UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Geração de células de pluripotência induzida (iPS) humanas utilizando
vetores lentivirais e determinação do perfil de integração lentiviral**

Luiza Cunha Junqueira Reis

RIBEIRÃO PRETO – SP

2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Geração de células de pluripotência induzida (iPS) humanas utilizando
vetores lentivirais e determinação do perfil de integração lentiviral**

**Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Biociências Aplicadas à Farmácia para
obtenção do Título de Mestre em Ciências**

**Área de Concentração: Biociências
Aplicadas à Farmácia.**

**Orientado(a): Luiza Cunha Junqueira Reis
Orientador(a): Prof^a. Dr^a. Elisa Maria de
Sousa Russo-Carbolante**

Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia em 28/11/2012. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

RIBEIRÃO PRETO – SP

2012

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTES TRABALHOS, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Junqueira-Reis, Luiza Cunha

Geração de células de pluripotência induzida (iPS) humanas utilizando vetores lentivirais e determinação do perfil de integração lentiviral. Ribeirão Preto, 2012.

136 p. : il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientador(a): Russo-Carbolante, Elisa Maria de Sousa.

1. Células-tronco de pluripotência induzida. 2. Vetores lentivirais. 3. Integração lentiviral. 4. LM-PCR.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Luiza Cunha Junqueira Reis

Geração de células de pluripotência induzida (iPS) humanas utilizando vetores lentivirais e determinação do perfil de integração lentiviral

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-graduação em Biociências
Aplicadas à Farmácia para obtenção do título de
Mestre em Ciências

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à
Farmácia.

Orientador(a): Profa. Dra. Elisa Maria de Sousa
Russo-Carbolante

Aprovado em: ____/____/____

Banca examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Aos meus pais, Tina e Ricardo, pelo amor
incondicional, carinho, sabedoria, compreensão
e todo o apoio imprescindível.

Dedico

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, que sempre estiveram presentes e são fundamentais em minha vida, que me ofereceram sempre o melhor que puderam me dar, dando-me suporte mesmo quando me veio o desânimo e que, nos momentos importantes, suportaram minha ausência e nos dias de fracasso, respeitaram meus sentimentos e enxugaram minhas lágrimas.

À minha grande família, que muitas vezes não entendiam e cobravam minha ausência, mas que estavam sempre de braços abertos, me davam carinho e energia pra seguir em frente e sempre apostando no meu sucesso.

À minha orientadora, Prof^ª. Dr^ª. Elisa Maria de Sousa Russo Carbolante, pela oportunidade, pela confiança depositada em mim, pelo auxílio e orientação em todos os momentos da realização do projeto e acima de tudo pela amizade e ensinamentos.

As minhas amigas do Laboratório de Biotecnologia, Aline, Ana Paula, Lílian, Marcela, Florência, Maryna e Camila, feitas irmãs com o passar dos anos e com a convivência diária, partilhando cada descoberta, dividindo medos, incertezas e inseguranças, mas somando entusiasmos, forças e alegrias, que tornaram os meus dias sempre melhores.

Aos meus amigos Juliana, Bruna, Gustavo e Noelle, pela profunda amizade de tantos anos, que nem sempre compreendiam a minha distância em alguns momentos e a dedicação extrema a esse trabalho, mas que sempre estiveram ao meu lado e torceram pelo meu sucesso, e sem perceber me davam a força necessária para seguir em frente.

À Fabiana Fernandes Bressan, pela paciência infinita, dedicação e ajuda preciosa.

À Tathiane e Maurício por estarem sempre dispostos a ensinar e auxiliar nos experimentos. Admiro a dedicação e o prazer em ensinar de ambos.

À paciência e amizade valiosa de Virgínia, Lucas, Everton e Marcela, pela ajuda intelectual e técnica, me ajudando em tudo que eu precisasse, há qualquer momento, e sempre com a maior boa vontade.

Aos colegas dos demais laboratórios e funcionários do Hemocentro, pela convivência diária e ajuda na realização do projeto. Em especial aos laboratórios de Terapia Celular, Sequenciamento e Biologia Molecular que tiveram participação direta na realização desse projeto.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto pelo conhecimento científico adquirido ao longo do curso de pós-graduação.

À FAPESP (2009/13558-4) e CNPq pelo auxílio financeiro e incentivo à pesquisa.

À Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, em especial ao Laboratório de Morfofisiologia Molecular e Desenvolvimento (LMMD) e ao Prof. Dr. Flávio Vieira Meirelles, pela colaboração imprescindível para a realização deste trabalho.

Aos integrantes da banca examinadora, por disponibilizarem parte de seu tempo para a análise desse trabalho.

A todas as pessoas que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização desse trabalho, que acreditaram em meu sucesso e caminharam ao meu lado, meus mais sinceros agradecimentos.

A alegria do triunfo jamais
seria experimentada se não
houvesse a luta que determina
a oportunidade de vencer.
(Carlos Bernardo Gonzáles)

RESUMO

JUNQUEIRA-REIS, L. C. **Geração de células de pluripotência induzida (iPS) humanas utilizando vetores lentivirais e determinação do perfil de integração lentiviral.** 2012. 136f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

As células *iPS* surgiram com a promessa de contornar as limitações das células-tronco embrionárias, como questões éticas, segurança, compatibilidade e disponibilidade. Essas células podem ser obtidas a partir de células somáticas de indivíduos normais ou de pacientes com doenças genéticas, fazendo destas uma importante ferramenta para o screening de drogas, modelos de doenças e testes toxicológicos. Grandes avanços ocorreram na reprogramação de células diferenciadas pela expressão forçada de fatores de transcrição (FT), principalmente, através de vetores lentivirais (VL), que proporcionam uma reprogramação eficiente. Entretanto, a inserção lentiviral no genoma humano e sua influência na reprogramação é pouco conhecida. Neste trabalho, avaliamos o perfil de inserção dos VL utilizados na geração de iPS. As iPS foram geradas e caracterizadas por nosso grupo a partir de fibroblastos humanos transduzidos com VL contendo 3 FT [SOX2, TCL-1A e C-MYC (célula TSM)], e de células mesenquimais derivadas de tecido adiposo com um vetor lentiviral policistrônico contendo 4 FT [OCT4, SOX2, KLF4 e C-MYC (*iPS* 4FT)]. Cinco colônias isoladas de cada *iPS* foram mapeadas e analisadas quanto aos sítios de inserção pela técnica de *LM-PCR*. O DNA genômico digerido foi amplificado com um *primer* específico para o *LTR* viral e outro para um *linker* sintético. Os produtos foram clonados, sequenciados, e analisados em bancos de dados para identificar similaridades com o genoma humano, entre outras análises. Na célula TSM, 176 sequências, obtidas com a técnica de LM-PCR, apresentaram identidade com o genoma humano, sendo que cerca de 50% ocorreram em regiões gênicas com 94% destas em introns. Já nas *iPS* 4FT, 251 sequências apresentaram identidade, com cerca de 45% atingindo genes, 92% destas em introns. As inserções distribuíram-se por todos os cromossomos, com preferência pelos cromossomos 16, 17 e 20 para a TSM e pelos cromossomos 11, 15 e 17 para a *iPS* 4FT. Analisamos a distância da inserção ao sítio de início de transcrição (*TSS*), e inserções próximas a ilhas CpG, que em geral correspondem a regiões regulatórias. A maior proporção de inserção ocorreu a partir de $\pm 30\text{Kb}$ de distância desses sítios. Os sítios frágeis e as regiões repetitivas do genoma foram atingidas, mas com uma frequência baixa. Os resultados mostraram uma preferência de inserção lentiviral por regiões gênicas nas *iPS*, indicando a possível participação de proteínas como LEDGF/p75 na integração nas células estudadas. Este trabalho mostrou que o local da integração pode contribuir para a reprogramação e, apesar de possíveis efeitos negativos das integrações, estas as células iPS ainda são uma ferramenta importante para estudos *in vitro*. E identificar fatores que influenciem a seleção do sítio de inserção é importante para determinar regiões cromossômicas “seguras” para a integração, aumentando a segurança no uso clínico.

Palavras-chave: Células-tronco de pluripotência induzida, vetores lentivirais, integração lentiviral, LM-PCR.

ABSTRACT

Junqueira-Reis, L. C. **Generation of human induced pluripotent stem (iPS) cell using lentiviral vector and determination of the lentiviral integration profile.** 2012. 136f. Dissertation (Master degree). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

The induced pluripotent stem (iPS) cells came with the promise of circumvent some of the limitations in the use of embryonic stem cells, like ethical issues, biological safety, immune compatibility and availability. These cells can be generated from somatic cells of normal individuals or from patients with some genetic disease, making them an important tool for drug screening, construction of disease models and toxicological trials. Great advances have happened in reprogramming differentiated cells through the forced exogenous expression of transcription factors (TF), mostly by lentiviral vectors (LV), which provide an efficient reprogramming. However, the lentiviral insertion in the human genome and its influence in reprogramming is not well known. In this work, we evaluate the insertion profile of LV used to generate human iPS cells. The iPS cells were generated, by our group, from human fibroblasts transduced by LV containing 3 TF [SOX2, TCL-1A and C-MYC (TSM reprogrammed cell)], and from mesenchymal cells derived from human adipose tissue transduced by a polycistronic LV containing 4 TF [OCT4, SOX2, KLF4 and C-MYC (iPS 4TF)]. Five isolated colonies of each iPS cell were mapped and analyzed for the insertion sites through LM-PCR technique. The digested genomic DNA was amplified with a primer for the viral LTR and another for a synthetic linker. The products were cloned, sequenced and analyzed in database to identify similarities with the human genome, among other analyzes. In TSM cell, 176 sequences, derived from the LM-PCR technique, presented identity with the human genome, and about 50% of those occurred in genic regions with 94% in introns. In iPS 4TF, 251 sequences showed identity, with about 45% reaching genes, 92% of these in introns. The insertions were distributed on all chromosomes, with preference for the 16, 17 and 20 for the TSM cell, and for the 11, 15 and 17 for the iPS 4TF. We analyzed the distance of the insertion from the transcription start site, and insertions near CpG islands, which, overall, correspond to regulatory regions. The highest proportion of insertion occurred starting $\pm 30\text{Kb}$ distance from these sites. The fragile sites and the repetitive regions of the genome were also reached, but with low frequency. The results showed a preference of lentiviral insertion for genic regions in iPS, indicating the potential participation of proteins like LEDGF/p75 in integration in the cells of this work. This work shows that the integration site may contribute to the reprogramming, and, despite possible negative effects of integration, these iPS cells are still an important tool for *in vitro* studies. Identify factors that influence the selection of insertion site is important for determination of “safe” chromosomal regions for the integration, increasing the safety in clinical use.

Keywords: iPS cells, lentiviral vectors, lentiviral integration, LM-PCR.

RESUMEN

Junqueira-Reis, L. C. Generación de células tronco de pluripotencia inducida (iPS) humanas utilizando vectores lentivirales y determinación de lo perfil de integración lentiviral. 2012. 136f. Disertación (Maestría). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

Las células *iPS* surgieron con la promesa de superar las limitaciones de las células tronco embrionarias, como cuestiones éticas, seguridad, compatibilidad y disponibilidad. Estas células pueden ser obtenidas a partir de células somáticas de individuos normales o de pacientes con enfermedades genéticas, haciendo de éstas una importante herramienta para el *screening* de drogas, modelos de enfermedades y ensayos toxicológicos. Grandes avances ocurrieron en la reprogramación de células diferenciadas por la expresión forzada de factores de transcripción (FT), principalmente, a través de vectores lentivirales (VL), que proporcionan una reprogramación eficiente. A pesar de esto, la inserción lentiviral en el genoma humano y su influencia en la reprogramación es poco conocida. En este trabajo, evaluamos el perfil de inserción de los VL utilizados en la generación de iPS. Las iPS fueron generadas y caracterizadas por nuestro grupo a partir de fibroblastos humanos transducidos con VL conteniendo 3 FT [SOX2, TCL-1A y C-MYC (célula TSM)], y de células mesenquimales derivadas de tejido adiposo con un vector lentiviral policistrónico conteniendo 4 FT [OCT4, SOX2, KLF4 y C-MYC (*iPS* 4FT)]. Cinco colonias aisladas de cada *iPS* fueron mapeadas y analizadas en cuanto a los sitios de inserción por la técnica de *LM-PCR*. El DNA genómico digerido fue amplificado con un *primer* específico para el *LTR* viral y otro para un *linker* sintético. Los productos fueron clonados, secuenciados, y analizados en bancos de datos para identificar similitudes con el genoma humano, entre otros análisis. En el caso de célula TSM, 176 secuencias, obtenidas con la técnica de *LM-PCR*, presentaron identidad con el genoma humano, siendo que cerca del 50% de las integraciones ocurrieron en regiones génicas con 94% de éstas en intrones. En el caso de *iPS* 4FT, 251 secuencias presentaron identidad, con cerca de 45% alcanzando genes y 92% de éstas en intrones. Las inserciones se distribuyeron por todos los cromosomas, con preferencia por el 16, 17 y 20 para TSM y por el 11, 15 y 17 para la *iPS* 4FT. Analizamos la distancia de la inserción al sitio de inicio de transcripción (*TSS*), e inserciones próximas a islas CpG, que en general corresponden a regiones regulatorias. La mayor proporción de inserción ocurrió a partir de $\pm 30\text{Kb}$ de distancia de esos sitios. Los sitios frágiles y las regiones repetitivas del genoma fueron alcanzadas, pero con una frecuencia baja. Los resultados muestran una preferencia de inserción lentiviral por regiones génicas en las *iPS*, indicando la posible participación de proteínas como LEDGF/p75 en la integración en las células estudiadas. Este trabajo mostró que el sitio de integración pueden contribuir a la reprogramación y, a pesar de los posibles efectos negativos de la integración, estas células iPS son todavía una importante herramienta para los estudios *in vitro*. Identificar factores que influyen la selección del sitio de inserción es importante para determinar regiones cromosómicas “seguras” para la integración, aumentando la seguridad en el uso clínico.

Palabras clave: Células tronco de pluripotencia inducida, vectores lentivirales, integración lentiviral, LM-PCR.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação de 2 técnicas de reprogramação nuclear.....	4
Figura 2: Esquema de alguns dos métodos utilizados na reprogramação de diferentes tipos celulares utilizando FT definidos, como por exemplo, sistemas virais (retrovírus, lentivírus, adenovírus) ou sistemas não virais (plasmídeos, proteínas, RNAm).....	7
Figura 3: Esquema estrutural de um vírus da família Retroviridae.....	10
Figura 4: Esquema do genoma do <i>HIV-1</i> . Flanqueado pelas regiões <i>LTR</i> , que controlam a expressão dos genes virais, estão os três genes que codificam proteínas estruturais e enzimas (<i>gag</i> , <i>pol</i> e <i>env</i>), além de genes que codificam proteínas regulatórias (<i>tat</i> e <i>rev</i>) e proteínas acessórias (<i>vif</i> , <i>vpu</i> , <i>vpr</i> e <i>nef</i>).....	11
Figura 5: Esquema do mecanismo de integração do DNA do <i>HIV-1</i> . (a) Um tetramero de integrase (esferas cinza) liga-se às duas extremidades do DNA do <i>HIV-1</i> (linhas azuis) dentro de um complexo nucleoproteico (formado pelas enzimas virais e DNA viral). Durante o processamento 3', água é usada pela integrase para criar sítios (setas verticais) para ligar dinucleotídeos de ambas as extremidades do <i>HIV-1</i> . Os triângulos abertos simbolizam as sequências de DNA U3 no <i>LTR upstream</i> reconhecido pela integrase, e os triângulos fechados simbolizam sequências U5 <i>downstream</i> reconhecidas pela integrase. (b) Após entrar no núcleo e localizar um sítio alvo adequado dentro da cromatina (linhas laranja), a integrase utiliza os grupos 3'-hidroxila do DNA viral clivado para cortar o DNA alvo (setas verticais), que concomitantemente liga a extremidade 3' viral ao 5'-fosfato do corte. (c) O intermediário da recombinação formado pela atividade de transferência de fita da integrase, incluindo a extremidade 3' viral ligada e a extremidade 5' livre. (d) O reparo da lacuna do intermediário de recombinação termina com o provírus integrado flanqueado por uma duplicação de 5 pb do DNA alvo (linhas verdes entre colchetes). A sequência dessa duplicação é definida pela sequência da dupla-fita cortada em (b).....	13
Figura 6: Sistema de terceira geração do vetor derivado de <i>HIV-1</i> independente de <i>tat</i> . Os vetores <i>SIN</i> possuem as sequências <i>cPPT/CTS</i> que auxiliam na importação nuclear e a sequência <i>WPRE</i> que aumentam a estabilidade do RNA, além de um um promotor interno para promover a expressão do transgene. O(s) cassete(s) do capsídeo contém apenas os genes <i>gag</i> , <i>pol</i> e <i>rev</i> , sendo que este último pode ser transcrito por um cassete separado.....	16
Figura 7: Esquema dos vetores utilizados na produção viral através de co-transfecção tripla. (A) Vetor de 3ª geração derivado do <i>HIV-1</i> , bicistrônico, que codifica para <i>EGFP</i> (pLenti-cPPT-C(FT)IGWS); (B) Vetor que codifica para o capsídeo viral (pCMVΔR8.91); (C) Vetor para o envelope viral (pMD2.VSVG), que codifica para a glicoproteína do vírus da estomatite vesicular.....	29
Figura 8: Esquema do vetor lentiviral comercial polistrônico <i>cre-excisable</i> EF1α-	

hSTEMCCA-LoxP (OKSM) (adaptado de Millipore™).....	32
--	----

Figura 9: Esquema da LM-PCR. Técnica que permite determinar o sítio de integração através da localização do local de inserção pelo sequenciamento do produto de PCR obtido após a ligação de uma sequência adaptadora (<i>linker</i>) DNA genômico, previamente digerido com enzimas de restrição específicas que criam um sítio de ligação com o <i>linker</i> sintético e impede a amplificação de um fragmento interno viral 5' <i>LTR</i>	38
---	----

Figura 10: Representação da análise das regiões ao redor do sítio de integração. Os Retrovírus integram de maneira estável seus genomas (5' <i>LTR</i> , Transgene, 3' <i>LTR</i>) no genoma da célula hospedeira. Como indicado na figura, o DNA do hospedeiro é fita dupla (fitas <i>plus</i> + e <i>minus</i> -) e cada fita pode conter vários elementos genômicos tais como genes, TSS, ilhas CpG, <i>LINE</i> , <i>SINE</i> , elementos de <i>LTR</i> ou elementos simples. Os vetores podem romper esta estrutura genômica (como no caso da inserção no GENE A), ou inserir-se adjacientemente a esta estrutura (GENE B). Para determinar se uma sequência genômica específica é um alvo potencial de um vetor, as distâncias (D) de cada uma das características até o sítio de integração são calculadas. Para cada integração, uma variedade de informações são geradas e acumuladas (APPELT <i>et al.</i> , 2009).....	44
--	----

Figura 11: (A) Imagem ilustrando a morfologia dos fibroblastos CCD27SK; (B) Imagem ilustrando a morfologia das CTE humanas; (C) e (D) Imagens ilustrando as colônias da célula reprogramada TSM, mostrando a morfologia semelhante a hCTE, com característica epitelial, de crescimento em colônias de células pequenas e justapostas. Microscopia ótica.....	49
---	----

Figura 12: (A) Imagem mostrando a morfologia da célula mesenquimal humana derivada de tecido adiposo; (B) Imagem mostrando a morfologia das CTE humanas; (C) e (D) Imagens das células <i>iPS</i> 4FT cultivadas sobre <i>MEF</i> , mostrando a morfologia semelhante a CTE, com característica epitelial, de crescimento em colônias de células pequenas e justapostas. Microscopia ótica.....	51
---	----

Figura 13: Gráficos representando a expressão de OCT4 (A), SOX2 (B) e NANOG (C), obtida por PCR quantitativo, em linhagens de <i>iPS</i> 4FT quando comparadas com a célula hAdMSC não modificada, em unidades arbitrárias.....	52
---	----

Figura 14: Colônias de <i>iPS</i> 4FT marcadas com fosfatase alcalina, indicando tratar-se de células indiferenciadas com potencial de autorrenovação.....	53
--	----

Figura 15: Formação de EB definidos após 3 dias de cultivo. Microscopia ótica, 10X.....	54
---	----

Figura 16: Imagens ilustrando a diferenciação <i>in vitro</i> das células <i>iPS</i> 4FT. Microscopia ótica.....	55
--	----

Figura 17: Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio mostrando o DNA genômico digerido com as enzimas <i>Mse</i> I e <i>Sac</i> I e precipitado	
--	--

com acetato de amônio. (M) Marcador 100 pb (Axygen); (1) DNA extraído e digerido uma colônia isolada de TSM; (2) DNA extraído e digerido de uma colônia isolada de *iPS* 4FT. É possível observar um rastro referente a um conjunto de bandas sobrepostas, devido a característica da enzima *MseI* que corta o DNA em vários fragmentos pequenos..... 56

Figura 18: Eletroforese em gel de agarose 1% do produto da reação de *Nested* PCR do DNA digerido de 2 colônias da célula reprogramada TSM e de 2 colônias isoladas de *iPS* 4FT com os *primers* para o *LTR* viral e para a sequência adaptadora (*linker*), utilizados para a amplificação da região de inserção do lentivírus no genoma humano. (M) Marcador 100 pb; (1) e (2) Produto de PCR do DNA das colônias de TSM; (3) e (4) Produto PCR do DNA das colônias de *iPS* 4FT; (5) Controle negativo da reação..... 57

Figura 19: Géis de eletroforese representativos da confirmação da presença do inserto no vetor de sequenciamento. Como mostrado na figura, os fragmentos são de diferentes tamanhos, devido a geração de fragmentos de DNA de diferentes tamanhos pela digestão. (A) Eletroforese em gel de agarose 1% da PCR de uma colônia isolada de célula reprogramada TSM; (M) Marcador 100 pb; (B) Eletroforese em gel de agarose 1% da PCR de uma colônia isolada de *iPS* 4 FT; (M') Marcador ϕ X174..... 59

Figura 20: Gráfico das integrações cromossômicas observadas do vetor pLenti-cPPT-CIGWS na célula TSM (azul) e do vetor EF1 α -hSTEMCCA-LoxP na *iPS* 4FT (vermelho), e os respectivos genes afetados.. A seta indica o cromossomo mais afetado em ambas as células..... 61

Figura 21: Porcentagem de integrações do vetor pLenti-cPPT-CIGWS ocorridas em cada cromossomo de cada colônia isolada da célula TSM..... 62

Figura 22: Porcentagem de integrações do vetor EF1 α -hSTEMCCA-LoxP ocorridas em cada cromossomo de cada colônia isolada da célula *iPS* 4FT..... 63

Figura 23: Distribuição esquemática das integrações dos vetores lentivirais, mostrando a média do *RISC* (estimativa de inserção retroviral nos cromossomos) dado por $(oi - ei)^2/ei \geq 3$. No caso de integração randômica, um *RISC* de 0 seria esperado (cut-off ≥ 3)..... 64

Figura 24: Distribuição esquemática das integrações do vetor lentiviral pLenti-cPPT-C(FT)IGWS, mostrando a média do *RISC* (estimativa de inserção retroviral nos cromossomos) dado por $(oi - ei)^2/ei \geq 3$. No caso de integração randômica, um *RISC* de 0 seria esperado (cut-off ≥ 3)..... 65

Figura 25: Distribuição esquemática das integrações do vetor lentiviral EF1 α -hSTEMCCA-LoxP, mostrando a média do *RISC* (estimativa de inserção retroviral nos cromossomos) dado por $(oi - ei)^2/ei \geq 3$. No caso de integração randômica, um *RISC* de 0 seria esperado (cut-off ≥ 3)..... 65

Figura 26: Frequência de sítios de integração próximos a sítios de início de

transcrição (TSS). A porcentagem de integração entre cada intervalo de Kb é mostrada para o vetor pLenti-cPPT-C(FT)IGWS na célula reprogramada TSM e para o vetor EF1 α -hSTEMCCA-LoxP na célula *iPS* 4FT..... 66

Figura 27: Frequência de inserções próximas a ilhas CpG. As porcentagens de integração entre cada intervalo de Kb são mostradas para o vetor pLenti-cPPT-C(FT)IGWS na célula reprogramada TSM e para o vetor EF1 α -hSTEMCCA-LoxP na célula *iPS* 4FT..... 68

Figura 28: Integrações cromossômicas observadas do vetor pLenti-cPPT-CIGWS na célula TSM (marcações em azul) e do vetor EF1 α -hSTEMCCA-LoxP na *iPS* 4FT (marcações em vermelho), e os respectivos genes afetados.....

Figura 29: Esquema da via de regulação do citoesqueleto de actina, evidenciando, com as marcações em vermelho, os genes atingidos pelos vetores lentivirais; ACTN2 (*actinin, alpha 2*), FGF13 (*fibroblast growth factor 13*), ITGA9 (*integrin, alpha 9*) e PIK3R1 (*phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 1*) (atingidos pelo vetor pLenti-cPPT-C(FT)IGWS; CYFIP2 (*cytoplasmic FMR1 interacting protein 2*), DIAPH2 (*diaphanous homolog 2*) e MSN (*moesin*) (atingidos pelo EF1 α -hSTEMCCA-LoxP)..... 75

Figura 30: Frequência de integração dos vetores lentivirais pLenti-cPPT-C(FT)IGWS e EF1 α -hSTEMCCA-LoxP em regiões repetitivas do genoma nas células reprogramadas TSM e *iPS* 4FT respectivamente..... 77

Figura 31: Frequência de integração dos vetores lentivirais pLenti-cPPT-C(FT)IGWS e EF1 α -hSTEMCCA-LoxP em sítios frágeis do genoma da célula reprogramada TSM e da *iPS* 4 FT, respectivamente..... 80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados.....	35
Tabela 2: Relação dos meios utilizados e pH para cada tipo celular.....	36
Tabela 3: Detalhes das reações de ligação nos vetores de clonagem para sequenciamento.....	41
Tabela 4: Caracterização imunofenotípica dos fibroblastos embrionários murino.....	48
Tabela 5: Dados sobre o número de sequências analisadas.....	59
Tabela 6: Frequência de integrações em regiões gênicas.....	69
Tabela 7: Frequência de integrações em regiões gênicas das colônias isoladas de célula TSM.....	69
Tabela 8: Frequência de integrações em regiões gênicas das colônias isoladas de célula <i>iPS</i> 4FT.....	70
Tabela 9: Genes atingidos pelo vetor lentiviral pLenti-cPPT-C(FT)IGWS na célula reprogramada TSM.....	70
Tabela 10: Genes atingidos pelo vetor lentiviral EF1 α -STEMCCA-LoxP na célula <i>iPS</i> 4FT.....	71
Tabela 11: Integrações que atingiram o mesmo gene em ambas as células.....	73
Tabela 12: Frequência de integração em regiões repetitivas do genoma nas células TSM e <i>iPS</i> 4FT.....	76
Tabela 13: Frequência de integração em regiões repetitivas do genoma nas colônias isoladas da célula TSM.....	77
Tabela 14: Frequência de integração em regiões repetitivas do genoma nas colônias isoladas da célula <i>iPS</i> 4FT.....	78
Tabela 15: Porcentagens de integrações dos vetores lentivirais em sítios frágeis das células TSM e <i>iPS</i> 4FT, e em cada colônia isolada separadamente.....	79
Tabela 16: Quantificação do número de cópias dos vetores lentivirais pLenti-cPPT-C(FT)IGWS e EF1 α -hSTEMCCA-LoxP inseridas no genoma das células hospedeiras para geração de <i>iPS</i>	81

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

α -MEM - *Minimum Essential Medium Alpha*

AME – Atrofia muscular espinhal

ASLV – *Avian sarcoma leukosis virus* (Vírus da leucose/sarcoma aviária)

CA – capsídeo

CMV – promotor do citomegalovírus humano

CO₂ – dióxido de carbono

cPPT/CTS – *central polypurine do HIV-1/ central termination sequence*

C-MYC – *v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog*

CTE – célula-tronco embrionária (plural ou singular)

DAPI – *4',6-diamidino-2-phenylindole* (4',6-diamidino-2-fenilindol)

DMEM – *Dulbecco's modified eagle's medium*

DMSO – dimetilsulfóxido

dNTP – desoxirribonucleotídeos trifosfatados

ddNTP – dideoxirribonucleotídeos trifosfatados

EB – embryoid bodies (corpos embrióides)

EDTA – *Ethylenediamine tetraacetic acid* (ácido etilenodiamino tetra-acético)

EF1 α – *Elongation factor 1 α* (Fator de alongamento 1 alfa)

EGFP – enhanced green fluorescent protein (proteína verde fluorescente melhorada)

ELA – Esclerose lateral aminotrófica

FITC – *fluorescein isothiocyanate* (isotiocianato de fluoresceína)

FIV – *Feline immunodeficiency virus* (Vírus da imunodeficiência felina)

FT – fator de transcrição (plural ou singular)

fs – fita simples

HEPES – *4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid* (ácido 2-[4-(2-hidroxietil)1-piperazinil]-etanosulfônico)

HIV – *Human immunodeficiency virus* (Vírus da imunodeficiência humana)

IN – integrase

iPS – célula-tronco de pluripotência induzida

IRES – *Internal ribosome entry site* (Sítio interno de ligação ao ribossomo)

KLF4 – *Krüppel-like factor 4*

LEDGF/p75 – *Lens epithelium-derived growth factor* (Fator de crescimento derivado do epitélio do cristalino/p75)

LM-PCR – *Ligation-mediated PCR*

LTR – *Long terminal repeat* (plural ou singular) (repetição terminal longa)

MA – matriz

MEF – *Mouse embryonic fibroblast* (plural ou singular) (fibroblasto embrionário murino)

Mg²⁺ – íon magnésio

MLV – *Murine leukemia virus* (virus da leucemia murina)

MOI – *Multiplicity of infection* (multiplicidade de infecção)

NC – Nucleocapsídeo

Nef – *Negative regulatory factor* (Fator de regulação negativa)

OCT4 – *octamer-binding transcription factor 4*

ORF – *open reading frame* (quadros de leitura)

PBS – *Phosphate buffered saline* (Tampão fosfato salino)

PCR – *Polymerase chain reaction* (reação em cadeia da polimerase)

PIC – *pre-integration complex* (complexo de pré-integração)

PE – phycoeritrin

PR – protease

qPCR – PCR quantitativo

RNA_m – RNA mensageiro

RRE – *Rev-responsive element do HIV-1* (elemento de resposta a rev do HIV-1)

RT – *Reverse transcriptase* (Transcriptase reversa)

SBF – soro bovino fetal

sf – RNA fita simples

SIN – *self inactivated vector* (vetor autoinativante)

SIV – *simian immunodeficiency virus* (virus da imunodeficiência símia)

SOX2 – *SRY (sex determining region Y-box 2* (região determinante do sexo no cromossomo Y, box 2)

SSEA – *stage-specific embryonic antigen* (antígeno embrionário estágio-específico)

SU – superfície

TCL-1A – *T-cell leukemia/lymphoma protein 1A*

TM – Transmembrana

TRA – *tumor-related antigen*

TSS – *transcription start site* (sítio de início de transcrição)

vif – *viral infectivity factor* (fator de infectividade viral)

vpr – *viral protein R* (proteína viral R)

vpu – *viral protein U* (proteína viral U)

VSV-G – *vesicular stomatitis virus glycoprotein* (glicoproteína do vírus da estomatite vesicular)

WPRE – *woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element* (elemento regulatório pós-transcricional do vírus da hepatite da marmota)

LISTA SÍMBOLOS E UNIDADES

cm – centímetro

g – grama

kb – kilobase

L – litro

mg – miligrama

mL – mililitro

mmol – milimol

ng – nanograma

nm – nanômetro

pb – pares de base

pmol – picomol

pg - picograma

U – unidades

μL – microlitro

μm - micrômetro

μg - micrograma

°C – graus Celsius

% – porcentagem

α – alfa

β – beta

Ψ – sinal de empacotamento

® – Marca Registrada

™ – Trademark

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	2
1.1	CÉLULAS-TRONCO EMBRIONÁRIAS (CTE) HUMANAS	2
1.2	CÉLULAS-TRONCO DE PLURIPOTÊNCIA INDUZIDA (iPS).....	4
1.3	SISTEMAS DE EXPRESSÃO.....	6
1.4	LENTIVÍRUS E CICLO DE VIDA	9
1.5	VETORES LENTIVIRAIS.....	13
1.6	INTEGRAÇÃO.....	16
1.7	INTEGRAÇÃO X CÉLULAS IPS	18
2	JUSTIFICATIVA.....	20
3	OBJETIVOS	22
3.1	OBJETIVO GERAL	22
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	22
4	ANIMAL, MATERIAL E MÉTODOS	24
4.1	PRODUÇÃO DE FIBROBLASTOS EMBRIONÁRIOS MURINOS (MEF).....	24
4.2	CÉLULAS UTILIZADAS E CULTIVO	25
4.2.1	CÉLULA REPROGRAMADA TSM.....	25
4.2.2	CÉLULA IPS 4FT	28
4.2.2.1	Geração das células iPS 4FT	29
4.2.2.2	qPCR.....	32
4.2.2.3	Fosfatase alcalina.....	33
4.2.2.4	Formação de corpos embriões (EB).....	33
4.2.3	CONDIÇÕES GERAIS PARA CULTURA DE CÉLULAS	33
4.2.4	ISOLAMENTO DE CLONES PARA ANÁLISE DE INTEGRAÇÃO	35
4.3	ANÁLISE DO PERFIL DE INTEGRAÇÃO LENTIVIRAL POR LM-PCR	35
4.3.1	EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO	36
4.3.2	DIGESTÃO DO DNA GENÔMICO COM ENZIMAS DE RESTRIÇÃO.....	37
4.3.3	PRECIPITAÇÃO DO DNA COM ACETATO DE AMÔNIO	37
4.3.4	PREPARO DA SEQUÊNCIA OLIGO-ADAPTADORA (<i>LINKER</i>) E LIGAÇÃO AO DNA	38
4.3.5	PRIMEIRA REAÇÃO DE PCR E <i>NESTED</i> PCR.....	38
4.3.6	CLONAGEM NO VETOR DE SEQUENCIAMENTO	39
4.3.7	TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA E EXPANSÃO CLONAL	39
4.3.8	SEQUENCIAMENTO DO DNA.....	40
4.3.9	ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS QUANTO AO PERFIL DE INTEGRAÇÃO.....	41
4.3.10	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	43
4.4	NÚMERO DE CÓPIAS INSERIDAS.....	43

5	RESULTADOS	46
5.1	CARACTERIZAÇÃO DOS FIBROBLASTOS EMBRIONÁRIOS MURINOS	46
5.2	CARACTERIZAÇÃO DAS CÉLULAS UTILIZADAS	46
5.2.1	CARACTERÍSTICAS DAS CÉLULAS REPROGRAMADAS TSM	47
5.2.2	DERIVAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DA CÉLULA IPS 4FT	48
5.2.2.1	qPCR.....	49
5.2.2.2	Coloração com fosfatase alcalina.....	50
5.2.2.3	Formação de corpos embrióides (EB).....	51
5.3	LM-PCR	52
5.3.1	DIGESTÃO E PRECIPITAÇÃO DO DNA GENÔMICO	52
5.3.2	PRIMEIRA REAÇÃO DE PCR E <i>NESTED</i> PCR.....	53
5.3.3	SEQUENCIAMENTO DO DNA.....	54
5.4	PERFIL DE INSERÇÃO LENTIVIRAL	55
5.4.1	PERFIL DE INTEGRAÇÃO CROMOSSÔMICO.....	55
5.4.2	FREQUÊNCIA DE INTEGRAÇÃO LENTIVIRAL PERTO DE SÍTIOS DE INÍCIO DE TRANSCRIÇÃO (<i>TSS</i>) 61	
5.4.3	FREQUÊNCIA DE INTEGRAÇÃO LENTIVIRAL PRÓXIMO A ILHAS CpG.....	62
5.4.4	FREQUÊNCIA DE INTEGRAÇÃO EM REGIÕES GÊNICAS DO GENOMA	63
5.4.5	FREQUÊNCIA DE INTEGRAÇÃO EM REGIÕES REPETITIVAS DO GENOMA	73
5.4.6	FREQUÊNCIA DE INSERÇÃO EM SÍTIOS FRÁGEIS DO GENOMA HUMANO	75
5.5	NÚMERO DE CÓPIAS VIRAIS INSERIDAS	77
6	DISCUSSÃO	80
6.1	CÉLULAS-TRONCO DE PLURIPOTÊNCIA INDUZIDA (IPS) HUMANAS	80
6.2	PADRÃO DE INTEGRAÇÃO LENTIVIRAL	83
7	CONCLUSÃO.....	90
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	92
9	ANEXOS	112

Introdução

1 Introdução

1.1 Células-tronco embrionárias (CTE) humanas

O desenvolvimento humano é acompanhado de uma restrição progressiva no destino celular, ou seja, há proliferação e diferenciação celular e, à medida que as células se comprometem com linhagens específicas, ocorre a restrição do potencial de diferenciação e a aquisição de características especializadas. Um indivíduo, com sua diversidade de células presentes em tecidos adultos, é derivado de uma única célula-ovo resultante da fecundação, célula denominada totipotente devido a sua capacidade de se diferenciar em todos os tecidos embrionários e extra-embrionários, e com isso dar origem a um indivíduo (PEREIRA, 2006 e RAMOS, 2006).

Inicialmente, a célula-ovo sofre uma série de divisões celulares, formando os blastômeros, que formam uma esfera maciça de células denominada mórula. Em seguida uma cavidade se forma (blastocelo) no centro da mórula, e as células dentro dessa cavidade ficam achatadas e compactas. A estrutura resultante é chamada de blastocisto, e este apresenta dois tipos celulares com destinos distintos. As células mais externas da trofotoderma se diferenciam em células da linhagem extra-embrionárias, enquanto as células da massa interna são pluripotentes e apresentam a capacidade de se diferenciar em todos os tipos celulares dos três folhetos embrionários – mesoderme, endoderme e ectoderme (NIWA, 2007; PEREIRA, 2006; RAMOS, 2006). Conforme o desenvolvimento progride, as células pluripotentes presentes na massa celular interna do blastocisto tornam-se comprometidas com linhagens específicas e perdem a capacidade de gerar todas as células especializadas do organismo adulto.

A demonstração de que essa pluripotência transiente poderia ser mantida *in vitro* é considerada uma das descobertas mais importantes da biologia do desenvolvimento. Thomson e colaboradores (1998) foram os primeiros a isolar e estabilizar as células-tronco embrionárias (CTE) humanas em cultura, aumentando a atenção nas promessas que acompanharam sua descoberta, como a possibilidade de ser um modelo para o conhecimento do desenvolvimento embrionário e como fonte promissora de células para transplante na medicina regenerativa (MURRY & KELLER, 2008). A pluripotência e a autorrenovação dessas células podem ser

preservadas em cultura por longo período através da adição de fatores que permitem sua proliferação sem diferenciação (NIWA, 2007). Tais fatores estão presentes nos meios apropriados e também são produzidos pelas células alimentadoras (MEF – fibroblastos embrionários murinos), nas quais geralmente as CTE humanas são mantidas *in vitro* (OKITA & YAMANAKA, 2006).

Desde seu isolamento, houve um crescente interesse em estudos que abrangem a diferenciação de CTE humanas em diferentes tipos celulares, como células pancreáticas, neurônios, cardiomiócitos, entre outros, a partir de protocolos em que as condições de cultura das CTE são alteradas, por exemplo, adicionando-se citocinas e outros fatores relacionados a cada tipo celular de interesse (OKITA & YAMANAKA, 2006). Dessa maneira, essas células são consideradas fontes promissoras para terapia celular, porque podem, potencialmente, ser usadas no tratamento de diversos tipos de patologias como diabetes, doenças neurodegenerativas, lesão de medula espinhal, falência renal, insuficiência cardíaca, doenças hematológicas, muitos casos de cegueira e surdez, todas doenças causadas pela ausência de uma ou mais populações celulares críticas que o corpo é incapaz de repor. Além disso, são também uma grande promessa para o reparo e regeneração de tecidos, visto que possuem a habilidade de gerar um grande número de populações celulares definidas (THOMSON *et al.*, 1998; DALEY & SCADDEN, 2008).

Entretanto, o isolamento das CTE também levantou sérias questões éticas como o uso de embriões humanos, além de questões acerca da segurança no uso dessas células devido a possibilidade de rejeição imunológica e formação de teratomas quando transplantadas em pacientes (HENTZE *et al.*, 2009; SEGRE & GUZ, 2006). Com isso iniciou-se uma busca por fontes alternativas de células pluripotentes. Diversos estudos mostraram que células somáticas podem ser reprogramadas quando seu núcleo é transferido para um ovócito que teve seu núcleo previamente retirado (WILMUT *et al.*, 2007), ou quando são fusionadas a CTE (WILMUT *et al.*, 2007; COWAN *et al.*, 2005; HOCHEDLINGER & JAENISCH, 2006) (Figura 1), demonstrando a possibilidade de reverter experimentalmente o estado diferenciado das células somáticas a um estado como o embrionário. Entretanto, tal técnica de transferência nuclear é um processo moroso e com eficiência de reprogramação muito baixa, que inviabilizam seu uso clínico.

Figura 1: Representação de 2 técnicas de reprogramação nuclear (adaptado de HANNA *et al.*, 2010).

A solução para alguns desses problemas veio com a geração de células pluripotentes a partir de células somáticas do próprio paciente, com a introdução de alguns fatores de transcrição (FT), o que revolucionou a área de células-tronco (YAMANAKA, 2007).

1.2 Células-tronco de pluripotência induzida (*iPS*)

As células-tronco de pluripotência induzida (*iPS*) são células obtidas a partir da expressão forçada de FT relacionados à pluripotência em CTE, permitindo que uma célula diferenciada tenha seu estado diferenciado revertido a um estado semelhante ao embrionário.

A reprogramação *in vitro* de células somáticas, para a geração de *iPS* não somente contornaria os problemas éticos associados ao uso de CTE, mas também minimizaria potencialmente os riscos de rejeição imunológica pós-transplante.

A descoberta da tecnologia das células *iPS* foi fundamentada na hipótese de que a reprogramação nuclear é um processo conduzido por fatores solúveis que estão presentes no ovócito e que desempenham papéis críticos na manutenção do estado pluripotente das CTE (YAMANAKA, 2008).

Inicialmente, a geração de *iPS* foi possível pela combinação de quatro genes relacionados a pluripotência, *OCT4* (ou *POU5F1*), *SOX2*, *KLF4* e *C-MYC* (OSKM), e este se tornou o método mais comum aplicado na reprogramação *in vitro* de células somáticas

(TAKAHASHI & YAMANAKA, 2006; OKITA *et al.*, 2007; WERNIG *et al.*, 2007; LOWRY *et al.*, 2008). Embora essa combinação original de FT seja a mais utilizada, células *iPS* podem ser obtidas utilizando-se diferentes combinações desses mesmos FT (KIM *et al.*, 2008; HUANGFU *et al.*, 2008; NAKAGAWA *et al.*, 2008; SHI *et al.*, 2008; WERNIG *et al.*, 2008), ou ainda substituindo *KLF4* e *C-MYC* por *NANOG* e *LIN28* (YU *et al.*, 2007). Recentemente, nosso grupo de pesquisa do INCTC (Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Células-Tronco e Terapia Celular) mostrou que é possível a geração de *iPS* a partir de uma combinação diferente de genes, utilizando *SOX2*, *TCL-1A* e *C-MYC* (PICANÇO-CASTRO *et al.*, 2011).

A introdução desses genes de pluripotência exógenos em células somáticas, induzem a expressão de genes endógenos pertencentes à rede autorregulatória transcricional de pluripotência (JAENISCH & YOUNG, 2008). Essa regulação positiva dos fatores endógenos direciona ao silenciamento dos genes exógenos através da metilação dos promotores. O silenciamento total dos FT exógenos estabelece o limite entre células *iPS* parcialmente reprogramadas e as totalmente reprogramadas, sendo que nas *iPS* totalmente reprogramadas os FT exógenos estão silenciados e a manutenção do estado pluripotente torna-se completamente dependente do circuito transcricional endógeno (HOTTA & ELLIS, 2008).

Com relação as suas características, Takahashi e Yamanaka (2006) demonstraram que estas células adquirem propriedades similares as CTE com relação a morfologia, proliferação, expressão de alguns dos genes marcadores de CTE e formação de tumores contendo uma variedade de tecidos originários dos três folhetos embrionários após o transplante subcutâneo destas células em camundongos *NOD/SCID*. Esse resultado foi confirmado e expandido em uma série de trabalhos, utilizando diversos tipos celulares animais e humanos, que estabeleceram que as células *iPS* são molecularmente e funcionalmente similares as CTE (MAHERALI *et al.*, 2007; OKITA *et al.*, 2008; WERNIG *et al.*, 2007; ZHAO *et al.*, 2009; AOI *et al.*, 2008; LOWRY *et al.*, 2008; PICANÇO-CASTRO *et al.*, 2011), compartilhando similaridades como o potencial de crescimento celular, a atividade da telomerase, os padrões de metilação do DNA e de modificações de histonas e a expressão de marcadores de superfície, incluindo SSEA-1, SSEA-3, SSEA-4, TRA ('tumor-related antigen')-1-60, TRA-1-81 (LEWITZKY, 2007; WANG *et al.*, 2010; SCHEPER & COPRAY, 2009), assim como o padrão de expressão gênica. Quanto a este último, as células *iPS* expressam um grande número de marcadores de pluripotência, mas em um nível de expressão mais baixo comparado as CTE.

O potencial das células *iPS* de dar origem a uma progênie diferenciada capaz de restaurar funções fisiológicas *in vivo* foi explorado em modelos murinos de anemia falciforme (HANNA *et al.*, 2007), doença de Parkinson (WERNIG *et al.*, 2008) e Hemofilia A (XU *et al.*, 2009). Em humanos, a reprogramação tem sido realizada a partir de células de pacientes com várias doenças neurodegenerativas como esclerose lateral amiotrófica (ELA) (DIMOS *et al.*, 2008), atrofia muscular espinhal (AME) (EBERT *et al.*, 2009), e doença de Parkinson (SOLDNER *et al.*, 2009), além de várias doenças genéticas de herança complexa ou Mendeliana (PARK *et al.*, 2008). Recentemente, as *iPS* estão sendo empregadas como plataforma experimental para modelo de doenças *in vitro*. Vários grupos demonstraram que tipos celulares relacionados com uma doença são diferenciados a partir de células *iPS* e são capazes de reproduzir fielmente os fenótipos das doenças (EBERT *et al.*, 2009; KU *et al.*, 2010; ITZHAKI *et al.*, 2011; LIU *et al.*, 2011; ZHANG *et al.*, 2011). A descoberta das *iPS* abriu uma nova possibilidade para o desenvolvimento de modelos de doença *in vitro* em humanos para a investigação da fisiopatologia e no auxílio ao desenvolvimento de drogas (MARCHETTO *et al.*, 2010; RASHID *et al.*, 2010; JANG *et al.*, 2011; NGUYEN *et al.*, 2011; YAZAWA *et al.*, 2011), e esse, em curto prazo, é um dos aspectos mais importantes dessa tecnologia.

Com um crescimento acelerado, a área da pluripotência induzida reconheceu a necessidade de protocolos eficientes e reprodutíveis, que permitissem a geração de células *iPS* clinicamente seguras. Eficiência, reprodutibilidade e segurança são determinados principalmente pelos métodos utilizados para introduzir os fatores de transcrição nas células somáticas de interesse e pela extensão das modificações genômicas necessárias para a geração destas células.

1.3 Sistemas de expressão

Um sistema retroviral foi o primeiro utilizado na geração de células *iPS* por Takahashi e Yamanaka (2006). Vários outros estudos utilizaram gamaretrovírus para introduzir os fatores de Yamanaka nas células de interesse (MAHERALI *et al.*, 2007; OKITA *et al.*, 2007; WERNIG *et al.*, 2007). Ao mesmo tempo, Thomson e colaboradores reprogramaram fibroblastos humanos por um sistema lentiviral (YU *et al.*, 2007).

Outros métodos foram utilizados na reprogramação de células somáticas utilizando FT definidos. Os FT podem ser inseridos dentro das células por meio de sistemas de vetores virais, com a transdução das células por retrovírus (TAKAHASHI & YAMANAKA, 2006), lentivírus (PICANÇO-CASTRO *et al.*, 2011) ou adenovírus (STADTFELD *et al.*, 2008) ou sistemas não virais, tendo como carreadores os plasmídios (OKITA *et al.*, 2008), proteínas (ZHOU *et al.*, 2009) ou ainda RNAm (WARREN *et al.*, 2010) (Figura 2). Apenas na reprogramação lenti/retroviral há a integração dos transgenes no DNA da célula somática; nas demais reprogramações não há a integração genômica (WANG *et al.*, 2010 e SCHEPER & COPRAY, 2009). Estudos relacionados à geração de *iPS* demonstraram a maior eficiência na reprogramação mediada por vetores virais.

Figura 2: Esquema de alguns dos métodos utilizados na reprogramação de diferentes tipos celulares, como por exemplo, sistemas virais (retrovírus, lentivírus, adenovírus) ou sistemas não virais (plasmídeos, proteínas, RNAm) (adaptado de HAN & YOON, 2011).

Mais recentemente, na busca por metodologias que aumentassem a eficiência de geração de células *iPS*, os sistemas de expressão policistronicos surgiram como uma alternativa mais simples de entrega de fatores de reprogramação (SOMMER &

MOSTOSLAVSKY, 2010). A expressão simultânea de múltiplos genes é possível através da inserção de sequências intercalantes, tais como o peptídeo 2A ou o elemento *IRES* (sítio interno de ligação ao ribossomo), entre duas *ORF* (quadros de leitura) constitutivas. Vários tipos de vetores virais policitrônicos expressando os quatro fatores em um único transcrito foram desenvolvidos (CHANG *et al.*, 2009; CAREY *et al.*, 2009; SOMMER *et al.*, 2009). Os vetores policitrônicos parecem realizar uma reprogramação mais fiel na geração de células *iPS* que são transcricionalmente mais próximas as CTE (CHIN *et al.*, 2010). Reprogramação com vetores de multi-expressão frequentemente gera um único evento de transdução, reduzindo o tempo de trabalho e aumentando a reprodutibilidade.

O sucesso dos vetores integrativos para a derivação de células *iPS* não foi coincidência, já que esses vetores fornecem expressão eficiente e estável em uma grande variedade de tipos celulares. Entretanto, os clones de célula *iPS* resultantes geralmente exibem múltiplas integrações, aumentando o risco de mutagênese insercional. Além disso, a infecção prolongada com múltiplos retrovírus individuais apresenta uma questão crítica em termos de segurança, especificamente quando há a expressão aberrante de oncogenes, sendo que alguns dos genes originalmente utilizados na geração de *iPS* estão associados com diversos tipos de câncer (SCHEPER & COPRAY, 2009). O *C-MYC*, por exemplo, conhecido por induzir a transformação oncogênica (OKITA *et al.*, 2007), tem relação com aproximadamente 70% dos cânceres humanos, sendo o principal fator oncogênico presente nos protocolos para geração de *iPS* (DANG *et al.*, 2006). Entretanto, *C-MYC* é um potente indutor da reprogramação, dado que uma de suas funções pode ser a ativação direta de genes relacionados a pluripotência, apesar de seu papel ainda não estar completamente esclarecido. Outra função de *C-MYC* é a aceleração do ciclo celular, e sua ligação pode desfazer/abrir a estrutura da cromatina e facilitar o acesso de outros fatores de proliferação a suas sequências alvo (OKITA & YAMANAKA, 2011).

Em contraste com os gamaretrovírus, os lentivírus são capazes de transduzir células em divisão ou não com alta eficiência. Eles são considerados ótimos sistemas para inserção de genes devido a sua capacidade de transdução em células que se dividem lentamente ou estacionárias, além de possuírem a capacidade de inserir grandes genes na cromatina do hospedeiro e de manter estável a expressão do transgene por longo tempo (PICANÇO-CASTRO *et al.*, 2008). Entretanto, assim como os retrovírus em geral ou qualquer outro vetor integrativo, a integração do vetor lentiviral pode levar à formação de tumores (BONETTA, 2002; HACEIN-BEY-ABINA *et al.*, 2003; MARSHALL, 2003).

1.4 Lentivírus e ciclo de vida

Os lentivírus compreendem um gênero da família Retroviridae, que incluem os patógenos humanos HIV-1, HIV-2, vírus da imunodeficiência símia (*SIV*) e outros vírus que infectam felinos (*FIV*) e ungulados (vírus da anemia infecciosa equina, vírus da artrite-encefalite caprina, vírus da imunodeficiência bovina, Maedi-Visna em ovinos).

Retroviridae é uma família de vírus esféricos de RNA fita simples (RNA fs) que, juntamente com as enzimas transcriptase reversa, integrase e protease, formam um complexo com proteínas do nucleocapsídeo. Um segundo invólucro proteico, formado por proteínas do capsídeo, envolve o nucleocapsídeo e delimita o núcleo viral. Proteínas de matriz formam uma camada externa ao núcleo e interagem com a camada lipídica celular, que incorpora glicoproteínas ao envelope viral, responsáveis pela interação com receptores celulares específicos, as quais são formadas por uma unidade transmembrana, que ancora a proteína na camada lipídica, e uma unidade de superfície, que liga-se ao receptor celular (Figura 3) (JONES & MORIKAWA, 1998; ESCORS & BRECKPOT, 2010).

Figura 3: Esquema estrutural de um vírus da família Retroviridae. Abreviações: CA capsídeo, IN integrase, MA matriz, NC nucleocapsídeo, PR protease, RT transcriptase reversa, SU superfície, TM transmembrana (adaptado de Escors & Breckpot, 2010).

O genoma do HIV-1, assim como de todos os outros tipos lentivirais, é organizado em nove genes, dentre eles, três genes, *gag*, *pol* e *env*, carregam a informação necessária para a produção de proteínas estruturais (proteínas da matriz, capsídeo e nucleocapsídeo), de

enzimas envolvidas na replicação (protease, transcriptase reversa e integrase) e da glicoproteína precursora do envelope (*Env*), que é clivada em gp120 (unidade de superfície) e gp41 (unidade transmembrana). *Gag* codifica as proteínas estruturais, enquanto o gene *pol* codifica as enzimas que acompanham o RNA fs, e o gene *env* codifica o envelope viral. Quanto às enzimas, a transcriptase reversa promove a transcrição reversa do RNA viral em DNA, a integrase catalisa a integração do DNA proviral no genoma do hospedeiro, e a protease está envolvida na clivagem de *gag-pol* e na maturação dos vírions (KATZ & SKALKA, 1994; ESCORS & BRECKPOT, 2010).

Outros componentes importantes do genoma retroviral são elementos regulatórios *cis-acting*, tais como duas repetições terminais longas (*LTR*), que, além de possibilitarem a integração do genoma viral na célula hospedeira, são também responsáveis pela regulação da transcrição dos genes virais. As *LTR* contêm sequências sinal de poliadenilação, sequências promotoras (TATA Box), além de sítios de ligação para fatores de transcrição das células hospedeiras. Existem também elementos necessários para a expressão, transcrição reversa e integração nos cromossomos do hospedeiro. Além disso, o genoma retroviral contém um sinal de empacotamento (ψ ou ψ), necessário para o empacotamento do RNA nos recém-formados vírions (WATANABE & TEMIN, 1982; CHARNEAU *et al.*, 1992; RATTRAY & CHAMPOUX, 1989; ESCORS & BRECKPOT, 2010) (Figura 4).

Figura 4: Esquema do genoma do *HIV-1*. Flanqueado pelas regiões *LTR*, que controlam a expressão dos genes virais, estão os três genes que codificam proteínas estruturais e enzimas (*gag*, *pol* e *env*), além de genes que codificam proteínas regulatórias (*tat* e *rev*) e proteínas acessórias (*vif*, *vpu*, *vpr* e *nef*). Abreviações: CA capsídeo, IN integrase, MA matriz, NC nucleocapsídeo, PR protease, RT transcriptase reversa, SU superfície, TM transmembrana, *LTR* repetições terminais longas, *RRE* elemento de resposta de *rev*.

O ciclo de vida do lentivírus possui duas fases principais: infecção e replicação. A infecção compreende a introdução do genoma viral na célula, o que leva à expressão de produtos regulatórios virais, seguido pela expressão de genes estruturais e montagem da nova

partícula viral na fase replicativa do ciclo. Inicialmente, as proteínas virais gp120 ligam-se a receptores específicos, o envelope viral funde-se com a membrana da célula hospedeira e o núcleo viral é transportado para o citoplasma da célula hospedeira. O RNA viral é convertido em DNA pela transcriptase reversa viral e este é transportado para o núcleo celular, onde a integrase catalisa a inserção do DNA na cromatina do hospedeiro (FREED, 2001; PICANÇO-CASTRO *et al.*, 2008).

O processo de integração, etapa essencial do ciclo replicativo, pode ocorrer em qualquer lugar do genoma da célula hospedeira e é dividido em três etapas principais: 1) o processamento 3', 2) a transferência de fita e 3) o reparo do DNA viral integrado no DNA da célula hospedeira. *In vitro*, a integrase viral catalisa as duas primeiras etapas do processo de integração, porém mostra baixa especificidade de ligação com o DNA da célula hospedeira. Provavelmente, as proteínas da célula hospedeira participam do processo de integração (CHEREPANOV *et al.*, 2005).

O primeiro passo do processo de integração ocorre no citoplasma da célula hospedeira após o fim da transcrição reversa do RNA do HIV em cDNA, e envolve a ligação da integrase, geralmente na forma de dímero, a cada extremidade do cDNA viral recém-formado. A ligação ocorre em sequências específicas nas regiões de *LTR* (repetições terminais longas). O complexo DNA viral-integrase compõem uma partícula nucleoproteica intracelular denominada “complexo de pré-integração” (*PIC*). Esse complexo consiste no cDNA viral linear, proteínas virais, que incluem integrase, nucleocapsídeo, matriz, proteína viral R (*Vpr*) e transcriptase reversa, e proteínas do hospedeiro.

O processamento da terminação 3', que também acontece no citoplasma da célula hospedeira, ocorre após a síntese completa do cDNA viral. O dímero de integrase cliva o cDNA viral em cada extremidade 3', eliminando as duas bases finais de cada terminação 3'. Essa clivagem do dinucleotídeo de cada extremidade 3' cria um intermediário reativo que contém um grupo 3'-hidroxila (3'-OH), que fornece um sítio de ligação no cDNA viral. O complexo nucleoproteico viral entra no núcleo, após essa que no caso do lentivírus pode ocorrer durante a mitose, porém o lentivírus possui um transporte ativo através do poro nuclear, permitindo que ele entre no núcleo também durante a interfase celular. Uma vez dentro do núcleo, uma proteína do hospedeiro liga-se ao *PIC* e ao DNA do hospedeiro, e funciona como uma ponte (“*tethering proteins*”) entre ambos.

Na etapa seguinte, a reação de transferência de fita envolve o passo crítico de inserção do cDNA viral em uma região selecionada do DNA do hospedeiro. A integrase catalisa a

inserção do cDNA viral no cromossomo hospedeiro, de maneira que o *PIC* liga-se ao DNA do hospedeiro e o processo de integração é iniciado, com uma reação de transesterificação, em que o átomo de oxigênio da extremidade 3' do cDNA viral clivado ataca a ligação fosfodiéster do DNA hospedeiro através de dois íons de Mg^{2+} . O tetrâmero da integrase liga as duas regiões *LTR* do cDNA viral ao DNA hospedeiro, inserindo ambas as extremidades do cDNA viral no cromossomo da célula hospedeira. Para completar a reação de integração é necessária a remoção dos dinucleotídeos, de origem viral, das extremidades 5' e reparo do DNA, que requer pelo menos 3 enzimas do hospedeiro – polimerase, nuclease e ligase. No primeiro passo, a enzima polimerase estende o DNA do hospedeiro em cada extremidade, preenchendo as lacunas. Em seguida, a enzima nuclease remove a ponta restante do dinucleotídeo 5' no cDNA viral. Por fim, a enzima DNA ligase junta os segmentos não ligados de cDNA viral e do hospedeiro. A reação final então resulta em uma molécula de cDNA viral, agora chamada de provírus, integrada no DNA genômico, com uma duplicação de 5 pb da sequência genômica flanqueando o sítio de integração (Figura 5) (CHOW & BROWN, 1994; DELELIS *et al.*, 2008; VANDEGRAAFF & ENGELMAN, 2007).

Figura 5: Esquema do mecanismo de integração do cDNA do *HIV-1*. (a) Um tetrâmero de integrase (esferas cinzas) liga-se às duas extremidades do cDNA do *HIV-1* (linhas azuis) dentro de um complexo nucleoproteico (formado pelas enzimas virais e DNA viral). Durante o processamento 3', água é usada pela integrase para criar sítios (setas verticais) para ligar

dinucleotídeos em ambas as extremidades do *HIV-1*. Os triângulos abertos simbolizam as sequências de DNA U3 no *LTR upstream* reconhecido pela integrase, e os triângulos fechados simbolizam sequências U5 *downstream* reconhecidas pela integrase. (b) Após entrar no núcleo e localizar um sítio alvo adequado dentro da cromatina (linhas laranja), a integrase utiliza os grupos 3'-hidroxila do cDNA viral clivado para cortar o DNA alvo (setas verticais), que concomitantemente liga a extremidade 3' viral ao 5'-fosfato do corte. (c) O intermediário da recombinação formado pela atividade de transferência de fita da integrase, incluindo a extremidade 3' viral ligada e a extremidade 5' livre. (d) O reparo da lacuna do intermediário de recombinação termina com o provírus integrado flanqueado por uma duplicação de 5 pb do DNA alvo (linhas verdes entre colchetes). A sequência dessa duplicação é definida pela sequência da dupla-fita cortada em (b) (adaptada de VANDEGRAAFF & ENGELMAN, 2007).

1.5 Vetores lentivirais

Com um intuito de utilizar essas características virais de transferência gênica, como a introdução de material exógeno no genoma de uma célula hospedeira e indução da expressão gênica, foram desenvolvidos os vetores virais.

Atualmente, os *trials* de terapia gênica utilizam mais comumente os vetores derivados do retrovírus *MLV* (vírus da leucemia murina), devido a ampla caracterização desses vetores e por seus genomas serem relativamente simples. Entretanto, os vetores derivados do HIV estão substituindo os vetores derivados do *MLV*, principalmente devido ao desenvolvimento de sistemas de empacotamento simples e ao aumento da segurança pela remoção de todos os genes do *HIV-1* não necessários para a transferência gênica (ZUFFEREY *et al.*, 1997; MARKMAN *et al.*, 2011).

Várias modificações foram realizadas no genoma do *HIV-1* com o objetivo de construir vetores eficientes e seguros. A estratégia geral que leva a produção de vetores lentivirais compreende a separação de elementos *cis-acting* dos elementos *trans*, e a colocação destes em moléculas de ácido nucleico distintas, para prevenir a formação de partículas lentivirais replicantes a partir de recombinação genética. Os elementos *cis-acting* são sequências regulatórias da região promotora (elementos de sequência não-codificante necessários para a síntese de RNA do vetor, empacotamento, transcrição reversa e integração) que são reconhecidas por proteínas específicas (fatores de transcrição – *trans-acting* –

sequências codificantes de proteínas enzimáticas, estruturais e acessórias) que ativam a transcrição de genes (PICANÇO-CASTRO *et al.*, 2008).

Há três gerações de vetores lentivirais, os quais são classificados de acordo com as deleções de genes virais realizadas. Os vetores de primeira geração não possuem um sinal de empacotamento funcional e nem o gene *env* (responsável pela codificação do envelope) completo. Essa configuração garante que as células infectadas não produzam vírus replicantes, porém a presença do *LTR*, um promotor endógeno forte, poderia ativar proto-oncogenes por mutagênese insercional, e a presença de alguns elementos virais (*vif*, *vpr*, *vpu*, *nef*) no cassete do capsídeo levantaram questões relacionadas a segurança devido as suas atividades citotóxicas e citostáticas (DELENDÁ, 2004; COCKRELL & KAFRI, 2007). Alguns problemas foram resolvidos nos vetores de segunda geração, com a deleção de mais quatro genes (*vpr*, *vif*, *vpu* e *nef*), responsáveis pela virulência, mas alguns continuaram sem solução, como a transcrição dependente de *tat* e o uso do 3' *LTR* como o promotor para dirigir a expressão do transgene (ZUFFEREY *et al.*, 1997). Para otimizar o sistema lentiviral, os vetores de terceira geração foram desenvolvidos com a remoção do gene *tat* do cassete do capsídeo e a inativação do *LTR* do cassete do vetor. Dessa maneira, no cassete do capsídeo restaram apenas três dos nove genes originais do genoma do *HIV-1* (*gag*, *pol* e *rev*) característica que aumenta a segurança do vetor reduzindo a probabilidade de formação de lentivírus competentes em replicação. Além disso, a substituição da região U3 do 5' *LTR* do *HIV-1* pelos promotores do *CMV* (Citomegalovírus) ou do *RSV* (Vírus do Sarcoma de Rous) eliminou a dependência de *tat* sem afetar a eficiência de transdução (DULL *et al.*, 1998; KIM *et al.*, 1998; PICANÇO-CASTRO *et al.*, 2008). Outra melhoria foi o desenvolvimento dos vetores autoinativantes (*self-inactivating*) (*SIN*), que incluem uma deleção da região *enhancer* e promotor na região U3 do 3' *LTR* do cassete de expressão (mostrado na Figura 6 como Δ). Esta deleção será duplicada durante a transdução, de modo que no provírus integrado tanto a região 5' como a 3' *LTR* terão a atividade promotora desligada. Essa característica leva à inativação transcricional, reduzindo a probabilidade de mobilização do vetor após uma infecção pelo $\square\mu\text{M}$ $\square\mu\text{Ma}$ do *HIV-1* (ZUFFEREY *et al.*, 1997; ZUFFEREY *et al.*, 1998; DULL *et al.*, 1998; COCKRELL & KAFRI, 2007; PICANÇO-CASTRO *et al.*, 2008). A adição das sequências *cPPT* e *CTS*, e do $\square\mu\text{Ma}$ *WPPE* são outras modificações importantes. As duas primeiras facilitam a entrada do cDNA viral no núcleo e explicam a capacidade do lentivírus de infectar células estacionárias, aumentando a eficiência de transdução dos vetores em células em divisão ou não (COCKRELL & KAFRI, 2007;

ZENNOU *et al.*, 2000; FOLLENZI *et al.*, 2000; INSTITUT PASTEUR, 2004). A adição da sequência *WPRE* $\square$ mu na região não traduzida na extremidade 3' do transgene aumenta a estabilidade do transcrito, aumentando consequentemente a expressão do transgene (Figura 6) (ZUFFEREY *et al.*, 1999; POPA *et al.*, 2002; SALK INSTITUTE FOR BIOLOGICAL STUDIES, 2000; SALK INSTITUTE FOR BIOLOGICAL STUDIES, 2001).

Figura 6: Sistema de terceira geração do vetor derivado de *HIV-1* independente de *tat*. Os vetores *SIN* possuem as sequências *cPPT/CTS* que auxiliam na importação nuclear e a sequência *WPRE* que aumenta a estabilidade do RNA, além de um promotor interno para promover a expressão do transgene. O(s) cassete(s) do capsídeo contém apenas os genes *gag*, *pol* e *rev*, sendo que este último pode ser transcrito por um cassete separado (adaptado de PIKANÇO-CASTRO *et al.*, 2008).

A capacidade dos vetores lentivirais de transduzir um grande número de tipos celulares os tornou um sistema de transferência gênica muito atraente para o tratamento de várias doenças. Entretanto, a integração do vetor lentiviral no genoma do hospedeiro pode levar a formação de tumores e, mesmo vetores que não carregam oncogenes podem induzir tumores no hospedeiro através de mutagênese insercional ou ativação de oncogenes, já observados em trials de terapia gênica utilizando vetores retrovirais (BONETTA 2002; HACEIN-BEY-ABINA *et al.*, 2003; MARSHALL, 2003; LI *et al.*, 2002).

1.6 Integração

Inicialmente, acreditava-se que os eventos de integração dos retrovírus eram aleatórios, e a possibilidade de interromper ou acidentalmente ativar um gene foi considerada remota. Os primeiros estudos de integração retroviral propuseram que as regiões de cromatina condensada não estavam propensas a integração retroviral, concentrando-se, assim, a integração nas regiões mais abertas e ativas do genoma. Porém, diferentes estudos têm demonstrado que a maioria do genoma do hospedeiro é acessível para a integração retroviral e também que a escolha do destino não é aleatória, ocorrendo em sítios previamente selecionados (SCHRODER *et al.*, 2002; WU *et al.*, 2003; MITCHELL *et al.*, 2004).

A sequência específica do DNA do hospedeiro parece ter um papel importante na seleção dos sítios de integração, visto que há diferenças claras nos sítios de integração preferencial. Wu e colaboradores, em 2003, analisaram a integração do vírus da leucemia murina (*MLV*) em células HeLa, e demonstraram que esse retrovírus possui um sítio de integração preferencial próximo de 5 Kb de distância *downstream* e *upstream* de sítios de início de transcrição (*TSS*) e próximos de 1 Kb *downstream* e *upstream* de ilhas CpG.

Em 2004, Mitchell e colaboradores compararam o perfil de integração de três retrovírus *HIV-1*, *MLV* e *ASLV* (vírus da leucose/sarcoma aviária), e observaram que, nas duas linhagens celulares primárias utilizadas (células mononucleares de sangue periférico e fibroblasto de pulmão IMR90), a integração do *MLV* é favorecida por regiões próximas de 1 Kb de distância *downstream* e *upstream* de ilhas CpG, e o *ASLV* mostrou apenas uma preferência fraca por genes ativos e nenhuma preferência por regiões de início de transcrição, sugerindo perfis distintos de acordo com o tipo viral, de maneira que a ligação do tipo viral específico no complexo de integração parece guiar a seleção do sítio na cromatina.

Entretanto, apesar de vários estudos demonstrarem que a sequência do DNA do hospedeiro tem um papel crítico na seleção do sítio de inserção, sabe-se atualmente que fatores celulares também estão envolvidos no processo. Existem três modelos possíveis para explicar a seleção do sítio de integração: acessibilidade da cromatina, ciclo celular e *tethering proteins*.

A estrutura da cromatina (heterocromatina ou eucromatina) pode influenciar a acessibilidade às sequências alvo do DNA, afetando o perfil de integração. Alguns grupos demonstraram que o *HIV-1* favorece algumas locais como regiões do DNA ricas em A/T e

regiões como os sulcos maiores do DNA nucleossomal (BARR *et al.*, 2005; BRADY *et al.*, 2009a; BRADY *et al.*, 2009b; FELICE *et al.*, 2009; VATAKIS *et al.*, 2009; WELLENSIEK *et al.*, 2009). Entretanto, a estrutura do DNA não explica as diferenças observadas entre *HIV-1* e *MLV*, com relação aos sítios de integração preferenciais. Evidências contra esse modelo surgiram da comparação de sítios de integração preferenciais de HIV e MLV, de maneira que o MLV integra-se preferencialmente em regiões promotoras, mas o HIV não mostra essa preferência (SCHRODER *et al.*, 2002; WU *et al.*, 2003; FELICE *et al.*, 2009; WELLENSIEK *et al.*, 2009). Dessa forma, a cromatina pode influenciar o perfil de integração, mas existem outros mecanismos que afetam a integração de *HIV-1* e *MLV*.

O ciclo celular também pode influenciar a seleção do sítio de inserção. O *MLV* necessita de que as células estejam se dividindo ativamente para introduzir o seu DNA no genoma da célula hospedeira, mas no caso dos lentivírus, eles são capazes de infectar e integrar-se no genoma da célula hospedeira com sucesso independente do estágio do ciclo celular (em divisão ou não). Ciuff e colaboradores (2006) analisaram o perfil de integração do *HIV* em células IMR-90 em divisão ou repouso para avaliar o efeito do ciclo celular na integração do *HIV*, e em ambas as células o *HIV* demonstrou uma preferência mais evidente, por determinadas regiões, nas células estacionárias. Outros estudos mostraram que não há grandes diferenças nos sítios alvo de integração do *HIV* entre células em divisão ou em repouso (BARR *et al.*, 2005; BRADY *et al.*, 2009a; VATAKIS *et al.*, 2009). Juntos, esses estudos mostram que, assim como a estrutura da cromatina, o ciclo celular também não explica as diferenças nos sítios de integração entre *HIV* e *MLV*.

O modelo mais aceito e que explica essas diferenças entre os tipos virais é de que existem proteínas celulares específicas que ligam o complexo de pré-integração (*PIC*) viral ao sítio específico do DNA alvo (CHEREPANOV *et al.*, 2005). A proteína *LEDGF/p75* (fator de crescimento derivado do epitélio do cristalino) é uma proteína celular que recruta o *PIC* lentiviral para regiões específicas do DNA alvo e facilita a integração (BUSHMAN & CRAIGIE, 1990; CIUFFI & BUSHMAN, 2006). Essa proteína é transcricionalmente ativa no genoma humano (GE *et al.*, 1998) e é importante para a sobrevivência da célula (SHINOHARA *et al.*, 2002).

1.7 Integração X Células *iPS*

Atualmente, com o desenvolvimento da tecnologia de geração de células-tronco pluripotentes induzidas (*iPS*), houve um grande interesse em se conhecer a fundo as características dessas células, uma vez que elas são uma importante ferramenta na medicina regenerativa.

As *iPS* humanas foram inicialmente derivadas utilizando vetores derivados de MLV e HIV-1 (TAKAHASHI & YAMANAKA, 2006; YU *et al.*, 2007; TAKAHASHI *et al.*, 2007). Entretanto, vetores derivados de MLV foram associados mais diretamente com genotoxicidade e ativação de proto-oncogene por inserção em vários sistemas experimentais e clínicos do que os vetores lentivirais derivados do HIV-1 (MONTINI *et al.*, 2006; MONTINI *et al.*, 2009).

Alguns poucos estudos avaliaram o perfil de integração dos vetores virais utilizados para geração de *iPS*. Winkler e colaboradores (2010) investigou o perfil de inserção de vetores lentivirais em linhagens de *iPS* humanas; outros estudos identificaram os sítios de inserção em *iPS* murinas obtidas utilizando vetores retrovirais (AOI *et al.*, 2008; VARAS *et al.*, 2009).

As células murinas e humanas possuem diferenças com relação a geração de *iPS*, como a transformação mais fácil das células murinas comparadas com qualquer tipo celular humano, e a baixa eficiência de geração de *iPS* humanas comparadas com *iPS* murinas. Dessa forma, é importante a realização de estudos de integração, especificamente em linhagens de *iPS* humanas.

Justificativa

2 Justificativa

Com o desenvolvimento da tecnologia de geração de *iPS*, iniciou-se uma corrida para caracterização e completo entendimento desse tipo celular e seus mecanismos de geração. Uma das grandes controvérsias dessa tecnologia é a utilização de vetores virais para sua geração. Mesmo que as estratégias de reprogramação estejam evoluindo rapidamente e apesar da existência de tecnologias de geração de *iPS* sem vetores virais integrativos, a transferência e a expressão de FT via sistema retroviral ou lentiviral continua sendo a estratégia de reprogramação mais comumente utilizada, devido a sua robustez e reprodutibilidade. Investigar se os vetores utilizados na geração desse tipo celular poderiam se inserir em locais de risco é importante, mesmo que sistemas não integrativos sejam eventualmente utilizados para aplicações clínicas futuras. Além disso, a análise do padrão de inserção dos vetores lentivirais nesses tipos celulares tão utilizados na geração de *iPS*, contribuiria para o entendimento dos fatores que interferem na seleção dos sítios de integração, e ajudaria a determinar regiões cromossômicas “seguras” para direcionar a integração, aumentando sua segurança no uso desse tipo celular.

Objetivos

3 Objetivos

3.1 Objetivo geral

- ✓ Avaliar e caracterizar o perfil de integração lentiviral em células reprogramadas.

3.2 Objetivos específicos

- ✓ Quantificar o número de cópias virais inseridas em cada célula.
- ✓ Determinar o perfil e padrão de integração do lentivírus no genoma das células.

Animal, Material e Métodos

Fluxograma da metodologia empregada neste trabalho

4 Animal, Material e Métodos

4.1 Produção de fibroblastos embrionários murinos (MEF)

Os fibroblastos embrionários murinos (MEF) são utilizados como células alimentadoras (*feeders*) na geração e manutenção das células pluripotentes. Com o intuito de suprir nossa demanda, fizemos o isolamento de fibroblastos de embriões murinos. Embriões de camundongos C57BL/6 com 13 dias foram assepticamente e cirurgicamente retirados do abdômen de camundongos fêmeas prenhas, adequadamente seccionados e submetidos a digestão enzimática com Tripsina-EDTA [0,25% tripsina – 0,02% EDTA (Ethylenediamine tetraacetic acid)] para a dissociação das células. O *pool* de células foi plaqueado em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) *High Glucose* (Gibco) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), aminoácidos não essenciais (Invitrogen), L-Glutamina 4

mmol/L (Invitrogen), Penicilina (100 U/L; Gibco) e Streptomicina (100 µg/mL; Gibco) (pH 7,2). As células foram expandidas e caracterizadas para serem utilizadas até a quarta passagem (Comitê de Ética Animal: 09.1.1353.53.5).

4.2 Células utilizadas e cultivo

4.2.1 Célula reprogramada TSM

No presente estudo foram utilizadas amostras de células reprogramadas TSM (PICANÇO-CASTRO *et al.*, 2011) criopreservadas, as quais foram previamente obtidas a partir da linhagem de fibroblastos humana CCD27SK (ATCC CRL1475), derivada de pele de recém-nascido prematuro, transduzidos com o vetor de expressão lentiviral pLenti-cPPT-CIGWS com os FT SOX2, TCL-1A e C-MYC clonados individualmente (Figura 7A). Este é um vetor de 3^a geração derivado do vírus da imunodeficiência humana-1 (*HIV-1*), no qual mais da metade do genoma do *HIV-1* foi deletado (TRONO, 2000). Esse vetor possui próximo ao cassete de expressão poucas sequências do *HIV-1*, como as sequências *cPPT/CTS* (*central polypurine tract/ central termination sequence*) do gene *pol* do *HIV-1*, que são elementos de transporte constitutivo, inseridas no final 5' do promotor interno *CMV* (*immediate early CMV enhancer/promoter*; *CMV*: *Cytomegalovirus*) antes do cassete de expressão, e atuam otimizando a eficiência de transdução de células estacionárias, visto que protege a importação do DNA viral retro-transcrito para o núcleo da célula-alvo. As sequências *LTR* encontram-se bastante modificadas no vetor de expressão, de modo que no provírus integrado tanto a região 5' como a 3' LTR terão a atividade promotora desligada, garantindo que o RNA viral do provírus não seja transcrito na célula-alvo, havendo apenas a produção do RNAm controlado pelo promotor interno (CMV) (*self inactivated vector - SIN*) (MYOSHI *et al.*, 1998).

O cassete de expressão do pLenti-cPPT-CIGWS contém um promotor interno, o transgene e alguns elementos regulatórios. O promotor *CMV* (promotor forte) é ativo em quase todos os tipos celulares. A região 3' do transgene apresenta um elemento regulatório do vírus da hepatite de marmota denominado *WPRE* (*woodchuck hepatitis virus*

posttranscriptional regulatory element) (DONELLO *et al.*, 1998). A sua presença no final 3' do RNA aumenta a eficiência do transporte do RNA do núcleo para o citoplasma e, possivelmente, também aumenta a eficiência do processamento do RNA, assim como a poliadenilação (ZUFFEREY *et al.*, 1999; POPA *et al.*, 2002). Dessa maneira, há um aumento da concentração de RNAm na célula-alvo e, conseqüentemente, da produção da proteína (ZUFFEREY *et al.*, 1999).

Nas construções pLenti-cPPT-CIGWS utilizadas nesse trabalho são expressas duas proteínas (FT - SOX2, C-MYC ou TCL1 - e EGFP – *Enhanced Green Fluorescent Protein*) (vetor bicistrônico) em um plasmídio transgênico. Isso se torna possível pela inserção de um sítio interno de ligação ao ribossomo (*IRES*), e dessa maneira, um segundo DNA transgênico (o gene marcador *EGFP*) pode ser inserido entre o *IRES* e o *WPPE*, permitindo a tradução de duas proteínas diferentes a partir de uma única molécula de RNAm (HENNECKE *et al.*, 2001).

Os fibroblastos e as células 293T [CRL-11268™ (ATCC), provenientes de rim embrionário humano], foram inicialmente cultivados em meio DMEM (Gibco) suplementado com 10% de SBF (Hyclone), 2,4 g/L HEPES (Sigma), 3,7 g/L bicarbonato de sódio, L-Glutamina 4 mmol/L, Penicilina (100 U/L; Gibco) e Streptomicina (100 µg/mL; Gibco) (pH 7,2). O DNA do vetor foi introduzido na célula 293T através de uma co-transfecção tripla com o vetor que codifica para o capsídeo viral pCMVΔR8.91 (ZUFFEREY *et al.*, 1997; MASTROMARINO *et al.*, 1987) (Figura 7B) e o vetor para o envelope viral pMD2.VSVG, que codifica para a glicoproteína do vírus da estomatite vesicular (FOLLENZI & NALDINI, 2002; MCGLYNN *et al.*, 1996) (Figura 7C).

O pCMVΔR8.91 é um vetor de segunda geração responsável pela formação do capsídeo. Nesse vetor encontram-se apenas os genes do *HIV-1* relacionados à produção de proteínas estruturais e enzimas (*gag*, *pro* e *pol*), o gene *rev*, que regula a expressão de *gag*, *pro* e *pol* e o gene *tat*, que funciona como um ativador da transcrição na região *LTR*. A transcrição desse vetor inicia-se pelo promotor heterólogo *CMV* e termina no sinal de poliadenilação (*polyA*).

Assim como no pCMVΔR8.91, a transcrição do pMD2.VSVG é regulada pelo promotor *CMV* e sinal de *polyA*. A utilização de envelope diferente do *HIV-1* amplia a gama de tipos de células-alvo, impedindo que as partículas virais formadas tenham tropismo apenas por células T e macrófagos. O pMD2.VSVG, por ser um vírus pantrópico, pode se ligar a uma variedade de células humanas primárias, células animais e linhagens celulares, levando em

conta que não possui um receptor específico, se ligando de forma inespecífica a fosfolipídeos da membrana celular (MASTROMARINO *et al.*, 1987).

A utilização dos genes virais divididos em três plasmídios e a deleção de regiões da LTR se mostram fundamentais no sentido que impede a possibilidade de formação de vírus competentes em replicação nas células transduzidas e diminui a patogenicidade (NALDINI *et al.*, 1996; MIYOSHI *et al.*, 1998). Neste sistema, o surgimento de vírus competentes para replicação é extremamente improvável, pois seriam necessários milhares de recombinações homólogas do vetor com outras sequências para substituir todas as regiões deletadas.

Figura 7: Esquema dos vetores utilizados na produção viral através de co-transfecção tripla. (A) Vetor de 3ª geração derivado do *HIV-1*, bicistrônico, que codifica para *EGFP* (pLenti-cPPT-C(FT)IGWS); (B) Vetor que codifica para o capsídeo viral (pCMVΔR8.91); (C) Vetor para o envelope viral (pMD2.VSVG), que codifica para a glicoproteína do vírus da estomatite vesicular.

Para a produção das partículas virais, as células 293T foram transfectadas com a mistura de DNA contendo os 3 plasmídios através de uma co-precipitação com fosfato de cálcio. Uma mistura de DNA e cálcio em um tampão fosfato permite a formação de precipitados DNA-Fosfato de cálcio, que são incorporados por endocitose nas células 293T. Vinte e quatro horas antes da transfecção, 6×10^6 células foram plaqueadas em placas de 10

cm. Para a formação do co-precipitado de cálcio foi utilizado 20 µg de plasmídeo em 450 µL de água destilada e 50 µL de solução de cloreto de cálcio (2,5 mol/L). Em seguida foi adicionado 500 µL de 2xHBS (NaCl 281 mmol/L, HEPES 100 mmol/L, Na₂HPO₄ 1,5 mmol/L; pH 7,12), em vortex, e o precipitado foi adicionado às células e incubado a 37°C com 5% de CO₂ e 80% de umidade. Dezesesseis horas após a transfecção, os sobrenadantes foram substituídos por meio fresco, e as células foram incubadas por 48 horas adicionais. Os sobrenadantes da cultura contendo as partículas virais foram coletados e filtrados através de filtros de poro 0,45 µm e as preparações virais foram congeladas e estocadas a -80°C. Um dia antes da transdução, os fibroblastos humanos foram plaqueados a 2x10⁴ células/poço de placa de 6 poços. Quantidades iguais de sobrenadante contendo cada um dos 3 lentivírus (MOI 10) foram misturadas juntamente com Polibreno (6 µg/mL; Sigma-Aldrich) (auxilia na ligação da superfície negativa do vírus com a membrana celular), transferidas para a placa com fibroblastos, e incubadas *overnight* a 37°C com 5% de CO₂ e 80% de umidade. Doze horas após a transdução, o meio contendo os vírus foi substituído por meio fresco, e após 6 horas as células foram retiradas por tripsinização e replaqueadas a 1x10⁴ células/poço de placa de 6 poços previamente coberta com *Matrigel*TM (BD Biosciences) e com meio de CTE [*mTeSR*TM1 (StemCell Technologies)] suplementado com ácido valpróico [(VPA) 20 mmol/L; Stemgent]. O meio foi trocado diariamente e 17 dias após a transdução, as colônias que surgiram foram selecionadas, dissociadas mecanicamente em pequenos grumos por pipetagem e replaqueadas em nova placa de 6 poços para expansão.

As células reprogramadas TSM, assim como os fibroblastos e as células 293T foram congeladas para estocagem com 90% SBF com 10% DMSO (Dimetilsulfóxido) a -80°C inicialmente e estocadas em nitrogênio líquido a -196°C.

4.2.2 Célula iPS 4FT

A célula iPS 4FT (cedida por Fabiana Fernandes Bressan - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos – USP) foi obtida a partir da inserção do vetor lentiviral polistrônico *cre-excisable* EF1α-hSTEMCCA-LoxP (OKSM) (Millipore) (SOMMER *et al.*, 2009) (Figura 8), em células mesenquimais primárias derivadas de tecido adiposo (Comitê de ética: 1986/2009; CONEP: 250/2010).

4.2.2.1 Geração das células iPS 4FT

As células mesenquimais humanas (hAdMSC) foram obtidas através de descarte de tecido adiposo obtido de procedimento de lipoaspiração eletiva. O tecido adiposo foi incubado por 3h a 38,5°C com colagenase IV (0,040 g/mL), centrifugado e o pellet ressuspendido em meio α -Mem (Gibco) suplementado com 10% SBF (Hyclone) e antibióticos.

O vetor utilizado é um sistema de expressão múltipla baseado no vetor lentiviral de terceira geração pHAGE. O cassete de expressão EF1 α -hSTEMCCA-LoxP contém um promotor interno, os transgenes (hOCT4, hSOX2, hC-MYC e hKLF4 – vetor poliscistrônico) e alguns elementos regulatórios. O promotor *EF1- α* (*Elongation factor 1 α*) (promotor forte) é um promotor constitutivo de origem humana, sendo ativo em quase todos os tipos celulares. Outros elementos presentes são um “*Rev-responsive element*” (*RRE*), essencial para o transporte dos RNA virais do núcleo para o citoplasma; sequências 5’ e 3’ *LTR* (*long terminal repeats*), necessárias para o início da transcrição reversa e integração do provírus no genoma-alvo. A região 3’ do transgene apresenta ainda um elemento regulatório do vírus da hepatite de marmota denominado *WPRE* (*woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element*) (DONELLO *et al.*, 1998) cuja presença no final 3’ do RNA aumenta a eficiência do transporte do RNA do núcleo para o citoplasma e, possivelmente, também aumenta a eficiência do processamento do RNA, assim como a poliadenilação (ZUFFEREY *et al.*, 1999; POPA *et al.*, 2002), aumentando consequentemente a produção da proteína na célula-alvo (ZUFFEREY *et al.*, 1999).

Figura 8: Esquema do vetor lentiviral comercial polistrônico *cre-excisable* EF1 α -hSTEMCCA-LoxP (OKSM) (adaptado de Millipore™). Abreviações: *LTR* long terminal repeat, *RRE* rer-responsive element, *IRES* internal ribosome entry site, *WPRE* woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element.

As células utilizadas para produção viral foram as células 293FT (Invitrogen), uma linhagem modificada que permite que a transfecção, seja feita em suspensão durante a aderência das células alvo, aumentando a eficiência de produção viral (ZHANG *et al.*, 2007; DALBY *et al.*, 2004). Estas células foram cultivadas em meio DMEM suplementado com 10% de SBF não inativado, 2,4 g/L HEPES, 3,7 g/L bicarbonato de sódio, L-Glutamina 4 mmol/L, aminoácidos não essenciais (1%), Penicilina (100 U/L) e Streptomicina (100 µg/mL) (pH 7,2). As células mesenquimais, derivadas de tecido adiposo de lipoaspirado, foram inicialmente cultivadas em meio α MEM (Gibco) suplementado com 10% de SBF, Penicilina (100 U/L), Streptomicina (100 µg/mL) e Anfotericina B (0,25 µg/mL) (pH 7,2). O vetor EF1 α -hSTEMCCA-LoxP foi inserido na célula 293FT através de co-transfecção com 5 plasmídeos, 3 vetores que codificam para as proteínas do capsídeo Gag-Pol, Rev e Tat (HDM-Hgpm2, RC-CMV-REV, HDM-TAT) e o vetor para o envelope viral (HDM-VSV-G), que codifica para a glicoproteína G do vírus da estomatite vesicular.

Para produção das partículas virais, as células 293FT foram transfectadas com a mistura de DNA contendo os 5 plasmídios através de lipossomos, utilizando-se *Lipofectamine*TM 2000 (Invitrogen), de acordo com as recomendações do fabricante. *Lipofectamine*TM 2000 é o preparado comercial de lipossomos catiônicos que se unem com moléculas de ácidos nucleicos, permitindo que elas ultrapassem a barreira eletrostática da membrana celular por endocitose e adentrem à célula. A carga positiva da superfície do lipossomo gera uma interação eletrostática com ácidos nucleicos e a formação do complexo facilita o contato com a membrana celular negativamente carregada.

Os sobrenadantes virais foram coletados a partir de 24 horas após a transfecção, e por mais 2 vezes consecutivas 48h e 72h após a transfecção. O volume total foi filtrado através de filtros de poro 0,45 µm (Millipore) e concentrados por ultracentrifugação em centrífuga Beckman por 1 hora e 40 minutos a 48.960xg (em rotor SW28).

Um dia antes da transdução, as células mesenquimais foram plaqueadas a 1×10^5 células/poço em placa de 6 poços. Um volume de 50 µL do sobrenadante viral concentrado foi adicionado nas células mesenquimais juntamente com polibreno (6 µg/mL) e incubados *overnight* a 37°C com 5% de CO₂ e 80% de umidade. Doze horas após a transdução, o meio contendo os vírus foi substituído por meio fresco. Após 6 ou 7 dias pós-transdução, as células foram retiradas por tripsinização e replaqueadas a 2×10^4 células/poço em monocamadas de MEF (fibroblastos embrionários murinos) previamente inativados mitoticamente com Mitomicina C [10 mg/mL (Sigma-Aldrich)]. A inativação do MEF é feita por 3 horas, com

meio de CTE [DMEM/F-12 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Nutrient F-12 Ham) (Gibco) suplementado com 20% de *Knockout® Serum Replacement* (Invitrogen), L-Glutamina 4 mmol/L, 1% de aminoácidos não essenciais (Invitrogen), 1:1000 β -mercaptoetanol (Invitrogen), D(+)-glicose (4,5 g/L), Penicilina (100 U/L) e Streptomicina (100 μ g/mL), 4 ng/mL de β FGF (Invitrogen) e 1 mmol/L de ácido valpróico (VPA) (pH 7,2) (Stemgent). O meio era trocado diariamente e, após 7 dias, o meio adicionado na troca de meio passa a ser um meio condicionado suplementado com β FGF e VPA (1 mmol/L), pois após cerca de 7 dias, as células alimentadoras diminuem a secreção de citocinas necessárias para a manutenção das células em reprogramação. Esse meio é produzido de acordo com o protocolo da Stemgent®; resumidamente, aproximadamente 4×10^5 células (MEF) por poço de placa de 6 poços são plaqueadas sobre uma camada de gelatina e, 24 horas depois, são inativadas mitoticamente mediante tratamento com Mitomicina C [10 mg/mL (Sigma-Aldrich)]. Após 24 horas, meio de CTE é adicionado e essas células são incubadas a 37°C, 5% de CO₂ por 24 horas. No dia seguinte, o meio é coletado, filtrado em filtro de poro 0,22 μ m (Millipore) e estocado a -20°C. Meio fresco é adicionado sobre a MEF e incubado novamente por 24 horas, a 37°C, 5% de CO₂ para nova coleta. Esse procedimento é realizado por no máximo 7 coletas.

Após aproximadamente 20 dias de indução *in vitro*, colônias foram morfológicamente selecionadas e repicadas manualmente para poços individuais (clones iPS). A partir do segundo repique, as passagens foram realizadas semanalmente. As colônias foram analisadas quanto à morfologia, expressão gênica e de fosfatase alcalina, formação de corpos embrióides (EB) e diferenciação *in vitro*.

Para a manutenção de estoques das células geradas, as células *iPS* 4FT foram congeladas utilizando um protocolo com dois meios de congelamento, em duas etapas. O meio de congelamento A, composto por 50% DMEM/F-12 + 50% *Knockout® Serum Replacement* foi adicionado nos tubos de congelamento (cerca de 500 μ L/tubo); em seguida, as células são adicionadas a esse meio e o meio de congelamento B, composto por 80% DMEM/F-12 + 20% DMSO é adicionado e homogeneizado cuidadosamente. Os tubos são congelados a -80°C em *container* de polietileno de alta densidade (Nalgene® Mr.Frosty), que congela a uma taxa de 1°C/minuto, preservando melhor a célula.

4.2.2.2 qPCR

Células mesenquimais antes da transdução (controle), após 6 a 7 dias de transdução (maior expressão do vetor exógeno) e após um mínimo de 20 dias de cultivo foram submetidas à análise de expressão gênica dos genes relacionados à pluripotência *OCT4*, *SOX2* e *NANOG*. Para tal, os cultivos foram tripsinizados, as células foram lavadas com PBS (tampão fosfato salino), o sobrenadante retirado e o pellet estocado à -80°C até a realização da extração do RNA. O RNA total das amostras foi isolado pelo método de *TRIzol Reagent* (Invitrogen) modificado, com a utilização de acrilamida linear (Ambion). A quantificação dos ácidos nucleicos foi realizada através de leitura em espectrofotômetro (*Nanodrop-Spectrophotometer* ND-1000).

O kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems) foi utilizado para a conversão do RNA total em cDNA. A quantificação do cDNA foi realizada utilizando-se a metodologia de PCR quantitativo qPCR) no equipamento *OneStep* (Applied Biosystems). Os *primers* utilizados para avaliar a expressão dos genes alvo foram desenhados com o programa *Primer Express* (Applied Biosystems) a partir de sequências obtidas do banco de dados do *GenBank* (www.ncbi.nlm.nih.gov). Os transcritos alvo foram os genes *OCT4*, *SOX2* e *NANOG*, candidatos a possuírem grande importância na reprogramação e pluripotência, e como controle endógeno foi utilizado o gene constitutivo 18S.

Foram realizadas curvas de referência dos genes, a eficiência de cada gene foi analisada, e a quantificação de cDNA das amostras foi avaliada utilizando o método de $2^{-\Delta\Delta CT}$ (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001), baseado em duplicatas.

As sequências dos oligonucleotídeos iniciadores estão descritas na Tabela 1.

Tabela 1: Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados.

Nome	Sequência 5'-3'
Oct4_FWD	CAGGCCCGAAAGAGAAAGC
Oct4_REV	CGGGCACTGCAGGAACA
Nanoghum_FWD	CCAAAGGCAAACAACCCACTT
Nanoghum_REV	CGGGACCTTGTCTTCCTTTT
Sox2_FWD	TGCGAGCGCTGCACAT
Sox2_REV	TCATGAGCGTCTTGGTTTTCC

18S_FWD	CCTGCGGCTTAATTTGACTC
18S_REV	CTGTCAATCCTGTCCGTGTC

4.2.2.3 Fosfatase alcalina

A coloração com fosfatase alcalina foi realizada com o kit de detecção de fosfatase alcalina “*Leukocyte Alkaline Phosphatase Kit*” (Sigma), de acordo com as instruções do fabricante. Altos níveis de expressão de fosfatase alcalina indicam células indiferenciadas com potencial de autorrenovação. Células coradas em rosa avermelhado foram classificadas como positivas (DA SILVA *et al.*, 2011).

4.2.2.4 Formação de corpos embrióides (EB)

As células iPS 4FT foram repicadas e os grumos celulares foram transferidos para uma placa de 6 poços previamente coberta com agarose 0,6% autoclavada, em meio de CTE sem β FGF por 48-60h. Após a cultura em suspensão, os EB foram recuperados através da utilização de estereomicroscópio e plaqueadas em poços previamente cobertos com gelatina 0,1% para indução da diferenciação *in vitro* espontânea. Os EB foram cultivados em gelatina para aderência por pelo menos 6 dias em meio específico [DMEM/F12 contendo 20% de SBF, L-glutamina 4 mmol/L e Penicilina (100 U/L)/Streptomicina (100g/mL) pH 7,2].

4.2.3 Condições gerais para cultura de células

Todas as células (TSM, iPS 4FT, mesenquimais, fibroblastos CCD27SK, 293T e 293FT) foram cultivadas em estufa úmida a 37°C e 5% CO₂. Meio de cultura adequado para cada tipo celular (Tabela 2) e PBS (Tampão fosfato-salino: NaCl 137mmol/L + KCl 2,7 mmol/L + Na₂HPO₄ • 2H₂O 10 mmol/L + KH₂PO₄ 2 mmol/L; pH 7,4) foram usados pré-

aquecidos a 37°C. Para a contagem das células foi utilizada a câmara de Neubauer e a solução de Turk (ácido acético a 3% e 0,1 mg/mL de violeta de genciana).

Tabela 2: Relação dos meios utilizados e pH para cada tipo celular.

Células	Meio de Cultura	pH
Célula TSM	mTeSR™ 1	7,3
iPS 4FT	DMEM/F-12 + 20% Knockout® Serum Replacement + L-Glutamina 4 mmol/L + 1% Aminoácidos não essenciais + Penicilina (100 U/L) /Streptomicina (100 µg/mL) + βFGF (4 ng/mL)	7,2
293T	DMEM + 10% SBF + L-Glutamina 4 mmol/L + Penicilina (100 U/L) /Streptomicina (100 µg/mL)	7,2
293FT	DMEM + 10% SBF + L-Glutamina 4 mmol/L + 1% Aminoácidos não essenciais + Penicilina (100 U/L)/Streptomicina (100 µg/mL)	7,2
CCD27SK	DMEM + 10% SBF + L-Glutamina 4 mmol/L + Penicilina (100 U/L)/Streptomicina (100 µg/mL)	7,2
Mesenquimal	αMEM + 10% SBF + Penicilina (100U/L)/Streptomicina (100 µg/mL) + Anfotericina B (0,25 µg/mL)	7,2

A tripsinização das células para o plaqueamento consistiu em primeiro lavar as células com PBS e posteriormente, incubar em estufa úmida com solução Tripsina-EDTA [0,25% tripsina - 0,02% EDTA (*Ethylenediamine tetraacetic acid*)]. Após alguns minutos as células começaram a desprender e foram delicadamente agitadas para obtenção de uma solução com células isoladas. A tripsina foi inativada pela adição de meio apropriado para a célula com 10% de SBF, as células foram sedimentadas por centrifugação e meio de cultura fresco foi adicionado ao *pellet*.

Para os descongelamentos, os tubos foram incubados a 37°C por alguns minutos, as células foram postas em meio pré-aquecido e centrifugadas por 10 minutos a 200xg. O pellet de células foi transferido para frascos de cultura com meio fresco e incubadas em estufa úmida.

4.2.4 Isolamento de clones para análise de integração

As análises de integração lentiviral para caracterização do padrão de integração lentiviral foram realizadas nas 2 linhagens de células *iPS*. Foram isolados e expandidos 5 clones de TSM e 5 clones de *iPS* 4FT. Esses 5 clones foram isolados aleatoriamente da placa inicial de *iPS* através do repique utilizando uma ponteira. O meio era trocado por meio fresco antes do repique, e a colônia retirada, sugada juntamente com o meio, e colocada sobre uma camada de *Matrigel*TM ou MEF previamente inativada. Essas colônias foram expandidas para obtenção de maiores quantidades de DNA para as análises de integração.

4.3 Análise do perfil de integração lentiviral por LM-PCR

Para a caracterização do padrão de integração dos vetores lentivirais nas células TSM e *iPS* 4FT foi utilizada a técnica de LM-PCR (Ligação Mediada por PCR) (LAUFS *et al.*, 2003) (Figura 9). Esta técnica permite rastrear o local de integração do vetor no genoma hospedeiro pelo sequenciamento do produto de PCR obtido após a ligação de uma sequência adaptadora (*linker*) ao DNA genômico. Este foi previamente digerido com as enzimas de restrição *Mse*I, para criar um sítio de ligação com o *linker*, e *Sac*I, cujo sítio está no vetor lentiviral a montante do sítio de inserção. Assim, construímos uma biblioteca de DNA, e os produtos foram sequenciados e analisados para caracterização da integração. Essa técnica, padronizada pelo nosso grupo (RUSSO-CARBOLANTE *et al.*, 2011), consiste de várias etapas experimentais que serão detalhadas a seguir.

Figura 9: Esquema da LM-PCR. Técnica que permite determinar o sítio de integração através da localização do local de inserção pelo sequenciamento do produto de PCR obtido após a ligação de uma sequência adaptadora (*linker*) ao DNA genômico, previamente digerido com enzimas de restrição específicas que criam um sítio de ligação com o *linker* sintético e impede a amplificação de um fragmento interno viral 5' *LTR*.

4.3.1 Extração de DNA genômico

Cerca de 1×10^7 células de cada um dos clones foram submetidas a extração de DNA genômico, utilizando o kit *Wizard® SV Genomic DNA Purification System* (Promega) ou o *Blood & Cell Culture DNA Mini Kit* (Qiagen), de acordo com as instruções do fabricante. Após a extração, o DNA foi quantificado em espectrofotômetro (*Nanodrop-Spectrophotometer ND-1000*) a 260 nm.

4.3.2 Digestão do DNA genômico com enzimas de restrição

O DNA genômico foi digerido com as enzimas de restrição *MseI* e *SacI* (New England Biolabs). A enzima *MseI* reconhece um sítio muito comum e amplamente distribuído no genoma humano (5'... T/TAA... 3'; 3'... AAT/T... 5'). Essa digestão cria sítios de ligação para o *linker*. A enzima *SacI* é utilizada para evitar a amplificação de um fragmento interno viral 5'*LTR*, diminuindo a amplificação inespecífica.

Para a reação de digestão foram utilizados 4 µg de DNA, 5 µL de Tampão 10X da enzima, 0,5 µL de BSA 100X, 2 µL da enzima *MseI* (10.000 U/mL) e 1,5 µL da enzima *SacI* (20.000 U/mL), e água milli-Q para completar o volume de 50 µL. A reação foi incubada por 16 horas a 37°C e, em seguida, foi realizada a inativação das enzimas de restrição, incubando-se a reação a 60°C por 20 minutos.

4.3.3 Precipitação do DNA com Acetato de Amônio

Para a purificação do DNA digerido pelas enzimas de restrição, foi realizado uma precipitação com acetato de amônio. Inicialmente, foi adicionado TE (Tris-HCl 10 mmol/L, *EDTA* 1 mmol/L) pH 8,0 à reação de digestão até completar o volume para 100 µL. Em seguida, adicionou-se 100 µL de Fenol *Buffer* Saturado (Invitrogen) e 100 µL de Clorofórmio 100%, para eliminar as enzimas. A reação foi homogeneizada em *vortex* e centrifugada a 16.000xg durante 10 minutos. Após a centrifugação, a fase aquosa, que contém o DNA digerido, foi coletada e transferida para um tubo novo. Em seguida, adicionou-se ao DNA 66,5 µL de Acetato de Amônio 7,5 mol/L, 1,5 µL de Glicogênio (20 mg/mL) e 500 µL de etanol 100%. A reação foi incubada a -20°C *overnight*, e centrifugada a 16.000xg, 4°C por 30 minutos para sedimentar. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado duas vezes com etanol 70%. Após a secagem por 30 minutos, o DNA foi ressuspendido em 30 µL de TE.

4.3.4 Preparo da sequência oligo-adaptadora (*linker*) e ligação ao DNA

O *linker*, uma sequência adaptadora de oligonucleotídeos, se liga na extremidade do DNA previamente digerido com a enzima de restrição *MseI*. Para a preparação do *linker* foram utilizados 240 pmols do oligonucleotídeo *linker forward* (5'-GTAATACGACTCACTATAGGGCTCCGCTTAAGGGAC-3') e 240 pmols do oligonucleotídeo *linker reverse* (5' PO₄-TAGTCCCTTAAGCGGAG - NH₂-3'), em um volume final de 59,29 µL. A reação foi colocada em termociclador a 95°C por 3 minutos e, após esse período, foi feita uma programação para diminuir a temperatura 1°C por minuto até atingir 4°C. Alíquotas de 5,5 µL foram armazenadas a -20°C.

Após o preparo do *linker*, a reação de ligação foi realizada com 4 µg do DNA digerido juntamente com 5,5 µL do *linker*, 1 µL da enzima T4 DNA Ligase (1 U/µL) (Invitrogen), 4 µL de Tampão 5X da enzima e água milli-Q para um volume final de 20 µL. A reação foi incubada a 16°C *overnight*.

4.3.5 Primeira Reação de PCR e *Nested PCR*

A primeira reação de PCR foi realizada com 0,8 µg do DNA ligado ao a sequência adaptadora, 10 pmoles do *primer* para a sequência adaptadora AP-1 (5'-GTAATACGACTCACTATAGGGC-3'), 10 pmoles do primer *MseI* 5' HIVLTR (5'-AGTGCTTCAAGTAGTGTGTGCC-3'), 2 µL de dNTP a uma concentração de 10 mM, 5 µL de Tampão 10X (200 mmol/L tris pH 8,4, 500 mmol/L KCl) da enzima, 1,5 µL de MgCl₂ (50 mmol/L) e 1,5 µL da enzima Taq DNA Polimerase [5 U/µL (Invitrogen)]. A reação foi ciclada no Termociclador *MyCycler® Thermal Cycler* (BIO-RAD) utilizando o programa de amplificação: 95°C por 2 minutos; 25 ciclos de 95°C por 25 segundos, 55°C por 30 segundos e 72°C por 35 segundos; 72°C por 5 minutos.

O produto da primeira reação de PCR foi diluído na proporção de 1:50 e 1 µL dessa solução foi utilizado na reação de *Nested PCR*. Essa reação foi realizada utilizando-se os mesmos parâmetros da primeira reação, porém os *primers* utilizados foram AP-2 (*Linker nest*

primer: 5'- AGGGCTCCGCTTAAGGGAC -3) e *primer MseI Nest* 5'HIVLTR (5'- GTCTGTTGTGTGACTCTGGTAAC -3').

4.3.6 Clonagem no vetor de sequenciamento

A clonagem para sequenciamento foi realizada no vetor *pCR[®]2.1-TOPO[®]* (Invitrogen) e no vetor *pGEM[®]-T Easy* (Promega), de acordo com as recomendações do fabricante. A Tabela 3 mostra os detalhes de cada reação.

Tabela 3: Detalhes das reações de ligação nos vetores de clonagem para sequenciamento.

Vetor TOPO[®]	1 µL	Vetor pGEM[®]-T Easy	1 µL
Produto de PCR	4 µL	Produto de PCR	3 µL
Solução Salina	1 µL	2X Rapid Ligation Buffer	5 µL
H ₂ O Milli-Q	—	T4 DNA Ligase	1 µL
Volume Final	6 µL	Volume Final	10 µL
Incubar a temperatura ambiente por 30 minutos.		Incubar a 4°C <i>overnight</i> .	

4.3.7 Transformação bacteriana e expansão clonal

As reações de ligação entre vetor e produto de PCR foram utilizadas para transformar bactérias competentes DH10β. A transformação foi realizada incubando a mistura DNA e bactéria em gelo por 30 minutos, seguido de choque térmico a 42°C por 1 minuto e 5 minutos no gelo. Em seguida, foi adicionado meio SOC (20 mmol/L Glicose e meio SOB contendo 1 mmol/L MgCl₂, 1 mmol/L MgSO₄; pH 7,0) e incubado por 1 hora a 37°C sob agitação. Após 1 hora, as bactérias transformadas foram plaqueadas em placas de Petri com meio de cultura LB-Ágar e antibiótico ampicilina (Sigma-Aldrich) a uma concentração final de 0,1 mg/mL, com a finalidade de selecionar as colônias contendo os plasmídeos recombinantes.

Para expansão em meio líquido, cada uma das colônias de bactéria transformadas foram selecionadas e diluídas em 150 µL de meio LB com antibiótico ampicilina a 0,1 mg/mL em placa de 96 poços e incubadas a 37°C *overnight*. Essas bactérias são estocadas utilizando glicerol 70% e armazenadas a -80°C.

4.3.8 Sequenciamento do DNA

Para o sequenciamento dos vetores *pCR[®]2.1-TOPO[®]* e *pGEM[®]-T Easy* contendo os fragmentos do DNA de interesse, foi realizada uma reação de PCR utilizando 1 µL da expansão clonal bacteriana juntamente com 3,2 pmols do *primer M13 Forward* (5'-GTAAAACGACGGCCAG -3'), 3,2 pmols do *primer M13 Reverse* (5'-CAGGAAACAGCTATGAC -3'), 1,5 µL de dNTP a uma concentração de 1,25 mmol/L, 1,5 µL de tampão 10X da enzima (200 mmol/L tris pH 8,4, 500 mmol/L KCl), 0,45 µL de MgCl₂ (50 mmol/L) e 0,2 µL da enzima *Taq DNA Polimerase* [5 U/µL (Invitrogen)] em um volume final de 15 µL. Essa reação foi submetida a uma termociclagem no *MyCycler[®] Thermal Cycler* (BIO-RAD) com um programa de amplificação de 95°C por 3 minutos; 35 ciclos de 95°C por 40 segundos, 60°C por 40 segundos, 72°C por 55 segundos; com extensão final de 72°C por 5 minutos.

O produto dessa primeira reação de PCR para o sequenciamento foi submetido a uma segunda reação na qual 1 µL deste foi adicionado a 4 µL do *DYEnamic ET Terminator Kit* (GE Healthcare) e 3,2 pmols do *primer M13 Forward*, em um volume final de 10 µL. Esses parâmetros foram utilizados na reação com o *primer M13 Reverse*, em um volume final de 10 µL. Essas reações foram submetidas a termociclagem no *MyCycler[®] Thermal Cycler* (BIO-RAD), utilizando o programa de amplificação de 95°C por 2 minutos; 35 ciclos de 95°C por 10 segundos, 51°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. Em seguida, foi realizada uma precipitação do produto de PCR seguindo o protocolo *ABI/Isopropanol* (MERCK), para a eliminação de dNTP, ddNTP não incorporados e enzimas. As amostras foram submetidas a eletroforese no sequenciador automático *MegaBACE 1000* (GE Healthcare), (sistema de eletroforese capilar), que utiliza método de Sanger, que utiliza a química de terminação de cadeia com dideoxinucleotídeos (ddNTP). Na forma de eletroferograma, as sequências de DNA geradas foram diretamente enviadas para um computador conectado ao aparelho

sequenciador. Esses eletroferogramas foram interpretados pelo *software DNA Sequencing Analyser 4.0* e convertidos em sequências de DNA, que foram posteriormente analisadas.

4.3.9 Análise das sequências quanto ao perfil de integração

As sequências geradas foram submetidas a uma análise inicial utilizando o programa *ChromasPro*. O uso dessa ferramenta teve como finalidade selecionar apenas as sequências contendo, em uma das extremidades, a sequência adaptadora (*linker*) e, na outra extremidade, a sequência referente ao *LTR* viral. Em seguida, as sequências foram convertidas para o formato FASTA e enviadas ao banco de dados do genoma NCBI BLAST® (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) para identificação de sítios de homologia com o genoma humano. Apenas as sequências com homologia maior que 95% em relação as sequências depositadas no banco de dados foram consideradas.

As sequências pré-selecionadas foram submetidas à ferramenta pública *QuickMap*^{gtsg}, disponível no site www.gtsg.org, que fornece um mapeamento detalhado do local de inserção dos vetores lentivirais (APPELT *et al.*, 2009). Essa ferramenta permite analisar uma grande variedade de dados referentes às características genômicas da região onde houve a integração, como genes, sequências repetitivas, sítios frágeis, distância dos sítios de início de transcrição (*TSS*), distância das ilhas CpG mais próximas, entre outros, em uma distância de ± 250 Kb em torno do sítio de integração do vetor. Além disso, as fitas *plus* e *minus* foram analisadas separadamente e a distância individual de cada uma das características até a base da integração é calculada em pares de bases (Figura 10).

Figura 10: Representação da análise das regiões ao redor do sítio de integração. Os Retrovírus integram de maneira estável seus genomas (5'LTR, Transgene, 3'LTR) no genoma da célula hospedeira. Como indicado na figura, o DNA do hospedeiro é fita dupla (fitas *plus* + e *minus* -) e cada fita pode conter vários elementos genômicos tais como genes, TSS, ilhas CpG, LINE, SINE ou elementos de LTR. Os vetores podem romper esta estrutura genômica (como no caso da inserção no GENE A), ou inserir-se adjacente a esta estrutura (GENE B). Para determinar se uma sequência genômica específica é um alvo potencial de um vetor, as distâncias (D) de cada uma das características até o sítio de integração são calculadas. Para cada integração, uma variedade de informações são geradas e acumuladas (APPELT *et al.*, 2009).

Para classificar as regiões gênicas nas quais o vetor se inseriu, foram utilizadas as ferramentas públicas Gene Ontology (<http://www.geneontology.org/>) e DAVID/EASE (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>), que permite identificar os genes, suas funções biológicas, descobrir grupos de genes relacionados funcionalmente, fazer associações dos genes com

doenças, visualizar vias metabólicas relacionadas, entre outras análises (HUANG *et al.*, 2009).

4.3.10 Análises estatísticas

O teste de Qui-quadrado foi utilizado para analisar se o número de integrações observadas (io) segue uma distribuição multinomial como as integrações esperadas (ie) para os 24 cromossomos (22 autossomos, X e Y). A integração esperada foi calculada assumindo uma distribuição uniforme discreta, corrigida pela distribuição do tamanho do cromossomo [$ie = (\text{número de bases do cromossomo} / \text{número de bases do genoma}) \times \text{número total de integrações}$]. O nível α de significância utilizado foi de 0,05. Um cut-off de $(io-ie)^2/ie \geq 3$ foi utilizado para a determinação de sítios preferenciais de integração (LAUFS *et al.*, 2003).

O teste exato de Fisher foi utilizado para determinar se houveram altas representações próximas a ilhas CpG e sítios de início de transcrição, e para determinar se houve preferência por regiões gênicas.

4.4 Número de cópias inseridas

O número de cópias de cada vetor inseridas no genoma celular foi calculado através de PCR quantitativa (qPCR), por ensaio de *SYBR®Green*, uma metodologia que utiliza o *SYBR Green I dye* (Applied Biosystems) o qual detecta produto de PCR ligando-se ao DNA dupla fita formado durante uma PCR.

Para a normalização das amostras, duas curvas padrão foram criadas, uma curva do plasmídeo de interesse e uma curva para a célula utilizada. Para a obtenção da curva-padrão para o vetor foram realizadas diluições seriadas a partir de 10^6 plasmídeos até 10^1 plasmídeos, e utilizadas na reação com o *primer* para o LTR viral. A curva-padrão para o gene foi criada com a extração do DNA de 10^7 células calculando-se a concentração em pg/ μ L a partir da massa (pg) do DNA, calculada pela multiplicação do peso do genoma contido em uma célula (3,3 pg) pela concentração do DNA extraído da célula. Foram feitas diluições do DNA da

célula de 10^5 a 10^1 , e essa curva foi utilizada na reação com o *primer* para o gene endógeno β -globina (Applied Biosystems).

Os *primers* utilizados foram um par para uma sequência do LTR viral (P5 – 5'-TGCTTTTGTGCTTGTACTGGG-3'; P3 – 5'-CTAGTTACCAGAGTCACACAA-3') presente em ambos os vetores, e um par para o gene endógeno da β -globina (β -globinaF – 5'-CAACTTCATCCACGTTTCACC-3'; β -globinaR – 5'-GAAGAGCCAAGGACAGGTAC-3'), como controle endógeno. Os *primers* utilizados foram desenhados com o programa *Primer Express* (Applied Biosystems) a partir de sequências obtidas do banco de dados do *GenBank* (www.ncbi.nlm.nih.gov). A reação foi realizada com 7,5 μ L do SYBR® *Green PCR Master Mix* juntamente com 3,2 pmol do *primer* P5-LTR ou β -globinaF e 3,2 pmol do *primer* P3-LTR ou β -globinaR em um volume final de 15 μ L, sendo 2 μ L de DNA.

O número de cópias virais inseridas foi calculado para cada colônia isolada das células TSM e das células *iPS* 4FT.

Resultados

5 Resultados

5.1 Caracterização dos fibroblastos embrionários murinos

Com o estabelecimento de uma produção própria de *MEF*, essas células foram caracterizadas imunofenotipicamente (Tabela 4), para serem utilizadas no co-cultivo de células-tronco embrionárias e células *iPS*.

Tabela 4: Caracterização imunofenotípica dos fibroblastos embrionários murinos.

Marcadores	MEF 4P 03/11
AC-133	0.0
CD-34	0.34
CD-14	1.74
CD-45	0.0
CD-13	96.67
CD-49D	88.1
CD-146	81.13
CD-106	37.53
KDR	0.0
CD-31	3.46
CD-90	97.2
CD-73	91.18
SSEA-4	0.0
SSEA-3	6.44
TRA-1 60	0.0
TRA-1 81	0.0
NANOG	1.43
OCT-3	0.25
CD-44	93.25
CD-38	0.0
CD-54	96.21
CD-105	92.94
SOX2	10.64

5.2 Caracterização das células utilizadas

5.2.1 Características das células reprogramadas TSM

As células reprogramadas TSM, obtidas pela inserção dos FT TCL-1A, SOX2 e C-MYC em vetor bicistrônico, possuem uma morfologia característica, semelhante às células-tronco embrionárias (CTE) humanas (Figura 11C e D), que possuem uma característica de crescimento em colônias de células pequenas e justapostas. Essas células também expressam os antígenos de superfície embrionários SSEA-4, TRA-1-60 e TRA-1-81, e *OCT4*, expressam os genes de pluripotência *OCT4*, *SOX2* e *NANOG* em níveis maiores do que aqueles apresentados pela célula da qual se originou, o fibroblasto CCD27SK (Figura 11A), porém em níveis mais baixos do que aqueles encontrados nas hCTE (PICANÇO-CASTRO *et al.*, 2011). Essas células possuem a habilidade de formar corpos embrióides (EB), que subsequentemente se diferenciam em células das 3 camadas germinativas, demonstrado pela positividade para os marcadores Nestina, β -Tubulina III e GFAP (marcadores ectodermis), α -fetoproteína (marcador endodermal) e α -SMA (marcador mesodermal), através de ensaios de imunofluorescência (PICANÇO-CASTRO *et al.*, 2011).

Figura 11: (A) Imagem ilustrando a morfologia dos fibroblastos CCD27SK; (B) Imagem ilustrando a morfologia das CTE humanas (Imagem: PICANÇO-CASTRO *et al.*, 2011); (C) e (D) Imagens ilustrando as colônias da célula reprogramada TSM, mostrando a morfologia semelhante a hCTE, com característica de crescimento em colônias de células pequenas e justapostas. Microscopia ótica. Imagens próprias.

5.2.2 Derivação e caracterização morfológica da célula iPS 4FT

As células *iPS* 4 FT obtidas pela expressão exógena dos fatores relacionados a pluripotência OCT4, SOX2, KLF4 e C-MYC, inseridos em um único vetor poliestrônico [EF1 α -hSTEMCCA-LoxP (OKSM)] em células mesenquimais humanas derivadas de tecido adiposo (Figura 12A), apresentaram a primeira diferenciação morfológica com aproximadamente 10 dias após a inserção dos genes exógenos em seu genoma. As células mesenquimais humanas começam a se organizar em colônias com morfologia típica de CTE em aproximadamente 10 dias após a transdução e puderam ser repicadas após aproximadamente 20 dias pós-transdução (Figura 12C e D). Os cultivos transduzidos com o vetor foram acompanhados a cada dois dias através de microscopia ótica até o momento do primeiro repique, quando foram acompanhadas a cada 3 ou 4 dias para o seguimento dos repiques.

Dezesseis colônias foram selecionadas para o primeiro repique clonal (uma colônia por poço). Destas, cinco colônias continuaram sendo cultivadas.

Figura 12: (A) Imagem mostrando a morfologia da célula mesenquimal humana derivada de tecido adiposo; (B) Imagem mostrando a morfologia das CTE humanas (Imagem: PIKANÇO-CASTRO *et al.*, 2011); (C) e (D) Imagens das células *iPS* 4FT cultivadas sobre *MEF*, mostrando a morfologia semelhante a CTE, com característica de crescimento em colônias de células pequenas e justapostas. Microscopia ótica. Imagens: Fabiana Fernandes Bressan.

5.2.2.1 qPCR

Quando as linhagens de iPS 4FT (Colônias 1, 2, 3, 4 e 5) são comparadas entre as passagens 10 a 15 com a hAdMSC não modificada, pode-se perceber um aumento não somente na expressão de OCT4 e SOX2 total (Figura 13A e 13B), mas também na produção de NANOG endógeno (Figura 13C), indicando que as colônias de iPS reprogramaram seu genoma à pluripotência. Na colônia isolada 1 de iPS 4FT, houve um aumento na expressão de OCT4 de aproximadamente 750X (Figura 13A), e na expressão de SOX2 de aproximadamente 1100X (Figura 13B), expressão relativa comparada com a célula não modificada. Na mesma colônia isolada 1, observamos também um aumento na produção de NANOG endógeno, de aproximadamente 1000X (Figura 13C).

Figura 13: Gráficos representando a expressão relativa de OCT4 (A), SOX2 (B) e NANOG (C), obtida por PCR quantitativo, em linhagens de iPS 4FT quando comparadas com a célula hAdMSC não modificada, em unidades arbitrárias.

Observamos também que a expressão de SOX2 manteve um padrão similar à expressão de NANOG quando colônias são comparadas entre si, sugerindo que a regulação gênica de ambos deve estar intrinsicamente interligada.

5.2.2.2 Coloração com fosfatase alcalina

As células iPS 4FT demonstraram uma alta expressão de fosfatase alcalina, indicando se tratar de uma célula indiferenciada com potencial de autorrenovação. Quando as células iPS fixadas são coradas, as células indiferenciadas tornam-se vermelhas ou roxas. A atividade da fosfatase alcalina foi observada para as 5 linhagens de iPS 4FT (Figura 14).

Figura 14: Colônias de iPS 4FT marcadas com fosfatase alcalina, indicando tratar-se de células indiferenciadas com potencial de autorrenovação.

5.2.2.3 Formação de corpos embrióides (EB)

As células iPS 4FT foram capazes de formar estruturas esféricas denominadas corpos embrióides (EB), quando cultivadas em condições específicas. Os EB são estruturas esféricas formadas *in vitro* a partir de células pluripotentes, as quais abrigam o desenvolvimento de diversos tipos celulares e tecidos. A formação de EB mostrou-se eficiente nas cinco linhagens de células iPS 4FT estudadas (Figura 15), demonstrando o potencial pluripotente *in vitro* dessas células. Após a formação dos EB, as células foram cultivadas em gelatina para aderência e diferenciação espontânea (Figura 16).

Figura 15: Formação de EB em quantidade e definidos após 3 dias de cultivo. Microscopia ótica, 10X.

Figura 16: Imagens ilustrando a alteração morfológica *in vitro* das células iPS 4FT. Microscopia ótica. Imagens: Fabiana Fernandes Bressan.

5.3 LM-PCR

5.3.1 Digestão e precipitação do DNA genômico

Os DNAs dos clones das células reprogramadas TSM e iPS 4FT foram extraídos e quantificados. Após a digestão do DNA genômico com as enzimas de restrição *MseI* e *SacI* e precipitação com acetato de amônio, foi realizada uma eletroforese em gel de agarose 1%, utilizando-se 6 μ L da amostra, para avaliar a qualidade do DNA. Foi possível observar um rastro referente a um conjunto de bandas sobrepostas, devido a característica da enzima *MseI* que corta o DNA em vários fragmentos pequenos (Figura 17).

Figura 17: Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio mostrando o DNA genômico digerido com as enzimas *MseI* e *SacI* e precipitado com acetato de amônio. (M) Marcador 100 pb (Axygen); (1) DNA extraído e digerido uma colônia isolada de TSM; (2) DNA extraído e digerido de uma colônia isolada de *iPS* 4FT.

5.3.2 Primeira Reação de PCR e *Nested* PCR

O DNA digerido foi ligado a uma sequência adaptadora e submetido a ampliações com 2 conjuntos de *primers*, um que reconhece um fragmento mais externo da sequência e outro que reconhece um fragmento mais interno (*Nested*), das regiões do LTR viral e da sequência adaptadora.

Após a realização das duas reações de PCR, foi realizada uma eletroforese em gel de agarose 1%, no qual foi possível observar um rastro referente a um conjunto de bandas (Figura 18).

Figura 18: Eletroforese em gel de agarose 1% do produto da reação de *Nested* PCR do DNA digerido de 2 colônias da célula reprogramada TSM e de 2 colônias isoladas de *iPS* 4FT com os *primers* para o LTR viral e para a sequência adaptadora (*linker*), utilizados para a

amplificação da região de inserção do lentivírus no genoma humano. (M) Marcador 100 pb (Axygen); (1) e (2) Produto de PCR do DNA das colônias de TSM; (3) e (4) Produto PCR do DNA das colônias de *iPS* 4FT; (5) Controle negative da reação.

5.3.3 Sequenciamento do DNA

Os produtos dessas PCR que amplificaram as diversas junções de integração do vetor lentiviral foram clonados em vetor *pCR[®]2.1-TOPO[®]* (Invitrogen) ou *pGEM[®]-T Easy* (Promega). Os vetores recombinados foram usados para transformar bactérias DH10 β , das quais foram realizadas reações de PCR para amplificação dos fragmentos clonados. Os produtos foram submetidos a eletroforese para visualizar a amplificação (Figura 19).

Figura 19: Géis de eletroforese representativos da confirmação da presença do inserto no vetor de sequenciamento. Como mostrado na figura, os fragmentos são de diferentes tamanhos, devido a geração de fragmentos de DNA de diferentes tamanhos pela digestão. (A) Gel de eletroforese da PCR de uma colônia isolada de célula reprogramada TSM; (M) Marcador 100 pb (Axygen); (B) Gel de eletroforese da PCR de uma colônia isolada de *iPS* 4 FT; (M') Marcador ϕ X174 (Invitrogen).

5.4 Perfil de Inserção Lentiviral

As amostras que mostraram amplificação de fragmentos clonados foram submetidas ao sequenciamento para determinação do perfil de inserção lentiviral no genoma hospedeiro.

5.4.1 Perfil de integração cromossômico

Foram sequenciadas 546 amostras da célula reprogramada TSM e, dentre estas, 341 sequências apresentaram identidade com o genoma humano. Para a iPS 4FT, 465 amostras foram sequenciadas e, destas, 365 sequências apresentaram homologia com o genoma humano. Dentre as sequências que não apresentaram homologia, observou-se que estas continham apenas uma pequena sequência referente ao vetor lentiviral ou eram muito pequenas, impossibilitando uma análise acurada.

Nesse estudo foram selecionados apenas as sequências que apresentavam, em uma das extremidades, a sequência correspondente ao *LTR* viral e, na outra extremidade, a sequência adaptadora (*linker*).

Após essa primeira triagem, as sequências de DNA foram submetidas a uma análise mais detalhada utilizando a ferramenta *QuickMap^{gts}* (APPELT *et al.*, 2009), que classifica as sequências inicialmente quanto a ambiguidade, considerando sequências “verdadeiras” como aquelas que possuem homologia com apenas um local do genoma humano, ou como sequências “falsas” quando as sequências apresentam ambiguidade, ou seja, possuem homologia com mais de um local no genoma humano. Na célula reprogramada TSM, das 341 sequências submetidas a análise, 176 foram consideradas “verdadeiras” e as 165 restantes foram consideradas ambíguas. Na célula *iPS* 4FT, das 369 sequências submetidas a essa análise, 255 foram consideradas “verdadeiras” e as 114 sequências restantes foram consideradas ambíguas (Tabela 5).

Tabela 5: Dados sobre o número de sequências analisadas.

	Célula TSM	Célula <i>iPS</i> 4FT
Clones de bactérias sequenciados	546	465
Sequências homólogas ao genoma humano	341	369
Sequências “verdadeiras”	176	255
Sequências ambíguas	165	114

Clones considerados “verdadeiros” foram caracterizados quanto ao sítio de integração cromossômico. As sequências dos clones gerados da célula reprogramada TSM mostram as integrações ocorreram em 23 dos 24 cromossomos diferentes, e os cromossomos que tiveram frequências relativamente altas (≥ 5 cópias) de eventos de integração foram o cromossomo 1 (9%), seguido dos cromossomos 4 e 6 (7,4%). Na célula *iPS* 4FT, as inserções afetaram 23 dos 23 cromossomos diferentes (célula XX), com o cromossomo 1 também como o mais afetado (9%), seguido dos cromossomos 6 (7,8%) e 11 (7,4%) (Figura 21).

Figura 20: Gráfico demonstrando as porcentagens de integrações cromossômicas observadas do vetor pLenti-cPPT-CIGWS na célula TSM (azul) e do vetor EF1α-hSTEMCCA-LoxP na *iPS* 4FT (vermelho). A seta indica o cromossomo mais afetado em ambas as células.

Analisando cada colônia de célula reprogramada TSM isolada separadamente, observamos que nos clones da célula TSM, a colônia 1 teve 15 dos seus 24 cromossomos atingidos, com uma maior frequência nos cromossomos 6 (18%) e 3 (14%). Na colônia 2, 14 dos 24 cromossomos foram atingidos, com integrações mais frequentes no cromossomo 13 (12,5%). Na colônia 3, o vetor integrou em 18 dos 24 cromossomos, atingindo o cromossomo 9 com mais frequência (8%). Já a colônia 4 teve 17 dos 24 cromossomos atingidos, com uma frequência maior nos cromossomos 1 (13%) e nos cromossomos 3 e 6 (11%). E na colônia 5, 18 dos 24 cromossomos tiveram alguma integração do vetor, com os cromossomos 2 (13%) e 1 (11%) como os cromossomos mais frequentemente atingidos (Figura 21).

Figura 21: Porcentagem de integrações do vetor pLenti-cPPT-CIGWS ocorridas em cada cromossomo de cada colônia isolada da célula TSM.

Nos clones da célula *iPS* 4FT, a colônia 1 teve 18 dos seus 23 cromossomos atingidos, com uma maior frequência nos cromossomos 1 e 11 (10%). Na colônia 2, 20 dos 23 cromossomos foram atingidos, com integrações mais frequentes nos cromossomos 11 (14%) e 17 (10%). Na colônia 3, o vetor integrou em 16 dos 23 cromossomos, atingindo o cromossomo 3 com mais frequência (16%). A colônia 4 teve 19 dos 23 cromossomos atingidos, com uma frequência maior nos cromossomos 1 e X (11%). Na colônia 5, apenas 1

cromossomo não teve nenhuma integração do vetor, com o cromossomo 1 (12,5%) como o cromossomo mais frequentemente atingido (Figura 22).

Figura 22: Porcentagem de integrações do vetor EF1 α -hSTEMCCA-LoxP ocorridas em cada cromossomo de cada colônia isolada da célula *iPS* 4FT.

A análise estatística do número das integrações observadas *versus* o número de integrações esperadas é dada pelo *RISC* (Estimativa de Inserção Retroviral nos Cromossomos). O *RISC* é um teste qui quadrado (χ^2), utilizado para comparar o número de integrações observadas (oi) com o número de integrações esperadas, que são computadas assumindo uma distribuição uniforme, mas também corrigindo para a distribuição de acordo com o tamanho dos cromossomos [$(oi - ei)^2/ei \geq 3$, sendo que quando $oi < ei$, o *RISC* é negativo] (LAUFS *et al.*, 2003). A distribuição cromossômica das 176 sequências não-ambíguas das junções do vetor e do DNA genômico da célula TSM e das 255 sequências da *iPS* 4FT, mostrada na Figura 23, revelou que as integrações estão distribuídas uniformemente nos cromossomo humanos, demonstrando preferência por cromossomos específicos. O vetor pLenti-cPPT-C(FT)IGWS apresentou uma preferência pelos cromossomos 20 (*RISC*: 8,34), 16 (*RISC*: 4,70) e 17 (*RISC*: 4,41). O vetor EF1 α -hSTEMCCA-LoxP, apresentou uma preferência pelos cromossomos 11 (*RISC*: 5,60), 15 (*RISC*: 5,40) e 17 (*RISC*: 4,51) (Figura 23).

Figura 23: Distribuição esquemática das integrações dos vetores lentivirais, mostrando a média do *RISC* (estimativa de inserção retroviral nos cromossomos) dado por $(oi - ei)^2/ei \geq 3$ (LAUFS *et al.*, 2003). No caso de integração randômica, um *RISC* de 0 seria esperado.

A estimativa de inserção (*RISC*) foi realizada em cada colônia isolada da célula TSM, e mostrou uma preferência pelo cromossomo 6 (*RISC* = 6,3) na colônia 1, pelos cromossomos 13 (*RISC* = 5) e 20 (*RISC* = 4,7) na colônia 2, e pelo cromossomo 20 (*RISC* = 6,8) na colônia 3 (Figura 24).

Na iPS 4FT, o *RISC* mostrou preferência pelos cromossomos 11 (*RISC* = 10,3) e 17 (*RISC* = 10,4) na colônia 2, pelo cromossomo 3 (*RISC* = 5,4) na colônia 3 e pelo cromossomo X na colônia 4 (4,1) (Figura 25).

Figura 24: Distribuição esquemática das integrações do vetor lentiviral pLenti-cPPT-C(FT)IGWS, mostrando a média do *RISC* (estimativa de inserção retroviral nos cromossomos) dado por $(oi - ei)^2/ei \geq 3$ (LAUFS *et al.*, 2003). No caso de integração randômica, um *RISC* de 0 seria esperado.

Figura 25: Distribuição esquemática das integrações do vetor lentiviral EF1 α -hSTEMCCA-LoxP, mostrando a média do *RISC* (estimativa de inserção retroviral nos cromossomos) dado por $(oi - ei)^2/ei \geq 3$ (LAUFS *et al.*, 2003). No caso de integração randômica, um *RISC* de 0 seria esperado.

5.4.2 Frequência de integração lentiviral perto de Sítios de Início de Transcrição (TSS)

A alta preferência de integração de alguns retrovírus, como *MLV*, próximo a *TSS* e ilhas CpG tem sido descrito como sendo um fator contribuinte para a sua alta genotoxicidade (KIM *et al.*, 2008). Apesar dos vetores utilizados serem de 3ª geração e se auto-inativarem quando inseridos na material genético da célula, os transgenes possuem promotores internos fortes derivados do *CMV*, que podem ativar genes próximos levando a alterações no perfil de expressão da célula receptora.

A porcentagem de integrações mapeadas na célula TSM e na *iPS* 4FT que atingiram alguma região dentro de uma distância de 5 Kb (*upstream* ou *downstream*) de um *TSS* foi de apenas 3% para ambas as células. A porcentagem de integração que atingiu alguma região dentro de uma distância de 30-60 Kb *downstream* ou *upstream* do gene alvo foi 28,4% e 22,6% para as células TSM e *iPS* 4FT, respectivamente. A maior frequência de integração ocorreu muito distante de *TSS*, acima de 100 Kb (*upstream* ou *downstream*) de distância em ambas as células, com 65,5% e 71,4% para as células TSM e *iPS* 4FT, respectivamente (Figura 26). A análise estatística confirmou que ambos os vetores apresentam preferência por locais distantes dessas regiões de *TSS* ($p < 0,0001$).

Figura 26: Frequência de sítios de integração próximos a sítios de início de transcrição (*TSS*). A porcentagem de integração entre cada intervalo de Kb é mostrada para o vetor pLenti-cPPT-C(FT)IGWS na célula reprogramada TSM e para o vetor EF1 α -hSTEMCCA-LoxP na célula *iPS* 4FT.

5.4.3 Frequência de integração lentiviral próximo a ilhas CpG

Ilhas CpG são regiões do genoma humano ricas no dinucleotídeo CpG, os quais não são metilados e frequentemente estão associadas com regiões regulatórias, como promotores que são transcripcionalmente ativos em diferentes estágios do desenvolvimento e podem também estar associadas com origens de replicação (ANTEQUERA & BIRD, 1999).

Nós analisamos a distância das integrações das ilhas CpG mais próximas (Figura 27). Considerando que a integração do vetor afeta as fitas *plus* e *minus* do DNA e que cada uma das fitas apresenta uma região *upstream* e outra *downstream*, das 176 integrações do vetor lentiviral pLenti-cPPT-C(FT)IGSW, 260 ilhas CpG foram afetadas na célula TSM, e das 251 integrações do vetor EF1 α -hSTEMCCA-LoxP, 350 ilhas CpG foram afetadas na *iPS* 4FT.

Na célula reprogramada TSM, 134 inserções ocorreram dentro de 60 Kb de distância das ilhas CpG mais próximas e, na *iPS* 4FT, 175 inserções. Destas, 53% ocorreram *upstream* e 47% *downstream* na célula TSM e 50% ocorreram *upstream* e 50% *downstream* nas *iPS* 4FT. Nas duas células, a maioria das integrações ocorreram distantes das ilhas CpG (> 1 Kb), calculado em 100% para as células TSM e 99,7% para as *iPS* 4FT. Entretanto, 8,8% das integrações nas células TSM e 8,3% nas *iPS* 4FT ocorreram dentro de ± 5 Kb de distância das ilhas CpG, frequências superiores aquelas obtidas de um conjunto de dados de uma simulação randômica, no qual 5,3% de 10.000 integrações simuladas atingiram regiões dentro de ± 5 Kb de distância da ilha CpG mais próxima (WINKLER *et al.*, 2010). Entretanto, a análise estatística não demonstrou significância [$p = 0,1717$ (TSM); $p = 0,1778$ (*iPS* 4FT)], de maneira que ambos os vetores utilizados não possuem preferência por ilhas CpG.

Figura 27: Frequência de inserções próximas a ilhas CpG. As porcentagens de integração entre cada intervalo de Kb são mostradas para o vetor pLenti-cPPT-C(FT)IGWS na célula reprogramada TSM e para o vetor EF1 α -hSTEMCCA-LoxP na célula *iPS* 4FT.

5.4.4 Frequência de integração em regiões gênicas do genoma

Vários estudos demonstraram uma preferência do lentivírus por unidades transcricionais (SCHRODER *et al.*, 2002; MITCHELL *et al.*, 2003; LAUFS *et al.*, 2006; RUSSO-CARBOLANTE *et al.*, 2011). Schroder e colaboradores (2002) investigaram a inserção do *HIV-1* e dos vetores derivados do *HIV-1* em linhagens linfóides humanas, e encontraram que as regiões gênicas são fortes sítios receptores de integração lentiviral e, uma análise global dos transcritos indicou que os genes ativos são alvos preferenciais para integração do *HIV-1*. Russo-Carbolante e colaboradores (2011) também observaram um padrão preferencial de um vetor lentiviral, derivado de *HIV-1*, carregando o fator VIII de coagulação sanguínea, por regiões gênicas em células de linhagens renal e hepática.

Os vetores estudados inseriram-se em vários genes em todos os cromossomos atingidos (Figura 28).

Figura 28: Integrações cromossômicas observadas do vetor pLenti-cPPT-CIGWS na célula TSM (marcações em azul) e do vetor EF1α-hSTEMCCA-LoxP na *iPS* 4FT (marcações em vermelho), e os respectivos genes afetados.

Nas células reprogramadas TSM, do total de integrações ocorridas, observamos que 50,6% atingiram regiões gênicas, sendo que apenas 2,8% atingiram exons e 47,7% ocorreram em regiões intrônicas. Na célula *iPS* 4FT, um resultado semelhante foi obtido, com 45,1% do total de integrações em regiões gênicas, sendo 3,5% atingindo exons e 41,6% regiões intrônicas (Tabela 6). As análises estatísticas revelaram que as regiões gênicas são sítios preferenciais dos vetores lentivirais nas células estudadas ($p < 0,0001$).

As frequências de inserção dos vetores lentivirais em regiões gênicas do genoma das células TSM e *iPS* 4FT foram superiores aquelas obtidas de um conjunto de dados de uma simulação randômica, no qual 22% de 10.000 integrações simuladas atingiram regiões gênicas (WU *et al.*, 2003).

Tabela 6: Frequência de integrações em regiões gênicas.

	Genoma humano	Randômico	Célula TSM	<i>iPS</i> 4FT
RefSeq genes	≈ 31,6% ^a	22,4% ^b	50,6% (< 0,0001)	45,1% (< 0,0001)
Exon	1,2%		2,8%	3,5%
Intron	30,4%		47,7%	41,6%

A coluna do genoma humano representa a porcentagem de genes presentes no genoma humano (VENTER et al, 2001).

^a Valor estimado.

^b WU *et al.*, 2003.

Avaliando cada colônia isolada das células TSM e *iPS* 4FT, observamos um padrão similar, com frequências de integração em regiões gênicas superiores aos resultados gerados pelas integrações randômicas simuladas (22%), com algumas demonstrando uma preferência muito alta por regiões gênicas, como a colônia isolada 1 (73%) e outras mostrando altas frequências, mas com uma preferência por regiões gênicas mais fracamente representada, como a colônia isolada 3 (Tabela 7) da célula TSM e a colônia 4 da *iPS* 4FT (Tabela 8).

Tabela 7: Frequência de integrações em regiões gênicas das colônias isoladas de célula TSM.

Porcentagem de integrações <i>in vitro</i> nas células TSM							
	Genoma humano	Randômico ^b	Colônia 1	Colônia 2	Colônia 3	Colônia 4	Colônia 5
RefSeq genes	≈ 31,6% ^a	22,4%	72,7%	50%	38%	53,2%	48%
Exon	2,22%		0	4,2%	0	2,1%	6,5%
Intron	38,1%		72,7%	45,8%	38%	51,1%	41,5%

A coluna do genoma humano representa a porcentagem de genes presentes no genoma humano (VENTER et al, 2001).

^a Valor estimado.

^b WU *et al.*, 2003.

Tabela 8: Frequência de integrações em regiões gênicas das colônia isolada de célula *iPS* 4FT.

Porcentagem de integrações <i>in vitro</i> nas células <i>iPS</i> 4FT							
	Genoma humano	Randômico ^b	Colônia 1	Colônia 2	Colônia 3	Colônia 4	Colônia 5
RefSeq genes	≈ 31,6% ^a	22,4%	46%	58,8%	40%	37,7%	43,8%
Exon	2,22%		4%	4%	5,7%	3,8%	1,6%
Intron	38,1%		42%	54,8%	34,3%	33,9%	42,2%

A coluna do genoma humano representa a porcentagem de genes presentes no genoma humano (VENTER *et al.*, 2001).

^a Valor estimado.

^b WU *et al.*, 2003.

Nas células reprogramadas TSM, das 89 integrações em unidades transcricionais, 85 genes foram atingidos, sendo que 2 (PCDH9 e SH3BP2) com uma frequência maior (3 integrações em cada) (Tabela 9). Na *iPS* 4FT, 115 integrações afetando unidades transcricionais, 113 genes diferentes foram atingidos, sendo que 2 (MAML3 e PARK2) tiveram 2 integrações cada (Tabela 10).

Tabela 9: Genes atingidos pelo vetor lentiviral pLenti-cPPT-C(FT)IGWS na célula reprogramada TSM.

Célula reprogramada TSM		
Genes atingidos	Processo Biológico	Função Molecular
AC010206.1, intron		
AC106037.2, intron		
ACTN2, intron	Contração muscular	Ligante de Ca^{2+} ; Receptor coativador hormôn. tireóide
ADAM32, intron	Proteólise	Ligante ion Zn^{2+} ; Atividade metalocarboxipeptidase
AGBL4, intron	Proteólise	Ligante ion Zn^{2+} ; Atividade metalocarboxipeptidase
ANK2, intron	Contração muscular cardíaca	
AR, intron	Regulação da transcrição	Ativ. Receptor andrógeno; Ligante Zn^{2+} , esteroide, DNA
BEAN1, intron	Morte celular	
C6orf142, intron		
CACNB4, intron		Atividade canal de cálcio voltagem dependente
CCDC57, intron		
CCL28, intron	Elevação da concentração de Ca^{2+} citosólico	
CLIC4, intron		Atividade canal cloreto voltagem dependente
COL9A1, intron	Orient. axônio; diferenciação condrocito; homeostase	Ligante ion metal; Constituinte estrut. matriz extrac. resist. tração
CTAGES, intron		
DHX58, intron		Ligante de ATP e DNA; Atividade de hidrolase
DLG2, intron	Percepção sensorial da dor; transmissão sináptica	
DPP10, intron	Proteólise	Atividade de peptidase tipo serina
DST, intron	Repressão do ciclo celular	Ligante de Ca^{2+}
EIF3K, intron	Regulação do início da tradução	Atividade fator de início da tradução; Ligante de ribossomo
EMID1, intron		
FAM108C1, intron		Atividade de hidrolase
FGF13, intron	Cascata MAPK; Sinaliz. célula-célula; desenvol.	Atividade ativador de proteína quinase
GABBR2, intron	Via sinalização GABA; transmissão sináptica	Atividade de receptor GABA acoplado a proteína G
GALK2, intron		Ligante ATP; Ativid. quinase e fosfotransferase, aceptor álcool
HEATR4, intron		
HMGB1, intron	Reparo DNA por excisão; Resposta Imune Inata	Atividade fator de transcrição; Ligante DNA danificado
INSC, intron	Desenv. Sist. Nervoso; Diferenc. cél. epitelial pulmão	
OQCK, intron		
ITGA9, intron	Adesão celular; via sinalização mediada por integrina	Atividade de receptor
JAKMIP1, intron	Interação microtúbulos e janus quinase	
KPNA7, intron	Importação de proteína para o núcleo	Atividade de transporte de proteína
KRT25, intron		Atividade de molécula estrutural
LDB2, intron	Manutenção estrutura epitelial, célula-tronco somática	Atividade de cofator de transcrição
LINGO2, intron		
LPHN2, intron	Via sinalização de neuropeptídeo	Atividade receptor acoplado a proteína G; Ligante carboidrato
MAGI2, intron	Regulação negativa da proliferação e migração celular	Atividade de transdução de sinal
MAP7D2, intron		
MSLN, intron	Adesão celular	
NANOGNB, intron		Atividade de fator de transcrição
NFATC2, intron	Transcrição; Resposta a drogas e a danos ao DNA	Atividade de fator de transcrição
NFIA, intron	Replicação do DNA; Transcrição, DNA-dependente	Atividade de fator de transcrição
NPR3, intron		Ligante de Cl^- e de hormônio
ORMDL3, intron	Processo metabólico da ceramida	
PCDH9, intron (3)	Adesão celular homofílica	Ligante de Ca^{2+}
PCSK5, intron	Proteólise	Atividade de endopeptidase tipo serina
PDE4D, intron	Transdução de sinal; Contração músculo liso	Ligante de ion metal
PFKFB4, intron	Processo metabólico da frutose-2,6-bisfosfato	Ligante ATP

PI16, intron		Inibidor de peptidase
PKIA, intron	Regulação da transição G2/M do ciclo mitótico	Ativid. inibidor prot. quinase dependente cAMP
PLK1S1, intron	Organização do fuso	
PLS1, intron		Ligante de Ca^{2+}
PTGR1, intron		Ligante de Zn^{2+} e nucleotídeo; Atividade oxidoreductase
PTPRS, intron	Desenvolv. cerebelo, córtex cerebral, medula espinhal	Atividade fosfatase da proteína quinase
ROBO2, intron	Adesão celular	
ROR2, intron		Atividade de proteína tirosina quinase
RUNX1, intron	Desenvol. Embrionário, SNC, fígado, sist. esquelético	Atividade de fator de transcrição
SCOC, intron		
SH3BP2, intron (3)		Ligante de fosfolípido
SLC44A5, intron	Transporte transmembrana	
SLIT2, intron	Resp. a hormônio; regulação (-) cresc. celular, fosforilação	Ligante de Ca^{2+} e de heparina; Atividade de inibidor de GTPase
SMOC2, intron	Transdução de sinal	Ligante de Ca^{2+}
SPILC3, intron	Processo Biossintético	Ligante do fosfato de piridoxal; Atividade de transferase
ST3GAL1, intron	Glicosilação e fosforilação de proteínas	Atividade de β -galactosídeo
STAB2, intron	Adesão celular	Ligante de ácido hialurônico
STRBP, intron	Comportam. mecanossensorial; Desenv. Espemátide	Ligante de ssRNA e dsRNA
SUPT3H, intron	Acetilação histona H3; Início da transcrição	Atividade de cofator de transcrição; Ligante de DNA
TMEM87A, intron		
ULK4, intron		Ligante de ATP; Atividade de proteína quinase
VIT, intron	Organiz. matriz extracel; regulação(+) adesão cél-subst	Ligante e glicosaminoglicana
YIPF4, intron		
ZBBX, intron		Ligante de Zn^{2+}
ZDHHC14, intron		Ligante de Zn^{2+}
ZNF292, intron		Ligante de Zn^{2+} e ligante de ácido nucleico
ZNF589, intron	Regulação da transcrição, DNA dependente	Ligante de ácido nucleico
ZNF720, intron	Regulação da transcrição, DNA dependente	Ligante de ácido nucleico
EDN3, exon	Regulação da vasoconstrição; Regulação (+) mitose	
INADL, exon	Transdução sinal intracel.; Reunião junções oclusivas	
PIK3R1, exon	Regulação da atividade de fosfatidilinositol-3-quinase	Atividade reguladora de fosfatidilinositol-3-quinase
RP11-339F13.2, exon		
THEM5, exon		Atividade de hidrolase

Os genes em destaque tiveram mais de uma inserção do vetor.

Tabela 10: Genes atingidos pelo vetor lentiviral EF1 α -STEMCCA-LoxP na *iPS* 4FT.

<i>iPS</i> 4FT		
Genes atingidos	Processo Biológico	Função Molecular
ADRM1, intron	Montagem de proteassoma; Elongação transcrição	Atividade de ativador de endopeptidase
AL353597.1, intron		
AMPD3, intron	Processo Biossintético de IMP	Atividade de AMP desaminase
ANKS1B, intron		
ANO6, intron	Ativação coagulação; Expos. fosfatidilserina plaquetas	Atividade de canal de Cl^-
ARMC9, intron		
BNIP3, intron	Resposta a hipóxia/hiperóxia; morte celular autofágica	
C1orf21, intron		
C1orf212, intron		
C11orf49, intron		
C2orf15, intron		
C2orf80, intron		
C20orf26, intron		
C7orf58, intron		
CCDC64, intron		
CDH24, intron	Adesão celular homofílica	Ligante de Ca^{2+}
CDK3, intron	Divisão, proliferação celular; Transição G1/G0, G1/S	Ligante ATP; Ativ. proteína quinase-ciclina dependente
CLRN1OS, intron	Sinaliz. célula-célula; Via sinaliz. mediada INF-tipo I	
COG8, intron	Transporte de proteína	Ligante de íon
COL23A1, intron	Homotrimerização de proteína	Ligante de heparina
CSMD3, intron		
CUX1, intron	Transporte mediado por vesícula intra-Golgi	
CYFIP2, intron	Processo apoptótico; Adesão célula-célula	

CYP1A2, intron	Respiração celular; Metilação; Desenvolv. pulmonar	Atividade de desmetilase e de carreador de elétron
DIAPH2, intron	Organização do citoesqueleto de actina	Ligante de proteína do citoesqueleto
FBXL13, intron		
FBXL17, intron		
FIBCD1, intron	Transdução de sinal	
FRMD2A, intron		
GABRA3, intron	Transp. transmembrana iônico; Via sinaliz. GABA	Atividade de receptor GABA-A e de canal de Cl ⁻
GABRG3, intron	Transporte de Cl ⁻ ; Via de sinalização do GABA	Atividade de receptor GABA-A e de canal de Cl ⁻
GLB1L2, intron	Processo metabólico de carboidrato	Ligante de cátion; Atividade de hidrolase (O-glicosil)
GPC5, intron		Atividade de receptor acoplado a proteína G
GUCY2F, intron	Transd. sinal intracel.; via sinal. receptor guanilato ciclase	Ligante ATP/GTP; Ativ. de receptor e de proteína quinase
HERC2, intron	Reparo; Transp. proteína intracel.; Espermato gênese	Ligante de Zn ²⁺ ; Atividade de proteína ubiquitina-ligase
HS6ST3, intron		Atividade sulfotransferase
IGSF21, intron		
ITPK1, intron	Processo metabólico do inositol trifosfato	Ligante de Mg ²⁺ ; Ligante de ATP
KANK1, intron	Regulação(-) da polimerização do filamento de actina	
KCNIP3, intron		Ligante Ca ²⁺ ; Atividade de canal iônico
KCNN3, intron		Atividade de canal K ⁺ ativado por baixa condutância de
KDELC2, intron		
KIRREL3, intron	Hematopoiese	
LARGE, intron	Homeostase de célula muscular	Atividade de transferase
LHFPL3, intron		
LIMD1, intron	Migração cel.; organiz. citoesqueleto; transdução sinal	Ligante de Zn ²⁺ ; Atividade de corepressor da transcrição
LMLN, intron	Adesão celular; Proteólise	Ligante de Zn ²⁺ ; Atividade de metaloendopeptidase
LRP1B, intron	Transporte proteína; Endocitose mediada por receptor	Ligante de Ca ²⁺ ; Ativ. receptor lipoproteína baixa densidade
MAMDC2, intron		Ligante de glicosaminoglicano
MAML3, intron (2)	Via de sinalização Notch; Regulação(+) transcrição	Atividade de coativador da transcrição
MATN2, intron		Ligante de Ca ²⁺
MDN1, intron	Montagem de complexo de proteína	Ligante de ATP; Atividade de ATPase
MEMO1, intron	Processo baseado na regulação de microtúbulos	
MEPE, intron	Regul.(-) mineralização óssea; desenv. sist. esquelético	Constituinte da matriz extracelular
MFGF8, intron	Angiogênese; Adesão celular; Fagocitose;	Ligante de fosfatidilserina e de fosfatidiletanolamine
MICAL2, intron	Despolimerização do filamento de actina	Ligante de Zn ²⁺ ; Ligante de FAD
MKL1, intron	Anti-apoptose; diferenciação músculo liso; Transcrição	Ligante de ácido nucléico; Atividade coativador transcrição
MSN, intron	Adesão cél-cél de leucócitos; Migração de leucócitos	Constituinte estrutural do citoesqueleto
MTUS1, intron		
MX11, intron	Regul. da transcrição; Regul.(-) de proliferação celular	Ligante de DNA; Atividade de corepressor da transcrição
NAA11, intron		Atividade de peptídeo α -N-acetiltransferase
NEU3, intron	Proc. metabólico carboidrato e catabólico gangliósido	Atividade α -sialidase
NIM, intron	Adesão celular; Reconhecimento de neurônio	
NUCB2, intron		Ligante de Ca ²⁺
NUMB, intron	Organiz. junções aderentes; Axonogênese	Ligante de α -catenina
PADI3, intron	Processo Biossintético do peptidil-citrulina	Ligante de Ca ²⁺ ; Atividade de desaminase
PARK2, intron (2)	Ubiquitinação de proteína	Atividade de proteína ligase ubiquitina
PAX5, intron	Desenvolv. organismo multicelular; Transcrição	Ligante de DNA
PCBD2, intron	Processo biossintético da tetrahydrobiopterina	Atividade de desidratase de 4- α -hidroxitetrahydrobiopterina
PDE1C, intron	Processo catabólico cAMP/cGMP; Transdução sinal	Ligante de íon metálico; Ligante de cAMP
PHACTR2, intron		Atividade de inibidor de proteína fosfatase
PLCL2, intron	Transdução sinal intracel.; Processo metabólico lipídio	Ligante de Ca ²⁺ ; Atividade de transdutor de sinal
PLEC, intron	Montagem hemidesossomos	Constituinte estrutural do músculo
POF1B, intron		Ligante de proteína do citoesqueleto
PPP2R2C, intron	Transdução de sinal	Atividade de regulador da proteína fosfatase tipo 2A
PRPF8, intron	Splicing nuclear do RNA m, via spliceossomo	Ligante de RNA
RAPGEF5, intron	Regul. da transdução de sinal mediada por GTPase	Atividade fator de troca de nucleotídeo guanil
RG9MTD2, intron		Atividade de metiltransferase
RNF157, intron		Ligante de Zn ²⁺
SCG3, intron	Ativação plaquetária; Desgranulação plaquetária	
SH3KBP1, intron	Apoptose; Migração celular; Organiz. citoesqueleto	Atividade quinase
SH3RF1, intron	Indução da apoptose; Regulação da cascata de JNK	Ligante de Zn ²⁺
SH3RF3, intron		Ligante de Zn ²⁺
SHROOM4, intron	Organização filamento de actina; Desenvolv. Cérebro	
SLC1A2, intron	Resposta a droga; transmissão sináptica	Ativ. de transporte de ânion transmembrana
SLC2A12, intron	Transporte de carboidrato; Transporte transmembrana	Atividade de transportador transmembrana
SLC39A11, intron	Transporte de Zn ²⁺	Atividade de transportador de íon metálico transmembrana
SORT1, intron	Endocitose; Diferenciação de miotubo; Ossificação	Atividade de receptor de fator de crescimento de nervo
ST8SIA1, intron	Glicosilação de proteína	Atividade de sialitransferase
TAF8, intron	Diferenciação celular; Regulação(+) da transcrição	Ligante de DNA
TKTL1, intron	Processo catabólico da glicose e da tiamina	Ligante de íon metálico
TMCO5A, intron		

TMEM163, intron		Ligante de Zn^{2+}
TMEM202, intron		
TMPRSS4, intron	Processo metabólico; Proteólise	Atividade catalítica; Atividade de receptor scavenger
UNC5C, intron	Transdução de sinal; Apoptose; Desenvol. cérebro	Atividade de receptor de netrina
UTRN, intron	Contração celular; Desenvolvimento muscular	Ligante de Ca^{2+} e; Ligante de Zn^{2+}
WDFY4, intron		Ligante
WWC3, intron		
ZC3H4, intron		Ligante de ácido nucléico; Ligante de Zn^{2+}
ZMYM4, intron	Organiz. citoesqueleto; Regul. morfogênese celular	Ligante de Zn^{2+} ; Ligante de DNA
CANX, exon	Envelhecimento	Ligante de Ca^{2+}
CTB-36O1.5, exon		
GNB5, exon	Via sinalização de receptor acoplado a proteína G	Atividade de GTPase; Atividade de transdutor de sinal
IL17RD, exon		Atividade de receptor de interleucina-17
MOCS1, exon	Processo biossintético de vitamina solúvel em água	Ligante de ion metálico e de GTP; Atividade catalítica
RAB11FIP1, exon	Transporte de proteína	
SNX15, exon	Comunicação celular	Ligante de fosfatidilinositol

Os genes em destaque tiveram mais de uma inserção do vetor.

Quando comparamos as duas células, curiosamente encontramos quatro genes que foram atingidos em ambas as células, pelos seus respectivos vetores lentivirais; CNRNA7, CNIH3 e PARP1, os três em íntrons, e AXIN2, atingido em íntron na célula reprogramada TSM e em exon na *iPS* 4FT (Tabela 11).

Tabela 11: Integrações que atingiram o mesmo gene em ambas as células.

Ambas as células			
Genes atingidos	Nº integr.	Processo Biológico	Função Molecular
CNRNA7,	2	Comunicação celular	Ligante de fosfatidilinositol
CNIH3, intron	2	Transdução de sinal	
PARP1, intron	2	Reparo DNA; Manutenção telômero; Autoproces. proteína	Ligante de DNA; Ligante de Zn^{2+}
AXIN2	1(exon: 4FT) 1(intron: TSM)	Transdução sinal; Via sinalização do receptor acoplado a terminação da proteína G; Desenv. organismo multicelular	Atividade de transdutor de sinal

Uma classificação funcional dos genes afetados foi realizada utilizando as ferramentas públicas *Gene Ontology* e DAVID/EASE, que utiliza créditos do *Gene Ontology*, e além de avaliar classes e vias metabólicas, identifica doenças que possam estar relacionadas aos genes afetados.

Após a análise dos dados, pudemos observar que 2 genes afetados, o AR (receptor de andrógeno) na célula TSM e o MXI1 (*MAX interactor 1*) na *iPS* 4FT, estão relacionados a uma suscetibilidade ao câncer de próstata, de acordo com o OMIM (*Online Mendelian Inheritance in Man*). Alguns estudos revelam que defeitos no gene AR podem resultar no

desenvolvimento sexual masculino anormal (KANG *et al.*, 2003). O Mxi1 pode agir como supressor tumoral em glioblastoma humano (MANNI *et al.*, 2002), e defeitos no MXI1 foram encontrados em pacientes com câncer de próstata (<http://omim.org/entry/176807>). Apesar disso, esses genes não são proto-oncogenes, somente foram identificados em cânceres de próstata e, dessa maneira, talvez a inserção não tenha qualquer influência que leve a um fenótipo maligno.

Pudemos também observar um conjunto de genes, 3 afetados pelo vetor pLenti-cPPT-C(FT)IGSW nas células TSM (CTAGE5, DST e PIK3R1) e 3 afetados pelo vetor EF1 α -hSTEMCCA-LoxP nas células *iPS* 4FT (MTUS1, PLEC e UTRN) que formam um grupo de proteínas relacionadas com divisão celular e distribuição de cromossomos. A inserção em algum desses genes poderia afetar esses processos, levando a uma divisão celular anormal ou causando quebras em cromossomos.

Foi possível também fazer uma análise quanto à participação de alguns genes em vias metabólicas. Com essas análises pudemos observar que 4 genes afetados na célula TSM (ACTN2, FGF13, ITGA9 e PIK3R1) e 3 genes afetados na célula *iPS* 4FT (CYFIP2, DIAPH2 e MSN) estão relacionados com a via de regulação do citoesqueleto de actina, de acordo com KEGG-Pathway. Esses genes estão amplamente distribuídos na via de regulação do citoesqueleto de actina, e inserções poderiam afetar a produção de fatores quimiotáticos ou ainda afetar adesões focais, junções relacionadas à adesão célula-matriz (Figura 29).

Figura 29: Esquema da via de regulação do citoesqueleto de actina, evidenciando, com as marcações em vermelho, os genes atingidos pelos vetores lentivirais; ACTN2 (*actinin, alpha 2*), FGF13 (*fibroblast growth factor 13*), ITGA9 (*integrin, alpha 9*) e PIK3R1 (*phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 1*) (atingidos pelo vetor pLenti-cPPT-

C(FT)IGWS; CYFIP2 (*cytoplasmic FMR1 interacting protein 2*), DIAPH2 (*diaphanous homolog 2*) e MSN (*moesin*) (atingidos pelo EF1 α -hSTEMCCA-LoxP).

5.4.5 Frequência de integração em regiões repetitivas do genoma

Elementos repetitivos respondem por quase metade da massa do genoma humano. A maioria desses elementos representam fósseis de elementos antes ativos. Elementos *Alu* (tipo de elemento *SINE*) estão amplamente presentes em regiões ricas em CG, estando frequentemente associado a densidade gênica, enquanto elementos L1 (tipo de elemento *LINE*) são mais encontrados em regiões ricas em AT (ROY-ENGEL, 2012).

As análises de integração também nos mostraram que os vetores lentivirais inseriram-se em regiões repetitivas do genoma humano (Tabela 12). Na célula reprogramada TSM, 75 (42,1%) integrações ocorreram em regiões repetitivas do genoma (*SINE*, *LINE*, *LTR*, etc.). Dentre essas, 28 (37%) inserções localizaram-se em regiões *LINE/L1*, seguido por 10 inserções em regiões *SINE/Alu* (13%) e 10 inserções em regiões *LINE/L2* (13%) (Figura 30).

Na *iPS* 4FT, 115 (45,3%) integrações ocorreram em regiões repetitivas do genoma, sendo que dessas, 31 (27%) inserções localizaram-se nas regiões *LINE/L1*, seguido por 15 em regiões *SINE/Alu* (13%) e 15 inserções em regiões *LINE/L2* (13%), seguindo o mesmo padrão demonstrado pelo vetor pLenti-cPPT-C(FT)IGWS nas células TSM (Figura 30).

Tabela 12: Frequência de integração em regiões repetitivas do genoma nas células TSM e *iPS* 4FT.

	Genoma humano	Célula TSM	Célula <i>iPS</i> 4FT
SINES			
Alu	10,60%	5,70%	6,00%
MIR	2,20%	4,00%	3,15%
LINE	20%	21,6%	18,8%
Elementos de DNA	2,80%	1,70%	5,50%
Elementos LTR	8,20%	9,10%	10,20%
Satélite	UN	0	1,60%

A coluna do genoma humano representa a porcentagem de elementos cromossômicos presentes no genoma humano (VENTER *et al.*, 2001).

Abreviação: UN, não conhecido.

Figura 30: Frequência de integração dos vetores lentivirais pLenti-cPPT-C(FT)IGWS e EF1 α -hSTEMCCA-LoxP em regiões repetitivas do genoma nas células reprogramadas TSM e *iPS* 4FT respectivamente.

A análise das colônias isoladas de célula TSM mostrou que vetores lentivirais inseriram-se em regiões repetitivas do genoma humano, com maior predominância pelos elementos LINE em todas as colônias isoladas, com exceção da Colônia 2, em que o vetor inseriu-se predominantemente em regiões SINE/Alu (16,7%) (Tabela 13).

Tabela 13: Frequência de integração em regiões repetitivas do genoma nas colônias isoladas da célula TSM.

Porcentagem de integrações <i>in vitro</i> nas células TSM						
	Genoma humano	Colônia 1	Colônia 2	Colônia 3	Colônia 4	Colônia 5
SINES						
Alu	10,6%	4,5%	16,7%	0	8,5%	2,2%
MIR	2,2%	0	0	5,4%	4,3%	6,5%
LINE						
Elementos DNA	2,8%	0	0	2,7%	2,1%	2,2%
Elementos LTR	8,2%	9,1%	4,2%	10,8%	8,5%	10,9%
Satélite	UN	0	0	0	0	0

A coluna do genoma humano representa a porcentagem de elementos cromossômicos presentes no genoma humano (VENTER et al, 2001).
Abreviação: UN, não conhecido.

A análise das colônias isoladas de iPS 4FT mostrou que o vetor lentiviral inseriu-se em regiões repetitivas do genoma humano, com maior predominância pelos elementos LINE em todas as colônias isoladas. As Colônias 1 e 4 tiveram 12% e 11,3% das regiões SINE/Alu respectivamente atingidas pelo vetor EF1 α -hSTEMCCA-LoxP (Tabela 14) e as Colônias 3 (14,3%), 4 (11,3%) e 5 (14,1%) sofreram integrações em elementos LTR.

Tabela 14: Frequência de integração em regiões repetitivas do genoma nas colônias isoladas da célula iPS 4FT.

Porcentagem de integrações <i>in vitro</i> nas iPS 4FT						
	Genoma humano	Colônia 1	Colônia 2	Colônia 3	Colônia 4	Colônia 5
SINES						
Alu	10,6%	12%	2%	6,1%	11,3%	0
MIR	2,2%	2%	3,9%	9,1%	1,9%	1,6%
LINE	20%	16%	15,7%	28,6%	17%	20,3%
Elementos DNA	2,8%	4%	3,9%	3%	7,5%	7,8%
Elementos LTR	8,2%	6%	7,8%	14,3%	11,3%	14,1%
Satélite	UN	0	2%	5,7%	0	1,6%

A coluna do genoma humano representa a porcentagem de elementos cromossômicos presentes no genoma humano (VENTER et al, 2001).
Abreviação: UN, não conhecido.

5.4.6 Frequência de inserção em sítios frágeis do genoma humano

As regiões de sítio frágil apresentam uma instabilidade cromossômica e consistem em locais nos cromossomos metafásicos suscetíveis a quebras (DURKIN & GLOVER, 2007), e essas quebras podem ser causa de mutações, translocações, inverções. Em nossas análises pudemos observar que os vetores lentivirais utilizados inseriram-se em sítios frágeis do genoma humano, sendo que a célula TSM apresentou 42 (24%) inserções nessas regiões, enquanto que na iPS 4FT ocorreram 78 (31%) integrações nessas regiões (Tabela 15). Quando comparadas com um conjunto de 1.000.000 de integrações randômicas simuladas pelo programa *QuickMap*^{gts}, houve uma pequena diferença na porcentagem de integração nas células iPS 4FT.

Analisando-se as colônias isoladas separadamente, pudemos observar o mesmo perfil, com os sítios frágeis mais representados nas colônias 1 (36%) e 3 (37,1%) isoladas da *iPS* 4FT (Tabela 15).

Tabela 15: Porcentagens de integrações dos vetores lentivirais em sítios frágeis das células TSM e *iPS* 4FT, e em cada colônia isolada separadamente.

TSM 4FT e TSM 1, 2 e 3 em uma Colônia Isolada Separadamente:												
	Genoma humano					Célula TSM			<i>iPS</i> 4FT			
Sítios Frágeis	20,50%					23,80%			31,40%			
	Porcentagem integrações TSM					Porcentagem de integrações <i>iPS</i> 4FT						
	Genoma humano	Colônia 1	Colônia 2	Colônia 3	Colônia 4	Colônia 5	Colônia 1	Colônia 2	Colônia 3	Colônia 4	Colônia 5	
Sítios Frágeis	20,50%	18,2%	33,3%	27%	19,1%	21,7%	36%	23,5%	37,1%	30,2%	32,8%	

A coluna do genoma humano representa a porcentagem de elementos cromossômicos presentes no genoma humano (VENTER et al, 2001).

Os sítios frágeis podem ser classificados em dois grupos, comuns e raros, de acordo com suas características e frequência em que são encontrados nos cromossomos. Ambos os vetores apresentaram integrações nos dois grupos, com uma frequência maior nos sítios frágeis comuns, com 74% das inserções totais que ocorreram em sítios frágeis nas células TSM e 72% nas células *iPS* 4FT.

Porém, apesar da semelhança, a frequência de integração e os respectivos sítios frágeis afetados diferem entre as células, como mostra a Figura 31. Na célula reprogramada TSM, o vetor pLenti-cPPT-C(FT)IGWS inseriu-se com maior frequência nos sítios FRA1L (3%) e FRA13B (2,3%), enquanto que na *iPS* 4FT, o vetor EF1 α -hSTEMCCA-LoxP inseriu-se com maior frequência no sítio FRA1A (2%). Quando comparadas com um conjunto de 1.000.000 de integrações randômicas simuladas pelo programa *QuickMap*^{gts}, houve uma diferença na porcentagem de integração, uma vez que se fosse aleatória as frequências esperadas seriam de 0,8% e 0,7% para os sítios mais atingidos pelo vetor pLenti-cPPT-C(FT)IGWS e de 0,9% para o sítio mais atingido pelo vetor EF1 α -hSTEMCCA-LoxP.

Figura 31: Frequência de integração dos vetores lentivirais pLenti-cPPT-C(FT)IGWS e EF1 α -hSTEMCCA-LoxP em sítios frágeis do genoma da célula reprogramada TSM e da *iPS* 4FT, respectivamente.

5.5 Número de cópias virais inseridas

O DNA das células transduzidas com os vetores lentivirais pLenti-cPPT-C(FT)IGWS e EF1 α -hSTEMCCA-LoxP foram coletados para a identificação do número de cópias integradas através de qPCR pela metodologia de *SYBR®Green*.

Para a determinação do número de cópias por qPCR foram utilizados oligonucleotídeos específicos para a região 3' do *LTR* para a amplificação dos vetores derivados do HIV-1. Como controle interno foram utilizados oligonucleotídeos específicos para o gene da β -globina, para normalizar a quantidade de DNA genômico de cada amostra.

Cada amostra foi submetida a quantificação em duplicata e, a partir dos dados gerados, foi possível obter a média dos valores obtidos referentes às regiões LTR e β -globina. A média

obtida para o *LTR* em cada uma das colônias foi dividida pela média para a β -globina para obtenção do número de cópias virais por célula.

A quantificação do número de cópias virais de cada colônia isolada das células TSM e *iPS* 4FT está disposta na Tabela 16. Observamos um padrão muito heterogêneo no número de cópias do vetor pLenti-cPPT-C(FT)IGWS inseridas quando colônias isoladas da célula reprogramada TSM são comparadas entre si. Nas células *iPS* 4FT, observamos um padrão bem mais homogêneo, na mesma situação.

Tabela 16: Quantificação do número de cópias dos vetores lentivirais pLenti-cPPT-C(FT)IGWS e EF1 α -hSTEMCCA-LoxP inseridas no genoma das células hospedeiras para geração de iPS.

Número de cópias virais inseridas (vírus/célula)		
Colônia isoladas	Célula TSM	Célula <i>iPS</i> 4FT
Colônia isolada 1	1,30	10,06
Colônia isolada 2	23,27	10,16
Colônia isolada 3	68,06	17,72
Colônia isolada 4	74,49	10,29
Colônia isolada 5	68,15	11,79

Discussão

6 Discussão

6.1 Células-tronco de pluripotência induzida (iPS) humanas

Nesse estudo utilizamos dois tipos celulares, fibroblasto e mesenquimal derivada de tecido adiposo, modificadas geneticamente para expressarem níveis adequados de genes relacionados a pluripotência (*OCT4*, *SOX2*, *KLF4*, *C-MYC* e *TCL-1A*), que regulam positivamente genes endógenos, permitindo uma reprogramação da célula diferenciada para um estado pluripotente. Essas células foram modificadas com dois vetores lentivirais diferentes, um vetor bicistrônico codificante de um fator de transcrição (FT) (*SOX2*, *C-MYC* ou *TCL-1A*) e da proteína EGFP, e outro polistrônico, codificante de 4 FT (*OCT4*, *SOX2*, *KLF4* e *C-MYC*).

A célula reprogramada TSM, que recebeu esse nome, pois foi transduzida para superexpressar *TCL-1A*, *SOX2* e *C-MYC*, não foi chamada de célula iPS por apresentar um perfil intermediário, sendo denominada de célula parcialmente reprogramada, pois apesar de se diferenciar espontaneamente e dar origem a corpos embrioides (EB) com células dos 3 folhetos embrionários, estas células não formaram teratomas nos experimentos realizados com camundongos imunossuprimidos (NOD/SCID). Teratomas são tumores que abrigam diversos tipos celulares e tecidos, quando inoculadas em camundongos NOD/SCID. As células TSM também apresentam um perfil de expressão gênica intermediário entre células-tronco embrionárias (CTE) e as células diferenciadas que as originaram (PICANÇO-CASTRO *et al.*, 2011). Entretanto, sabe-se que as linhagens de células iPS humanas parecem ser menos eficientes na formação de teratomas e requerem um maior número de células para tal quando comparadas com as CTE (PARK *et al.*, 2008). ELLIS e colaboradores (2009) discutem se esse teste seria realmente o ensaio mais apropriado e, que essas linhagens que não formam teratomas, mas que mantêm a capacidade de geração de diversos tipos celulares *in vitro*, não deveriam ser descartadas, pois são essas as células mais “desejáveis” para o uso em transplantes. Dessa maneira, se essas células forem capazes de se diferenciar eficientemente em células dos três folhetos germinativos, seria uma opção muito mais atraente para a terapia celular por não induzir a formação de teratomas, e ser capaz de dar origem a diversos tipos celulares com potencial terapêutico (ELLIS *et al.*, 2009).

A iPS 4FT, que foi modificada com o vetor policistrônico EF1 α -hSTEMCCA-LoxP mostrou uma morfologia muito semelhante as CTE, característica de colônias de células pequenas e justapostas. Esse sistema de expressão múltipla baseado no vetor lentiviral de terceira geração pHAGE, permite a expressão dos 4FT clássicos (TAKAHASHI & YAMANAKA, 2006), necessários para a geração de célula pluripotente, a partir de um único transcrito. Em contraste com as construções múltiplas, os vetores policistrônicos parecem realizar uma reprogramação para geração de *iPS* que seriam transcricionalmente mais próximas as CTE (CHIN *et al.*, 2010).

As populações de células iniciais utilizadas, fibroblastos e mesenquimais, são dois tipos celulares muito utilizados na geração de células iPS. Os fibroblastos são as células mais amplamente utilizadas na reprogramação, e especificamente, as células CCD27SK já possuem uma expressão aumentada de KLF4 (PICANÇO-CASTRO *et al.*, 2011), um dos FT clássicos utilizados na geração de iPS, o que pode ter contribuído para a geração das células reprogramadas TSM com apenas 3FT. Variações na expressão endógena dos FT de reprogramação e diferenças epigenéticas entre os vários tipos celulares podem afetar a eficiência de reprogramação. As células mesenquimais estromais (MSC) são células multipotentes que mostram níveis detectáveis de alguns dos principais genes reguladores presentes nas CTE, e foi demonstrado que as MSC são reprogramadas mais rapidamente e/ou com maior eficiência, característica atribuída a essa expressão endógena aumentada dos genes de pluripotência em comparação com uma célula diferenciada, e ao padrão epigenético (ZHENG *et al.*, 2009).

As células reprogramadas, TSM e iPS 4FT foram caracterizadas quanto a sua pluripotência, utilizando parâmetros como morfologia, capacidade de formação de corpos embrioides, atividade da fosfatase alcalina e perfil de expressão gênica de marcadores de pluripotência. Os clones de iPS estabelecidos devem ser caracterizados molecular e funcionalmente utilizando-se experimentos que definem sua pluripotência (MAHERALI & HOCHEDLINGER, 2008), porém um conjunto mínimo de critérios para caracterização das iPS ainda é controverso (DALEY *et al.*, 2009; ELLIS *et al.*, 2009).

Os ensaios de caracterização realizados com a *iPS* 4FT mostraram que essas células possuem um potencial pluripotente, com alta expressão de fosfatase alcalina (Figura 14), indicando se tratar de uma célula indiferenciada com potencial de autorrenovação. A fosfatase alcalina é uma enzima hidrolase responsável por desfosforilar moléculas como nucleotídeos, proteínas e alcaloides em condições alcalina, e está presente em altos níveis na membrana

celular de células indiferenciadas pluripotentes. Dessa maneira, a coloração com fosfatase alcalina é utilizada para detectar essas células e testar sua pluripotência.

As iPS 4FT também foram capazes de formar corpos embrioides *in vitro* (Figura 15). Os EB são estruturas esféricas, agregados tri-dimensionais, formadas *in vitro* a partir de células pluripotentes, os quais abrigam o desenvolvimento de diversos tipos celulares e tecidos. A formação dessas estruturas caracteriza o potencial de diferenciação das células iPS.

Com relação a expressão, nas iPS 4FT, de OCT4, SOX2 e NANOG, fatores-chave da rede autoregulatória transcricional da pluripotência em CTE (JAENISH & YOUNG, 2008), os resultados demonstraram um aumento na expressão de OCT4 e SOX2 total, assim como na produção de NANOG endógeno (Figura 13). Observou-se também que a expressão de SOX2 manteve um padrão similar à expressão de NANOG quando colônias de iPS são comparadas entre si, sugerindo que a regulação gênica de ambos deve estar intrinsecamente relacionada.

Nesse sentido, estudos têm demonstrado que o FT SOX2 forma um complexo com o OCT4, o qual ativa a transcrição de numerosos genes relacionados à condição pluripotente das CTE, dentre eles o *NANOG* (KURODA *et al.*, 2005; RODDA *et al.*, 2005; PICANÇO-CASTRO *et al.*, 2012), que se autorregula e também regula positivamente outros genes das CTE, proporcionando a manutenção da condição pluripotente destas células (BOYER *et al.*, 2005; CHEW *et al.*, 2005; OKUMURA-NAKANISHI *et al.*, 2005; TOMIOKA *et al.*, 2002).

Além de atuarem de forma autoregulatória, esses três fatores reprimem a expressão de genes reguladores do desenvolvimento que levam à diferenciação e co-regulam positivamente a expressão de genes envolvidos na autorrenovação e pluripotência (BOYER *et al.*, 2005; BOYER *et al.*, 2006). Esses genes são desativados à medida que se inicia a diferenciação das linhagens de células que constituirão os tecidos adultos (ZAGO, 2006).

Comparando a expressão nas iPS 4FT geradas com as células reprogramadas TSM, observa-se uma grande diferença na expressão de OCT4, SOX2 e NANOG, com as iPS 4FT obtendo uma expressão mais alta que as células TSM (PICANÇO-CASTRO, 2011). Essas iPS 4FT possuem uma morfologia mais semelhante as CTE, potencial de autorrenovação com alta expressão de fosfatase alcalina e um potencial de diferenciação com a formação de corpos embrioides *in vitro*. As células TSM não foram capazes de gerar teratomas, após vários testes, mesmo utilizando quantidades altas de células. Talvez essa grande diferença na expressão dos três fatores chave na regulação da pluripotência estejam influenciando na capacidade pluripotente das células TSM. Dessa forma, podemos concluir que talvez a presença de SOX2 sozinho não seja capaz de regular a rede transcricional, sendo indispensável a presença de

OCT4 nos protocolos de geração de *iPS*, para formar um complexo com SOX2 e ativar a transcrição de vários genes relacionados a pluripotência.

Além disso, os vetores policistronicos, como o utilizado para a geração das *iPS* 4FT, são sistemas considerados mais confiáveis, eficientes e reprodutíveis na geração de *iPS* que seriam transcricionalmente mais próximas as CTE (CHIN *et al.*, 2010), pois integra os 4FT no genoma celular com um único evento de transdução, e permite a tradução das 4 proteínas em níveis iguais a partir de um único RNAm.

6.2 Padrão de integração lentiviral

Com o objetivo de identificar um padrão de integração dos vetores lentivirais utilizados, analisamos os locais de inserção dos lentivírus, através da clonagem e sequenciamento das junções entre o DNA genômico e o DNA do vetor que se inseriu. Essa análise revelou uma preferência por cromossomos específicos e por regiões cromossômicas específicas, em ambas as células estudadas, valores corrigidos para o tamanho dos cromossomos. A distribuição dos sítios de integração pode ser influenciada por várias características das populações celulares, como no caso das células utilizadas, em que somente aquelas que possuísem todos os FT inseridos no genoma em níveis adequados, capazes de reprogramar a célula a um estado indiferenciado, sobrevivem as condições de cultivo de CTE.

No caso das células utilizadas, a regulação da expressão dos FT é feita de maneira muito precisa, e um valor de número de cópias mais alto não se traduz necessariamente em indução da pluripotência. Esse fato é mostrado em estudos que determinam que o desbalanço (aumento ou diminuição) dos níveis de alguns dos FT relacionados à pluripotência, como OCT4 e SOX2, nas CTE murinas e humanas leva a diferenciação (ADACHI *et al.*, 2010; RIZZINO, 2009). Um exemplo dessa regulação foi dado por Pan e colaboradores (2006), em que demonstraram que OCT4 regula *NANOG* de duas maneiras: quando OCT4 está superexpresso, há a supressão do promotor de *NANOG*; por outro lado, quando a concentração do FT OCT4 está estável, a expressão de *NANOG* é mantida. Essa regulação precisa é também identificada no presente estudo, pois dentre as colônias isoladas de *iPS* 4FT, a colônia 1 que obteve maior expressão de *NANOG*, mas não a maior expressão de OCT4, foi aquela que teve o menor número de cópias do vetor inseridas em seu genoma (Figura 13 e Tabela 16).

Quando analisamos a distribuição dos vetores lentivirais pLenti-cPPT-C(FT)IGWS e EF1 α -hSTEMCCA-LoxP nos cromossomos das células estudadas, observamos frequências de integração aumentadas nos cromossomos 16, 17 e 20 da célula reprogramada TSM, e nos cromossomos 11, 15 e 17 da célula *iPS* 4FT. A análise estatística, dada pelo *RISC*, determinou que a distribuição das integrações não ocorreu uniformemente nos 24 cromossomos para ambos os vetores e confirmou a preferência dos vetores pLenti-cPPT-C(FT)IGWS e EF1 α -hSTEMCCA-LoxP pelos cromossomos específicos citados, quando levamos em consideração o tamanho dos cromossomos, já que existe uma facilidade de integração em cromossomos maiores. Esse dado é corroborado por Laufs e colaboradores (2003) e Mitchel e colaboradores (2004), estudos de integração que identificaram que os sítios de integração lentiviral do HIV-1 e de vetores lentivirais derivados do *HIV-1* demonstravam uma preferência por cromossomos específicos.

As análises das integrações dentro de genes nos mostraram frequências significativamente altas quando comparadas àquelas obtidas de um conjunto de dados de uma simulação randômica, no qual 22% de 10.000 integrações simuladas atingiram regiões gênicas (WU *et al.*, 2003), de cerca de 51% ($p < 0,0001$) nas células TSM e de cerca de 45% ($p < 0,0001$) nas células *iPS* 4FT.

Esses dados confirmam a preferência dos vetores lentivirais por unidades transcricionais, previamente descrita para o lentivírus HIV-1 e diversos vetores lentivirais derivados do HIV-1 (SCHRODER *et al.*, 2002; MITCHEL *et al.*, 2004; WU *et al.*, 2003; LAUFS *et al.*, 2006; RUSSO-CARBOLANTE *et al.*, 2010; MARKMAN *et al.*, 2011). Schroder e colaboradores (2002) investigaram a inserção do HIV-1 e de vetores derivados do HIV-1 em linhagens linfoides humanas, e encontraram que as regiões gênicas são fortes sítios receptores de integração lentiviral e, uma análise global dos transcritos indicou que os genes ativos são alvos preferenciais para integração do HIV. Russo-Carbolante e colaboradores (2011) também observaram um padrão preferencial de vetores lentivirais, carreando o fator VIII de coagulação sanguínea, por regiões gênicas de células de linhagens renais e hepáticas. Em 2006, Laufs e colaboradores, demonstraram que a integração de vetores lentivirais em células precursoras hematopoiéticas humanas, que foram capazes de repopular a hematopoiese em camundongos *NOD/SCID*, preferencialmente ocorrem em regiões codificantes do genoma humano.

Mais recentemente, Markman e colaboradores (2011) avaliaram o perfil de integração de um vetor lentiviral em células pluripotentes de carcinoma embrionário humano, e identificaram a mesma preferência do vetor derivado de HIV-1 por regiões gênicas,

mostrando que mesmo para um tipo celular tão distinto dos outros já estudados, o padrão se mantém.

Essa preferência dos lentivírus e vetores lentivirais derivados do HIV-1 por regiões gênicas pode ser dirigida pela proteína celular LEDGF/p75, que se liga a proteína integrase e a carrega para a cromatina (CHERPANOV *et al.*, 2003; CHERPANOV *et al.*, 2004; LLANO *et al.*, 2006; MAERTENS *et al.*, 2003; SHUN *et al.*, 2007; VANEGAS *et al.*, 2005). Dessa maneira, as integrações ocorrendo predominantemente em genes indica que a proteína LEDGF/p75 também desempenha um papel importante nos tipos celulares estudados.

No presente estudo, as análises dos genes atingidos pelos vetores lentivirais identificou alguns genes comuns para ambos os vetores, que foram atingidos em ambas as células independentemente (Tabela 11). Os genes comumente atingidos (CNRNA7, CNIH3, PARP1 e AXIN2) estão relacionados a processos como comunicação celular, transdução de sinal, reparo do DNA e manutenção de telômeros, porém não estão relacionados entre si nem a nenhuma função em comum. Esse achado de genes igualmente atingidos em mais de uma linhagem de célula iPS difere dos achados da literatura. Em 2009, Varas e colaboradores utilizaram quatro clones de iPS 4FT derivadas de fibroblastos estabelecidos a partir de biópsias da cauda de camundongos, e dois clones de iPS 4FT derivadas de fibroblastos embrionários murinos, para determinar o perfil de integração do vetor retroviral pMX. O grupo determinou que não houve genes comuns entre as células transduzidas com o vetor retroviral e, concluiu que os 4FT inseridos seriam suficientes para induzir a reprogramação em fibroblastos. Winkler e colaboradores (2010) avaliaram o perfil de integração em oito linhagens de iPS 4FT derivadas de fibroblastos fetais humanos ou de fibroblastos de pele de recém-nascido transduzidas com vetores lentivirais expressando os FT OCT4, SOX2, NANOG e LIN28, e também não identificaram nenhum gene comumente atingido em todas as linhagens, de maneira que concluíram que a reprogramação de células somáticas humanas parece não depender da ativação/desativação de genes específicos induzidas pela integração lentiviral. Em nosso estudo, a inserção em genes comuns nas duas células estudadas poderia significar que a inserção nesses sítios estaria relacionada com um aumento na reprogramação, ligado a alguma de suas funções, apesar de não demonstrarem nenhuma função em comum. Entretanto, esses genes foram atingidos apenas uma vez em cada célula, podendo ser apenas inserções aleatórias. Mais análises são necessárias para avaliar se esses sítios se repetem e se esses sítios em comum se mantêm.

Observamos também que um conjunto de genes, três afetados pelo vetor pLenti-cPPT-C(FT)IGSW nas células TSM (CTAGE5, DST e PIK3R1) e três afetados pelo vetor EF1 α -

hSTEMCCA-LoxP nas células *iPS* 4FT (MTUS1, PLEC e UTRN) formam um grupo de proteínas relacionadas com divisão celular e distribuição de cromossomos. A inserção em algum desses genes poderia afetar esses processos, levando a uma divisão celular anormal ou causando quebras em cromossomos. E ainda, a inserção nesses genes poderia auxiliar a reprogramação devido a participação de suas proteínas na divisão e proliferação celular, dado que as células pluripotentes tem como característica um crescimento acelerado em comparação com outros tipos celulares, como as células somáticas.

A análise da participação de alguns genes afetados em vias metabólicas, mostrou que quatro genes afetados na célula TSM (ACTN2, FGF13, ITGA9 e PIK3R1) e três genes afetados na célula *iPS* 4FT (CYFIP2, DIAPH2 e MSN) participam da via de regulação do citoesqueleto de actina, uma proteína relacionada com o controle da forma celular, distribuição das proteínas de membrana e tráfego intracelular (EITZEN, 2003). Esses genes estão amplamente distribuídos nessa via de regulação, e inserções poderiam afetar a produção de fatores quimiotáticos ou ainda afetar adesões focais, junções relacionadas à adesão célula-matriz.

Identificamos também dois genes afetados (AR – TSM; MXI1 – *iPS* 4FT) que estão relacionados a suscetibilidade ao câncer de próstata. O AR está relacionado ao desenvolvimento e manutenção das características sexuais masculinas (HEINLEIN & CHANG, 2002), além de estarem relacionados a fertilidade feminina (WALTER *et al.*, 2010). O MXI1 tem como produto uma proteína que inibe a atividade transcricional de C-MYC, conhecido oncogene, utilizado nos protocolos de geração de *iPS*, fortemente regulado em células normais e frequentemente desregulado em cânceres humanos. Dessa forma, uma mutação por inserção nesse gene supressor tumoral MXI1 poderia levar a um fenótipo maligno, pela desregulação de C-MYC.

Quanto a inserção em regiões do genoma como ilhas CpG e sítios de início de transcrição (TSS), os vetores mostraram preferência por regiões muito distantes das regiões de TSS ($p < 0,0001$). As integrações ocorreram, com maior frequência, distantes das ilhas CpG, e, apesar de encontrarmos frequências relativamente altas em regiões a ± 5 Kb de distância da ilha CpG mais próxima, a estatística não confirmou uma preferência por esses sítios (TSM: $p = 0,1717$; *iPS* 4FT: $p = 0,1778$). As ilhas CpG, as quais estão frequentemente associadas com regiões regulatórias, como promotores que são transcripcionalmente ativos em diferentes estágios do desenvolvimento e podem também estar associadas com origens de replicação (ANTEQUERA & BIRD, 1999) são um sítio preferencial de MLV, assim como as regiões de TSS (WU *et al.*, 2003; MITCHELL *et al.*, 2004; LAUFS *et al.*, 2004; AMBROSI *et al.*, 2008)

e tem sido descrito como um fator contribuinte para a sua alta genotoxicidade (KIM *et al.*, 2008).

Observamos também a integração dos vetores em regiões de sítios frágeis do genoma humano. As regiões de sítio frágil apresentam uma instabilidade cromossômica e consistem em locais nos cromossomos metafásicos suscetíveis a quebras. Essas regiões têm sido associadas com instabilidade genômica em células cancerígenas e com a paralisação da resposta ao dano no DNA durante a replicação. Estudos têm mostrado que os sítios frágeis são sítios recorrentes de deleções e outros rearranjos cromossômicos em células tumorais (DURKIN & GLOVER, 2007). No presente estudo, os vetores lentivirais integraram-se com uma frequência alta nessas regiões (TSM: 23,8%; iPS 4FT: 31,4%), e inserções nessas regiões poderiam causar mutações e alterações cromossômicas.

Os vetores lentivirais utilizados no presente estudo também inseriram-se em regiões repetitivas do genoma humano, com frequências de 42,1% nas células TSM e de 45,3% nas iPS 4FT. Essas frequências podem parecer altas, porém esses elementos repetitivos respondem por quase metade da massa do genoma humano, mas inativos, e, dessa maneira, a probabilidade dos vetores atingirem algum elemento é alta. Dessas inserções em regiões repetitivas, 37,3% atingiram elementos LINE/L1 nas células TSM e 27% nas iPS 4FT, elementos mais encontrados em regiões ricas em AT (ROY-ENGEL, 2012).

Em suma, o presente trabalho mostrou o perfil de integração de dois vetores lentivirais utilizados para introduzir FT relacionados a pluripotência em células diferenciadas, para a geração de iPS. Apenas um estudo na literatura investiga o perfil de inserção lentiviral em linhagens de iPS humanas (WINKLER *et al.*, 2010). Outros estudos relatam sobre sítios de integração encontrados em iPS murinas geradas utilizando vetores retrovirais derivados do MLV. Dadas as diferenças existentes entre células murinas e humanas como a transformação mais fácil das células murinas comparadas com qualquer tipo celular humano, e a baixa eficiência de geração de iPS humanas comparadas com iPS murinas, é importante a realização de estudos de integração, especificamente em linhagens de iPS humanas.

O presente trabalho identificou genes comumente afetados nas duas linhagens, que poderia auxiliar na reprogramação, porém mais análises são necessárias para comprovar essa relação. Um grupo de genes relacionados devido as suas funções similares foi afetado pelas inserções lentivirais e este poderia estar relacionado a reprogramação devido a participação de suas proteínas na divisão e proliferação celular, pois as células pluripotentes tem como característica um crescimento acelerado em comparação com outros tipos celulares, como as células somáticas.

Em suma, nosso trabalho mostrou que o local da integração pode contribuir para a reprogramação e, apesar de possíveis efeitos negativos das integrações, estas células ainda são uma ferramenta importante para estudos *in vitro*. E mesmo que sistemas não-integrativos sejam eventualmente utilizados para aplicações clínicas futuras, essa caracterização é interessante não somente para o entendimento dos fatores envolvidos na reprogramação, mas também para o entendimento dos fatores que interferem na seleção dos sítios de integração, de modo que seja possível a determinação de regiões cromossômicas “seguras” para direcionar a integração, aumentando sua segurança.

Conclusão

7 Conclusão

- ✓ Neste trabalho foi realizada a caracterização do perfil de integração dos vetores lentivirais pLenti-cPPT-C(FT)IGWS e EF1 α -hSTEMCCA-LoxP em fibroblastos e células mesequimais derivadas de tecido adiposo para reprogramá-las à pluripotência.
- ✓ A linhagem de célula reprogramada com a inserção de três fatores de transcrição [TCL-1A, SOX2 e C-MYC (TSM)] foi caracterizada previamente.
- ✓ A linhagem de *iPS* obtida a partir da inserção de um vetor policistrônico carreando os quatro fatores clássicos de pluripotência (*iPS* 4FT) apresentou características de células pluripotentes: morfologia característica de CTE, alta expressão de fosfatase alcalina, formação de corpos embrioides *in vitro* e expressão de OCT4, SOX2 e NANOG.
- ✓ A determinação do número de cópias virais inseridas revelou que a utilização de 3 vetores separados versus 1 vetor com 4 FT resultou em um número muito maior de cópias integradas e um padrão bastante heterogêneo quando colônias isoladas são comparadas entre si quanto a essa quantificação.
- ✓ O perfil de integração lentiviral, obtida pelo sequenciamento das junções entre o DNA genômico e o DNA do vetor inserido, através da técnica de LM-PCR revelou um padrão não-randômico de integração, com uma preferência por cromossomos específicos, como os cromossomos 20, 11 e 15.
- ✓ Os vetores utilizados apresentaram um perfil de integração muito semelhante, com preferência por regiões gênicas e integração em sítios comuns.
- ✓ Identificamos genes afetados cujas proteínas estão envolvidas no ciclo celular, de maneira que estas integrações podem causar divisão e proliferação anormal.
- ✓ Este trabalho mostrou que o local da integração pode contribuir para a reprogramação.
- ✓ Apesar de possíveis efeitos negativos das integrações, estas células ainda são uma ferramenta importante para estudos *in vitro*.

Referências Bibliográficas

8 Referências Bibliográficas

- ADACHI, K., SUEMORI, H., YASUDA, S.Y., NAKATSUJI, N. & KAWASE, E. 2010. Role of *SOX2* in maintaining pluripotency of human embryonic stem cells. *Genes Cells*, **15**: p. 455-70.
- AMBROSI, A., CATTOGLIO, C., DI SERIO, C. 2008. Retroviral integration process in the human genome: is it really non-random? A new statistical approach. *PLoS Comput Biol*, **4**(8).
- ANTEQUERA, F. & BIRD, A. 1999. CpG islands as genomic footprints of promoters that are associated with replication origins. *Curr Biol*, **9**: p. 661-7.
- AOI, T., et al. 2008. Generation of pluripotent stem cells from adult mouse liver and stomach cells. *Science*, **321**(5889): p. 699-702.
- APPELT, J.U., GIORDANO, F.A., ECKER, M., ROEDER, I., GRUND, N., HOTZ-WAGENBLATT, A., OPELZ, G., ZELLER, W.J., ALLGAYER, H., FRUEHAUF, S., LAUFS, S. 2009. *QuickMap*: a public tool for large-scale gene therapy vector insertion site mapping and analysis. *Gene Ther.* **16**(7): p. 885-93.
- BARR, S.D., et al. 2005. Integration targeting by avian sarcoma-leukosis virus and human immunodeficiency virus in the chicken genome. *J Virol*, **79**(18): p. 12035-44.
- BONETTA, L. 2002. Leukemia case triggers tighter gene-therapy controls. *Nat. Med.*, **8**: p. 1189.
- BOYER, L., LEE, T., COLE, M., JOHNSTONE, S., LEVINE, S., ZUCKER, J., GUENTHER, M., KUMAR, R., MURRAY, H., JENNER, R., GIFFORD, D., MELTON, D., JAENISCH, R. & YOUNG, R. 2005. Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell*, **122**: p. 947-56.
- BOYER, L., MATHUR, D. & JAENISCH, R. 2006. Molecular control of pluripotency. *Curr*

Opin Genet Dev, **16**: p. 455-62.

BRADY, T., *et al.* 2009a. HIV integration site distributions in resting and activated CD4⁺ T cells infected in culture. *AIDS*, **23**(12): p. 1461-71.

BRADY, T., *et al.* 2009b. Integration target site selection by a resurrected human endogenous retrovirus. *Genes Dev*, **23**(5): p. 633-42.

BUSHMAN, F.D. & CRAIGIE, R. 1990. Sequence requirements for integration of Moloney murine leukemia virus DNA in vitro. *J Virol*, **64**(11).

CAREY, B.W., MARKOULAKIS, S., HANNA, J., SAHA, K., GAO, Q., MITALIPOVA, M., JAENISCH, R. 2009. Reprogramming of murine and human somatic cells using a single polycistronic vector. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **106**(1): p. 157-62.

CHANG, C.W., LAI, Y.I., PAWLIK, K.M., LIU, K., SUN, C.W., LI, C., SCHOEB, T.R., TOWNES, T.M. 2009. Polycistronic lentiviral vector for “hit and run” reprogramming of adult skin fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Stem Cells*, **27**(5): p. 1042-9.

CHARNEAU, P., ALIZON, M., CLAVEL, F. 1992. A second origin of DNA plusstrand synthesis is required for optimal human immunodeficiency virus replication. *J Virol*, **66**: p. 2814-20.

CHEREpanov, P. MAERTENS, G., PROOST, P., DEVREESE, B., VAN BEEUMEN, J., ENGELBORGHs, Y., DE CLERCQ, E., DEBYSER, Z. 2003. HIV-1 integrase forms stable tetramers and associates with LEDGF/p75 protein in human cells. *J Biol Chem*, **278**: p. 372-381.

CHEREpanov, P., DEVROE, E., SILVER, P.A., ENGELMAN, A. 2004. Identification of an evolutionarily conserved domain in human lens epithelium-derived growth-factor/transcriptional co-activator p75 (LEDGF/p75) that binds HIV-1 integrase. *J Biol Chem*, **279**.

- CHEREPANOV, P., *et al.* 2005. Structural basis for the recognition between HIV-1 integrase and transcriptional coactivator p75. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**(48).
- CHEW, J., LOH, Y., ZHANG, W., CHEN, X., TAM, W., YEAP, L., LI, P., ANG, Y., LIM, B., ROBSON, P. & NG, H. 2005. Reciprocal transcriptional regulation of Pou5f1 and SOX2 via the Oct3/4/SOX2 complex in embryonic stem cells. *Mol Cell Biol*, **25**: p. 6031-46.
- CHIN, M.H., PELLEGRINI, M., PLATH, K., LOWRY, W.E. 2010. Molecular analyses of human induced pluripotent stem cells and embryonic stem cells. *Cell Stem Cell*, **7**(2): p. 263-9.
- CHOW, S.A. & BROWN, P.O. 1994. Juxtaposition of two viral DNA ends in a bimolecular disintegration reaction mediated by multimers of human immunodeficiency virus type 1 or murine leukemia virus integrase. *J Virol*, **68**(12): p. 7869-78.
- CIUFFI, A., *et al.* 2006. Integration site selection by HIV-based vectors in dividing and growth-arrested IMR-90 lung fibroblasts. *Mol Ther*, **13**(2): p. 366-73.
- CIUFFI, A. & BUSHMAN, F.D. 2006. Retroviral DNA integration: HIV and the role of LEDGF/p75. *Trends Genet*, **22**(7): p. 388-95.
- COCKRELL, A.S., KAFRI, T. 2007. Gene delivery by lentivirus vectors. *Mol Biotechnol*, **36**(3): p. 184-204.
- COWAN, C.A. *et al.* 2005 Nuclear reprogramming of somatic cells after fusion with human embryonic stem cells. *Science*, **309**(5739): p. 1369-1373.
- DALBY, B., CATES, S., HARRIS, A., OHKI, E.C., TILKINS, M.L., PRICE, P.J. & CICCARONE, V.C. 2004. Advanced transfection with *Lipofectamine* 2000 reagent: primary neurons, siRNA, and high-throughput applications. *Methods*, **33**: p. 95-103.
- DALEY, G.Q. & SCADDEN, D.T. 2008 Prospects for stem cell-based therapy. *Cell*, **132**(4):

p. 544-8.

DALEY, G.Q., LENSCH, M.W., JAENISCH, R., MEISSNER, A., PLATH, K., YAMANAKA, S. 2009. Broader implications of defining standards for the pluripotency of iPSCs. *Cell Stem Cell*, 4(3): p. 200-1; author reply 202.

DANG, C.V., O'DONNELL, K.A., ZELLER, K.I., NGUYEN, T., OSTHUS, R.C. & LI, F. 2006. The c-Myc target gene network. *Semin Cancer Biol*, 16: p. 253-64.

DA SILVA, W.F., EGAMI, M.I., SANTOS, A.A., ANTONIAZZI, M.M., SILVA, M., GUTIERRE, R.C., PAIVA, M.J.R. Cytochemical, immunocytochemical and ultrastructural observations on leukocytes and thrombocytes of fat snook. 2011. *Fish & Shellfish Immunology*, 31(4): p. 571-7.

DELELIS, O., CARAYON, K., SAIB, A., DEPREZ, E., MOUSCADET, J-F. 2008. Integrase and integration: biochemical activities of HIV-1 integrase. *Retrovirology*, 5: p. 114.

DELEND, C. 2004. Lentiviral vectors: optimization of packaging, transduction and gene expression. *J Gene Med*, 6: p. 125-38.

DIMOS, J.T., RODOLFA, K.T., NIAKAN, K.K., WEISENTHAL, L.M., MITSUMOTO, H., CHUNG, W., CROFT, G.F., SAPHIER, G., LEIBEL, R., GOLAND, R., WICHTERLE, H., HENDERSON, C.E., EGGAN, K. 2008. Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons. *Science*, 321(5893): p. 1218-21.

DONELLO, J.E., LOEB, J.E. & HOPE, T.J. 1998. Woodchuck hepatitis virus contains a tripartite posttranscriptional regulatory element. *J Virol*, 72: p. 5085-92.

DULL, T, ZUFFEREY, R., KELLY, M., et al. 1998. A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system. *J Virol*, 72(11): p. 8463-71.

DURKIN, S.G. & GLOVER, T.W. 2007. Chromosome fragile sites. *Annu Rev Genet*, 41: p.

169-92.

EBERT, A.D., YU, J., ROSE, F.F.Jr, MATTIS, V.B., LORSON, C.L., THOMSON, J.A., SVENDSEN, C.N. 2009. Induced pluripotent stem cells from a spinal muscular atrophy patient. *Nature*, **457**: p. 277-80.

EITZEN, G. Actin remodeling to facilitate membrane fusion. 2003. *Biochim. Biophys. Acta*, **18**: p. 175-81.

ELLIS, J., BRUNEAU, B.G., KELLER, G., LEMISCHKA, I.R., NAGY, A., ROSSANT, J., SRIVASTAVA, D., ZANDSTRA, P.W., STANFORD, W.L. 2009. Alternative induced pluripotent stem cell characterization criteria for in vitro applications. *Cell Stem Cell*, **4**(3): p. 198-199; author reply 202.

ESCORS, D. & BRECKPOT, K. 2010. Lentiviral vectors in gene therapy: their current status and future potential. *Arch. Immunol. Ther. Exp.*, **58**: p. 107-19.

FAIRMAN, M. & STILLMAN, B. 1988. Cellular factors required for multiple stages of SV40 DNA replication *in vitro*. *EMBO J*, **7**: p. 1211-8.

FELICE, B., *et al.* 2009. Transcription factor binding sites are genetic determinants of retroviral integration in the human genome. *PLoS One*, **4**(2): p. e4571.

FOLLENZI, A., AILLES, L.E., BAKOVIC, S., *et al.* 2000. Gene transfer by lentiviral vectors is limited by nuclear translocation and rescued by HIV-1 pol sequences. *Nat Genet*, **25**(2): p. 217-22.

FOLLENZI, A. & NALDINI, L. 2002. Generation of HIV-1 derived lentiviral vectors. *Methods Enzymol*, **346**: p. 454-65.

FREED, E.O. 2001. HIV-1 replication. *Somat Cell Mol Genet*, **26**(1-6): p. 13-33.

GE, H., SI, Y., & ROEDER, R.G. 1998. Isolation of cDNAs encoding novel transcription

coactivators p52 and p75 reveals an alternate regulatory mechanism of transcriptional activation. *EMBO J*, **17**(22): p. 6723-9

GRAHAM, F., SMILEY, J., RUSSELL, W. & NAIRN, R. 1977. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol*, **36**: p. 59-74.

HACEIN-BEY-ABINA, S., DE SAINT BASILE, G., & CAVAZZANA-CALVO, M. 2003. Gene therapy of X-linked severe combined immunodeficiency. *Methods Mol. Biol.*, **215**: p. 247-59.

HANNA, J., WERNIG, M., MARKOULAKI, S., SUN, C.W., MEISSNER, A., CASSADY, J.P., BEARD, C., BRAMBRINK, T., WU, L.C., TOWNES, T.M., JAENISCH, R. 2007. Treatment of sickle cell anemia mouse model with iPS cells generated from autologous skin. *Science*, **318**: p. 1920-3.

HANNA, J.H., SAHA, K., & JAENISCH, R. 2010. Pluripotency and Cellular reprogramming: Facts, Hypotheses, Unresolved Issues. *Cell*, **143**: p. 508-25.

HEINLEIN, C.A. & CHANG, C. Androgen receptor in prostate cancer. 2004. *Endocr. Rev.*, **25** (2): p. 276-308.

HENNECKE, M., KWISSA, M., METZGER, K., OUMARD, A., KRÖGER, A., SCHIRMBECK, R., REIMANN, J. & HAUSER, H. 2001. Composition and arrangement of genes define the strength of IRES-driven translation in bicistronic mRNAs. *Nucleic Acids Res*, **29**: p. 3327-34.

HENTZE, H., SOONG, P., WANG, S., PHILLIPS, B., PUTTI, T. & DUNN, N. 2009. Teratoma formation by human embryonic stem cells: Evaluation of essential parameters for future safety studies. *Stem Cell Res.*, **2**(3): p. 198-210.

HOCHEDLINGER, K. & JAENISCH, R. 2006. Nuclear reprogramming and pluripotency. *Nature*, **441**(7097): p. 1061-7.

- HOTTA, A. & ELLIS, J. 2008. Retroviral vector silencing during iPS cell induction: an epigenetic beacon that signals distinct pluripotent states. *J Cell Biochem*, **105**: p. 940-8.
- HUANGFU, D., OSAFUNE, K., MAEHR, R., GUO, W., EIJKELENBOOM, A., CHEN, S., MUHLESTEIN, W. & MELTON, D. 2008. Induction of pluripotent stem cells from primary human fibroblasts with only *Oct3/4* and *SOX2*. *Nat Biotechnol*, **26**: p. 1269-75.
- INSTITUT PASTEUR. 2004. Use of triplex structure DNA in transferring nucleotide sequences. US6682907.
- ITZHAKI, I., MAIZELS, L., HUBER, I., ZWI-DANTSIS, L., CASPI, O., WINTERSTERN, A., FELDMAN, O., GEPSTEIN, A., ARBEL, G., HAMMERMAN, H., BOULOS, M., GEPSTEIN, L. 2011. Modelling the long QT syndrome with induced pluripotent stem cells. *Nature*, **471**: p. 225-9.
- JAENISCH, R. & YOUNG, R. 2008. Stem cells, the molecular circuitry of pluripotency and nuclear reprogramming. *Cell*, **132**: p. 567-82.
- JANG, J., KANG, H.C., KIM, H.S., KIM, J.Y., HUH, Y.J., KIM, D.S., YOO, J.E., LEE, J.A., LIM, B., LEE, J., YOON, T.M., PARK, I.H., HWANG, D.Y., DALEY, G.Q., KIM, D.W. 2011. Induced pluripotent stem cell models from X-linked adrenoleukodystrophy patients. *Ann Neurol*, **70**: p. 402-9.
- JONES, I.M. & MORIKAWA, Y. 1998. The molecular basis of HIV capsid assembly. *Rev Med Virol*, **8**: p. 87-95.
- KANG, H.Y., TSAI, M.Y., CHANG, C. et al. 2003. Mechanisms and Clinical Relevance of Androgens and Androgen Receptor Actions. *Chang Gung Med J*, **26**: p. 388-402.
- KATZ, R.A., SKALKKA, A.M. 1994. The retroviral enzymes. *Annu Rev Biochem*, **63**: p. 133-173.

- KIM, V.N., MITROPHANOUS, K., KINGSMAN, S.M., KINGSMAN, A.J. 1998. Minimal requirement for a lentivirus vector based on human immunodeficiency virus type 1. *J Virol*, **72**(1): p. 811-6.
- KIM, J.B., ZAEHRES, H., WU, G., GENTILE, L., KO, K., SEBASTIANO, V., ARAÚZO-BRAVO, M.J., RUAU, D., HAN, D.W., ZENKE, M. & SCHÖLER, H.R. 2008. Pluripotent stem cells induced from adult neural stem cells by reprogramming with two factors. *Nature*, **454**: p. 646-50.
- KU, S., SORAGNI, E., CAMPAU, E., THOMAS, E.A., ALTUN, G., LAURENT, L.C., LORING, J.F., NAPIERALA, M., GOTTESFELD, J.M. 2010. Friedreich's ataxia induced pluripotent stem cells model intergenerational GAA•TTC triplet repeat instability. *Cell Stem Cell*, **7**: p. 631-7.
- KURODA, T., TADA, M., KUBOTA, H., KIMURA, H., HATANO, S., SUEMORI, H., NAKATSUJI, N. & TADA, T. 2005. Octamer and Sox elements are required for transcriptional cis regulation of Nanog gene expression. *Mol Cell Biol*, **25**: p. 2475-85.
- LAUFS, S. et al. 2003. Retroviral vector integration occurs into preferred genomic targets of human bone marrow-repopulating cells. *Blood*, **101**: p. 2191-8.
- LAUFS, S., GUENECHEA, G., GONZALES-MURILLO, A., NAGY, K.Z., LOZANO, M.L., DEL VAL, C., JONNAKUTY, S., HOTZ-WAGENBLATT, A., ZELLER, W.J., BUEREN, J.A., FRUEHAUF, S. 2006. Lentiviral vector integration sites in human NOD/SCID repopulating cells. *J Gene Med*, **8**: p. 1197-1207.
- LEWIS, P., HENSEL, M., EMERMAN, M. 1992. Human immunodeficiency virus infection of cells arrested in the cell cycle. *EMBO J*, **11**(8): p. 3053-8.
- LEWIS, P.F., EMERMAN, M. 1994. Passage through mitosis is required for oncoretrovirus but not for the human immunodeficiency virus. *J Virol*, **68**(1): p. 510-6.

- LEWITZKY, M. & YAMANAKA, S. 2007. Reprogramming somatic cells towards pluripotency by defined factors. *Curr Opin Biotechnol*, **18**: p. 467-73.
- LI, Z., DULLMANN, J., SCHIEDLMEIER, B., SCHMIDT, M., VON KALLE, C., MEYER, J., FORSTER, M., STOCKING, C., WAHLERS, A., FRANK, O., OSTERTAG, W., KUHLCHE, K., ECKERT, H.G., FEHSE, B., BAUM, C. 2002. Murine leukemia induced by retroviral gene marking. *Science*, **296**: p. 497.
- LIU, G.H., BARKHO, B.Z., RUIZ, S., DIEP, D., QU, J., YANG, S.L., PANOPOULOS, A.D., SUZUKI, K., KURIAN, L., WALSH, C., THOMPSON, J., BOUE, S., FUNG, H.L., SANCHO-MARTINEZ, I., ZHANG, K., YATES, J. 3rd, IZPISUA-BELMONTE, J.C. 2011. Recapitulation of premature ageing with iPSCs from Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Nature*, **472**: p. 221-5.
- LLANO, M., SAENZ, D.T., MEEHAN, A., WONGTHIDA, P., PERETZ, M., WALKER, W.H., TEO, W., POESCHLA, E.M. AN essential role for LEDGF/p75 in HIV integration. *Science*, **314**: p. 461.
- LOWRY, W., RICHTER, L., YACHECHKO, R., PYLE, A., TCHIEU, J., SRIDHARAN, R., CLARK, A. & PLATH, K. 2008. Generation of human induced pluripotent stem cells from dermal fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **105**: p. 2883-8.
- MAERTENS, G., CHEREPANOV, P., PLUYMERS, W., BUSSCHOTS, K., DE CLERCQ, E., DEBYSER, Z., ENGELBORGH, Y. 2003. LEDGF/p75 is essential for nuclear and chromosomal targeting of HIV-1 integrase in human cells. *J Biol Chem*, **278**.
- MAHERALI, N. & HOCHEDLINGER, K. 2008. Guidelines and techniques for the generation of induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*, **3**(6): p. 595-605.
- MAHERALI, N., SRIDHARAN, R., XIE, W., UTIKAL, J., EMINLI, S., ARNOLD, K., STADTFELD, M., YACHECHKO, R., TCHIEU, J., JAENISCH, R., PLATH, K. &

- HOCHEDLINGER, K. 2007. Directly reprogrammed fibroblasts show global epigenetic remodeling and widespread tissue contribution. *Cell Stem Cell*, **1**: p. 55-70.
- MANNI, I., TUNICI, P., CIRENEI, N., ALBAROSA, R., COLOMBO, B.M., ROZ, L., SACCHI, A., PIAGGIO, G., FINOCCHIARO, G. 2002. Mxi1 inhibits the proliferation of U87 glioma cells through down-regulation of cyclin B1 gene expression. *Br. J. Cancer*, **86**: p. 477-84.
- MARCHETTO, M.C., CARROMEU, C., ACAB, A., YU, D., YEO, G.W., MU, Y., CHEN, G., GAGE, F.H., MUOTRI, A.R. 2010. A model for neural development and treatment of Rett syndrome using human induced pluripotent stem cells. *Cell*, **143**: p. 527-39.
- MARKMAN, J.L., SILVERS, R.M., NDOYE, A.M.N., GEARY, K.R., ALVARADO, D., SMITH, J.A., DANIEL, R. 2011. HIV-1 integration site preferences in pluripotent cells. *Frontiers in Biocscience E3*: p. 453-62.
- MARSHALL, E. 2003. Second child in French trial is found to have leukemia. *Science*, **299**: p. 320.
- MASTROMARINO, P., CONTI, C., GOLDONI, P., HAUTTECOEUR, B. & ORSI, N. 1987. Characterization of membrane components of the erythrocyte involved in vesicular stomatitis virus attachment and fusion at acidic pH. *J Gen Virol* **68**: p. 2359–69.
- MCGLYNN, L.K., MUELLER, C.R., BEGBIE, M., NOTLEY, C.R. & LILLICRAP, D. 1996. Role of the liver-enriched transcription factor hepatocyte nuclear factor 1 in transcriptional regulation of the factor V111 gene. *Mol Cell Biol* **16**: p. 1936–45.
- MITCHELL, R.S., BEITZEL, B.F., SCHRODER, A.R., SHINN, P., CHEN, H., BERRY, C.C., ECKER, J.R., BUSHMAN, F.D. 2004. Retroviral DNA integration: ASLV, HIV, and MLV show distinct target site preferences. *PLoS Biol*, **2**(8): E234.
- MONTINI, E., CESANA, D., SCHMIDT, M., et al. 2006. Hematopoietic stem cell gene

transfer in a tumor-prone mouse model uncovers low genotoxicity of lentiviral vector integration. *Nat Biotech*, **24**: p. 687-696.

MONTINI, E., CESANA, D., SCHMIDT, M., et al. 2009. The genotoxic potential of retroviral vectors is strongly modulated by vector design and integration site selection in a mouse model of HSC gene therapy. *J Clin Invest*, **119**: p. 964-975.

MURRY, C.E. & KELLER, G. 2008. Differentiation of embryonic stem cells to clinically relevant populations: lessons from embryonic development. *Cell*, **132**(4): p. 661-80.

MYOSHI, H., BLÖMER, U., TAKAHASHI, M., GAGE, F. H., VERMA, I. M. 1998. Development of a self-inactivating lentivirus vector. *J Virol*, **72**: p. 8150-7.

NAKAGAWA, M., KOYANAGI, M., TANABE, K., TAKAHASHI, K., ICHISAKA, T., AOI, T., OKITA, K., MOCHIDUKI, Y., TAKIZAWA, N. & YAMANAKA, S. 2008. Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nat Biotechnol*, **26**: p. 101-6.

NALDINI, L., BLÖMER, U., GALLAY, P., ORY, D., MULLIGAN, R., GAGE, F.H., VERMA, I.M. & TRONO, D. 1996. In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science*, **272**: p. 263-7.

NGUYEN, H.N., BYERS, B., CORD, B., SHCHEGLOVITOV, A., BYRNE, J., GUJAR, P., KEE, K., SCHULE, B., DOLMETSCH, R.E., LANGSTON, W., PALMER, T.D., PERA, R.R. 2011. LRRK2 mutant iPSC-derived neurons demonstrate increased susceptibility to oxidative stress. *Cell Stem Cell*, **8**: p. 267-80.

NIWA, H. 2007. How is pluripotency determined and maintained? *Development*, **134**: p. 635-46.

OKITA, K. & YAMANAKA, S. 2006. Intracellular signaling pathways regulating pluripotency of embryonic stem cells. *Curr Stem Cell Res Ther*, **1**: p. 103-11.

- OKITA, K., ICHISAKA, T. & YAMANAKA, S. 2007. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature*, **448**: p. 313-7.
- OKITA, K., NAKAGAWA, M., HYENJONG, H., ICHISAKA, T. & YAMANAKA, S. 2008. Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors. *Science*, **322**: p. 949-53.
- OKUMURA-NAKANISHI, S., SAITO, M., NIWA, H. & ISHIKAWA, F. 2005. Oct-3/4 and SOX2 regulate Oct-3/4 gene in embryonic stem cells. *J Biol Chem*, **280**: p. 5307-17.
- PAN, G., LI, J., ZHOU, Y., ZHENG, H. & PEI, D. 2006. A negative feedback loop of transcription factors that controls stem cell pluripotency and self-renewal. *FASEB J.* **20**: p. 1730-2.
- PARK, I.H., ARORA, N., HUO, H., MAHERALI, N., AHFELDT, T., SHIMAMURA, A., LENSCH, M.W., COWAN, C., HOCHEDLINGER, K. & DALEY, G.Q. 2008. Disease-Specific Induced Pluripotent Stem Cells. *Cell*, **134** (5): p. 877-86.
- PEREIRA, L. V. 2006. Células-tronco embrionárias e clonagem terapêutica. *In*: COVAS, D. T. & ZAGO, M. A. (eds.) Células-tronco: a nova fronteira da medicina. 1ª ed. São Paulo: Editora Atheneu.
- PICANÇO-CASTRO, V., RUSSO-CARBOLANTE, E.M.S., REIS, L.C.J., FRAGA, A.M., DE MAGALHÃES, D.A.R., ORELLANA, M.D., PANEPUCCI, R.A., PEREIRA, L.V. & COVAS, D.T. 2011. Pluripotent Reprogramming of Fibroblasts by Lentiviral-mediated Insertion of SOX2, C-MYC, and TCL-1A. *Stem Cells And Development*, **20**: p. 169-80.
- PICANÇO-CASTRO, V., FONTES, A.M. RUSSO-CARBOLANTE, E.M.S. & COVAS, D.T. 2008. Lentiviral mediated gene transfer – a patent review. *Expert Opin ther patents*. **18**(5): p. 525-39.
- POPA, I., HARRIS, M.E., DONELLO, J.E., HOPE, T.J. 2002. CRM1-dependent function of

a cis-acting RNA export elemento. *Mol Cell Biol*, 22(7): p. 2057-67.

RAMOS, R.G.P. Desenvolvimento embrionário. 2006. In: COVAS, D. T & ZAGO, M. A. (eds.) Células-tronco: A nova fronteira da medicina. 1ª ed. São Paulo: Editora Atheneu.

RASHID, S.T., CORBINEAU, S., HANNAN, N., MRCINIAK, S.J., MIRANDA, E., ALEXANDER, G., HUANG-DORAN, I., GRIFFIN, J., AHRLUND-RICHTER, L., SKEPPER, J., SEMPLE, R., WEBER, A., LOMAS, D.A., VALLIER, L. 2010. Modeling inherited metabolic disorders of the liver using human induced pluripotent stem cells. *J Clin Invest*, **120**: p. 3127-36.

RATTRAY, A.J., CHAMPOUX, J.J. 1989. Plus-strand priming by Moloney murine leukemia virus. The sequence features important for cleavage by RNase H. *J Mol Biol*, **208**: p. 445–56.

RIZZINO, A. 2009. *SOX2* and Oct-3/4: a versatile pair of master regulators that orchestrate the self-renewal and pluripotency of embryonic stem cells. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*, **1**: p. 228-36.

RODDA, D., CHEW, J., LIM, L., LOH, Y., WANG, B., NG, H. & ROBSON, P. 2005. Transcriptional regulation of nanog by *OCT3/4* and *SOX2*. *J Biol Chem*, **280**: p. 24731-7.

ROY-ENGEL, A.M. 2012. LINEs, SINEs and other retroelements: do birds of a feather flock together? *Frontiers in Bioscience*, **17**: p. 1345-61.

RUSSO-CARBOLANTE, E.M.S., PICANÇO-CASTRO, V., ALVES, D.C.C., FERNANDES, A.C., ALMEIDA-PORADA, G., TONN, T., COVAS, D.T. 2011. Integration pattern of HIV-1 based lentiviral vector carrying recombinant coagulation factor VIII in Sk-hep and 293T cells. *Biotechnol Lett*, **33**: p. 23-31.

SCHEPER, W. & COPRAY, S. 2009. The molecular mechanism of induced pluripotency: a two-stage switch. *Stem Cell Rev*, **5**: p. 204-23.

- SCHRODER, A.R., SHINN, P., CHEN, H., BERRY, C., ECKER, J.R., BUSHMAN, F. 2002. HIV-1 integration in the human genome favors active genes and local hotspots. *Cell*, **110**(4): p. 521-9.
- SEGRE, M. & GUZ, G. 2006. Aspectos éticos e legais das pesquisas e do tratamento com células-tronco. In: COVAS, D. T & ZAGO, M. A. (eds.) *Células-tronco: A nova fronteira da medicina*. 1ª ed. São Paulo: Editora Atheneu.
- SHI, Y., DESPONT, C., DO, J., HAHM, H., SCHÖLER, H. & DING, S. 2008. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic fibroblasts by *Oct3/4* and *Klf4* with small-molecule compounds. *Cell Stem Cell*, **3**: p. 568-74.
- SHINOHARA, T., SINGH, D.P., & FATMA, N. 2002. LEDGF, a survival factor, activates stress-related genes. *Prog Retin Eye Res*, **21**(3): p. 341-58.
- SHUN, M.C., RAGHAVENDRA, N.K., VANDEGRAAFF, N., DAIGLE, J.E., HUGHES, S., KELLAM, P., CHEREPANOV, P., ENGELMAN. 2007. LEDGF/p75 functions downstream from preintegration complex formation to effect gene-specific HIV-1 integration. *Genes Dev*, **21**: p. 1767.
- SOLDNER, F., HOCKEMEYER, D., BEARD, C., GAO, Q., BELL, G.W., COOK, E.G., HARGUS, G., BLAK, A., COOPER, O., MITALIPOVA, M., ISACSON, O., JAENISCH, R. 2009. Parkinson's disease patient-derived induced pluripotent stem cells free of viral reprogramming factors. *Cell*, **136**(5): p. 964-977.
- SOMMER, C.A. & MOSTOSLAVSKY, G. 2010. Experimental approaches for the generation of induced pluripotent stem cells. *Stem Cells Res Ther*, **1**(3): p. 26.
- SOMMER, C.A., STADTFELD, M., MURPHY, G.J., HOCHEDLINGER, K., KOTTON, D.N., MOSTOSLAVSKY, G. 2009. Induced pluripotent stem cell generation using a single lentiviral stem cell cassette. *Stem Cells*, **27**(3): p. 543-9.

- STADTFELD, M., NAGAYA, M., UTIKAL, J., WEIR, G. & HOCHEDLINGER, K. 2008. Induced pluripotent stem cells generated without viral integration. *Science*, **322**: p. 945-9.
- STUDAMIRE, B. & GOFF, S.P. 2008. Host proteins interacting with the Moloney murine leukemia virus integrase: multiple transcriptional regulators and chromatin binding factors. *Retrovirology*, **13**: p. 48.
- TAKAHASHI, K. & YAMANAKA, S. 2006. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, **126**: p. 663-76.
- TAKAHASHI, K., et al. 2007. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*, **131**(5): p. 861-72.
- THE SALK INSTITUTE FOR BIOLOGICAL STUDIES. 2000. RNA export element. US6136597.
- THE SALK INSTITUTE FOR BIOLOGICAL STUDIES. 2001. RNA export element and methods of use. US6287814.
- THOMSON, J., ITSKOVITZ-ELDOR, J., SHAPIRO, S., WAKNITZ, M., SWIERGIEL, J., MARSHALL, V. & JONES, J. 1998. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, **282**: p. 1145-7.
- TOMIOKA, M., NISHIMOTO, M., MIYAGI, S., KATAYANAGI, T., FUKUI, N., NIWA, H., MURAMATSU, M. & OKUDA, A. 2002. Identification of Sox-2 regulatory region which is under the control of Oct-3/4-Sox-2 complex. *Nucleic Acids Res*, **30**: p. 3202-13.
- TRONO, D. 2000. Lentiviral vectors: turning a deadly foe into a therapeutic agent. *Gene Ther*, **7**: p. 20-3.
- VANDEGRAAFF, N. & ENGELMAN, A. 2007. Molecular mechanisms of HIV integration and therapeutic intervention, *Expert Reviews in Molecular Medicine*, **9**: p. 1-19.

- VANEGAS, M., LLANO, M., DELGADO, S., THOMPSON, D., PERETZ, M., POESCHLA, E. 2005. Identification of LEDGF/p75 HIV-1 integrase-interaction domain and NLS reveals NLS-dependent chromatin tethering. *J Cell Sci*, **118**: p. 1733.
- VARAS, F., STADTFELD, M., DE ANDRES-AGUAYO, L., et al. 2008. Fibroblast derived induced pluripotent stem cells show no common retroviral vector insertions. *Stem Cells*, **27**: p. 300-306.
- VATAKIS, D.N., et al. 2009. Differentially stimulated CD4⁺ T cells display altered human immunodeficiency virus infection kinetics: implications for the efficacy of antiviral agents. *J Virol*, **83**(7): p. 3374-8.
- WALTERS, K.A., SIMANAINEN, U., & HANDELSMAN, D.J. 2010. Molecular insights into androgen actions in male and female reproductive functions from androgen receptor knockout models. *Hum. Reprod. Update*, **16**(5): p. 543-58.
- WANG, Y., MAH, N., PRIGIONE, A., WOLFRUM, K., ANDRADE-NAVARRO, M. & ADJAYE, J. 2010. A transcriptional roadmap to the induction of pluripotency in somatic cells. *Stem Cell Rev.*, **6**: p. 282-96.
- WARREN, L., MANOS, P.D., AHFELDT, T., LOH, Y.H., LI, H., LAU, F., EBINA, W., MANDAL, P.K., SMITH, Z.D., MEISSER, A., DALEY, G.Q., BRACK, A.S., COLLINS, J.J., COWAN, C., SCHLAEGER, T.M., ROSSI, D.J. 2010. Highly eficiente reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA. *Cell Stem Cell*, **7**(5): p. 618-30.
- WATANABE, S., TEMIN, H.M. 1982. Encapsidation sequences for spleen necrosis virus, an avian retrovirus, are between the 50 long terminal repeat and the start of the gag gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **79**: p. 5986-90.
- WELLENSICK, B.P., et al. 2009. Differential HIV-1 integration targets more actively

transcribed host genes in neonatal than adult blood mononuclear cells. *Virology*, **385**(1): p. 28-38.

WERNIG, M., MEISSNER, A., FOREMAN, R., BRAMBRINK, T., KU, M., HOCHEDLINGER, K., BERNSTEIN, B. & JAENISCH, R. 2007. In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. *Nature*, **448**: p. 318-24.

WERNIG, M., ZHAO, J.P., PRUSZAK, J., HEDLOND, E., FU, D., SOLDNER, F., BROCCOLI, V., CONSTANTINE-PATON, M., ISACSON, O., JAENISCH, R. 2008. Neurons derived from reprogrammed fibroblasts functionally integrate into the fetal brain and improve symptoms of rats with Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **105**(15): p. 5856-61.

WILMUT, I., et al. 2007. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Cloning Stem Cells*, **9**(1): p. 3-7.

WINKLER, T., CANTILENA, A., MÉTAIS, J-Y., Xu, X., NGUYEN, A-D., BORATE, B., ANTOSIEWICZ-BOURGET, J.E., WOLFSBERG, T.G., THOMSON, J.A., DUNBAR, C.E. 2010. No evidence for clonal selection due to lentiviral integration sites in human induced pluripotent stem cells. *Stem Cells*, **28**(4): p. 687-94.

WU, X., LI, Y., CRISE, B., BURGESS, S.M. 2003. Transcription start regions in the human genome are favored targets for MLV integration. *Science*, **300**(5626): p. 1749-51.

XU, D., ALIPIO, Z., FINK, L.M., ADCOCK, D.M., YANG, J., WARD, D.C., MA, Y. 2009. Phenotypic correction of murine hemophilia A using an iPS cell-based therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **106**(3): p. 808-13.

YAMANAKA, S. 2007. Strategies and new developments in the generation of patient-specific pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*, **1**(1): p. 39-49.

YAMANAKA, S. 2008. Pluripotency and nuclear reprogramming. *Philos Trans R Soc Lond*

B Biol Sci, **363**(1500): p. 2079-87.

YAZAWA, M., HSUEH, B., JIA, X., PASCA, A.M., BERNSTEIN, J.A., HALLMAYER, J., DOLMETSCH, R.E. 2011. Using induced pluripotent stem cells to investigate cardiac phenotypes in Timothy syndrome. *Nature*, **471**: p. 230-4.

YU, J., VODYANIK, M.A., SMUGA-OTTO, K., ANTOSIEWICZ-BOURGET, J., FRANE, J.L., TIAN, S., NIE, J., JONSDOTTIR, G.A., RUOTTI, V., STEWART, R., SLUKVIN, I.I. & THOMSON, J.A. 2007. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*, **318**: p. 1917-20.

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

ZAGO, M.A. 2006. Células-tronco: origens e propriedades. In: COVAS, D.T. & ZAGO, M.A. (eds.) *Células-tronco: a nova fronteira da medicina*. 1ª ed. São Paulo: Editora Atheneu.

ZENNOU, V., PETIT, C., GUETARD, D., et al. 2000. HIV-1 genome nuclear import is mediated by a central DNA flap. *Cell*, 101(2): p. 173-85.

ZHANG, M., GULLER, S. & HUANG, Y. 2007. Method to enhance transfection efficiency of cell lines and placental fibroblasts. *Placenta*, **28**: p. 779-82.

ZHANG, J., LIAN, Q., ZHU, G., ZHOU, F., SUI, L., TAN, C., MUTALIF, R.A., NAVASANKARI, R., ZHANG, Y., TSE, H.F., STEWART, C.L., COLMAN, A. 2011. A human iPSC model of Hutchinson Gilford Progeria reveals vascular smooth muscle and mesenchymal stem cell defects. *Cell Stem Cell*, **8**: p. 31-45.

ZHAO, X.Y., Li, W., LV, Z., LIU, L. TONG, M., HAI, T., HAO, J., GUO, C.L. MA, Q.W., WANG, L., ZENG, F., ZHOU, Q. 2009. iPS cells produce viable mice through tetraploid complementation. *Nature*, **461**(7260): p. 86-90.

ZHENG, C., YANG, S., GUO, Z., LIAO, W., ZHANG, L. YANG, R., HAN, Z. C. 2009. Human multipotent mesenchymal stromal cells from fetal lung expressing pluripotent markers and differentiating into cell types of three germ layers. *Cell Transplant.*, **18**: p. 1093-1109.

ZHOU, H., WU, S., JOO, J. Y., ZHU, S., HAN, D. W., LIN, T., TRAUGER, S., BIEN, G., YAO, S., ZHU, Y., SIUZDAK, G., SCHÖLER, H.R., DUAN, L. & DING, S. 2009. Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins. *Cell Stem Cell*, **4**: p. 381-4.

ZUFFEREY, R., NAGY, D., MANDEL, R.J., NALDINI, L. & TRONO, D. 1997. Multiply attenuated lentiviral vector achieves efficient gene delivery in vivo. *Nat Biotechnol*, **15**: p. 871-5.

ZUFFEREY, R., DULL, T., MANDEL, R.J., et al. 1998. Self-inactivating lentivirus vector for safe and efficient in vivo gene delivery. *J Virol*, 72(12): p. 9873-80.

ZUFFEREY, R., DONELLO, J.E., TRONO, D., HOPE, T.J. 1999. Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element enhances expression of transgenes delivered by retroviral vectors. *J Virol*, 73(4): p. 2886-92.

Anexos

9 Anexos

ANEXO A. Ofício do comitê de ética do HCRP-FMRP-USP.

www.hcrp.fmrp.usp.br

Ribeirão Preto, 30 de setembro de 2009

Ofício nº 3253/2009
CEP/MGV

PROCESSO HCRP nº 1986/2009

Prezado Professor:

O trabalho intitulado **“GERAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO PLURIPOTENTES INDUZIDAS (iPS) HUMANAS UTILIZANDO VETORES LENTIVIRAIS E ADENOVIRAIS”**, foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em sua 296ª Reunião Ordinária realizada em 28/09/2009, e enquadrado na categoria: **APROVADO**.

Entretanto, deve-se aguardar a manifestação da CONEP, pois o projeto será encaminhado para apreciação e aprovação.

Atenciosamente,

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

Ilustríssimo Senhor
PROF. DR. DIMAS TADEU COVAS
Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto

Comitê de Ética em Pesquisa HCRP e FMRP-USP - Campus Universitário
FWA – 0000 2733; IRB – 0000 2186 e Registro SISNEP/CONEP nº 4
Fone (16) 3602-2228 - E-mail : cep@hcrp.fmrp.usp.br
Monte Alegre 14048-900 Ribeirão Preto SP

ANEXO B. Ofício da CONEP que aprova a realização do projeto.

Mem. nº 722/2010
GS-3/SMFK

Ribeirão Preto, 11 de junho de 2010

Prezado Senhor
PROF. DR. DIMAS TADEU COVAS
Fundação Hemocentro

Senhor Professor,

Atendendo solicitação da Vice-Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa, Dr^a. Marcia Guimarães Villanova, encaminho a Vossa Senhoria Parecer CONEP nº 250/2010, referente ao Projeto de Pesquisa intitulado **“GERAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO PLURIPOTENTES INDUZIDAS (iPS) HUMANAS UTILIZANDO VETORES LENTIVIRAIS E ADENOVIRAIS”**, de acordo com o Processo HCRP nº 1986/2009.

O parecer informa que seu projeto encontra-se **APROVADO** na CONEP.
Atenciosamente.

SUSI MARA FURIAMA KATO
Diretora do Serviço de Comunicações Administrativas
R.F. nº 7882

Comitê de Ética em Pesquisa HC e FMRP-USP - Campus Universitário
Fone (16) 3602-2228 - E-mail : cep@hcrp.usp.br
Monte Alegre 14048-900 Ribeirão Preto SP

ANEXO C. Ofício do comitê de ética no uso de animais.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Campus de Ribeirão Preto
Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho (Protocolo nº 09.1.1353.53.5), intitulado "Geração de Células-Tronco Pluripotentes Induzidas (iPS) Humanas Utilizando Vetores Lentivirais e Adenovirais", de autoria de **Elisa Maria de Sousa Russo Carbolante**, por estar de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotado pela **Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)** do *Campus* de Ribeirão Preto – USP foi aprovado em reunião da CEUA de 07/04/2010.

This is to certify that the work (Protocol number 09.1.1353.53.5), entitled: "Geração de Células-Tronco Pluripotentes Induzidas (iPS) Humanas Utilizando Vetores Lentivirais e Adenovirais", by **Elisa Maria de Sousa Russo Carbolante**, is in accordance with the Ethic Principles in Animal Experimentation adopted by Ethic Commission for the Use of Animals (CEUA) of the Campus of Ribeirão Preto – USP, and was approved in the meeting, April 07, 2010.

Ribeirão Preto, 9 de abril de 2010.

Presidente da CEUA
Profa.Dra. Christie Ramos Andrade Leite Panissi

Secretária da CEUA
Maria Angélica Depiro