GRAÇA CORREIA ROSAS

Estudo da variação da expressão de PGC-1
alfa na reprogramação e diferenciação de
células-tronco pluripotentes induzidas

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutor em Ciências

Programa de Ciências Médicas

Área de concentração: Distúrbios do Crescimento
Celular, Hemodinâmicos e da Hemostasia

Orientador: Prof. Dr. Heraldo Possolo de Souza

São Paulo

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Rosas, Graça Correia

Estudo da variação da expressão de PGC-1 alfa na reprogramação e diferenciação de células-tronco pluripotentes induzidas / Graça Correia Rosas. -- São Paulo, 2016.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Ciências Médicas. Área de Concentração: Distúrbios do Crescimento Celular, Hemodinâmicos e da Hemostasia.

Orientador: Heraldo Possolo de Souza.

Descritores: 1.Células-tronco pluripotentes induzidas 2.Reprogramação celular 3.Diferenciação celular 4.PGC-1 alfa 5.Metabolismo 6.Mitocôndrias 7.Doenças cardiovasculares 8.Miócitos cardíacos 9.Transdução genética

USP/FM/DBD-203/16

Aos meus pais, **Graça e José Manuel,**

Por todo o apoio e confiança que sempre
me deram desde o primeiro dia da minha
vida, e por nunca me terem deixado
desistir quando tudo parecia perdido.

Agradecimentos

Este trabalho foi desenvolvido com o apoio financeiro da CNPq – Conselho Nacional de apoio Científico e Tecnológico.

O meu mais profundo agradecimento vai para os meus pais, por toda a confiança e dedicação, por todo o amor e conhecimento, por toda a educação e investimento, por todas as palavras, por todas as brigas, por todos os sorrisos, por cada dia distante, por cada dia do meu lado, não só durante estes quase 5 anos, mas sim todos os dias dos meus 28 anos de vida. Sem vocês, nada disto seria possível. OBRIGADA!

Obrigada Mammy pela paciência infinita que tens comigo mas tu és a única pessoa que conhece o meu verdadeiro “geniozinho” que eu sei que não é fácil; obrigada por cada sorriso e cada gesto de amor; obrigada pelas conversas infinitas por telefone e por toda a coragem transmitida, mesmo quando até tu receavas que não fosse possível. obrigada por seres a melhor mãe do mundo.

Obrigada Papilis, por toda a sabedoria, por todas as conversas acertivas, pela garra e força transmitidas, pela vontade de vencer, por toda a teimosia que insiste em viver no meio de todo o nosso amor. Um obrigada especial por teres atendido ao meu pedido de desenho da capa, ficou incrível, és um génio!

Ao meu Mocholitos, Joshuazinho, por ser o irmão mais caricato e querido do mundo. És um desnaturado, mas mesmo assim, apoiaste me em todos os momentos que sentias que eu precisava. Não há melhor amigo como um irmão!

Aos meus avozinhos, que tanto sofreram com a minha distância; os únicos que sempre me fizeram chorar em todas as despedidas, os que fazem o meu coração ficar pequenino com apenas um sorriso.

À minha Sampinhas e principalmente à minha Pastel, por toda a companhia e amor que me deram. Sem vocês o meu coração não sorri diariamente.

A todas as pessoas que tiveram uma passagem, mesmo que breve, na minha vida em São Paulo, com cada um de vocês aprendi e cresci um bocadinho mais.

À Pepe, Lueines, Perroletas, por toda a amizade gratuita que me deu desde o primeiro dia em que me conheceu; pelas risadas sem motivo, por todas as brigas que nunca existiram, por toda atenção diária, por todas as baladas divertidas, por todas as madrugadas de longas e ininterruptas conversas, por cada hora, cada minuto, cada segundo, porque qualquer momento com você é feliz, mas principalmente, por todos os almoços e jantares que gentilmente levou até minha casa nesta última etapa do doutorado. Obrigada amiga/IRMÃ, vou-te dar sempre o melhor de mim.

À minha mais que tudo Thatiely, Thatinhas, por me ter deixado entrar no coração dela; você é uma pessoa excepcional, de coração único e personalidade incomparável. Obrigada por todas as ajudas, por me orientar, por me fazer sorrir, por partilhar vários momentos de felicidade comigo, e acima de tudo, por me ter ensinado a ser mais prática na vida. Irmãs para sempre!

À minha Estrely e à minha Vivoquinhas, por toda a amizade e cumplicidade que distribuímos em cada sorriso compartilhado. Vocês não existem! Graças a vocês, tenho a garantia que saio do Brasil com um coração cheio de amizades verdadeiras e que durarão uma eternidade.

À Txah, Chamils, Camilitis, por tudo aquilo que representa para mim. Por todos os momentos de vida, dentro e fora do laboratório, por toda a companhia e parceirismo, pela amizade incansável, pela persistência no amor. Obrigada Txah, vou morrer de saudades, mas você estará sempre presente meu coração.

Ao Manecas, Nelo, Neka, por simplesmente ter entrado na minha vida de uma forma tão espontânea e infinita. Tenho a certeza que estes laços se manterão no mínimo por mais 100 anos.

À Margui, por me ter apoiado no tempo que ainda habitava na mesma cidade que eu e pela confiança imediata – num instante nos tornamos tão próximas e tão cúmplices.

Ao Ticsi, ao Berny e ao Botelhas, pelo companheirismo, diversão e conversas de amizade eterna.

Ao meu Teddyzinho, pela amizade constante, pela atenção incansável e todos os momentos de paciência comigo.

À Laryssa, Gabi, Leletas, Mary por todos os momentos ÚNICOS que passamos! Meninas, vocês não existem, diversão, palhaçada e pura amizade é só com vocês! Vão todas no meu coração. Fica, tem boro!

Ao Diogo Biagi, por ter aceitado me ensinar tudo o que sabia sobre iPSCs, e por todas as conversas dentro e fora do local de trabalho, sem você, esta tese não seria a mesma.

À minha Nathalins por toda a amizade, parceria, compreensão e apoio. Amei te conhecer! Vou morrer de saudades suas, mas esta amizade não se vai perder.

Ao meu Rohnzinho, por tudo o que sempre faz por mim. Impressionante como você está sempre disposto a me ajudar, nem que seja a fazer companhia. Obrigada Rohny pela pessoa que você é, nunca me irei esquecer de você.

À Claritas, por me ter ajudado nesta reta final, por todas as opiniões e discussões de projeto e claro, por todas as festas! Você é demais! Um mega obrigada do fundo do coração!!!

Ao meu Pumba, embora tenhas chegado no “fim da festa” tiveste um papel fundamental para que o término fosse feliz. Obrigada, prometo que vou te retribuir com muitos momentos de extrema felicidade.

À minha Chabizinha e à Ritolitas por nunca me terem esquecido e por manterem este nosso grupo unido para sempre! Mesmo à distância de quase 9000 km, por quase 5 anos, com apenas duas visitas rápidas ao Porto, esta amizade nunca se perdeu no oceano. Deixamos de partilhar momentos rotineiros, mas nunca perdemos a referência da verdadeira amizade. Não sou ninguém sem vocês!

Ao Murrelitos, Joseph e Bins, por todos os jantares, todas as risadas, e por me fazerem sentir em casa. Tem Cebora!

À Gabi, Marcela, Laila e Thiago por todas as noites de funk inesquecíveis. Nunca vou esquecer que quem tem vergonha não se diverte.

Ao Prof. Dr. Heraldo, por todos os ensinamentos e por ter acreditado em mim.

Ao Prof. Dr. José Eduardo Krieger por ter cedido gentilmente as instalações do seu laboratório para que esta pesquisa fosse possível.

A todos os amigos e colegas de laboratório, que tornaram o ambiente de trabalho favorável para que tudo isto se realizasse. Levo isso no coração.

*Difficult roads often leads to
a beautiful destinations*

author unknown

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver)*

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 F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentações; 2011.

Sumário

1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	Doenças cardiovasculares	1
1.2	Células-Tronco Pluripotentes	2
1.1.1.	Apresentação geral	2
1.2.1	Metabolismo de células-tronco pluripotentes.....	4
1.3	Coativador 1 α do receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama (PPARY) – PGC1- α e doenças metabólicas.....	5
1.3.1	Apresentação geral	5
1.3.2	PGC-1 α e cardiomiócitos	10
1.4	Diferenciação das células iPS em cardiomiócitos	12
1.5	Hipótese	16
2	OBJETIVOS	17
2.1	Objetivo geral	17
2.2	Objetivos específicos.....	17
3	MATERIAL E MÉTODOS:	18
3.1	Vetores e Clonagem	18
3.1.1	Mapas de vetores	18
3.1.2	Clonagem de shRNA	21
3.1.3	Produção Viral	22

3.1.4	Titulação da produção viral	22
3.2	Culturas celulares	23
3.2.1	Reprogramação celular	23
3.2.2	Manutenção de células-tronco pluripotentes induzidas	25
3.2.3	Transdução de células-tronco pluripotentes induzidas – clone CTR	26
3.2.4	Subclonagem	26
3.2.5	Diferenciação de células-tronco pluripotentes induzidas em cardiomiócitos	27
3.3	Caracterização celular: técnicas de biologia celular	28
3.3.1	Cariótipo	28
3.3.2	Corpo embrióide	29
3.3.3	Coloração de fosfatase alcalina:	30
3.3.4	Imunofluorescência	30
3.3.5	Análise da expressão proteica por citometria de fluxo	31
3.4	Caracterização celular: técnicas de biologia molecular	33
3.4.1	Extração de RNA segundo o método de TRIzol	33
3.4.2	Análise da expressão gênica por reação de polimerase em cadeia em tempo real (qRT-PCR)	34
3.4.3	Análise estatística	36
4	RESULTADOS	37
4.1	Reprogramação de fibroblastos para geração de células-tronco pluripotentes induzidas humanas	37

4.2	Clonagem	38
4.2.1	Produção Viral	38
4.2.2	Transdução dos lentivírus produzidos portadores dos vetores de inibição e superexpressão no clone de células iPS gerado (clone CTR).....	40
4.3	Caracterização dos clones de células-tronco pluripotentes induzidas ...	44
4.3.1	Morfologia celular:.....	44
4.3.2	Capacidade de diferenciação nas três linhagens germinativas	46
4.3.3	Cariótipo.....	47
4.3.4	Presença de marcadores proteicos:	48
4.3.5	Presença de marcadores moleculares	50
4.4	Diferenciação.....	52
4.4.1	Desenvolvimento de um novo protocolo de diferenciação	52
4.5	Caracterização dos cardiomiócitos derivados da diferenciação de células-tronco pluripotentes induzidas	56
4.5.1	Avaliação da expressão dos marcadores moleculares durante a diferenciação em cardiomiócitos	56
4.5.2	Análise de expressão comparativa entre os clones controlo CTR e SCR.....	57
4.5.3	Caracterização dos marcadores proteicos durante a diferenciação em cardiomiócitos.....	68
5	DISCUSSÃO	73
5.1	Doenças cardíacas e células-tronco pluripotentes induzidas.....	74
5.2	Efeitos da inibição da expressão de PGC-1 α	75

5.3	Diferenciação em cardiomiócitos e o impacto da inibição de PGC-1 α ...	80
6	CONCLUSÃO	85
7	BIBLIOGRAFIA.....	86
8	ANEXOS.....	94
8.1	Anexo I	94
8.2	Anexo II	95

Lista de Figuras

Figura 1: Esquema do método de geração de células-tronco pluripotentes induzidas a partir de células adultas diferenciadas.....	3
Figura 2: Esquema representativo da estrutura dos coativadores PGC-1 α , PGC1 β - e PRC.....	6
Figura 3: Esquema representativo da regulação da expressão gênica pelos coativadores PGC-1.....	7
Figura 4: Interações transcricionais e funções regulatórias de PGC-1 α	9
Figura 5: Esquema da sinalização da via Wnt.....	13
Figura 6: Esquema representativo das etapas de diferenciação em cardiomiócito a partir de células-tronco pluripotentes induzidas.....	14
Figura 7: Sequência do plasmídeo policistrônico STEMCCA utilizado para reprogramação celular.....	19
Figura 8: (A) Mapa do plasmídeo pGP, utilizado para transdução dos vetores de inibição (C1, C2, C3, SCR). (B) Esquema representativo dos lugares de anelamento dos insertos demonstrados em Tabela 1.....	20
Figura 9: Esquema representativo do protocolo de reprogramação estabelecido.....	25
Figura 10: Imagens capturadas durante o processo de reprogramação celular, após transfecção de fibroblastos humanos com o lentivírus STEMCCA, na ampliação de 100x, em diferentes dias.....	38

Figura 11: Citometria de fluxo mostrando a eficiência de transfecção dos diferentes vetores em células NIH-3T3.....	40
Figura 12: Imagens capturadas por microscopia de fluorescência dos subclones das células transduzidas, GFP positivas: SCR, C2 e C3.....	42
Figura 13: Expressão do gene <i>PGC-1α</i> dos clones gerados.....	43
Figura14: Caracterização morfológica das colônias de células-tronco pluripotentes induzidas geradas, sobre GelTrex.....	45
Figura 15: Expressão de Fosfatase Alcalina em células-tronco pluripotentes induzidas.....	46
Figura 16: Corpos embrióides gerados a partir dos clones de iPSCs – controle (CTR), controle <i>scramble</i> (SCR), e os dois clones com inibição de expressão de <i>PGC-1α</i> (C2 e C3), na ampliação de 200x.....	47
Figura 17: Cariótipo obtido segundo método de bandeamento GTG dos clones de iPSCs gerados entre as passagens 20 a 30 (CTR- controle; SCR- <i>scramble</i>).....	48
Figura 18: Imagens capturadas do microscópio de fluorescência para análise da presença de marcadores proteicos de pluripotência dos 4 clones de iPSCs geradas.....	49
Fugura 19: Expressão relativa de marcadores moleculares de pluripotência: <i>POU5F1</i> , <i>SOX2</i> e <i>REX1</i>	51
Figura 20: Células iPS (clone CTR) no dia 0 de diferenciação, em duas ampliações diferentes.....	53

Figura 21: Células de iPS (clone CTR) 24 horas (dia 1) após indução de formação de células de mesendoderme pela adição de diferentes concentrações de CHIR.....	54
Figura 22: Esquema resumido do protocolo de diferenciação de células iPS em cardiomiócitos, adaptado e utilizado neste trabalho.....	55
Figura 23: Perfil de expressão dos genes <i>SOX2</i> e <i>PGC-1α</i> nos dias de diferenciação.....	58
Figura 24: Perfil de expressão do gene <i>PGC-1α</i> dos clones C2 (A) e C3 (B), comparativamente com o clone controle SCR.....	60
Figura 25: Expressão relativa dos principais marcadores moleculares de mesendoderme: <i>T</i> (A) e <i>MIXL1</i> (B).....	62
Figura 26: Expressão relativa do gene <i>ISL1</i> , marcador específico da mesoderme cardíaca.....	64
Figura 27: Expressão relativa de genes progenitores cardíacos: <i>MEF2C</i> (A) e <i>MYL7</i> (B).....	65
Figura 28: Expressão do gene de troponina I (<i>TNNI3</i>) durante a diferenciação celular, para os três clones: <i>scramble</i> (SCR), C2 e C3.....	67
Figura 29: Porcentagem de eventos positivos obtidos por citometria de fluxo para marcadores proteicos de pluripotência – (A) SSEA4, (B) TRA-1-60 e (C) NANOG, para marcadores de progenitores cardíacos – (F) NKX2.5, e para marcadores de cardiomiócitos – (E) cTnT.....	69
Figura 30: Imagens capturadas através do microscópio de fluorescência, das células do clone SCR no dia 15 da diferenciação de cardiomiócitos.....	73

Lista de Tabelas

Tabela 1: Sequências de *short hairpin*-RNA que foram clonadas no plasmídeo pGP.....**20**

Tabela 2: Lista de anticorpos utilizados para a reação de imunofluorescência.....**31**

Tabela 3: Lista de anticorpos utilizados para a reação de citometria.....**33**

Tabela 4: Sequências dos *primers* utilizados.....**35**

Lista de Abreviações

ATP – adenosina tri-fosfato

BMP – do inglês, *bone morphogenetic protein*

BR-1 – linhagem de células embrionárias humanas

BSA – soro fetal bovino; do inglês, *bovine serum albumin*

C2 – clone de células com 70% de inibição da expressão de PGC-1 α

C3 – clone de células com 50% de inibição da expressão de PGC-1 α

cAMP – adenosina monofosfato cíclico

Cdk – quinase dependente de ciclina

CDM3 - Meio de cultura composto de RPMI, albumina e vitamina-C

cDNA – DNA complementar

c-MYC - gene, do inglês, *v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog*

CREB – proteínas de ligação aos elementos de resposta a cAMP

cTnT2 – proteína de troponina T

CTR – clone de células controle

D10F – Meio DMEM suplementado com 10% de SFB

D10F12 – Meio DMEM F12 suplementado com 10% de SFB

DEPC – dietilpirocarbonato

DMEM – Meio de cultura, do inglês, *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*

DMSO – sulfóxido de dimetilo

DNA – ácido desoxiribonucleico

DPBS-- - solução balanceada DPBS sem magnésio e sem cálcio

DPBS – solução balanceada, do inglês, *Dulbecco's Phosphate Buffered Saline*

E6 – Meio de cultura *Essential 6*

E8 – Meio de cultura *Essential 8*

EROS – espécies reativas de oxigênio

ERR – receptores relacionados ao estrogênio

ESC – célula-tronco embrionária

FACS – do inglês, *Fluorescence-activated cell sorting*

FAO – oxidação de ácidos graxos; do inglês, *fat acid oxidation*

GATA4 - gene, do inglês, *GATA binding protein 4*

GFP – proteína de fluorescência verde; do inglês, *Green Fluorescent Protein*

GSK3 – glicogênio sintase quinase

HAT – histona acetil transferase

HBSS – Solução salina balanceada de Hank

HCN4 - gene, do inglês, *Hyperpolarization activated cyclic nucleotide-gated potassium channel 4*

HEK293T – células embrionárias do rim; do inglês, *Human Embryonic Kidney*

HEPES – do inglês, *4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid*

iPSC – célula-tronco pluripotente induzida, do inglês *induced pluripotent stem cell*

ISL1 - gene, do inglês *Islet 1*

KLF4 - gene, do inglês, *Kruppel-like factor 4*

KY - Composto químico KY21111

LB – meio de cultura de bactéria Luria-Bertani

LGCM – Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular

MAP2 – gene, do inglês, *Microtubule-associated 2*

MEF2C – gene, do inglês, *Myocyte-specific enhancer factor 2C*

MIXL1 – gene, do inglês, *Mix Paired-Like Homeobox*

MLC2A - gene, do inglês, *Myosin light chain 2A*

MLC2V - gene, do inglês, *Myosin light chain 2V*

mRNA - RNA mensageiro

MSC – célula-tronco mesenquimal

mtDNA – DNA mitocondrial

MYL7 - gene, do inglês, *Myosin heavy chain 7*

NIH3T3 – linhagem celular de fibroblastos embrionários de murino

NKX2.5 - gene, do inglês, *NK2 homeobox 5*

NR – receptor nuclear; do inglês, *nuclear receptor*

NRF – fator de respiração nuclear; do inglês, *nuclear receptor factor*

OCT4 – gene, do inglês, *Octamer-binding transcription factor 4*

PBS - PBS – Tampão fosfato-salino

PCR – reação de *polymerase* em cadeia

PFA – paraformaldeído

PGC – coativador gama do receptor ativado do proliferador de peroxissoma

pGP – plasmídeo pGreenPuro

POU5F1 – gene codificador do fator de transcrição OCT4

PPAR – receptor ativado do proliferador de peroxissoma

PRC – coativador relacionado com PGC

RB- - Meio RPMI suplementado com soro B27 sem insulina

RB+ - Meio RPMI suplementado com soro B27

REV - Plasmídeo empacotador de lentivirus

Ri – do inglês, *Rock Inhibitor*

RMPI - Meio de cultura *Roswell Park Memorial Institute*

RNA – ácido ribonucleico

RT-qPCR - reação da cadeia de *polymerase* em tempo real

SCR – clone de células controle *scramble*

SFB – soro fetal bovino

shRNA – *short hairpin* RNA

SOX17 - gene, do inglês, *Sex determining region Y- box 17*

SOX2 - gene, do inglês, *Sex determining region Y- box 2*

SRC – receptores de esteroides

SSEA4 - gene, do inglês, *Stage-specific embryonic antigen-4*

STEMCCA - do inglês Stem cell casset

T – gene *Brachyury*

Tfam – fator de transcrição mitocondrial

TNNT2 - gene, do inglês, *cardiac troponin T2*

TNNI3 – gene, do inglês, *Troponin I type 3*

TRA-1-60 – epítipo presente em células-tronco pluripotentes

TRA-1-81 – epítipo presente em células-tronco pluripotentes

VSV-g - proteína VSV-G de envelope viral

XAV - composto químico XAV939

WNT - do inglês, wingless-type MMTV integration site

β 2M – gene, do inglês, *beta-2-microglobulin*

Lista de Símbolos

% - porcentagem

°C – graus Célsius

pb – pares de bases

α – alfa

β – beta

γ – gama

δ – ómega

Ca^{2+} - ião cálcio

CO_2 – dióxido de carbono

MgCl_2 – cloreto de magnésio

NaB – butirato de sódio

KCl – Cloreto de potássio

U - unidade

g – constante gravitacional

Rpm – rotações por minuto

Δ – delta

MOI – multiplicidade de infecção

M – molar

g – grama

L – litro

cm² – centímetro quadrado

mm – milímetro

mg – miligrama

mL - mililitro

ng – nanograma

nM – nanomolar

μM – micromolar

μg – micrograma

μL – microlitro

μm – micrómetro

nm – nanômetro

mM – milimolar

Resumo

Rosas, GC. *Estudo da variação da expressão de PGC-1 α na reprogramação e diferenciação de células-tronco pluripotentes induzidas* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2016.

As doenças cardiovasculares representam a maior causa de mortalidade a nível mundial. Desde o conhecimento da importância da mitocôndria no metabolismo do cardiomiócito, alterações no funcionamento desta organela têm sido associadas a um dos principais causadores do infarto do miocárdio e consequente morte celular. O cofator de transcrição PGC-1 α tem sido alvo de diversos estudos relacionados com o metabolismo celular devido à sua forte participação na biogênese mitocondrial. Considerando a limitação de material biológico para o estudo de doenças cardíacas, muito se tem investido no estudo de células-tronco pluripotentes induzidas (iPSCs). Esta tese teve como principal objetivo a avaliação dos efeitos da variação da expressão de PGC-1 α em iPSCs e na sua diferenciação em cardiomiócitos. Após estabelecimento de um protocolo de reprogramação celular, em que ocorre geração de iPSCs a partir de fibroblastos humanos, induzimos a inibição da expressão de PGC-1 α em 50% e 70% pelo uso de vetores lentivirais, e analisamos o estado de pluripotência através da avaliação de expressão genica e proteica dos principais marcadores – SSEA4, TRA-1-60, OCT4, NANOG, SOX2, REX1, TRA-1-81. Não observamos diferenças significativas no conteúdo destes marcadores entre os clones de iPSC controle e inibidos. Estabelecemos um protocolo de diferenciação de iPSCs em cardiomiócitos com elevada taxa de reprodutibilidade, através da adaptação de protocolos descritos na literatura, e submetemos estas iPSCs à diferenciação. As células geradas pela diferenciação do clone controle apresentaram características típicas de cardiomiócito: contratilidade e alta expressão molecular de troponina T e troponina I. Em contraste, as células com 70% de inibição de PGC-1 α se mostraram incapazes de contrair e com baixa expressão de troponina. Através de uma análise dos níveis de expressão genica e proteica de diversos marcadores expressos durante o processo de diferenciação (T, NKX2.5, MIXL1, MYL7, ISL1), observamos que o clone com maior inibição de PGC-1 α

apresentou sempre níveis de expressão diminuídos em relação aos clones controle. Em conclusão, podemos afirmar que o PGC-1 α não interfere com as características de auto-renovação e pluripotência das iPSCs mas possui um papel essencial na diferenciação de células-tronco pluripotentes induzidas em cardiomiócitos. Os resultados obtidos contribuem para informações preliminares acerca do desenvolvimento de iPSCs com inibição da expressão de PGC-1 α durante a diferenciação cardíaca, mas estudos relativos ao potencial papel deste cofator durante o desenvolvimento cardíaco *in vivo* ainda precisam ser aprofundados, utilizando outros modelos de estudo.

Descritores: células-tronco pluripotentes induzidas; reprogramação celular; diferenciação celular; PGC-1 alfa; metabolismo; mitocôndrias; doenças cardiovasculares; miócitos cardíacos; transdução genética.

Abstract

Rosas, GC. *A study of the variation in expression of PGC-1 α on the reprogramming and differentiation of induced pluripotent stem cells* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2016.

Cardiovascular diseases are the leading cause of mortality worldwide. Since the knowledge of the importance of mitochondria in the cardiomyocyte metabolism, changes in the functioning of this organelle has been associated with one of the main causes of myocardial infarction and subsequent cell death. The transcriptional cofactor PGC-1 α has been subjected to several studies related to cell metabolism due to its strong involvement in mitochondrial biogenesis. Considering the limitations of biological material in the study of heart disease, there has been a lot of investment in the study of induced pluripotent stem cells (iPSCs). The main objective of this thesis was to evaluate the effects of the variation in expression of PGC-1 α in iPSCs and its differentiation in cardiomyocytes. After the establishment of a cellular reprogramming protocol, where iPSCs is generated from human fibroblasts, the expression of PGC-1 α was induced by 50% and 70% with the use of lentiviral vectors and the state of pluripotency was determined by analyzing the gene and protein expression of the main markers - SSEA4, TRA-1-60, OCT4, NANOG, SOX2, REX1, TRA-1-81. There were no significant differences observed in the content of these markers between the iPSC clones control and inhibited. A protocol for the differentiation of iPSCs into cardiomyocytes was established with a high reproducibility rate, by adapting existing protocols in the general literature, submitting these iPSCs into differentiation. The cells generated from the differentiation of the control clone showed typical characteristics of cardiomyocytes: contractility and high molecular expression of troponin T and troponin I. In contrast, the cells with 70% inhibition PGC-1 α were unable to contract and had low troponin expression. Through an analysis of gene expression and protein levels of several markers expressed during the differentiation process (T, Nkx2.5, MIXL1, MYL7, ISL1), the clone with greater inhibition of PGC-1 α always showed decreased expression levels compared to control clones. In conclusion, we can say that the PGC-1 α does not interfere

with the characteristics of self-renewal and pluripotency of iPSCs but has an essential role in the differentiation of pluripotent stem cells induced into cardiomyocytes. These results were obtained thanks an original approche based on iPSC technology enabling genetic modifications of the cells and controled differentiation into cardiomyocytes, but the potential role of PGC-1 α on in vivo cardiac development or cardiomyocytes maturation remain to be evaluated using other models.

Descriptors: Induced pluripotent, stem cells; cellular reprogramming; cell differentiation; PGC-1 α ; metabolism; mitochondria; cardiovascular diseases; myocyte, cardiac; transduction, genetic.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Doenças cardiovasculares

As doenças cardiovasculares representam a maior causa de mortalidade, atingindo cerca de 30% da população mundial (1). Apesar de existirem várias publicações acerca do funcionamento, morfologia, fisiologia e expressão gênica de células cardíacas, o entendimento e tratamento de injúrias, como o infarto do miocárdio, ainda não está completamente elucidado (2). Desde o conhecimento da importância da mitocôndria no metabolismo celular do cardiomiócito, alterações no funcionamento desta organela têm sido associadas a um dos principais causadores do infarto do miocárdio e consequente morte celular.

Evidências recentes sugerem que o miocárdio adulto é capaz de regenerar algumas células após injúria, mas em número limitado, o que não permite o reestabelecimento do funcionamento normal do coração (3). Consequentemente, o transplante de coração reside como a melhor alternativa de sobrevivência ou aumento da qualidade de vida dos pacientes, mas o número de doadores é muito limitado. Nas últimas décadas, tem se discutido sobre o desenvolvimento de terapias celulares como uma estratégia alternativa, através do uso de células-tronco mesenquimais (do inglês, MSCs) ou até de células-tronco progenitoras cardíacas (4, 5). Infelizmente, o transplante destas células não constitui uma estratégia funcional na reconstrução tecidual, mas contribui para um efeito parácrino pela liberação de moléculas bioativas fortemente associadas aos processos de angiogênese, que demonstram uma tendência em preservar a função cardíaca (6). Novas terapias medicamentosas e técnicas de revascularização cirúrgica são ainda as estratégias mais utilizadas, mas que não evitam a perda de tecido contrátil e falência cardíaca.

1.2 Células-Tronco Pluripotentes

1.2.1 Apresentação geral

Tendo em consideração a limitação de material biológico para o estudo das desordens cardíacas em humanos, muito se tem investido nas células-tronco pluripotentes com vista na criação de novas terapias e, principalmente, na compreensão do funcionamento cardíaco.

Após o estabelecimento de culturas de linhagens celulares pluripotentes derivadas de blastocistos de camundongos (7), James Thomson, em 1998, renovou as esperanças de médicos, pesquisadores e pacientes através do isolamento e manutenção de células-tronco embrionárias humanas (do inglês ESCs) em cultura (8), provenientes da massa interna do blastocisto. As ESCs são células com algumas capacidades peculiares, intrínsecas às suas principais características: 1) conseguem se auto-renovar de forma ilimitada, e por isso podem ser mantidas em cultura por um longo período de tempo, permitindo a obtenção de um grande número de células; 2) e pluripotência, capazes de se diferenciarem em qualquer célula do organismo. Graças à sua capacidade de diferenciação em qualquer tipo de célula funcional, como hepatócitos, cardiomiócitos, neurônios, etc, estas células tornam-se potencialmente muito úteis para a regeneração celular e terapia de doenças. Contudo, existem ressalvas e discussões éticas e políticas quanto à sua manutenção e utilização terapêutica, devido à sua origem e isolamento estarem relacionados com o uso de embriões humanos.

O mesmo fenômeno de pluripotencialidade foi então reproduzido artificialmente em células adultas pela combinação de quatro fatores de transcrição (denominados hoje em dia, por fatores de Yamanaka): OCT3/4, SOX2, KLF4 e c-MYC. Inicialmente produzidas a partir de células de fibroblastos de camundongo (9) e, posteriormente, de fibroblastos de pele humana (10), estas células foram denominadas de células-tronco pluripotentes induzidas (do inglês, iPSCs) e possuem as mesmas características de auto-renovação e pluripotência do que as ESCs (Figura 1). Shinaya Yamanaka,

vencedor do prêmio Nobel da Medicina em 2012 pelo desenvolvimento e caracterização destas células iPS, possibilitou a criação de novos modelos de estudo *in vitro* de certas doenças que até então eram dificultadas por limitação de conteúdo biológico, como células provenientes do coração ou até neurônios.

Figura 1: Esquema do método de geração de células-tronco pluripotentes induzidas a partir de células adultas diferenciadas (método de reprogramação desenvolvido por Shinaya Yamanaka) (Adaptado de Jacob Marks, Yale Scientific, 2014)

Desde 2006, diversos métodos de reprogramação de células adultas foram desenvolvidos, utilizando diferentes tipos de vetores e até combinações diferentes de genes, com resultados de eficiência distintos (11, 12). Inicialmente, esta técnica utilizava a integração do material exógeno no genoma da célula hospedeira por meio de retrovírus ou lentivírus; os genes transfectados podem estar separados em diferentes plasmídeos ou vírus (11), ou podem estar todos contidos em um *cassete* – vetor policistrônico (13). Com o objetivo de evitar a integração do transgene no genoma celular (14), foram desenvolvidas novas técnicas que utilizam vírus não integrativos (vírus *Sendai*,

por exemplo) (15), ou apenas por transfecção de mRNA (16) ou até através da nucleoporação de vetores episomais (17). Este último método é o mais indicado no caso de eventuais terapias celulares devido à ausência de integração viral, embora seja mais demorada a eliminação dos fatores episomais. Para modelamento de doenças, os métodos de transfecção viral não interferem nos dados do estudo uma vez que há garantia de silenciamento dos transgenes, e desde que não ocorra integração do material viral em um local causador de mutações no genoma da célula (12, 13). Hoje em dia, todas estas metodologias também podem ser utilizadas com outros tipos de células somáticas, como por exemplo, células provenientes da urina (18), o que se torna uma vantagem no procedimento de coleta de células, uma vez que se trata de uma método menos invasivo.

1.2.2 Metabolismo de células-tronco pluripotentes

As células-tronco embrionárias caracterizam-se principalmente pelas suas capacidades de proliferação ilimitada e diferenciação em diversos tipos celulares. Estas possuem uma capacidade ilimitada de auto-renovação sem entrar em estado de senescência (19) devido a modulação seletiva das principais vias relacionadas com este mecanismo, tais como o tamanho aumentado de telômero e alta atividade da telomerase (8), atividade reduzida de p53 (20), e baixos níveis de espécies reativas de oxigênio (EROS) e atividade mitocondrial (21) quando comparadas com células diferenciadas. As células iPS apresentam estas mesmas características exceto com pequenas variações na questão da atividade mitocondrial e na produção de EROS, talvez por serem geradas através de um método de reprogramação artificial, mas que ainda precisam ser esclarecidos (22). Alguns estudos dedicados inteiramente a uma análise ampla do perfil de expressão gênica destas células descrevem algumas diferenças na expressão de genes específicos, o que sugere que o grau de similaridade molecular ainda precisa ser mais aprofundado (23).

Durante o desenvolvimento e diferenciação celular, as ESCs utilizam diferentes vias metabólicas para a obtenção de energia, uma vez que está

comprovada que a respiração mitocondrial está estritamente associada à perda da pluripotencialidade das células (21, 24). Ocorrem diversas alterações na mitocôndria durante o desenvolvimento e envelhecimento celular: para além do aumento em número e tamanho, iniciam a sua atividade funcional para produção de energia via fosforilação oxidativa, aumentando significativamente a quantidade de adenosina-tri-fosfato (ATP) e, conseqüentemente, a produção de EROS (25, 26). Considerando estes fatos, a glicólise anaeróbica é a via de obtenção de energia mais favorável para o crescimento de células-tronco pluripotentes induzidas. Estas vias são alteradas dependendo do estado de diferenciação e maturação da célula para respiração aeróbia e produção de energia via fosforilação oxidativa (27, 28).

Neste contexto, diversos artigos descritos na literatura comprovam que ocorrem várias alterações na mitocôndria durante a reprogramação e a diferenciação celular (28-30). A replicação de DNA mitocondrial (mtDNA) é controlada por fatores codificados no núcleo e que posteriormente são transferidos para a mitocôndria (31). Elementos fundamentais na biogênese mitocondrial são os coativadores de transcrição gênica da família dos coativadores do receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama (PPAR γ) - PGC-1.

1.3 Coativador 1 α do receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama (PPAR γ) – PGC1- α e doenças metabólicas

1.3.1 Apresentação geral

O PGC-1 α está localizado no cromossomo 5 e codifica uma proteína constituída por 798 aminoácidos (em humanos), no núcleo da célula. Este foi primeiramente descrito por Puigserver e colaboradores, em 1998, pela sua interação com o receptor nuclear PPAR γ em células do tecido adiposo marrom

após exposição a baixas temperaturas devido ao seu efeito regulador de termogênese adaptativa (32). Posteriormente, foram descritos dois fatores desta mesma família – PGC-1 β e o coativador relacionado com PGC-1 (PRC) (33, 34), que apresentam diversas similaridades quanto à sua estrutura e domínios (Figura 2).

Figura 2: Esquema representativo da estrutura dos coativadores PGC-1 α , PGC-1 β e PRC. Os três membros da família de PGC-1 compartilham homologia em alguns domínios: domínio de ativação, domínio rico em arginina/serina e no domínio de ligação ao RNA. PGC-1 α e PGC-1 β também compartilham de similaridades no domínio de repressão da transcrição. (Adaptado de Lin e colaboradores, 2005)(35).

Os cofatores PGC-1 α e PGC-1 β são preferencialmente expressos em tecidos com elevada capacidade oxidativa, como o coração, o tecido de músculo esquelético e o tecido adiposo marrom (36-38). A indução da superexpressão destes cofatores em cultura de células demonstrou que estes são capazes de ativar genes regulatórios e induzir o aumento da capacidade de produção de energia celular (36-39). Quando há alterações de ambiente, o cofator de subunidade α facilita a adaptação biológica de demanda energética na célula, aumentando a biogênese mitocondrial, elevando os níveis de respiração celular e controlando o consumo do substrato energético existente.

Um coativador de transcrição é definido como uma proteína ou um complexo de proteínas que aumenta a probabilidade de ocorrer transcrição de um gene específico, pela sua interação com fatores de transcrição (40). Portanto, como podemos observar pelo esquema da Figura 3, o PGC-1 α não se liga diretamente ao DNA mas exerce a sua principal função de regular a homeostase energética da célula através da sua capacidade em se ligar a outros fatores de transcrição ou receptores nucleares (NRs). Entre eles, estão os NRF-1 e NRF-2, relacionados com a respiração mitocondrial, receptores α relacionados ao estrogênio (ERR α) e PPARs ou outros fatores que controlam a disponibilidade de nutrientes, ácidos graxos e carboidratos (41).

Figura 3: Esquema representativo da regulação da expressão gênica pelos coativadores PGC-1. PGC-1 liga-se diretamente aos fatores de transcrição e serve como uma âncora para a ação das enzimas modificadoras de histonas, TRAP/DRIP/complexo mediador, e a maquinaria de *splicing* do RNA. (Adaptado de Rowe e colaboradores, 2010) (42)

Os fatores de respiração nucleares 1 e 2 (NRF-1 e NRF-2) estão intimamente ligados ao controle transcricional dos genes mitocondriais (33). Estes dois fatores conseguem se ligar ao promotor Tfam, permitindo assim a ativação da transcrição de genes essenciais para a biogênese mitocondrial

(39). Mas nem todos os genes coordenadores da biogênese mitocondrial são ativados pelos NRFs. Por exemplo, a expressão das proteínas envolvidas no transporte e oxidação de ácidos graxos nas mitocôndrias é regulada pelo receptor ativado pelo proliferador de peroxissoma α – PPAR α (43). Os PPARs são uma família relativamente grande de receptores nucleares, cuja transcrição depende da coativação por PGC-1 α : PPAR γ é essencial para os processos de diferenciação e adipogênese (44), e interage com componentes utilizados para o aumento de insulina (45); PPAR α e PPAR δ possuem funções muito importantes no controle da oxidação de ácidos graxos (46). PGC-1 α interage com PPAR α para regular a expressão dessas enzimas e proteínas transportadoras, controlando também a biogênese mitocondrial (42, 47).

A maioria dos genes induzidos por PGC-1 α possuem um sítio de ligação a ERRs. A família de ERRs interage com promotores de genes envolvidos na absorção de substratos, produção e transporte de ATP através da membrana intracelular e mitocondrial. Estudos demonstraram que a superexpressão de ERR α resulta na indução de genes envolvidos no metabolismo da glicose, de ácidos graxos e na fosforilação oxidativa em cardiomiócitos de camundongo neonatal (48); por sua vez, a inibição da expressão de ERR α em camundongos com aumento de pressão no ventrículo esquerdo leva a falência cardíaca, o que comprova que este fator tem uma grande importância na resposta bioenergética adaptativa (49). Em contraste, foi demonstrado recentemente que alterações nos níveis de expressão de ERR γ provocam desregulação na expressão de genes envolvidos na biogênese mitocondrial e, consequentemente, a anomalias no coração de embriões de camundongo. Isto sugere que o receptor γ tenha um papel importante na transição para metabolismo oxidativo de ácidos graxos após o nascimento (50). A Figura 4 retrata algumas das interações de PGC-1 α e das suas funções regulatórias.

Figura 4: Interações transcricionais e funções regulatórias de PGC-1 α . Diversos estímulos ativam o PGC-1 α/β , levando à coativação dos fatores de transcrição envolvidos na oxidação e transporte de ácidos graxos, angiogênese, montagem da cadeia de transporte de elétrons, biogênese membranar, transcrição e replicação do DNA mitocondrial. (Adaptado de Rowe e colaboradores, 2010) (42)

O PGC-1 α também não possui atividade de histona acetiltransferase (HAT), mas através de alterações conformacionais na sua própria estrutura após acoplamento com fatores de transcrição específicos, aumentam a afinidade do complexo de transcrição com coativadores adicionais com atividade HAT, como o coativador 1 da família de receptores de esteroides (do inglês, SRC-1), proteínas de ligação aos elementos de resposta a cAMP (do inglês, CREB) e p300 (51, 52).

1.3.2 PGC-1 α e cardiomiócitos

Os cardiomiócitos são células que exigem uma grande quantidade de energia, devido à sua constante contratilidade. Possuem uma alta atividade mitocondrial diretamente relacionada com os níveis de expressão muito elevados de PGC-1 α (53). Diversos estudos comprovaram que é o PGC-1 α que controla as vias metabólicas cardíacas durante o desenvolvimento, uma vez que a expressão deste aumenta quando a célula troca a sua fonte de energia para oxidação de ácidos graxos na mitocôndria (39, 52). A sua expressão também aumenta em resposta a estresses fisiológicos, como o jejum de células cardíacas, por aumentar significativamente a dependência do coração na oxidação de gordura para produção de ATP (54-56).

PGC-1 α coativa PPAR α e ERR α , que são NRs que controlam diversos genes envolvidos na oxidação de ácidos graxos do coração, na biogênese mitocondrial e na função de respiração mitocondrial (Figura 4) (53). Estudos realizados em cardiomiócitos de camundongo comprovam que a indução de superexpressão de PGC-1 α aumenta exacerbadamente a biogênese mitocondrial, em número e em tamanho, e aumenta a regulação positiva de genes relacionados, conduzindo a cardiomiopatias derivadas da desregulação do metabolismo (cardiomiopatia dilatada, por exemplo). Quando perante uma situação inversa, em que a expressão de PGC-1 α é inibida, surpreendentemente o volume e densidade de mitocôndrias permanecem normais e a expressão de genes é atenuada, mas ainda assim observa-se uma aceleração da disfunção cardíaca (39, 57, 58).

Em casos de insuficiência cardíaca, tratamentos de hipertensão ou até hipertrofia, observa-se uma regulação negativa dos níveis de expressão de PGC-1 α nas células do coração (56, 59).

Diversas vias de sinalização utilizadas por cardiomiócitos regulam a expressão e atividade de PGC-1 α . O aumento da atividade contrátil na célula implica em um aumento da concentração de cálcio intracelular, que ativa a calcineurina fosfatase dependente de cálcio (CaN) e a quinase calciomodulina-Ca²⁺ dependente (CaMK) (60). CaN controla a expressão de

PGC-1 α no músculo, que proporciona uma via de sinalização de cálcio que estimula a atividade mitocondrial. A perda de CaN em cardiomiócitos é prejudicial para o transporte de elétrons, o que é associado a níveis muito elevados de produção de superóxidos (61-63). A família de quinases dependentes de ciclina (CDKs) estão envolvidas com o ciclo celular e/ou com o controle transcricional e também interagem com PGC-1 α . Alguns estudos de perfil de expressão gênica demonstraram que a ciclina T/Cdk9 (uma quinase da RNA polimerase envolvida na hipertrofia cardíaca), suprime a expressão da maioria dos genes que codificam as proteínas mitocondriais, tal como PGC-1 α . O heterodímero dependente de ciclina MAT1 é ativado durante eventos de estresse no crescimento de células hipertróficas; a sua inibição origina supressão de genes envolvidos no metabolismo cardíaco, como é o caso de PGC-1 α (64, 65).

Lehman e colaboradores, 2002, realizaram um extensivo trabalho sobre a regulação dinâmica do complexo PPAR/PGC-1 α em cardiomiócitos e o seu controle de produção de energia mitocondrial após o início de hipertrofia cardíaca e observaram que, durante o desenvolvimento do tecido lesado, a regulação negativa de PPAR α e PGC-1 α origina uma diminuição na expressão dos genes responsáveis pela oxidação de ácidos graxos (FAO) (66). Outros estudos também relataram que a regulação negativa de PGC-1 α e dos seus efetores NRF2 e Tfam está intimamente ligada com a diminuição da atividade mitocondrial e consequente hipertrofia cardíaca, infarto do miocárdio e hipertensão espontânea. Estes resultados sugerem que a diminuição da expressão e transcrição da cascata de PGC-1 α /PPAR α são as principais causas moleculares para a insuficiência de produção de energia no miocárdio lesado (67-69).

Podemos então concluir que PGC-1 α é o maior responsável pela biogênese mitocondrial no músculo cardíaco e consequentemente do controle de produção de EROS (58), e possui um papel muito importante nos mecanismos patogênicos da hipertrofia do miocárdio e de insuficiências cardíacas (70).

1.4 Diferenciação das células iPS em cardiomiócitos

Durante o desenvolvimento embrionário são formadas três linhas germinativas capazes de se diferenciarem em todos os tipos celulares que constituem um novo organismo. Dependendo do seu estado de diferenciação e do tecido que irão originar, estas células utilizam diferentes vias metabólicas e diferentes demandas de energia até e após a diferenciação completa.

No caso do tecido cardíaco, os estágios da sua formação já foram caracterizados, incluindo as vias de sinalização utilizadas pelas células até ao final do desenvolvimento. A grande maioria dos protocolos de diferenciação de células iPS ou ESCs em cardiomiócitos desenvolvidos baseia-se na alteração das vias de sinalização descritas por trabalhos que estudaram a cardiomiogênese animal (71).

Resumidamente, podemos dividir os protocolos descritos na literatura em dois grupos: os que utilizam uma pré-agregação de células pluripotentes em estruturas esféricas (corpos embrióides) (72, 73), e os que utilizam as células-tronco pluripotentes em monocamada (74). No geral, todos os protocolos utilizam a superexpressão e consequente bloqueio de fatores associados à via Wnt, por ser considerada a chave de regulação da cardiomiogênese *in vitro* e *in vivo*. As proteínas morfogenéticas do osso (BMPs) e as proteínas da família Wnt são muito importantes na formação do coração durante o desenvolvimento embrionário, uma vez que as primeiras estão envolvidas nos estágios primários de formação do coração, e que a sua interação com as segundas completam a interação molecular necessária para o seu funcionamento (75, 76). A via canônica Wnt (clássica) utiliza uma sinalização mediada por β -catenina, essencial para o desenvolvimento cardíaco primário enquanto que a via não canônica (não clássica) envolve uma sinalização mediada por JNK e Ca^{2+} , para que ocorra a regulação cardíaca subsequente. (75).

Figura 5: Esquema da sinalização da via Wnt. Quando a via Wnt está inibida (A), ocorre formação do complexo proteico de β-catenina no citoplasma que é posteriormente fosforilado por GSK3 e degradado por proteossomas, não ocorrendo a transcrição de genes alvo de Wnt. (B) Quando Wnt está ativa, a GSK3 está ligada ao seu complexo, permitindo o acúmulo de β-catenina no citoplasma e a sua migração para o núcleo, permitindo a transcrição dos genes alvo. (Adaptado de MacDonald, 2009) (77)

Num primeiro estágio do processo de diferenciação em cardiomiócitos, a via Wnt é ativada e, conseqüentemente a via glicogênio sintase quinase 3 (GSK3) é inibida, levando ao acúmulo de β-catenina no citoplasma e subsequentemente no núcleo, permitindo a transcrição de genes favoráveis à via Wnt (Figura 5B). Ocorre a formação de mesendoderme, e dependendo da concentração da molécula utilizada para ativação desta via, bem como do seu tempo de ação, estas células podem dar origem a um tecido endodérmico (superior a 48 horas) ou mesodérmico (inferior a 48 horas) (78-80). Logo após a formação deste tipo celular, o gene *Brachyury* (*T*) apresenta níveis de expressão muito elevados, mas que vão sendo reduzidos com a maturação das células em mesoderme (*MIXL1* e *MSX1*). A próxima etapa define o destino da mesoderme gerada, através da formação de células progenitoras cardíacas. Para tal, é necessário inativar a via Wnt. Este fenômeno poder ser realizado

por diferentes compostos químicos em concentrações e tempos distintos. Neste trabalho nós optamos pelo uso da associação de dois conhecidos componentes (XAV939 e KY02111). A inativação da via Wnt provoca a clivagem e fosforilação do complexo de β -catenina formado, seguido da ubiquitinação do excesso deste composto por proteossomas (Figura 5A). Uma vez livre no citoplasma, esta ainda possui a capacidade de migrar para o núcleo, ativando a expressão de fatores de transcrição que irão conduzir esta diferenciação no sentido cardíaco (ISL1, HCN4 e NKX2.5). A partir desta etapa, as células diferenciam-se em cardiomiócitos imaturos, até à remoção completa dos inativadores da via de Wnt. GATA4 e MEF2C são dois importantes reguladores do desenvolvimento cardíaco, e por isso a sua expressão nesta etapa é elevada, acompanhada dos genes ISL1 e *NKX2.5*. Após a ativação da expressão das proteínas cardíacas, as células tendem a se diferenciar num estado cada vez mais maduro de cardiomiócitos. Alguns genes ajudam na compreensão do estado de maturação dos cardiomiócitos formados, como são exemplos os genes das isoformas da cadeia leve da miosina como MLC2a (atrial) e MLC2v (ventricular), troponina I (TNNi3) e troponina T (TNNT2). As diversas etapas e genes mais expressos da diferenciação estão representados na Figura 6.

Figura 6: Esquema representativo das etapas de diferenciação em cardiomiócito a partir de células-tronco pluripotentes induzidas. (Baseado em Burridge e colaboradores, 2012; Mummery e colaboradores, 2012; Paige e colaboradores, 2015) (72, 81, 82)

A divergência de opiniões quanto aos compostos, às suas concentrações e o seu tempo de ação durante o processo de diferenciação deve-se à obtenção de diferentes taxas de eficiência. Neste trabalho foram testados diversos compostos químicos, bem como a associação entre eles, em diversas concentrações e tempos, como descrito previamente na literatura, mas não encontramos consenso entre o número de células contráteis e troponina T positivas no final do processo.

Na verdade, embora o resultado final do processo de diferenciação utilizado sejam células positivas para troponina T e com morfologia e contratilidade semelhantes ao de um cardiomiócito, o nosso grupo bem como vários outros pesquisadores têm evidências que estas células são mais similares com cardiomiócitos imaturos (fetais) do que cardiomiócitos maduros (adultos). Um dos maiores desafios da atualidade relacionado com a produção

de cardiomiócitos humanos derivados de iPSC refere-se a incertezas no estado de maturação destas células.

1.5 Hipótese

Tendo em consideração a limitação de material biológico para o estudo das desordens cardíacas em humanos, muito se tem investido nas células-tronco pluripotentes com vista na criação de novas terapias e principalmente na compreensão do funcionamento cardíaco. Aspectos éticos e políticos levam os pesquisadores a investirem cada vez mais em células-tronco pluripotentes induzidas a partir de células diferenciadas. No entanto, muito ainda precisa ser elucidado a respeito das características e potencialidades destas células.

Visto que o PGC-1 α é o maior responsável pela biogênese mitocondrial no músculo cardíaco e como a relevância desta organela na diferenciação celular é elevada, nossa hipótese é que a expressão deste cofator é determinante para a diferenciação de iPSCs em cardiomiócitos. Para testá-la, reprogramamos e caracterizamos iPSCs derivadas de fibroblastos de um indivíduo saudável, e diferenciamos em cardiomiócitos. Por meio de vetores lentivirais, induzimos a variação da expressão de PGC-1 α nestas células e avaliamos a expressão gênica e proteica de vários marcadores durante o processo de diferenciação em cardiomiócitos.

2 OBJETIVOS

2.1 *Objetivo geral*

Determinar o efeito da variação da expressão de PGC-1 α no comprometimento do fenótipo de células-tronco pluripotentes induzidas e durante a sua diferenciação em cardiomiócitos.

2.2 *Objetivos específicos*

- A) Reprogramar células adultas humanas em células-tronco pluripotentes induzidas.
- B) Avaliar o comprometimento fenotípico das células-tronco pluripotentes induzidas após inibição e superexpressão de PGC-1 α .
- C) Estabelecer um protocolo de diferenciação de células-tronco pluripotentes induzidas em cardiomiócitos.
- D) Avaliar o comprometimento fenotípico dos cardiomiócitos gerados a partir das células-tronco pluripotentes induzidas com variação da expressão de PGC-1 α .

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Com o objetivo de reprogramar células adultas humanas em células-tronco pluripotentes induzidas, foram cultivados fibroblastos humanos de um indivíduo saudável, cedidos gentilmente pelo laboratório de Genética e Cardiologia Molecular (LGCM) do Instituto do Coração, São Paulo. Após reprogramação de células de fibroblastos adultos em células-tronco pluripotentes induzidas e comprovação das suas características de pluripotência, estas células foram transduzidas com vetores virais capazes de inibir a expressão de PGC-1 α . Posteriormente, estas células iPS foram submetidas à diferenciação em cardiomiócitos com o intuito de avaliar as principais funções de PGC-1 α durante e após o processo de diferenciação. Todas as técnicas e protocolos utilizadas para estes objetivos, bem como as técnicas específicas para cultura de células iPS, reprogramação e diferenciação celulares estão descritas neste capítulo.

3.1 Vetores e Clonagem

3.1.1 Mapas de vetores

Vetor de reprogramação

A reprogramação de fibroblastos adultos humanos em células-tronco pluripotentes induzidas foi realizada pelo método de transdução lentiviral, a partir de um vetor cedido gentilmente pelo Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular do Instituto do Coração, São Paulo, de nome *STEMCCA*. Este contém um plasmídeo policistrônico com os chamados “fatores de Yamanaka” - OCT3, KLF4, SOX2 e c-MYC - bem como os componentes de produção lentiviral, como demonstrado na Figura 7.

Figura 7: Sequência do plasmídeo policistronico STEMCCA utilizado para reprogramação celular. (Adaptado de Sommer e colaboradores, 2009)(83)

Vetor de superexpressão

Com o objetivo de superexpressar o gene de interesse, foi adquirido o plasmídeo pcDNA4-myc-PGC-1 α , da empresa *Addgene*.

Vetor para inibição de expressão e insertos de *short hairpin*-RNA (shRNA)

O plasmídeo utilizado foi gentilmente cedido pelo Prof. Martin Harmsen, da Universidade de Groningen, Holanda. Seguindo as regras do manual do plasmídeo “pGreenPuro™ shRNA Cloning and Expression Lentivector” da *System Biosciences*, para transfecção celular, foram desenhados 4 pares de oligonucleotídeos: 4 com sequências de shRNA (sh1, sh2 e sh3) que anelam respectivamente, no início, meio e final da sequência do gene de interesse a silenciar (PGC-1 α), e uma sequência inespecífica *scramble* (SCR). Para inserção no vetor plasmideal, os oligonucleotídeos sintetizados (Invitrogen) são flanqueados por sequências BglII na extremidade 5' e EcoRI na extremidade 3'. Este vetor contém os componentes essenciais para produção de lentivírus, bem como um fator de seleção durante a transformação em bactéria

(ampicilina), e dois fatores de seleção clonal pós transdução celular (puromicina e GFP).

A

B

Figura 8: (A) Mapa do plasmídeo pGP, utilizado para transdução dos vetores de inibição (sh1, sh2, sh3, shSCR). (B) Esquema representativo dos lugares de anelamento dos insertos demonstrados em Tabela 1.

Tabela 1: Sequências de *short hairpin*-RNA que foram clonadas no plasmídeo pGP.

shRNA-1	GAT CTG CCA ACA CTC AGC TAA GTT ATT TCA AGA GAA TAA CTT AGC TGA GTG TTG GCT TTT TG
shRNA-2	GAT CTC AGG TAC AGT GAG TCT TCT GGT ACA CTT CCT GTC AGA TGT ACC AGA CTC ACT GTA CCT GTT TTT G
shRNA-3	GAT CTC GTG TGA TTT ATG TCG GTA AAT TCA AGA GAT TTA CCG ACA TAA ATC ACA CGT TTT TG
shRNA-SCR	GATCCGATTCCAGACGTAGGCTTATATTCAAGAGAATATAAGCCTACGTCTGGAATCTTTTTTG

3.1.2 Clonagem de shRNA

Uma vez que os plasmídeos são segmentos de DNA de dupla fita, o processo de clonagem inicia-se pelo anelamento e purificação dos oligonucleotídeos.

É essencial garantir que o plasmídeo se encontra linear para que seja possível a sua ligação com os oligonucleotídeos de dupla fita. Para isso, o vetor pGreenPuro (pGP) foi digerido com as enzimas de restrição EcoRI e BamHI e devidamente isolado e purificado (Kit Qiagen-tip 20 - 10023) a partir de um gel de agarose de 1%. Uma vez que possuímos 4 insertos de shRNA diferentes (shSCR, sh1, sh2 e sh3), foram realizadas 4 reações de ligação idênticas mas em tubos separados, utilizando a enzima T4 Ligase (#M0202T - New England Biolabs) com um volume de reação de 20 μ L, com uma proporção molar vetor-inserto de 1:3. A ligação foi feita *overnight*, no escuro e com gradiente de temperatura (entre os 4°C e a temperatura ambiente). As extremidades do vetor e dos insertos são compatíveis, embora não sejam iguais, o que permitiu a geração de uma ligação coesiva com maior garantia que não iríamos gerar plasmídeos fechados sem inserto, após transformação em bactéria. Em seguida, 10 μ L de cada uma destas ligações foram transformadas em 50 μ L de bactéria termocompetente *Dh5- α* , e plaqueadas em meio LB com ágar e 100 mg/mL de ampicilina, *overnight*, 37°C. Este vetor contém um fator de selecção da transformação por antibiótico (ampicilina), o que permitiu seleccionar apenas as colónias de bactérias que incorporaram o plasmídeo fechado. As colónias aparentemente positivas, resistentes à ampicilina, foram submetidas à digestão de enzimas de restrição para confirmação do resultado de clonagem e transformação. Para amplificação do produto de clonagem, foram utilizados os kits EndoFree Plasmid Midi Kit e EndoFree Plasmid Maxi Kit (Qiagen).

3.1.3 Produção Viral

Todos os vectores utilizados neste trabalho (STEMCCA, pGP-shRNA-SCR, pGP-shRNA-1, pGP-shRNA-2 e pGP-shRNA-3 e o pcDNA4-myc-PGC-1 α) foram transformados em lentivírus de terceira geração, seguindo a metodologia de precipitação com fosfato de cálcio.

Após a clonagem, amplificação do número de cópias e purificação de todos os vectores, estes foram transfectados juntamente com o vector de empacotamento em células HEK293T. Plaquearam-se 1×10^6 células em placa de 60 mm em meio DMEM 4,5 g/L glucose suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), cerca de 24 horas antes da transfecção. No dia seguinte, preparou-se uma mistura de vectores: 10 μ g do vector de interesse, 6,5 μ g do vector pMDL-gag/pol RRE, 2,5 μ g do vector pRSVs-REV e 3,5 μ g do vector pCMV-VSVg. Esta mix de DNAs foi adicionada a uma solução com 250 μ L de cloreto de cálcio 0,25 M, e posteriormente foi misturada, gota a gota, sob agitação, a 250 μ L de um tampão preparado contendo cloreto de sódio 274 mM, HEPES 40 mM e fosfato de monoácido de sódio 2,8 mM, pH 7,05. Este preparado de DNA foi adicionado ao meio de cultura das células plaqueadas e incubado por 4 horas. Em seguida, submeteu-se as células a um choque de glicerol (PBS 1X com 15% glicerol) por apenas 3 minutos e incubou-se com meio fresco por 20 horas. O meio de cultura foi coletado e centrifugado em ultracentrífuga a 11000 g, por 90 minutos; o sobrenadante foi desprezado e o *pellet* foi ressuspensionado em *Hank's salt solution* (HBSS) a 4°C. Este procedimento foi repetido pelas 24 horas seguintes, e os *pellets* contendo as partículas virais foram armazenadas a -80 °C.

3.1.4 Titulação da produção viral

Para que fosse possível quantificar a produção viral, a expressão do gene de fluorescência contido no vector foi avaliada por meio de citometria de fluxo. Para tal, plaquearam-se 5×10^4 células NIH-3T3 em placa de 35 mm, em meio DMEM 4,5 g glucose suplementado com 10% de SFB. Após 24 horas,

estas células foram transduzidas com os vírus, pela adição de 8 µg/mL de polibreno. No dia seguinte, as células foram tripsinizadas, centrifugadas e ressuspensas em PFA 4%.

Antes da análise por citometria de fluxo (FACS Scalibur, Becton Dickson), as células foram lavadas em PBS-1X e novamente ressuspensas em PBS-1X. Utilizando o software *CellQuest* (Becton Dickinson) foi possível avaliar a percentagem de células transduzidas e o nível de expressão de GFP, considerando a intensidade de fluorescência emitida.

3.2 Culturas celulares

As células foram cultivadas em placas multi-*well* de 6 poços, exceto quando especificado. O pH e a temperatura foram mantidos na faixa fisiológica através da incubação em estufa a 37°C e atmosfera de 5% de CO₂.

Estoques celulares foram congelados em meio de manutenção contendo 10% de sulfóxido de dimetilo - DMSO (Sigma-Aldrich - #472301), 30% soro fetal bovino (SFB) (Gibco, Thermo Fisher Scientific - #26140) , 5 µM *ROCK Inhibitor* – Ri (Y27632 – Sigma-Aldrich - #Y0503), por 24 horas em *freezer* - 80°C e posteriormente armazenadas em reservatórios contendo nitrogénio líquido (-196°C).

3.2.1 Reprogramação celular

A reprogramação de fibroblastos adultos humanos em células iPS teve como base o protocolo original de Somers e colaboradores, 2010 (13) com apenas algumas alterações: substituímos a camada de sustentação de fibroblastos embrionários de camundongo - *feeder layer* - por uma de matrigel (GelTrex) qualificada para cultura de células-tronco embrionárias e acrescentamos o uso de butirato de sódio (NaB) (Cayman - #13121) durante o

processo. O protocolo de reprogramação utilizado está apresentado no esquema na Figura 9.

Foram plaqueadas 1×10^5 células de fibroblastos adultos humanos em passagem inferior a 5 em poço de 35 mm contendo GelTrex, 16 horas antes do início da transdução. Os fibroblastos foram transduzidos em meio mínimo de DMEM High Glucose 10% SFB (D10F) (Thermo Fisher Scientific - #26140087) contendo os 10^6 lentivirus STEMCCA e 8 µg/mL de polibrene (Sigma-Aldrich - #107689). Após 6 horas, com homogeneização manual da placa de 1 em 1 hora, foram acrescentados mais 1 mL de meio D10F até ao dia seguinte. É importante lavar as células e mudar o meio de cultura nas 24 horas seguintes para assegurar a retirada de todos os vírus. No dia 3, soltamos os fibroblastos com tripsina 0,25% (Thermo Fisher Scientific - #25200056) e replaqueamos em 3 poços de 35 mm contendo GelTrex, com o mesmo meio D10F. A partir do dia 4, o meio foi trocado de dois em dois dias para Essential 6 (E6) (Thermo Fisher Scientific – A1516401) suplementado com 0,5 µM NaB, e manteve-se a sua utilização até ao dia 10. Ao dia 11, o meio foi trocado diariamente por E8 suplementado com 0,25 µM NaB até as colônias terem um tamanho possível de serem coletadas (dias 20-25). As colônias foram selecionadas e coletadas manualmente, com a ajuda do microscópio EVOS XL Image System (AMG), dentro do fluxo laminar, e plaqueadas individualmente em uma placa multi-well de 24 poços, em E8 suplementado com 5 µM Ri. O meio foi trocado todos os dias (E8) até o poço atingir uma confluência de 50%. Após o crescimento adequado, as colônias foram ressuspensas com o reagente Versene, por 4 minutos, a 37° C, e replaqueadas.

Figura 9: Esquema representativo do protocolo de reprogramação estabelecido.

3.2.2 Manutenção de células-tronco pluripotentes induzidas

Após a geração de células iPS, estas foram cultivadas e expandidas em placas contendo um matrigel qualificado para cultura de células embrionárias – GelTrex (Thermo Fisher Scientific – #A1413201), sem qualquer *feeder layer*. Para garantir adesão celular, as placas eram previamente preparadas conforme descrição do manual do produto, diluído em DMEM-F12 (Thermo Fisher Scientific - #11320-033) para 1% concentração final (10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$), no máximo 3 dias antes do uso. Esta matriz celular é extraída a partir de tumor de murinos *Engelbreth-Holm-Swarm* e é rica em laminina, colágeno tipo V e proteoglicanos.

Estas células exigem a troca diária do meio de manutenção Essencial 8 – E8 (Thermo Fisher Scientific - #A1517001). Quando atingiam uma confluência de cerca de 70% do preenchimento do poço, estas foram repicadas com o reagente Versene (Thermo Fisher Scientific - #15040-066) e replaqueadas em novo poço contendo GelTrex, em meio de cultura E8 suplementado com 2 μM Ri. Segundo as indicações do manual do reagente Versene, antes de incubar as células com volume suficiente para cobrir todo o poço, por 4 minutos, a 37°C, é necessária uma pré-lavagem com este

reagente, para a remoção do cálcio do meio e posterior liberação de ligações celulares.

As células foram mantidas em estufa a 37°C e 5% de CO₂.

O clone de células iPS selecionado para futura caracterização, transdução e diferenciação foi denominado de CTR (controle).

3.2.3 Transdução de células-tronco pluripotentes induzidas – clone CTR

Após uma breve caracterização do clone CTR selecionado, transduzimos estas células com os lentivírus produzidos anteriormente. Foram plaqueadas cerca de 5×10^5 células em um poço de uma placa multi-well de 6 poços, previamente preparada com GelTrex. Quando a confluência atingiu cerca de 40% do poço, as células foram mantidas com o volume mínimo de meio E8 (1 mL) suplementado com 8 µg/mL de polibreno, contendo os lentivírus com um MOI de 4, por 7 horas, a 37°C, com homogeneização manual da placa de 1 em 1 hora. Após este tempo completou-se o meio para 2 mL de E8 e procedeu-se à troca diária de meio de cultura, por 72 horas. Os plasmídeos utilizados possuem genes de seleção por microscopia de fluorescência e por antibiótico (puromicina). Desta forma, ao quarto dia de transdução, o meio de cultura foi suplementado com 5 µg/mL de puromicina (Thermo Fisher Scientific - #A1113803), por tempo indeterminado.

3.2.4 Subclonagem:

As células transduzidas do clone CTR foram subclonados cerca de 5 passagens após a sua seleção por puromicina. Desta vez, as colônias foram repicadas após incubação com Versene por aproximadamente 8 minutos, para que ocorresse total dissociação. As células foram ressuspensas e singularizadas em E8 suplementado com 5 µM Ri e 5 µg/mL de puromicina e

replaqueadas em uma nova placa de 24 poços previamente preparada com GelTrex. Com um acompanhamento quase diário pelo microscópio de fluorescência foi possível observar o crescimento de colônias que expressam GFP, partindo de uma única célula. Foram selecionadas as colônias com uma morfologia típica de células pluripotentes e expandidas para futuros experimentos.

3.2.5 Diferenciação de células-tronco pluripotentes induzidas em cardiomiócitos

O protocolo de diferenciação sofreu diversas alterações ao longo do tempo devido à ineficiência de reprodutibilidade. Foram seguidos vários protocolos registrados na literatura, mas nenhum destes se demonstrou eficaz e reprodutível o suficiente para as nossas células, no nosso laboratório. Então, optamos pela criação de um novo protocolo, derivado de uma adaptação do protocolos de Lian e colaboradores, 2012 (74).

As diferenciações foram realizadas em placas multi-*well* de 12 poços, previamente preparadas com GelTrex. As diferenciações foram testadas a partir da passagem 25 dos clones de células-tronco pluripotentes induzidas, como garantia da sua estabilidade cromossômica.

Foram plaqueadas $2,5 \times 10^5$ células por poço em meio E8: mTeSR (StemCell Technologies - #05852) na proporção de 1:1, suplementado com 5 μ M de Ri. O meio foi trocado diariamente, com 1,5 mL de mTeSR até a confluência celular atingir a cobertura total do poço (100%). Este dia é considerado o dia 0 da diferenciação. Neste dia, o meio foi trocado para 2 mL de RPMI com L-Glutamina (Thermo Fisher Scientific - #11875119) suplementado com 1X soro B27 sem insulina (Thermo Fisher Scientific - #1895601) (meio RB-) e 6 μ M de inibidor de GSK3 – CHIR (CHIR99021 – Merk - #361571). Após 24 horas, dependendo da porcentagem de morte celular, descartamos entre 50 a 80% do meio de cultura, e adicionamos o mesmo meio (previamente aquecido em banho-maria a 37°C), com a mesma concentração

de CHIR descartada, e com o acréscimo de 10 ng/mL de BMP4 (R&D Systems – #314-BP-010/CF). No dia 2, o poço foi devidamente lavado com meio CDM3 – RPMI suplementado com 500 µg/mL de Albumina e 213 µg/mL de ácido ascórbico (Sigma-Aldrich - #A8960), por 5 minutos. Em seguida, foi adicionado 2,5 mL de meio RB- suplementado com 2,5 µM de XAV (XAV939- Cayman - #13596) e 2,5 µM KY (KY 02111- Cayman - #14315). Após 48 horas, o poço foi novamente sujeito a uma lavagem idêntica à descrita anteriormente, e o meio foi trocado para o meio RPMI suplementado com 1X soro B27 (Thermo Fisher Scientific - #17504044) (meio RB+) e com a mesma concentração dos reagentes XAV e KY. Entre os dias 5 e 8 o meio é trocado diariamente (RB+), e a partir do dia 9 o meio é trocado a cada 2 dias (meio CDM3).

3.3 Caracterização celular: técnicas biologia celular

3.3.1 Cariótipo

Para testar a integridade cromossômica de todos os clones de células iPS, estes foram plaqueados em uma placa de 35 mm contendo GelTrex. Após atingirem cerca de 80% de confluência, foram adicionados 200 µL de colchicina 4×10^{-3} µg/mL (Sigma - #C9754) a 1 mL de E8 e incubou-se na estufa a 37°C, por 90 minutos. A placa foi lavada por 3 vezes com DPBS sem magnésio e sem cálcio (DPBS--) (Gibco - #14200075) e as células foram dissociadas pela ação do reagente Versene, ressuspendidas em DPBS-- e coletadas em um *falcon* de 15 mL para centrifugação a 1500 rpm, por 5 minutos, temperatura ambiente. O *pellet* obtido foi ressuspendido em 5 mL de solução hipotônica KCl, e incubada em banho-maria, a 37°C, por 15 minutos. Após nova centrifugação nas mesmas condições que a anterior, o *pellet* foi fixado com 3 mL de uma solução de metanol e ácido acético na proporção de 1:3. Este processo de fixação foi repetido por mais duas vezes, sendo que no final da última centrifugação o *pellet* foi ressuspendido em 1 mL da mesma solução fixadora e mantido a 4°C até ao momento da análise. Com a ajuda de

uma pipeta de *Pasteur*, as células foram pingadas em uma lâmina de vidro e guardadas por tempo indefenido.

A análise do cariótipo foi realizada por especialistas em citogenética do Instituto Central do Hospital das Clínicas, São Paulo, segundo o método de bandeamento GTG, observado em um aumento de 400 vezes. Foram analisadas no mínimo 20 metáfases, com aquisição de apenas 5 imagens pelo sistema CytoVision (Applied Imaging Corporation).

3.3.2 Corpo embrióide

Para avaliar o potencial de pluripotência e diferenciação das células iPS *in vitro*, estas foram submetidas à formação de corpos embrióides e posterior análise dos diferentes tipos celulares. Para isso, foram plaqueadas cerca de $2,5 \times 10^6$ células em placa de 60 mm com o objetivo de obter uma confluência próxima a 100% em apenas dois dias. A placa foi lavada duas vezes com DPBS--. Com a ajuda do bisturi, foram feitos cortes superficiais com formato quadriculado sobre o tapete de células, com quadrados de tamanho aproximado entre 1 a 2 mm. As colônias foram dissociadas da placa em quadrados inteiros após a ação de 2 mL de dispase 1 U/mL (StemCell Technologies - #07923), por 15 minutos, a 37°C e coletadas para um *falcon* de 15 mL. As células foram centrifugadas por 2 minutos a 200 g e o *pellet* foi lavado por 2 vezes com DPBS--. Por fim, as colônias foram ressuspendidas com meio E6 suplementado com 4 µg/mL de álcool polivinílico (Sigma - #P8136) e 5 µM Ri e plaqueadas em placas de baixa aderência (Corning - #3261) contendo gel de agarose 1%. Aproximadamente 70% do meio foi trocado de dois em dois dias, até ao dia 12. Neste dia a formação dos corpos embrióides estava aparentemente completa, procedendo-se à coleta dos mesmos em tubo *falcon* 15 mL. As colônias foram centrifugadas por 5 minutos a 200 g e o *pellet* foi ressuspendido com 1 mL de TRIzol, para extração de RNA, como descrito no item 3.4.1.

3.3.3 Coloração de fosfatase alcalina

Após plaqueamento de células em placa multi-*well* de 6 poços, a atividade da enzima fosfatase alcalina foi observada nas células iPS pela utilização do kit Leukocyte Alkaline Phosphatase Kit (Sigma-Aldrich), segundo as recomendações do manual do fabricante. Resumidamente, as colônias foram fixadas com uma solução de citrato-acetona-formaldeído por 30 segundos. As células foram lavadas uma vez com água deionizada por 45 segundos e incubadas por 15 minutos, protegido da luz, com solução contendo nitrato de sódio, solução alcalina de naftol AS-BL com *fast red violet* LB. Após duas lavagens de 2 minutos com água deionizada, as células foram coradas com solução de hematoxilina, por 2 minutos, protegido da luz. Antes de fotografar, as colônias foram lavadas 3 vezes com água deionizada.

3.3.4 Imunofluorescência

As células foram plaqueadas em uma confluência bem reduzida, em placas de 12 poços previamente preparadas com GelTrex (cerca de 10^4 células por poço), em meio E8 suplementado com 2 μ M Ri. Aproximadamente 2 a 3 dias após plaqueamento, as colônias foram lavadas com PBS-1X e fixadas com paraformaldeído 4%, por 30 minutos, à temperatura ambiente. Após duas lavagens com PBS-1X, as células foram bloqueadas com uma solução de PBS-1x e 1% BSA, por uma hora, à temperatura ambiente; no caso de proteínas nucleares foi acrescentado 0,1% de *nonidet* NP-40 à mesma solução de bloqueio, para dissociação da membrana citoplasmática. Foram utilizados anticorpos primários de marcação nuclear – OCT4, NANOG, TNNT2 – e de membrana – SSEA4, TRA-1-60 e TRA-1-81. Estes anticorpos foram previamente diluídos em solução de PBS-1X e 1% BSA, e incubados *overnight*, a 4°C. Terminado o tempo de incubação, as células foram lavadas 3 vezes com PBS-1X, seguida de uma nova reação de bloqueio, com as mesmas soluções de bloqueio, mas desta vez por apenas 30 minutos. Os anticorpos secundários foram escolhidos segundo a espécie animal e incubados na concentração de

1:500 na solução de PBS-1X e 1% BSA, por 1 hora, à temperatura ambiente e protegido da luz. Optamos pelo uso do anticorpo Alexa 555 (vermelho), uma vez que as células emitem expressão de GFP (verde). As células foram lavadas uma vez com PBS-1X e incubadas por 10 minutos com DAPI, para marcação de DNA e visualização de núcleo. Após 3 lavagens consecutivas com PBS-1X, as imagens foram adquiridas em microscópio invertido de fluorescência (Carl Zeiss). As imagens foram analisadas e tratadas no software LSM Image Browser (Carl Zeiss).

As concentrações utilizadas para os anticorpos estão apresentadas na tabela 2.

Tabela 2: Lista de anticorpos utilizados para a reação de imunofluorescência.

Anticorpo	hosped	Marca	Catalog	Epitopo	conc
OCT4	rabbit	CellSignaling	#2840S	IgG	1-400
NANOG	rabbit	CellSignaling	#4903S	IgG	1-600
SOX2	rabbit	CellSignaling	#3579S	IgG	1-200
TRA-1-60	mouse	CellSignaling	#4746S	IgM	1-500
TRA-1-81	mouse	CellSignaling	#4745S	IgM	1-500
SSEA4	mouse	CellSignaling	#4755S	IgG3	1-500
cTnT2	goat	HY-test	4T19-2	IgG	1-200

3.3.5 Análise da expressão proteica por citometria de fluxo

A técnica de citometria de fluxo foi utilizada com o intuito de avaliar a eficiência da diferenciação celular em cardiomiócitos bem como das diferenças na expressão proteica entre os diferentes clones de iPSCs durante a diferenciação. Assim sendo, as amostras avaliadas foram coletadas e processadas durante os 16 dias de diferenciação estudados (desde o dia 0 até ao dia 15). As células foram plaqueadas em placas de 12 poços e foram

utilizados 3 poços para avaliar diariamente as alterações na expressão de proteínas específicas nucleares (NANOG, Troponina T, NKX2.5) e membranares (SSEA4, TRA-1-60). Todo o processo de coleta, processamento e análise foi efetuado por duas vezes.

As células foram dissociadas com 500 μ L de tripsina, por aproximadamente 5 minutos à temperatura ambiente, e ressuspensas em 3 mL de SFB. As células foram centrifugadas por 5 minutos a 1500 rpm e o sobrenadante foi descartado. O protocolo para análise de marcadores nucleares necessita de fixação por 20 minutos em paraformaldeído 4% à temperatura ambiente e permeabilização da membrana citoplasmática com o uso de uma solução de metanol 90%, por 10 minutos, no gelo. Entre o processo de fixação e permeabilização, as células foram centrifugadas novamente nas mesmas condições que a centrifugação anterior. A partir deste passo, o protocolo utilizado foi o mesmo para todos os marcadores, com exceção da composição das soluções de incubação e lavagem: para marcadores membranares foi utilizada uma solução de PBS-1X com 1% de BSA, e para os marcadores nucleares foi utilizada a mesma solução com o acréscimo de 0,1% de *Triton X-100*. O *pellet* foi ressuspensado na respectiva solução e distribuído por tubos de 1,5 mL. As células foram lavadas duas vezes antes da incubação com o anticorpo primário, em 100 μ L do respectivo tampão, por 30 minutos, no gelo. As amostras foram centrifugadas a 2000 rpm por 5 minutos e lavadas 2 vezes. O anticorpo secundário foi diluído nas devidas concentrações e incubado por 30 minutos, no gelo e protegido da luz, com um volume final de 100 μ L por amostra. Por fim, as células foram lavadas duas vezes e ressuspensas em 100 μ L de solução de 4% de PFA. Após seleção da população a avaliar, foram adquiridos no mínimo 10 000 eventos no citômetro de fluxo BD Accuri C6 Flow Cytometer (BD Biosciences). Os resultados foram analisados utilizando o *software* BD Accuri C6 Plus (BD Biosciences).

Os anticorpos utilizados estão descritos na tabela 3.

Tabela 3: Lista de anticorpos utilizados para a reação de citometria.

Anticorpo	hosped	Marca	Catalog	conc	AbSec	Conc
SSEA4	mouse	CellSignaling	#4755S	1-300	A647	1-1000
TRA-1-60	mouse	CellSignaling	#4746S	1-300	A647	1-1000
NANOG	rabbit	CellSignaling	#4903S	1-200	A647	1-2000
NKX2.5	rabbit	CellSignaling	#8792S	1-300	A647	1-1000
cTnT2	goat	HY-test	#4T19-2	1-200	A647	1-4000

3.4 Caracterização celular: técnicas de biologia molecular

3.4.1 Extração de RNA segundo o método de TRIzol

Para extração de RNA total, aguardamos uma confluência de cerca de 90% das células em um poço de uma placa de 12 poços. O meio de cultura foi aspirado e as células foram dissociadas pela ação do reagente Versene e ressuspensas com PBS-1X em um tubo *falcon* de 15 mL. Após centrifugação (200 g por 4 minutos), o *pellet* foi ressuspendido com 1 mL do reagente TRIzol (#15596 - Thermo Fisher Scientific) e armazenado em freezer de -80°C até extração do RNA.

O método de extração de RNA utilizado foi baseado no protocolo descrito pelo manual do reagente. Foram adicionados 200 µL de clorofórmio a cada amostra, com posterior homogeneização e incubação por 3 minutos à temperatura ambiente. Procedeu-se a uma centrifugação a 12000 g por 15 minutos, a 4°C, e o sobrenadante incolor foi transferido para um novo tubo de 1,5 mL e as restantes frações descartadas. Após adição de 500 µL de isopropanol gelado e 20 µL de acetato de sódio 2 mM, incubaram-se as amostras por 30 minutos a -20°C, seguido de uma centrifugação na velocidade de 12000 g, por 10 minutos, a 4°C. Desta vez, o sobrenadante foi desprezado e o *pellet* foi ressuspendido em 1 mL de etanol 70% (diluído em água dietilpirocarbonato, DEPC), seguido de nova centrifugação a 7500 g por 5

minutos, a 4°C. O sobrenadante foi descartado e aguardou-se a secagem do *pellet*, para ressuspensão em 20 µL de água DEPC. Todas as amostras foram submetidas a um tratamento com DNase, conforme indicação do manual do kit (Thermo Fisher Scientific - #18047019).

O RNA extraído foi quantificado por espectrofotometria utilizando o biofotômetro (Eppendorf), em comprimento de onda de 260 nm, e uma razão 260/280 nm superior a 1,8. As amostras foram diluídas para 20 ng/µL para posterior utilização de reação de PCR em tempo real (RT-qPCR).

3.4.2 Análise da expressão gênica por reação de polimerase em cadeia em tempo real (qRT-PCR)

O método de RT-qPCR foi utilizado para avaliar os níveis de expressão de genes específicos referentes ao estado de pluripotência e aos diferentes estágios da diferenciação em cardiomiócitos, bem como para comprovar a alteração da expressão gênica do gene *PGC-1α* nos clones de células iPS comparados com células de fibroblasto e de células-tronco embrionárias humanas (BR-1).

A reação de RT-qPCR foi realizada com o kit *SuperScript III Platinum One-Step qRT-PCR Kit with ROX* (Thermo Fisher Scientific - #11745100), em termociclador *StepOne Real-Time PCR System* (Applied Biosystems), em ambiente estéril do fluxo laminar. Todas as reações foram realizadas em duplicatas biológicas, contendo 100 ng de RNA. O gene $\beta 2M$ foi utilizado como gene normalizador. Os *primers* utilizados encontram-se listados na Tabela 4.

A reação de amplificação por qRT-PCR inicia-se após a transcrição reversa do RNA em cDNA, pela ação do reagente *SuperScript III Reverse Transcription* a cerca de 42-60°C e é dividida em três fases: a fase geométrica, caracterizada por apresentar alta precisão na duplicação do número de moléculas de cDNA pela ação de nucleotídeos, *primers*, enzima *taq polimerase*, $MgCl_2$; a fase linear, onde a amplificação de novas moléculas se

torna estacionária, sem aumentar nem diminuir; e a fase platô, onde a eficiência de amplificação passa a ser decrescente devido à ausência ou escassez de reagentes.

O *software* quantifica a intensidade da fluorescência dada pelo SYBR Green I e normaliza pelos dados de fluorescência obtidos pelo ROX, facilitando uma correção dos possíveis erros de quantificação, como variação de volume final de reação.

Terminada a reação de Real Time-qPCR, foi definido manualmente um limite de *threshold* na fase exponencial de amplificação do gene. A intersecção deste *threshold* com a curva de amplificação forneceu o valor do ciclo onde a fluorescência se encontra acima do *background* da amostra utilizada – CT. O valor médio de CT's obtidos pela duplicata ou sextuplicata de amostras para o gene de interesse foi subtraído pelos valores de CT obtidos para gene normalizador $\beta 2M$.

A quantificação da expressão gênica foi realizada por $2^{-\Delta\Delta CT}$ (84, 85).

Tabela 4: Sequências dos *primers* utilizados.

Gene	Sequência senso	Sequência antisenso	°C
$\beta 2M$	CGTGATCTTTCTGGTGCTTGTC	TTCTGAATGGCAAGCACGAC	60
PGC-1 α	AAAAGCGGCCGCATGGCGTGGGACATG	GGGGGATCCTTACCTGCGCAAGCTTCTCTG	60
POU5F1	GACAGGGGGAGGGGAGGAGCTAGG	CTTCCCTCCAACCAGTTGCCCAAAC	60
SOX2	GGGAAATGGGAGGGGTGCAAAAGAGG	TTGCGTGAGTGTGGATGGGATTGGTG	60
REX1	AAAGCATCTCCTCATTCATGGT	TGGGCTTTCAGGTTATTGACT	60
T	CTTCCCTGAGACCCAGTTCA	CAGGGTTGGGTACCTGTCAC	58
MIXL1	AAGCGCACGTCTTTCAGC	TGGAAGGATTTCCTACTCTG	58
HCN4	GATCCTCAGCCTCTTACGCC	CCCCAGGAGTTGTTACCAT	60
ISL1	GTTACCAGCCACCTTGAAA	TTCCCACTTTCTCCAACAGG	60
TNNI3	CTGCAGATTGCAAGCAAGA	CCTCCTTCTCACCTGCTTG	60
MYL7	GGAGTTCAAAGAAGCCTTCAGC	TCCTCTGGGACACTCACCTT	60
MEF2C	TCCGAGTTCTTATTCCACC	ATCCTCCCATTCTTGTC	60

3.4.3 Análise estatística

Os resultados foram apresentados como médias $\pm$ EPM. Para análise estatística dos dados utilizou-se o programa *GraphPad Prism 6®*. Dependendo do experimento em questão, as comparações entre os grupos foram realizadas através do teste *t de Student*, da análise de variância -OneWay ANOVA e 2Way ANOVA – para identificar diferenças estatísticas entre os grupos. O nível de significância considerado foi $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 *Reprogramação de fibroblastos para geração de células-tronco pluripotentes induzidas humanas*

Para a geração de células iPS humanas, fibroblastos adultos foram transduzidos com um lentivírus contendo o plasmídeo *STEMCCA*, portador dos fatores de pluripotência definidos por Yamanaka – OCT4, KLF4, SOX2 e cMYC. O vetor *STEMCCA* utilizado para reprogramação foi gentilmente cedido por Diogo Biagi, aluno do LGCM, InCor, São Paulo, sob a forma de lentivírus.

Utilizamos este método integrativo uma vez que, para além de ser o que possui maior taxa de eficiência de reprogramação descrito na literatura, apresenta procedimentos mais fáceis e menos dispendiosos de executar. Após o oitavo dia de transdução, observaram-se alterações morfológicas nas colônias de fibroblastos, com o aparecimento de células arredondadas e aparentemente mais granuladas (Figura 10C). Estas alterações morfológicas são típicas do que acontece durante a transição de células mesenquimais para células epiteliais, o que explica este acontecimento nos primeiros dias de reprogramação (86). Pela observação da Figura 10F, ao dia 28, aproximadamente 80% das colônias existentes na placa apresentavam uma morfologia típica de iPSCs, semelhante à de ESCs, com um núcleo grande e um citoplasma escasso (tal como descrito por Yamanaka (10)). Foram coletadas cerca de seis colônias individuais e mantidas em diferentes poços para expansão e caracterização, seguindo os padrões descritos por Takahashi e Yamanaka (10). Estes clones foram expandidos até a passagem 10 a 15 e caracterizados quanto ao seu estado de pluripotência, antes de proceder com a transdução dos vetores produzidos. O clone escolhido para a continuação do trabalho foi denominado de CTR (controle). Com o intuito de simplificar a apresentação dos resultados, a sua caracterização está descrita em conjunto com os demais clones produzidos (item 4.3).

Figura 10: Imagens capturadas durante o processo de reprogramação celular, após transfecção de fibroblastos humanos com o lentivírus STEMCCA, na ampliação de 100x, em diferentes dias. As setas ressaltam a atenção para o aparecimento de células com morfologia alterada quando comparadas com a morfologia normal do fibroblasto.

4.2 Clonagem

4.2.1 Produção Viral

Neste trabalho foram utilizados 3 vetores diferentes: o vetor *pGreenPuro* clonado com 3 sequências de shRNA com o objetivo de inibir a expressão de PGC-1 α e uma sequência inespecífica controle, o vector pcDNA4-myc-PGC-1 α comprado na empresa *Addgene* responsável pela superexpressão do gene, e o vector STEMCCA, utilizado na reprogramação de células adultas em iPSCs, como referido anteriormente. Para todos os vetores foram produzidos lentivírus de terceira geração pela sua conhecida capacidade de transdução em vários tipos celulares e também porque possibilita a integração dos transgenes no DNA da célula em divisão ou em estado estacionário, permitindo uma transdução a longo prazo, conhecida como constitutiva (87). Utilizamos a terceira geração de lentivírus que possui apenas 3 dos 9 genes originais do

genoma do vírus por aumentar a estabilidade do vetor e do transcrito (6). Os vetores pGP e pcDNA4-myc-PGC-1 α possuem o gene *GFP* (do inglês, *Green Fluorescent Protein*) que emite fluorescência, o que facilitou a análise de resultados de produção viral por citometria de fluxo e transdução celular por microscopia de fluorescência.

A eficiência da produção dos lentivirus está demonstrada na Figura 11. Utilizamos como controle negativo a célula NIH-3T3 que não esteve em contato com nenhum tipo de plasmídeo portador de GFP. Observamos algumas variações na taxa de eficiência de produção dos lentivirus. Os lentivirus contendo a sequência *scramble* (SCR) e duas das sequências específicas para inibição de PGC-1 α (sh-2 e sh-3) apresentaram eficiência ao redor de 95%. Os lentivirus que contêm o vetor pGP-sh1 e pcDNA4-myc-PGC-1 α apresentaram uma taxa de valor inferior quando comparados aos outros vetores. Esta ineficiência na produção destes lentivirus deve-se à baixa eficiência na transfecção destes vetores na célula NIH-3T3.

Figura 11: Citometria de fluxo mostrando a eficiência de transfecção dos diferentes vetores em células NIH-3T3. O primeiro gráfico apresentado à esquerda representa a população selecionada para os restantes gráficos (considerando conformação morfológica com tamanho celular). Utilizamos a célula NIH-3T3 como controle negativo. No eixo vertical está representada a intensidade de emissão de GFP e o eixo horizontal refere-se ao tamanho dos eventos adquiridos. Os gráficos à direita referem-se à quantidade de células transfectadas com os plasmídeos portadores do gene GFP: o controle (pGP-sh-SCR), os plasmídeos clonados com as sequências de shRNA com função de inibição de *PGC-1α* (pGP-sh-1, pGP-sh-2, pGP-sh-3) e o plasmídeo responsável pela superexpressão de *PGC-1α*.

4.2.2 Transdução dos lentivírus portadores dos vetores de inibição e superexpressão no clone de células iPS gerado (clone CTR)

Após caracterização das células do clone de iPS gerado, ao qual atribuímos o nome de CTR (controle), submetemos à transdução com lentivírus portadores dos vetores de inibição (pGP-sh1, pGP-sh2, pGP-sh3) e

superexpressão (pcDNA4-myc-PGC-1 α) do gene *PGC-1 α* e do vetor *scramble* (pGP-shSCR). Através da visualização por microscopia de fluorescência da proteína GFP inserida nos vetores utilizados, foi possível selecionar os clones transduzidos que mantiveram as características morfológicas de iPSCs. Foram realizadas várias tentativas para a transdução dos vetores pcDNA4-myc-PGC-1 α e pGP-sh1, com variação na concentração de lentivirus, de células e de polibrene, mas não obtivemos resultados de células GFP positivas e resistentes à puromicina. Por esse motivo, o restante do presente trabalho só apresentará resultados obtidos nas células com expressão inibida de *PGC-1 α* . A ineficiência da transfecção dos vetores pGP-sh1 e pcDNA4-myc-PGC-1 α corroboram com a inexistência de células iPS transduzidas com estes vetores. Este resultado ressalta a nossa atenção para a importância da manutenção basal de expressão *PGC-1 α* , tanto em células somáticas diferenciadas, quanto nas células pluripotentes, uma vez que não sobreviveram ou que não permitiram a integração do genoma viral quando expostas a condições de superexpressão ou de inibição absoluta.

Foi realizada uma subclonagem do clone CTR transduzido, para as células que se apresentavam GFP positivas, visíveis no microscópio de fluorescência invertido (Figura 12), mantendo a puromicina como método principal de seleção por cerca de 8 passagens. Estes clones foram denominados de: SCR – para as células transduzidas com o vetor contendo a sequência inespecífica *scramble*; C2 – para as células transduzidas com o vetor contendo a sequência sh-2; e C3 – para as células transduzidas com o vetor contendo a sequência sh-3.

A

B

Figura 12: Imagens capturadas por microscopia de fluorescência dos subclones das células transduzidas, GFP positivas: SCR, C2 e C3. Em (A), as imagens estão num aumento de 100x; em (B), a escala foi adaptada para 50 μm, e foi usado DAPI como marcador de nuclear (azul).

Estes subclones foram mantidos nas mesmas condições que o clone CTR. Uma vez garantida a exclusão de todas as células GFP negativas e não resistentes à puromicina através de sucessivas passagens em cultura e por avaliação de microscopia de fluorescência, realizamos uma reacção de PCR em tempo real (RT-qPCR) com o intuito de avaliar qual a percentagem de inibição da expressão do gene *PGC-1α* após transdução lentiviral. Para análise quantitativa da expressão do gene *PGC-1α*, inicialmente comparamos os dois clones controle: CTR e SCR. Utilizamos células de fibroblasto para comparar

os níveis de expressão de *PGC-1 α* entre células somáticas e células pluripotentes. Como podemos observar pelo gráfico da Figura 13A, não houve diferença significativa entre os dois controles utilizados (CTR e SCR). Por sua vez, os clones C2 e C3, transduzidos com vetores portadores de *short hairpin*-RNA, apresentam uma taxa significativa de inibição da expressão de *PGC-1 α* : cerca de 70% e 50%, respectivamente. Na Figura 13B, podemos observar que os fibroblastos apresentam expressão de *PGC-1 α* muito reduzida em comparação com as células-tronco pluripotentes induzidas.

Figura 13: Expressão do gene *PGC-1 α* dos clones gerados. O clone CTR representa o clone de iPSC controle; SCR é o clone controle após transdução com sequência inespecífica; C2 e C3 representam os dois clones submetidos à transdução com vetores de inibição. (B) * $p < 0,0035$ quando comparado com SCR; *** $p < 0,0001$ quando comparado com SCR.

Uma vez comprovada a taxa de inibição dos clones transduzidos com os vetores contendo *short hairpin*-RNA, procedeu-se à caracterização da pluripotência de todos os clones.

4.3 Caracterização dos clones de células-tronco pluripotentes induzidas

4.3.1 Morfologia celular

Após a coleta de várias colônias originadas a partir da reprogramação descrita anteriormente, o passo seguinte foi selecionar o clone CTR com características ideais de iPSCs, segundo a descrições da literatura e em comparação com o clone de células embrionárias humanas - BR-1. Foram avaliados vários parâmetros, sendo que o primeiro a ser considerado foi a avaliação da morfologia das células e a formação de colônias durante as primeiras passagens. As colônias típicas deste tipo celular apresentam células justapostas, em monocamada e com margem bem definida (10). Uma das principais características morfológicas deste tipo celular é o tamanho do seu núcleo, sendo que abrange quase todo o citoplasma, além da presença nítida de diversos nucleossomos ou de apenas um único nucleossomo denso e maior. As células que delimitam as colônias por vezes apresentam um citoplasma maior do que as do centro da colônia pois estão em crescimento. Conforme podemos observar pela Figura 14, todos os clones apresentam uma morfologia idêntica, bem como a taxa de proliferação e formação de colônias.

Figura 14: Caracterização morfológica das colônias de células-tronco pluripotentes induzidas geradas, sobre GelTrex.

É conhecida a presença de elevados níveis da proteína fosfatase alcalina em células pluripotentes. Por este motivo, foi realizada a coloração segundo a metodologia descrita em 3.3.3, e como mostram as imagens das Figuras 15B e 15C, podemos concluir que todas as células se apresentaram positivas para esta marcação. Na Figura 15A, podemos observar uma parte de uma colônia de células iPS (corada) contaminada com células somáticas diferenciadas (não coradas). Este resultado comprova que todas as células que apresentam coloração positiva são pluripotentes.

Figura 15: Expressão de Fosfatase Alcalina em células-tronco pluripotentes induzidas. Coloração com solução de hematoxilina e eosina para marcação de Fosfatase Alcalina. Em (A), colônia de iPSC (corada) contaminada com células diferenciadas (não coradas), no aumento de 200x e 400x. Em (B), são imagens de colônias do clone controle (CTR), nas ampliações de 100x, 200x, e 400x; na segunda linha, estão as imagens dos clones controle *scramble* (SCR), C2 e C3, na ampliação de 200x.

4.3.2 Capacidade de diferenciação nas três linhagens germinativas

Uma das características básicas para avaliação de pluripotência das iPSCs é a sua capacidade de formação de corpos embrióides com diferenciação espontânea em células provenientes das três camadas da linha germinativa (endoderme, mesoderme e ectoderme) *in vitro*. Pela análise de

marcadores de expressão demonstrados na Figura 16, concluímos que estes clones são capazes de se diferenciarem em endoderme (*SOX17* positivo), mesoderme (*MSX1* positivo) e ectoderme (*MAP2* positivo).

Figura 16: Corpos embrióides gerados a partir dos clones de iPSCs – controle (CTR), controle *scramble* (SCR), e os dois clones com inibição de expressão de *PGC-1α* (C2 e C3), na ampliação de 200x. Marcadores moleculares da presença de células das três linhas germinativas: endoderme (*SOX17*), mesoderme (*MSX1*) e ectoderme (*MAP2*).

4.3.3 Cariótipo

Uma vez que estas células sofreram alterações (ativação e inibição) de expressão gênica durante a reprogramação e a transdução viral e já que estas estão em constante replicação e proliferação, foi realizado cariótipo para avaliação da integridade cromossômica. Os 4 clones de iPSCs gerados foram analisados entre as passagens 20 a 30. Foram analisadas 15 metáfases para cada clone. Os subclones SCR, C2 e C3 tiveram origem após transdução do clone CTR e os resultados do cariótipo foram idênticos, tal como se esperava (46,XX), concluindo que não ocorreu qualquer alteração cromossômica visível durante a reprogramação e/ou transdução e posterior manutenção da célula (Figura 17).

Figura 17 – Cariótipo obtido segundo método de bandeamento GTG dos clones de iPSCs gerados entre as passagens 20 a 30 (CTR- controle; SCR- *scramble*).

4.3.4 Presença de marcadores proteicos

Os quatro clones de células-tronco pluripotentes induzidas gerados foram submetidos a um ensaio de expressão proteica através de análise por imunofluorescência.

Foram analisados cinco marcadores específicos de pluripotência, sendo dois marcadores nucleares: OCT4 e NANOG, e três marcadores de membranares: SSEA4, TRA-1-60 e TRA-1-81. Todas as colônias apresentaram coloração positiva para todos os marcadores (Figura 18). Utilizamos como controle negativo fibroblastos humanos, que não apresentaram qualquer tipo de fluorescência para nenhum dos marcadores testados (imagens não

apresentadas). Como controle de quantificação celular, utilizamos o marcador nuclear DAPI.

Figura 18: Imagens capturadas do microscópio de fluorescência para análise da presença de marcadores proteicos de pluripotência dos 4 clones de iPSCs geradas: CTR- controle, SCR- *scramble*, C2 e C3. Marcadores nucleares - NANOG e OCT4; Marcadores de membrana – SSEA4, TRA-1-60 e TRA-1-81; anticorpo secundário – Alexa 555 (vermelho); Marcador de DNA – DAPI (azul). As imagens apresentam ampliação de 200x e a barra de escala é de 50 μm.

4.3.5 Presença de marcadores moleculares

A expressão de alguns dos principais marcadores moleculares de pluripotência foi avaliada por reação de PCR em tempo real, nos quatro clones gerados. Esta análise quantitativa permitiu comparar os níveis de expressão entre cada clone. Como controle positivo utilizamos RNA de células-tronco embrionárias (BR-1) e como controle negativo utilizamos células somáticas adultas – neste caso, utilizamos o fibroblasto adulto que foi submetido a reprogramação para geração das células-tronco pluripotentes induzidas CTR (Fibro). Avaliamos a expressão do gene *POU5F1* (gene codificador do fator de transcrição OCT4), do gene *SOX2* e o gene *REX1*.

Segundo a Figura 19, existe diferença significativa dos valores de expressão desses marcadores no fibroblasto em relação à BR-1 uma vez que esta célula não expressa os marcadores de pluripotência. Podemos afirmar que, pela análise dos gráficos da Figura 19, todos os clones de iPSCs gerados expressam estes marcadores de pluripotência, mesmo com algumas variações nos níveis de expressão quando comparados aos das células embrionárias (BR-1).

Figura 19: Expressão relativa de marcadores moleculares de pluripotência: *POU5F1*, *SOX2* e *REX1*. Todas as amostras foram comparadas em relação ao clone de células-tronco embrionárias (BR-1). * $p < 0,05$ quando comparado com BR-1; ** $p < 0,0001$ quando comparado com BR-1.

Pela análise da Figura 19C, observamos que, embora as células BR-1 apresentem níveis de expressão mais reduzida para o gene *REX1* em relação aos restantes clones avaliados, estas contêm aproximadamente 417 vezes mais em comparação com os fibroblasto (BR-1 – valor 1; Fibro – 0,0024).

Estes resultados mostram que o cofator de transcrição PGC-1 α não desempenha um papel fundamental na manutenção da pluripotência das células iPS *in vitro*, uma vez que tanto os clones submetidos a inibição (C2 e C3) quanto os clones controle (CTR e SCR) não demonstram diferenças significativas na expressão dos fatores de pluripotência.

4.4 Diferenciação de células iPS em cardiomiócitos

O estabelecimento de um protocolo de diferenciação reprodutível e eficiente foi a etapa mais demorosa e instável deste trabalho, tal como iremos referir mais detalhadamente no capítulo 5 da discussão. Testamos vários protocolos descritos na literatura baseados na diferenciação de cardiomiócitos derivados de iPSCs em monocamada (nunca foi testada a diferenciação dependente da formação de corpos embrióides) (74, 88, 89) mas nenhum resultou em células contráteis ou com características típicas de cardiomiócito. Optamos então por fazer algumas adaptações ao protocolo de Lian e colaboradores, 2012 (74). Até estabelecermos um protocolo que resultasse em pelo menos 70% de células contráteis utilizamos somente o clone controle (CTR) para diferenciação.

4.4.1 Desenvolvimento de um novo protocolo de diferenciação

A primeira adaptação de protocolo foi a troca do meio de manutenção E8 de iPSCs no momento de pré-diferenciação (desde que foi plaqueada até ao dia 0, por cerca de 3 dias) para meio mTeSR; este meio permite que a célula se torne mais apta para se diferenciar.

Com os testes realizados anteriormente, percebemos a importância do momento do plaqueamento até ao dia 0 de diferenciação: o ideal é que a célula fique homogeneamente distribuída pelos poços, e que não ultrapasse a confluência de 100%, ou seja, sem que ocorra justaposição celular (Figura 20).

Figura 20: Células iPS (clone CTR) no dia 0 de diferenciação, em duas ampliações diferentes. Em (A) as células apresentam uma confluência de 100% sem sobreposição, enquanto que em (B) estão 100% confluentes e justapostas.

A dificuldade inicial encontrada no nosso protocolo de diferenciação em cardiomiócitos era a elevada taxa de morte celular observada no dia 1, 24 horas após a adição de CHIR ao meio de cultura. Conseguimos reduzir parte dessa morte com a troca diária de meio de cultura, mas ainda assim não foi suficiente. Por este motivo, após o início da diferenciação, avaliamos a concentração ideal do inibidor da via GSK3 – CHIR – o principal responsável por orientar a célula para se diferenciar em mesendoderme (células capazes de se diferenciarem em mesoderme e endoderme). Testamos as concentrações de 3, 6, 9 e 12 μM e concluímos que, para o clone CTR em confluência de 100% sem justaposição, a concentração onde observamos maior alteração morfológica e recuperação celular nos dias subsequentes foi de 6 μM CHIR (Figura 21).

Figura 21: Células de iPS (clone CTR) 24 horas (dia 1) após indução de formação de células de mesendoderme pela adição de diferentes concentrações de CHIR. A linha II demonstra as mesmas imagens apresentadas na linha I após lavagem dos poços com CDM3.

Testamos o uso de activina A e BMP4 (em separado e conjugados) 24 horas após a inativação da GSK3 e concluímos que, baseados no trabalho de Tan e colaboradores (90), o uso de BMP4 favorecia a formação de mesoderme em detrimento da formação de endoderme, aumentando o número de células de mesoderme mais puras nos estágios iniciais de diferenciação. A concentração ideal testada foi de 10 ng/mL, conclusão obtida após avaliação dos poços com maior porcentagem celular contrátil.

Uma vez que a via de Wnt foi ativada pela inibição da GSK3 pelo efeito do CHIR, utilizamos drogas descritas na literatura com função inibitória da Wnt. Foram testadas diferentes drogas para esse efeito: iWP2 e iWP4, utilizadas independentemente e caracterizadas por terem a mesma eficiência de inibição, por Lian e colaboradores, 2012 (103 e 104); apenas iWP4; e a combinação de XAV939 e KY2111, descrito por Minami e colaboradores, 2012 (109) e com os melhores resultados de inativação da via de Wnt. Os melhores resultados obtidos, segundo observação ao microscópio ótico do número de células contráteis a partir do dia 9 de diferenciação, foram pelo uso de 2,5 μ M de XAV939 combinado com a mesma concentração de KY2111.

A adaptação dos meios de cultura após o dia 7 de diferenciação não mostrou qualquer alteração em relação à eficiência de resultados, apenas tornou o processo menos dispendioso.

Figura 22: Esquema resumido do protocolo de diferenciação de células iPS em cardiomiócitos, adaptado e utilizado neste trabalho.

Uma vez estabelecido um protocolo capaz de diferenciar cerca de 80% do poço e com uma eficiência de reprodução quase absoluta (representado pelo esquema da Figura 22), repetimos este procedimento para os restantes clones de células iPS: o clone controle *scramble* (SCR), o clone com cerca de 70% de inibição de *PGC-1α* (C2) e o clone com 50% de inibição deste mesmo gene (C3).

Testamos o uso de CHIR em diferentes concentrações, uma vez que estávamos perante clones diferentes, mas não obtivemos diferenças em relação aos resultados iniciais do teste de CHIR no clone CTR.

O protocolo foi testado para todos os clones repetidas vezes, em simultâneo e em tempos diferentes, utilizando sempre as mesmas aliquotas de drogas e o mesmo lote de meios de cultura, para tentar minimizar as diferenças dos resultados obtidos entre placas e clones diferentes. Consideramos que este era um protocolo com elevada reprodutibilidade quando, aproximadamente 90% dos ensaios realizados apresentavam o mesmo resultado. A taxa de sucesso para a obtenção de células contráteis para cada poço dos clones controle (CTR e SCR) foi de cerca de 90%. Resumidamente, os resultados obtidos em relação à taxa de células contráteis estimada não variou: os clones CTR e SCR apresentaram contratilidade em cerca de 90% das tentativas de diferenciação; enquanto que o clone C3, com 50% de inibição

de PGC-1 α , apenas apresentou cerca de 20% do poço contrátil, em cerca de 30% das tentativas realizadas; por sua vez, o clone mais inibido C2 nunca apresentou células contráteis. A morfologia dos clones de iPSCs sofreu alterações diárias, durante o processo de diferenciação.

As primeiras evidências morfológicas mostram que PGC-1 α parece ter um papel fundamental na diferenciação de cardiomiócitos *in vitro*: as células com maior taxa de inibição deste gene nunca se mostraram contráteis nem morfologicamente idênticas aos cardiomiócitos derivados da diferenciação do clone SCR. Com o objetivo de compreender melhor o motivo pelo qual a diferenciação não ocorre, nós caracterizamos as células geradas durante os 16 dias de diferenciação. Procedemos a análises de expressão gênica e proteica, para as etapas de formação de diferentes tipos celulares que ocorre durante o desenvolvimento de cardiomiócitos, *in vitro*.

4.5 Caracterização dos cardiomiócitos derivados da diferenciação de células-tronco pluripotentes induzidas

Uma vez estabelecido um protocolo de diferenciação com elevada eficiência e reprodutibilidade, procedemos à caracterização básica das células de cardiomiócitos geradas. Foram avaliados os níveis de expressão de alguns marcadores moleculares e proteicos, por reação de PCR em tempo real e por citometria de fluxo.

Já que as células apresentavam contratilidade ao dia 9 e o nosso principal foco não era estudar cardiomiócitos maduros, consideramos o dia 15 como o último dia da diferenciação.

As células do clone C2 nunca apresentaram contratilidade no final do processo de diferenciação e o clone C3 apresentou em uma taxa relativamente baixa, tal como descrito anteriormente. Com o objetivo de compreender em qual etapa da diferenciação estas células apresentam características diferentes

das células dos clones controle, foram coletadas amostras nos principais dias da diferenciação, para todos os clones: dias 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10 e 15.

4.5.1 Avaliação da expressão dos marcadores moleculares durante a diferenciação em cardiomiócitos

Até esta etapa do trabalho, todos os ensaios foram realizados com dois clones controle, CTR e SCR. Uma vez que estamos perante experimentos dispendiosos a nível temporal e monetário, procedemos a uma caracterização comparativa entre o controlo CTR e o controlo SCR.

4.5.1.1 Análise de expressão comparativa entre os clones controle CTR e SCR

Avaliamos o perfil de expressão gênica do marcador de pluripotência *SOX2* e do nosso gene de interesse *PGC-1 α* durante a diferenciação de iPSCs em cardiomiócitos. Como podemos observar pela Figura 23A, não existem diferenças significativas nos valores da expressão de *SOX2*, entre os clones controle. Ambos os clones seguem o mesmo perfil gênico para este marcador: ao dia 0 apresentam valores bem elevados, (tal como demonstrado anteriormente pela forte marcação por imunofluorescência – Figura 18) pois ainda são células iPS. Ao longo dos dias da diferenciação, esta expressão é praticamente nula, uma vez que as células vão perdendo a sua pluripotência. Com relação aos resultados obtidos para o perfil de expressão gênica de *PGC-1 α* (Figura 23B) durante a diferenciação, observamos que a expressão em ambos os clones é mais elevada nos últimos dias de diferenciação. Este resultado comprova uma das nossas hipóteses de trabalho já que mostra uma relação entre a expressão de *PGC-1 α* e a formação de cardiomiócitos. Embora existam diferenças na expressão de *PGC-1 α* entre os clones controle apenas em alguns dias da diferenciação (dias 6, 7 e 15), esses resultados indicam que

o clone SCR é o controle mais indicado para ser utilizado nos experimentos com os clones inibidos em *PGC-1 α* .

Figura 23: (A) Perfil de expressão do marcador molecular de pluripotência *SOX2*, durante o processo de diferenciação de iPSCs em cardiomiócitos, dos clones controle (CTR) e *scramble* (SCR). (B) Perfil de expressão do gene *PGC-1 α* , durante o processo de diferenciação de iPSCs em cardiomiócitos, dos clones controle (CTR) e *scramble* (SCR). * $p < 0,05$ quando comparado com SCR, no mesmo dia de diferenciação.

4.5.1.2 Análise de expressão comparativa do clone controle SCR com os clones inibidos (C2 e C3)

Com o objetivo de avaliar se os clones transduzidos com vetores de inibição manteriam os seus valores de expressão de *PGC-1 α* reduzidos durante o processo de diferenciação em cardiomiócitos, avaliamos o perfil gênico deste gene nos clones C2 e C3, comparativamente com o clone SCR. Como podemos ver pelo gráfico Figura 24A, a expressão de *PGC-1 α* pelo clone C2 continua inibida, exceto nos dias 5 e 6 da diferenciação, em que os valores de expressão estão mais aumentados em relação ao clone SCR, embora não tenham sido reportadas diferenças estatísticas segundo o teste de OneWay ANOVA. Pela observação dos níveis de expressão definidos entre os dias 7 e 15, concluímos que as células do clone C2 permanecem com a expressão de *PGC-1 α* inibida, o que pode estar relacionado com o fato de este não atingir a formação de cardiomiócitos. Este mesmo perfil de expressão é retratado no clone C3 (Figura 24B).

Figura 24: Perfil de expressão do gene PGC-1 α dos clones C2 (A) e C3 (B), comparativamente com o clone controle SCR. * $p < 0,0001$ quando comparado com o SCR, no mesmo dia de diferenciação.

Após análise aprofundada destes gráficos é importante ressaltar que o clone C2 mantém uma inibição da expressão de *PGC-1 α* superior a 70%, após o dia 6, e o mesmo se verifica para o clone C3, que aumenta a sua porcentagem de inibição a partir do dia 7, em relação à expressão observada no clone SCR.

Uma vez confirmado que o perfil gênico de *PGC-1 α* se mantém inibido nos clones C2 (aproximadamente 70%) e C3 (aproximadamente 50%), seguimos para a análise de expressão de marcadores moleculares das diferentes etapas do processo de diferenciação. Para melhor garantir a veracidade dos resultados obtidos, foram coletados dois poços diferentes para cada dia da mesma diferenciação celular, para cada um dos clones.

Os valores obtidos para esta análise foram avaliados graficamente pelo logaritmo de base 2 da expressão relativa com o normalizador β 2M, pois facilita a análise quando perante picos de expressão com valores muito elevados. Os valores de expressão obtidos foram sempre comparados com o clone controle SCR.

A primeira etapa do processo de diferenciação *in vitro* é a formação de células da mesendoderme, através da inibição da via GSK3 e ativação da via Wnt, pela adição de CHIR. É esperado um pico de expressão dos genes T e MIXL1 entre os dias 1 e 2.

Figura 25: Expressão relativa dos principais marcadores moleculares de mesendoderme: *T* (A) e *MIXL1* (B) (* $p < 0,0001$ entre os três grupos; ** $p < 0,0001$ entre SCR e C2; ** $p < 0,0001$ entre SCR e C3).

Todos os clones apresentam um pico de expressão ao dia 2, indicando a formação de mesendoderme, tal como esperado (Figura 25). Pela figura 25A,

podemos observar que o perfil de expressão do gene *Brachyury* (*T*) é idêntico para os três clones, embora os valores sejam mais reduzidos para os clones C2 e C3: no dia 2 observa-se um pico de expressão, seguido de uma diminuição abrupta verificada no dia 3, momento em que ocorre a formação de mesoderme. O clone SCR apresenta uma expressão de cerca de 20 vezes e 2 vezes mais elevada do que os clones C2 e C3, respetivamente.

Em relação ao gene *MIXL1* (Figura 25B), o clone SCR apresenta expressão superior em cerca de 6 vezes mais do que o clone C2 e não apresenta nenhuma diferença de expressão comparando com o clone C3. Para este gene, a diminuição da expressão não é tão abrupta quanto para o gene *T*, uma vez que este ainda é expresso em células de mesoderme.

Podemos concluir que, embora o clone C3 também apresente uma expressão menor para o gene *T* em relação ao SCR, entre os clones C2 e C3 a expressão dos dois marcadores de formação de mesendoderme (*T* e *MIXL1*) apresentam valores completamente distintos: os valores obtidos para C3 são cerca de 13 vezes e 5 vezes superiores aos valores obtidos por C2. Este fato pode estar associado à formação incompleta da mesendoderme no clone C2.

Com a formação de mesendoderme, as células podem se dirigir para dois destinos: mesoderme ou endoderme. Após a adição de BMP4, a diferenciação ocorre no sentido da mesoderme, com posterior formação de progenitores cardíacos. Nesta etapa, é esperado que ocorra um aumento da expressão de genes da mesoderme cardíaca como *NKX2.5* e *ISL1*. Como podemos verificar pelo gráfico da Figura 26, existe um pico de expressão do gene *ISL1*, para os clones C2 e SCR no dia 5 da diferenciação, indicador da formação de mesoderme cardíaca. Neste caso, o clone C3 apresentou o seu pico de expressão um dia mais tarde do que os restantes clones, mas com valores idênticos aos obtidos pelo SCR. Contrariamente ao sucedido pela observação da Figura 25, o clone C2 atingiu o dobro do valor da expressão de SCR.

Figura 26: Expressão relativa do gene *ISL1*, marcador específico da mesoderme cardíaca. (* $p < 0,0001$ entre os três grupos; ** $p < 0,0001$ entre SCR e C2; ** $p < 0,0001$ entre SCR e C3)

Segundo avaliação das Figuras 25 e 26, uma possível explicação para as diferenças reduzidas da expressão do clone C2 em relação ao clone SCR para os genes *MIXL1* e *ISL1* (ambos com expressão na mesoderme), sendo que existe uma diferença de cerca de 20 vezes menos de expressão para o marcador da mesendoderme (T – praticamente não é expresso na mesoderme), é a formação direta de mesoderme, ou formação incompleta de mesendoderme pelo clone C2.

Para a formação de mesoderme cardíaca e de células progenitoras cardíacas, foram adicionados inibidores da via Wnt ao meio de cultura (XAV939 e KY2111). Após inativação desta via, as células passam a expressar outros marcadores de progenitores cardíacos, até à formação completa de cardiomiócito imaturo. Portanto nos próximos estágios, espera-se que haja um pico de expressão dos genes progenitores cardíacos *MYL7* e *MEF2C*.

Figura 27: Expressão relativa de genes progenitores cardíacos: *MEF2C* (A) e *MYL7* (B). (* $p < 0,0001$ entre os três grupos; ** $p < 0,0001$ entre SCR e C2; *** $p < 0,0001$ entre SCR e C3).

Para o gene *MEF2C*, observa-se um pico de expressão entre os dias 7 e 8, que é exatamente o momento que antecede o início da contratilidade celular.

Embora todos os clones apresentem níveis de expressão elevados no mesmo dia de diferenciação, o SCR possui cinco vezes mais de expressão de *MEF2C* comparando com C2 e apenas duas vezes mais quando comparado com C3. Os níveis de expressão deste gene são reduzidos logo em seguida, ao contrário do que acontece com o gene *MYL7*. O gene *MYL7* é o codificador da proteína de cadeia leve da miosina, presente nos progenitores cardíacos e nos cardiomiócitos, por isso, embora se observe uma curva exponencial de aumento da expressão a partir do dia 8 para o SCR, este atinge os valores mais elevados ao dia 15, com a maturação dos cardiomiócitos formados. Para os clones C2 e C3, os valores de expressão mais elevados são no dia 7 da diferenciação, mas são cerca de 8 e 5 vezes menores que a encontrada no SCR, respetivamente. Contrariamente ao que acontece com a constante expressão de *MYL7* para SCR até ao dia 15, para os clones C2 e C3 estes valores decrescem, indicando a inibição da formação de células com potenciais cardíacos. Mais uma vez, observamos que os níveis de expressão para os marcadores dos diferentes tipos celulares que se formam durante a diferenciação cardíaca *in vitro* estão cerca de 80% diminuídos no clone C2 (com 70% de inibição de *PGC-1α*). Para o clone C3, existe muita variabilidade na percentagem de repressão gênica nos dias referentes aos picos de expressão dos diversos genes, mas em todos os casos, observa-se uma diminuição muito maior nos níveis de expressão que sucedem esses dias, em relação ao SCR.

A expressão de *TNNI3*, gene codificador da proteína de interação entre a miosina e a actina, também foi avaliada para os três clones em alguns dias da diferenciação (Figura 28). Os valores de expressão relativa mais elevados foram no dia 8 para o clone SCR e no dia 7 para os clones C2 e C3. A expressão foi reduzindo até ao dia 15 para os clones inibidos, até atingirem valores equivalentes aos observados no dia 5 de diferenciação. O clone SCR apresentou valores de expressão aproximadamente 8 vezes superior ao dos restantes clones, e embora a sua expressão também tenha diminuído com o tempo de diferenciação, ele ainda manteve níveis superiores a qualquer outro dia da diferenciação.

Figura 28: Expressão do gene de troponina I (*TNNI3*) durante a diferenciação celular, para os três clones: *scramble* (SCR), C2 e C3. (* $p < 0,0001$ entre os três grupos; ** $p < 0,001$ entre SCR e C2; ** $p < 0,001$ entre SCR e C3).

Como pudemos verificar ao avaliar a expressão de marcadores moleculares de diferenciação em cardiomiócitos, o clone C2 possui uma expressão reduzida de todos os genes avaliados, em comparação com o clone SCR. O clone C3, em todos os gráficos possui os valores de expressão intermédia comparativamente com SCR e C2. Estes dados sugerem que o conteúdo de *PGC-1 α* influencia na expressão destes genes, já que C3 possui 50% de inibição e C2 possui 70% de inibição.

Estes resultados ressaltam a nossa hipótese de que a diferenciação é interrompida em células com inibição de *PGC-1 α* após a formação de células que exigem maior demanda de energia.

4.5.2 Caracterização dos marcadores proteicos durante a diferenciação em cardiomiócitos

Além da expressão dos marcadores moleculares, também foram analisados marcadores proteicos, através da metodologia de citometria de fluxo. Foram coletadas amostras diariamente e incubadas por 1 hora com anticorpos específicos. Durante a análise foi fácil compreender que algumas amostras sofreram alterações durante o processamento, já que a população de evento observada não separava populações. Nesses casos, consideramos o valor da porcentagem de eventos positivos do dia anterior.

Inicialmente foram testados os níveis de expressão proteica de marcadores de pluripotência: dois marcadores de membrana – SSEA4 e TRA-1-60 – e um marcador nuclear – NANOG. Para SSEA4 e TRA-1-60 observa-se um decréscimo nítido da porcentagem de eventos positivos durante a diferenciação. Para TRA-1-60 os eventos atingem quase o valor absoluto de 0% (Figura 29A), enquanto que para SSEA4, a média de valores se mantém em cerca de 40% de eventos positivos no dia 15 da diferenciação (Figura 29B). Por sua vez, a expressão de NANOG verificou-se inconstante: todos os clones mantêm praticamente 100% dos eventos positivos até ao dia 3; a partir deste dia, a sua expressão diminui, mas com picos inconstantes. No dia 15, verifica-se um aumento de cerca de 40% de eventos positivos (Figura 29C).

Com o objetivo de avaliar a expressão do marcador NKX2.5 (Figura 29D), um fator de transcrição essencial no desenvolvimento e formação de cardiomiócitos, realizamos a marcação com um anticorpo específico que apenas demonstrou valores de expressão elevados no dia 7 da diferenciação, para os clones C2 e SCR. Para o clone SCR, obtiveram-se os resultados esperados já que se trata de um controle, com um aumento e manutenção da porcentagem de eventos positivos desde o dia 7 até ao dia 15. Em C2, uma vez que em nenhum momento se observaram células contráteis, os resultados obtidos também foram os esperados, com uma diminuição drástica de NKX2.5 após o nono dia de diferenciação. Por sua vez, o clone C3 obteve um aumento

da expressão no dia 6, seguido de uma curva de valores inconstantes até ao dia 15.

A expressão de troponina T (cTnT) também foi avaliada por citometria de fluxo, como um complemento ao ensaio de avaliação de expressão relativa do gene troponina I (*TNNI3*). Verificamos um aumento na porcentagem de eventos positivos no dia 7 para o clone SCR e no dia 8 para os clones C2 e C3, com aumento ou manutenção do número de eventos positivos até ao dia 15. Observamos que C2 e C3 possuem cerca de 50% menos eventos positivos para troponina T quando comparados com SCR.

Figura 29: Porcentagem de eventos positivos obtidos por citometria de fluxo para marcadores proteicos de pluripotência – (A) SSEA4, (B) TRA-1-60 e (C) NANOG, para marcadores de progenitores cardíacos – (F) NKX2.5, e para marcadores de cardiomiócitos – (E) cTnT.

Pelos gráficos demonstrados na Figura 29, podemos observar que os valores de porcentagem de eventos positivos são sempre mais elevados no clone SCR, seguidos do clone C3 e por último, do clone C2. Um exemplar de gráfico com população selecionada está no anexo I, bem como a tabela com todos os valores de porcentagens positivas.

Com todos estes resultados, podemos observar que o clone C2 com inibição de aproximadamente 70% da expressão do gene *PGC-1 α* possui sempre expressão diminuída em relação a C3 e a SCR.

Uma vez que estamos perante clones transduzidos com um vetor que contém GFP, estes emitem um sinal de fluorescência mesmo após diferenciação. Durante o processo de diferenciação das células-tronco pluripotentes induzidas em cardiomiócitos, as células foram observadas ao microscópio de fluorescência, a fim de analisar a eventual perda do gene GFP, inserido nos vetores transduzidos no início do trabalho. Com o estabelecimento de um protocolo de diferenciação com taxa de eficiência e reprodutibilidade próximas a 90%, foi possível produzir vídeos das células do clone SCR após diferenciação, com contração característica de cardiomiócitos. Durante a apresentação deste trabalho, será mostrado um vídeo de células contráteis, GFP positivas (clone SCR).

Como observado pela Figura 30, as células do clone SCR são positivas quando avaliada a expressão proteica de cTnT, no dia 15 de diferenciação. Este resultado, complementando todos os acima referidos e com o vídeo que será demonstrado durante a apresentação, demonstra que, independentemente do grau de maturação dos cardiomiócitos atingido, a diferenciação das células controle ocorreu com sucesso. Esta avaliação de

expressão proteica de cTnT pela técnica de imunofluorescência também foi realizada para os clones C2 e C3, onde não se observou nenhum resultado positivo (imagens não demonstradas, sem fluorescência). As células não foram singularizadas, o que dificultou a obtenção de um bom foco das imagens.

Este resultado apenas complementa os restante obtidos: não ocorre formação de cardiomiócitos nas células inibidas de PGC-1 α , o que demonstra que o metabolismo mitocondrial e a expressão desta cofator de transcrição possuem importantes funções na formação de cardiomiócitos provenientes da diferenciação de células-tronco pluripotentes induzidas.

Figura 30: Imagens capturadas através do microscópio de fluorescência, das células do clone SCR no dia 15 da diferenciação de cardiomiócitos. As células foram submetidas à marcação com troponina T (cTnT) e Alexa 555 (vermelho); este clone é GFP positivo (verde); utilizamos o DAPI para marcação nuclear (azul); escala 50 µm.

5 DISCUSSÃO

5.1 *Doenças cardíacas e células-tronco pluripotentes induzidas*

As doenças cardiovasculares constituem uma das principais causas de mortalidade a nível mundial.

Nas últimas décadas, a terapia celular tem sido fortemente abordada para a criação de tratamentos inovadores de doenças cardiovasculares, como o infarto do miocárdio. Com a geração de células-tronco pluripotentes induzidas *in vitro*, provenientes de células adultas de pacientes portadores de doenças ou até de indivíduos saudáveis, abriram-se novas esperanças tanto a nível médico, quanto científico.

Neste trabalho foram geradas células iPS humanas pela reprogramação de células de fibroblasto adultas, segundo o método de integração viral dos fatores de transcrição descritos por Yamanaka, no genoma da célula. Optou-se pelo uso deste método de reprogramação uma vez que, segundo descrições literárias, é o que apresenta maior taxa de eficiência na formação de colônias iPSCs-like e é o método menos dispendioso, tanto a nível temporal quanto monetário. Hoje em dia existem outros métodos bem descritos em que não ocorre integração do produto viral no genoma da célula, o que parece ser indispensável nos casos de estudo de terapia celular ou de transplante de células. Com a utilização do método de reprogramação integrativo é possível que ocorra mutações aleatórias uma vez que a integração do genoma viral pode ocorrer em qualquer lugar do genoma da célula que não impeça a reprogramação, mas que pode interferir com a manutenção ou até diferenciação das células iPS geradas, dependendo do lugar onde ocorre integração. Já que estamos perante um modelo de estudo de eventuais doenças relacionadas com a indução da variação de um fator de transcrição relacionado ao metabolismo, não houve necessidade de recorrer a outro método de reprogramação, uma vez que as células se mantiveram caracteristicamente como o esperado e já que existe garantia de que os

transgenes são silenciados ao final de algum tempo das células. Quando iniciamos este projeto, em 2012, apenas estavam descritos protocolos que utilizavam fibroblastos para reprogramação celular. Entretanto, estudos descrevem que é possível a utilização de outros tipos celulares para reprogramação em iPSCs que não necessitem de biopsia de tecido, sendo menos invasivos.

5.2 Efeitos da inibição da expressão de PGC-1 α

As doenças cardiovasculares estão diretamente relacionadas com o metabolismo dos cardiomiócitos (60). O desbalanceamento crônico da homeostase energética, onde o gasto de energia é superior à quantidade de energia produzida, representa um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento de síndromes metabólicas (66). A alteração da expressão de genes envolvidos no metabolismo de lípidos e glicose bem como na fosforilação oxidativa pela mitocôndria têm grandes implicações nestas doenças.

Sabemos que, devido à grande demanda de energia necessária para a sua contração e homeostase, os cardiomiócitos possuem um grande número de mitocôndrias ou mitocôndrias de maior tamanho.

Segundo dados publicados na literatura, sabemos que a família dos cofatores de transcrição de PGC-1 são os principais reguladores da biogênese mitocondrial (31, 41). O cofator de transcrição PGC-1 α é transcrito no núcleo da célula mas as suas principais funções atuam sobre a mitocôndria e consequentemente, sobre o metabolismo celular. Sabe-se que, quando há alterações de ambiente na célula, o cofator de subunidade α facilita a adaptação biológica de demanda energética na célula, aumentando a biogênese mitocondrial, elevando os níveis de respiração celular e controlando o consumo do substrato energético existente. Considerando que durante o desenvolvimento do cardiomiócito, desde o estágio embrionário até à sua completa maturação, ocorrem alterações das vias metabólicas das células,

podemos concluir que os níveis de expressão de *PGC-1 α* estão associados a este processo. Estudos relacionados com o desenvolvimento e metabolismo celulares relatam a essencial função deste cofator com o funcionamento de células cardíacas (42, 91, 92).

O princípio básico deste trabalho foi avaliar qual o efeito da variação da expressão de *PGC-1 α* nas células iPS geradas, para posterior diferenciação. As células iPS são conhecidas pelas suas principais características de auto-renovação ilimitada e diferenciação em todas as linhas germinativas. Desta forma, este tipo celular exige uma elevada demanda de energia, para constante proliferação, fato que contribui para a formulação da hipótese. A expressão relativa de *PGC-1 α* do clone de iPS gerado foi comparado com a de células de fibroblasto adultas, onde se verificou que as células-tronco pluripotentes apresentam uma expressão de cerca de 30 vezes mais elevada deste gene.

Por observação deste resultado, induzimos a inibição e a superexpressão de *PGC-1 α* a fim de avaliar as consequências nas principais características das células iPS. A técnica utilizada para a alteração dos níveis de expressão deste gene foi por meio de lentivírus de terceira geração, uma vez que apresenta maior estabilidade, menos chance de ocorrer mutagênese insercional e garante a expressão do transgene por um longo período de tempo (até anos).

Para superexpressar *PGC-1 α* utilizamos um vetor comercial, mas não obtivemos resultados positivos após a sua transfecção e transdução, talvez porque estas células já possuem níveis muito elevados deste gene, não permitindo a sua superexpressão. O tamanho do gene *PGC-1 α* (2400 pb) também pode ter sido um dos causadores deste insucesso, pois a sua integração no genoma na célula é dificultada.

Utilizamos um plasmídeo adequado para a clonagem de *short hairpin*-RNA para a indução da inibição do gene de *PGC-1 α* – *pGreenPuro*. A transdução com lentivírus contendo o vetor com sequência inespecífica *scramble* (SCR) não alterou em nada as características de pluripotência do

clone CTR da iPSCs geradas, e por isso, tardiamente, utilizamos apenas este clone como controle. A transdução com lentivírus contendo a sequência de shRNA-1, desenhado com uma sequência adequada para anelar no início do gene de *PGC-1 α* também não foi bem sucedida, talvez porque iria provocar inibição absoluta da expressão do gene na célula, não permitindo a sua sobrevivência. Por sua vez, os clones transduzidos com o shRNA-2 (C2) e com o shRNA-3 (C3) sobreviveram e por avaliação da expressão relativa através da reação de PCR em tempo real, verificou-se inibição de cerca de 70% e 50% da expressão de *PGC-1 α* , respectivamente. As tentativas de geração do clone C2 foram diversas, devido à intensa morte celular observada após transdução do vetor shRNA-2. Estes dados sugerem que a célula não consegue sobreviver com mais de 70% de inibição deste gene. Mesmo inibidos, os clones C2 e C3 apresentam uma expressão de cerca de 10 vezes e 17 vezes (respectivamente) mais elevados de *PGC-1 α* do que os fibroblastos.

Considerando estas grandes diferenças nos níveis de expressão de *PGC-1 α* entre células-tronco pluripotentes e os fibroblastos, uma estratégia alternativa para este estudo, seria induzir a variação da expressão deste cofator em fibroblastos humanos, e proceder à reprogramação destas células em células iPS. Uma vez que o processo de reprogramação em células iPS envolve alterações de ativação e inativação de genes, bem como da seleção de uma única célula somática, esta estratégia torna-se muito mais complicada de realizar. Devido à reduzida expressão deste cofator observada em fibroblastos adultos, a probabilidade de não sobrevivência destas células após indução de inibição do gene é grande. Além disso, ainda não há conhecimento acerca do impacto do *PGC-1 α* durante a reprogramação celular.

Os quatro clones de iPSCs gerados, após confirmação da inibição da expressão de *PGC-1 α* , foram avaliados quanto ao seu potencial de pluripotência e comparados com os resultados dos ensaios descritos na literatura. Utilizamos a técnica de PCR em tempo real para avaliação dos marcadores moleculares, e as técnicas de imunofluorescência e citometria de fluxo para a avaliação dos marcadores proteicos. A expressão relativa dos marcadores de pluripotência *POU5F1*, *SOX2* e *REX1* dos quatro clones de

iPSCs gerados (CTR, SCR, C2 e C3) foram comparados com células-tronco embrionárias (BR-1) e com células diferenciadas de fibroblastos adultos (Fibro) (Figura 19). Verificaram-se algumas variações não esperadas: as células BR-1 apresentaram níveis mais elevados de expressão de *SOX2* em relação aos clones de iPSCs e cerca de 200 vezes menos de expressão do gene *REX1*. Os níveis de expressão mais elevados podem ser explicados devido à origem de cada tipo celular: as células embrionárias têm origem em células provenientes do blastocisto, enquanto que as células iPS provêm de uma reprogramação artificial de células adultas diferenciadas. Com relação às diferenças de expressão do gene *REX1*, os resultados obtidos não apresentaram relevância neste trabalho, uma vez que apenas utilizamos as células de iPS para os experimentos seguintes; de qualquer forma, a célula BR-1 expressa cerca de 417 vezes mais *REX1* do que as células de fibroblasto testadas, confirmando a sua pluripotência.

Um outro método utilizado neste trabalho para avaliar a pluripotência dos clones gerados foi através da indução da formação de corpos embrióides e sua diferenciação espontânea em células derivadas das três linhagens germinativas. Este ensaio, embora seja simples e rápido, hoje em dia, permite a substituição do processo de formação de teratomas em camundongos imunodeficientes. Aliás, um dos principais princípios para o uso de células-tronco pluripotentes induzidas para a pesquisa científica é a redução do uso de camundongos no teste de drogas, de extração de células, de estudos preliminares de doenças, entre outros.

As células foram mantidas em cultura com meios apropriados, por passagens constantes com reagentes não enzimáticos, o que nós acreditamos que contribuiu para a manutenção da integridade cromossômica. Existem estudos que relatam que apenas as passagens realizadas mecanicamente (com corte de colônia manualmente) são as que induzem menos instabilidade a nível cromossômico, comparando com as passagens realizadas com o uso de reagente enzimáticos (Tryple) ou não enzimáticos (Versene) (93). Estas evidências não foram observadas no nosso trabalho, uma vez que, segundo

avaliação citogenética, o cariótipo dos quatro clones de iPS se manteve inalterado (Figura 17).

Os métodos de reprogramação e de inibição de expressão gênica utilizados (lentivírus) possuem diversas vantagens em termos de eficiência e duração de tempo, mas podem constituir um risco para a ocorrência de mutações geradas por inserção de transgenes em locais aleatórios do genoma celular. Estudos relatam que as células iPS, quando mantidas em cultura por muito tempo, tendem a sofrer mutações do tipo pontuais (94) ou até duplicações ou deleções (95). Neste trabalho, apenas verificamos a integridade cromossômica por análise citogenética, uma vez que os clones de iPS se apresentavam com características idênticas e típicas deste tipo celular. A capacidade de diferenciação destes clones nas três linhagens germinativas, bem como as suas capacidades de diferenciação em cardiomiócitos comprovaram que, para este estudo, uma avaliação aprofundada de mutações genéticas era desnecessária. Associado ao fato do nosso trabalho pretender avaliar as diferenças observadas entre os quatro clones gerados e que todos mostraram ser capazes de se diferenciarem, a existência ou não de mutações não constitui uma grande interferência para os nossos objetivos.

Hoje em dia existem outras técnicas mais elegantes para induzir a inibição da expressão de transgenes, como por exemplo CRISPR. Todavia, esta técnica ainda não era totalmente conhecida e confiável quando este projeto se iniciou (2012). Além disso, segundo os nossos resultados iniciais, a inibição completa do gene *PGC-1 α* não é compatível com a sobrevivência e manutenção das células iPS, o que se torna um impedimento para o uso da técnica de CRIPR, favorecendo a utilização do método constitutivo do lentivírus.

Finalizados estes ensaios com a garantia que estamos perante clones pluripotentes e simultaneamente dois deles (C2 e C3) com inibição de *PGC-1 α* (70% e 50%, respetivamente), procedemos à segunda parte deste trabalho: a diferenciação de células iPS em cardiomiócitos.

5.3 Diferenciação em cardiomiócitos e o impacto da inibição de PGC-1 α

Esta etapa foi a mais laboriosa e conflituosa devido à dificuldade extrema de reproduzir os mesmos resultados quando baseados em protocolos descritos na literatura. Observamos uma variação extrema de resultados, em cada dia da diferenciação: desde muita morte celular a praticamente nenhuma, alterações morfológicas em momentos inconstantes, bem como formação de células contráteis ou com aparência de células iPS. Esta diminuída taxa de reprodutibilidade dos protocolos descritos na literatura pode ocorrer por diversos motivos: variabilidade genética inerente a cada linhagem celular (observada, por exemplo, na variação da expressão dos marcadores de pluripotência segundo ensaios de PCR em tempo real) (96); importação demorada dos reagentes utilizados para diferenciação celular devido a questões alfandegárias; condições de cultivo e manutenção das linhagens de iPSCs.

Desta forma, decidimos desenvolver, pela compilação de adaptações já descritas na literatura, um novo protocolo de diferenciação em cardiomiócitos.

Como descrito no capítulo de resultados deste trabalho, o exato momento que antecede a diferenciação (desde o plaqueamento das células até ao dia 0), revelou-se o mais importante para que a eficiência de protocolo fosse elevada e constante. Confluência e homogeneidade, foram as principais adequações chave que influenciaram a obtenção de células contráteis no final do protocolo. A troca do meio E8 por mTeSR nos dias que antecedem a diferenciação também influenciou o estado preparatório da célula para este processo, uma vez que se sabe que o meio mTeSR possui mais componentes do que o meio E8, que podem interferir positivamente com os reagentes utilizados durante a diferenciação.

A adequação da concentração ideal de CHIR (inibidor de GSK3) e posterior utilização de BMP4 foram as alterações mais significativas para o sucesso do protocolo. Com a inibição da via GSK3 e consequente ativação da

via Wnt, as células tendem a formar mesendoderme. O uso de BMP4 apenas favorece a diferenciação em células de mesoderme, que é o tecido primordial e essencial para o desenvolvimento cardíaco. Os genes responsáveis pela formação destes tecidos foram avaliados segundo expressão relativa por PCR em tempo real, e após confirmação do aumento da expressão destes marcadores pelas células iPS em diferenciação, demos continuidade ao processo. Durante a etapa seguinte, ocorre a formação de células progenitoras cardíacas e finalmente cardiomiócitos. Foram testados diversos componentes, em associação ou isolados, com várias concentrações, e concluímos que o protocolo que demonstrou maior taxa de eficiência e reprodutibilidade foi quando utilizamos a associação de XAV e KY, para a inibição da via Wnt, e formação de progenitores cardíacos. O uso do meio CDM3 a partir do dia 9 não mostrou qualquer interferência no resultado final obtido, então nós continuamos com o seu uso, uma vez que é menos dispendioso do que o usado anteriormente (RB+).

Como demonstração da importância da ativação de PGC-1 α em células diferenciadas em cardiomiócitos, recorreremos a uma análise de expressão relativa por PCR em tempo real de amostras coletadas diariamente durante a diferenciação celular. Observamos que ocorre um aumento exacerbado de expressão de PGC-1 α a partir do dia 7 (após formação de progenitores cardíacos), de cerca de 7 vezes mais quando comparado ao dia 0. Estes resultados corroboram com as descrições existentes na literatura, mostrando que este cofator de transcrição é muito importante na manutenção da função de cardiomiócitos (42, 91, 92).

Após uma árdua e demorada padronização do protocolo de diferenciação de células iPS em cardiomiócitos, consideramos o protocolo anteriormente descrito o melhor por possuir maior taxa de reprodutibilidade e eficiência, quando testado com os clones de iPS controle (CTR e SCR). Uma vez que não foram observadas diferenças na eficiência do protocolo entre estes dois clones, procedemos à diferenciação dos clones com inibição de PGC-1 α . Avaliamos se a expressão de PGC-1 α se mantinha inibida durante a diferenciação, e observamos que o perfil gênico destas células não mudou,

sendo que nos últimos dias de diferenciação se mantinham inibidas. Várias tentativas foram realizadas, mas em nenhuma delas se observou células do clone C2 contráteis. Por sua vez, para as células do clone C3, o protocolo foi repetido tantas vezes quanto para C2, pelo que, apenas 20% do poço se apresentava contrátil (principalmente junto das bordas do poço), em aproximadamente 30% das tentativas realizadas.

Com o objetivo de compreender qual o motivo pelo qual as células iPS geradas com inibição de *PGC-1 α* nunca terem apresentado células contráteis no final do protocolo, procedemos a uma caracterização das células durante o processo de diferenciação. Inicialmente, caracterizamos as células quanto à sua pluripotência, por análise de expressão gênica de PCR em tempo real e por análise de expressão proteica por citometria de fluxo. Verificamos que as células mantêm o mesmo padrão de expressão para os marcadores SSEA4, TRA-1-60 e NANOG o que corrobora com o fato de que a inibição de *PGC-1 α* não interfere com a manutenção da pluripotência da célula antes, durante e após diferenciação. Para este último marcador nuclear (NANOG), obtivemos resultados que demonstram grandes variações nos picos de expressão (Figura 29C), mas que podem estar associados à formação de mesoderme. Hatano e colaboradores, em 2005, descreveram que a ausência da transcrição do gene NANOG induz a diferenciação das células em tecido endodérmico, enquanto que apenas uma redução de aproximadamente 50% da sua transcrição, contribui para a ativação de genes indutores da mesoderme e ectoderme (97). Curiosamente, os níveis de expressão de NANOG para o clone com maior taxa de inibição de *PGC-1 α* , aumentam nos últimos dias de diferenciação, e para os clones SCR e C3 esta expressão é reduzida. Embora não conclusivo, este dado corrobora com a ausência de células cardiomiócito-*like* no final da diferenciação.

Avaliamos a expressão dos principais marcadores de mesendoderme – *T* e *MIXL1* – onde observamos um pico de expressão ao dia 2, como esperado. As diferenças dos níveis de expressão do gene *Brachyury* (*T*) foram bastante significativas, quando comparamos os clones inibidos em *PGC-1 α* com o clone SCR: cerca de 20 vezes e 2 vezes mais, em relação a C2 e C3,

respectivamente, o que pode significar uma diferenciação incompleta em mesendoderme do clone C2 (Figura 25A). Por outro lado, em relação ao gene *MIXL1*, marcador de mesendoderme e de mesoderme, a relação dos níveis de expressão entre C2 e SCR não é tão grande (apenas 6 vezes menos) e não se observaram diferenças significativas entre os clones C3 e SCR (Figura 25B). Estes resultados indicam que o clone que apresenta maior taxa de inibição de *PGC-1 α* possui maior capacidade de geração de mesoderme do que de mesendoderme. Os resultados de *ISL1* (marcados de mesoderme cardíaca) corroboram com essa afirmação, já que observamos valores mais elevados para o clone C2 comparativamente com o clone SCR (aproximadamente o dobro).

Paralelamente, analisamos a expressão proteica de NKX2.5 (marcador de células progenitoras cardíacas) (Figura 29D), essencial no desenvolvimento e formação de cardiomiócitos. Conforme esperado, observou-se um pico de expressão no dia 7 para os clones SCR e C2, sem diferenças significativas entre ambos; por sua vez, o clone SCR manteve a expressão deste marcador até ao dia 15 da diferenciação, fato que não foi observado no clone C2, em que o número de eventos positivos atingiu valores próximos aos observados no dia 5 (em que ainda não há expressão deste gene), o que pode explicar a inexistência de células contráteis. O clone C3, que não é tão inibido quanto o clone C2, mostrou variação de expressão deste marcador, desde o dia 6 até o dia 15, o que também pode explicar a formação incompleta de células cardíacas.

Relativamente aos resultados obtidos para a quantificação de eventos positivos marcados com cTnT (marcador de troponina T – relacionado com a tropomiosina) (Figura 29E), observou-se uma curva exponencial de crescimento no dia 7 para o clone SCR e no dia 8 para os clones C2 e C3, seguidos de estabilização de porcentagem de eventos positivos até ao dia 15. Embora o perfil de expressão entre os clones seja idêntico, a quantidade de eventos positivos observada em C2 e C3 foi cerca de metade, quando comparado com o controle. Por sua vez, para a troponina I (*TNNI3* – relacionado com a interação entre a miosina e a actina) (Figura 28), observa-se

um pico de expressão no dia 7 para os clones C2 e C3 e no dia 8 para o clone SCR, com valores de cerca 8 vezes superiores aos dos obtidos para os clones inibidos. Mais uma vez, a expressão deste marcador diminui exponencialmente até ao dia 15, para os clones C2 e C3, atingindo valores idênticos aos observados no dia 5 de diferenciação, em que praticamente não existe expressão deste gene.

Estes dados corroboram com a possibilidade da paragem ou redução do processo de diferenciação quando estamos perante clones com menor expressão de *PGC-1 α* . O clone C3 apresenta uma inibição de cerca de 50% da expressão de *PGC-1 α* enquanto que o clone C2 apresenta uma inibição de 70%. Segundo a análise de todos os gráficos de expressão molecular e proteica dos marcadores avaliados, C2 possui sempre valores diminuídos em relação a C3, que por sua vez também possui valores menores quando comparado com SCR.

Ainda são necessários outros experimentos que avaliem as características e funcionalidades das células geradas, mas com os resultados obtidos por este trabalho indicam que a inibição do cofator de transcrição *PGC-1 α* não interfere com as características de pluripotência inerentes às células iPS, embora não tenha sido possível a geração de iPSCs com inibição absoluta deste gene. Analisando todos os dados obtidos após submeter estas células ao processo de diferenciação em cardiomiócitos, e considerando os dados da literatura que referem a elevada demanda energética exigida por estas células cardíacas, podemos inferir que *PGC-1 α* interfere na formação de cardiomiócitos funcionais, *in vitro*.

6 CONCLUSÃO

Neste trabalho, foi estabelecido um protocolo de reprogramação celular e de diferenciação de células iPS em cardiomiócitos. Uma vez que estes protocolos se mostraram robustos, a expressão de PGC-1 α foi inibida e avaliada quanto ao seu papel durante o desenvolvimento cardíaco.

Nossos dados permitem concluir que a inibição parcial de PGC-1 α não compromete o fenótipo de pluripotência das células-tronco pluripotentes induzidas mas interfere na capacidade das mesmas em se diferenciarem em cardiomiócitos, provavelmente por alterar a expressão dos genes relacionados com a formação da mesendoderme ou até mesmo por inibir a formação de cardiomiócitos. Estudos relativos ao potencial papel deste cofator durante o desenvolvimento cardíaco *in vivo* ainda precisam ser aprofundados, utilizando outros modelos de estudo.

7 BIBLIOGRAFIA

1. Mummery CL, Davis RP, Krieger JE. Challenges in using stem cells for cardiac repair. *Sci Transl Med*. 2010;2(27):27ps17.
2. Malliaras K, Zhang Y, Seinfeld J, Galang G, Tseliou E, Cheng K, et al. Cardiomyocyte proliferation and progenitor cell recruitment underlie therapeutic regeneration after myocardial infarction in the adult mouse heart. *EMBO Mol Med*. 2013;5(2):191-209.
3. Laflamme MA, Murry CE. Heart regeneration. *Nature*. 2011;473(7347):326-35.
4. Schachinger V, Erbs S, Elsasser A, Haberbosch W, Hambrecht R, Holschermann H, et al. Intracoronary bone marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction. *N Engl J Med*. 2006;355(12):1210-21.
5. Tendera M, Wojakowski W, Ruzyllo W, Chojnowska L, Kepka C, Tracz W, et al. Intracoronary infusion of bone marrow-derived selected CD34+CXCR4+ cells and non-selected mononuclear cells in patients with acute STEMI and reduced left ventricular ejection fraction: results of randomized, multicentre Myocardial Regeneration by Intracoronary Infusion of Selected Population of Stem Cells in Acute Myocardial Infarction (REGENT) Trial. *Eur Heart J*. 2009;30(11):1313-21.
6. Funakoshi S, Miki K, Takaki T, Okubo C, Hatani T, Chonabayashi K, et al. Enhanced engraftment, proliferation, and therapeutic potential in heart using optimized human iPSC-derived cardiomyocytes. *Sci Rep*. 2016;6:19111.
7. Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*. 1981;292(5819):154-6.
8. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*. 1998;282(5391):1145-7.
9. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006;126(4):663-76.
10. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*. 2007;131(5):861-72.
11. Gonzalez F, Boue S, Izpisua Belmonte JC. Methods for making induced pluripotent stem cells: reprogramming a la carte. *Nat Rev Genet*. 2011;12(4):231-42.

12. Nishikawa S, Goldstein RA, Nierras CR. The promise of human induced pluripotent stem cells for research and therapy. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008;9(9):725-9.
13. Somers A, Jean JC, Sommer CA, Omari A, Ford CC, Mills JA, et al. Generation of transgene-free lung disease-specific human induced pluripotent stem cells using a single excisable lentiviral stem cell cassette. *Stem Cells.* 2010;28(10):1728-40.
14. Mochiduki Y, Okita K. Methods for iPS cell generation for basic research and clinical applications. *Biotechnol J.* 2012;7(6):789-97.
15. Okano H, Nakamura M, Yoshida K, Okada Y, Tsuji O, Nori S, et al. Steps toward safe cell therapy using induced pluripotent stem cells. *Circ Res.* 2013;112(3):523-33.
16. Warren L, Manos PD, Ahfeldt T, Loh YH, Li H, Lau F, et al. Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA. *Cell Stem Cell.* 2010;7(5):618-30.
17. Okita K, Matsumura Y, Sato Y, Okada A, Morizane A, Okamoto S, et al. A more efficient method to generate integration-free human iPS cells. *Nat Methods.* 2011;8(5):409-12.
18. Zhou T, Benda C, Duzinger S, Huang Y, Li X, Li Y, et al. Generation of induced pluripotent stem cells from urine. *J Am Soc Nephrol.* 2011;22(7):1221-8.
19. Campisi J. Cellular senescence as a tumor-suppressor mechanism. *Trends Cell Biol.* 2001;11(11):S27-31.
20. Maimets T, Neganova I, Armstrong L, Lako M. Activation of p53 by nutlin leads to rapid differentiation of human embryonic stem cells. *Oncogene.* 2008;27(40):5277-87.
21. Cho YM, Kwon S, Pak YK, Seol HW, Choi YM, Park DJ, et al. Dynamic changes in mitochondrial biogenesis and antioxidant enzymes during the spontaneous differentiation of human embryonic stem cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006;348(4):1472-8.
22. Utikal J, Polo JM, Stadtfeld M, Maherali N, Kulalert W, Walsh RM, et al. Immortalization eliminates a roadblock during cellular reprogramming into iPS cells. *Nature.* 2009;460(7259):1145-8.
23. Chin MH, Mason MJ, Xie W, Volinia S, Singer M, Peterson C, et al. Induced pluripotent stem cells and embryonic stem cells are distinguished by gene expression signatures. *Cell Stem Cell.* 2009;5(1):111-23.
24. Facucho-Oliveira JM, St John JC. The relationship between pluripotency and mitochondrial DNA proliferation during early embryo development and embryonic stem cell differentiation. *Stem Cell Rev.* 2009;5(2):140-58.

25. Szibor M, Holtz J. Mitochondrial ageing. *Basic Res Cardiol*. 2003;98(4):210-8.
26. Prigione A, Cortopassi G. Mitochondrial DNA deletions induce the adenosine monophosphate-activated protein kinase energy stress pathway and result in decreased secretion of some proteins. *Aging Cell*. 2007;6(5):619-30.
27. Lonergan T, Bavister B, Brenner C. Mitochondria in stem cells. *Mitochondrion*. 2007;7(5):289-96.
28. Prigione A, Fauler B, Lurz R, Lehrach H, Adjaye J. The senescence-related mitochondrial/oxidative stress pathway is repressed in human induced pluripotent stem cells. *Stem Cells*. 2010;28(4):721-33.
29. Lai L, Wang M, Martin OJ, Leone TC, Vega RB, Han X, et al. A role for peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 (PGC-1) in the regulation of cardiac mitochondrial phospholipid biosynthesis. *J Biol Chem*. 2014;289(4):2250-9.
30. Armstrong L, Tilgner K, Saretzki G, Atkinson SP, Stojkovic M, Moreno R, et al. Human induced pluripotent stem cell lines show stress defense mechanisms and mitochondrial regulation similar to those of human embryonic stem cells. *Stem Cells*. 2010;28(4):661-73.
31. Kelly DP, Scarpulla RC. Transcriptional regulatory circuits controlling mitochondrial biogenesis and function. *Genes Dev*. 2004;18(4):357-68.
32. Puigserver P, Wu Z, Park CW, Graves R, Wright M, Spiegelman BM. A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell*. 1998;92(6):829-39.
33. Andersson U, Scarpulla RC. Pgc-1-related coactivator, a novel, serum-inducible coactivator of nuclear respiratory factor 1-dependent transcription in mammalian cells. *Mol Cell Biol*. 2001;21(11):3738-49.
34. Lin J, Puigserver P, Donovan J, Tarr P, Spiegelman BM. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1beta (PGC-1beta), a novel PGC-1-related transcription coactivator associated with host cell factor. *J Biol Chem*. 2002;277(3):1645-8.
35. Lin J, Handschin C, Spiegelman BM. Metabolic control through the PGC-1 family of transcription coactivators. *Cell Metab*. 2005;1(6):361-70.
36. Lin J, Wu H, Tarr PT, Zhang CY, Wu Z, Boss O, et al. Transcriptional coactivator PGC-1 alpha drives the formation of slow-twitch muscle fibres. *Nature*. 2002;418(6899):797-801.
37. Kamei Y, Ohizumi H, Fujitani Y, Nemoto T, Tanaka T, Takahashi N, et al. PPARgamma coactivator 1beta/ERR ligand 1 is an ERR protein ligand, whose

expression induces a high-energy expenditure and antagonizes obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(21):12378-83.

38. St-Pierre J, Lin J, Krauss S, Tarr PT, Yang R, Newgard CB, et al. Bioenergetic analysis of peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivators 1alpha and 1beta (PGC-1alpha and PGC-1beta) in muscle cells. *J Biol Chem*. 2003;278(29):26597-603.

39. Lehman JJ, Barger PM, Kovacs A, Saffitz JE, Medeiros DM, Kelly DP. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 promotes cardiac mitochondrial biogenesis. *J Clin Invest*. 2000;106(7):847-56.

40. Puigserver P, Spiegelman BM. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 alpha (PGC-1 alpha): transcriptional coactivator and metabolic regulator. *Endocr Rev*. 2003;24(1):78-90.

41. Scarpulla RC. Metabolic control of mitochondrial biogenesis through the PGC-1 family regulatory network. *Biochim Biophys Acta*. 2011;1813(7):1269-78.

42. Rowe GC, Jiang A, Arany Z. PGC-1 coactivators in cardiac development and disease. *Circ Res*. 2010;107(7):825-38.

43. Lin J, Tarr PT, Yang R, Rhee J, Puigserver P, Newgard CB, et al. PGC-1beta in the regulation of hepatic glucose and energy metabolism. *J Biol Chem*. 2003;278(33):30843-8.

44. Lowell BB. PPARgamma: an essential regulator of adipogenesis and modulator of fat cell function. *Cell*. 1999;99(3):239-42.

45. Spiegelman BM. PPAR-gamma: adipogenic regulator and thiazolidinedione receptor. *Diabetes*. 1998;47(4):507-14.

46. van Raalte DH, Li M, Pritchard PH, Wasan KM. Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)-alpha: a pharmacological target with a promising future. *Pharm Res*. 2004;21(9):1531-8.

47. Borniquel S, Valle I, Cadenas S, Lamas S, Monsalve M. Nitric oxide regulates mitochondrial oxidative stress protection via the transcriptional coactivator PGC-1alpha. *FASEB J*. 2006;20(11):1889-91.

48. Huss JM, Kopp RP, Kelly DP. Peroxisome proliferator-activated receptor coactivator-1alpha (PGC-1alpha) coactivates the cardiac-enriched nuclear receptors estrogen-related receptor-alpha and -gamma. Identification of novel leucine-rich interaction motif within PGC-1alpha. *J Biol Chem*. 2002;277(43):40265-74.

49. Huss JM, Imahashi K, Dufour CR, Weinheimer CJ, Courtois M, Kovacs A, et al. The nuclear receptor ERRalpha is required for the bioenergetic and functional adaptation to cardiac pressure overload. *Cell Metab*. 2007;6(1):25-37.

50. Alaynick WA, Kondo RP, Xie W, He W, Dufour CR, Downes M, et al. ERRgamma directs and maintains the transition to oxidative metabolism in the postnatal heart. *Cell Metab.* 2007;6(1):13-24.
51. Puigserver P, Adelmant G, Wu Z, Fan M, Xu J, O'Malley B, et al. Activation of PPARgamma coactivator-1 through transcription factor docking. *Science.* 1999;286(5443):1368-71.
52. Liang H, Ward WF. PGC-1alpha: a key regulator of energy metabolism. *Adv Physiol Educ.* 2006;30(4):145-51.
53. Mootha VK, Bunkenborg J, Olsen JV, Hjerrild M, Wisniewski JR, Stahl E, et al. Integrated analysis of protein composition, tissue diversity, and gene regulation in mouse mitochondria. *Cell.* 2003;115(5):629-40.
54. Liu C, Lin JD. PGC-1 coactivators in the control of energy metabolism. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).* 2011;43(4):248-57.
55. Jones AW, Yao Z, Vicencio JM, Karkucinska-Wieckowska A, Szabadkai G. PGC-1 family coactivators and cell fate: roles in cancer, neurodegeneration, cardiovascular disease and retrograde mitochondria-nucleus signalling. *Mitochondrion.* 2012;12(1):86-99.
56. Finck BN, Kelly DP. PGC-1 coactivators: inducible regulators of energy metabolism in health and disease. *J Clin Invest.* 2006;116(3):615-22.
57. Leone TC, Lehman JJ, Finck BN, Schaeffer PJ, Wende AR, Boudina S, et al. PGC-1alpha deficiency causes multi-system energy metabolic derangements: muscle dysfunction, abnormal weight control and hepatic steatosis. *PLoS Biol.* 2005;3(4):e101.
58. Arany Z, He H, Lin J, Hoyer K, Handschin C, Toka O, et al. Transcriptional coactivator PGC-1 alpha controls the energy state and contractile function of cardiac muscle. *Cell Metab.* 2005;1(4):259-71.
59. Huss JM, Kelly DP. Mitochondrial energy metabolism in heart failure: a question of balance. *J Clin Invest.* 2005;115(3):547-55.
60. Murphy E, Ardehali H, Balaban RS, DiLisa F, Dorn GW, 2nd, Kitsis RN, et al. Mitochondrial Function, Biology, and Role in Disease: A Scientific Statement From the American Heart Association. *Circ Res.* 2016.
61. Heineke J, Molkentin JD. Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006;7(8):589-600.
62. Handschin C, Rhee J, Lin J, Tarr PT, Spiegelman BM. An autoregulatory loop controls peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1alpha expression in muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(12):7111-6.

63. Sayen MR, Gustafsson AB, Sussman MA, Molkentin JD, Gottlieb RA. Calcineurin transgenic mice have mitochondrial dysfunction and elevated superoxide production. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2003;284(2):C562-70.
64. Sano M, Wang SC, Shirai M, Scaglia F, Xie M, Sakai S, et al. Activation of cardiac Cdk9 represses PGC-1 and confers a predisposition to heart failure. *EMBO J*. 2004;23(17):3559-69.
65. Sano M, Izumi Y, Helenius K, Asakura M, Rossi DJ, Xie M, et al. Menage-a-trois 1 is critical for the transcriptional function of PPARgamma coactivator 1. *Cell Metab*. 2007;5(2):129-42.
66. Lehman JJ, Kelly DP. Transcriptional activation of energy metabolic switches in the developing and hypertrophied heart. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2002;29(4):339-45.
67. van den Bosch BJ, van den Burg CM, Schoonderwoerd K, Lindsey PJ, Scholte HR, de Coo RF, et al. Regional absence of mitochondria causing energy depletion in the myocardium of muscle LIM protein knockout mice. *Cardiovasc Res*. 2005;65(2):411-8.
68. Sebastiani M, Giordano C, Nediani C, Travaglini C, Borchini E, Zani M, et al. Induction of mitochondrial biogenesis is a maladaptive mechanism in mitochondrial cardiomyopathies. *J Am Coll Cardiol*. 2007;50(14):1362-9.
69. Wall JA, Wei J, Ly M, Belmont P, Martindale JJ, Tran D, et al. Alterations in oxidative phosphorylation complex proteins in the hearts of transgenic mice that overexpress the p38 MAP kinase activator, MAP kinase kinase 6. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006;291(5):H2462-72.
70. Madrazo JA, Kelly DP. The PPAR trio: regulators of myocardial energy metabolism in health and disease. *J Mol Cell Cardiol*. 2008;44(6):968-75.
71. Olson EN. Gene regulatory networks in the evolution and development of the heart. *Science*. 2006;313(5795):1922-7.
72. Mummery CL, Zhang J, Ng ES, Elliott DA, Elefanty AG, Kamp TJ. Differentiation of human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells to cardiomyocytes: a methods overview. *Circ Res*. 2012;111(3):344-58.
73. Graichen R, Xu X, Braam SR, Balakrishnan T, Norfiza S, Sieh S, et al. Enhanced cardiomyogenesis of human embryonic stem cells by a small molecular inhibitor of p38 MAPK. *Differentiation*. 2008;76(4):357-70.
74. Lian X, Hsiao C, Wilson G, Zhu K, Hazeltine LB, Azarin SM, et al. Robust cardiomyocyte differentiation from human pluripotent stem cells via temporal modulation of canonical Wnt signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(27):E1848-57.

75. Mehta A, Ramachandra CJ, Sequiera GL, Sudibyo Y, Nandihalli M, Yong PJ, et al. Phasic modulation of Wnt signaling enhances cardiac differentiation in human pluripotent stem cells by recapitulating developmental ontogeny. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1843(11):2394-402.
76. Gessert S, Kuhl M. The multiple phases and faces of wnt signaling during cardiac differentiation and development. *Circ Res*. 2010;107(2):186-99.
77. MacDonald BT, Tamai K, He X. Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Dev Cell*. 2009;17(1):9-26.
78. Tan KY, Eminli S, Hettmer S, Hochedlinger K, Wagers AJ. Efficient generation of iPS cells from skeletal muscle stem cells. *PLoS One*. 2011;6(10):e26406.
79. Tahamtani Y, Azarnia M, Farrokhi A, Sharifi-Zarchi A, Aghdami N, Baharvand H. Treatment of human embryonic stem cells with different combinations of priming and inducing factors toward definitive endoderm. *Stem Cells Dev*. 2013;22(9):1419-32.
80. Komiya Y, Habas R. Wnt signal transduction pathways. *Organogenesis*. 2008;4(2):68-75.
81. BurrIDGE PW, Keller G, Gold JD, Wu JC. Production of de novo cardiomyocytes: human pluripotent stem cell differentiation and direct reprogramming. *Cell Stem Cell*. 2012;10(1):16-28.
82. Paige SL, Plonowska K, Xu A, Wu SM. Molecular regulation of cardiomyocyte differentiation. *Circ Res*. 2015;116(2):341-53.
83. Sommer CA, Stadtfeld M, Murphy GJ, Hochedlinger K, Kotton DN, Mostoslavsky G. Induced pluripotent stem cell generation using a single lentiviral stem cell cassette. *Stem Cells*. 2009;27(3):543-9.
84. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*. 2001;29(9):e45.
85. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001;25(4):402-8.
86. Samavarchi-Tehrani P, Golipour A, David L, Sung HK, Beyer TA, Datti A, et al. Functional genomics reveals a BMP-driven mesenchymal-to-epithelial transition in the initiation of somatic cell reprogramming. *Cell Stem Cell*. 2010;7(1):64-77.
87. Naldini L, Blomer U, Gallay P, Ory D, Mulligan R, Gage FH, et al. In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science*. 1996;272(5259):263-7.
88. Laflamme MA, Chen KY, Naumova AV, Muskheli V, Fugate JA, Dupras SK, et al. Cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells in pro-survival

factors enhance function of infarcted rat hearts. *Nat Biotechnol.* 2007;25(9):1015-24.

89. Zhang J, Klos M, Wilson GF, Herman AM, Lian X, Raval KK, et al. Extracellular matrix promotes highly efficient cardiac differentiation of human pluripotent stem cells: the matrix sandwich method. *Circ Res.* 2012;111(9):1125-36.

90. Tan JY, Sriram G, Rufaihah AJ, Neoh KG, Cao T. Efficient derivation of lateral plate and paraxial mesoderm subtypes from human embryonic stem cells through GSKi-mediated differentiation. *Stem Cells Dev.* 2013;22(13):1893-906.

91. Rog-Zielinska EA, Craig MA, Manning JR, Richardson RV, Gowans GJ, Dunbar DR, et al. Glucocorticoids promote structural and functional maturation of foetal cardiomyocytes: a role for PGC-1alpha. *Cell Death Differ.* 2015;22(7):1106-16.

92. Birket MJ, Casini S, Kosmidis G, Elliott DA, Gerencser AA, Baartscheer A, et al. PGC-1alpha and reactive oxygen species regulate human embryonic stem cell-derived cardiomyocyte function. *Stem Cell Reports.* 2013;1(6):560-74.

93. Bai Q, Ramirez JM, Becker F, Pantesco V, Lavabre-Bertrand T, Hovatta O, et al. Temporal analysis of genome alterations induced by single-cell passaging in human embryonic stem cells. *Stem Cells Dev.* 2015;24(5):653-62.

94. Gore A, Li Z, Fung HL, Young JE, Agarwal S, Antosiewicz-Bourget J, et al. Somatic coding mutations in human induced pluripotent stem cells. *Nature.* 2011;471(7336):63-7.

95. Laurent LC, Ulitsky I, Slavin I, Tran H, Schork A, Morey R, et al. Dynamic changes in the copy number of pluripotency and cell proliferation genes in human ESCs and iPSCs during reprogramming and time in culture. *Cell Stem Cell.* 2011;8(1):106-18.

96. Kyttala A, Moraghebi R, Valensisi C, Kettunen J, Andrus C, Pasumarthi KK, et al. Genetic Variability Overrides the Impact of Parental Cell Type and Determines iPSC Differentiation Potential. *Stem Cell Reports.* 2016;6(2):200-12.

97. Hatano SY, Tada M, Kimura H, Yamaguchi S, Kono T, Nakano T, et al. Pluripotential competence of cells associated with Nanog activity. *Mech Dev.* 2005;122(1):67-79.

Jacob Marks, Yale Scientific, 2014, Face Lifts for Skin Cells: Fast Cell Cycles Lead to Efficient Reprogramming periódico online. Disponível em <http://www.yalescientific.org/2014/07/face-lifts-for-skin-cells-fast-cell-cycles-lead-to-efficient-reprogramming/>

8 ANEXOS

8.1 Anexo I

	Clones	SSEA4	TRA-1-60	NANOG	NKX2.5	TNNT
Dia 0	SCR	98,6	95	88,9	0,4	2,3
	C2	98,1	91	96,3	0,1	1,7
	C3	97,4	84,3	96,1	3,7	4,3
Dia 1	SCR	98,6	94,8	97,1	1,2	1,6
	C2	99,6	98,1	96,2	5,2	0,9
	C3	99,3	87,5	98,1	0,3	9
Dia 2	SCR	99,3	92,4	92,3	3,7	8
	C2	99,1	96	97,1	5	0,7
	C3	99	97,5	95,7	12,6	9,2
Dia 3	SCR	99	87,9	92,5	2,9	8
	C2	99,6	91,9	86,6	5	3
	C3	99,8	92,6	90,4	22,5	14,8
Dia 4	SCR	91,5	70,6	85	3,2	7,1
	C2	99,7	92,9	40	2,5	8,2
	C3	99,1	66,9	75,5	9,7	17,5
Dia 5	SCR	91,5	57	85,9	24,6	9,6
	C2	99,9	89	66,2	1,8	10,5
	C3	99,5	85,4	88	7	4,6
Dia 6	SCR	92,4	71,4	53,1	10,6	6,1
	C2	93	92,3	52,6	0,3	30,4
	C3	97,2	67,6	68,3	48,9	32,7
Dia 7	SCR	98,8	36,3	63,1	68,5	54,6
	C2	96,3	56,2	50,5	74,2	15,6
	C3	95,7	35,2	87,6	14,8	17,8
Dia 8	SCR	86,8	18,7	36,2	69,1	58,8
	C2	94,2	38	50,5	72	52,4
	C3	72,3	5,8	81	43,6	40,6
Dia 9	SCR	98,7	3	52,1	91,4	59,8
	C2	96,1	21,8	43,5	75,1	21,8
	C3	80,9	14,7	63,3	35,3	26,2
Dia 10	SCR	70,1	0,9	49,3	88,4	53
	C2	72,6	11,2	43,5	75,1	43,7
	C3	66,8	9,1	46,4	22,2	26
Dia11	SCR	86,2	8,5	43,2	92,9	67,7
	C2	42,1	3,7	41,3	39,5	37,2
	C3	66,2	16,2	84,2	39,1	37,5
Dia 12	SCR	67,5	5,2	85,7	93,4	75,1
	C2	42,1	3,7	41,3	39,5	37,2
	C3	52,9	12,7	79,6	32,4	36,2
Dia 13	SCR	57,7	3,6	81,5	80,4	63,5
	C2	67,3	0,9	39,3	13,4	24,3
	C3	54,2	0,1	91	23,3	27,4
Dia 14	SCR	57,5	2,3	81,7	86,7	53,7
	C2	72,7	3,1	44,3	15,2	14,5
	C3	60,5	1,4	78,9	36,7	36,4
Dia 15	SCR	48,3	3	60,9	90,7	74,5
	C2	45,9	16,8	78,1	4,1	37,1
	C3	62,2	2,6	37,4	29,5	24,4

8.2 Anexo II