LUCAS ASSIS PEREIRA

**Estabelecimento de linhagens de células-tronco de pluripotência
induzida (hiPSCs) de indivíduos com Transtorno Depressivo
Maior**

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação Interunidades em
Biotecnologia da Universidade de São
Paulo, Instituto Butantan e Instituto de
Pesquisas Tecnológicas para obtenção
do Título de Mestre em Biotecnologia

São Paulo
2017

LUCAS ASSIS PEREIRA

**Estabelecimento de linhagens de células-tronco de pluripotência
induzida (hiPSCs) de indivíduos com Transtorno Depressivo
Maior**

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação Interunidades em
Biotecnologia da Universidade de São
Paulo, Instituto Butantan e Instituto de
Pesquisas Tecnológicas para obtenção
do Título de Mestre em Biotecnologia

Área de concentração: Biotecnologia

Orientadora: Prof(a) Dr(a). Lygia da
Veiga Pereira

Versão Original

São Paulo
2017

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

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Pereira, Lucas Assis
Estabelecimento de linhagens de células-tronco
de pluripotência induzida (hiPSCs) de indivíduos com
Transtorno Depressivo Maior / Lucas Assis Pereira;
orientadora Lygia da Veiga Pereira. -- São Paulo,
2017.
64 p.

Dissertação (Mestrado)) -- Universidade de São
Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Transtorno Depressivo Maior. 2. Células
mononucleares. 3. hiPSCs. 4. Neurônio Serotonérgico.
5. Modelo in vitro. I. Pereira, Lygia da Veiga,
orientador. II. Título.

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

Candidato(a): Lucas Assis Pereira

Título da Dissertação: Estabelecimento de linhagens de células-tronco de pluripotência induzida (hiPSCs) de indivíduos com Transtorno Depressivo Maior

Orientador(a): Prof(a) Dr(a). Lygia da Veiga Pereira

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:

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS
DA UNIVERSIDADE DE SÃO
PAULO - IBUSP

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Estabelecimento de células-tronco de pluripotência induzida (hiPSCs) como um modelo in vitro para o estudo de resposta a drogas.

Pesquisador: lygia da veiga pereira carramaschi

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 34595414.3.0000.5464

Instituição Proponente: Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo - IBUSP

Patrocinador Principal: FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 837.566

Data da Relatoria: 14/10/2014

Apresentação do Projeto:

Estabelecimento de células-tronco de pluripotência induzida (iPSCs) como um modelo in vitro para o estudo de resposta a drogas.

Objetivo da Pesquisa:

Estabelecimento de plataforma para estudo in vitro de resposta a drogas, em neurônios obtidos a partir de células iPS derivadas de pacientes com transtorno depressivo maior.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Risco inerente ao procedimento de coleta de sangue periférico, apenas.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Amostra a ser analisada: células mononucleadas totais (MNC) de sangue periférico de 240 pacientes entre 18 e 65 anos de idade, com transtorno depressivo maior.

Procedimentos a que as pessoas serão submetidas: coleta de 16 mL de sangue periférico por punção venosa.

Infraestrutura disponível: coleta de sangue será realizada no HU-USP e o processamento, manipulação e armazenamento das células ocorrerá no Laboratório da Dra. Lygia (LANCE) no IB USP.

Armazenamento de amostra: MNC serão congeladas e armazenadas em N2 líquido até obtenção de

Endereço: Rua do Matão, Travessa 14, nº 321

Bairro: Butantã

CEP: 05.508-090

UF: SP

Município: SÃO PAULO

Telefone: (11)3091-7624

Fax: (11)3091-7624

E-mail: cepibusp@ib.usp.br

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS
DA UNIVERSIDADE DE SÃO
PAULO - IBUSP

Continuação de Parecer: 837.588

dados de resposta a drogas. Segundo o projeto, serão selecionadas 5 amostras de pacientes refratários e 5 de pacientes respondentes aos tratamentos para geração de células IPS.

Apoio financeiro: Fapesp

Outros aspectos pertinentes: o estudo clínico sob responsabilidade do Dr. Andre R. Brunoni possui aprovação do CEP do HU-USP.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Adequado.

Recomendações:

Atendidas.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Pendências atendidas.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar a este Comitê, relatórios anuais (parciais e final), de acordo com a Resolução nº 466/12, item II, II.19 e II.20, do Conselho Nacional de Saúde.

SAO PAULO, 20 de Outubro de 2014

Assinado por:
CELIA PRISZKULNIK KOIFFMANN
(Coordenador)

Endereço: Rua do Matão, Travessa 14, nº 321

Bairro: Butantã

CEP: 05.508-090

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3091-7624

Fax: (11)3091-7624

E-mail: cepibusp@ib.usp.br

Aos meus pais, por todo o apoio, incentivo e oportunidades que me deram, que mesmo nos meus piores momentos continuaram acreditando em quem eu era. Sem eles eu não seria nada, eu não faria nada.

Aos meus amigos, pelas broncas, risadas, frustrações e alegrias que não me deixaram desistir.

Aos meus orientadores e colegas de trabalho, que me ensinaram e ajudaram a completar mais esta etapa.

Agradecimentos

Agradeço a toda a equipe do laboratório: Prof^a Lygia, Fabiano, Luís, Simone, Yasmin, Giselle, Amanda, Raquel, Juliana, Karla, Gustavo, Yordanka, Patrícia, Elisa, Carol, Isabela, Mariana, Rodrigo, Érica, por todos os ensinamentos e auxílios.

Agradeço a minha família: Dinha, Pedro e Leonardo, por tudo.

Agradeço aos meus amigos: Andressa, Danielle, Arthur, Priscilla, Janne, Alex, Giovanna, Ed Carlos, Elan, Lianne, Luana, Caio, João, Thiago, Antônio, Guilherme, Vidal, e todos os outros que estiveram do meu lado ao longo deste projeto.

Por último mas não menos importante, agradeço a Deus e ao Plano Maior por me permitirem seguir sempre em frente no cumprimento da minha missão.

Agradecimentos

Agradeço em especial ao CNPq por ter financiado este projeto, através de bolsa de Mestrado, processo nº 142992/2014-3.

“Work it harder, make it better, do it faster,
makes us stronger. More than ever hour after
(h)our work is never over.”

(Daft Punk)

Resumo

PEREIRA, L. A. **Estabelecimento de linhagens de células-tronco de pluripotência induzida (hiPSCs) de indivíduos com Transtorno Depressivo Maior**. 2017. 64 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

O Transtorno Depressivo Maior (TDM) é uma condição psiquiátrica com uma herdabilidade em torno de 40%, que afeta 4,4% da população mundial, exibindo um substancial sofrimento pessoal, incapacidade e custos sociais. A incidência anual deste transtorno é prevista em cerca de 3%, e estima-se que ele será a principal causa de incapacidade no mundo em 2030. Entre os tratamentos farmacológicos hoje utilizados para tratar essa doença, muitos apresentam casos de pacientes com resistência medicamentosa, dificultando o tratamento e sobrevivência dos afetados. O surgimento de novas ferramentas e modelos de pesquisa envolvendo o TDM irá auxiliar no entendimento desta doença. Tendo isto em consideração, o objetivo deste trabalho foi gerar uma coleção de células-tronco pluripotentes induzidas humanas (hiPSCs) de um grupo de indivíduos com TDM clinicamente bem caracterizados, participantes de um ensaio clínico realizado no Hospital Universitário (HU) que avaliou o efeito da Estimulação Transcraniana por Corrente Contínua (ETCC) no tratamento do TDM. Foram coletadas amostras de células mononucleares (MNCs) de sangue periférico de 66 participantes, e geradas 6 linhagens de hiPSCs. Através de diversos testes de caracterização, a pluripotência destas células foi confirmada, estabelecendo no laboratório um protocolo robusto de reprogramação celular a partir de sangue periférico. Além disto, também foi padronizada a diferenciação destas hiPSCs em neurônios serotoninérgicos, mostrando o potencial de diferenciação destas células em células envolvidas no TDM. Neurônios derivados dessas hiPSCs poderão constituir material de estudo para outros grupos de pesquisa interessados no estudo da TDM, e ser utilizados em testes futuros para prever resposta a medicamentos.

Palavras-chave: Transtorno Depressivo Maior. Células mononucleares. hiPSCs. Neurônio Serotoninérgico. Modelo *in vitro*.

Abstract

PEREIRA, L. A. **Establishment of induced pluripotent stem cells lineages (hiPSCs) of individuals with Major Depressive Disorder**. 2017. 64 p. Master's thesis (Biotechnology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

Major Depressive Disorder (MDD) is a psychiatric condition with a heritability around 40%, which affects 4.4% of the world population, exhibiting substantial personal suffering, disability and social costs. The annual incidence of this disorder is estimated at about 3%, and is estimated that it will be the leading cause of disability in the world by 2030. Among the pharmacological treatments used today to treat this disease, many present cases of patients with drug resistance, complicating the treatment and survival of those affected. The emergence of new tools and research models involving MDD will aid in the understanding of this disease. Taking this into consideration, the objective of this work was to generate a collection of human induced pluripotent stem cells (hiPSCs) from a group of clinically well-characterized MDD patients, participants of a clinical study conducted at the Hospital Universitário (HU), which evaluated the effect of Transcranial Direct Current Stimulation (tDCS) on the treatment of MDD. Samples of peripheral blood mononuclear cells (MNCs) were collected from 66 participants, and 6 lineages of hiPSCs were generated. Through several characterization tests, the pluripotency of these cells was confirmed, establishing in the laboratory a robust protocol of cellular reprogramming from peripheral blood. In addition, the differentiation of these hiPSCs into serotonergic neurons was also standardized, showing the differentiation potential of these cells in cells involved in MDD. Neurons derived from these hiPSCs could constitute study material for other research groups interested in the study of MDD, and be used in future tests to predict drug response.

Keywords: Major Depressive Disorder. Mononuclear Cells. hiPSCs. Serotonergic Neuron. *In vitro* model.

Sumário

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	Transtorno Depressivo Maior	13
1.2	Células-Tronco Pluripotentes	15
1.3	Utilização de hiPSC na modelagem de doenças e desenvolvimento de drogas	18
2	OBJETIVO	23
2.1	Objetivo geral	23
2.2	Objetivos específicos	23
3	MATERIAIS E MÉTODOS	24
3.1	Coleta de amostras	24
3.2	Processamento de sangue periférico	24
3.3	Armazenamento em Nitrogênio (N ₂) líquido e descongelamento das células MNCs	25
3.4	Cultura e expansão de eritroblastos	25
3.5	Caracterização dos eritroblastos e avaliação da eficiência de nucleoporação	26
3.6	Nucleoporação com plasmídeos de reprogramação	26
3.7	Recuperação das células e aparecimento das colônias de hiPSCs	28
3.8	Caracterização de pluripotência por citometria de fluxo	28
3.9	Ausência de integração dos plasmídeos	28
3.10	Verificação de integridade genômica por SNP Array	28
3.11	Análise de identidade celular por STR	29
3.12	Verificação de contaminação por micoplasma	29
3.13	Diferenciação e cultura neuronal	29
3.14	Imunocitoquímica dos neurônios serotoninérgicos	30
4	RESULTADOS	31
4.1	Cultura e expansão de eritroblastos	32
4.2	Geração de hiPSCs	33
4.3	Confirmação de pluripotência por citometria de fluxo	34
4.4	Integração dos plasmídeos	35
4.5	Análise de integridade genômica por SNP Array	35
4.6	Análise de identidade celular por STR	37
4.7	Ausência de contaminação por micoplasma	38
4.8	Diferenciação e cultura neuronal	39
4.9	Imunocitoquímica dos neurônios dopaminérgicos	40
5	DISCUSSÃO	42
6	CONCLUSÃO	45
	REFERÊNCIAS*	46
	APÊNDICE	52
A	- Confirmação de pluripotência por citometria de fluxo	52
B	- Análise de integridade genômica por SNP Array	55
C	- Análise de identidade celular por STR	60

1 INTRODUÇÃO

1.1 Transtorno Depressivo Maior

O Transtorno Depressivo Maior (TDM) é uma doença do sistema nervoso que afeta o corpo, o humor e os pensamentos. É uma condição psiquiátrica de alta prevalência, afetando cerca de 4,4% da população mundial segundo dados da Organização Mundial de Saúde (WHO), resultando em um substancial sofrimento pessoal, incapacidade e custos sociais. Entre os anos de 2005 e 2015, houve um aumento de 18% no número de casos, principalmente em mulheres. Só no Brasil, são 11,5 milhões de pessoas afetadas (WHO, 2017). Estima-se que o TDM seja a principal causa de incapacidade no mundo em 2030, ultrapassando doenças relacionadas ao coração, pulmão e AIDS (ANDRADE et al., 2003).

Um grande número de sintomas está associado a esta doença, dentre os quais tristeza profunda, ansiedade, negligência, afastamento de familiares, falta de energia, de apetite, de esperança, choro, além de pensamentos de morte e tentativas de suicídio (GAYNES et al., 2015). Os episódios onde esses sintomas se manifestam podem ocorrer diversas vezes ao longo da vida, ou em um único momento da vida após um evento traumático, porém, para que esse transtorno seja diferenciado de uma tristeza profunda que ocorre normalmente, é necessário que esses episódios depressivos estejam ocorrendo num período de 6 a 12 meses. Grande parte destes episódios é recorrente, e o diagnóstico envolve uma extensa avaliação da vida, dos familiares, dos amigos e do ambiente em que vive o paciente, pois esses sintomas não são exclusivos do TDM, podendo ser encontrados em transtornos psicológicos como Distúrbio Bipolar, Transtorno de Ansiedade Generalizada, Esquizofrenia, entre outros (BRUNONI et al., 2012, 2013).

A causa exata que leva ao TDM ainda não foi determinada, e dentre os fatores envolvidos estipula-se que ele pode ser causado por alterações na plasticidade neural, como atrofia ou morte celular, anomalias na estrutura anatômica, alterações no balanço hormonal, eventos traumáticos ou mesmo casos de depressão na família, porém a maioria dos trabalhos na literatura sugere que o mecanismo de ação desta doença está envolvido com uma neurotransmissão

desregulada (GAYNES et al., 2015). A herdabilidade do TDM em torno de 40% indica a importância de fatores genéticos no desenvolvimento da doença (FERRARI et al., 2013; LOHOFF et al., 2010).

Os principais neurotransmissores envolvidos neste transtorno são a Serotonina e a Norepinefrina, onde de algum modo ocorreu uma mudança anormal na liberação, recepção, recaptação ou distribuição destas substâncias, afetando os centros de prazer, felicidade e satisfação do cérebro. Também já foram reportados casos onde ocorreram alterações em outros neurotransmissores, como dopamina, ácido gama-aminobutírico (GABA) e glutamato (RISCH et al., 1992; WEISS et al., 1981).

O principal tratamento do TDM é a utilização de medicamentos antidepressivos, sendo selecionados e administrados conforme o quadro de sintomas. Existem diversas classes de antidepressivos, mas os principais e mais comuns são os Inibidores Seletivos de Recaptação da Serotonina (ISRS), Inibidores da Monoaminoxidase (IMAOs), Antidepressivos Tricíclicos (ATCs) e os Inibidores Seletivos de Recaptação da Serotonina e Norepinefrina (ISRSN). Resumidamente, o modo de agir destes medicamentos envolve fazer com que os neurotransmissores permaneçam por mais tempo na fenda sináptica, seja por inibir sua recaptação ou degradação (GAYNES et al., 2015).

Porém, mesmo apresentando resultados satisfatórios, esses medicamentos possuem diversos efeitos adversos, como insônia, ganho de peso, disfunção sexual, crises hipertensivas, taquicardia e náuseas (ROSENBLAT et al., 2016). Apesar da grande variedade de antidepressivos já estabelecidos que atuam no tratamento do TDM, cerca de 30% de pacientes falha em responder a dois ou mais medicamentos, apresentando um quadro de Depressão Resistente ao Tratamento (KESSLER et al., 2003). Também existem pacientes que apresentam Taquifilaxia, uma condição onde o paciente perde o efeito de um tratamento outrora eficaz, mesmo que esteja utilizando os mesmos medicamentos e dosagens adequados (CHEN et al., 2014; TARGUM, 2014). Essas dificuldades ocorrem principalmente devido à heterogeneidade da doença, tornando difícil um diagnóstico e tratamento precisos (ROSENBLAT et al., 2016).

Uma alternativa para o tratamento medicamentoso do TDM é a Estimulação Transcraniana por Corrente Contínua (ETCC), uma técnica não invasiva de estimulação cerebral, que consiste em aplicar uma corrente elétrica direta através de dois eletrodos, que é capaz de penetrar no crânio e chegar ao córtex cerebral, modificando o potencial de repouso da membrana neuronal e modulando a taxa de disparo neuronal, alterando a atividade do cérebro e tratando a doença. Esta técnica vem sendo utilizada em diversos trabalhos, mostrando sua eficácia no tratamento do TDM, diminuindo os sintomas depressivos (BRUNONI et al., 2012; CHEN et al., 2014; PELLETIER et al., 2015; REATO et al., 2015).

Recentemente, foi desenvolvido um estudo no Hospital Universitário da Universidade de São Paulo cuja intenção foi comparar a eficácia da ETCC com a de um antidepressivo eficaz e em dose plena ("Escitalopram e Estimulação Transcraniana por Corrente Contínua no Transtorno Depressivo Maior: Um Ensaio Clínico Randomizado, Duplo-cego, Placebo-controlado de Não-Inferioridade" – estudo ELECT). Neste estudo, coordenado pelo Doutor André R. Brunoni, pacientes clinicamente diagnosticados com TDM foram divididos em três grupos: (a) ETCC ativa + medicamento placebo, (b) ETCC simulada (simula a sensação de aplicação da ETCC ativa porém sem os efeitos terapêuticos) + medicamento escitalopram, e (c) ETCC simulada + medicamento placebo, tratamentos que duraram 10 semanas. Neste período, diversos dados foram coletados para análise, como avaliações psicológicas, biomarcadores, polimorfismos genéticos, frequência cardíaca, entre outros, visando demonstrar a não-inferioridade da ETCC em relação ao medicamento para reforçar a hipótese de que a ETCC pode ser utilizada como uma alternativa ao fármaco (BRUNONI et al., 2017).

Deste modo, o TDM é um transtorno psiquiátrico comum, crônico, com importante morbidade e dificuldade de tratamento, justificando-se pesquisas que auxiliem seu entendimento.

1.2 Células-Tronco Pluripotentes

Para tentar entender os mecanismos moleculares do TDM e da resistência medicamentosa, pesquisadores vem desenvolvendo maneiras de melhor avaliar a resposta desses medicamentos em estudos clínicos e pré-clínicos. Uma opção seria a utilização de culturas de neurônios serotoninérgicos, que são os principais

responsáveis pela produção de serotonina, onde estas células seriam tratadas com antidepressivos de interesse e sua resposta analisada em diferentes níveis, desde sobrevivência da célula até alterações de expressão, fornecendo informações que ajudariam a prever a resposta em um paciente (BERLIM et al., 2007; GELENBERG et al., 2008; KORNSTEIN et al., 2001). Porém, essas células não são de fácil obtenção. Assim, é necessário o desenvolvimento de sistemas experimentais para o estudo do TDM *in vitro*.

Células-tronco são células que possuem a capacidade de se proliferar indefinidamente, se auto-renovar e se diferenciar em outros tipos celulares de nosso corpo através de estímulos específicos (CABRAL et al., 2008). Estas células têm sido usadas no desenvolvimento de novos tratamentos e na criação de modelos para estudar os mecanismos patobiológicos envolvidos em diversas doenças humanas. Elas podem ser divididas principalmente em dois tipos: células-tronco adultas, encontradas nas matrizes dos tecidos do organismo, chamadas de multipotentes por possuírem a capacidade de se diferenciar em um limitado tipo de células; e as células-tronco embrionárias humanas (do inglês, Human Embryonic Stem Cell, ou hESC), retiradas de blastocistos, chamadas de pluripotentes pois são capazes de se diferenciar em qualquer célula do corpo (revisado por PEREIRA, 2008; THOMSON et al., 1998;).

Devido a esta capacidade de diferenciação em vários tipos celulares, estuda-se sua utilização para diversas aplicações científicas, como tratamentos de reparação de tecidos que não tenham ou possuam uma baixa capacidade de regeneração, como o tecido nervoso e o cardíaco, modelagem de novas doenças, terapias e transplantes (MUOTRI et al., 2010; WATT et al., 2010). Apesar de sua extensa versatilidade, as hESCs apresentam a limitação de gerar incompatibilidade imunológica quando se pensa na possibilidade de transplante de tecidos derivados destas células, uma vez que o organismo original delas quase sempre não será o mesmo do receptor (MURACA et al., 2017; SHROFF et al., 2017).

Em 2006, Takahashi e Yamanaka descreveram uma técnica de reprogramação de células somáticas em células indiferenciadas e pluripotentes (chamadas de Células-Tronco Pluripotentes Induzidas, do inglês: Induced Pluripotent Stem Cells - hiPSCs) (TAKAHASHI et al., 2006, 2007). Estas células

apresentam características semelhantes às hESCs e esta descoberta mostrou-se uma alternativa para o estudo com as hESCs e para a dificuldade de se obter células-tronco pluripotentes de indivíduos adultos.

A técnica de geração de hiPSCs consiste na introdução de um conjunto de 4 fatores de transcrição (Oct3/4, Sox2, Klf4 e MYC) nas células somáticas através de vetores, capazes de reprogramá-las em células indiferenciadas equivalentes às hESCs (TAKAHASHI et al., 2006, 2007). Isso torna possível o estudo de um tecido de interesse, do mecanismo patobiológico da doença ou a resposta do paciente a um determinado tratamento (KANEKO et al., 2010).

Desde então, surgiram diversos trabalhos mostrando que a técnica de reprogramação celular pode ser reproduzida em diversos tipos celulares, e para que esta técnica possa ser utilizada no estudo e tratamento de doenças, muitos esforços estão sendo concentrados na busca de vetores que não se integram ao DNA (plasmídeos, micro RNAs, proteínas, vetores episomais) (CHOU et al., 2011; KANEKO et al., 2010; SEKI et al., 2010).

Inicialmente, as hiPSCs foram geradas a partir de fibroblastos da pele, cuja técnica para sua obtenção é invasiva ao paciente, podendo causar desconforto devido à biópsia de pele. A cultura e expansão de fibroblastos são demoradas e após a reprogramação em hiPSC, as células levam muito tempo para mostrar sinais de pluripotência (CHOU et al., 2011, 2015). Como solução para este problema, pesquisadores mostraram que células sanguíneas também podem ser reprogramadas e diferenciadas. Além disto, concluiu-se que o sangue é uma fonte promissora para a geração de hiPSC, pois é facilmente adquirido, não causando muito incômodo ao doador durante e após a coleta (CHOU et al., 2011, 2015; KANEKO et al., 2010; LOH et al., 2010; SEKI et al., 2010; STAERK, 2010).

Entre as células sanguíneas que já foram reprogramadas e estudadas, os linfócitos foram os primeiros a serem reprogramados. Porém, apresentam rearranjos em seu genoma, chamados de rearranjos V(D)J, que existem devido à função destas células de possuir grande especificidade para combater antígenos. Isto pode ser considerado um fator negativo na reprogramação celular, podendo afetar a diferenciação das hiPSCs em outras linhagens celulares, aumentar o risco de formação de linfomas, além de gerar dúvidas se possíveis mutações nas hiPSCs

foram causadas pela reprogramação ou se foram originadas no linfócito inicial (Chou et al., 2011, 2015).

Em 2011, Chou e colaboradores desenvolveram a técnica de reprogramação de eritroblastos derivados de células mononucleares (MNCs) do sangue periférico. Testando diversas condições de cultura, foi estipulado um método de cultivo que promoveu o crescimento a partir das MNCs de eritroblastos, que foram então reprogramados com um plasmídeo episomal (CHOU et al., 2011, 2015). O trabalho deste grupo mostrou que é possível cultivar eritroblastos a partir do sangue periférico, onde a seleção, cultura e expansão são feitas com um meio de cultura específico para promover o crescimento de células hematopoiéticas. Sendo assim, este tipo celular tornou-se uma alternativa aos antigos métodos de reprogramação e um promissor modelo para reprogramação porque pode ser retirado de uma pequena quantidade de sangue cuja coleta causa desconforto mínimo ao doador.

1.3 Utilização de hiPSC na modelagem de doenças e desenvolvimento de drogas

Apesar de toda a tecnologia empregada em pesquisa atualmente, o setor farmacêutico de desenvolvimento de drogas continua a utilizar um procedimento virtualmente inalterado a mais de 50 anos, de maneira lenta, arriscada, ineficiente e com um alto custo (KAITIN, 2010). O tempo médio gasto para desenvolver e testar um medicamento novo varia de 10 a 15 anos, com um custo entre 800 milhões e 1 bilhão de dólares (INNOVATION.ORG) e, mesmo assim, aproximadamente 40% das substâncias que estão sob avaliação dos órgãos de fiscalização, para solicitar aprovação de produção e distribuição, recebem uma resposta negativa (EICHLER et al., 2010). Além disto, somente 3 em 10 novas drogas que são lançadas no mercado obtém uma margem de lucro maior do que o custo necessário para desenvolvê-las e produzi-las, dificultando o crescimento da indústria farmacêutica (KAITIN, 2010).

Esses problemas decorrem principalmente da fase pré-clínica, onde os modelos escolhidos para teste não fornecem informações suficientes para prever todos os possíveis efeitos do medicamento, ou então apresentam características divergentes do organismo alvo, levando a interações diferentes. (SARTIPY, 2007; WEINSHILBOUM, 2003). Um modelo muito utilizado em estudos de medicamentos é o de cultura de células, que comumente são derivadas de linhagens de células de

tumor ou células imortalizadas por transformação genética. Essas células são utilizadas devido a sua grande capacidade de crescimento e longevidade. Porém, elas normalmente não são células humanas, e seus fenótipos nem sempre estão relacionados com o fenótipo do tecido de interesse (HENG et al., 2009; POUTON; HAYNES, 2007).

Em muitos casos, ao invés de utilizar células de tumor ou imortalizadas, os pesquisadores optam pela cultura primária de células somáticas, que podem fornecer dados mais diretos sobre o funcionamento de um tecido alvo e direcionar melhor a continuação do teste. Porém, estas culturas apresentam dificuldades, como baixa disponibilidade dependendo do tipo de célula necessária, o curto tempo em cultura, um elevado grau de variabilidade entre lotes, e uma resposta imprecisa quando as células são obtidas de tecido descartado ou após a morte do paciente (PARK et al., 2008).

Também são utilizados modelos animais para testes toxicológicos, pois representam um organismo completo, ao invés de apenas um tecido, e ajudam a entender as possíveis influências que os tecidos exercem uns sobre os outros. Entretanto, a fisiologia de um animal não pode ser eficientemente comparada com a de um humano, o uso de animais nos testes pode ser considerado eticamente inadequado e afetar a opinião do consumidor sobre o medicamento, e animais são mais caros de obter e manter do que comparados com culturas de células (HENG et al., 2009).

Uma alternativa promissora para esses modelos é a utilização de hiPSCs, por conta das suas características de pluripotência e de proliferação indefinida. Estas células podem acelerar a pesquisa e desenvolvimento de novas drogas, através de testes mais precisos e direcionados ao utilizar células específicas de pacientes com a doença de interesse, fornecendo informações mais aproximadas da resposta real que o paciente terá a determinado medicamento (GUNASEELI et al., 2010).

Muitos trabalhos já foram publicados mostrando a eficiência em diferenciar hiPSC em tipos celulares de interesse, como cardiomiócitos, neurônios e células beta produtoras de insulina (EBERT et al., 2012; GUNASEELI et al., 2010). O grupo de Park e colaboradores mostrou que células de pacientes com doenças genéticas, como Doença de Parkinson, Doença de Gaucher tipo 3, Síndrome de Down, entre

outras, também podem ser reprogramadas em hiPSC e continuar apresentando os mesmo marcadores moleculares específicos de cada doença, afirmando que um método acessível para estabelecer linhagens de hiPSC derivadas de portadores doentes iria não apenas facilitar o desenvolvimento de novos medicamentos, mas também ser a base para a criação de terapias celulares autólogas que evitariam rejeição imunológica e permitiriam a correção de defeitos genéticos antes da reconstituição de tecido (PARK et al., 2008).

A utilização de modelos de células derivadas de hiPSC auxiliaria muito o setor de desenvolvimento de drogas que atuam no sistema nervoso, que enfrenta muitos problemas. Realizar culturas primárias de neurônios que representem de maneira confiável os sintomas de uma doença é muito difícil, uma vez que os modelos atuais empregam neurônios animais que, como já foi comentado, não são um bom modelo de estudo, ou células obtidas de tecidos descartados, que possuem uma baixa taxa de viabilidade, quantidade e estabilidade (ALLEN et al., 2005). Outro fator que interfere no estudo de doenças do sistema nervoso é a variabilidade individual de cada caso. Nem todos os pacientes que recebem a droga respondem da mesma maneira esperada ou de maneira positiva (BRUNONI et al., 2013), o que leva muitos medicamentos a não serem aprovados na fase clínica.

No campo das doenças neurodegenerativas complexas, cada vez mais modelos vem surgindo para melhorar a compreensão destes transtornos. Diversos fatores estão envolvidos nessas doenças, desde alterações genéticas em regiões não codificantes até fatores ambientais, dificultando a caracterização de um modelo 100% confiável (ARDHANAREESWARAN et al., 2017; RATAJCZAK et al., 2017; SHROFF et al., 2017). A grande maioria dos esforços iniciais para estudar neurônios derivados de hiPSCs focou na produção de neurônios dopaminérgicos, envolvidos em doenças neurodegenerativas como a Doença de Parkinson (CHAMBERS et al., 2009; KIM, 2002; KRIKS et al., 2011).

Dentre esses transtornos complexos, além da depressão vale mencionar a esquizofrenia e o transtorno bipolar (LICINIO et al., 2016; SOLIMAN et al., 2017). Em 2011, Brennand e colaboradores publicaram pela primeira vez fenótipos neuronais e alterações de expressão gênica em neurônios dopaminérgicos derivados de hiPSCs de pacientes com esquizofrenia: as células apresentavam

menor número de neuritos, menor expressão de glutamato e da proteína PSD-95, e alterações de expressão nas vias WNT e AMP-cíclico. Esse grupo forneceu pela primeira vez dados para modelar esta doença complexa a partir de hiPSCs (BRENNAND et al., 2011). No trabalho de Mertens e colaboradores (2015), utilizando neurônios derivados de hiPSCs de pacientes com distúrbio bipolar, foram encontradas alterações mitocondriais, e as células apresentavam um disparo de potencial de ação hiperativo. Ao tratar as células com lítio, este potencial de ação hiperativo foi revertido, e o mais interessante foi que esta alteração só aconteceu nas linhagens de hiPSCs provenientes de pacientes que também responderam positivamente ao tratamento com a mesma substância (MERTENS et al., 2015). Esses trabalhos corroboram a hipótese de que hiPSCs podem fornecer modelos valiosos para entender os mecanismos moleculares de doenças psiquiátricas complexas.

No caso da depressão, as principais células envolvidas são os neurônios serotoninérgicos, responsáveis pela regulação do humor no nosso organismo, que são os alvos dos principais antidepressivos no mercado. Trabalhos focados em derivar este tipo celular a partir de células pluripotentes são escassos, e a maioria utilizou células animais ou então manteve o foco em neurônios dopaminérgicos, obtendo os serotoninérgicos como objetivo secundário ou por obter populações de células heterogêneas. O desenvolvimento de métodos robustos de diferenciação representa um grande avanço no entendimento do papel da serotonina na depressão. (BARBERI et al., 2003; KIM et al., 2002; LEE, G. et al., 2010; LEE, S. et al., 2000; SALLI et al., 2004; TOKUYAMA et al., 2010).

Recentemente, foram publicados três trabalhos focados exclusivamente em produzir neurônios serotoninérgicos humanos. Dois deles utilizaram a técnica de diferenciação direta para induzir fibroblastos a se reprogramarem em neurônios, que foram então caracterizados, apresentando marcadores de neurônios serotoninérgicos maduros, potenciais de ação espontâneos, liberação de serotonina e respondendo funcionalmente a ISRS (VADODARIA et al., 2016; XU et al., 2016). O terceiro trabalho, publicado por Lu e colaboradores, utilizou hiPSCs para realizar a diferenciação serotoninérgica. Utilizando fatores de crescimento e moduladores de vias de sinalização, eles foram capazes de caracterizar as etapas do desenvolvimento neuronal e desenvolver um protocolo relativamente simples para

geração de neurônios serotoninérgicos. Subsequentemente, este grupo utilizou o medicamento escitalopram, um SSRI, para estabelecer a utilidade destes neurônios como ferramentas de triagem para moduladores de serotonina (Lu et al., 2016). Os resultados adquiridos nesses estudos evidenciam que linhagens neuronais obtidas através de hiPSCs podem fornecer um robusto material de estudo visando a elucidação dos mecanismos de ação do TDM, realização de testes em busca de novos medicamentos e avaliação do risco de um indivíduo desenvolver essa doença futuramente (BRENNAND et al., 2011; ISRAEL et al., 2012).

Em colaboração com o Dr. André Brunoni, nosso laboratório (Laboratório Nacional de Células-Tronco Embrionárias – LaNCE) visou gerar uma coleção de MNCs e hiPSCs de pacientes com TDM estudados no ELECT. Neurônios derivados dessas hiPSCs constituirão material de estudo para outros grupos de pesquisa interessados no estudo da TDM, e poderão ser utilizados em testes futuros de resposta a medicamentos.

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo geral

O objetivo geral deste projeto foi o estabelecimento de um modelo *in vitro* para o estudo do TDM e da resposta a medicamentos.

2.2 Objetivos específicos

- 1- Implementar no laboratório uma metodologia de geração de hiPSC em larga escala;
- 2- Coletar e armazenar amostras de MNCs de indivíduos com TDM participantes do estudo ELECT;
- 3- Estabelecer linhagens de hiPSCs a partir de sangue periférico desses indivíduos com TDM;
- 4- Estabelecer um protocolo de diferenciação neural das hiPSCs.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Coleta de amostras

Para a obtenção das MNCs foram utilizadas amostras de sangue de doadores entre 18 e 65 anos, participantes do projeto intitulado “Escitalopram e Estimulação Transcraniana por Corrente Contínua no Transtorno Depressivo Maior: Um Ensaio Clínico Randomizado, Duplo-cego, Placebo-controlado de Não-Inferioridade”. Todos os participantes assinaram e receberam uma via do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Este termo possui explicações relevantes ao projeto, e informa que o projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário da USP em 1º de Fevereiro de 2013, CAAE: 10173712.3.0000.0076.

Foram coletados 16 ml de sangue periférico em tubos de coleta CPT (BD, Franklin Lakes, Nova Jersey, EUA), contendo o anticoagulante Citrato de Sódio, através de venopunção. Este procedimento foi realizado por profissionais qualificados do Hospital Universitário da USP, e as amostras foram então encaminhadas ao nosso laboratório para processamento.

3.2 Processamento de sangue periférico

Após coleta, as amostras foram centrifugadas durante 40 minutos na velocidade de 1800 x g, para a separação das células mononucleares dos outros componentes do sangue. Após centrifugação, foi coletada a nuvem de células que contém as MNCs; os tubos foram lavados com 5 ml cada de Tampão Fosfato-Salino (PBS, Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA) para coletar células que possam ter ficado grudadas no tubo, e foi feita uma nova centrifugação das células coletadas, durante 15 minutos, na velocidade de 400 x g, na temperatura de 4 °C. Após centrifugação, o sobrenadante foi descartado e cada amostra foi incubada durante 10 minutos em 5 ml Tampão de Lise de Células Vermelhas, composto por 4,145g de Cloreto de Amônio (Merck, Darmstadt, Alemanha), 0,5g de Bicarbonato de Potássio (Merck), e 100 µl de EDTA (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, Califórnia, EUA), diluídos em 500 ml de H₂O ultrapura. Após incubação, foram adicionados 45 ml de PBS em cada amostra, seguido de centrifugação durante 15 minutos, na velocidade de 400 x g, na temperatura de 4 °C. O sobrenadante foi descartado após centrifugação.

3.3 Armazenamento em Nitrogênio (N₂) líquido e descongelamento das células MNCs

Após o processamento, foram adicionados 3 ml de uma solução 90% Soro Fetal Bovino (FBS, Gibco) e 10% Dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma Aldrich, São Paulo, SP, Brasil) em cada amostra, e uma pequena alíquota foi separada e corada com Trypan Blue 0,4% (Gibco) para contagem manual na câmara de Neubauer e contagem automática com o Contador de Células TC20 (Bio-Rad, São Paulo, SP, Brasil). Cada amostra foi separada em 3 criotubos, contendo 1 ml de solução cada, e os criotubos foram colocados em um recipiente contendo isopropanol para congelamento gradual, mantidos em freezer com temperatura -80 °C durante 24 horas, sendo depois transferidos para tanques de armazenamento com N₂ líquido.

Para descongelamento, as amostras de MNCs retiradas do N₂ líquido foram mantidas em banho-maria na temperatura de 37 °C durante 2 minutos, sendo imediatamente transferidas para um tubo contendo 10 ml de meio de cultura para eritroblastos. Este meio era composto de meio Stemspan SFEM (Stemcell Technologies, Vancouver, Canadá) suplementado com Dexametasona (1 µM, Sigma Aldrich), Interleucina 3 (IL-3, 10 ng/ml, R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, EUA), Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-1, 40 ng/ml, R&D Systems), Fator de célula-tronco (SCF, 50 ng/ml, R&D Systems) e Eritropoetina (EPO, 2 U/ml, R&D Systems). As amostras foram centrifugadas durante 10 minutos, na velocidade de 300 x g, para precipitação das células e remoção do meio de congelamento. O sobrenadante foi descartado e cada amostra foi diluída em 2 ml de meio de cultura para eritroblastos.

3.4 Cultura e expansão de eritroblastos

Após descongelamento, uma alíquota de cada amostra foi separada para contagem, e cada cultura foi colocada em um poço de uma placa de cultura de seis poços na proporção de dois milhões de células por mililitro de meio para eritroblastos, mantidas a 37 °C, 5% de CO₂. O meio de cultura foi trocado a cada três dias, e as células foram cultivadas durante 12 dias. Durante as trocas de meio, cada amostra foi coletada em um tubo de centrifugação, centrifugadas durante 10 minutos, na velocidade de 300 x g. O sobrenadante foi descartado e cada amostra diluída em 2 ml de meio de cultura para eritroblastos. Uma pequena alíquota foi

separada para contagem e o volume final de meio foi ajustado conforme proporção citada acima. As amostras retornaram para o mesmo poço de cultura onde se encontravam após o procedimento, mantidas a 37 °C, 5% de CO₂.

3.5 Caracterização dos eritroblastos e avaliação da eficiência de nucleoporação

Após 12 dias de cultivo, uma amostra controle de MNC foi caracterizada por citometria com auxílio do aparelho Guava® easyCyte Flow Cytometer (Millipore, Billerica, Massachusetts, EUA). As células foram retiradas da placa de cultura, transferidas para um tubo e lavadas com 5 ml de PBS. Após centrifugação e descarte do sobrenadante, as amostras foram diluídas com 1 ml de PBS e contadas. Para cada corrida no citômetro de fluxo, foram utilizadas 1×10^5 células/ml (100 células/ μ l) que foram fixadas com Formaldeído 4% (Merck) diluído em PBS, lavadas com PBS, permeabilizadas com Triton X-100 0,5% (Sigma Aldrich) diluído em PBS, e bloqueadas com Albumina de Soro Bovino (BSA, Gibco) 2% diluída em PBS. Após esses procedimentos, a amostra foi separada em 3 tubos, que foram tratados com os anticorpos contra CD71, CD36 e CD235a (todos da BD), marcadores fenotípicos de eritroblastos, na concentração de 1:50 diluídos em PBS + BSA 2%, e incubadas durante 30 minutos em local protegido de luz para a marcação. As amostras foram lavadas mais duas vezes com PBS + 10% FBS e analisadas no citômetro.

Para avaliar a eficiência da nucleoporação deste tipo celular, esta mesma amostra controle foi nucleoporada com o plasmídeo pmaxGFP, contendo o gene repórter da Proteína Verde Fluorescente (GFP), fornecido pelo kit Amaxa® Human CD34 Cell Nucleofector® (Lonza, São Paulo, SP, Brasil), e com o aparelho Nucleofector™ 2b Device (Lonza), seguindo as especificações do fabricante. Após um período de recuperação de 48 horas, a amostra foi analisada por citometria conforme descrito acima, para verificar a expressão de GFP.

3.6 Nucleoporação com plasmídeos de reprogramação

Após a cultura dos eritroblastos durante 12 dias, as células foram nucleoporadas como descrito no item anterior. Foram utilizadas duas combinações de plasmídeos de reprogramação desenvolvidos pelo grupo do Dr. Linzhao Cheng: pEB-C5 e pEB-Tg (CHOU et al., 2011, figura 1); MMK, MOS e MBX (CHOU et al.,

2015; figura 2), adquiridos da empresa Addgene (Addgene, Cambridge, Massachusetts, EUA). A nucleoporação seguiu as especificações do fabricante.

As células foram imediatamente transferidas para placas com Fibroblastos Embrionários de Camundongos (MEFs), e cultivadas em meio Essential 8™ (E8, Gibco).

Figura 1 - Representação do primeiro conjunto de plasmídeos episomais para a geração de hiPSCs. **(A)** Os fatores de transcrição Oct4, Sox2, Klf4, cMyc e Lin28 foram inseridos no backbone do plasmídeo pCEP4, gerando o plasmídeo pEB-C5, para induzir a reprogramação celular. **(B)** O gene de expressão do antígeno T grande SV40 (SV40-T) foi inserido no backbone do plasmídeo pCEP4, gerando o plasmídeo pEB-Tg, para aumentar a eficiência de reprogramação (CHOU et al., 2011).

Figura 2 - Representação do segundo conjunto de plasmídeos episomais para a geração de hiPSCs. **(A)** Os fatores de transcrição Oct4 e Sox2 foram inseridos no backbone do plasmídeo pCEP4 gerando o plasmídeo MOS, enquanto que **(B)** os fatores de transcrição c-Myc e Klf4 foram inseridos no backbone do plasmídeo pCEP4 gerando o plasmídeos MMK. Ambos foram utilizados para induzir a reprogramação celular. **(C)** O gene de expressão da proteína BCL-XL foi inserido no backbone do plasmídeo pCEP4 gerando o plasmídeo MBX, para diminuir a morte celular e aumentar a eficiência de reprogramação. Figura retirada de CHOU et al., 2015.

3.7 Recuperação das células e aparecimento das colônias de hiPSCs

Após a nucleoporação, as células foram cultivadas em meio E8, mantidas a 37 °C, 5% CO₂, 5% de O₂ (CHOU et al., 2011, 2015), trocando-se o meio diariamente e sendo observadas até a formação de colônias de hiPSC. Após o aparecimento das colônias, as culturas foram expandidas, trocando-se o meio diariamente, até se obter uma quantidade suficiente de células para realizar os testes de caracterização de pluripotência, integração dos plasmídeos, cariótipo, integridade genômica, análise de identidade celular, e contaminação por micoplasma.

3.8 Caracterização de pluripotência por citometria de fluxo

Para iniciar a caracterização, foi realizada verificação de pluripotência através de citometria de fluxo com o kit Human Pluripotent Stem Cell Transcription Factor Analysis (BD), com os anticorpos contra Nanog, Oct3/4 e Sox2, marcadores de células pluripotentes fornecidos pelo kit, comparando-as com a respectivas linhagens marcadas com isotipos controles dos anticorpos. O protocolo foi realizado conforme orientações do fabricante.

3.9 Ausência de integração dos plasmídeos

Para garantir a qualidade da reprogramação e confirmar que os plasmídeos não se integraram ao genoma das linhagens geradas, DNA total das culturas de hiPSCs foi extraído com o kit QIAamp® DNA Mini Kit (QIAGEN, São Paulo, SP, Brasil). Este DNA foi utilizado para uma reação de PCR com um par de primers que detectam os vetores utilizados na reprogramação. A sequência dos primers utilizados foi:

Primer EBNA1_D: 5'-TTTAATACGATTGAGGGCGTCT-3',

Primer EBNA1_U: 5'-GGTTTTGAAGGATGCGATTAAG-3',

O DNA dos plasmídeos de reprogramação foi utilizado como controle positivo.

3.10 Verificação de integridade genômica por SNP Array

Para verificação da integridade genômica, DNA total das culturas de hiPSCs geradas neste projeto foi extraído com o kit QIAamp® DNA Mini Kit (QIAGEN), e encaminhado para o Institut für Humangenetik (Bereich Genomics, Universitat Bonn, Alemanha), para a realização da análise de *Single Nucleotide Polymorphism Array* (SNP array), conforme o protocolo do próprio laboratório.

3.11 Análise de identidade celular por STR

Para confirmar a identidade das hiPSCs geradas e garantir que não ocorreu contaminação ou troca de amostras durante os procedimentos de reprogramação e cultivo, as linhagens geradas e suas respectivas MNCs de origem foram analisadas através de genotipagem de microssatélites em repetições curtas em tandem (STR). DNA de cada linhagem e sua respectiva MNC foi extraído e utilizado como amostras para o kit AmpFISTR® Identifiler® Plus PCR Amplification (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Foster City, Califórnia, EUA), seguindo as especificações do fabricante. Os produtos de PCR desse kit foram encaminhados para o Centro de Estudos do Genoma Humano, onde foram analisados. Os resultados dessa genotipagem foram analisados com o software GeneMapper® (Applied Biosystems).

3.12 Verificação de contaminação por micoplasma

Para garantir a qualidade das culturas, foi coletada uma alíquota do meio de cultivo das hiPSCs e utilizada para análise de micoplasma com o kit MycoScope PCR Detection (Genlantis, San Diego, Califórnia, EUA), segundo as especificações do fabricante.

3.13 Diferenciação e cultura neuronal

Em conjunto com a reprogramação para obtenção de linhagens de hiPSCs, a linhagem controle iPS03, de um indivíduo sem TDM, foi tratada com meios de cultura e suplementos específicos para induzir sua diferenciação em neurônios serotoninérgicos, segundo o protocolo estabelecido por Lu e colaboradores (LU et al., 2016), para estabelecer esse procedimento em nosso laboratório.

Para a diferenciação, as colônias em cultura foram removidas das placas de cultivo com Accutase (Gibco), transferidas para novas placas e cultivadas até atingirem 20% de confluência. Em seguida, foi adicionado meio “SDC”, composto por 47% meio DMEM F12 (Gibco), 47% meio Neurobasal (Gibco), 1% Glutamax (Gibco), 1% MEM NEAA (Gibco), 1% Suplemento N2 (Gibco), 2% Suplemento B27 (Gibco), 1% Antibiótico-Antimicótico (Gibco), SB431245 (2 µM, R&D Systems), DMH1 (2 µM, R&D Systems) e CHIR99021 (3 µM, R&D Systems). As células foram mantidas neste meio por 7 dias. No 7º dia, as células foram passadas manualmente

para um novo poço, na proporção 1:3, e cultivadas com meio SDC suplementado com SHH (1000 ng/ml, R&D Systems), por mais 7 dias. No 14º dia, as células foram passadas novamente na proporção 1:3, e cultivadas com meio SDC suplementado com FGF4 (10 ng/ml, R&D Systems), por mais 7 dias. No 21º dia, as células foram passadas novamente na proporção 1:3, e cultivadas com meio “NDM”, composto por 95% meio Neurobasal, 1% MEM-NEAA, 1% Antibiótico-Antimicótico, 1% Suplemento N2, 2% Suplemento B27, BDNF (10 ng/ml, R&D Systems), GDNF (10 ng/ml, R&D Systems), Ácido Ascórbico (200 µM, Sigma Aldrich), TGFb3 (1 ng/ml, R&D Systems), DAPT (2,5 µM, R&D Systems), IGF-I (10 ng/ml, R&D Systems) e Laminina (1 µg/ml, Gibco), por mais 7 dias. No 28º dia o cultivo foi interrompido, foram tiradas fotos das colônias com microscópio invertido e as células foram tratadas para o procedimento de imunocitoquímica.

3.14 Imunocitoquímica dos neurônios serotoninérgicos

Para caracterizar as células diferenciadas, foi realizado experimento de imunocitoquímica 28 dias após o início da diferenciação. O meio de cultura foi retirado dos poços, as células foram fixadas com Formaldeído 4% diluído em PBS, lavadas com PBS, permeabilizadas com Triton X-100 0,1% diluído em PBS, bloqueadas com BSA 2% diluída em PBS, e então marcadas com os anticorpos contra Nestin (Abcam, Cambridge, Reino Unido), β -Tubulina III (Tuj1, Abcam), 5-hidroxitriptamina (5-HT, Abcam), Triptofano Hidroxilase 2 (TPH2, Abcam), Receptor 1A de 5-HT (R5-HT, Abcam), e Transportador de 5-HT (T5-HT, Abcam). Foram utilizados anticorpos secundários AlexaFluor 488 e AlexaFluor 594 (ambos da Thermo Fisher Scientific) adequados para cada primário, e 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Thermo Fisher Scientific) foi utilizado para marcar o núcleo das células. As concentrações dos anticorpos foram determinadas conforme instruções dos fabricantes. As placas foram analisadas com auxílio de um microscópio de fluorescência.

4 RESULTADOS

Ao todo, foram coletadas e processadas amostras de sangue de 66 dos 245 participantes do estudo ELECT. A Tabela 1 descreve as amostras que foram coletadas, qual grupo do estudo ELECT elas foram incluídas, e se os pacientes foram responsivos ou não ao tratamento utilizado.

Tabela 1 - Amostras de sangue coletadas dos participantes do estudo ELECT, separados no grupo ao qual estavam incluídos e suas respostas aos tratamentos submetidos.

ETCC ativa + placebo		ETCC simulada + Escitalopram		ETCC simulada + Placebo	
Responsivo	Não Responsivo	Responsivo	Não Responsivo	Responsivo	Não Responsivo
030 - MI	045 - RMSM	015 - FCS	018 - MCRO	088 - LCA	087 - RMA
062 - STC	092 - EAN	019 - DRM	052 - PHT	054 - EG	203 - PPB
074 - GVG	093 - PLV	040 - CPAC	117 - MCA	122 - ESC	209 - AM
075 - SOMU	121 - PSLC	073 - RSS	130 - IPMS	213 - FOMC	214 - RLG
089 - STG	153 - VBB	086 - SGB	215 - JON	220 - VLDB	251 - FDO
114 - ACB	192 - GAF	091 - ACS	236 - LCM	239 - CROC	252 - MNMS
123 - NAL	208 - LAA	133 - SRCA	243 - RGS		258 - HS
235 - KRB	212 - ABTM	140 - AAO	244 - NGG		
242 - TMK	225 - KKWM	143 - ISM	249 - MMMS		
261 - ACS	226 - PBD	216 - NMA	250 - FLM		
	228 - MCSRD	217 - MFM	259 - EM		
	233 - BVA	229 - SRB			
	238 - RCCS	230 - FFP			
	241 - MSL	231 - AAS			
	247 MSC	237 - PCF			
		240 - CORC			
		245 - FMJ			

Os códigos representam os números de recrutamento e iniciais dos pacientes dentro do estudo (Ex: 030 – MI)

4.1 Cultura e expansão de eritroblastos

As proteínas CD71, CD36 e CD235a são normalmente encontradas em células da linhagem eritróide, sendo utilizadas como marcadores em estudos envolvendo maturação de células do sangue, leucemias eritróides e outras patologias relacionadas às células sanguíneas. Em conjunto, a expressão destes 3 marcadores ajuda a detectar a presença de eritroblastos em amostras de sangue (MARSEE et al., 2010). A análise de citometria de fluxo mostrou um grande aumento da porcentagem de células positivas para esses marcadores depois de 12 dias de cultivo, confirmando a expansão dos eritroblastos em nossas culturas (Figura 3).

Figura 3 - Caracterização da cultura de eritroblastos. Citometria de fluxo no primeiro (cinza) e 12º (preto) dias de cultura. Os marcadores analisados estão indicados acima de cada histograma. Em vermelho, o percentual de células positivas no 1º e no 12º dias de cultura.

No teste de nucleoporação desta amostra controle com o plasmídeo pmaxGFP, a expressão de GFP foi confirmada em 96% das células nucleoporadas (Figura 4).

Figura 4 - Eficiência de transfecção de eritroblastos. Citometria de fluxo de células transfectadas com o plasmídeo expressando o gene repórter GFP (preto) e células não transfectadas (cinza). Em vermelho, o percentual de células positivas em cada condição.

4.2 Geração de hiPSCs

Das amostras de MNCs coletadas no projeto, seis passaram pelo procedimento de expansão e reprogramação, em dois momentos separados. No primeiro experimento, realizado no ano de 2014, foi utilizada a combinação de plasmídeos publicada no artigo de Chou e colaboradores (2011), e foram utilizadas as amostras MNC32, MNC33 e MNC34 (identificação utilizada dentro da rotina de nosso laboratório), que foram efetivamente reprogramadas, passando a ser denominadas iPS32, iPS33 e iPS34 (figuras 5A, 5B e 5C) respectivamente. Ao planejar o segundo experimento de reprogramação, optamos por utilizar a nova combinação de plasmídeos publicada no artigo de Chou e colaboradores (2015), visto que era uma versão melhorada e mais eficiente dos plasmídeos usados no primeiro experimento. Com a segunda combinação de plasmídeos, foram utilizadas as amostras MNC49, MNC50 e MNC51, que também foram efetivamente reprogramadas e geraram as iPS49, iPS50 e iPS51 (figuras 5D, 5E e 5F), respectivamente.

Figura 5 - Colônias das iPS32 (A), iPS33 (B), iPS34 (C), iPS49 (D), iPS50 (E) e iPS51 (F), após reprogramação celular, aumento de 4x. As barras brancas indicam a escala de aumento de 1000 µm.

4.3 Confirmação de pluripotência por citometria de fluxo

Todas as linhagens passaram por análise de citometria de fluxo com anticorpos contra os marcadores Nanog, Oct3/4 e Sox2, e apresentaram marcação positiva acima de 70% (Figura 6). As análises das outras linhagens se encontram no Apêndice A.

Figura 6: Caracterização de pluripotência da linhagem iPS32 na passagem 21 (p21). Citometria de fluxo com os anticorpos contra Nanog (A), Oct3/4 (B) e Sox2 (C), indicados abaixo de cada histograma. O histograma preto representa a amostra marcada com isotipos controles, e o vermelho representa as células marcadas com os anticorpos específicos, com o percentual de células positivas indicado.

4.4 Integração dos plasmídeos

Após análise de PCR com oligonucleotídeos específicos para os plasmídeos utilizados, verificou-se que nenhuma das linhagens testadas apresentava integração dos plasmídeos em seu DNA (Figura 7).

Figura 7 - Análise de integração dos vetores no genoma das hiPSCs. PCR de DNA genômico das diferentes linhagens de hiPSCs, utilizando primers que amplificam a região EBNA1 dos vetores de reprogramação MBX, MMK, MOS, pEB-C5 e pEB-Tg. Como controles positivos, utilizamos 100 ng de DNA dos plasmídeos (cinco primeiras amostras à esquerda). Branco representa o controle negativo, sem DNA.

4.5 Análise de integridade genômica por SNP Array

Foram realizadas análises de SNP array para as seis linhagens de hiPSCs geradas neste projeto, mostrando que as mesmas possuíam um genoma completo com 46 cromossomos e sem alterações estruturais detectáveis por esta técnica. A figura 8 representa o resultado da iPS32; o resultado das outras linhagens pode ser encontrado no Apêndice B.

Figura 8 - Análise de SNP Array da linhagem iPS32. Nenhuma grande aberração cromossômica foi detectada por esta técnica. Os gráficos acima das ilustrações dos cromossomos representam a frequência alélica (B allele frequency) e a razão alélica (Log R Ratio).

4.6 Análise de identidade celular por STR

Como controle de qualidade, as amostras de MNC e das respectivas hiPSCs foram genotipadas para se confirmar a identidade das mesmas. As análises indicaram que não ocorreram contaminações ou trocas de amostras ao longo do projeto, e que todas as linhagens de hiPSCs correspondiam adequadamente às suas MNCs de origem. A Tabela 2 apresenta os marcadores genotipados e o número de repetições encontradas para cada linhagem. A Figura 9 mostra os resultados da genotipagem da iPS32, exibidos pelo programa de análise. As representações das outras linhagens se encontram no Apêndice C.

Tabela 2 - Genotipagem das linhagens de hiPSCs

Marcador	iPS 32	iPS 33	iPS 34	iPS 49	iPS 50	iPS 51
D8S1179	14	13	14	11 ; 13	11 ; 13	13 ; 15
D21S11	28	28 ; 32.2	29 ; 33.2	29 ; 30	28 ; 31.2	29 ; 32.2
D7S820	8 ; 10	12	8 ; 11	9 ; 12	10 ; 12	11 ; 12
CSF1PO	10 ; 11	12 ; 13	10 ; 11	10 ; 12	10 ; 12	10 ; 11
D3S1358	18	15 ; 17	15	15	14 ; 17	15 ; 16
TH01	8 ; 9.3	9 ; 10	8 ; 9.3	6 ; 7.3	6	6 ; 7
D13S317	11 ; 13	8	8 ; 11	9 ; 13	8 ; 9	8 ; 12
D16S539	11 ; 12	11	12 ; 13	11 ; 12	11 ; 13	8 ; 10
D2S1338	17 ; 24	17 ; 20	17	19 ; 23	24 ; 25	19 ; 22
D19S433	15 ; 17.2	13 ; 15.2	14	10.2 ; 14	12 ; 15	10 ; 13.2
vWA	11 ; 15	16 ; 18	18	11 ; 17	16 ; 19	16
TPOX	9 ; 11	8 ; 11	10 ; 11	8 ; 10	8	8 ; 11
D18S51	13 ; 18	12 ; 15	12 ; 19	12 ; 13	17	16 ; 17
AMEL	X	X	X	X	X ; Y	X ; Y
D5S818	11	12 ; 13	10 ; 12	9 ; 12	10 ; 13	9 ; 10
FGA	20 ; 22	22 ; 26	21 ; 22	22	22 ; 23	22 ; 23

Figura 9 - Genotipagem da iPS32. Resultado obtido através do Software Gene Mapper por cromatograma exemplificando a comparação de padrão dos marcadores STRs utilizados para os locus D3S1358 (Cromossomo 3), TH01 (Cromossomo 11), D13S317 (Cromossomo 13), D16S539 (Cromossomo 16) e D2S1338 (Cromossomo 2) entre o DNA obtido da hiPSC 32 (abaixo) e sua respectiva MNC (cima) demonstrando que ambas possuem exatamente o mesmo padrão de repetição das sequências nas regiões polimórficas de cada marcador comprovando a identidade correta da linhagem gerada.

4.7 Ausência de contaminação por micoplasma

Foi realizada análise de contaminação por micoplasma para garantir a qualidade das culturas. O teste realizado através de reação de PCR mostrou resultados negativos quanto à presença do contaminante para as linhagens de hiPSCs geradas neste projeto (Figura 10).

Figura 10 - Análise por PCR para detecção de contaminação por micoplasma para as linhagens **(A)** iPS32, iPS33, iPS34, e **(B)** iPS49, iPS50 e iPS51. MW - marcador molecular; CT+ - controle positivo; CT- - controle negativo.

4.8 Diferenciação e cultura neuronal

A linhagem de hiPSC controle iPS03, derivada de um indivíduo sem TDM, foi cultivada durante 28 dias, seguindo o protocolo estabelecido por Lu e colaboradores (2015). Seu desenvolvimento foi acompanhado e registrado através de microscópio invertido, sendo possível observar formação de prolongamentos neurais e agregados celulares após 15 dias de diferenciação, que aumentam em quantidade por volta de 20 e 30 dias de cultivo (figura 11A e 11B).

Figura 11 - Campo claro no aumento de 20 x após **(A)** 20 dias de indução neural e **(B)** 30 dias de indução neural da cultura de hiPSC, seguindo protocolo publicado por LU et al., 2016. As barras brancas indicam a escala de aumento de 200 μm.

4.9 Imunocitoquímica dos neurônios dopaminérgicos

O teste foi realizado após 28 dias de cultivo, com uma combinação de 1 ou 2 anticorpos, contra as seguintes proteínas: Nestin, marcador de diferentes tipos celulares neurais, envolvido no desenvolvimento de neurônios; β -Tubulina III (Tuj1), proteína do citoesqueleto de diferentes tipos de neurônios; 5-hidroxitriptamina (5-HT), também conhecida como serotonina, principal neurotransmissor liberado pelos neurônios serotonérgicos; Triptofano Hidroxilase 2 (TPH2), enzima responsável pela produção de serotonina no sistema nervoso central; Receptor 1A de 5-HT (R5-HT), um dos subtipos de receptores encontrados em neurônios pós-sinápticos, responsáveis por transmitir o sinal nervoso; e Transportador de 5-HT (T5-HT), estruturas presentes nos neurônios pré-sinápticos responsáveis pela recaptação de 5-HT após a transmissão do sinal nervoso. Todos os anticorpos testados apresentaram marcação positiva, confirmando que os neurônios diferenciados através deste protocolo eram neurônios serotonérgicos (Figura 12).

Figura 12 - Indução neural de hiPSC controle conforme o protocolo de LU et al., 2016, após 28 dias de cultivo, aumento de 20 x. (A) Células marcadas com anticorpo contra 5-HT, principal neurotransmissor envolvido em neurônios serotonérgicos. (B) Células marcadas com anticorpo contra T5-HT, estrutura responsável pela recaptação de 5-HT. (C) Células marcadas com anticorpo contra Nestin, fator envolvido no desenvolvimento de neurônios. (D) Células marcadas com R5-HT, receptor de 5-HT. (E) Células marcadas com anticorpo contra Tuj-1, proteína do citoesqueleto de neurônios. (F) Células marcadas com TPH2, enzima responsável pela produção de 5-HT.

5 DISCUSSÃO

Ao longo dos 10 anos de surgimento da técnica de indução da pluripotência, muito progresso já foi feito na pesquisa envolvendo hiPSCs nas áreas de biologia de células-tronco e medicina regenerativa, além de modelagem de doenças e triagem de novos medicamentos (SAYED et al., 2016; SHI et al., 2016).

Com a caracterização de pluripotência confirmada nas linhagens geradas em nosso laboratório, geramos insumos que poderão ser utilizadas em diversos projetos de pesquisa, desde o estudo das bases moleculares da TDM, até a utilização dessas células na triagem de drogas para o tratamento desta doença.

No campo de pesquisa sobre novos compostos com capacidade para serem utilizados como medicamentos, os pesquisadores utilizam a capacidade de grande expansão das hiPSCs para montar testes de triagem em larga escala, avaliando os efeitos desses compostos em diversas doenças. Um grupo de pesquisadores avaliou a eficiência de cerca de 350 compostos, aplicados em neurônios corticais derivados de hiPSCs, em prevenir a toxicidade induzida por beta amilóides envolvida na doença de Alzheimer, observando uma taxa de efetividade de aproximadamente 5,4% desses compostos (XU et al., 2013). Uma equipe envolvida em estudar Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA), utilizando neurônios motores derivados de hiPSCs de pacientes com esta doença, realizou uma triagem com 1757 pequenas moléculas e verificou que cerca de 2% delas foi capaz de diminuir a quantidade de células com agregados de TDP-43, a principal proteína envolvida na ELA (Burkhardt et al., 2013). Em 2012, Hoing e colaboradores avaliaram 11,819 pequenas moléculas que pudessem ter capacidade de neuroproteção em células progenitoras neurais derivadas de hiPSCs, identificando compostos que modularam a neurotoxicidade microglial, fornecendo possíveis substâncias de interesse para serem testadas em pesquisas de doenças neurodegenerativas (HOING et al., 2012).

Com a habilidade de diferenciação oferecida pelas hiPSCs, pode-se criar modelos de pacientes que apresentem determinada patologia e procurar fenótipos que possam caracterizar essa doença, além de ajudar a entender a farmacogenômica dela (COOPER et al., 2012; MILLARD et al., 2016; SHI et al., 2016). O trabalho publicado por Biel e colaboradores (2015) mostrou que múltiplas

linhagens de hiPSCs de pacientes com hipertensão puderam eficientemente ser diferenciadas em células do músculo liso vascularizado funcionais, além de mostrar que estas células possuíam resposta contrátil a endotelina-1 e apresentaram uma resposta típica quando induzidas com fator α de necrose tumoral. Este trabalho abriu as portas para uma iniciativa de pesquisa maior que pretende identificar a significância biológica de polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNPs) na farmacogenômica da hipertensão (BIEL et al., 2015).

Este é o primeiro trabalho descrevendo uma coleção de células primárias (MNCs) e hiPSCs de indivíduos com TDM, provenientes do ensaio clínico ELECT. A vantagem de se coletar material de participantes de ensaios clínicos é que estes são bem caracterizados clinicamente, e temos ainda informações sobre sua resposta aos diferentes tratamentos. Com as amostras de MNCs de pacientes com TDM que foram coletadas neste projeto, em conjunto com as informações fornecidas pela equipe do estudo ELECT sobre a resposta que os participantes tiveram em cada tratamento, é possível desenhar diversos experimentos para tentar entender os mecanismos moleculares envolvidos na resposta ao tratamento. As amostras podem ser selecionadas quanto a idade, sexo, condição social ou outros parâmetros, em seguida reprogramadas em hiPSCs e então diferenciadas em diversos tipos de neurônios para se avaliar quais respondem a determinado tratamento. Uma vez analisados os resultados destes possíveis estudos, pode-se levar os tratamentos testados para um estudo clínico maior e melhor condicionado para verificar se pacientes com TDM respondem de maneira semelhante, e ao mesmo tempo continuar a pesquisa com as culturas celulares para procurar por variáveis moleculares que estejam implicadas na resposta ao tratamento e no mecanismo de ação desse transtorno (INOUE et al., 2014).

Neste sentido, foi estabelecida a técnica de diferenciação de hiPSCs para neurônios serotoninérgicos, de modo a fornecer uma segunda ferramenta de estudo para projetos futuros sobre TDM. As células diferenciadas apresentaram prolongamentos celulares característicos de linhagens neurais, e expressão de marcadores específicos de neurônios serotoninérgicos.

Pensando em perspectivas futuras para se criar um modelo do TDM com estas células, algumas abordagens poderiam ser tomadas. Dentro do nosso

conjunto de MNCs dos pacientes do estudo ELECT, pode-se verificar aqueles que responderam e aqueles que não responderam ao tratamento com ETCC, gerar neurônios desses pacientes, simular na cultura celular a corrente elétrica que esses pacientes receberam, e então verificar se ocorrem alterações nos potenciais de ação, liberação e produção de serotonina, expressão de receptores e transportadores, comparadas com amostras que não receberam a estimulação e amostras de pessoas saudáveis. Além disso, assim como em trabalhos mencionados acima, pode-se testar também o efeito que antidepressivos apresentariam em culturas celulares, se causariam mudanças de expressão e/ou função nos neurônios. Essas pesquisas poderão levar ao descobrimento de novos alvos para medicamentos e novos conhecimentos na biologia molecular da depressão (SOLIMAN et al., 2017).

6 CONCLUSÃO

Neste projeto conseguimos gerar uma coleção de células MNCs de pacientes com Transtorno Depressivo Maior, responsivos e resistentes a diferentes tratamentos, utilizar de modo efetivo a tecnologia de reprogramação celular gerando hiPSCs de 6 desses pacientes, e implantar um protocolo de diferenciação para neurônios serotoninérgicos. Através da utilização desses modelos celulares, o conhecimento em torno do TDM pode ser aumentado, gerando novos medicamentos e tratamentos para estes transtornos.

REFERÊNCIAS*

ALLEN, DD. et al. Cell lines as *in vitro* models for drug screening and toxicity studies. **Drug development and industrial pharmacy**, v. 31, n. 8, p. 757-768, 2005.

ANDRADE, L. et al. The epidemiology of major depressive episodes: results from the International Consortium of Psychiatric Epidemiology (ICPE) Surveys. **International journal of methods in psychiatric research**, v. 12, n. 1, p. 3-21, 2003.

ARDHANAREESWARAN, K. et al. Human induced pluripotent stem cells for modelling neurodevelopmental disorders. **Nature Reviews Neurology**, v. 13, n. 5, p. 265-278, 2017.

BARBERI, T. et al. Neural subtype specification of fertilization and nuclear transfer embryonic stem cells and application in parkinsonian mice. **Nature biotechnology**, v. 21, n. 10, p. 1200-1207, 2003.

BERLIM, M. T.; TURECKI, G.. What is the meaning of treatment resistant/refractory major depression (TRD)? A systematic review of current randomized trials. **European Neuropsychopharmacology**, v. 17, n. 11, p. 696-707, 2007.

BIEL, N. et al. Vascular Smooth Muscle Cells From Hypertensive Patient-Derived Induced Pluripotent Stem Cells to Advance Hypertension Pharmacogenomics. **Stem cells translational medicine**, v. 4, n. 12, p. 1380-1390, 2015.

BRENNAND, K. J. et al. Modelling schizophrenia using human induced pluripotent stem cells. **Nature**, v. 473, n. 7346, p. 221-225, 2011.

BRUNONI, A. R. et al. Clinical research with transcranial direct current stimulation (tDCS): challenges and future directions. **Brain stimulation**, v. 5, n. 3, p. 175-195, 2012.

BRUNONI, A. R. et al. The sertraline vs electrical current therapy for treating depression clinical study: results from a factorial, randomized, controlled trial. **JAMA psychiatry**, v. 70, n. 4, p. 383-391, 2013.

BRUNONI, A. R. et al. Trial of Electrical Direct-Current Therapy versus Escitalopram for Depression. **New England Journal of Medicine**. v. 376, n.26, p. 2523-2533, 2017.

*De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BURKHARDT, M. et al. A cellular model for sporadic ALS using patient-derived induced pluripotent stem cells. **Molecular and Cellular Neuroscience**, v. 56, p. 355-364, 2013.

CABRAL, A. C. V. et al. ISOLAMENTO, DIFERENCIAÇÃO E ASPECTOS BIOQUÍMICOS DE CÉLULAS-TRONCO DE LÍQUIDO AMNIÓTICO. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 54, n. 6, p. 489-493, 2008.

CHAMBERS, S. M. et al. Highly efficient neural conversion of human ES and iPS cells by dual inhibition of SMAD signaling. **Nature biotechnology**, v. 27, n. 3, p. 275-280, 2009.

CHEN, J. et al. Bilateral vs. unilateral repetitive transcranial magnetic stimulation in treating major depression: a meta-analysis of randomized controlled trials. **Psychiatry research**, v. 219, n. 1, p. 51-57, 2014.

CHOU, B. et al. Efficient human iPS cell derivation by a non-integrating plasmid from blood cells with unique epigenetic and gene expression signatures. **Cell research**, v. 21, n. 3, p. 518-529, 2011.

CHOU, B. et al. A facile method to establish human induced pluripotent stem cells from adult blood cells under feeder-free and xeno-free culture conditions: a clinically compliant approach. **Stem cells translational medicine**, v.4, n.4, p.320-332, 2015.

COOPER, O. et al. Pharmacological Rescue of Mitochondrial Deficits in hiPSC-Derived Neural Cells from Patients with Familial Parkinson's Disease. **Science Translational Medicine**, v. 4, n. 141, p. 141ra90, 2012.

EBERT, A. D.; LIANG, P.; WU, J. C. Induced pluripotent stem cells as a disease modeling and drug screening platform. **Journal of cardiovascular pharmacology**, v. 60, n. 4, p. 408, 2012.

EICHLER, H.-G. et al. New drug approval success rate in Europe in 2009. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 9, n. 5, p. 355-356, 2010.

FERRARI, A. J. et al. Global variation in the prevalence and incidence of major depressive disorder: a systematic review of the epidemiological literature. **Psychological medicine**, v. 43, n. 3, p. 471-481, 2013.

GELENBERG, A. J. et al. The history and current state of antidepressant clinical trial design: a call to action for proof-of-concept studies. **The Journal of clinical psychiatry**, 2008.

GUNASEELI, I. et al. Induced pluripotent stem cells as a model for accelerated patient-and disease-specific drug discovery. **Current medicinal chemistry**, v. 17, n. 8, p. 759, 2010.

HENG, B. C. et al. Induced pluripotent stem cells: a new tool for toxicology screening?. **Archives of toxicology**, v. 83, n. 7, p. 641-644, 2009.

HÖING, S. et al. Discovery of Inhibitors of Microglial Neurotoxicity Acting Through Multiple Mechanisms Using a Stem-Cell-Based Phenotypic Assay. **Cell Stem Cell**, v. 11, n. 5, p. 620-632, 2012.

Innovation.org:

http://www.innovation.org/drug_discovery/objects/pdf/RD_Brochure.pdf; acessado em 10/05/2014

INOUE, H. et al. iPS cells: a game changer for future medicine. **The EMBO journal**, v. 33, n. 5, p. 409-417, 2014.

ISRAEL, M. A. et al. Probing sporadic and familial Alzheimer's disease using induced pluripotent stem cells. **Nature**, v. 482, n. 7384, p. 216-220, 2012.

KAITIN, K. I. Deconstructing the drug development process: the new face of innovation. **Clinical pharmacology and therapeutics**, v. 87, n. 3, p. 356, 2010.

KANEKO, S.; OTSU, M.; NAKAUCHI, H. Reprogramming adult hematopoietic cells. **Current opinion in hematology**, v. 17, n. 4, p. 271-275, 2010.

KESSLER, R. C. et al. The epidemiology of major depressive disorder: results from the National Comorbidity Survey Replication (NCS-R). **JAMA**, v. 289, n. 23, p. 3095-105, 3 jun. 2003.

KIM, J. et al. Dopamine neurons derived from embryonic stem cells function in an animal model of Parkinson's disease. **Nature**, v. 418, n. 6893, p. 50-56, 2002.

KORNSTEIN, S. G.; SCHNEIDER, R. K. Clinical features of treatment-resistant depression. **Journal of Clinical Psychiatry**, v. 62, p. 18-25, 2001.

KRIKS, S. et al. Dopamine neurons derived from human ES cells efficiently engraft in animal models of Parkinson's disease. **Nature**, v. 480, n. 7378, p. 547-551, 2011.

LEE, G. et al. Derivation of neural crest cells from human pluripotent stem cells. **Nature protocols**, v. 5, n. 4, p. 688-701, 2010.

LEE, S. et al. Efficient generation of midbrain and hindbrain neurons from mouse embryonic stem cells. **Nature Biotechnology**, v. 18, n. 6, p. 675-679, 2000.

LICINIO, J.; WONG, M. L. Serotonergic neurons derived from induced pluripotent stem cells (hiPSCs): a new pathway for research on the biology and pharmacology of major depression. **Molecular psychiatry**, v. 21, n. 1, p. 1, 2016.

LOH, Y. et al. Reprogramming of T cells from human peripheral blood. **Cell stem cell**, v. 7, n. 1, p. 15, 2010.

LOHOFF, F. W. Overview of the genetics of major depressive disorder. **Current psychiatry reports**, v. 12, n. 6, p. 539-546, 2010.

LU, J. et al. Generation of serotonin neurons from human pluripotent stem cells. **Nature Biotechnology**, v. 34, n. 1, p. 89-94, 2016.

MARSEE, D. K.; PINKUS, G. S.; YU, H.. CD71 (transferrin receptor) an effective marker for erythroid precursors in bone marrow biopsy specimens. **American journal of clinical pathology**, v. 134, n. 3, p. 429-435, 2010.

MERTENS, J. et al. Differential responses to lithium in hyperexcitable neurons from patients with bipolar disorder. **Nature**, v. 527, n. 7576, p. 95-99, 2015.

MILLARD, D. C. et al. Identification of Drug–Drug Interactions *In Vitro*: A Case Study Evaluating the Effects of Sofosbuvir and Amiodarone on hiPSC-Derived Cardiomyocytes. **Toxicological Sciences**, p. kfw153, 2016.

MUOTRI, A. R.. Células-tronco pluripotentes e doenças neurológicas. **Estudos avançados**, v. 24, n. 70, p. 71-79, 2010.

MURACA, M. et al. Diverging Concepts and Novel Perspectives in Regenerative Medicine. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 5, p. 1021, 2017.

PARK, I. et al. Disease-specific induced pluripotent stem cells. **Cell**, v. 134, n. 5, p. 877-886, 2008.

PELLETIER, S. J.; CICCHETTI, F.. Cellular and molecular mechanisms of action of transcranial direct current stimulation: evidence from *in vitro* and in vivo models. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 18, n. 2, p. pyu047, 2015.

PEREIRA, L. V. A importância do uso das células tronco para a saúde pública. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 13, n. 1, p. 07-14, 2008.

POUTON, C. W.; HAYNES, J. M. Embryonic stem cells as a source of models for drug discovery. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 6, n. 8, p. 605-616, 2007.

RATAJCZAK, M. Z. et al. Stem cells and their potential clinical applications in psychiatric disorders. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, 2017.

REATO, D.; BIKSON, M.; PARRA, L. C. Lasting modulation of *in vitro* oscillatory activity with weak direct current stimulation. **Journal of neurophysiology**, v. 113, n. 5, p. 1334-1341, 2015.

RISCH, S. C.; NEMEROFF, C. B. Neurochemical alterations of serotonergic neuronal systems in depression. **The Journal of clinical psychiatry**, v. 53, n. 10, p. 3-7, 1992.

ROSENBLAT, J. D.; KAKAR, R.; MCINTYRE, R. S. The cognitive effects of antidepressants in major depressive disorder: a systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 19, n. 2, 2016.

SALLI, U. et al. Serotonin neurons derived from rhesus monkey embryonic stem cells: similarities to CNS serotonin neurons. **Experimental neurology**, v. 188, n. 2, p. 351-364, 2004.

SARTIPY, P. et al. The application of human embryonic stem cell technologies to drug discovery. **Drug discovery today**, v. 12, n. 17, p. 688-699, 2007.

SAYED, N.; LIU, C.; WU, J. C. Translation of human-induced pluripotent stem cells: from clinical trial in a dish to precision medicine. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 67, n. 18, p. 2161-2176, 2016.

SEKI, T. et al. Generation of induced pluripotent stem cells from human terminally differentiated circulating T cells. **Cell stem cell**, v. 7, n. 1, p. 11-14, 2010.

SHI, Y. et al. Induced pluripotent stem cell technology: a decade of progress. **Nature Reviews Drug Discovery**, 2016.

SHROFF, G.; TITUS, J. D.; SHROFF, R. A review of the emerging potential therapy for neurological disorders: human embryonic stem cell therapy. **American journal of stem cells**, v. 6, n. 1, p. 1, 2017.

SOLIMAN, M. A. et al. Pluripotent stem cells in neuropsychiatric disorders. **Molecular Psychiatry**, 2017.

STAERK, J. et al. Reprogramming of peripheral blood cells to induced pluripotent stem cells. **Cell stem cell**, v. 7, n. 1, p. 20, 2010.

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, 2006.

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

TARGUM, S. D. Identification and treatment of antidepressant tachyphylaxis. **Innovations in clinical neuroscience**, v. 11, n. 3-4, p. 24, 2014.

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

TOKUYAMA, Y. et al. Functional characterization of rhesus embryonic stem cell-derived serotonin neurons. **Experimental Biology and Medicine**, v. 235, n. 5, p. 649-657, 2010.

VADODARIA, K. C. et al. Generation of functional human serotonergic neurons from fibroblasts. **Molecular psychiatry**, v. 21, n. 1, p. 49-61, 2016.

WATT, F. M.; DRISKELL, R. R. The therapeutic potential of stem cells. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, v. 365, n. 1537, p. 155-163, 2010.

WEINSHILBOUM, R. Inheritance and drug response. **New England Journal of Medicine**, v. 348, n. 6, p. 529-537, 2003.

WEISS, J. M. et al. Behavioral depression produced by an uncontrollable stressor: relationship to norepinephrine, dopamine, and serotonin levels in various regions of rat brain. **Brain Research Reviews**, v. 3, n. 2, p. 167-205, 1981.

WHO, 2017 - <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/254610/1/WHO-MSD-MER-2017.2-eng.pdf>, acessado em 03/06/2017

XU, X. et al. Prevention of β -amyloid induced toxicity in human hiPSC-derived neurons by inhibition of Cyclin-dependent kinases and associated cell cycle events. **Stem Cell research**, v. 10, n. 2, p. 213-227, 2013.

XU, Z. et al. Direct conversion of human fibroblasts to induced serotonergic neurons. **Molecular psychiatry**, v. 21, n. 1, p. 62-70, 2016.

APÊNDICE

A - Confirmação de pluripotência por citometria de fluxo

Figura 13 - Caracterização de pluripotência da linhagem iPS33 na passagem 13 (p13). Citometria de fluxo com os anticorpos contra Nanog (A), Oct3/4 (B) e Sox2 (C), indicados abaixo de cada histograma. O histograma preto representa a amostra marcada com isotipos controles, e o vermelho representa as células marcadas com os anticorpos específicos, com o percentual de células positivas indicado.

Figura 14 - Caracterização de pluripotência da linhagem iPS34 na passagem 7 (p7). Citometria de fluxo com os anticorpos contra Nanog (A), Oct3/4 (B) e Sox2 (C), indicados abaixo de cada histograma. O histograma preto representa a amostra marcada com isotipos controles, e o vermelho representa as células marcadas com os anticorpos específicos, com o percentual de células positivas indicado.

Figura 15 - Caracterização de pluripotência da linhagem iPS49 na passagem 7 (p7). Citometria de fluxo com os anticorpos contra Nanog (A), Oct3/4 (B) e Sox2 (C), indicados abaixo de cada histograma. O histograma preto representa a amostra marcada com isotipos controles, e o vermelho representa as células marcadas com os anticorpos específicos, com o percentual de células positivas indicado.

Figura 16 - Caracterização de pluripotência da linhagem iPS50 na passagem 7 (p7). Citometria de fluxo com os anticorpos contra Nanog (A), Oct3/4 (B) e Sox2 (C), indicados abaixo de cada histograma. O histograma preto representa a amostra marcada com isotipos controles, e o vermelho representa as células marcadas com os anticorpos específicos, com o percentual de células positivas indicado.

Figura 17 - Caracterização de pluripotência da linhagem iPS51 na passagem 16 (p16). Citometria de fluxo com os anticorpos contra Nanog (A), Oct3/4 (B) e Sox2 (C), indicados abaixo de cada histograma. O histograma preto representa a amostra marcada com isotipos controles, e o vermelho representa as células marcadas com os anticorpos específicos, com o percentual de células positivas indicado.

B - Análise de integridade genômica por SNP Array

Figura 18 - Análise de SNP Array da linhagem iPS33. Nenhuma grande aberração cromossômica foi detectada por esta técnica. Os gráficos acima das ilustrações dos cromossomos representam a frequência alélica (B allele frequency) e a razão alélica (Log R Ratio).

Figura 19 - Análise de SNP Array da linhagem iPS34. Nenhuma grande aberração cromossômica foi detectada por esta técnica. Os gráficos acima das ilustrações dos cromossomos representam a frequência alélica (B allele frequency) e a razão alélica (Log R Ratio).

Figura 20 - Análise de SNP Array da linhagem iPS49. Nenhuma grande aberração cromossômica foi detectada por esta técnica. Os gráficos acima das ilustrações dos cromossomos representam a frequência alélica (B allele frequency) e a razão alélica (Log R Ratio).

Figura 21 - Análise de SNP Array da linhagem iPS50. Nenhuma grande aberração cromossômica foi detectada por esta técnica. Os gráficos acima das ilustrações dos cromossomos representam a frequência alélica (B allele frequency) e a razão alélica (Log R Ratio).

Figura 22 - Análise de SNP Array da linhagem iPS51. Nenhuma grande aberração cromossômica foi detectada por esta técnica. Os gráficos acima das ilustrações dos cromossomos representam a frequência alélica (B allele frequency) e a razão alélica (Log R Ratio).

C - Análise de identidade celular por STR

Figura 23 - Genotipagem da iPS33. Resultado obtido através do Software Gene Mapper por cromatograma exemplificando a comparação de padrão dos marcadores STRs utilizados para os locus D3S1358 (Cromossomo 3), TH01 (Cromossomo 11), D13S317 (Cromossomo 13), D16S539 (Cromossomo 16) e D2S1338 (Cromossomo 2) entre o DNA obtido da hiPSC 32 (abaixo) e sua respectiva MNC (cima) demonstrando que ambas possuem exatamente o mesmo padrão de repetição das sequências nas regiões polimórficas de cada marcador comprovando a identidade correta da linhagem gerada.

Figura 24 - Genotipagem da iPS34. Resultado obtido através do Software Gene Mapper por cromatograma exemplificando a comparação de padrão dos marcadores STRs utilizados para os locus D3S1358 (Cromossomo 3), TH01 (Cromossomo 11), D13S317 (Cromossomo 13), D16S539 (Cromossomo 16) e D2S1338 (Cromossomo 2) entre o DNA obtido da hiPSC 32 (abaixo) e sua respectiva MNC (cima) demonstrando que ambas possuem exatamente o mesmo padrão de repetição das sequências nas regiões polimórficas de cada marcador comprovando a identidade correta da linhagem gerada.

Figura 25 - Genotipagem da iPS49. Resultado obtido através do Software Gene Mapper por cromatograma exemplificando a comparação de padrão dos marcadores STRs utilizados para os locus D3S1358 (Cromossomo 3), TH01 (Cromossomo 11), D13S317 (Cromossomo 13), D16S539 (Cromossomo 16) e D2S1338 (Cromossomo 2) entre o DNA obtido da hiPSC 32 (abaixo) e sua respectiva MNC (cima) demonstrando que ambas possuem exatamente o mesmo padrão de repetição das sequências nas regiões polimórficas de cada marcador comprovando a identidade correta da linhagem gerada.

Figura 26 - Genotipagem da iPS50. Resultado obtido através do Software Gene Mapper por cromatograma exemplificando a comparação de padrão dos marcadores STRs utilizados para os locus D3S1358 (Cromossomo 3), TH01 (Cromossomo 11), D13S317 (Cromossomo 13), D16S539 (Cromossomo 16) e D2S1338 (Cromossomo 2) entre o DNA obtido da hiPSC 32 (abaixo) e sua respectiva MNC (cima) demonstrando que ambas possuem exatamente o mesmo padrão de repetição das sequências nas regiões polimórficas de cada marcador comprovando a identidade correta da linhagem gerada.

Figura 27 - Genotipagem da iPS51. Resultado obtido através do Software Gene Mapper por cromatograma exemplificando a comparação de padrão dos marcadores STRs utilizados para os locus D3S1358 (Cromossomo 3), TH01 (Cromossomo 11), D13S317 (Cromossomo 13), D16S539 (Cromossomo 16) e D2S1338 (Cromossomo 2) entre o DNA obtido da hiPSC 32 (abaixo) e sua respectiva MNC (cima) demonstrando que ambas possuem exatamente o mesmo padrão de repetição das sequências nas regiões polimórficas de cada marcador comprovando a identidade correta da linhagem gerada.