

KAIANA RECCHIA

Reprogramação celular *in vitro* à pluripotência (geração de células iPSCs) no modelo suíno a partir da metodologia não transgênica e não invasiva

São Paulo

2020

KAIANA RECCHIA

Reprogramação celular *in vitro* à pluripotência (geração de células iPSCs) no modelo suíno a partir da metodologia não transgênica e não invasiva

Dissertação/Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre/Doutor em Ciências.

Departamento:

Cirurgia

Área de concentração:

Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientador:

Profa. Dra. Fabiana Fernandes Bressan

De acordo: Fabiana F. Bressan

Orientador

São Paulo

2020

Obs: A versão original encontra-se disponível na Biblioteca da FMVZ/USP

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virgínia Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T. 4008 FMVZ	Recchia, Kaiana Reprogramação celular <i>in vitro</i> à pluripotência (geração de células iPSCs) no modelo suíno a partir da metodologia não transgênica e não invasiva / Kaiana Recchia. – 2020. 62 f. : il. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2020. Programa de Pós-Graduação: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres. Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres. Orientadora: Profa. Dra. Fabiana Fernandes Bressan. 1. iPSCs. 2. Suíno. 3. Não invasivo. I. Título.
-----------------	---

Ficha catalográfica elaborada pela bibliotecária Maria Aparecida Laet, CRB 5673-8, da FMVZ/USP.



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Geração de células tronco pluripotentes in vitro (células IPS) no modelo suíno a partir de metodologia não invasiva e não transgênica", protocolada sob o CEUA nº 7051150717 (0.000779), sob a responsabilidade de **Fabiana Fernandes Bressan** e equipe; Kalana Recchia - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo - FZEA/USP (CEUA/FZEA) na reunião de 19/12/2017.

We certify that the proposal "Generation of swine induced pluripotent stem cells (iPSCs) using a non transgenic and non invasive technology.", utilizing 3 Swines (males and females), protocol number CEUA 7051150717 (0.000779), under the responsibility of **Fabiana Fernandes Bressan** and team; Kalana Recchia - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Animal Science and Food Engineering - (São Paulo University) (CEUA/FZEA) in the meeting of 12/19/2017.

Finalidade da Proposta: Pesquisa (Acadêmica)

Vigência da Proposta: de 07/2017 a 07/2018 Área: Medicina Veterinária

Origem: Suínocultura VNP (Laboratório de pesquisa em Suínos)

Espécie: Suínos sexo: Machos e Fêmeas Idade: 12 a 24 meses N: 3
Linhagem: mista Peso: 70 a 150 kg

Local do experimento: Após aprovação pelo CEUA e bolsa PIBIC as coletas de amostras serão solicitadas em suínos da prefeitura do Campus ou no Núcleo de Pesquisa em suínos da FMVZ/USP. O cultivo celular e toda experimentação in vitro serão realizados no Laboratório de Morfofisiologia Molecular e Desenvolvimento da FZEA/USP

Pirassununga, 05 de fevereiro de 2020

Profa. Dra. Daniele dos Santos Martins
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da
Universidade de São Paulo - FZEA/USP

Profa. Dra. Cristiane Gonçalves Titto
Vice-Cordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da
Universidade de São Paulo - FZEA/USP



Pirassununga, 12 de junho de 2019
CEUA N 7051150717

Ilmo(a). Sr(a).
Responsável: Fabiana Fernandes Bressan
Área: Medicina Veterinária

Título da proposta: "Geração de células tronco pluripotentes in vitro (células IPS) no modelo suíno a partir de metodologia não invasiva e não transgênica".

Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais FZEA (00 200919)

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo - FZEA/USP, no cumprimento das suas atribuições, analisou e **APROVOU** a Emenda (versão de 04/junho/2019) da proposta acima referenciada.

Resumo apresentado pelo pesquisador: "O projeto enviado para uma bolsa IC foi aprovado na Fapesp como proposta de mestrado e será desenvolvido pela mesma aluna e mesma orientadora. Não houve mudanças na metodologia proposta inicialmente. Solicita-se portanto a promoção do final desta proposta até dezembro de 2020, compreendendo então os 2 anos de mestrado da aluna."

Comentário da CEUA: "Esta CEUA FZEA aprova a emenda do projeto."

Profa. Dra. Daniele dos Santos Martins
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da
Universidade de São Paulo - FZEA/USP

Profa. Dra. Cristiane Gonçalves Titto
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da
Universidade de São Paulo - FZEA/USP

**CERTIFICADO**

Certificamos que a proposta intitulada "Reprogramação celular in vitro à pluripotência (geração de células IPS) no modelo suíno a partir da metodologia não transgênica e não invasiva", protocolada sob o CEUA nº 6372070119 (0000202), sob a responsabilidade de **Fabiana Fernandes Bressan** e equipe; Kalana Recchia - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 07/03/2019.

We certify that the proposal "in vitro cellular reprogramming to pluripotency (IPS cells) in the swine model from the non-transgenic and non-invasive version", utilizing 3 Swines (males and females), protocol number CEUA 6372070119 (0000202), under the responsibility of **Fabiana Fernandes Bressan** and team; Kalana Recchia - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 03/07/2019.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa](#)

Vigência da Proposta: de [02/2019](#) a [12/2021](#)

Área: [Reprodução Animal](#)

Origem: [Prefeitura do Campus da USP de Pirassununga](#)

Espécie: [Suínos](#)

sexo: [Machos e Fêmeas](#)

Idade: [12 a 24 meses](#)

N: [3](#)

Linhagem: [Misto](#)

Peso: [70 a 150 kg](#)

Local do experimento: Após aprovação pelo CEUA as coletas de amostras serão solicitadas em suínos da prefeitura do Campus ou no Núcleo de Pesquisa em suínos da FMVZ/USP. O cultivo celular e toda experimentação in vitro serão realizados no Laboratório de Morfofisiologia Molecular e Desenvolvimento da FZEA/USP

São Paulo, 05 de fevereiro de 2020

Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna

Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

Camilla Mota Mendes

Vice-Coordenador

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: RECCHIA, Kaiana

Título: Reprogramação celular *in vitro* à pluripotência (geração de células iPSCs) no modelo suíno a partir da metodologia não transgênica e não invasiva

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

AGRADECIMENTOS

O sentimento de gratidão vai além do exposto nesta simples folha. E eu começo meu agradecimento a **Deus**, que nos une, ilumina e dá força para continuarmos. Meus agradecimentos se estendem a todas as pessoas que contribuíram de forma direta ou indireta para a realização desta dissertação, em especial aos meus **pais, avós e familiares**, que sempre foram minha base e incentivo.

À minha orientadora **Professora Dr^a Fabiana Bressan**, por todas as oportunidades, incentivos e ensinamentos que me proporcionaram crescimento profissional e pessoal, e por ter se feito presente muito além de sua “obrigação”, muito obrigada. Ao **Dr. Paulo Fantinato** que também se fez presente, e me auxiliou nos eventos científicos e no projeto.

Agradeço à **Laís Pêssoa** que me acompanha no laboratório desde 2015, e **Naira Pieri**, que foram muito além de colaboradoras no projeto e hoje considero grandes amigas. À **Aline Souza** pelas conversas durante os cultivos celulares e que teve um papel importante no meu desenvolvimento científico. Ao **Ramon Botigelli**, que além de toda a ajuda possui a melhor playlist para a sala de cultivo. À **Raquel Castro** pelos incentivos e parceria. À minha companheira de laboratório **Gabriela Barbosa**, ao **Lucas Machado** pela ajuda nos experimentos e ao meu amigo de discussões científicas **Brendon Bessi**, que será eternizado na memória de todos nós. Muito obrigada “família iPS”.

À **Maísa Sampaio** por tornar os momentos difíceis suportáveis e os felizes mais alegres. Às minhas amigas de longa data, **Alenia, Isabela, Monique, Patrícia e Maria** por todo conforto emocional. A todos os Professores e colaboradores do **LMMD**, e a **Simone Martins** pelo auxílio na coleta das amostras, obrigada.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (**CAPES**) - Código de Financiamento 001, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (**FAPESP** processos nº 2019/02811-2 e 2015/26818-5) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (**CNPq**, processo 433133/2018-0).

RESUMO

RECCHIA, K. **Reprogramação celular *in vitro* à pluripotência (geração de células iPSCs) no modelo suíno a partir da metodologia não transgênica e não invasiva.** [*In vitro cellular reprogramming into pluripotency (generation of iPS cells) in the porcine model using non-transgenic and non-invasive methodology*] 2020. 62f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

O suíno é um interessante modelo biomédico por apresentar similaridades imunológicas, anatômicas e fisiológicas com o humano, e, portanto, a reprogramação de células à pluripotência neste modelo é vantajosa para o desenvolvimento de estudos translacionais. A utilização de células de pluripotência induzida (iPSCs) derivadas de células coletadas de forma não invasiva ou menos invasiva pode ser promissora em diversas terapias regenerativas devido à facilidade de obtenção, apesar de ainda não reportada nos animais domésticos. Por essa razão, este estudo tem como objetivos produzir células iPSCs suínas *in vitro* a partir de células derivadas de urina (*urine derived cells* ou UDCs) e a partir células mononucleares do sangue periférico (*peripheral blood mononuclear cells* ou PBMCs), provindas de coleta não invasiva e menos invasiva, respectivamente. Para tal, a urina e o sangue periférico foram coletados de três fêmeas suínas. A partir do sangue coletado foi realizada a separação por gradiente de densidade e a expansão de eritroblastos, entretanto, não foi obtido o número de células necessário para a reprogramação. A partir de amostras de urina processadas, células em cultivo *in vitro* foram observadas após aproximadamente uma semana. Uma das linhagens isoladas (UDC3) foi submetida ao processo de reprogramação a partir de metodologia integrativa, através de transdução lentiviral com os fatores de transcrição OCT4, SOX2, KLF4 e C-MYC (OSKM, humano ou murino), ou não integrativa, utilizando vetor episomal, contendo os fatores C-MYC, LIN28, SOX2, KLF4, OCT3/4 e shp53. Foram obtidas colônias reprogramadas derivadas da reprogramação integrativa, das quais isolamos três linhagens de iPSCs clonais (C1, C2 e C3) que se mantiveram em cultivo por pelo menos 28 passagens, demonstrando a capacidade de autorrenovação *in vitro*. As linhagens foram caracterizadas quanto à detecção de proteínas relacionadas à pluripotência por meio de imunofluorescência, quanto à quantificação de transcritos endógenos e exógenos, e à capacidade de diferenciação em corpos embrioides. Neste estudo foram geradas células suínas reprogramadas a partir de células de urina, o que possibilitará o desenvolvimento de novas tecnologias aplicadas ao modelo suíno beneficiando tanto a produção animal, quanto a ciência básica e translacional, visando sua utilização como modelo biomédico *in vivo*.

Palavras-chave: iPSCs; Suíno; Não invasivo.

ABSTRACT

RECCHIA, K. ***In vitro* cellular reprogramming into pluripotency (generation of iPSC cells) in the porcine model using non-transgenic and non-invasive methodology.** [Reprogramação celular *in vitro* à pluripotência (geração de células iPSCs) no modelo suíno a partir da metodologia não transgênica e não invasiva.] 2020. 62p. Dissertation (Master of Science) - Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science, University of São Paulo, São Paulo, 2020.

The swine is an attractive biomedical model because it shares immunological, anatomical, and physiological similarities with the human. It is advantageous to reprogram cells into pluripotency in this model to develop translational studies in human and veterinary regenerative medicine. In addition, iPSCs derived from cells collected in a non-invasive or less invasive methodology could have their use simplified, and is unprecedented in this animal model. Hence, this study aims to produce swine iPSCs cells *in vitro* from cells derived from urine (urine-derived cells or UDCs) and peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) by non-invasive or less invasive collection, respectively. Therefore, three swine females had their urine and peripheral blood collected. The collected blood was processed by density gradient separation, and erythroblast expansion was performed; however, the number of cells necessary for reprogramming was not obtained in our conditions. From the processed urine, we observed UDC cells after approximately one week in culture. One of the isolated lineages (UDC3) was subjected to the reprogramming processes, either using an integrative methodology through lentiviral transduction with the transcription factors OCT4, SOX2, KLF4, and C-MYC (OSKM, human or murine) or using a non-integrative methodology with episomal vectors containing the C-MYC, LIN28, SOX2, KLF4, OCT3 / 4 and shp53 factors. However, only colonies derived from integrative reprogramming were obtained, from which three clonal lineages (C1, C2, and C3) were isolated and maintained in culture for at least 28 passages, demonstrating the ability of self-renewal *in vitro*. The lineages were characterized for their morphology, the detection of proteins related to pluripotency by immunofluorescence, the quantification of endogenous and exogenous transcripts, and the ability to form embryoid bodies. The swine *in vitro* reprogrammed cells obtained in this study were obtained from UDCs and characterized. They may enable the future development of new technologies applied using the swine model, benefiting both animal production and translational science, aiming its use as a biomedical model *in vivo*.

Keywords: iPSCs; Swine; Non-Invasive.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Delineamento experimental para a coleta de UDCs e PBMCs suínas, reprogramação celular através de vetores episomais ou lentivirais, e análises de caracterização da pluripotência.....20
- Figura 2.** Processamento das amostras de sangue após a centrifugação dos tubos. Seta indicando a nuvem presente nos tubos.21
- Figura 3.** Processamento inicial das amostras de urina após a coleta.23
- Figura 4.** Representação gráfica da quantificação das células PBMCs durante a expansão.....33
- Figura 5.** Cultivo *in vitro* de células UDC3 em D2 e D8, respectivamente, após isolamento. Aumento 40x.....34
- Figura 6.** Análise de citometria de fluxo para a caracterização das UDC3 quanto aos marcadores: CD44, β -actina, Citoqueratina e Vimentina.....36
- Figura 7.** Detecção de transcritos mesenquimais (CD44 e CD90) e epiteliais (E-CADHERIN e KRT18) em células derivadas da urina.....37
- Figura 8.** Análise de citometria de fluxo para avaliação do sucesso em relação à nucleofecção de GFP da amostra UDC3.....38
- Figura 9.** Detecção de fosfatase alcalina 12 dias após a transdução das UDCs através de mOSKM ou hOSKM em D12 após transfecção. Figuras A, B e C mostram colônias positivas, parciais ou negativas, respectivamente. *Setas - indicam as colônias negativas para FA.....39
- Figura 10.** Células UDC3 reprogramadas com hOSKM (imagens A e B em aumento 40x e 100x, respectivamente) e mOSKM, subdividido em C1 (imagens C e D em aumento 100x e 200x, respectivamente), C2 (imagens E e F em aumento 100x e 200x, respectivamente) e C3 (imagens G e H em aumento 100x e 200x, respectivamente). Todas as colônias apresentaram bordas bem delimitadas.....40
- Figura 11.** Linhagens clonais C1, C2 e C3 testadas para a detecção das proteínas SOX2, OCT4, NANOG, SSEA1 e TRA1 81 nas passagens 16, 15 e 9, respectivamente.....42

Figura 12. Linhagens clonais C1, C2 e C3 testadas para a detecção das proteínas SOX2, OCT4, NANOG, SSEA1 e TRA1 81 nas passagens 23, 22 e 22, respectivamente.....	43
Figura 13. Análise da abundância de transcritos endógenos relacionados a pluripotência na UDC3 e nos diferentes grupos de passagem de iPSCs UDC. ^{A-C} Letras maiúsculas sobrescritas representam diferenças ($p < 0,05$) entre colunas.....	46
Figura 14. Análise da quantificação de transcritos endógenos relacionados à pluripotência na UDC3 e nas diferentes linhagens de iPSCs UDC. ^{A-C} Letras maiúsculas sobrescritas representam diferenças ($p < 0,05$) entre colunas.....	47
Figura 15. Gráficos da análise de transcritos endógenos SOX2, NANOG, OCT4 e exógeno OSKM. Comparando a UDC3 com o grupo geral de iPSCs. *Sobrescritos representam diferenças ($p < 0,05$) entre colunas.....	48
Figura 16. Formação de corpos embrioides (CE) por meio do cultivo de iPSCs UDC em suspensão. Na linha A estão os CEs todos em aumento 40x em EP e na linha B em IP em aumento 40x, 100x e 100x respectivamente.....	48
Figura 17. Gel de eletroforese a partir do produto de RT-qPCR dos CEs. L – <i>ladder</i> (marcador molecular), V- Vimentina, β -T- β -Tubulina III, A- AFP e β -A- β -Actina utilizado como gene referência.	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Lista de oligonucleotídeos iniciadores (<i>primers</i>) utilizados para caracterização das UDCs. Pb: pares de base.....	25
Tabela 2. Ciclos programados no termociclador para a transcrição reversa.....	30
Tabela 3. Lista de oligonucleotídeos iniciadores (<i>primers</i>) utilizados para caracterização de pluripotência. Pb: pares de base.....	31
Tabela 4. Oligonucleotídeos iniciadores (<i>primers</i>) utilizados para a detecção de transcritos de genes mesodérmicos, endodérmicos ou ectodérmicos.....	32
Tabela 5. Contagem celular realizada durante a expansão das PBMCs. *Volume menor do que o previsto para o poço.....	33
Tabela 6. Colônias contadas no 12 ^o dia em cultivo após a transdução das células e testadas para FA. ¹ Mista – colônias que em partes eram positivas para a FA. % - taxa de eficiência de formação de colônias e % ¹ – taxa de eficiência de formação de colônias positivas para FA.....	39
Tabela 7. Resultado da imunocitoquímica nas iPSCs UDCs mostrando células positivas com fraca marcação foram representadas com “+”, positivas com forte marcação foram representadas com “++”, as parcialmente positivas com +/- e células com marcação negativa foram representadas com “-”.....	44
Tabela 8. Diferença estatística encontrada entre UDC3 e as passagens de iPSCs UDC para os genes endógenos e fator exógeno analisados por RT-qPCR.....	46
Tabela 9. Diferença estatística encontrada entre as colônias de iPSCs UDC e UDC3 para os genes endógenos e fator exógeno analisados por RT-qPCR.....	47
Tabela 10. Resumo dos resultados parciais quanto a caracterização as linhagens de iPSCs UDC geradas. *n/a – não avaliado.....	51

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
2. HIPÓTESE.....	19
3. OBJETIVOS.....	19
3. 1. GERAL.....	19
3. 2. ESPECÍFICOS.....	19
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	20
4. 1. Delineamento experimental.....	20
4. 2. Coleta de células mononucleares sanguíneas - PBMCs.....	21
4. 3. Expansão dos eritroblastos.....	22
4. 4. Coleta e isolamento das células derivadas de amostras da urina (UDCs).....	23
4. 5. Caracterização das UDCs por citometria de fluxo.....	24
4. 6. Indução de células suínas à pluripotência por transdução lentiviral.....	25
4. 7. Indução de células suínas à pluripotência por vetores epissomais.....	25
4. 8. Caracterização das células iPSCs.....	27
4. 8. 1. <i>Eficiência de formação de colônias, morfologia e detecção da fosfatase alcalina</i>	27
4. 8. 2. <i>Detecção da presença de proteínas relacionadas à pluripotência OCT4, SOX2, NANOG, SSEA1 e TRA1 81</i>	27
4. 8. 2. <i>Extração de RNA total</i>	29
4. 8. 3. <i>Transcrição reversa – síntese de cDNA</i>	29
4. 8. 4. <i>Análise de transcritos por RT-qPCR</i>	30
4. 8. 5. <i>Diferenciação celular: formação de corpos embrioides (CE)</i>	31
5. RESULTADOS.....	33
5. 1. Coleta e expansão de PBMCs.....	33
5. 2. Coleta e isolamento de UDCs.....	34
5. 3. Caracterização das UDCs.....	34
5. 4. Reprogramação à pluripotência através de vetores epissomais.....	37
5. 5. Reprogramação à pluripotência através de vetores lentivirais.....	38
5. 6. Detecção da expressão de proteínas relacionadas à pluripotência em iPSCs.....	41
5. 7. Análise dos transcritos relacionados à pluripotência na iPSCs a partir de RT-qPCR.....	45
5. 8. Diferenciação <i>in vitro</i> : formação de corpos embrioides.....	48

6. DISCUSSÃO.....	52
7. CONCLUSÕES.....	56
REFERÊNCIAS	57

1. INTRODUÇÃO

Células-tronco pluripotentes possuem a capacidade de auto renovação e de se diferenciarem em células dos três folhetos embrionários e células germinativas. Tais características impulsionam diversos estudos com estas células, pois a partir de sua versatilidade, são possíveis diversas aplicações nas áreas de produção animal ou terapia regenerativa humana e veterinária (DE PAEPE et al., 2014; ARNHOLD; WENISCH, 2015). As células pluripotentes são derivadas da massa celular interna (*inner cell mass*, ICM) de embriões em estágio de blastocisto, denominadas células-tronco embrionárias (do inglês *embryonic stem cell*, ESCs) e podem ser subdivididas de acordo com o seu estado de pluripotência: *naïve* ou *primed*. As ESCs *naïve* são derivadas dos embriões em estágio pré-implantacional, enquanto as *primed* são encontradas no estágio pós-implantação, no epiblasto (NICHOLS; SMITH, 2009; HANNA; SAHA; JAENISCH, 2010).

A possibilidade de utilizar ESCs em terapias já foi bastante almejada. Porém, ao coletar a ICM do blastocisto ocorre inviabilização do embrião, e, conseqüentemente, sua utilização passa por diversas e importantes discussões éticas e religiosas. Além disso, são passíveis de ocasionar rejeição pelo organismo receptor, já que não são provindas do próprio paciente e ao entrarem em contato com organismo podem ser reconhecidas como estranhas e atacadas pelo sistema imunológico receptor (YUAN et al., 2007). Ainda, caso não sejam destruídas pelo organismo receptor, tais células podem se diferenciar aleatoriamente formando teratomas, que são formações tumorais com tecidos derivados dos três folhetos embrionários, podendo prejudicar tecidos e órgãos (ALONSO-ALONSO; SRIVASTAVA, 2015).

Estudos pioneiros em 2006 reportaram a indução de células murinas já diferenciadas a um estado de pluripotência (TAKAHASHI; YAMANAKA, 2006). A reprogramação foi realizada a partir da introdução de genes exógenos, sendo expressos na célula fatores de transcrição relacionados com a pluripotência embrionária e proliferação celular. Estas células reprogramadas *in vitro* são denominadas iPSCs (do inglês *induced pluripotent stem cells*, ou células de pluripotência induzida) e, em 2007, o mesmo grupo de pesquisa reportou a produção de células iPS humanas (TAKAHASHI et al., 2007). A partir da indução gênica *in vitro* de células somáticas a pluripotência torna-se possível a produção de células pluripotentes autólogas, sem passar pelo estado embrionário, eliminando desta maneira tanto problemas de rejeição quanto problemas éticos. A metodologia também

possibilita estudos *in vitro*, facilitando o entendimento da biologia celular de células pluripotentes e do estudo de diferentes doenças teciduais ou genéticas.

A metodologia mais utilizada para a indução de células à pluripotência é a inserção dos genes OCT4, SOX2, c-MYC e KLF4 carreados por mecanismo viral para o interior da célula, levando à inserção dos fatores de transcrição no genoma da célula. Tal expressão promove a reprogramação da célula a um estágio indiferenciado (TAKAHASHI; YAMANAKA, 2006). Entretanto, a inserção aleatória ao DNA pode promover alterações na função celular e a continuada expressão dos fatores exógenos pode levar a formação de tumores (YU et al., 2009; DU et al., 2015). Desta maneira, as células transgênicas podem não ser o modelo mais adequado para a terapia celular.

Já as iPSCs derivadas de reprogramação não integrativa podem ter sua utilização facilitada, pois em sua metodologia são utilizados plasmídeos com os genes selecionados, que são inseridos nas células alvo via nucleoporação, e são transcritos independentemente de sua inserção no genoma celular. Ao longo das divisões celulares no cultivo *in vitro* os plasmídeos se diluem e são degradados nas células até que em determinado momento as células são livres de DNA exógeno (YU et al., 2009), evitando possíveis alterações nas funções celulares por inserção randômica e potencial de formação de tumor (ZHOU; ZENG, 2013).

Na medicina veterinária, as iPSCs apresentam aplicações tanto na ciência básica quanto na aplicada, seja para o entendimento da biologia celular fundamental, da medicina regenerativa ou do aprimoramento da produção animal. Entretanto, nos animais domésticos a completa reprogramação ainda não é totalmente elucidada, diferentemente da espécie murina e humana que já têm seus padrões para a aquisição, manutenção e avaliação da pluripotência reportados e utilizados como base para as iPSCs de animais domésticos. Ainda, diferenças interespecies dificultam a padronização das condições de cultivo adequadas para manter a pluripotência e dos protocolos de reprogramação nas diferentes espécies de animais domésticos (KOH; PIEDRAHITA, 2014; PESSÔA; BRESSAN; FREUDE, 2019).

A metodologia de indução a pluripotência mais reportada entre os animais domésticos é a integrativa, e em adicional, as células utilizadas para a reprogramação em sua maioria provém de coletas invasivas, como exemplo, biópsias para coleta de fibroblastos, células da medula óssea e células do tecido adiposo, ou mesmo coleta de material *post-mortem*, como no caso de fibroblastos fetais (JI et al., 2013; WU et al., 2018; PESSÔA et al., 2019; BRESSAN et al., 2020). Em contra partida, a geração de iPSCs derivadas de coletas não invasivas ou menos invasivas apresentam importantes vantagens por possibilitar o estudo *in vitro* de diversas síndromes e

doenças genéticas que necessitam das células do próprio paciente, mas cuja coleta de células é difícil ou impossibilitada, como por exemplo, a partir de pacientes apresentando disfunções cognitivas, neurológicas ou músculo-esqueléticas. Dessa forma, a coleta não invasiva ou menos invasiva para a produção de iPSCs facilitaria seu uso na medicina regenerativa e translacional (GAO et al., 2015; JI et al., 2017).

A coleta de sangue periférico ocorre de forma pouco invasiva quando comparada, por exemplo, com biópsias teciduais. A obtenção de células de sangue periférico para a geração de iPSCs (OHMINE et al., 2011; WEN et al., 2018), sendo atrativa na medicina regenerativa, foi reportada em humanos para o uso como modelo de doenças genéticas *in vitro* e com perspectivas de terapias celulares para distrofia muscular de Duchenne (GUAN et al., 2020), cardiomiopatia hipertrófica familiar (ROSS et al., 2017) e demência (LEE et al., 2015).

O isolamento e cultivo de células derivadas da coleta não invasiva foi recentemente reportada a partir de leite (PIPINO et al., 2018), sendo esta possibilidade exclusiva em fêmeas em lactação, e também pela urina, reportada em humanos (STEICHEN et al., 2017) e no coelho (YANG et al., 2018). Na medicina humana as células derivadas da urina já foram utilizadas para o desenvolvimento de diferentes modelos de doença *in vitro* após sua reprogramação à pluripotência (ZHOU et al., 2011; STEICHEN et al., 2017), como por exemplo, foi realizada a diferenciação *in vitro* de células iPSCs derivadas de células progenitoras derivadas da urina (*urine-progenitor cells*, UPCs) em cardiomiócitos (JIANG et al., 2018), hepatócitos-like (ZHOU et al., 2019), e a geração de linhagens iPSCs paciente-específica para esclerose múltipla (MASSA et al., 2016), retinose ligada ao X (YAN et al., 2019), insuficiência cardíaca (CAO et al., 2018), fenilcetonúria (QI et al., 2018), glaucoma (ZHANG et al., 2018), e retinite pigmentosa (GUO et al., 2018).

Devido à importância do estudo de doenças humanas, os modelos animais auxiliam consideravelmente no estudo destas doenças *in vitro* ou *in vivo* (PÊSSOA et al., 2020). O modelo suíno é considerado um excelente modelo biomédico pelas semelhanças fisiológicas, morfológicas, genéticas e imunológicas com o humano (ROBERTS; TELUGU; EZASHI, 2009; WU et al., 2009; WEST et al., 2010; EZASHI et al., 2011; GROENEN et al., 2012; CONG et al., 2013; MICHAEL ROBERTS et al., 2015). Em adicional, o suíno, por ser um importante animal de produção, possui manejo padronizado com condições livres de patógenos (DU et al., 2015; PERLEBERG; KIND; SCHNIEKE, 2018).

Ao utilizar o suíno como modelo biomédico já foi possível realizar o estudo de diferentes doenças e o desenvolvimento de tratamentos e diagnósticos, como exemplo: cardiovasculares (ZIBLY et al. 2017; GUNASEKAR et al. 2018; HALL and

AGRAWAL, 2018), respiratórias (TURNER et al., 2002; BRANDLER et al., 2005; THOMAS et al., 2011), neurológicas (LORSON et al., 2011; DOLEZALOVA et al., 2014) e endócrinas (TORRES-ROVIRA et al., 2012; VAN DEN HEUVEL et al., 2018; BADIN et al., 2019).

A geração de células iPS suínas (piPSCs, ou *porcine*-iPSCs) é de grande vantagem tanto para estudos translacionais na medicina regenerativa, quanto para a produção animal, já sendo descrita a diferenciação de piPSCs em cardiomiócitos (MONTSERRAT et al., 2011), hepatócitos (AO et al., 2014) e linhagens neuronais (DOLEZALOVA et al., 2014; KIM et al., 2019; MACHADO et al., 2020b). Já foi reportada a produção de piPSCs em pelo menos 25 estudos, sendo que apenas um utilizou metodologia não integrativa que resultou em células suínas iPS-*like*, e em nenhum dos estudos foram utilizadas células coletadas de forma menos invasiva ou não invasiva para a reprogramação (PESSÔA; BRESSAN; FREUDE, 2019).

O estudo da reprogramação *in vitro* de tipos celulares provenientes de coletas não ou menos invasivas via vetores não integrativos e o estudo do potencial de diferenciação pós-reprogramação é, desta maneira, importante e desejável seja para a terapia celular, para estudos básicos quanto à biologia destas células ou na produção animal. A geração de células iPSCs a partir de urina ou sangue periférico ainda é inédita em modelos suíno, e contribuirá para a geração de protocolos simples e reproduzíveis de indução e manutenção da pluripotência celular *in vitro*, e posterior utilização desta tecnologia nas áreas biomédica ou na medicina veterinária em geral.

2. HIPÓTESE

A geração de células pluripotentes induzidas no modelo suíno, assim como sua manutenção *in vitro*, é possível através do mecanismo episomal a partir de células provenientes da urina e de sangue. Ainda, a eficiência de geração de células iPSCs via mecanismos não integrativos é possível, porém apresenta menor eficiência quando comparado ao mecanismo lentiviral.

3. OBJETIVOS

3. 1. GERAL

Gerar células iPSCs na espécie suína utilizando-se vetores episomais e lentivirais em células obtidas não invasivamente a partir da urina (*urine-derived cells* - UDCs) e pouco invasiva a partir de coleta de sangue periférico (*peripheral blood mononuclear cells* - PBMCs), caracterizando a eficiência do processo e as linhagens celulares reprogramadas obtidas quanto à sua pluripotência.

3. 2. ESPECÍFICOS

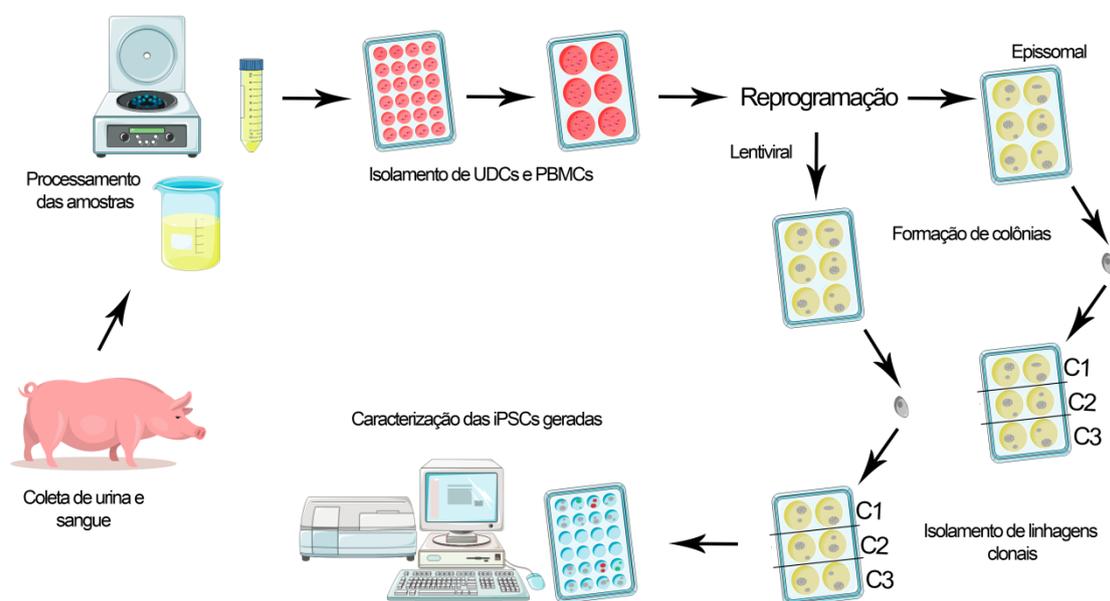
- I. Padronização de métodos de coleta e cultivo de células suínas a serem reprogramadas: células sanguíneas mononucleares a partir coleta de sangue periférico (PBMCs) e células derivadas da urina (UDCs).
- II. Reprogramar à pluripotência células suínas por meio de vetores episomais e lentivirais, comparando a eficiência dos protocolos.
- III. Caracterizar a pluripotência nas células iPSCs geradas através das análises de morfologia, detecção da fosfatase alcalina, de proteínas e transcritos relacionados à pluripotência, e diferenciação *in vitro*: diferenciação espontânea e diferenciação induzida.
- IV. Analisar os resultados, e identificar possíveis diferenças entre as iPSCs originadas de diferentes tecidos e diferentes metodologias.

4. MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi realizado no Laboratório de Morfofisiologia Molecular e Desenvolvimento (LMMD) da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo (FZEA/USP) e foi aprovado pelo Comitê de Ética em experimentação animal da Faculdade (CEUA/FZEA nº7051150717 e CEUA/FMVZ nº6372070119).

4. 1. Delineamento experimental

Neste estudo foram coletadas amostras de urina e sangue periférico de três fêmeas suínas adultas alocadas na granja da Prefeitura do Campus Fernando Costa (PUSP-FC), Universidade de São Paulo, Pirassununga/SP. As coletas de urina e sangue periférico foram realizadas por médico veterinário experiente e processadas em laboratório. As células isoladas foram submetidas à reprogramação à pluripotência por metodologia integrativa ou não integrativa, e quando obtidas, as colônias de iPSCs foram caracterizadas *in vitro*. Um resumo do delineamento experimental é apresentado na Figura 1, e os procedimentos e metodologia são descritos a seguir.



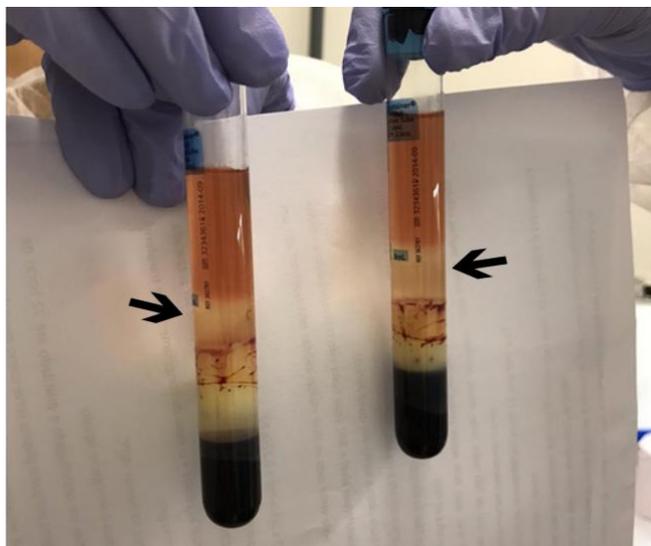
Fonte: (RECCHIA, K. 2019)

Figura 1. Delineamento experimental para a coleta de UDCs e PBMCs suínas, reprogramação celular através de vetores epissomais ou lentivirais, e análises de caracterização da pluripotência.

4. 2. Coleta de células mononucleares sanguíneas - PBMCs

Foram realizadas coletas de células sanguíneas de três fêmeas e o protocolo de processamento e isolamento de PBMCs seguiu o reportado em Junqueira Reis e colaboradores (JUNQUEIRA REIS et al., 2017).

A coleta foi realizada através da punção da veia jugular externa, sendo utilizado frascos BD *Vacutainer CPT Cell Preparation Tube* – 8 ml *Sterile* (NC: 1.0 ml / FICOLL: 2.0 ml). Após a coleta foi iniciado o seu processamento com a centrifugação dos tubos a 18000 x g, 22°C durante 40 minutos com o freio da centrífuga desligado. Após o término da centrifugação (Figura 2) foram coletadas as porções transparente e esbranquiçada onde são encontradas as células mononucleares como os leucócitos e eritroblastos, assim como parte do plasma sanguíneo (porção chamada de “nuvem”), evitando encostar a ponteira no gel do tubo, o conteúdo coletado foi transferido para um novo tubo (50 ml), cada tubo foi nomeado para sua amostra como PBMC1, PBMC2 e PBMC3, e foram homogeneizadas e centrifugadas a 400 x g, 4°C durante 15 minutos com o freio da centrífuga ligado. O sobrenadante foi então descartado com a utilização de ponteiros sorológicos e foi adicionado o tampão de lise (5 ml), seguido de homogeneização e incubação das amostras durante 12 minutos.



Fonte: (RECCHIA, K. 2020)

Figura 2. Processamento das amostras de sangue após a centrifugação dos tubos. Seta indicando a nuvem presente nos tubos.

Após o processo de incubação foi adicionada a solução de 45 ml de PBS + EDTA (0,1M), e o conteúdo foi homogeneizado por inversão, e centrifugadas a 400 x

g, a 4°C durante 15 minutos, este processo foi repetido duas vezes. Posteriormente o sobrenadante foi descartado utilizando ponteira sorológica e as células foram ressuspendidas em 1 ml de soro fetal bovino (SFB, Hyclone) previamente filtrado (0.22 µm, Millipore). Em um micro tubo de 1,5 ml foram adicionados 10 µl das células ressuspendidas e 10 µl de *Trypan Blue* para a contagem das células viáveis no *Countess® II FL Hemacytometer* (Life Technologies) e na Câmara de Neubauer com a visualização no EVOS™ (Thermo Scientific), as amostras foram congeladas em concentração 2×10^6 células, com SFB e 10% de *Dimethyl Sulfoxide* (DMSO, Sigma) em criotubos utilizando *Mr. Frosty* (Corning) no freezer -80°C e no dia seguinte as amostras foram armazenadas em freezer -150°C.

4. 3. Expansão dos eritroblastos

A expansão foi realizada para selecionar apenas as células desejadas, os eritroblastos. Para tal, a amostra 1 foi descongelada (Dia 0 – D0) e ressuspendida com a adição de 1 ml de SFB, e o conteúdo foi realocado para um tubo cônico (15 ml), onde foi centrifugada a 200 x g, 25°C durante 10 minutos, posteriormente o sobrenadante foi descartado utilizando ponteira sorológica de 1 ml e as células foram ressuspendidas em 1 ml de meio *StemSpan* (StemCell Technologies) previamente filtrado (filtro de 0,20 µm, Millipore) e foram adicionadas as citocinas: IGF-1 (10 µg/ml), SCF (50 µg/ml), IL-3 (10 µg/ml) e EPO (2 U/ml) (*R&D Systems*, diluídos em D-PBS com BSA 0,1%). Em um microtubo de 1,5 ml foram adicionados 10 µl das células ressuspendidas e foi adicionado *Trypan Blue*, seguido de contagem de células viáveis pelo *Countess® II FL Hemacytometer* (Life Technologies) e também na Câmara de Neubauer com a visualização em microscópio de fluorescência invertido (EVOS™, Thermo Fisher). Após a contagem foi utilizada a equação:

$$\frac{n^{\circ} \text{ de células}}{4 \times 10000 \times 20}$$

N°Células / 4 = média dos quadrantes contados na Câmara de Neubauer (não se enquadra quando a contagem se realiza *pelo Countess®*).

10 000 = fator de correção.

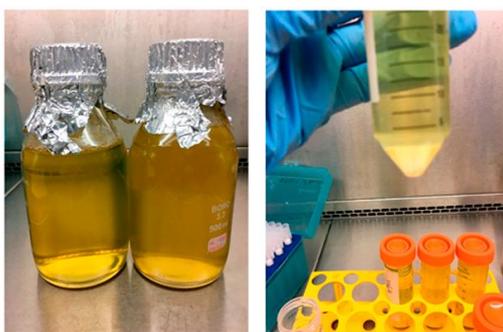
20 = diluição das células no *Trypan Blue*.

Após análise da concentração celular foi realizada a ressuspensão e plaqueamento em concentração de 2×10^6 células por poço em placas de 12 poços, no meio descrito e com a adição de 5 $\mu\text{l/ml}$ Dexametasona (200 μM) por poço. O meio foi trocado a cada 3 dias (D3, D6, D9 e D12), e no dia D13 as células isoladas seriam utilizadas para a reprogramação, pelos mecanismos integrativos e não integrativos. O cultivo das células sanguíneas ocorreu em suspensão, e dessa forma, a cada troca de meio as células foram centrifugadas e ressuspensas em 1 ml de meio, contadas no *Countess®* e na câmara de Neubauer e após as análises de concentração e as células eram replaqueadas.

4. 4. Coleta e isolamento das células derivadas de amostras da urina (UDCs)

Foram coletadas amostras de urina de três fêmeas, que foram identificadas como UDC1, UDC2 e UDC3. Durante a pré-coleta foi realizada a limpeza das vulvas com álcool 70%, o processo de higienização estimulou as fêmeas a micção espontânea e durante a micção os primeiros jatos de urina foram descartados e a urina foi coletada em um *becker* (500 ml), e posteriormente a amostra coletada foi realocada em uma garrafa de vidro (500 ml) (Figura 3). As vidrarias utilizadas foram previamente lavadas e autoclavadas de acordo com as normas do laboratório, e o protocolo de processamento, isolamento e cultivo das UDCs seguiu o reportado em Steichen et al., 2017 (STEICHEN et al., 2017).

UDC1 e UDC2



UDC3



Fonte: (RECCHIA, K. 2020)

Figura 3. Processamento inicial das amostras de urina após a coleta.

No fluxo laminar as amostras foram aliqüotadas em tubos cônicos (50 ml) utilizando ponteiras sorológicas e centrifugadas a 400 x g, 25°C durante 10 minutos, e o sobrenadante foi removido com ponteira sorológica deixando de 1 ml de

sobrenadante por tubo. Todo o material proveniente da mesma fêmea foi ressuspendido e passado para apenas um tubo cônico (50 ml), ao fim obtendo então 3 tubos cônicos, onde foram adicionados 45 ml de PBS (Life Technologies) com antibióticos e foram homogeneizados por inversão e centrifugados a 200 x g, 25°C durante 10 minutos. O sobrenadante foi descartado com ponteira sorológica e os *pellets* ressuspendidos em 12 ml de meio para UDCs [22,5 ml de *DMEM high glucose* (Life Technologies), 2,5 ml de SFB (HyClone), 0,25 ml de Penicilina/Estreptomicina (Life Technologies), 0,25 ml de 100x GlutaMAX *supplement* (Life Technologies), 0,25 ml 100x *non-essential amino acids solution* (Life Technologies), 25 ml de REBM medium (*renal epithelial basal médium*, Lonza) e suplementos REGM: 5 µl/ml FBS, hEGF, Insulina, *hydrocortisone*, *GA-1000*, *transferrin*, *triiodothyronine* e *epinephrine* (todos 0,5 µl/ml, Lonza)]. No momento do uso foi adicionado 0,25 ng/ml de fator de crescimento fibroblástico básico (*basic fibroblast growth factor*, bFGF, Peprotech).

Em placas de 24 poços preparadas com solução de Gelatina 0,1% (Sigma) o conteúdo processado foi plaqueado e mantido em ambiente controlado a 5% CO₂ e 38.5°C. A troca de meio foi realizada de forma parcial no D3 (3º dia após o plaqueamento), sendo removidos 500 µl de cada poço e adicionados 500 µl a cada poço de novo meio para UDCs, e a partir de então, as trocas de meio foram realizadas a cada 2 dias de forma a evitar a perda de células até sua aderência à placa. As células isoladas foram criopreservadas em 10% de DMSO e 90% de meio IMDM suplementado com 10% SFB e antibióticos, preservando amostras de baixa passagem no banco de células do laboratório.

4. 5. Caracterização das UDCs por citometria de fluxo e RT-qPCR

As células UDC3 isoladas foram mantidas em cultivo até passagem 9 e foram testadas via citometria de fluxo para os marcadores CD44 (1:100, cat# MCA1082GA, AbD Serotec), vimentina (1:250, cat# AB8069, Abcam) e β-actina (1:100, cat# 7811, Sigma). Para cada marcador foram utilizadas 1x10⁵ UDCs. As células foram lavadas com solução de lavagem (PBS + 0,1% BSA, Sigma) e centrifugadas a 300 x g, durante 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e foi adicionada a solução de bloqueio (PBS + 1% BSA, Sigma). As células foram incubadas durante 1 hora, centrifugadas a 300 x g durante 5 minutos, e foram adicionados 100µl de anticorpo primário em seus respectivos tubos e incubados durante 1 hora. Ao término da incubação os anticorpos primários foram removidos e as células foram lavadas, centrifugadas e foi adicionado o 100µl do anticorpo secundário (1:300, cat# P0447, Dako). As células foram incubadas

durante 1 hora, em seguida foram lavadas, fixadas com PFA 2% e mantidas em 300µl de PBS até a análise realizada por citometria de fluxo (FacsAria BD, software FacsDIVa).

As células isoladas foram passadas para um microtubo (1,5 ml) e centrifugados a 300g, durante 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e o pellet passou por congelamento em nitrogênio líquido e armazenamento a -150°C até a extração de RNA. Posteriormente, foi realizada transcrição reversa utilizando o *comercial High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (QIAGEN), seguindo as instruções do fornecedor, e as células foram avaliadas quanto a detecção de transcritos de genes relacionados células mesenquimais (CD44 e CD90) e epiteliais (E-Cadherin e KRT18), como controle para os primers foi utilizado cDNA de fibroblasto de neonato, fígado, cérebro e coração de suíno. As sequências estão descritas na Tabela 1.

Tabela 1. Lista de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) utilizados para caracterização das UDCs. Pb: pares de base.

Primers	Forward	Reverse	pb
CD44	CAACCGCAACGACAGCTTTG	AACCAGTCCTGGGTTTCGTG	82
CD90	CGCTCTCTTGCTAACAGTCTTG	GGGCAGGTTGGTGGTATTCT	121
Ecadherin	TCAAGGCACCTGTGAGTTCG	CCACGATGAGACCTGCAACA	149
KRT18	TACTGGTCCCAGCAGATTGAG	CGTCTCAGCTCTGTGAGTGT	95

4. 6. Indução de células suínas à pluripotência por vetores episomais

As células UDC3 (1×10^6) foram nucleofectadas com os plasmídeos episomais segundo Li et al (2018), que realizou a reprogramação de fibroblastos suínos utilizando plasmídeos hUL, hSK e hOCT3/4 – shp53. O protocolo foi escolhido por ser o único reportado até o momento eficiente em suínos, e foi otimizado pelo grupo de pesquisa da Professora Kristine Freude da Universidade de Copenhagen, colaboradora nesta proposta.

A nucleoporação foi realizada utilizando o kit comercial *Basic Fibroblasts Nucleofector®* (Lonza) e o dispositivo *Amaxa Nucleofector II* (Lonza). A UDC3 foram eluídas em Nucleofector Solution e nucleoporadas utilizando uma combinação dos plasmídeos citados acima (1:1:1) a 1µg/µL. O dia da nucleoporação foi considerado o dia 0 (D0), as células foram cultivadas até D4 no meio de cultivo utilizado para o isolamento das UDCs sem antibióticos. Em D6 as células foram dissociadas (*Tryple*

Express, Gibco) e replaqueadas sob uma monocamada de MEFs inativadas via tratamento com mitomicina C (Sigma) com cultivado em meio iPSCs suplementado com bFGF (Peprotech) trocado a cada 2 dias, conforme descrito previamente. As células foram mantidas nas condições de cultivo de 5% de CO₂ a 38.5°C.

4. 7. Indução de células suínas à pluripotência por transdução lentiviral

A indução à pluripotência ocorreu conforme o protocolo estabelecido em nosso laboratório (BRESSAN et al., 2020). Foi utilizado o vetor lentiviral policistrônico STEMCCA (SOMMER et al., 2009), composto pelos fatores de transcrição murinos ou humanos: OCT4, SOX2, KLF-4, e c-Myc (mOSKM ou hOSKM). Para a produção das partículas lentivirais foi realizado o protocolo de lipofecção (Lipofectamina 3000, Life Technologies) com os vetores auxiliares TAT, REV, hgpm2, VSVG e com mOSKM ou hOSKM em células renais embrionárias humanas (293 FT, Life Technologies). Entre 48 – 72 horas após a lipofecção o sobrenadante foi coletado, filtrado (0.45 µm PVDF, Millipore) e adicionado à placa de 6 poços contendo UDC3 plaqueadas previamente na concentração de 2×10^4 por poço (dia 0, D0). Foi realizada a troca de meio entre 12 – 16 horas após a transdução. Em D6, as células foram dissociadas (*Tryple Express*, Gibco) e replaqueadas em placas de cultivo de seis poços contendo uma camada de fibroblastos fetais de camundongos (*mouse embryonic fibroblasts*, MEFs) inativados via tratamento com mitomicina C (Sigma) e cultivadas em meio iPSCs composto por *DMEM/F12 Knockout* suplementado com 20% de substituto de soro *Knockout (knockout serum replacement, KSR)*, 1% glutamina, 1:1000 B-mercaptoetanol, 1% aminoácidos não essenciais (todos Gibco), 10ng/mL bFGF (Peprotech) e 1% penicilina/estreptomicina (Sigma).

Após a observação de formação de colônias (passagem 0, P0) foi realizada a transferência de forma manual (clonal) das colônias selecionadas com o auxílio de microscópio de luz invertido, no fluxo laminar e com auxílio de agulhas de insulina para a coleta e fixação das colônias em nova poços revestidos com MEFs mitomicinizadas e gelatina (passagem 1, P1) e mantidas em ambiente controlado a 5% CO₂ e 38.5°C. O processo de reprogramação pode ocorrer de forma heterogênea e ao selecionar colônias com morfologia característica de iPSCs, espera-se o isolamento de linhagens clonais homogêneas.

4. 8. Caracterização das células iPSCs

4. 8. 1. Eficiência de formação de colônias, morfologia e detecção da fosfatase alcalina

A eficiência de formação de colônias foi analisada através da contagem de colônias formadas após indução à pluripotência em relação ao número de células transduzidas, além do acompanhamento da morfologia (bordas definidas das colônias e alta razão núcleo/citoplasma das células) e viabilidade destas colônias após o primeiro repique por no mínimo 10 passagens.

O protocolo de detecção da fosfatase alcalina foi realizado com o kit comercial 86R (Sigma). Para placas de 6 poços, para cada poço foi preparado: o fixador em um tubo cônico de 15 ml contendo 0,25 ml de tampão citrato, 0,65 ml de acetona e 0,08 ml de formaldeído (37%). As células foram lavadas com água destilada por no mínimo 45 segundos, a água foi retirada e o fixador foi adicionado durante 30 segundos, foi realizada uma nova lavagem e adicionada a solução de 22,2 µL de NaNO₃, 22,2 µL de FRV – alk sol e 22,2µl de Naphtol As-Bi em 1 ml de água destilada, os cultivos foram incubados com a solução em temperatura ambiente sem luz direta por durante 15 minutos, lavados com água destilada e analisados no sistema de fotodocumentação EVOS™.

4. 8. 2. Detecção da presença de proteínas relacionadas à pluripotência OCT4, SOX2, NANOG, SSEA1 e TRA1 81

Para a detecção das proteínas OCT4, SOX2, NANOG, SSEA1 e TRA1 81 foram realizados protocolos de detecção por imunofluorescência (DE SOUZA et al., 2018). Após a fixação dos cultivos celulares em paraformaldeído 4% por 10 minutos, 3 lavagens de 5 minutos em PBS foram realizadas e então as amostras foram mantidas a 4°C até o início do protocolo. Ao fim de cada protocolo foi realizada a marcação do DNA celular por meio de *Hoechst* (1:1000), seguido de 3 lavagens com PBS (Sigma) de 5 minutos e manutenção das amostras em PBS. Todas as análises foram realizadas por microscopia de fluorescência no sistema de fotodocumentação o EVOS™. Especificamente para cada anticorpo, o protocolo é descrito abaixo.

Detecção de OCT4 e SOX2

As amostras foram permeabilizadas em solução de 0,1% de Triton X em PBS durante 30 minutos à temperatura ambiente e lavados 3 vezes de 5 minutos em PBS, então foram incubados em solução de bloqueio (0,5% de Tween-20 em PBS) por 30 minutos à temperatura ambiente. Os anticorpos primários respectivos para detecção das proteínas selecionadas foram diluídos em solução de bloqueio e adicionados a amostra, OCT4 (1: 100, cat# SC8628, Santa Cruz) e SOX2 (1: 500, cat# ab97959; Abcam) e incubadas *overnight* (aproximadamente 16 horas) a 4°C. Após o tempo de incubação as amostras foram lavadas 3 vezes com PBS e incubadas com o anticorpo secundário (*donkey anti-goat 488*, cat# A11058 e *donkey anti-rabbit 488*, cat# A21206, Invitrogen) durante 2 horas. As amostras foram lavadas e mantidas em PBS.

Detecção de NANOG

A amostra foi permeabilizada em solução de 0,2% de Triton X em PBS durante 30 minutos à temperatura ambiente e lavada 3 vezes de 5 minutos em 0,05% Tween-20 em PBS, então foi incubada em solução de bloqueio (0,05% de Tween-20 e 2% albumina do soro bovino (*bovine serum albumin*, BSA, Sigma) em PBS) por 30 minutos à temperatura ambiente. O anticorpo primário foi diluído em solução de bloqueio e adicionado à amostra, NANOG (1: 100, cat # ab77095, Abcam) e incubado *overnight* a 4°C. Após o tempo de incubação a amostra foi lavada 3 vezes com PBS e incubadas com o anticorpo secundário (1:500, *donkey anti-goat 488*, cat# A11055, Invitrogen) durante 2 horas.

Detecção de SSEA1

A amostra foi incubada em solução de bloqueio (0,1% de Tween-20 e 1% BSA em PBS) durante 30 minutos à temperatura ambiente. O anticorpo primário foi diluído em solução de bloqueio e adicionado à amostra, SSEA1 (1: 50, cat# MAB4301, Millipore) e incubado *overnight* a 4°C. Após o tempo de incubação a amostra foi lavada 3 vezes com PBS e incubadas com o anticorpo secundário (1:500, *donkey anti-rabbit 488*, cat# A21206, Invitrogen) durante 2 horas. A amostra foi lavada e mantida em PBS.

Detecção de TRA1 81

A amostra foi incubada em solução de bloqueio (0,1% de Tween-20 e 1% BSA em PBS) por 30 minutos à temperatura ambiente. O anticorpo primário TRA1 81 (1:50, *cat# MAB4381*, Millipore) foi diluído em solução de bloqueio e adicionado à amostra que permaneceu incubada *overnight* a 4°C. Posteriormente ao tempo de incubação as amostras foram lavadas 3 vezes com PBS e o anticorpo secundário (1:500, *donkey anti-rabbit 488*, *cat# A21206*, Invitrogen) foi adicionado e as amostras incubadas durante 2 horas. Por fim as amostras foram lavadas e mantidas em PBS.

4. 8. 2. Extração de RNA total

Ao longo cultivo das UDCs e iPSCs as células foram centrifugadas em eppendorf e o pellet formado foi congelado em nitrogênio líquido e mantido em freezer a -150°C. O RNA foi extraído com o reagente trizol (*TRizol Reagent*, Invitrogen). Cada pellet foi ressuspensionado em 100 µl de mix acrilamida (10 µl de acrilamida linear Ambion) e 90 µl de *UltraPure™ DNase/RNase-Free Distilled Water* (DEPC, Invitrogen) e 90 µl do reagente TRizol, as amostras foram incubadas durante 5 minutos em temperatura ambiente, foi adicionado 180 µl clorofórmio as amostras foram homogeneizadas por inversão, incubadas durante 3 minutos e centrifugadas em 15000 x g, 4°C, durante 15 minutos. O sobrenadante translúcido foi removido com cuidado e realocado em um novo microtubo (1,5 ml), e foi adicionado 600 µl álcool isopropílico (Synth) seguido de incubação por 10 minutos em temperatura ambiente, e posteriormente incubados durante 2 horas a -80°C. As amostras foram centrifugadas em 15000 x g, 4°C, durante 15 minutos, o sobrenadante foi removido, o pellet formado foi mantido no eppendorf e ressuspensionado em 1 ml de álcool etílico (75%, Synth) e centrifugados a 7500g, 4°C, durante 5 minutos e o sobrenadante foi removido e o pellet seco. Para a quantificação do RNA presente em cada amostra, o pellet foi ressuspensionado em 16µl de DEPC (Invitrogen) e foi realizada a leitura no espectrofotômetro Nanodrop.

4. 8. 3. Transcrição reversa – síntese de cDNA

Por meio do kit comercial *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (QIAGEN) foi realizada a transcrição reversa do RNA extraído das amostras para cDNA utilizado para o teste de RT-qPCR. Para iniciar o protocolo 1000 ng de RNA de

cada amostra foram realocados em um novo eppendorf e para completar 7,75µl de volume total foi adicionada DEPC (Invitrogen), então foi preparado o Mix 1 composto por Buffer 10x DNase I, DNase (Amp Grade) e RNase OUT e adicionado as amostras, que foram incubadas no termociclador a 25°C durante 15 minutos. Ao fim da etapa foi adicionado 1 µl de EDTA por amostra, que retornaram ao termociclador a 65°C, durante 10 minutos. Posteriormente, foi adicionado as amostras o Mix 2, composto de Buffer RT, primers randômicos, DNTP, RNase OUT, enzima RT e DEPC (Invitrogen) e as amostras retornaram ao termociclador programado para 4 ciclos (Tabela 2). Ao fim dos ciclos as amostras foram armazenadas em temperatura de -20°C.

Tabela 2. Ciclos programados no termociclador para a transcrição reversa.

	Ciclo 1	Ciclo 2	Ciclo 3	Ciclo 4
Tempo	10 minutos	120 minutos	5 minutos	∞
Temperatura	25°C	37°C	85°C	4°C

4. 8. 4. Análise de transcritos por RT-qPCR

Para avaliar de forma quantitativa os transcritos endógenos dos genes relacionados à pluripotência OCT4, SOX2 e NANOG foram desenhados oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) a partir do programa *Primer Express v.2* (Applied Biosystems) usando como referências sequências suínas obtidas no banco de dados do *GenBank* (www.ncbi.nlm.nih.gov).

As linhagens foram analisadas em diferentes momentos do cultivo *in vitro*: baixas passagens (*early passages*, EP, 15 a 18), intermediárias (*intermediate*, IP, 20 a 24) e altas (*late passages*, LP, 28 a 32). Os genes avaliados foram escolhidos devido a sua importância na reprogramação e manutenção do estado indiferenciado, e os genes referência foram gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) e beta-actina 3 (β-ACTIN-3). Para quantificar os transcritos dos fatores exógenos foram utilizados primers para o vetor mOSKM. As sequências estão descritas na Tabela 3.

Tabela 3. Lista de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) utilizados para caracterização de pluripotência. Pb: pares de base.

Primers	Forward	Reverse	pb
OCT4	CTATGACTTCTGCGGAGGGAT	TTTGATGTCCTGGGACTCCTCG	223
SOX2	CTCAGTGGTCAAGTCCGAGG	AGAGAGAGGCAGTGTACCGT	223
NANOG	TCCTTCCTCCATGGATCTGCT	GGGTCTGCGAGAACACAGTT	155
GAPDH	GTCGGTTGTGGATCTGACCT	ACCAGGAAATGAGCTTGACGA	221
β-ACTIN3	GAAGATCAAGATCATCGCGCCT	GTGGAATGCAACTAACAGTCCG	177
mOSKM	ACGAGCCACAAGCTCACCTCT	GGCATTAAAGCAGCGTATCC	221

Embriões suínos na fase de blastocisto foram usados como controle positivo, e a UDC3 foi utilizada como controle negativo. A expressão relativa de genes candidatos foi quantificada por *SYBR®Green PCR Master Mix* (Life Technologies). As condições para RT-qPCR foram: 95°C por 15 minutos; 40 ciclos de 95°C por 15 segundos, 60°C por 5 s, e 72°C por 30 segundos; 72°C por 2 minutos; e a curva de *Melting* analisada até 40 ciclos iniciando no 50°C com 0,5°C de aumento.

Os dados obtidos dos procedimentos experimentais foram analisados utilizando o programa estatístico *Statistical Analysis System* (SAS University Edition), com prévia verificação da normalidade dos resíduos pelo teste de *Shapiro-Wilk* (PROC UNIVARIATE). As variáveis que não atenderam às premissas estatísticas foram submetidas à transformação logarítmica [Log (X+1)]. Os dados originais ou transformados, quando este procedimento foi necessário, foram submetidos à Análise de Variância. Os dados relativos às diferentes linhagens celulares, quando significativos à análise de variância, foram submetidos ao teste de médias de Bonferroni. Em todas as análises estatísticas, o nível de significância considerado foi 5%.

4. 8. 5. Diferenciação celular: formação de corpos embrioides (CE)

Placas de cultivos de doze poços foram revestidas com agarose 0,6%, que impede a aderência das células a placa, desta forma células iPSCs foram repicadas e cultivadas suspensão em meio iPSCs sem a suplementação de bFGF por 48 horas e mantidas nas condições de cultivo de 5% de CO₂ a 38.5°C. Os corpos embrioides formados foram recuperados, passados para um microtubo (1,5 ml) e centrifugados a 300g, durante 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e o pellet passou por congelamento em nitrogênio líquido e armazenamento a -150°C até a extração de

RNA. Posteriormente, foi realizada transcrição reversa utilizando o *comercial High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (QIAGEN), seguindo as instruções do fornecedor, e os CEs foi avaliada a detecção de transcritos de genes relacionados a linhagens mesodérmica (BMP4 e Vimentina -VIMENTIN), endodérmica (AFP) ou ectodérmica (NESTIN, β -TUBULIN III) por meio de RT-qPCR. Os oligonucleotídeos iniciadores são descritos na tabela 4.

Tabela 4. Oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) utilizados para a detecção de transcritos de genes mesodérmicos, endodérmicos ou ectodérmicos.

Primers	Forward	Reverse	pb
AFP	GGAATGCTGCAGAGGAAACG	TTCAAGTGTGGTGGGCAACTT	130
NESTIN	GGAGAAACAGGGCCTACAGA	GCTCCAACCTTAGGGTCCAAGA	191
BMP4	TGTCTCGCCTTTCTCCCTGAT	GAATGGCTCAATAGGTCCCTG	157
VIMENTIN	GTGATGTCCGCCAGCAG	CGCTTCCAGAGACTCGTT	217
βTUBULIN	CAGAGCAAGAACAGCAGCTAC TT	GTGAACTCCATCTCGTCCATG CCCTC	227
β-ACTIN3	GAAGATCAAGATCATCGCGCCT	GTGGAATGCAACTAACAGTCC G	177

5. RESULTADOS

5. 1. Coleta e expansão de PBMCs

A amostra PBMC1 foi descongelada e cultivada *in vitro* com o meio específico para o isolamento de eritroblastos. A cada passagem as células foram contadas na câmara de Neubauer, os valores obtidos foram utilizados para calcular o volume ideal para o replaqueamento, como descrito previamente, e a viabilidade celular foi acompanhada por meio do *Countess*® (Tabela 5 e Figura 4).

Tabela 5. Contagem celular realizada durante a expansão das PBMCs. *Volume menor do que o previsto para o poço.

	Countess		Câmara de <i>Neubauer</i>		Plaqueamento	
	Total	Viáveis	Contagem	Concentração	V Final	6poços
D0	1,24x10 ⁶	1,47x10 ⁵	151	7x10 ⁶	3,5 ml	1 poço
D3	2,17x10 ⁶	1,42x10 ⁶	84	12,6x10 ⁶	6,3 ml	1 poço
D6	1,43x10 ⁶	1,08x10 ⁶	88	19,8x10 ⁶	9,9 ml	2 poços
D9	1,86x10 ⁶	4,40x10 ⁵	65	22,27x10 ⁶	2,2 ml*	1 poço
D12	1,42x10 ⁶	5,63x10 ⁵	19	9,5x10 ⁵	-	-

Fonte: (RECCHIA, K. 2020)

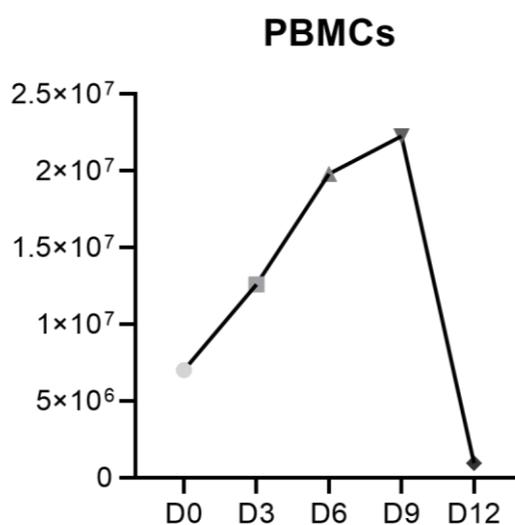
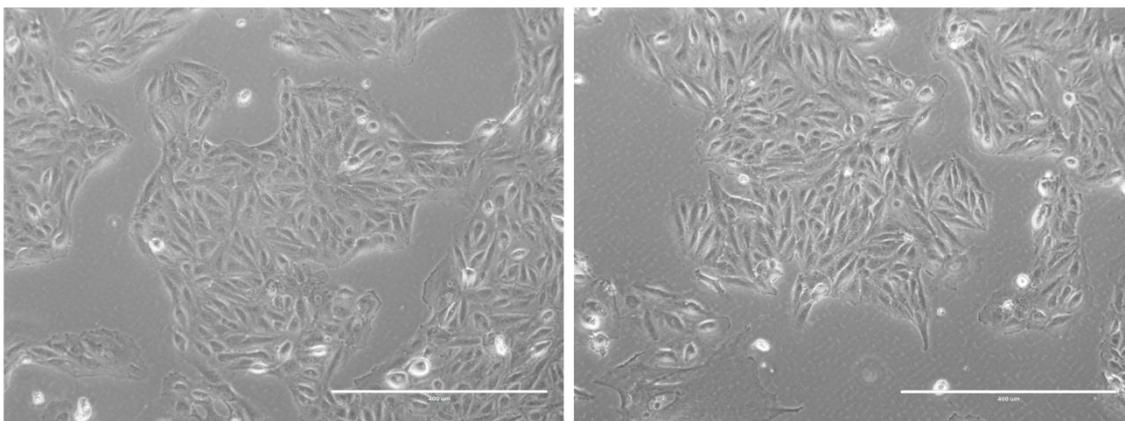


Figura 4. Representação gráfica da quantificação das células PBMCs durante 12 dias em cultivo.

Foi observado um aumento na população celular até D9, entretanto ao fim do isolamento proposto em D12 não obtivemos a concentração celular mínima de células para o processo de reprogramação epissomal ou lentiviral. Desta forma, o protocolo de enriquecimento está sendo reavaliado, pois pode não ter sido eficiente ou ainda ter prejudicado a viabilidade destas células suínas. Outras linhagens devem ser testadas, e caso o resultado seja insatisfatório novamente, a otimização do enriquecimento para a espécie suína deverá ser realizada.

5. 2. Coleta e isolamento de UDCs

Dentre as coletas de amostra de urina descrita previamente, duas amostras foram coletas no mesmo dia, de fêmeas, e nomeadas de UDC1 e UDC2. A terceira amostra, nomeada UDC3, foi coletada de uma fêmea (Figura 3). Células da amostra UDC3 (Figura 5) foram utilizadas no protocolo de reprogramação celular.



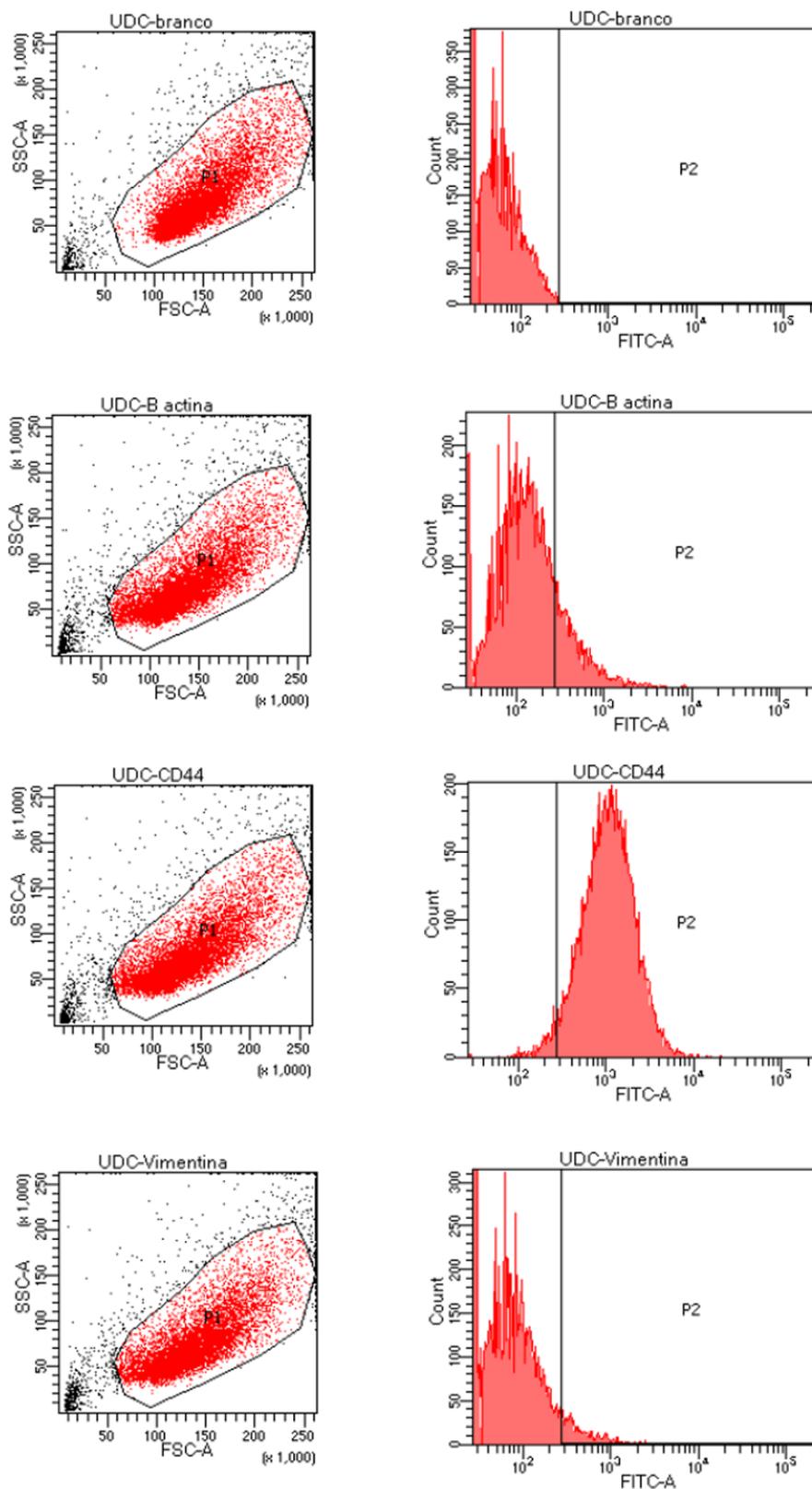
Fonte: (RECCHIA, K. 2020)

Figura 5: Cultivo *in vitro* de células UDC3 em D2 e D8, respectivamente, após isolamento. Aumento 40x.

5. 3. Caracterização das UDCs

Para a caracterização das UDCs, marcadores de células mesenquimais (CD44), epiteliais (citoqueratina) e vimentina e β -actina foram utilizados e os resultados avaliados por meio de citometria de fluxo (Figura 5). Foi possível detectar o marcador CD44 em 95,8% das células, porém, a detecção dos marcadores vimentina e β -actina foi baixa (9% e 18,9%, respectivamente). Por sua vez, também não foi observada marcação para citoqueratina, presente em células epiteliais (Figura 6).

Desta maneira, próximos passos incluem a validação dos marcadores em outros tecidos suínos para confirmação da especificidade destes e do protocolo, assim como para outro protocolo para marcação de células epiteliais como a e-caderina. Caso os resultados sejam validados, é possível que esta população de UDCs sejam células progenitoras do trato urinário (*urine-progenitor cells*, UPCs), por apresentarem características de células mesenquimais progenitoras.



Fonte: (RECCHIA, K. 2020)

Figura 6. Análise de citometria de fluxo para a caracterização das UDC3 quanto aos marcadores: β -actina, CD44 e Vimentina.

A partir do teste de RT-qPCR foi possível realizar análise qualitativa por meio da detecção de transcritos epiteliais e mesenquimais nas UDCs, e nos seus respectivos controles, sendo: coração controle para CD44, fígado para E-CADHERIN e KRT18 (Figura 7).

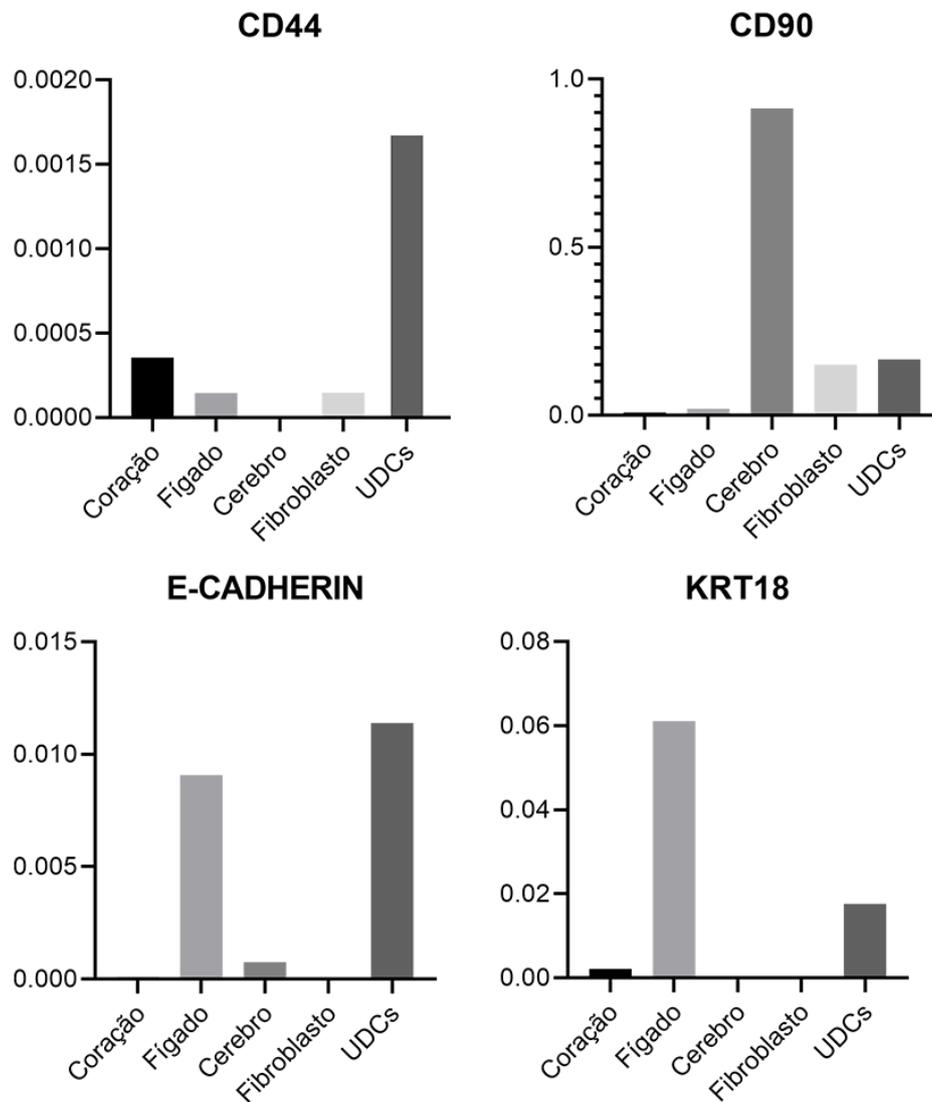
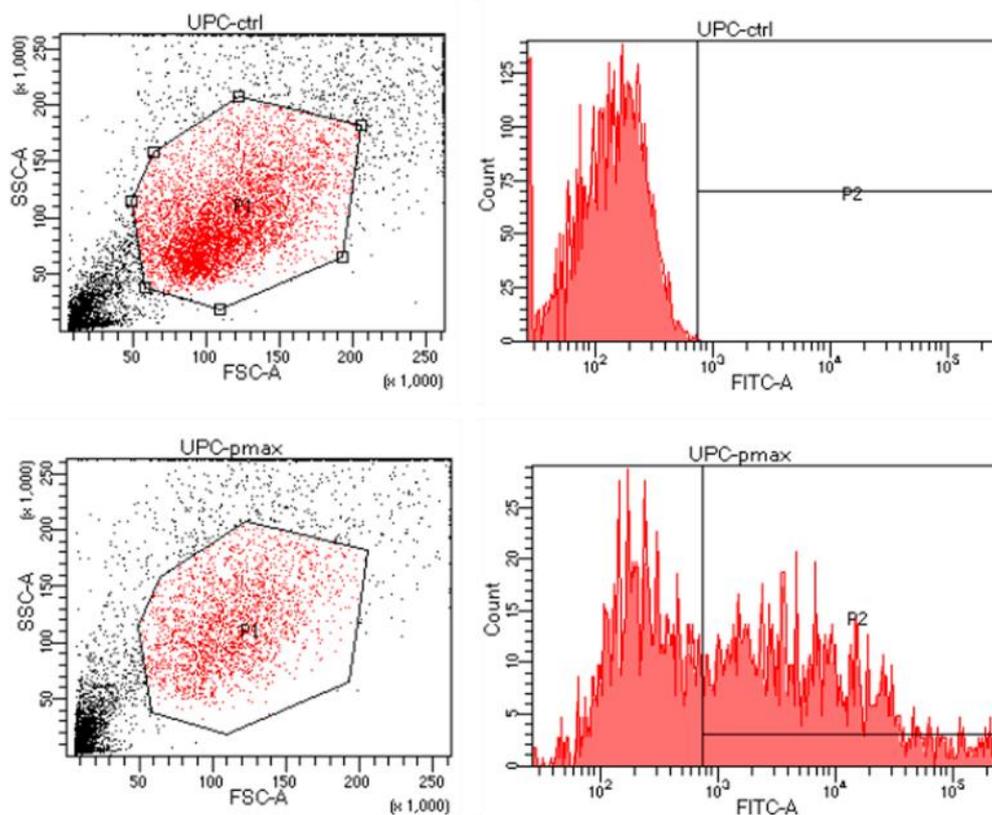


Figura 7. Detecção de transcritos mesenquimais (CD44 e CD90) e epiteliais (E-CADHERIN e KRT18) em células derivadas da urina, fibroblastos suínos e seus controles.

5. 4. Reprogramação à pluripotência através de vetores episomais

A amostra UDC3 foi nucleofectada segundo o protocolo para suíno de Li e colaboradores (2018), utilizando plasmídeos hUL, hSK, hOCT3/4 – shp53 ou pMAX. Um controle somente com o vetor pMAX, que expressa a proteína fluorescente verde

(GFP), foi utilizado para controle da nucleofecção, uma vez que a partir do GFP expresso pelas células nucleofectadas foi possível avaliar a eficiência de entrada dos plasmídeos na célula (Figura 8). A análise da eficiência da nucleofecção após 48h apresentou 56,9% da expressão do plasmídeo GFP+. As células nucleofectadas com os plasmídeos para reprogramação foram cultivadas durante pelo menos 30 dias e não apresentaram formação de colônias. A não reprogramação pode estar relacionada à baixa taxa da eficiência da nucleofecção, sendo que o esperado seria a obtenção acima de 70% de fluorescência para o grupo controle GFP.



Fonte: (RECCHIA, K. 2020)

Figura 8. Análise de citometria de fluxo para avaliação do sucesso em relação à nucleofecção de GFP da amostra UDC3.

5. 5. Reprogramação à pluripotência através de vetores lentivirais

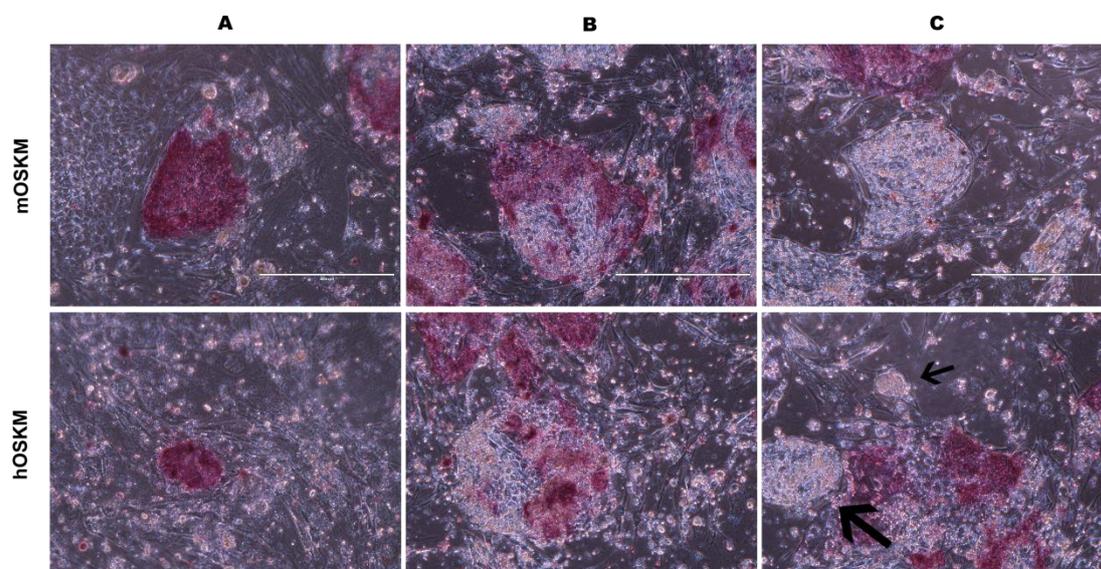
A formação de colônias foi observada 12 dias após a transdução por fatores murinos ou humanos e as formações foram testadas e analisadas quanto à detecção da fosfatase alcalina (FA). Na maioria das formações obtivemos detecção parcial, em

outras não houve detecção da proteína e em menor quantidade de formações pudemos observar a detecção de FA por toda a sua extensão (Tabela 6, Figura 9).

Tabela 6. Colônias contadas no 12^o dia em cultivo após a transdução das células e testadas para FA. ¹Mista – colônias que em partes eram positivas para a FA. % - taxa de eficiência de formação de colônias e %¹ – taxa de eficiência de formação de colônias positivas para FA.

	Colônias	%	Positivas ^A	% ¹	Mistas ^B	Negativas ^C
hOSKM	1691	7,70%	57	2,46%	1175	460
mOSKM	1541	8,45%	38	3,37%	889	614

Fonte: (RECCHIA, K. 2020)

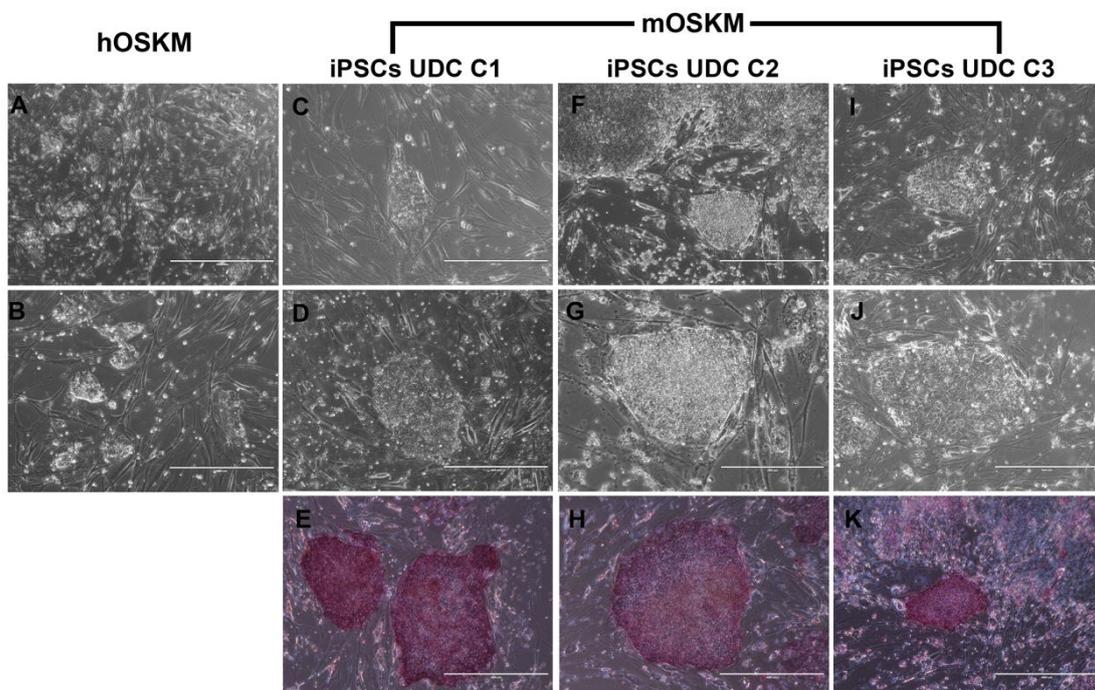


Fonte: (RECCHIA, K. 2020)

Figura 9. Detecção de fosfatase alcalina 12 dias após a transdução das UDCs através de mOSKM ou hOSKM em D12 após transfecção. Figuras A, B e C mostram colônias positivas, parciais ou negativas, respectivamente. *Setas - indicam as colônias negativas para FA.

A taxa de formação de colônias das iPSCs UDC transduzidas com os fatores humanos foi de 7,70% e a taxa de formação de colônias com presença de FA foi de 2,46%. Entretanto, as colônias formadas com os fatores humanos não se mantiveram em cultivo após passagem 4, sendo um indicativo de que as células podem não foram suficientemente induzidas à reprogramação.

A partir das iPSCs UDC transduzidas com os fatores murinos foi observada uma taxa de formação de colônias de 8,455% e a taxa contabilizando apenas colônias com detecção completa para FA foi de 3,37%. Em adicional, a partir da manutenção destas iPSCs em cultivo foi possível isolar 8 linhagens clonais com o repique manual, que continuaram a ser cultivadas em meio iPS sob uma monocamada MEFs inativadas, porém, apenas 3 colônias das linhagens clonais denominadas de iPSCs UDC Colônia 1 (C1), Colônia 2 (C2) e Colônia 3 (C3), se mantiveram em cultivo até passagem 32, 28 e 31, respectivamente. Todas as linhagens apresentaram detecção de FA e mantiveram morfologia característica de células pluripotente desde seu isolamento (Figura 10).

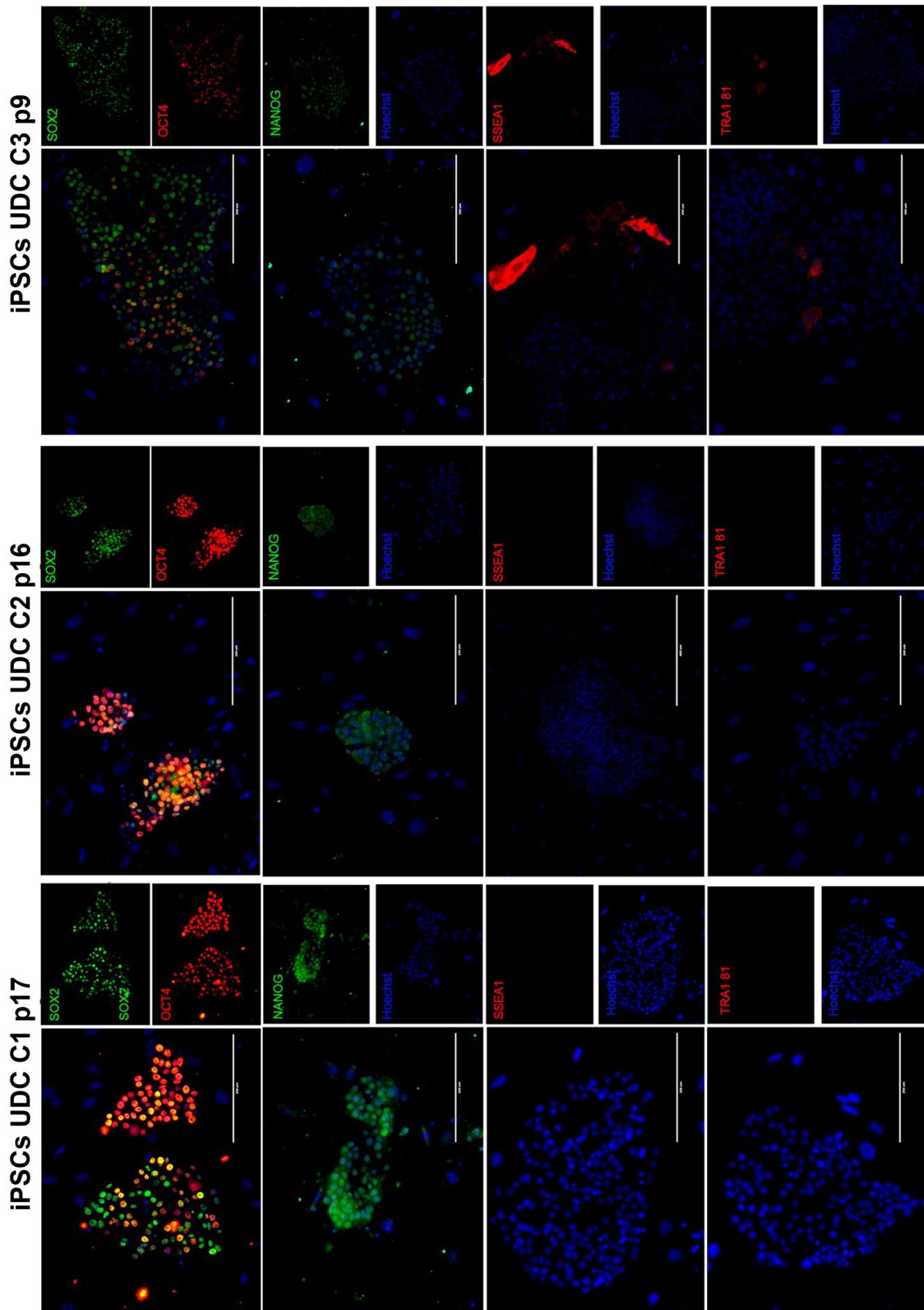


Fonte: (RECCHIA, K. 2020)

Figura 10. Células UDC3 reprogramadas com hOSKM (imagens A e B em aumento 40x e 100x, respectivamente) e mOSKM, subdividido em C1 (imagens C e D em aumento 100x e 200x, respectivamente), C2 (imagens E e F em aumento 100x e 200x, respectivamente) e C3 (imagens G e H em aumento 100x e 200x, respectivamente). Todas as colônias apresentaram bordas bem delimitadas.

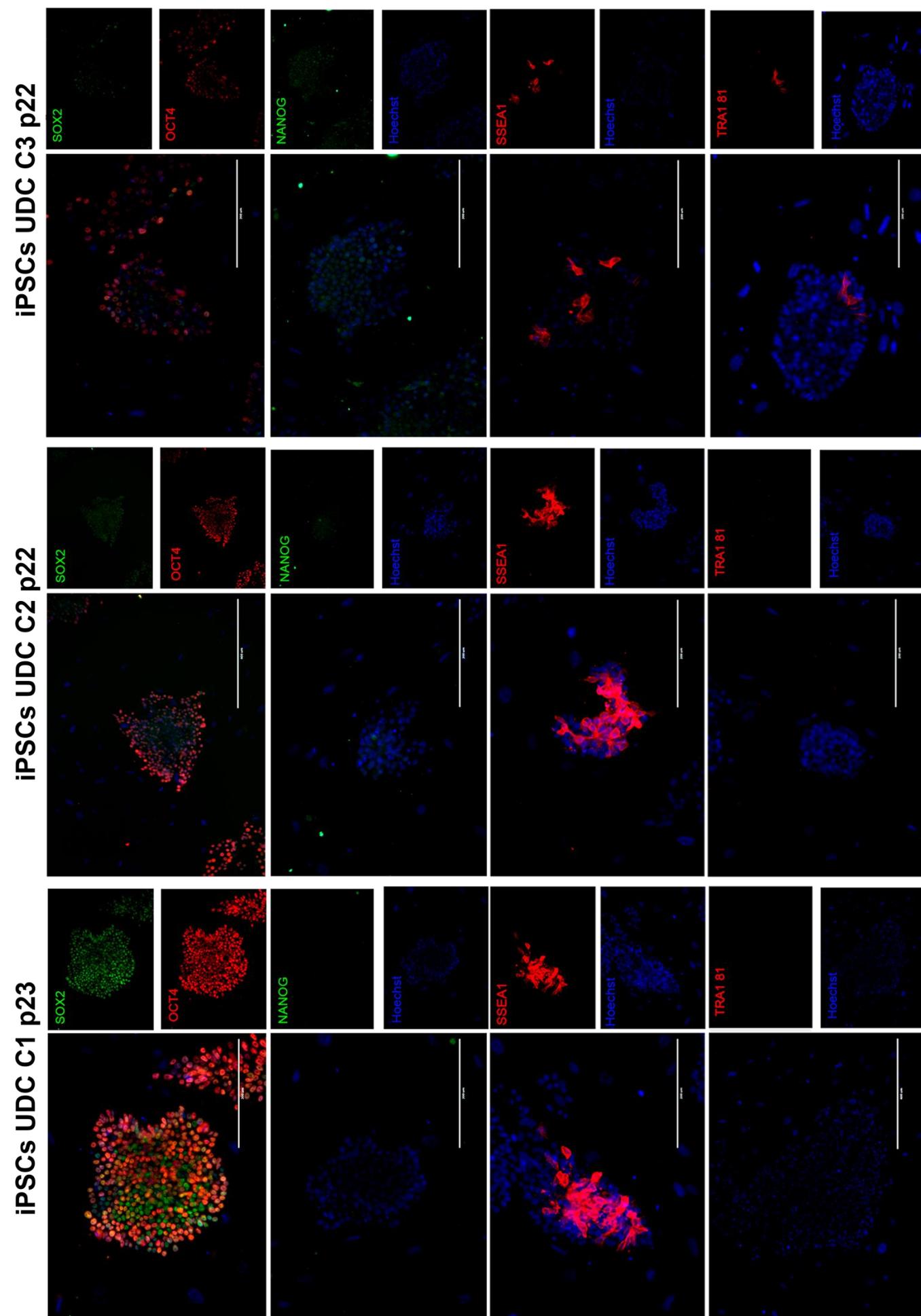
5. 6. Detecção da expressão de proteínas relacionadas à pluripotência em iPSCs

Com a manutenção das linhagens clonais em cultivo e a detecção de FA, outras proteínas relacionadas a pluripotência foram analisadas, sendo: OCT4, SOX2, NANOG, SSEA1, e TRA1 81. A detecção das proteínas foi realizada em passagens baixa (17, 16 e 9 para as linhagens C1, C2 e C3) e intermediária (23, 22 e 22 para as linhagens C1, C2 e C3) por teste de imunocitoquímica de fluorescência e analisadas no EVOS™ (Figuras 11 e 12).



Fonte: (RECCHIA, K. 2020)

Figura 11. Linhagens clonais C1, C2 e C3 testadas para a detecção das proteínas SOX2, OCT4, NANOG, SSEA1 e TRA1 81 nas passagens 16, 15 e 9, respectivamente.



Fonte: (RECCHIA, K. 2020)

Figura 12. Linhagens clonais C1, C2 e C3 testadas para a detecção das proteínas SOX2, OCT4, NANOG, SSEA1 e TRA1 81 nas passagens 23, 22 e 22, respectivamente.

A marcação para SSEA1 demonstrou uma possível necessidade de maior tempo de cultivo das iPSCs UDC para a sua expressão (Tabela 7), indicando uma melhor reprogramação com maior tempo de cultivo *in vitro*. Por outro lado, de maneira interessante, o tempo de cultivo diminuiu a expressão de NANOG.

Uma vez que a reprogramação completa ainda não é robustamente reportada em animais domésticos, análises mais detalhadas e em diferentes períodos de cultivo *in vitro* (passagens) ainda são necessárias para a caracterização destas linhagens, sendo possível a necessidade de um maior tempo em cultivo destas. Em resumo, pode-se observar que a linhagem C3 se manteve em EP e IP negativa para TRA-81 e fracamente positiva para SOX2, OCT4 e NANOG, em contrapartida positivo para SSEA1 em IP. O mesmo foi evidenciado para as linhas C1 e C2, porém estas não foram fracamente positivas para SOX2 e OCT4. Desta forma, é preciso testar os anticorpos quanto sua especificidade.

Tabela 7. Resultado da imunocitoquímica nas iPSCs UDCs mostrando células positivas com fraca marcação foram representadas com “+”, positivas com forte marcação foram representadas com “++”, as parcialmente positivas com +/- e células com marcação negativa foram representadas com “-”.

Marcadores	iPSCs UDC C1		iPSCs UDC C2		iPSCs UDC C3	
	EP	IP	EP	IP	EP	IP
OCT4	++	++	++	++	+	+
SOX2	++	++	++	++	+	+
NANOG	+	+/-	+	+/-	+/-	+/-
SSEA1	-	+	-	+	+/-	+/-
TRA1 81	-	-	-	-	+/-	+/-

Fonte: (RECCHIA, K. 2020)

5. 7. Análise dos transcritos relacionados à pluripotência na iPSCs a partir de RT-qPCR

5. 7. 1. Expressão dos fatores de transcrição endógenos e exógenos

A detecção de transcritos endógenos relacionados à pluripotência OCT4, SOX2 e NANOG e do vetor exógeno foram avaliadas em comparação com a UDC3 e as iPSCs geradas em diferentes momentos do cultivo: baixa (*early passages*, EP), intermediária (*intermediate passages*, IP) e alta (*late passages*, LP) (Tabela 7). Foram detectados transcritos endógenos e exógenos em todos os grupos de passagens, mas com diferenças significativas para os genes NANOG ($p < 0,0001$), mOSKM ($p < 0,0001$) e SOX2 ($p = 0,0003$), sendo que estes não tiveram detecção significativa ou não foram detectados em UDCs (Tabela 8). Transcritos dos fatores exógenos foram encontrados em abundância, porém, não foi apresentada diferença entre nas diferentes passagens das linhagens. O SOX2 apresentou, em uma análise visual, apesar de não diferente estatisticamente, maior expressão em passagens intermediárias e altas, quando comparado a passagens baixas.

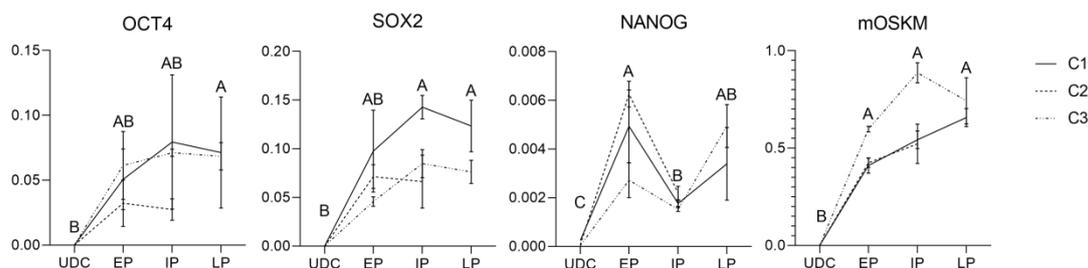
O fator de transcrição NANOG apresentou maior abundância de transcritos em passagens baixas, e uma diminuição na detecção de seus transcritos quando em passagens intermediárias, porém, voltou a aumentar em passagens altas. É importante ressaltar que para o gene OCT4 não foi encontrada diferença, entre os grupos e passagens.

Tabela 8. Diferença estatística encontrada entre UDC3 e as passagens de iPSCs UDC para os genes endógenos e fator exógeno analisados por RT-qPCR.

GENE	UDC	IPSCs		
		EP	IP	LP
NANOG	$1,1777 \times 10^{-4} \pm$	$0,0046 \pm$	$0,0018 \pm$	$0,0042 \pm$
	$1,0832 \times 10^{-4}^C$	$0,0021^A$	$0,0004^B$	$0,0021^{AB}$
mOSKM	0 ± 0^B	$0,4778 \pm$	$0,6509 \pm$	$0,7002 \pm$
		$0,0998^A$	$0,2067^A$	$0,1470^A$
OCT4	0 ± 0^B	$0,0481 \pm$	$0,0593 \pm$	$0,0698 \pm$
		$0,0343^{AB}$	$0,0486^{AB}$	$0,0513^A$
SOX2	$4,2896 \times 10^{-5} \pm$	$0,0716 \pm$	$0,0979 \pm$	$0,0998 \pm$
	$1,9131 \times 10^{-5}^B$	$0,0442^{AB}$	$0,0448^A$	$0,0411^A$

^{A-C} Letras maiúsculas sobrescritas representam diferenças ($p < 0,05$) entre colunas em uma mesma linha.

Para uma melhor visualização o resultado referente aos grupos de passagens (EP, IP e LP) e UDC3 é apresentado em forma de gráfico (Figura 13). Não houve contribuição da linhagem C2 para o grupo de altas passagens (LP), pois a linhagem se diferenciou quando em passagem 28.



Fonte: (RECCHIA, K. 2020).

Figura 13. Análise da abundância de transcritos endógenos relacionados a pluripotência na UDC3 e nos diferentes grupos de passagem de iPSCs UDC. ^{A-C} Letras maiúsculas sobrescritas representam diferenças ($p < 0,05$) entre colunas.

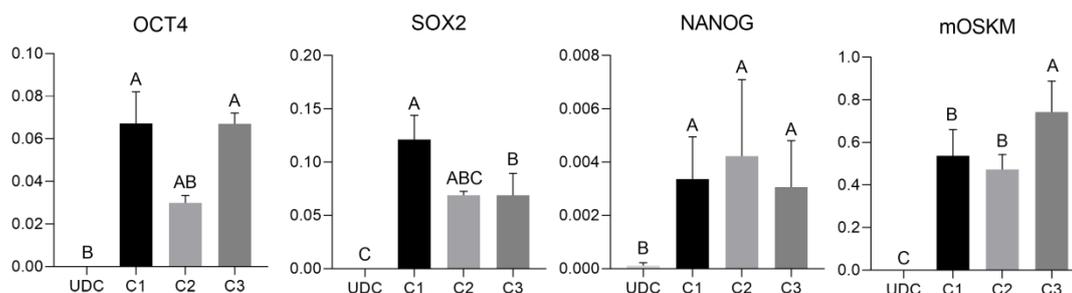
Também foi avaliada a detecção de transcritos das linhagens clonais C1, C2 e C3 separadamente, e foi possível observar diferença estatística significativa entre as colônias para transcritos exógenos mOSKM ($p < 0,0001$) e de transcritos endógenos somente do gene SOX2 ($p = 0,0099$) (tabela 9), e não houve diferença para o gene entre as linhagens para os transcritos de OCT4 e NANOG apenas diferença entre as

linhagens de iPSCs para com a UDC3. A colônia C3 apresentou maior expressão do vetor exógeno, e menor expressão de SOX2 quando comparada à colônia C1. Os resultados também são apresentados em forma de gráfico para melhor visualização (Figura 14).

Tabela 9. Diferença estatística encontrada entre as colônias de iPSCs UDC e UDC3 para os genes endógenos e fator exógeno analisados por RT-qPCR.

GENE	UDC	Linhagens		
		C1	C2	C3
NANOG	$1,1777 \times 10^{-4} \pm$	$0,0034 \pm$	$0,0042 \pm$	$0,0031 \pm$
	$1,0832 \times 10^{-4} \text{B}$	$0,0023^{\text{A}}$	$0,0023^{\text{A}}$	$0,0018^{\text{A}}$
mOSKM	$0 \pm 0^{\text{C}}$	$0,5369 \pm$	$0,4733 \pm$	$0,7430 \pm$
		$0,1253^{\text{B}}$	$0,1258^{\text{B}}$	$0,1685^{\text{A}}$
OCT4	$0 \pm 0^{\text{B}}$	$0,0671 \pm$	$0,0298 \pm$	$0,0670 \pm$
		$0,0593^{\text{A}}$	$0,0198^{\text{AB}}$	$0,0248^{\text{A}}$
SOX2	$4,2896 \times 10^{-5} \pm$	$0,1213 \pm$	$0,0689 \pm$	$0,0689 \pm$
	$1,9131 \times 10^{-5} \text{C}$	$0,0485^{\text{A}}$	$0,0328^{\text{ABC}}$	$0,0244^{\text{B}}$

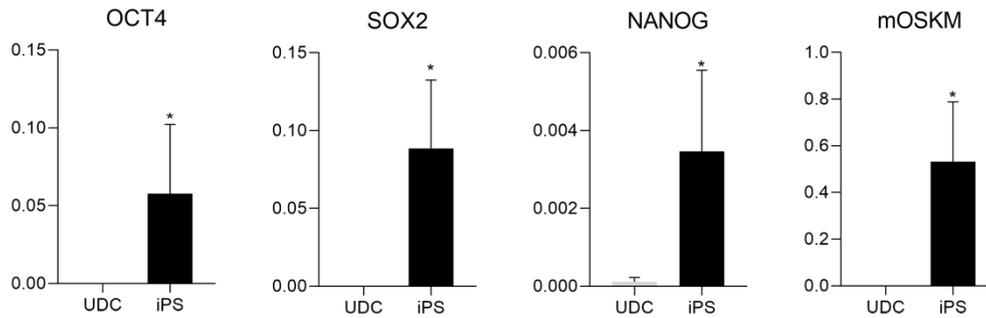
^{A-C} Letras maiúsculas sobrescritas representam diferenças ($p < 0,05$) entre colunas em uma mesma linha.



Fonte: (RECCHIA, K. 2020)

Figura 14. Análise da quantificação de transcritos endógenos relacionados à pluripotência na UDC3 e nas diferentes linhagens de iPSCs UDC. ^{A-C} Letras maiúsculas sobrescritas representam diferenças ($p < 0,05$) entre colunas.

A partir da detecção de transcritos endógenos foi possível observar uma alteração no quadro de transcritos quando comparamos a UDC3 com as iPSCs produzidas, de um modo geral, e como já esperado houve detecção de transcritos exógenos apenas nas iPSCs (Figura 15).

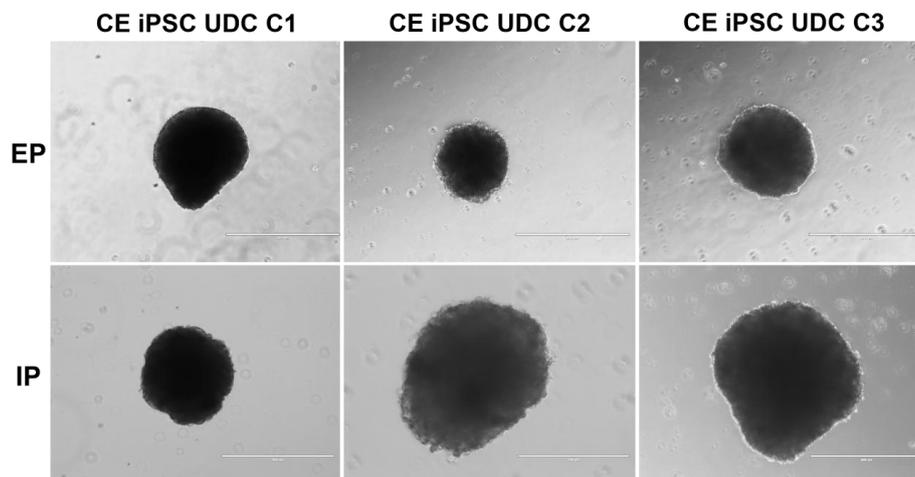


Fonte: (RECCHIA, K. 2020)

Figura 15. Gráficos da análise de transcritos endógenos SOX2, NANOG, OCT4 e exógeno OSKM. Comparando a UDC3 com o grupo geral de iPSCs. *Sobrescritos representam diferenças ($p < 0,05$) entre colunas.

5. 8. Diferenciação *in vitro*: formação de corpos embrioides

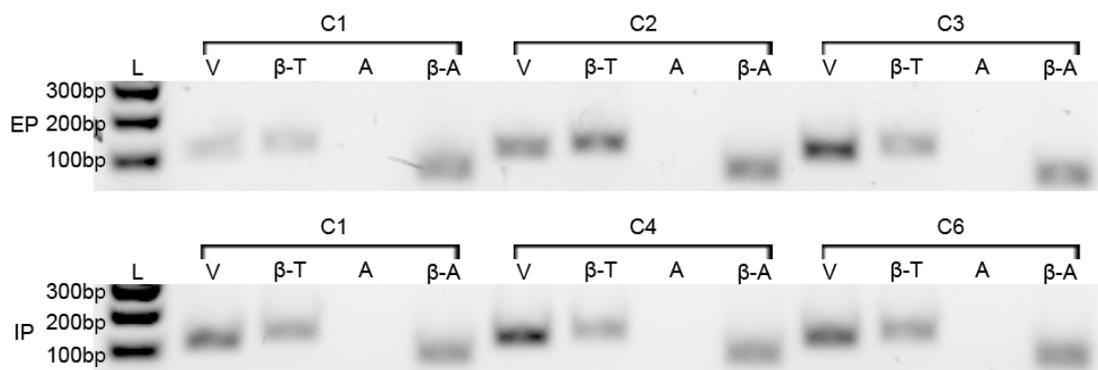
As linhagens C1, C2 e C3 foram dissociadas (*Tryple Express*, Gibco) e cultivadas em suspensão na ausência do fator que auxilia a manutenção da pluripotência (bFGF). Todas as linhagens formaram os corpos embrioides em baixas passagens (EP - 16, 15 e 15, respectivamente) e em passagens intermediárias (IP - 25, 24 e 24, respectivamente) (Figura 16).



Fonte: (RECCHIA, K. 2020)

Figura 16. Formação de corpos embrioides (CE) por meio do cultivo de iPSCs UDC em suspensão. Na linha A estão os CEs todos em aumento 40x em EP e na linha B em IP em aumento 40x, 100x e 100x respectivamente.

Foi realizado RT-qPCR para detecção de transcritos ectodérmicos, mesodérmicos e endodérmicos, e o produto da reação foi analisado por eletroforese em gel de agarose. (Figura 17). Foram observados transcritos mesodérmicos (vimentina) e ectodérmicos (β -tubulina III), mas não endodérmicos (AFP).



Fonte: (RECCHIA, K. 2020)

Figura 17. Gel de eletroforese a partir do produto de RT-qPCR dos CEs. L – *ladder* (marcador molecular), V- Vimentina, β -T- β -Tubulina III, A- AFP e β -A- β -Actina utilizado como gene referência.

5. 9. Resumo dos resultados

Foram obtidas células reprogramadas à pluripotência a partir de UDCs em suínos. Na tabela 10 são resumidos os resultados de caracterização à pluripotência das três linhagens clonais isoladas da UDC3 reprogramada com os fatores integrativos murinos (mOSKM). Nas linhagens C1 e C2 foi possível observar a manutenção tanto em EP quanto em IP da presença das proteínas SOX2 e OCT4 e a ausência da proteína TRA1 81, porém na linhagem C3 foi observada a presença de TRA1 81 em algumas células. Em contrapartida, a detecção da proteína SSEA1 foi observada em todas as linhagens quando em IP, enquanto o NANOG foi fracamente detectado. Entretanto, a partir da detecção das proteínas OCT4 ou SOX2 por imunofluorescência não é possível distinguir se é decorrente de transcritos endógenos ou exógenos.

Dessa forma, transcritos relacionados à pluripotência foram avaliados via RT-qPCR, onde observamos transcritos endógenos e exógenos avaliando as iPSCs de maneira geral em diferentes passagens (EP, IP e LP) e as linhagens C1, C2 e C3 separadamente. De forma interessante, foi observada uma queda na quantidade de transcritos do NANOG quando em IP, e é possível correlacionar este resultado ao observado na imunofluorescência, onde foi encontrada uma fraca detecção da proteína NANOG. Estes resultados podem estar associados a uma resposta das

colônias após o congelamento e descongelamento realizado entre as baixas passagens (EP) e passagem intermediária (IP).

Em adicional, mesmo sendo observada a presença de transcritos exógenos observados, sendo indicativo da incapacidade de silenciamento completo do vetor, as diferentes linhagens geradas neste estudo foram capazes de se diferenciar em corpos embrioides e apresentaram transcritos mesodérmicos e ectodérmicos.

Tabela 10. Resumo dos resultados da caracterização das linhagens de iPSCs UDC geradas. *n/a – não avaliado.

	iPSCs C1			iPSCs C2			iPSCs C3			
	EP	IP	LP	EP	IP	LP	EP	IP	LP	
Marcadores de superfície										
• OCT4	+	+	n/a	+	+	n/a	+	+	n/a	
• SOX2	+	+	n/a	+	+	n/a	+	+	n/a	
• NANOG	+	+/-	n/a	+	+/-	n/a	+	+/-	n/a	
• SSEA1	-	+/-	n/a	-	+/-	n/a	+/-	+	n/a	
• TRA1 81	-	-	n/a	-	-	n/a	+/-	+/-	n/a	
Expressão endógena										
• OCT4	√	√	√	√	√	√	√	√	√	
• SOX2	√	√	√	√	√	√	√	√	√	
• NANOG	√	√	√	√	√	√	√	√	√	
Expressão exógena (mOSKM)										
CEs	√	n/a	√	n/a	√	n/a	√	√	n/a	

6. DISCUSSÃO

A reprogramação *in vitro* de células derivadas de urina ou sangue à pluripotência é de grande interesse, em especial, devido à vantagem de serem procedimentos menos ou não invasivos, não levando à necessidade de realização de biopsias ou interrupção de gestações, levando a um menor estresse, sem a necessidade de recuperação após microcirurgias, e geralmente indolor. Dessa forma, células derivadas destas coletas tornam-se de grande interesse para a modelagem de doenças *in vitro*, em modelos animais ou humanos, e podem ser especialmente beneficiados pacientes com síndromes caracterizadas por deficiências cognitivas ou quaisquer outras impossibilidades de coletas, facilitando assim, estudos na medicina regenerativa ou produção animal, e sendo importantes para a avaliação de etapas na em questões éticas de propostas de pesquisa (WEN et al., 2018; ZHOU et al., 2019).

A reprogramação à pluripotência de células derivadas da coleta de sangue periférico, menos invasiva, já foi reportada no modelo humano (OHMINE et al., 2011; JUNQUEIRA REIS et al., 2017; WEN et al., 2018; GUAN et al., 2020), mas não em modelos animais. O isolamento e reprogramação de células derivadas da urina humana via coleta não invasiva (MASSA et al., 2016; STEICHEN et al., 2017; JIANG et al., 2018; YAN et al., 2019; ZHOU et al., 2019), entretanto, já foi reportado em coelhos (YANG et al., 2018), mas a reprogramação destas ainda não foi descrita em modelos animais. Neste trabalho, os protocolos foram adaptados do modelo humano ao suíno, visando a validação e facilitação de iPSCs derivadas de UDCs de forma inédita no modelo suíno e na medicina veterinária.

Para tal, foi realizada a coleta de sangue periférico da jugular externa de fêmeas suínas e o isolamento de eritroblastos por serem mononucleares e sem a atividade de recombinação genômica. Entretanto, nas condições deste estudo não foi possível sua caracterização ou indução à pluripotência, uma vez que o número de células não foi suficiente para tal, apresentando um breve aumento seguido de uma queda na concentração das células. Tal evento pode estar relacionado com o protocolo de enriquecimento, e também com uma maior facilidade de perda das células durante sua manipulação quando cultivadas em suspensão. Entretanto, ainda há um banco de células que poderão ser utilizadas para o isolamento, caracterização e reprogramação celular em estudos futuros.

Para o processo de isolamento de células da urina foi utilizado protocolo de isolamento de células progenitoras (STEICHEN et al., 2017), estas consideradas em literatura células precursoras do trato urinário (*urine-progenitor cells*, UPCs). A caracterização não é padronizada no humano, pois os estudos apresentam

divergência entre a detecção de transcritos ou proteínas (GAO et al., 2015; MASSA et al., 2016; YANG et al., 2018; ZHOU et al., 2019). Entretanto, para elucidar se as células que isolamos são progenitoras ou epiteliais de descamação, foi iniciado o processo de caracterização, que revelou que tais células são positivas para o CD44. A família da glicoproteína transmembrana CD44 têm-se mostrado participar em funções importantes de processos de transdução de sinal, em especial monitorando mudanças na matriz extracelular e organizando cascatas de sinalização por meio da associação com o citoesqueleto. Em especial, a alta expressão de CD44 foi correlacionada com fenótipos de células-tronco cancerosas e com a transição epitélio-mesenquimal (PONTA; SHERMAN; HERRLICH, 2003; XU et al., 2015; MORATH; HARTMANN; ORIAN-ROUSSEAU, 2016).

Outros estudos que visam a caracterização via detecção de marcadores ou transcritos característicos de células mesenquimais ou epiteliais e seus respectivos controles, para tal utilizamos a detecção dos transcritos CD44, CD90, KRT18 e E-CADHERIN (MASSA et al., 2016; PIPINO et al., 2018; YANG et al., 2018). A UDC03 apresentou todos os transcritos testados e a partir da avaliação qualitativa dos resultados as células derivadas da urina apresentam perfil de células progenitoras, porém novas repetições devem ser efetuadas para análise estatística.

A célula UDC3 foi mantida em cultivo e induzida à pluripotência a partir de duas metodologias, integrativa e não integrativa. A metodologia integrativa de reprogramação já padronizada em nosso laboratório utiliza o vetor lentiviral e nosso grupo já reportou a geração iPSCs diferentes espécies, incluindo o suíno (PESSÔA et al., 2019; BRESSAN et al., 2020; MACHADO et al., 2020b). Em contra partida, a metodologia não integrativa utilizada já foi realizada no modelo suíno por colaboradores diretos neste projeto (LI et al., 2018); entretanto, não foram obtidas colônias iPSCs derivadas desta metodologia, e com a manutenção morfologia nas UDC3, foi caracterizado que não houve reprogramação. A dificuldade em adquirir iPSCs na metodologia episomal pode ser decorrente do tamanho dos plasmídeos a serem inseridos. Por outro lado, testes recentes do nosso laboratório indicam que células humanas foram reprogramadas com sucesso com um protocolo otimizado (dados não publicados).

Como demonstrado nos resultados, obtivemos formações de colônias a partir da UDC3 induzida a reprogramação a partir da integração dos fatores hOSKM ou mOSKM e as colônias formadas foram inicialmente testadas para FA. Visto que a FA é um teste de alta sensibilidade de detecção em tecidos indiferenciados e é considerada um marcador de pluripotência (LIU et al., 2017). Porém, as células transduzidas com hOSKM não se mantiveram em cultivo após 4 passagens, diferente das colônias

formadas com mOSKM das quais selecionamos 3 linhagens clonais que se mantiveram em cultivo por pelo menos 28 passagens. Outros tipos celulares no modelo suíno já foram reprogramados utilizando os fatores mOSKM, sendo fibroblastos embrionários, fibroblastos de orelha de neonatos, e células da medula óssea, ou seja todos derivados de coleta invasiva (ESTEBAN et al., 2009; Ji et al., 2013), incluindo resultados encontrados em nosso laboratório sob as mesmas condições de cultivo a partir de fibroblastos embrionários ou neonatais (MACHADO et al., 2020a; PIERI et al., 2020).

As linhagens clonais C1, C2 e C3 foram submetidas à imunofluorescência para detecção das proteínas relacionadas à pluripotência nas diferentes passagens (EP e IP) para: OCT4, SOX2, NANOG (LIU et al., 2017). Porém, a fraca detecção de NANOG em passagens intermediárias foi notória e já foi descrita sua fraca detecção ou não detecção em iPSCs que foram capazes de contribuir com a ICM em embriões suínos quiméricos (XU et al., 2019). A detecção de SSEA1 foi encontrada apenas em algumas células da colônia e em todas as linhagens quando em passagem intermediária, diferente do TRA1-81 que foi observado em algumas células da colônia, mas apenas na linhagem C3.

No processo de reprogramação espera-se que ocorra a perda das características das células diferenciadas para que passem a estado indiferenciado, para tal é necessária o remodelamento epigenético, permitindo que genes relacionados à pluripotência antes silenciados se tornem ativos (YU et al., 2007; PICK et al., 2009; TROUNSON, 2009). Em nossos resultados foi possível observar que a UDC3 não apresentou transcritos, ou apresentou baixa quantidade de transcritos endógenos relacionados a pluripotência quando comparado à abundância de transcritos encontrados nas diferentes linhagens de iPSCs. Porém, a aquisição e manutenção da via de pluripotência em animais domésticos não é tão explorada quando comparado com estudos nos modelos humano e camundongo (PESSÔA; BRESSAN; FREUDE, 2019). Dessa forma, é possível que alguns genes analisados, em especial o NANOG e SSEA1, exerçam funções diferentes e ainda não bem compreendidas.

Foi notória, em IP, a diminuição de transcritos de NANOG detectados, e também houve fraca detecção da proteína durante o mesmo período quando testada via imunofluorescência em todas as linhagens de iPSCs, sendo tais eventos possivelmente estão correlacionados com o processo de congelamento e descongelamento das linhagens. Tal procedimento pode ter levado à dificuldade da manutenção da condição indiferenciada *in vitro*, pois também foi observado o aumento da detecção de transcritos exógeno. Esta manutenção nas diferentes passagens e

linhagens pode ser um indicativo de dependência para a manutenção da pluripotência (SILVA et al., 2008; SRIDHARAN et al., 2009), um possível fator limitante para a reprogramação completa das células.

Para avaliar o potencial de diferenciação, as linhagens de iPSCs geradas foram submetidas ao protocolo de formação de CEs de forma espontânea quando cultivadas em suspensão. Todas as linhagens foram capazes de formar os CEs em passagem baixa (EP) e intermediária (IP), e observamos nos CEs a presença de transcritos mesodérmicos e ectodérmicos, mas não endodérmicos. A não diferenciação em linhagens endodérmicas pode demonstrar uma reprogramação incompleta das iPSCs, ou ainda, pode apresentar características tempo-dependente, sendo que talvez um maior tempo em cultivo seria necessário para que os CEs apresentassem os transcritos, visto que a origem das iPSCs podem influenciar sua diferenciação (POLO et al., 2010).

As iPSCs geradas neste estudo podem ser classificadas como células reprogramadas, ou pelo menos, iPSCs parcialmente reprogramadas, uma vez que ainda apresentam expressão dos fatores exógenos. Em adicional, a não caracterização de células pluripotentes *naïve* ou *primed* no modelo suíno é uma barreira para a classificação e padronização dos protocolos no modelo.

De maneira importante, sabemos que a reprogramação completa pode ser dispensada em alguns estudos, como exemplo, a produção de modelos de doença *in vitro*, ou diferenciação em célula funcional como gametas. Já foram reportadas células diferenciadas à partir de iPSCs não completamente reprogramadas, ou sem a caracterização de uma reprogramação completa, validando desta forma sua utilização (GAO et al., 2015; MASSA et al., 2016; WANG et al., 2016; ZHOU et al., 2019).

A geração de células iPSCs a partir de metodologia não invasiva é inédita no modelo suíno e os resultados alcançados são promissores. O completo estudo da reprogramação destas células neste modelo é de extrema importância devido a versatilidade de suas aplicações, que aliado com a maior facilidade de obtenção das células via coleta não invasiva é de grande importância para o desenvolvimento de novas biotecnologias voltadas à produção animal e à medicina regenerativa.

7. CONCLUSÕES

Os resultados reportados neste estudo apresentam de forma inédita a reprogramação à pluripotência de células derivadas de urina coletada de forma não invasiva em um modelo animal de grande porte, o suíno. O isolamento de eritroblastos proposto inicialmente não foi eficiente no presente estudo, e como consequência, o protocolo de reprogramação não foi realizado nestas células.

Nas células derivadas da urina (UDCs) foram realizados dois protocolos de reprogramação, e quando submetidas ao protocolo episomal não houve indicativo morfológico de reprogramação à pluripotência, e dessa forma não foram obtidas células pluripotentes não transgênicas.

Em contrapartida, a partir da metodologia integrativa foram obtidas colônias com morfologia típica, das quais derivamos linhagens clonais que apresentaram ao longo do cultivo *in vitro*, marcadores proteicos relacionados à pluripotência e transcritos de genes endógenos relacionados à pluripotência.

As iPSCs suínas derivadas deste estudo apresentam características de células pluripotentes e poderão ser utilizadas em estudos de modelos *in vitro* de doenças e em terapia celular. Além disso, ressaltamos a importância do estudo e o desenvolvimento de novas metodologias no modelo suíno, que quando associado à versatilidade das aplicações das células pluripotentes induzidas, podem contribuir de forma inovadora na medicina regenerativa e no aprimoramento genético animal.

REFERÊNCIAS

- ALONSO-ALONSO, M. L.; SRIVASTAVA, G. K. Current focus of stem cell application in retinal repair. **World journal of stem cells**, v. 7, n. 3, p. 641–8, abr. 2015.
- AO, Y. et al. High efficient differentiation of functional hepatocytes from porcine induced pluripotent stem cells. **PLoS ONE**, v. 9, n. 6, p. 1–11, 2014.
- ARNHOLD, S.; WENISCH, S. Adipose tissue derived mesenchymal stem cells for musculoskeletal repair in veterinary medicine. **American journal of stem cells**, v. 4, n. 1, p. 1–12, jan. 2015.
- BADIN, J. K. et al. Effect of Age on Diabetogenicity of Alloxan in Ossabaw Miniature Swine. **Comparative medicine**, v. 69, n. 2, p. 114–122, 2019.
- BRANDLER, M. D. et al. A novel inhaled organic nitrate that affects pulmonary vascular tone in a piglet model of hypoxia-induced pulmonary hypertension. **Pediatric Research**, v. 58, n. 3, p. 531–536, 2005.
- BRESSAN, F. F. et al. Generation of induced pluripotent stem cells from large domestic animals. **Stem cell research & therapy**, v. 11, n. 1, p. 247, 2020.
- CAO, Y. et al. Generation of a Urine-Derived Ips Cell Line from a Patient with a Ventricular Septal Defect and Heart Failure and the Robust Differentiation of These Cells to Cardiomyocytes via Small Molecules. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 50, n. 2, p. 473–488, 2018.
- CONG, Y. et al. Derivation of putative porcine embryonic germ cells and analysis of their multi-lineage differentiation potential. **Journal of genetics and genomics = Yi chuan xue bao**, v. 40, n. 9, p. 453–64, set. 2013.
- DE PAEPE, C. et al. Totipotency and lineage segregation in the human embryo. **Molecular human reproduction**, v. 20, n. 7, p. 599–618, jul. 2014.
- DE SOUZA, A. F. et al. Dynamics of male canine germ cell development. **PLoS ONE**, v. 13, n. 2, 2018.
- DOLEZALOVA, D. et al. Pig models of neurodegenerative disorders: Utilization in cell replacement-based preclinical safety and efficacy studies. **Journal of Comparative Neurology**, v. 522, n. 12, p. 2784–2801, 2014.
- DU, X. et al. Barriers for Deriving Transgene-Free Pig iPS Cells with Episomal Vectors. **STEM CELLS**, v. 33, n. 11, p. 3228–3238, nov. 2015.
- ESTEBAN, M. A. et al. Generation of induced pluripotent stem cell lines from Tibetan miniature pig. **The Journal of biological chemistry**, v. 284, n. 26, p. 17634–40, jun. 2009.
- EZASHI, T. et al. Generation of Colonies of Induced Trophoblast Cells During Standard

Reprogramming of Porcine Fibroblasts to Induced Pluripotent Stem Cells 1. v. 787, n. July, p. 779–787, 2011.

GAO, P. et al. Urine-derived Stem Cells, A New Source of Seed Cells for Tissue Engineering. **Current Stem Cell Research & Therapy**, v. 11, n. 7, p. 547–553, 2015.

GROENEN, M. A. M. et al. Europe PMC Funders Group Europe PMC Funders Author Manuscripts Europe PMC Funders Author Manuscripts Analyses of pig genomes provide insight into porcine demography and evolution. v. 491, n. 7424, p. 393–398, 2012.

GUAN, J. et al. Reprogramming of human Peripheral Blood Mononuclear Cell (PBMC) from a Chinese patient suffering Duchenne muscular dystrophy to iPSC line (SDQLCHI007-A) carrying deletion of 49–50 exons in the DMD gene. **Stem Cell Research**, v. 42, n. November 2019, 2020.

GUNASEKAR, P. et al. Vitamin D and macrophage polarization in epicardial adipose tissue of atherosclerotic swine. **PLoS ONE**, v. 13, n. 10, p. 1–14, 2018.

GUO, Y. et al. Generation of an iPSC cell line via a non-integrative method using urine-derived cells from a patient with USH2A-associated retinitis pigmentosa. **Stem Cell Research**, v. 29, p. 139–142, 2018. Disponível em:

<<https://doi.org/10.1016/j.scr.2018.03.022>>.

HALL, S.; AGRAWAL, D. K. Delivery of viral vectors for gene therapy in intimal hyperplasia and restenosis in atherosclerotic swine. **Drug Delivery and Translational Research**, v. 8, n. 4, p. 918–927, 2018.

HANNA, J.; SAHA, K.; JAENISCH, R. Somatic cell reprogramming and transitions between pluripotent states: facts, hypotheses, unresolved issues. **Cell**, v. 143, n. 4, p. 508–525, 2010. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3032267/>>.

JI, G. et al. Telomere Reprogramming and Maintenance in Porcine iPSC Cells. **PLoS ONE**, v. 8, n. 9, 2013.

JI, X. et al. Urine-derived stem cells: The present and the future. **Stem Cells International**, v. 2017, 2017.

JIANG, Y. F. et al. In vitro and in vivo differentiation of induced pluripotent stem cells generated from urine-derived cells into cardiomyocytes. **Biology Open**, v. 7, n. 1, p. 1–7, 2018.

JUNQUEIRA REIS, L. C. et al. Induced Pluripotent Stem Cell for the Study and Treatment of Sickle Cell Anemia. **Stem Cells International**, v. 2017, 2017.

KIM, E. et al. Neural induction of porcine-induced pluripotent stem cells and further differentiation using glioblastoma-cultured medium. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 23, n. 3, p. 2052–2063, 2019.

- KOH, S.; PIEDRAHITA, J. A. From “ES-like” cells to induced pluripotent stem cells: A historical perspective in domestic animals. **Bone**, v. 23, n. 1, p. 1–7, 2014.
- LEE, H. K. et al. Induced pluripotent stem cells (iPSCs) derived from frontotemporal dementia patient’s peripheral blood mononuclear cells. **Stem Cell Research**, v. 15, n. 2, p. 325–327, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.scr.2015.07.004>>.
- LI, D. et al. Generation of transgene-free porcine intermediate type induced pluripotent stem cells. **Cell Cycle**, v. 17, n. 23, p. 2547–2563, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/15384101.2018.1548790>>.
- LIU, K. et al. DNA repair and replication links to pluripotency and differentiation capacity of pig iPS cells. **PLoS ONE**, v. 12, n. 3, p. 1–22, 2017.
- LORSON, M. A. et al. Disruption of the Survival Motor Neuron (SMN) gene in pigs using ssDNA. **Transgenic Research**, v. 20, n. 6, p. 1293–1304, 2011.
- MACHADO, L. S. et al. 217 Induction and differentiation of porcine induced pluripotent stem cells into neuronal precursor cell-like cells. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 32, n. 2, p. 236–237, 2020a. Disponível em: <<https://doi.org/10.1071/RDv32n2Ab217>>.
- MACHADO, L. S. et al. Generation of neural progenitor cells (NPC) from porcine induced pluripotent stem cells (piPSC). **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, v. n/a, n. n/a, 13 out. 2020b. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/term.3143>>.
- MASSA, M. G. et al. Multiple sclerosis patient-specific primary neurons differentiated from urinary renal epithelial cells via induced pluripotent stem cells. **PLoS ONE**, v. 11, n. 5, p. 1–14, 2016.
- MICHAEL ROBERTS, R. et al. Livestock models for exploiting the promise of pluripotent stem cells. **ILAR Journal**, v. 56, n. 1, p. 74–82, 2015.
- MONTERRAT, N. et al. Generation of pig iPS cells: A model for cell therapy. **Journal of Cardiovascular Translational Research**, v. 4, n. 2, p. 121–130, 2011.
- MORATH, I.; HARTMANN, T. N.; ORIAN-ROUSSEAU, V. CD44: More than a mere stem cell marker. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 81, p. 166–173, dez. 2016.
- NICHOLS, J.; SMITH, A. Naive and Primed Pluripotent States. **Cell Stem Cell**, v. 4, n. 6, p. 487–492, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.stem.2009.05.015>>.
- OHMINE, S. et al. Induced pluripotent stem cells from GMP-grade hematopoietic progenitor cells and mononuclear myeloid cells. **Stem Cell Research and Therapy**, v. 2, n. 6, p. 46, 2011. Disponível em: <<http://stemcellres.com/content/2/6/46>>.
- PERLEBERG, C.; KIND, A.; SCHNIEKE, A. Genetically engineered pigs as models for human disease. **DMM Disease Models and Mechanisms**, v. 11, n. 1, 2018.

PESSÔA, L. V. de F. et al. Generation and miRNA Characterization of Equine Induced Pluripotent Stem Cells Derived from Fetal and Adult Multipotent Tissues. **Stem Cells International**, v. 2019, p. 1–15, 2019.

PESSOA, L. V. de F. et al. Induced Pluripotent Stem Cells from Animal Models : Applications on Translational. n. November, 2020.

PESSÔA, L. V. de F.; BRESSAN, F. F.; FREUDE, K. K. Induced pluripotent stem cells throughout the animal kingdom: Availability and applications. **World Journal of Stem Cells**, v. 11, n. 8, p. 491–505, 26 ago. 2019. Disponível em: <<https://www.wjgnet.com/1948-0210/full/v11/i8/491.htm>>.

PICK, M. et al. Clone- and gene-specific aberrations of parental imprinting in human induced pluripotent stem cells. **Stem Cells**, v. 27, n. 11, p. 2686–2690, 2009.

PIERI, N. et al. 219 *In vitro* culture environment influences the ability to generate porcine primordial germ cell-like from induced pluripotent stem cells. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 32, n. 2, p. 237–238, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1071/RDv32n2Ab219>>.

PIPINO, C. et al. Identification and Characterization of a Stem Cell-Like Population in Bovine Milk: A Potential New Source for Regenerative Medicine in Veterinary. **Stem Cells and Development**, v. 27, n. 22, p. 1587–1597, 2018.

POLO, J. M. et al. Cell type of origin influences the molecular and functional properties of mouse induced pluripotent stem cells. **Nature Biotechnology**, v. 28, n. 8, p. 848–855, 2010.

PONTA, H.; SHERMAN, L.; HERRLICH, P. A. **CD44: From adhesion molecules to signalling regulators** *Nature Reviews Molecular Cell Biology* Nat Rev Mol Cell Biol, , jan. 2003. .

QI, Z. et al. Generation of urine-derived induced pluripotent stem cells from a patient with phenylketonuria. **Intractable and Rare Diseases Research**, v. 7, n. 2, p. 87–93, 2018.

ROBERTS, R. M.; TELUGU, B. P. V. L.; EZASHI, T. Induced pluripotent stem cells from swine (*Sus scrofa*): Why they may prove to be important. **Cell Cycle**, v. 8, n. 19, p. 3078–3081, 2009.

ROSS, S. B. et al. Peripheral blood derived induced pluripotent stem cells (iPSCs) from a female with familial hypertrophic cardiomyopathy. **Stem Cell Research**, v. 20, p. 76–79, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.scr.2017.02.016>>.

SILVA, J. et al. Promotion of reprogramming to ground state pluripotency by signal inhibition. **PLoS Biology**, v. 6, n. 10, p. 2237–2247, 2008.

SOMMER, C. A. et al. Induced pluripotent stem cell generation using a single lentiviral stem cell cassette. **Stem cells (Dayton, Ohio)**, v. 27, n. 3, p. 543–549, mar. 2009.

- SRIDHARAN, R. et al. Role of the Murine Reprogramming Factors in the Induction of Pluripotency. **Cell**, v. 136, n. 2, p. 364–377, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.001>>.
- STEICHEN, C. et al. Human Induced Pluripotent Stem (hiPS) Cells from Urine Samples: A Non-Integrative and Feeder-Free Reprogramming Strategy. **Current Protocols in Human Genetics**, v. 2017, n. January, p. 21.7.1-21.7.22, 2017.
- TAKAHASHI, K. et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. **Cell**, v. 131, n. 5, p. 861–72, nov. 2007.
- 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. 663–76, ago. 2006.
- THOMAS, D. J. et al. Lactobacillus rhamnosus HN001 attenuates allergy development in a pig model. **PLoS ONE**, v. 6, n. 2, 2011.
- TORRES-ROVIRA, L. et al. Diet-induced swine model with obesity/leptin resistance for the study of metabolic syndrome and type 2 diabetes. **The Scientific World Journal**, v. 2012, 2012.
- TROUNSON, A. Rats, Cats, and Elephants, but Still No Unicorn: Induced Pluripotent Stem Cells from New Species. **Cell Stem Cell**, v. 4, n. 1, p. 3–4, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.stem.2008.12.002>>.
- TURNER, D. J. et al. Decreased airway narrowing and smooth muscle contraction in hyperresponsive pigs. **Journal of Applied Physiology**, v. 93, n. 4, p. 1296–1300, 2002.
- VAN DEN HEUVEL, M. et al. The effect of bioresorbable vascular scaffold implantation on distal coronary endothelial function in dyslipidemic swine with and without diabetes. **International Journal of Cardiology**, v. 252, p. 44–51, 2018.
- WANG, H. et al. Induction of Germ Cell-like Cells from Porcine Induced Pluripotent Stem Cells. **Scientific Reports**, v. 6, n. February, p. 1–13, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/srep27256>>.
- WEN, W. et al. High-Level Precise Knockin of iPSCs by Simultaneous Reprogramming and Genome Editing of Human Peripheral Blood Mononuclear Cells. **Stem Cell Reports**, v. 10, n. 6, p. 1821–1834, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2018.04.013>>.
- WEST, F. D. et al. Porcine induced pluripotent stem cells produce chimeric offspring. **Stem Cells and Development**, v. 19, n. 8, p. 1211–1220, 2010.
- WU, C. et al. Comparison of the proliferation and differentiation potential of human urine-, placenta decidua basalis-, and bone marrow-derived stem cells. **Stem Cells International**, v. 2018, 2018.

- WU, Z. et al. Generation of pig induced pluripotent stem cells with a drug-inducible system. **Journal of molecular cell biology**, v. 1, n. 1, p. 46–54, out. 2009.
- XU, H. et al. **The role of CD44 in epithelial–mesenchymal transition and cancer development****OncoTargets and Therapy**Dove Medical Press Ltd., , dez. 2015. .
- XU, J. et al. Generation of pig induced pluripotent stem cells using an extended pluripotent stem cell culture system. **Stem Cell Research and Therapy**, v. 10, n. 1, p. 1–16, 2019.
- YAN, X. et al. Establishment of CSUASOi001-A, a non-integrated induced pluripotent stem cell line from urine-derived cells of a Chinese patient carrying RS1 gene mutation. **Stem Cell Research**, v. 38, n. April, p. 101466, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.scr.2019.101466>>.
- YANG, H. et al. Characterization of rabbit urine-derived stem cells for potential application in lower urinary tract tissue regeneration. **Cell and Tissue Research**, v. 374, n. 2, p. 303–315, 2018.
- YU, J. et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. **Science**, v. 318, n. 5858, p. 1917–1920, 2007.
- YU, J. et al. Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences. **Science (New York, N.Y.)**, v. 324, n. 5928, p. 797–801, maio 2009.
- YUAN, X. et al. Embryonic stem cell transplantation for the treatment of myocardial infarction: immune privilege or rejection. **Transplant immunology**, v. 18, n. 2, p. 88–93, nov. 2007.
- ZHANG, J. et al. Generation of a human induced pluripotent stem cell line from urinary cells of a patient with primary congenital glaucoma using integration free Sendai technology. **Stem Cell Research**, v. 29, n. 1, p. 162–165, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.scr.2018.04.004>>.
- ZHOU, M. et al. Inducing differentiation of human urine - derived stem cells into hepatocyte - like cells by coculturing with human hepatocyte L02 cells. n. November 2018, p. 1–8, 2019.
- ZHOU, T. et al. Generation of induced pluripotent stem cells from urine. **Journal of the American Society of Nephrology : JASN**, v. 22, n. 7, p. 1221–8, jul. 2011.
- ZHOU, Y. ye; ZENG, F. Integration-free Methods for Generating Induced Pluripotent Stem Cells. **Genomics, Proteomics and Bioinformatics**, v. 11, n. 5, p. 284–287, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.gpb.2013.09.008>>.
- ZIBLY, Z. et al. A novel swine model of subarachnoid hemorrhage-induced cerebral vasospasm. **Neurology India**, v. 65, n. 5, p. 1035–1042, 1 set. 2017. Disponível em: <<http://www.neurologyindia.com/article.asp?issn=0028-3886>>.