

ROBERTA FERRARI MOURÃO

**ANÁLISE COMPARATIVA DA POTÊNCIA DE DIFERENTES PROMOTORES EM VETORES
LENTIVIRAIS PARA TRANSDUÇÃO DE CÉLULA-TRONCO MESENQUIMAL DE PELE HUMANA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP / Instituto Butantã / IPT, para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

São Paulo
2013

ROBERTA FERRARI MOURÃO

**ANÁLISE COMPARATIVA DA POTÊNCIA DE DIFERENTES
PROMOTORES EM VETORES LENTIVIRAIS PARA
TRANSDUÇÃO DE CÉLULA-TRONCO MESENQUIMAL DE PELE
HUMANA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP / Instituto Butantã / IPT, para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

Área de Concentração: Biotecnologia

Orientador: Katiúcia Batista da Silva Paiva

Versão original

São Paulo
2013

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Mourão, Roberta Ferrari.

Análise comparativa da potencia de diferentes promotores em vetores lentivirais para transdução de célula-tronco mesenquimal de pele humana / Roberta Ferrari Mourão. -- São Paulo, 2013.

Orientador: Profa. Dra. Katiucia Batista da Silva Paiva.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de pesquisa: Produção de células-tronco pluripotentes induzidas (iPs cells).

Versão do título para o inglês: Comparative analysis of different promoters in lentiviral vectors to transduce human dermal mesenchymal stem cells.

1. Célula-tronco 2. Biologia celular 3. Biologia molecular
I. Paiva, Profa. Dra. Katiucia Batista da Silva II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan III. Título.

ICB/SBIB078/2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidato(a): Roberta Ferrari Mourão.

Título da Dissertação: Análise comparativa da potencia de diferentes promotores em vetores lentivirais para transdução de célula-tronco mesenquimal de pele humana.

Orientador(a): Profa. Dra. Katiucia Batista da Silva Paiva.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

Aprovado(a)

Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

Ao Fabricio, até hoje, a melhor escolha

que eu fiz.

*Ao meu pai que sempre acreditou em mim, e que é o melhor pai que
alguém pode ter.*

À minha irmã que, onde quer que esteja, estará sempre comigo.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Fernando Lojudice e a Prof^a Dr^a Katiúcia pela orientação. Ao Dr. Fernando pelas conversas, puxões de orelha e por ter acreditado em mim. Obrigado por tudo. A Prof^a. Katiúcia por ter me aceitado dessa maneira torta, mas mesmo assim por ter me ajudado muito em partes importantes desse projeto.

A Prof^a. Dr^a. Mari Cleide Sogayar, por ter aberto as portas do laboratório e pelos ensinamentos.

Ao Dr. Marcus Demasi, obrigada a você é muito pouco, mas enfim, muito obrigada por tudo.

A Dr^a Ana Claudia Carreira, “a oráculo”. Muito obrigada por tudo.

A Dr^a Maria Fernanda Forni pelas células-tronco utilizadas nesse trabalho, pela ajuda no final da tese (quando nós duas estávamos desesperadas), e por ter o email mais simples e ao mesmo tempo mais complicado que alguém pode ter.

Ao Dr. Renato Astorino Filho pelos plasmídeos utilizados nesse trabalho.

A Marina por ter me ajudado a desvendar o flowjo e por ser essa pessoinha doce.

A Marluce, Ilana e Patricia, obrigada pela ajuda em tudo, almoços, jantares, conversas, risadas e tudo o que uma grande amizade pode ter.

A Aline, Ana Lúcia, Éricas (com e sem k), Gisella, Gustavo, Letícia, Lu Gomes, Tati, sem vocês esses anos não seriam tão bons. Vou levar vocês comigo pra sempre.

Ao Dr. Miguel Garay Malpartida por me apresentar ao laboratório, pela amizade e orientação na minha iniciação.

A Prof^a Dr^a. Leticia Labriola e a Dr^a Theri Degaki pelas conversas, almoços e conselhos.

A Camila, Talita, Rosangela, Ancely, Luiz, Fernandinha e todos da UIPH e LBCM pelas risadas e pela amizade.

As técnicas Zizi, Débora e Sandra que sempre me ajudaram em tudo o que eu precisei, além de deixar o laboratório funcionando da melhor maneira possível.

A todos do laboratório da Prof^a Dr^a Renata Guimarães Moreira, “um pedacinho de Mogi aqui na USP”, em especial a Aline, Cris e Kadu, por tudo o que vocês representam pra mim.

A CAPES, CNPQ, FINEP, FAPESP e ao BNDES pelo financiamento.

E aos que me esqueci de agradecer.

“Tudo aquilo que o homem ignora, não existe pra ele.

Por isso o universo de cada um, se resume ao tamanho do seu saber.”

Albert Einstein

RESUMO

MOURÃO, R. F. **Análise comparativa da potência de diferentes promotores em vetores lentivirais para transdução de célula-tronco mesenquimal de pele humana.** 2013. 50 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

A habilidade das células-tronco de se diferenciar em diferentes tipos celulares faz delas fortes candidatas para serem utilizadas em terapias celulares como tratamento de diversas doenças. No entanto, para explorar este potencial é necessário o estabelecimento de estratégias efetivas para modificações genéticas nessas células. Associado a outras tecnologias, o sistema de vetores lentivirais tem sido usado como um método atrativo para entrega de transgenes de interesse por possuírem uma alta eficiência de transdução. Além disso, eles permitem a transdução em células em proliferação ou quiescentes. A eficácia desses vetores para expressão de transgenes depende do uso de promotores corretos que possam garantir uma alta expressão gênica e sustentável. Assim, o objetivo deste projeto foi comparar a eficiência dos promotores de citomegalovírus (CMV) e do fator de alongação-1 α (EF1 α) no sistema de entrega gênica lentiviral em células-tronco mesenquimais de pele humana (HU). Para isso, foram construídos vetores lentivirais que possuem o promotor de CMV ou o promotor de EF1 α , além do gene-repórter eGFP (“enhanced green fluorescence protein”). Para avaliar a eficiência de transfecção das construções, os vetores contendo os promotores e o gene-repórter (pLVCMVeGFP e pLVEF-1 α -eGFP) foram utilizadas células 293T (produtora de partículas virais) e verificamos a presença da proteína fluorescente verde por microscopia de fluorescência, indicando a funcionalidade dos promotores. Visando analisar a eficiência das construções, células HU foram transduzidas e observamos a presença da proteína fluorescente nas transduções, demonstrando que os promotores encontram-se ativos em ambas as células. Após a verificação da eficácia das construções plasmidiais, foram feitas análises para avaliar a eficiência da transdução das construções em células HU. Para tal, as células foram transduzidas com lentivírus contendo um dos promotores analisados em diferentes multiplicidades de infecção (1, 5 e 10) e analisadas através da intensidade do sinal de fluorescência e pela porcentagem de células eGFP positivas. Detectamos mais células eGFP positivas com a transdução do gene a partir do promotor P_{CMV} do que com a do promotor $P_{EF-1\alpha}$. Assim, comparamos a eficiência destes promotores em MOI 1. Os resultados mostraram que a transdução com o promotor $P_{EF-1\alpha}$ foi superior quando comparado ao promotor P_{CMV} , portanto sendo a melhor escolha para esse sistema de entrega gênica em células-tronco mesenquimais de pele humana.

Palavras-chave: Célula-tronco mesenquimal de pele humana. Lentivírus. Promotores.

ABSTRACT

MOURÃO, R. F. **Comparative analysis of diferente promoters in lentiviral vectors to transduce human dermal mesenchymal stem cells.** 2013. 50 p. Masters thesis (Biotechnology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

The hability of stem cells to form a wide source spectrum of cell type makes them an interesting source for cell therapies. However, to exploit their remarkable potentials, the development of effective strategies for genetic modifications of MSCs is required. Lentiviral-based vectors, with other techniques, offer an attractive system for efficient gene delivery in stem cells. These vectors efficiently transduce stem cells, and can infect dividing and nondividing cells. However, the efficiency of this vectors to genetic manipulation depends on the use of corrects cellular promoters for driving a high and stable expression of exogenous genes. In this study, we have chosen the cytomegalovirus (CMV) and the elongation factor 1- α promoters. We have compared the efficiency of this promoters in drive expression of the transgene in human dermal mesenchymal stem cells. The lentiviral vectors were constructed with the CMV promoter or the EF-1 α promoter, together with the eGFP gene (enhanced green fluorecence protein). To evaluate the efficiency of the lentiviral vectors, 293T cells were transfected and analyzed for eGFP expression using fluorecence microscopy. We were able to observe the expression of eGFP, indicating that the vectors were working. Dermal mesenchymals stem cells were transduced with CMV- and EF-1 α lentiviral vectors to evaluate the efficiency of the transductions. Efficiency of transductions was measured by flow cytometry (FACS) as percentage eGFP+ cells and signal intensity with different MOIs (multiplicity of infections).

Keywords: Stem cells. Lentiviral. Promoters.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ASC – Adult Stem Cells

AIDS - síndrome da imunodeficiência adquirida

BMSC – Bone Marrow Stem Cells

CFU-F – Células formadoras de colônias fibrobláticas

CMV – citomegalovírus

DMSO - dimetilsulfóxido

EDTA – Ácido etilenodinitrilotetracético sal dissódico

ESC – Embryonic Stem Cells

eGFP – enhanced Green Fluorescent Protein

EF-1 α - fator de elongação humano 1 α

FITC - fluoróforo isotiocianato de fluoresceína

GTP - trifosfato de guanosina

HCMV - citomegalovírus humano

HIV-1 - vírus da imunodeficiência humana tipo 1

HSC – Hematopoietic Stem Cells

iPSCs - células-tronco pluripotentes induzidas

ISCT - *International Society for Cellular Therapy*

LB – meio Luria Bertani

MOI - multiplicidade de infecção

MSC – Mesenchymal Stem Cells

P_{CMV} – Promotor de citomegalovírus

SC – Stem Cells (Células-tronco)

SKPs – Skin Progenitor

tRNA – ácido ribonucleico transportador

UFC – Unidade formadora de colônias

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
1.1 Células-tronco.....	14
1.2 Células-tronco adultas.....	15
1.3 Células-tronco mesenquimais.....	15
1.4 Células-tronco mesenquimais de pele.....	16
1.5 Terapia gênica em células-tronco.....	18
1.6 Vetores lentivirais.....	19
1.7 Promotores.....	20
2 OBJETIVO.....	23
2.1 Objetivos Específicos.....	23
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	24
3.1 Modelos Celulares.....	24
3.2 Meio de cultivo celular.....	24
3.3 Soluções.....	24
3.4 Suplementos.....	24
3.5 Condições de cultura e manutenção das linhagens celulares.....	24
3.6 Isolamento e cultivo de células-tronco de pele humana.....	24
3.7 Clonagem dos vetores lentivirais.....	24
3.8 Transformação de bactérias XL1 blue.....	27
3.9 Transfecção transitória em células 293T.....	27
3.10 Análise da eficiência de transfecção dos vetores lentivirais em células 293T por microscopia de fluorescência.....	27
3.11 Produção viral em células empacotadoras 293T.....	28
3.12 Concentração das partículas virais por centrifugação.....	28
3.13 Titulação das partículas virais produzidas.....	29
3.14 Transdução de células HU com as partículas lentivirais.....	29
3.15 Análise da eficiência de transdução dos vetores lentivirais em células HU por microscopia de fluorescência.....	30
3.16 Citometria de fluxo.....	30
3.17 Extração e purificação de RNA.....	30

3.18 Síntese de cDNA.....	31
3.19 RT-PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR).....	31
3.20 Lista de iniciadores utilizados.....	31
3.21 Análise estatística.....	32
4 RESULTADOS.....	35
4.1 Análise das construções plasmidiais pLVCMVeGFP e pLVEF-1α-eGFP em células 293T.....	35
4.2 Transdução lentiviral em células-tronco mesenquimais de pele.....	36
4.3 Análise da eficiência de transdução das construções lentivirais em células HU.....	36
4.4 Análise comparativa da eficiência de transdução das construções lentivirais em células HU.....	39
4.5 Expressão gênica das células HU transduzidas pelos promotores PCMV E PEF-1α.....	39
5 DISCUSSÃO.....	42
6 CONCLUSÃO.....	45
REFERÊNCIAS.....	46

1 INTRODUÇÃO

1.1 Células-Tronco

Células-tronco (SC, “Stem Cells”) são células indiferenciadas que apresentam duas características: (I) são capazes de autorrenovação, ou seja, podem se multiplicar mantendo seu estado indiferenciado e, conseqüentemente, proporcionam uma manutenção ativa de sua população de maneira constante nos tecidos; e (II) são capazes de se diferenciarem em diversos tipos celulares distintos (revisado por BRIGNIER; GEWIRTZ, 2010; BYDLOWSKI et al., 2009). A capacidade das células-tronco e progenitoras de formar uma prole diferenciada é descrita em termos de seu potencial de diferenciação ou plasticidade (revisado por FRIEL; SAR; MEE, 2005).

Apesar da grande diversidade de células que podem ser reconhecidas em tecidos adultos, todas estas derivam de uma única célula-ovo produzida pela fecundação de um óvulo com um espermatozoide. Essa única célula, denominada célula-tronco embrionária (ESC, “Embryonic Stem Cells”), totipotente, tem o potencial de se diferenciar e formar um embrião completo, ou seja, pode gerar qualquer tipo celular, incluindo tecidos extraembrionários. Essa propriedade única é transitória e aparece com a fertilização do óvulo, desaparecendo quando o embrião alcança o estágio de 4 a 8 células. Com as divisões subsequentes, as ESC perdem a capacidade de gerar um organismo completo. No entanto, estas células são capazes de se diferenciarem em células dos três folhetos germinativos: ectoderme, mesoderme, e endoderme, e nesse estágio são chamadas de células-tronco pluripotentes. Ainda, ao decorrer das divisões celulares, a capacidade de diferenciação em múltiplas linhagens vai se tornando restrita. Na maioria dos tecidos adultos existem reservas de células-tronco com capacidade de multiplicarem-se, diferenciando-se em células daquele tecido e, ao mesmo tempo, mantendo uma reserva de células indiferenciadas. Essas células-tronco tecido-específicas são as responsáveis pela manutenção da integridade dos tecidos adultos, pelo reparo de tecidos lesionados e pela remodelação dos tecidos e órgãos. São chamadas então de células-tronco multipotentes, isto é, elas são capazes de formar um limitado número de tipos celulares (revisado por BRIGNIER; GEWIRTZ, 2010; ZAGO; COVAS, 2006).

Nos últimos 50 anos foram feitas grandes descobertas que, juntas, contribuíram para o entendimento do funcionamento dessas células, além de levar ao desenvolvimento de terapias baseadas em células-tronco. A primeira descoberta ocorreu em 1961, quando Till e McCulloch (TILL; MCCULLOCH, 1961) demonstraram a existência de células-tronco na medula óssea de camundongos. Somente vinte anos depois pesquisadores conseguiram isolar ESC de camundongos (EVANS; KAUFMAN, 1981) e, posteriormente, ESC humanas (THOMSON et al., 1998). Recentemente, um grupo japonês liderado pelo pesquisador Shimada Yamanaka (TAKAHASHI; YAMANAKA, 2006) induziu a formação de células-tronco pluripotentes a partir de fibroblastos murinos, gerando células semelhantes a ESC (revisado por BRIGNIER; GEWIRTZ, 2010; LEEB et al., 2011).

Apesar de possuir um grande potencial, o uso de ESC para o tratamento de doenças encontra barreiras éticas e técnicas. As ESC são extraídas de embriões humanos fertilizados *in vitro* que, teoricamente, têm o potencial de se tornar em um ser humano, portanto, o seu uso para a pesquisa ainda é inviável em diversos países. Além da questão ética, há ainda questões técnicas como a quantidade limitada de fontes dessas células, o que inviabilizaria a aplicação em larga escala em terapias. Outra desvantagem no uso das ESC é sua ilimitada capacidade de proliferação, que pode levar a formação de tumores benignos, chamados de teratomas (composto por células dos três folhetos embrionários, se usadas em enxertos (FRIEL; SAR; MEE, 2005). Também podem apresentar rejeição quando utilizadas em pacientes diferentes do doador, devido a sua diferente origem genética, restringindo ainda mais seu potencial uso terapêutico (revisado por LEEB et al., 2011).

1.2 Células-tronco adultas

Uma alternativa ao uso de ESC para terapias celulares é o uso de células-tronco adultas (ASC, “Adult Stem Cells”). Elas são mais adequadas para fins terapêuticos por serem eticamente aceitáveis e facilmente encontradas em diversos tecidos. Há outra vantagem importante por poderem ser usadas em tratamentos autólogos de doenças degenerativas, traumáticas e congênitas pela possibilidade de serem extraídas e purificadas a partir de algum órgão do próprio paciente, evitando assim imunorrejeição (revisado por LEEB et al., 2011). A ASC melhor descrita é a célula-tronco hematopoiética (HSC, “Hematopoietic Stem Cells”), encontrada na medula óssea e no sangue do cordão umbilical, que é capaz de se

diferenciar em células da linhagem mieloide e linfoide (revisado por NARDI; ALFONSO, 1999).

As ASC também têm sido isoladas e caracterizadas de diversos tecidos como encéfalo, epitélio, polpa dentária, tecido adiposo e geléia de Wharton, e um tipo de ASC que tem recebido muita atenção em estudos clínicos e pré-clínicos focando terapias celulares é a célula-tronco mesenquimal (MSC, “Mesenchymal Stem Cells”) (revisado por YARAK; OKAMOTO, 2010).

1.3 Células-tronco mesenquimais

As MSC são um grupo de células clonogênicas, inicialmente, detectadas no estroma da medula óssea (BMSC, “Bone Marrow Stem Cells”), e identificadas a partir das células mononucleares da medula óssea de camundongos por Alexander Friedenstein e cols., em 1966 (FRIEDENSTEIN; PIATETZKY-SHAPIRO; PETRAKOVA, 1966), que as denominaram de células formadoras de colônias fibroblásticas (CFU-F). Agora denominadas de MSC, pela habilidade em se diferenciarem em células de origem mesenquimal (células dos tecidos ósseo, cartilaginoso, adiposo e miogênico), ou células estromais da medula óssea, pois parecem originar-se do complexo de estruturas de suporte encontrado na medula (revisado por BYDLOWSKI et al., 2009; ZAGO; COVAS, 2006).

Em 2006, a *International Society for Cellular Therapy* (ISCT) propôs critérios mínimos para definir MSC humanas: (I) as MSC devem ser aderentes ao plástico quando mantidas em condições básicas de cultura; (II) devem expressar, no mínimo, os marcadores de superfície celular CD105, CD73 e CD90, e não expressar CD45, CD34, CD14 ou CD11b, CD79 α ou CD119 e HLA-DR; e (III) devem se diferenciar, ao menos, em osteoblastos, adipócitos e condrócitos *in vitro* (DOMINICI et al., 2006).

Apesar de terem sido originalmente isoladas da medula óssea, as MSCs têm sido obtidas de várias outras fontes potenciais, como, por exemplo, o sangue de cordão umbilical, a geléia de Wharton, tecido adiposo, polpa dentária, músculo esquelético, sangue menstrual, endométrio e na pele. (revisado por BYDLOWSKI et al., 2009, DING; SHYU; LIN, 2011; TOMA et al., 2001).

Essas células fornecem suporte estrutural, além de regular a passagem de células através do tecido. Por serem encontradas em vários nichos, as MSC podem ser órgão-específicas,

assim, populações isoladas a partir de diferentes fontes, mesmo sendo morfologicamente similares, podem ser diferentes funcionalmente (MARTIN-RENDON et al., 2008; REBELATTO et al., 2008).

1.4 Células-tronco mesenquimais de pele

A pele tem sido recentemente considerada uma fonte alternativa de ASC por ser encontrada em grande quantidade e por ter fácil acesso. O principal foco de pesquisa com células-tronco cutâneas está relacionado às células-tronco epidermais e células-tronco associadas ao folículo capilar (SKP, “Skin Progenitor”) (revisado por GOLDSTEIN; HORSLEY; 2012). No entanto, recente estudos mostraram a presença de MSC na derme (TOMA et al., 2001).

As MSC de pele apresentam um fenótipo similar ao encontrado em BMSC e, porém, possuem uma capacidade de diferenciação menor (VACULIK et al., 2012). As MSC de pele somente são encontradas na derme, especificamente no revestimento do tecido conectivo e na papila do folículo capilar (revisado por SELLHEYER; KRAHL, 2010). Essas células tem a capacidade de se diferenciar em adipócitos, células do músculo liso, osteócitos, condrócitos, e também em neurônios, glia e células hematopoéticas da linhagem mielóide e eritróide, sendo consideradas como uma fonte alternativa de células para terapias celulares. Estudos mostraram a sua capacidade de reparo tecidual, principalmente, na medicina neuroregenerativa. Além disso, estudos *in vitro* mostraram o potencial das MSC cutâneas de se diferenciarem em células produtoras de insulina, hepatócitos e células renais (MEDINA et al., 2006; SHI; CHENG, 2004).

1.5 Terapia gênica em células-tronco

Outra nova possibilidade de uso da MSC em terapias celulares é seu potencial para entrega gênica (terapia gênica), devido a sua habilidade de autorrenovação a altas taxas proliferativas.

O objetivo da terapia gênica é o de tratar doenças causadas pelo mau funcionamento dos genes. Isso é feito através da substituição do gene que causa a doença por um gene funcional. Para que seja feita a substituição do gene, o procedimento mais utilizado em

estudos clínicos de terapia gênica é a inserção de uma cópia do gene alvo funcional em um local não específico no DNA genômico do hospedeiro. O transgene terapêutico é empacotado em um veículo de entrega, que é normalmente um vírus não replicante (revisado por BRIGNIER; GEWIRTZ, 2010).

Vários métodos têm sido usados para introduzir genes exógenos em células-tronco. Essas estratégias incluem métodos de entrega não-virais e virais. Entre os métodos de entrega não virais podemos incluir eletroporação, microinjeção, e através de um complexo com lipídeos catiônicos ou polímeros catiônicos. Apesar dos sistemas não-virais serem considerados mais seguros, há limitações nesses métodos, tais como baixa eficiência de transfecção e expressão gênica transiente (revisado por GROPP; REUBINOFF, 2006; NISHIKAWA; HUANG, 2001).

Os vetores virais são os mais utilizados em protocolos de terapia gênica devido à alta eficiência de transdução. Dentre os vetores virais, podem-se destacar o uso de vetores derivados de adenovírus e lentivírus. Os adenovírus são vetores amplamente utilizados para terapia gênica por apresentarem uma expressão eficiente do transgene e por possuírem uma alta titulação possibilitando um grande poder de infecção tanto em células em proliferação quanto em células quiescentes. Trabalhos têm demonstrado que os adenovírus podem ser uma ferramenta importante na terapia gênica associada a terapia celular utilizando ASC (GRIFASI et al., 2008; ROELANTS et al., 2008). Porém, a expressão do transgene nesse sistema é transiente o que causa limitação no seu uso, além de ser menos eficiente em alguns tipos celulares, como MSC, HSC, células dendríticas, células T e células do músculo liso (revisado por KAWABATA et al., 2006; THOMAS; EHRHARDT; KAY, 2003).

1.6 Vetores lentivirais

Os vetores lentivirais são baseados nos lentivírus, um grupo de retrovírus complexo que causa doenças crônicas em humanos e animais. Esse grupo inclui o vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1), que causa a síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) em humanos. Como outros vírus da família dos retrovírus, os lentivírus são vírus de RNA que se replicam através de um ciclo de vida único. Ao entrar na célula hospedeira, o RNA viral é convertido em DNA (transcrição reversa) e se integra ao DNA genômico da célula hospedeira. O vírus permanece integrado e usa a maquinaria da célula hospedeira para sua

replicação e expressão (GROPP et al., 2003). Porém, diferentemente dos retrovírus, os lentivírus têm a habilidade de infectar tanto células em proliferação, quanto células quiescentes, incluindo células-tronco. A habilidade de se integrar em células que não estão em divisão celular é devido ao sinal de localização nuclear presente no complexo de pré-integração que permite a sua entrada no núcleo sem a necessidade de fragmentação da membrana nuclear, necessária nos oncorretrovírus (revisado por FEDERICO, 1999).

Assim, a partir do desenvolvimento do primeiro sistema de entrega gênica baseado no HIV, os vetores baseados nos lentivírus têm provado ser uma eficiente ferramenta de entrega gênica em vários tipos celulares, ambos *in vivo* ou *in vitro*, inclusive em ESC (GROPP et al., 2003; MA et al., 2003; XIONG et al., 2005). Nesse método, há uma expressão estável do transgene sem a perda de pluripotência das ESC (XIONG et al., 2005). Entre as várias aplicações do uso de vetores lentivirais em células-tronco, podemos ressaltar a superexpressão de fatores de transcrição para direcionar a diferenciação de ESC em um tipo celular específico, o silenciamento de um gene-alvo específico através da técnica de RNA de interferência, e a construção de vetores contendo gene-repórter ou um marcador seletivo sob o controle de promotores tecido específicos que poderiam permitir a seleção de ambas às células-tronco indiferenciadas ou mesmo diferenciadas em linhagens específicas (GROOP et al., 2003; XIONG et al., 2005).

Em ASC, os vetores lentivirais também têm sido testados com grande sucesso. Em HSC, vetores que contêm promotores fortes podem gerar altos níveis de expressão do transgene (RAMEZANI; HAWLEY; HAWLEY, 2000; revisado por WOODS; OOKA; KARLSSON, 2002).

1.7 Promotores

Para maximizar o potencial de entrega gênica do vetor lentiviral é necessário um promotor adequado para o tipo celular proposto. Especificamente, em ESC, vários promotores estão sendo testados na tentativa de encontrar o melhor sistema de entrega gênica. Dois promotores foram mais testados: (I) o promotor de citomegalovírus (CMV) por ser fortemente ativo em diversos tipos celulares e ser usado como um promotor padrão em construções plasmidiais; e (II) o promotor do fator de alongação humano 1 α (EF-1 α), que tem mostrado promover uma expressão alta do transgene que não foi silenciado ao longo do tempo ou após a diferenciação (KIM et al., 2007; HONG et al., 2007).

O citomegalovírus humano (HCMV) é altamente distribuído em toda a população mundial. Como outros vírus da família *herpesviridae*, o HCMV pode estabelecer residência permanente no hospedeiro resultando em infecções primárias com infecções recorrentes ou persistentes (KOEDOOD et al., 1994). Estudos sobre a replicação do HCMV indicam que o vírus tem uma especificidade restrita de hospedeiro, apesar do fato do vírus poder entrar em diversos tipos celulares incluindo células parenquimais e células do tecido conectivo de virtualmente qualquer órgão, além de vários tipos celulares hematopoéticos (SINZQER; DIGEL; JAHN, 2008). Tipos celulares permissíveis ao vírus devem conter fatores transcricionais que se ligam a sequência do DNA do promotor do HCMV para ativar a transcrição dos genes *immediate-early enhancer/promoter* (KOEDOOD et al., 1994).

Um grande número de artigos tem examinado a atividade do promotor de CMV (P_{CMV}) em ESC e durante o processo de diferenciação destas células, com resultados variados. Há resultados que mostram que o P_{CMV} é altamente ativo em células-tronco indiferenciadas de camundongo usando transfecção transiente (BAGCHI; KUMAR; MANI, 2006; WARD; STERN, 2002), contrastando com resultados anteriores que mostraram expressão do transgene inativa (CHUNG et al., 2002). Quando são utilizados vetores adenovirais ou lentivirais não há expressão do transgene em ESC, só há expressão do transgene durante os estágios finais da diferenciação neuronal (HONG et al., 2007; KAWABATA et al., 2005).

Já no caso de transfecção estável em ESC humanas, há uma forte expressão do transgene, porém com um posterior silenciamento quando o P_{CMV} é utilizado (LIU et al., 2009). Foi mostrado que, após transdução com lentivirus há uma supressão do transgene de acordo com o promotor usado, e que esta supressão é maior em ESC humanas em comparação com ESC de camundongo (XIA et al., 2007). Em HSC humanas derivadas de cordão umbilical transduzidas com lentivírus, o P_{CMV} manteve uma expressão forte e estável do transgene por seis semanas após a transdução mostrando sua eficácia em um tipo de ASC (VARMA et al., 2011).

O gene EF-1 α tem uma função de gene endógeno (*housekeeping gene*) em todas as células, ele promove a ligação dependente de GTP (trifosfato de guanosina) de um aminoacil-tRNA ao ribossomo na síntese de proteínas, e é expresso em altos níveis. E mais importante, devido a sua função indispensável de *housekeeping* em todas as células, a expressão do promotor de EF-1 α é consistente a partir de um ponto de vista temporal,

relativamente isolado de mudanças na fisiologia da célula e independente do tipo celular (GOPALKRISHNAN et al., 1999; KIM et al., 1990).

O $P_{EF-1\alpha}$ foi usado na reprogramação de células somáticas em células-tronco pluripotentes induzidas (iPSCs, “inducible Pluripotent Stem Cells”) para superexpressar os quatro fatores de transcrição utilizados SOX2, OCT3/4, KLF4 e c-MYC (TAKAHASHI; YAMANAKA, 2006, 2007).

Em relação à expressão do transgene pelo promotor EF-1 α em ESC, os resultados são uniformes e positivos. ESC de camundongo, quando transientemente transfectadas com vetores contendo $P_{EF-1\alpha}$, mostraram expressão forte e estável do transgene, que continua nos diferentes estágios do desenvolvimento como corpos embrióides, precursores neuronais e cardiomiócitos (CHUNG et al., 2002; KIM et al., 2007; WANG et al., 2008). Os mesmo resultados foram encontrados quando as ESC foram transduzidas com vetores lentivirais (HONG et al., 2007).

Embora construções lentivirais com o promotor EF-1 α terem mostrado grande eficiência em ESC tanto de camundongo quanto humanas (CHUNG et al., 2002; KIM et al., 2007), em ASC o promotor CMV também mostrou resultados promissores. Porém, ainda não foram realizados estudos em MSC. Assim, o objetivo deste estudo foi determinar qual é o melhor promotor utilizando o sistema de entrega lentiviral em células-tronco mesenquimais de pele humana.

2 OBJETIVO

Analisar comparativamente a potência de diferentes promotores para transdução de célula-tronco mesenquimal de pele humana.

2.1 Objetivos específicos

Analisar a eficiência de transfecção e transdução das construções lentivirais com em células-tronco mesenquimais de pele humana por citometria de fluxo e microscopia de fluorescência.

Analisar comparativamente a eficiência de promotores nos vetores lentivirais em células-tronco mesenquimais de pele humana através de análise de eficiência de expressão do gene eGFP por citometria de fluxo, microscopia de fluorescência e qRT-PCR.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Modelos celulares

Células 293-T (Linhagem de rim embrionário humano, transformada com a proteína “large” T de SV40).

Células-tronco mesenquimais de pele humana (HU) isoladas e caracterizadas no Núcleo de Terapia Celular e Molecular (NUCEL), Departamento de Bioquímica, Instituto de Química da USP, pela doutora Maria Fernanda Forni.

3.2 Meio de cultivo celular

Células de mamíferos: DMEM (Dulbecco’s Modified Eagle Medium) (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA).

Células bacterianas: LB: Meio de Lúria Bertani para cultivo bacteriano contendo: 10 g/L de triptona; 6 g/L de extrato de levedura e 10 g/L de NaCl, pH 7,5. Para o preparo de meio sólido (LB-Ágar) em placas, adicionou-se 15 g/L de ágar (Merck, Whitehouse Station, New Jersey, EUA).

3.3 Soluções

Solução salina: PBSA (Phosphate Buffered Saline – sem cálcio ou magnésio), tamponada a pH 7,2, composta por NaCl 140 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 8 mM e KH₂PO₄ 1,5 mM.

Tripsina: solução 0,1 % de tripsina (Life Technologies) em PBSA contendo EDTA 1 mM (pH 8,0).

3.4 Suplementos

Soro Fetal Bovino (SFB) (Atená Biotecnologia, Campinas, SP, Brasil).

Antibiótico Ampicilina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) a 25 mg/mL.

Antibiótico Estreptomicina (Sigma-Aldrich) a 100 mg/mL.

3.5 Condições de cultura e manutenção das linhagens celulares

As células foram cultivadas a 37 °C em atmosfera de 5 % CO₂, em frascos plásticos descartáveis aderentes contendo meio de cultura específico para cada uma das linhagens utilizadas. O meio de cultura foi trocado a cada 2-3 dias. As células foram subcultivadas sempre que atingissem aproximadamente 80 % da densidade de saturação, utilizando solução de tripsina. Os estoques celulares foram mantidos à -190 °C, em reservatório contendo nitrogênio líquido.

3.6 Isolamento e cultivo de células-tronco de pele humana

Após coleta da pele humana, o material foi limpo de tecidos contaminantes e cortado em pedaços de cerca de 5x5 mm, sendo, então, digerido enzimaticamente por incubação com colagenase 10 ug/mL (Serva, Heidelberg, Germany) e, após a dissociação mecânica em células únicas (“single cells”), o material foi lavado 1x com DMEM 10 % SFB para neutralizar a enzima e 2x PBSA para eliminar células rompidas, sendo as células então ressuspensas em DMEM 10 % SFB e, posteriormente, separadas (“sorteadas”) com base na expressão de seus marcadores de membrana (CD90, 105 e 34) por citometria de fluxo e re-cultivadas.

3.7 Clonagem dos vetores lentivirais

Os vetores lentivirais utilizados foram clonados no Núcleo de Terapia Celular e Molecular (NUCEL), Departamento de Bioquímica, Instituto de Química da USP pelo doutor Renato Astorino Filho. O vetor molde para a construção dos novos vetores foi o vetor lentiviral p156RRLsinPPTCMVIns3IRESPRE. Inicialmente, foi realizada a clonagem do gene-repórter eGFP juntamente com a substituição do elemento IRES presente no vetor. Para isso foi realizada a clonagem destes genes utilizando os iniciadores EGFP_NT_NheI e EGFP_CT_Sall e como molde o vetor pEGFP-N1 (Clontech). O elemento IRES presente neste mesmo vetor (p156RRLsinPPTCMVIns3IRESPRE) foi substituído pelo IRES presente no vetor pIRESneo2 (Clontech) através de amplificação por PCR com os iniciadores IRES_CT_XbaI e IRES_NT_BamHI. Os genes-repórter e o elemento IRES foram subclonados (ligação tripla: vetor + gene-repórter + IRES) nos sítios BamHI e Sall presentes no vetor. Finalmente, os

promotores CMV e EF-1 α foram adicionados ao vetor. Para isso, os mesmos foram clonados usando os iniciadores específicos CMV_promoter_F_ClaI, CMV_promoter_R_NheI/BamHI, EF1a_promoter_F_ClaI e EF1a_promoter_R_NheI/BamHI (tabela 1) e como molde os vetores pLV-tTKKRAB-red (promotor EF-1 α) e p156RRLsinPPTCMVIns3IRESPRE (promotor CMV) em reações de PCR. Em seguida foi feita a subclonagem dos promotores nos sítios Cla I e Xba I presentes no vetor (Tabela 1).

Tabela 1 - Sequência dos iniciadores utilizados para a inserção dos elementos nos vetores lentivirais

<i>Iniciador</i>	<i>Sequência</i>
EGFP_NT_NheI	5'GAGAGAGCTAGCTGAGCAAGGGCGAGGAGC3'
EGFP_CT_Sall	5'GAGAGAGTCGACTTACTTGTACAGCTCGTCCATGC3'
IRES_CT_XbaI	5'GAGAGATCTAGATTGTGGCAAGCTTATCATCG3'
IRES_NT_BamHI	5'GAGAGAGGATCCCGCCCCTCTCCCTCCCCCCCCCTAACG3'
CMV_promoter_F_ClaI	5'GAGAGAATCGATGTTGACATTGATTATTGACTAG3'
CMV_promoter_R_NheI/BamHI	5'GAGAGAGCTAGCGGATCCAATTTGATAAGCCAGTAAGC3'
EF1a_promoter_F_ClaI	5'GAGAGAATCGATGCTCCGGTGCCCGTCAGTGG3'
EF1a_promoter_R_NheI/BamHI	5'GAGAGAGCTAGCGGATCCTCACGACACCTGAAATGGAAG3'

3.8 Transformação de bactérias XL1 blue

Os plasmídeos de interesse foram adicionados a uma suspensão de bactérias DH5 α eletrocompetentes e estas foram submetidas a um pulso elétrico dentro de uma cubeta de eletroporação no eletroporador (EC-100, EC Apparatus Corporation). Imediatamente após o choque, 1mL de meio LB foi adicionado à suspensão bacteriana e esta foi incubada a 37 °C, sob agitação por 1 h. Após este período, as bactérias transformadas foram plaqueadas em meio LB-Agar contendo antibiótico ampicilina e incubadas a 37 °C overnight para obtenção de colônias resistentes ao antibiótico.

3.9 Transfecção transitória em células 293T

Para análise das construções plasmidiais, células 293T foram transfectadas com os plasmídeos pLVCMVeGFP e pLVEF-1 α eGFP. Para a transfecção transitória, as células 293T

foram plaqueadas em alta densidade em placas de 24 poços. A transfecção foi realizada 24 h depois do plaqueamento com o reagente Lipofectamine 2000 (Invitrogen), sendo 0,8 µg de DNA plasmidial diluído em 50 µL de meio DMEM sem SFB. Em outro tubo, 2 µL de Lipofectamine Mix 2000[®] foi diluído em 50 µL de meio DMEM sem SFB e incubado por 5 minutos a temperatura ambiente. Após a incubação, o conteúdo dos dois tubos foi misturado e foi incubado por 20 minutos a temperatura ambiente. O complexo foi adicionado aos poços contendo as células plaqueadas. As células foram incubadas a 37 °C em uma estufa de CO₂ por 24 horas (Figura 1).

3.10 Análise da eficiência de transfecção dos vetores lentivirais em células 293T por microscopia de fluorescência

A eficiência de transfecção dos vetores lentivirais foi feita pela análise de expressão da proteína eGFP através de microscopia de fluorescência. Após 48 h da transfecção, foi feita a contagem de colônias fluorescentes, observadas em microscópio de fluorescência Nikon modelo TE-300, com o filtro para a proteína eGFP (excitação 460 – 510 nm e emissão 515 – 565 nm). A captura das imagens foi realizada pela câmera digital acoplada ao microscópio (Figura 1).

3.11 Produção viral em células empacotadoras 293T

As células 293T foram plaqueadas em placa de seis poços (1×10^6 células/poço), na presença de 10 % SFB Hyclone (ThermoFisher Scientific Inc., Waltham, MA, EUA), DMEM (volume final 1,5 mL), cerca de 16 a 24 h antes da transfecção. A mistura dos DNAs plasmidiais estruturais para a produção dos lentivírus foi realizada na proporção segundo TISCORNIA e colaboradores (2006). Utilizou-se 1,1 µg do vetor de transferência (pLVCMVeGFP ou pLVEF-1α-eGFP), 720 ng do vetor pMDL, 280 ng do vetor pREV e 390 ng do vetor pVSVG. Esses 26 plasmídeos foram diluídos em 150 µL de meio DMEM sem SFB. Em outro tubo de microcentrifuga, 10 µL do reagente de lipofecção (Lipofectamine 2000 – Life Technologies Corp.) foram diluídos em 150 µL de meio DMEM sem SFB para cada ensaio de transfecção. Misturou-se o conteúdo dos dois tubos e incubou-se a mistura por 20 min à temperatura ambiente. Após este período, adicionou-se a mistura lipossomo/DNA ao meio

de cultura das células. Após 5 h de incubação, foi efetuada a troca do meio de cultura para o início das coletas. A partir disso, foram coletados os sobrenadantes em 24, 48 e 72 h, sendo adicionado 1mL de meio DMEM-10 % + SFB (Hyclone) em cada poço após cada coleta. O sobrenadante de cada coleta foi centrifugado a 1000 xg por 5 min a temperatura ambiente para eliminar restos celulares e, em seguida, aliquotados e congelados à -80 °C.

3.12 Concentração das partículas virais por centrifugação

Alíquotas do sobrenadante contando as partículas virais foram descongeladas e centrifugadas a 20.000 xg a 4 °C por 4 h. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e as partículas virais foram ressuspensas em um volume apropriado de meio DMEM com SFB a 10 %.

3.13 Titulação das partículas virais produzidas

O cálculo do título biológico foi feito através da porcentagem de células eGFP+ em diferentes diluições. Foi preparada uma diluição seriada com as alíquotas contendo as partículas virais (concentrado, 10^{-1} , 10^{-2}) em solução de PBS. As células 293T foram plaqueadas em placa de 24 poços (1×10^5 células/poço), na presença de DMEM com 10 % de SFB com volume final de 500 μ L. Logo após o plaqueamento, foram adicionados 20 μ L de cada diluição nas células. As células foram então incubadas a 37 °C por 48 h. Após o período de incubação, as células foram lavadas 2 vezes com PBS para a eliminação de restos virais no meio e logo após foram resuspensas em 500 μ L de PBS. A porcentagem de células eGFP+ foi feita através da contagem, na câmara de Neubauer, do número de células eGFP+ versus o número de células não fluorescentes. Para tanto foi utilizado o microscópio de fluorescência Nikon modelo TE-300, com o filtro para o fluoróforo isotiocianato de fluoresceína (FITC) (excitação 460 – 510 nm e emissão 515 – 565 nm). Para o cálculo do título biológico (TB = unidades transformantes/mL) foi utilizada a seguinte fórmula: $TU/\mu L = (P \times N / 100 \times V) \times 1/FD$, onde P = porcentagem de células eGFP+, N = número de células no momento da transdução = 10^5 , V = volume da diluição adicionado em cada poço = 20 μ L, e FD = fator de diluição = 1 (não diluído), 10^{-1} (diluído 1/10), 10^{-2} (diluído 1/100).

3.14 Transdução de células HU com as partículas lentivirais

As células foram transduzidas com as partículas virais construídas com os promotores pLVCMV-eGFP ou pLVEF-1 α -eGFP, utilizando diferentes MOIs (1, 5 e 10). Para a transdução das células HU, 2×10^5 células em meio DMEM contendo 15 % SFB foram transferidas para tubos cônicos por condição. Com as células ainda em suspensão, adicionou-se o meio contendo as partículas virais e polibreno na concentração final de 10 μ g/mL. Após a adição dos volumes de meio condicionado contendo as partículas virais, as células foram plaqueadas em poços de uma placa de 6 poços. No dia seguinte foi feita a troca de meio de cultura. Cerca de 72 horas após a transdução as células foram observadas ao microscópio de fluorescência (Figura 2.1). As células foram transduzidas na passagem 9 e analisadas na passagem 13 (as passagens eram realizadas a cada 2-3 dias). As células utilizadas nesse trabalho foram caracterizadas até a passagem 20 (FORNI, 2013).

3.15 Análise da eficiência de transdução dos vetores lentivirais em células HU por microscopia de fluorescência

A eficiência de transfecção dos vetores lentivirais foi feita pela análise de expressão da proteína eGFP através de microscopia de fluorescência. Após 48h da transfecção, foi feita a contagem de colônias fluorescentes, observadas em microscópio de fluorescência Nikon modelo TE-300, com o filtro para a proteína eGFP (excitação 460 – 510 nm e emissão 515 – 565 nm). A captura das imagens foi realizada pela câmera digital acoplada ao microscópio (Figura 1).

3.16 Citometria de fluxo

Para análise da intensidade de fluorescência e análise do número de células transduzidas as células foram tripsinizadas e a intensidade de fluorescência foi medida em um equipamento FACSAria I/II (BD Bioscience, Califórnia, USA). A análise e processamento dos resultados foram realizados utilizando-se o programa FlowJo 7.6.3 Tree Star Inc., USA).

3.17 Extração e Purificação de RNA.

Para a extração e purificação do RNA, foi utilizado o Kit RNAspin Mini RNA (GE Healthcare). As culturas celulares foram mantidas nas placas de culturas até o momento da extração, quando foram lavadas 2 vezes com PBSA. O PBSA foi removido e 350 µl de solução de lise, contendo β-Mercaptoetanol foi adicionado à placa. O lisado então pode ou ser congelado ou ser submetido ao restante do protocolo de purificação, seguindo as instruções do fabricante. O RNA foi quantificado através da absorbância da amostra quando atingida por luz de comprimento de onda de 260 nm (Spectrophotometer ND-1000, NanoDrop). O grau de pureza foi determinado através da razão das medidas nos comprimentos de onda a 260 e 280 nm, adotando-se os valores entre 1,8 e 2,0 como sendo de grau adequado de pureza.

3.18 Síntese de cDNA

O RNA total, resultante do item anterior, foi utilizado como molde para a síntese de cDNA em uma reação de transcrição reversa. Assim, foram preparadas as reações contendo 2 µg de RNA total tratado com Dnase I, 500 ng de Oligo dT, 100 ng de *Random Primer*, 10 µmol de dNTPs em H₂O para um volume final de 12 µl. As amostras foram incubadas a 75 °C por 10 min e, em seguida, adicionou-se 14 µl de uma solução contendo 2 µl de DTT 0,1 M (Ditiotrietol), 1 µl de RNase OUT 40 U/µl e 1 µl de enzima ImProm II 200 U/µl.

A reação deu-se durante uma incubação de 2 h a 42 °C e 2 h a 50 °C. Em seguida, para inativação da enzima, a amostra foi incubada a 75 °C por 10 min. Visando degradar o RNA, foi adicionado 1 µl de Rnase H 5 U/µl em cada tubo e os tubos foram incubados por 37 °C por 30 min, e em seguida, a 75 °C por 10 min para inativação da Rnase H. Posteriormente, as amostras foram diluídas em H₂O Milli-Q.

A qualidade do cDNA era confirmada através da análise da expressão do gene *housekeeping actina*.

3.19 RT-PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR)

O qRT-PCR foi realizado pela técnica de SyBR Green Dye, utilizando-se o equipamento ABI 7300 Real Time PCR (Applied Biosystems) e os resultados foram calculados utilizando-se o método $\Delta\Delta C_t$, sendo o gene *Actina* o controle endógeno.

3.20 Lista de iniciadores utilizados

Os iniciadores utilizados foram: CD 29, CD105, CD90, CD44, cKIT, ABCG-2, OCT-4 e Actina, e suas sequências estão na tabela 2.

Tabela 2 - Sequência dos iniciadores utilizados para análises.

<i>Iniciador</i>	<i>Sequência</i>
CD29 F	5' CATCTGCGAGTGTGGTGTCT 3'
CD29 R	5' GTTGGACCGCTGGGGTAAT 3'
CD105 R	5' GCACTGCGCAAGACAAAC 3'
CD90 F	5' CACCCTCTCCGCACACCT 3'
CD90 R	5' CCCACCATCCCCTACC 3'
CD44 F	5' CAACCGTTGGAAACATAACC 3'
CD44 R	5' CAAGTGGGAAGTGGAAACGAT 3'
cKIT F	5' CCCCGGGATGGATGTTTTG 3'
cKIT R	5' CCTGGGTTCTGGGCTCTTG 3'
ABCG2 F	5' GTCAACTCCTCTTCTACAAA 3'
ABCG2 R	5' GGCACCTATAACCAGTCC 3'
OCT4 F	5' AAGCTCCTGAAGCAGAAGAGGA 3'
OCT4 R	5' ATGGTCGTTGGCTGAATACCT 3'

3.21 Análise estatística

Para análise estatística dos dados, foram feitas análises de variâncias simples, com o programa GraphPad Prism. Os resultados são expressos em média \pm desvio padrão. Testes de Tukey foram realizados consecutivamente para se determinar diferenças significativas.

Figura 1 – Representação esquemática dos procedimentos de transfecção celular e produção viral.

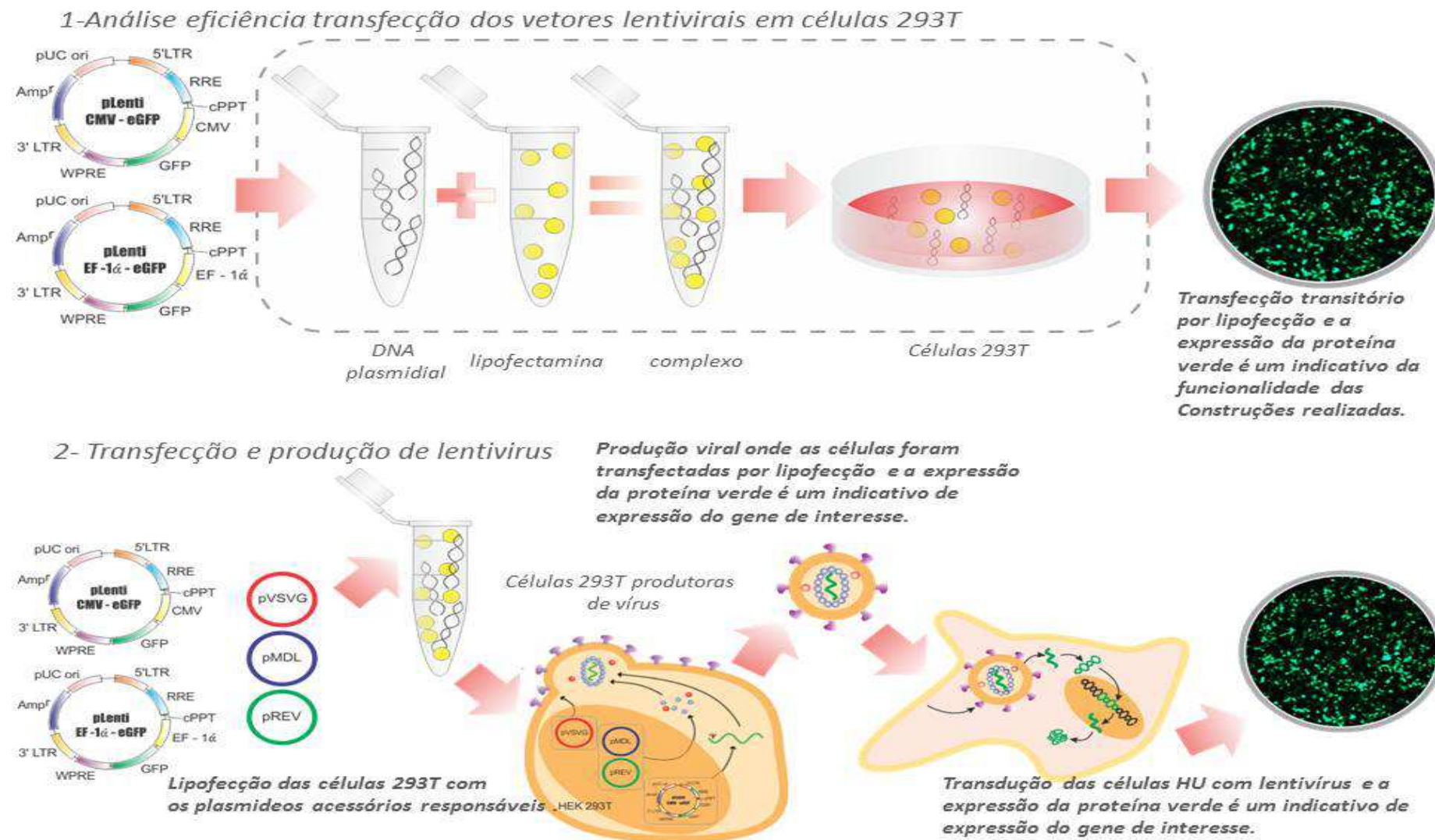
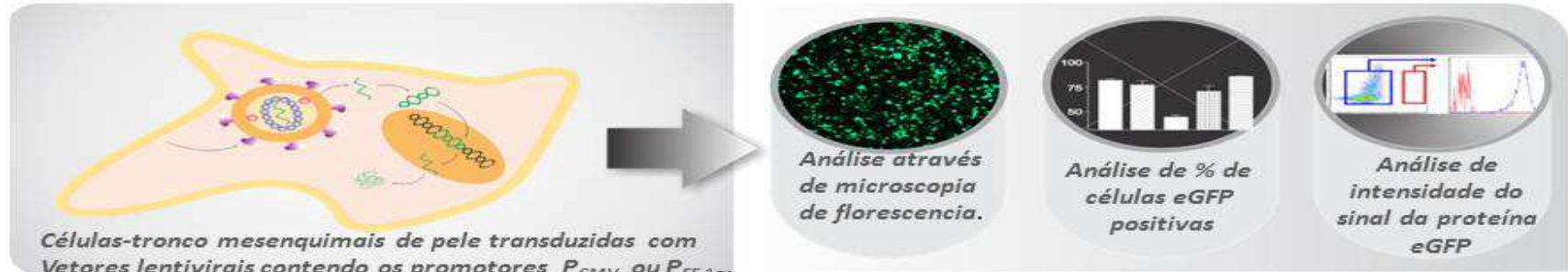
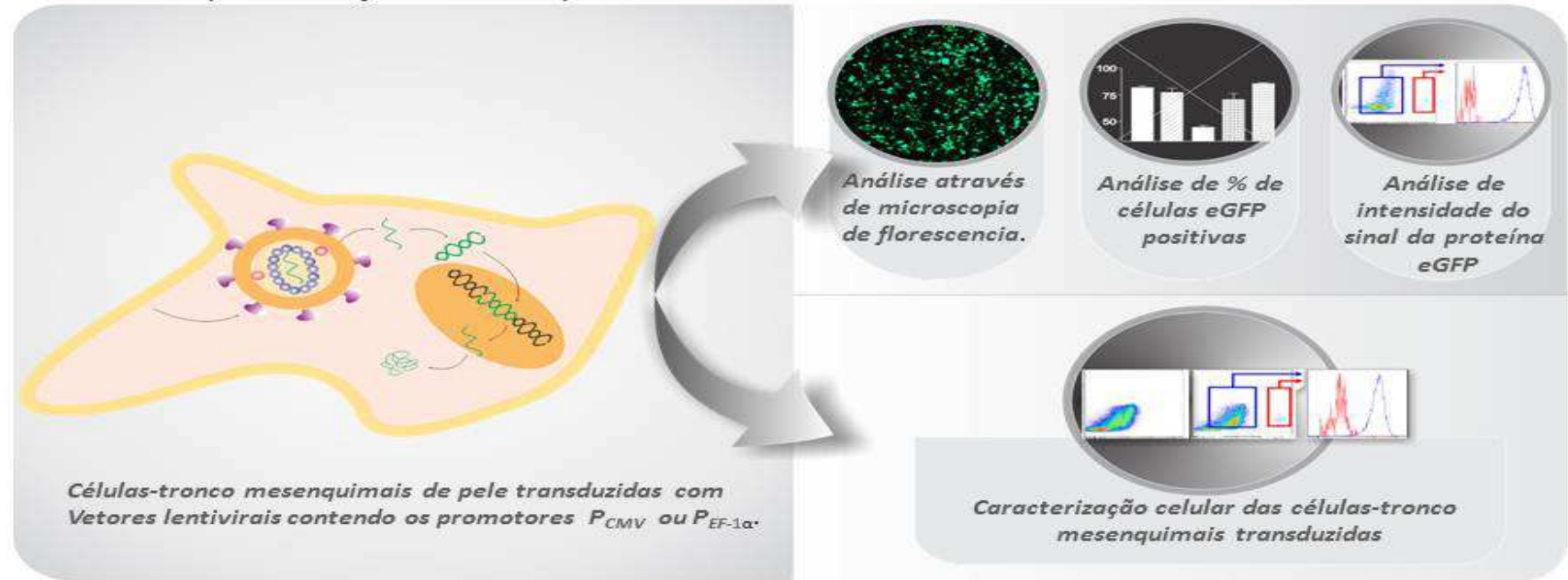


Figura 2 – Representação esquemática dos procedimentos de análise da transdução celular.

4-Análise da eficiência de transdução dos promotores dos vetores lentivirais em células HU.



4-Análise comparativa eficiência dos promotores dos vetores lentivirais em células HU.

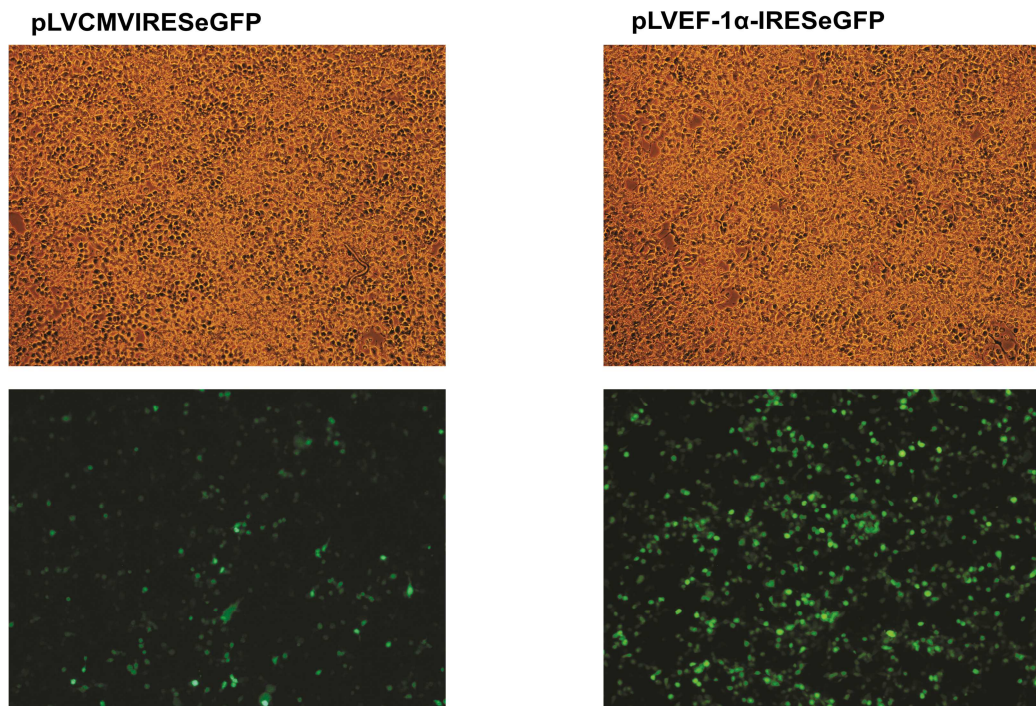


4 RESULTADOS

4.1 Análise das construções plasmidiais pLVCMVeGFP e pLVEF-1 α -eGFP em células 293T.

A fim de testar as construções que serão utilizadas para produção dos lentivirus, foi realizada a análise da eficiência de transfecção das construções plasmidiais em células 293T através de transfecção transitória com lipofectamina e analisadas após 48h através de microscopia de fluorescência quanto a expressão do gene repórter eGFP. A eficiência de transfecção foi diferente entre os promotores P_{CMV} e $P_{EF-1\alpha}$ e foi estimada em 60% na construção pLVCMVeGFP e 80 % na construção pLVEF-1 α -eGFP (fig. 3) determinadas indiretamente pela contagem de células verdes observadas no microscópio de fluorescência. Esses resultados comprovam a eficiência de ambas as clonagens.

Figura 3 – Análise das construções pLVCMVeGFP e pLVEF-1 α -eGFP



Transfecção transiente das construções pLVCMVeGFP e pLVEF-1 α -eGFP em células 293T: Os vetores foram transfectados em células 293T usando lipofectamina. Após 48 h as células foram observadas no microscópio de fluorescência (aumento 40x) usando luz visível (painel superior) e fluorescência a 509 nm (painel inferior).

4.2 Transdução lentiviral em células-tronco mesenquimais de pele

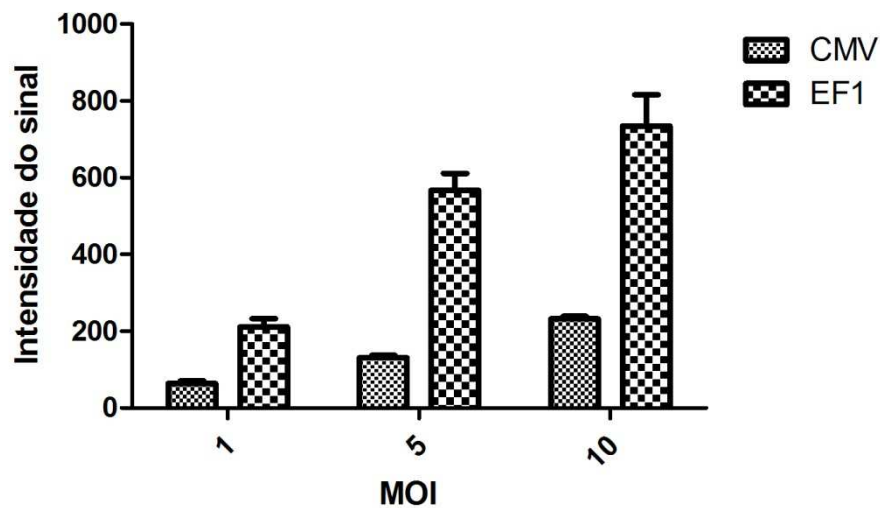
Para que fosse possível comparar quantitativamente a expressão da proteína eGFP entre os diferentes promotores, foi necessário o cálculo do MOI (multiplicidade de infecção) para que se tenha número de cópias similares de vetores virais integrados. O título produzido pela construção com o promotor P_{CMV} foi de 10^7 UFC/mL e pela construção com o promotor $P_{EF-1\alpha}$ foi de 10^8 UFC/mL. As células HU foram transduzidas com vetores lentivirais contendo os promotores P_{CMV} e $P_{EF-1\alpha}$. A eficiência de transdução foi medida através de citometria de fluxo (FACS) como a porcentagem de células eGFP+ (positivas), pela intensidade do sinal de fluorescência e por microscopia de fluorescência em células transduzidas com diferentes MOIs (1, 5 e 10 pfu/célula). Para evitar mutagênese insercional, as células foram transduzidas com baixa quantidade de partículas virais. Além disso, foi mostrado anteriormente que há expressão do transgene pelos vetores lentivirais não integrados ao genoma até 10 dias depois da transdução e essa expressão diminui gradualmente com a diluição do genoma do vetor através das divisões celulares (PHILIPPE et al., 2006). Portanto, a eficiência de transdução foi analisada 10 dias após a transdução para que fosse evitada a detecção da expressão do transgene a partir de vetores lentivirais não integrados.

4.3 Análise da eficiência de transdução das construções lentivirais em células HU.

Para analisar a eficiência dos promotores P_{CMV} e $P_{EF-1\alpha}$ em vetores lentivirais, as MSC de pele foram incubadas com meio contendo as construções lentivirais pLVCMVeGFP ou pLVEF-1 α -eGFP com MOIs 1, 5 e 10. A eficiência de transdução foi avaliada pelo monitoramento da expressão do gene eGFP por microscopia de fluorescência e por citometria de fluxo 10 dias após a incubação. A figura 4 mostra os resultados obtidos por microscopia de fluorescência nas 3 diferentes MOIs (1, 5 e 10) nas células transduzidas com os dois promotores. A expressão do gene eGFP pelo promotor P_{CMV} foi menor se comparada com a expressão dirigida pelo promotor $P_{EF-1\alpha}$. Foi feita análise quantitativa da intensidade do sinal do eGFP por FACS (fig 5). Essas análises mostraram que a intensidade do sinal da proteína eGFP dirigida pelo promotor $P_{EF-1\alpha}$ foi maior nas 3 condições testadas (MOI 1, 5 e 10) (fig 5). Além da intensidade do sinal de eGFP ser maior quando é dirigida pelo promotor $P_{EF-1\alpha}$, esta também aumenta substancialmente conforme a multiplicidade de infecção

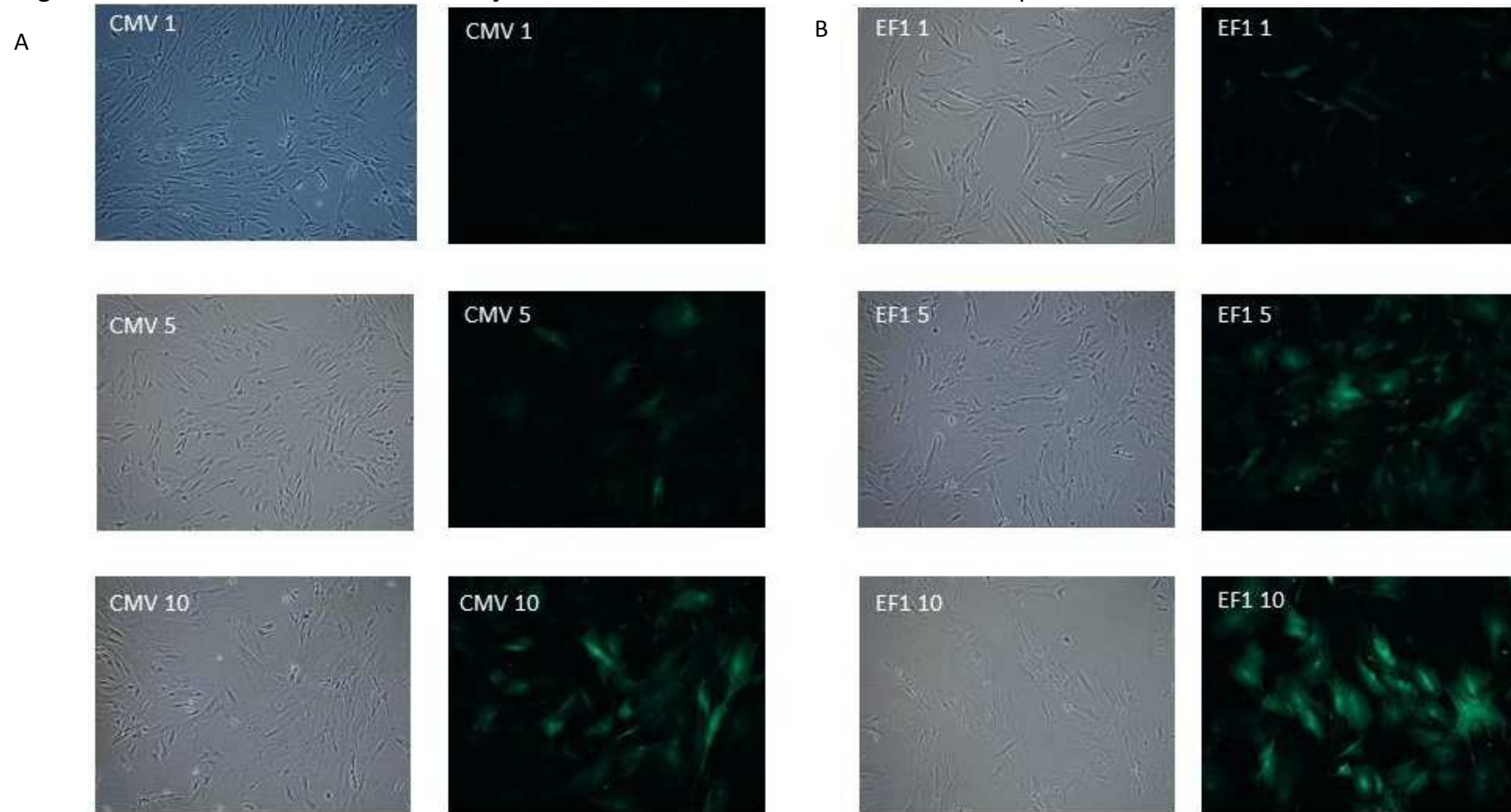
aumenta se comparada com a intensidade do sinal dirigida pelo promotor P_{CMV} . Em relação à porcentagem da população positiva para a expressão do gene eGFP realizada por FACS, os resultados foram diferentes. A média da população eGFP positiva transduzida pelo promotor P_{CMV} foi igual nas MOIs 5 e 10, e menor na MOI 1 (fig 6). Esses resultados mostram que a transdução do gene a partir do promotor P_{CMV} obteve maior número de células positivas, porém com menor intensidade de sinal quando comparado com a do promotor $P_{EF-1\alpha}$.

Figura 5 - Análise da eficiência de transdução dos vetores lentivirais através da intensidade do sinal de fluorescência medido por citometria de fluxo.



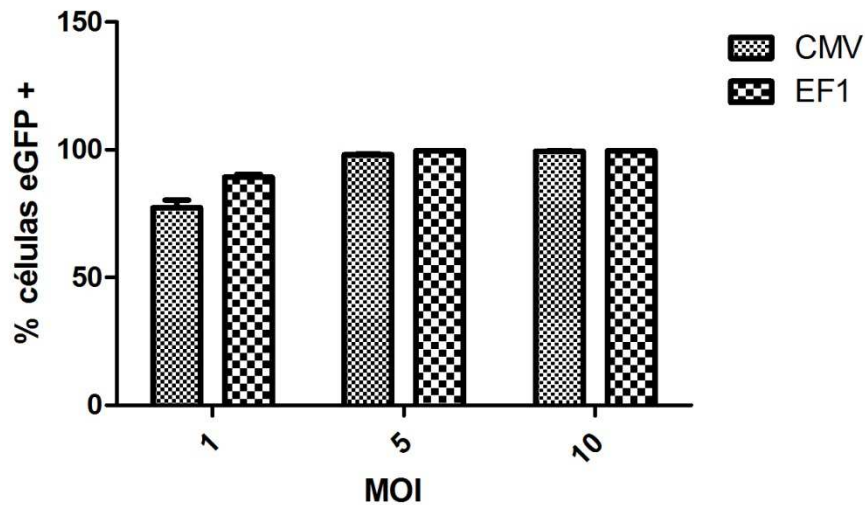
As MSC de pele HU foram transduzidas com vetores lentivirais contendo os promotores p_{CMV} e $p_{EF-1\alpha}$. As células foram analisadas 10 dias após a transdução pela intensidade da expressão de eGFP positiva em diferentes multiplicidades de infecção (MOI 1, 5 e 10) por citometria de fluxo. * $p < 0,05$.

Figura 4 - Análise da eficiência de transdução dos vetores lentivirais através de microscopia de fluorescência.



As MSC humanas de pele HU foram transduzidas com vetores lentivirais contendo os promotores pCMV e pEF-1. As células foram analisadas 10 dias após a transdução pela expressão de eGFP por microscopia de fluorescência. **A.** Expressão do eGFP dirigida pelo pCMV com MOI 1 (painel superior), MOI 5 (painel central) e MOI 10 (painel inferior). **B.** Expressão do eGFP dirigida pelo pEF-1 com MOI 1 (painel superior), MOI 5 (painel central) e MOI 10 (painel inferior). Aumento 100x.

Figura 6 - Análise da eficiência de transdução dos vetores lentivirais através da porcentagem da população eGFP positivas medido por citometria de fluxo.



As MSC humanas de pele HU foram transduzidas com vetores lentivirais contendo os promotores P_{CMV} e $P_{EF-1\alpha}$. As células foram analisadas 10 dias após a transdução pela porcentagem da população eGFP positiva em diferentes multiplicidades de infecção (MOI 1, 5 e 10) por citometria de fluxo.

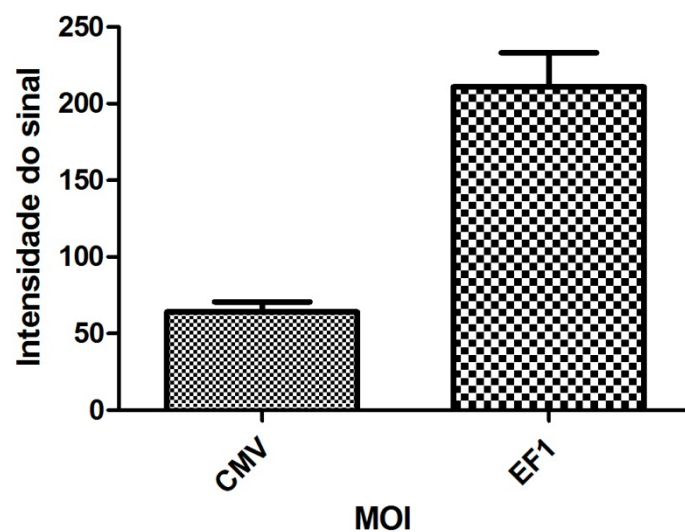
4.4 Análise comparativa da eficiência de transdução das construções lentivirais em células HU

Para a análise comparativa da eficiência dos promotores P_{CMV} e $P_{EF-1\alpha}$ em vetores lentivirais na MSC de pele, estas foram incubadas com meio contendo as construções lentivirais pLVCMVeGFP ou pLVEF-1 α -eGFP com MOI 1. A multiplicidade de infecção 1 foi utilizada para que fosse possível comparar quantitativamente a atividade dos dois promotores, excluindo a possibilidade de diferentes níveis de expressão do eGFP serem resultado de diferentes números de cópias integradas ao genoma, e garantindo que a maior parte das células transduzidas contenham somente 1 a 2 partículas virais integradas. Trabalhos anteriores já mostraram que utilizando MOI 1, o número de cópias que são integradas nas células eGFP positivas varia de 1 a 2 (NORRMAN; et al. 2010). Os resultados das populações transduzidas pelos vetores lentivirais são representativos de 3 transduções independentes que foram analisadas por FACS. A atividade do promotor foi medida 10 dias após a incubação das células com os lentivirus contendo os promotores P_{CMV} e $P_{EF-1\alpha}$, respectivamente. As células foram transduzidas na passagem 9 e analisadas na passagem 13

(as passagens eram realizadas a cada 2-3 dias). As células utilizadas nesse trabalho estão caracterizadas até a passagem 20.

Quando comparadas somente na multiplicidade de infecção 1, a diferença na intensidade do sinal de eGFP nas células-tronco transduzidas pelos dois promotores é significativa (figura 7).

Figura 7 - Análise comparativa da atividade dos promotores P_{CMV} e $P_{EF-1\alpha}$ em células HU através da intensidade do sinal fluorescente.



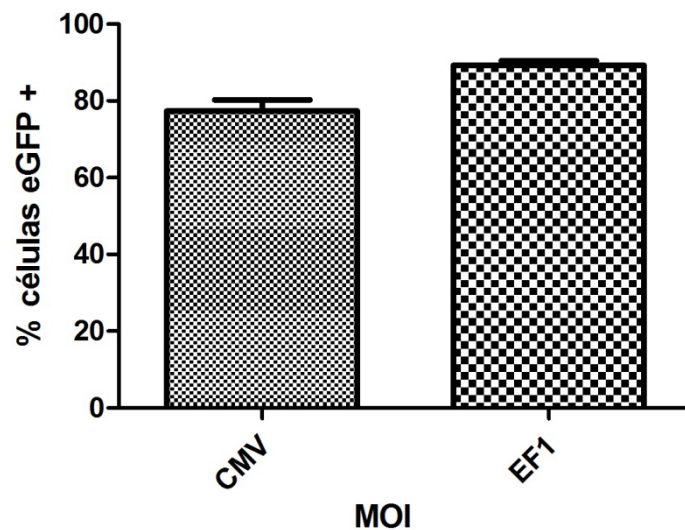
As MSC humanas de pele HU foram transduzidas com vetores lentivirais contendo os promotores P_{CMV} e $P_{EF-1\alpha}$. Para análise comparativa entre os dois promotores testados a multiplicidade de infecção foi de 1. As células foram analisadas 10 dias após a transdução pela intensidade da expressão de eGFP por citometria de fluxo.

Quando analisada a porcentagem de células eGFP positivas, há também diferença significativa da porcentagem de células transduzidas entre os dois promotores (fig. 7). A porcentagem de células eGFP positivas transduzidas com lentivirus contendo o promotor P_{CMV} foi menor, de aproximadamente 78 %, e das células transduzidas com lentivirus contendo o promotor $P_{EF-1\alpha}$ 83 % (tabela 3).

Tabela 3 - % de células HU eGFP positivas transduzidas com lentivirus contendo os promotores P_{CMV} e P_{EF-1 α} .

MOI	P _{CMV}	P _{EF-1α}
1	76,77 \pm 2,75	82,70 \pm 1,58

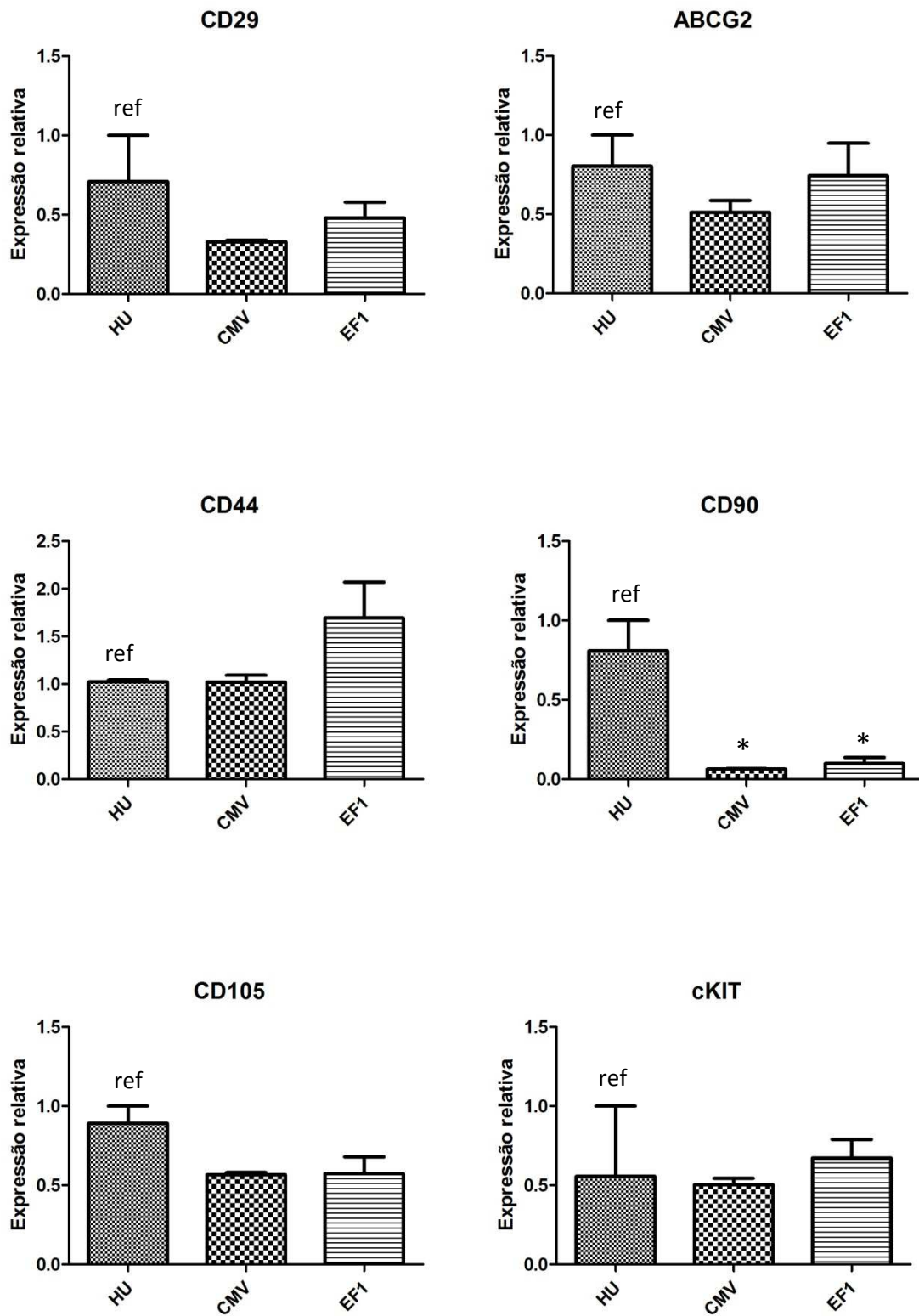
Figura 8 - Análise comparativa da atividade dos promotores P_{CMV} e P_{EF-1 α} em células-tronco mesenquimais de pele através da porcentagem de células eGFP positivas.

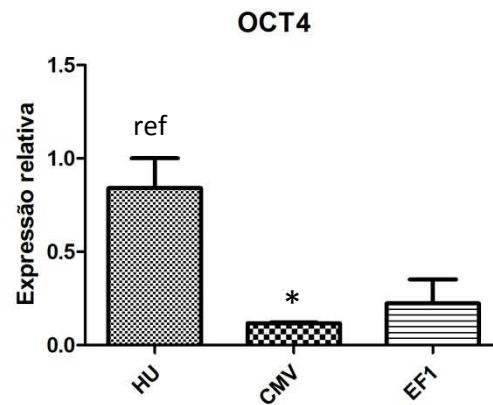


As MSC humanas de pele HU foram transduzidas com vetores lentivirais contendo os promotores pCMV e pEF-1 α . Para análise comparativa entre os dois promotores testados a multiplicidade de infecção foi de 1. As células foram analisadas 10 dias após a transdução pela porcentagem de células eGFP positivas por citometria de fluxo.

4.5 Expressão gênica das células HU transduzidas pelos promotores PCMV E PEF-1 α .

A expressão relativa dos genes *CD29*, *CD105*, *CD90* e *CD44*, característicos de células-tronco mesenquimais, e *OCT4*, *cKIT* e *ABCG2* relacionados a pluripotência, foi analisada ao nível de mRNA através de qRT-PCR (Fig 9). Houve uma diferença de expressão significativa entre a célula HU não transduzida (controle) em relação às células transduzidas pelos dois promotores testados somente no gene *CD90*. Na expressão do gene *OCT4* somente houve diferença nas células transduzidas pelo promotor P_{CMV}. Com os outros genes testados, não houve diferença de expressão.

Figura 9 – Expressão gênica relativa das células HU transduzidas.



Comparação dos níveis de expressão dos mRNAs correspondentes aos genes *CD29*, *ABCG2*, *CD44*, *CD90*, *CD105*, *cKIT* e *OCT4*. As MSC humanas de pele HU foram transduzidas com vetores lentivirais contendo os promotores pCMV e pEF-1 α . Para análise da expressão gênica comparativa entre os dois promotores testados e as células não transduzidas (HU) a multiplicidade de infecção foi de 1. As células foram analisadas 10 dias após a transdução. Os dados foram obtidos a partir de dois experimentos independentes. Ref.: referência (controle – célula HU não transduzida) para comparações com os restantes das amostras. * $p < 0,05$.

5 DISCUSSÃO

Para evitar mutagênese insercional, as células foram transduzidas com baixa quantidade de partículas virais e a eficiência de transdução foi analisada 10 dias após a transdução para que fosse evitada a detecção da expressão do transgene a partir de vetores lentivirais não integrados (PHILIPPE et al., 2006).

Tem sido descrito um grande número de diferentes promotores constitutivos com a capacidade de manter a expressão do transgene em diferentes tipos de células-tronco, e que são bons candidatos para aplicações como, por exemplo, rastreamento de linhagens celulares, geração de linhagens fluorescentes e superexpressão de fatores de transcrição. Grandes esforços estão focados em técnicas de integração estável do transgene, porém tentativas de comparação quantitativa da eficácia dos promotores constitutivos em monitorar e traçar o destino celular em células-tronco mesenquimais ainda são limitadas (NORRMAN et al., 2010). Neste trabalho nós comparamos quantitativamente a eficiência dos promotores CMV e EF-1 α em dirigir a expressão de eGFP em células-tronco mesenquimais de pele humana. Para tanto, foi feito a entrega gênica através de vetores lentivirais para garantir uma grande eficiência da transdução do transgene e integração do transgene no genoma da célula hospedeira. O sistema lentiviral foi escolhido por ser mais favorável a integração estável do transgene, do que outros métodos de entrega do transgene como a transfecção ou a transdução por adenovírus, que são mais apropriados para a expressão transiente. Além disso, vetores derivados do HIV-1 são eficientes ferramentas para modificação genética de células-tronco humanas, pois existe uma menor possibilidade de silenciamento do que de vetores tradicionais como, por exemplo, os retrovírus (HONG et al., 2006). Esses vetores também apresentam uma transdução eficaz, expressão estável do transgene e baixa citotoxicidade. Os vetores lentivirais têm sido usados como um eficiente método de entrega gênica em células-tronco embrionárias e adultas (GROPP et al., 2006). Para maximizar o potencial de entrega gênica dos vetores lentivirais é necessário o uso de promotores eficazes. Um estudo mostrou que a expressão do transgene mediada por lentivirus em células progenitoras endoteliais é dependente de um promotor gênico apropriado (LIU et al., 2006). Este trabalho mostra dados relativos de características de promotores em células-tronco mesenquimais de pele humana usando o eGFP como gene repórter e os resultados apresentados são representativos para a atividade dos promotores

constitutivos detectados através da expressão do eGFP. Porém, não se pode excluir a possibilidade de uma possível interferência entre o promotor e o gene repórter possa influenciar a expressão do transgene, portanto estudos futuros terão que resolver de diferentes combinações de promotores/genes repórter irão resultar em outros resultados diferentes dos que apresentados aqui.

Para as análises deste trabalho, vetores lentivirais foram construídos com os promotores CMV e EF-1 α a partir de um sistema já utilizado com eficácia (NARDI, 1999). Os vetores foram testados através de transfecção transiente em células 293T e os resultados mostraram uma forte expressão do gene reporter eGFP em ambas as construções, sendo possível a utilização das construções realizadas.

Para a realização desse trabalho, primeiro foi feita a análise a eficiência dos promotores nas células-tronco mesenquimais de pele. Para tanto, as células foram transduzidas pelos vetores lentivirais com diferentes multiplicidades de infecção (1, 5 e 10). Quando analisada a intensidade do sinal de fluorescência, o promotor EF-1 α mostrou ser o promotor mais forte quando com o promotor CMV. Estudos anteriores com o promotor EF-1 α têm demonstrado que este expressa eGFP forte e estávelmente em células-tronco embrionárias humanas. Além disso, o promotor de EF-1 α tem sido usado para gerar expressão estável do transgene em 95% das células (KIM et al., 2007). Neste trabalho a maior porcentagem conseguida através do promotor EF-1 α foi de 82% na multiplicidade de infecção 1. Quando analisadas as outras MOIs, a porcentagem de células transduzidas cai conforme o aumento da MOI, chegando a aproximadamente 60 % na MOI 10. Esse resultado contrasta com resultados anteriores que mostram um aumento da porcentagem de células transduzidas conforme o aumento da multiplicidade de infecção (NORRMAN et al., 2010). Esse resultado pode ser explicado pela morte celular resultante de um maior número de partículas virais utilizadas na transdução. Porém, não foram feitos estudos de morte celular nesse trabalho, o que serão feitos posteriormente.

Na análise da eficiência de transdução do promotor CMV, este mostrou também ser eficiente para transduzir células-tronco mesenquimais humanas. A porcentagem de células transduzidas, ao contrário do que aconteceu com o promotor EF-1 α aumentou conforme a maior MOI. A intensidade do sinal de fluorescência também aumentou conforme o aumento da multiplicidade de infecção, sendo maior na MOI 10. Porém, trabalhos já demonstraram que o promotor CMV não é estável em células indiferenciadas de mamíferos (HONG et al.,

2007; KIM et al., 2007). Portanto há a necessidade de novos estudos para ver a consistência da expressão do transgene direcionada por esse promotor.

Para as análises comparativas entre os dois promotores, a multiplicidade de infecção utilizada foi a 1. Essa multiplicidade foi escolhida, pois seria necessário números similares de cópias de vetores virais integrados, e também para evitar mutagênese insercional. Para a comparação, foram comparadas a intensidade de fluorescência do sinal do eGFP por microscopia de fluorescência, análise de FACS e PCR em tempo real. Também foi analisada a porcentagem de células eGFP positivas após a transdução. Em todos os experimentos realizados, o promotor EF-1 α mostrou ser o mais eficiente, expressando o transgene de interesse com maior intensidade e em um maior número de células. Esse resultado corrobora trabalhos anteriores que já demonstraram a potencialidade do promotor em outros tipos de células-tronco (KIM et al., 2007; NORRMAN et al., 2010).

6 CONCLUSÕES

Pela análise de presença de células 293T eGFP positivas após transfecção transitória, pode-se concluir que os vetores utilizados nesse projeto são viáveis para produção de lentivírus.

Pela análise de presença de células-tronco mesenquimais de pele humanas eGFP positivas após a transdução com vetores lentivirais contendo diferentes promotores, os promotores testados CMV e EF-1 α dirigiram a expressão do transgene de interesse de forma eficiente nas três condições testadas (diferentes multiplicidades de infecção), podendo ser usados para expressão de um transgene de interesse.

Pela análise comparativa realizada entre os promotores CMV e EF-1 α , o promotor EF-1 α mostrou ser mais eficiente em células-tronco mesenquimais de pele humanas, expressando o transgene com maior intensidade e em um maior número de células.

REFERÊNCIAS*

- BAGCHI, B.; KUMAR, M.; MANI, S. CMV promotor activity during ES cell differentiation: potential insight into embryonic stem cell differentiation. **Cell Biol. Int.**, v. 30, n. 6, p. 505-513, Jun 2006. ISSN 1065-6995.
- BRIGNIER, A. C.; GEWIRTZ, A. M. Embryonic and adult stem cell therapy. **J Allergy Clin. Immunol.**, v. 125, n. 2, p. S336-344, Feb 2010. Suppl 2. ISSN 1097-6825.
- BYDLOWSKI, S. P. et al. Características biológicas das células-tronco mesenquimais. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 31, p. 10, 2009. Supl. 1.
- CAPLAN, A. I.; CORREA, D. The MSC: an injury drugstore. **Cell Stem Cell**, v. 9, n. 1, p. 11-15, Jul 2011. ISSN 1875-9777.
- CHUNG, S. et al. Analysis of different promoter systems for efficient transgene expression in mouse embryonic stem cell lines. **Stem Cells**, v. 20, n. 2, p. 139-145, 2002. ISSN 1066-5099
- DEANS, R. J.; MOSELEY, A. B. Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses. **Exp. Hematol.**, v. 28, n. 8, p. 875-884, Aug 2000. ISSN 0301-472X.
- DING, D. C.; SHYU, W. C.; LIN, S. Z. Mesenchymal stem cells. **Cell Transplant.**, v. 20, n. 1, p. 5-14, 2011. ISSN 1555-3892.
- DOMINICI, M. et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v. 8, n. 4, p. 315-317, 2006. ISSN 1465-3249.
- EVANS, M. J.; KAUFMAN, M. H. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. **Nature**, v. 292, n. 5819, p. 154-156, Jul 1981. ISSN 0028-0836.
- FEDERICO, M. Lentiviruses as gene delivery vectors. **Curr. Opin. Biotechnol.**, v. 10, n. 5, p. 448-453, Oct 1999. ISSN 0958-1669.
- FORNI, M. F. P. A. D. Bases moleculares da depleção de glutatona sobre a potencialidade, diferenciação e envelhecimento de células-tronco de pele. 2013. 182p. **Tese (Doutorado em Bioquímica)** – Instituto de Química, Universidade de São Paulo. São Paulo, 2013.
- FRIEDENSTEIN, A. J.; PIATETZKY-SHAPIRO, I. I.; PETRAKOVA, K. V. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. **J. Embryol. Exp. Morphol.**, v. 16, n. 3, p. 381-390, Dec 1966. ISSN 0022-0752.
- FRIEL, R.; VAN DER SAR, S.; MEE, P. J. Embryonic stem cells: understanding their history, cell biology and signalling. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v. 57, n. 13, p. 1894-1903, Dec 2005. ISSN 0169-409X.

* De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

GOLDSTEIN, J.; HORSLEY, V. Home sweet home: skin stem cell niches. **Cell Mol. Life Sci.**, v. 69, n. 15, p. 2573-2582, Aug 2012. ISSN 1420-9071.

GOPALKRISHNAN, R. V. et al. Use of the human EF-1alpha promoter for expression can significantly increase success in establishing stable cell lines with consistent expression: a study using the tetracycline-inducible system in human cancer cells. **Nucleic Acids Res.**, v. 27, n. 24, p. 4775-4782, Dec 1999. ISSN 1362-4962.

GORIO, A. et al. Fate of autologous dermal stem cells transplanted into the spinal cord after traumatic injury (TSCI). **Neuroscience**, v. 125, n. 1, p. 179-189, 2004. ISSN 0306-4522.

GRISAFI, D. et al. High transduction efficiency of human amniotic fluid stem cells mediated by adenovirus vectors. **Stem Cells Dev.**, v. 17, n. 5, p. 953-962, Oct 2008. ISSN 1557-8534.

GROPP, M. et al. Stable genetic modification of human embryonic stem cells by lentiviral vectors. **Mol. Ther.**, v. 7, n. 2, p. 281-287, Feb 2003. ISSN 1525-0016.

GROPP, M.; REUBINOFF, B. Lentiviral vector-mediated gene delivery into human embryonic stem cells. **Methods Enzymol.**, v. 420, p. 64-81, 2006. ISSN 0076-6879.

HONG, S. et al. Functional analysis of various promoters in lentiviral vectors at different stages of in vitro differentiation of mouse embryonic stem cells. **Mol. Ther.**, v. 15, n. 9, p. 1630-1639, Sep 2007. ISSN 1525-0016.

KAWABATA, K. et al. Adenovirus vector-mediated gene transfer into stem cells. **Mol. Pharm.**, v. 3, n. 2, p. 95-103, 2006 Mar-Apr 2006. ISSN 1543-8384.

KAWABATA, K. et al. Efficient gene transfer into mouse embryonic stem cells with adenovirus vectors. **Mol. Ther.**, v. 12, n. 3, p. 547-554, Sep 2005. ISSN 1525-0016.

KIM, D. W. et al. Use of the human elongation factor 1 alpha promoter as a versatile and efficient expression system. **Gene**, v. 91, n. 2, p. 217-223, Jul 1990. ISSN 0378-1119.

KIM, S. et al. Efficiency of the elongation factor-1alpha promoter in mammalian embryonic stem cells using lentiviral gene delivery systems. **Stem Cells Dev.**, v. 16, n. 4, p. 537-545, Aug 2007. ISSN 1547-3287.

KOEDOOD, M. et al. Human cytomegalovirus (HCMV) immediate-early enhancer/promoter specificity during embryogenesis defines target tissues of congenital HCMV infection. **J. Virol.**, v. 69, n. 4, p. 2194-2207, Apr 1995. ISSN 0022-538X.

KRUSE, C. et al. Towards the development of a pragmatic technique for isolating and differentiating nestin-positive cells from human scalp skin into neuronal and glial cell populations: generating neurons from human skin? **Exp. Dermatol.**, v. 15, n. 10, p. 794-800, Oct 2006. ISSN 0906-6705.

LIU, J. et al. Promoter dependence of transgene expression by lentivirus-transduced human blood-derived endothelial progenitor cells. **Stem Cells**, v. 24, p. 199-208, 2006.

LIU, J. et al. Stable transgene expression in human embryonic stem cells after simple chemical transfection. **Mol. Reprod. Dev.**, v. 76, n. 6, p. 580-586, Jun 2009. ISSN 1098-2795.

MA, Y. et al. High-level sustained transgene expression in human embryonic stem cells using lentiviral vectors. **Stem Cells**, v. 21, n. 1, p. 111-117, 2003. ISSN 1066-5099.

MARTIN-RENDON, E. et al. 5-Azacytidine-treated human mesenchymal stem/progenitor cells derived from umbilical cord, cord blood and bone marrow do not generate cardiomyocytes in vitro at high frequencies. **Vox Sang.**, v. 95, n. 2, p. 137-148, Aug 2008. ISSN 1423-0410.

MEDINA, R. J. et al. Isolation of epithelial stem cells from dermis by a three-dimensional culture system. **J. Cell Biochem.**, v. 98, n. 1, p. 174-184, May 2006. ISSN 0730-2312.

MINGUELL, J. J.; ALLERS, C.; LASALA, G. P. Mesenchymal stem cells and the treatment of conditions and diseases: the less glittering side of a conspicuous stem cell for basic research. **Stem Cells Dev.**, v. 22, n. 2, p. 193-203, Jan 2013. ISSN 1557-8534.

NARDI, N. B.; ALFONSO, Z. Z. The hematopoietic stroma. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 32, n. 5, p. 601-609, May 1999. ISSN 0100-879X.

NISHIKAWA, M.; HUANG, L. Nonviral vectors in the new millennium: delivery barriers in gene transfer. **Hum. Gene Ther.**, v. 12, n. 8, p. 861-870, May 2001. ISSN 1043-0342.

PHILIPPE, S. et al. Lentiviral vectors with a defective integrase allow efficient and sustained transgene expression in vitro and in vivo. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 103, n. 47, p. 17684-17689, Nov 2006. ISSN 0027-8424.

RAMEZANI, A.; HAWLEY, T. S.; HAWLEY, R. G. Lentiviral vectors for enhanced gene expression in human hematopoietic cells. **Mol. Ther.**, v. 2, n. 5, p. 458-469, Nov 2000. ISSN 1525-0016.

REBELATTO, C. K. et al. Dissimilar differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, and adipose tissue. **Exp. Biol. Med. (Maywood)**, v. 233, n. 7, p. 901-913, Jul 2008a. ISSN 1535-3702.

ROELANTS, V. et al. Comparison between adenoviral and retroviral vectors for the transduction of the thymidine kinase PET reporter gene in rat mesenchymal stem cells. **J. Nucl. Med.**, v. 49, n. 11, p. 1836-1844, Nov 2008. ISSN 0161-5505.

SELLHEYER, K.; KRAHL, D. Skin mesenchymal stem cells: prospects for clinical dermatology. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v. 63, n. 5, p. 859-865, Nov 2010. ISSN 1097-6787.

SHI, C. M.; CHENG, T. M. Differentiation of dermis-derived multipotent cells into insulin-producing pancreatic cells in vitro. **World J. Gastroenterol.**, v. 10, n. 17, p. 2550-2552, Sep 2004. ISSN 1007-9327.

SINZGER, C.; DIGEL, M.; JAHN, G. Cytomegalovirus cell tropism. **Curr. Top Microbiol. Immunol.**, v. 325, p. 63-83, 2008. ISSN 0070-217X.

TAKAHASHI, K. et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. **Cell**, v. 131, n. 5, p. 861-872, Nov 2007. ISSN 0092-8674.

TAKAHASHI, K.; YAMANAKA, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. **Cell**, v. 126, n. 4, p. 663-676, Aug 2006. ISSN 0092-8674.

THOMAS, C. E.; EHRHARDT, A.; KAY, M. A. Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy. **Nat. Rev. Genet.**, v. 4, n. 5, p. 346-358, May 2003. ISSN 1471-0056.

THOMSON, J. A. et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. **Science**, v. 282, n. 5391, p. 1145-1147, Nov 1998. ISSN 0036-8075.

TILL, J. E.; MCCULLOCH, E. A. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. 1961. **Radiat. Res.**, v. 178, n. 2, p. AV3-AV7, Aug 2012. ISSN 1938-5404.

TISCORNIA, G.; SINGER, O.; VERMA, I. M. Production and purification of lentiviral vectors. **Nat. Protoc.**, v. 1, n. 1, p. 241-245, 2006. ISSN 1750-2799.

TOMA, J. G. et al. Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin. **Nat. Cell Biol.**, v. 3, n. 9, p. 778-784, Sep 2001. ISSN 1465-7392.

VACULIK, C. et al. Human dermis harbors distinct mesenchymal stromal cell subsets. **J. Invest. Dermatol.**, v. 132, n. 3, pt. 1, p. 563-574, Mar 2012. ISSN 1523-1747.

VARMA, N. R. et al. Lentiviral Based Gene Transduction and Promoter Studies in Human Hematopoietic Stem Cells (hHSCs). **J. Stem Cells Regen. Med.**, v. 7, n. 1, p. 41-53, Jan 2011. ISSN 0973-7154.

WANG, R. et al. Promoter-dependent EGFP expression during embryonic stem cell propagation and differentiation. **Stem Cells Dev.**, v. 17, n. 2, p. 279-289, Apr 2008. ISSN 1547-3287.

WARD, C. M.; STERN, P. L. The human cytomegalovirus immediate-early promoter is transcriptionally active in undifferentiated mouse embryonic stem cells. **Stem Cells**, v. 20, n. 5, p. 472-475, 2002. ISSN 1066-5099.

WOODS, N. B.; OOKA, A.; KARLSSON, S. Development of gene therapy for hematopoietic stem cells using lentiviral vectors. **Leukemia**, v. 16, n. 4, p. 563-569, Apr 2002. ISSN 0887-6924.

XIA, X. et al. Transgenes delivered by lentiviral vector are suppressed in human embryonic stem cells in a promoter-dependent manner. **Stem Cells Dev.**, v. 16, n. 1, p. 167-176, Feb 2007. ISSN 1547-3287.

XIONG, C. et al. Genetic engineering of human embryonic stem cells with lentiviral vectors. **Stem Cells Dev.**, v. 14, n. 4, p. 367-377, Aug 2005. ISSN 1547-3287.

YARAK, S.; OKAMOTO, O. K. Human adipose-derived stem cells: current challenges and clinical perspectives. **Na. Bras. Dermatol.**, v. 85, n. 5, p. 647-656, Oct 2010. ISSN 1806-4841.

ZAGO, M. A.; COVAS, D. T. **Células-tronco, a nova fronteira da medicina**. São Paulo: Editora Atheneu, 2006. 245 p..