

Maria Susana Joya Marodin

---

Avaliação do potencial oncogênico e  
imunomodulador de células estromais  
mesenquimais com trissomia 5

Evaluation of oncogenic and  
immunomodulatory potential of mesenchymal  
stem cells with trisomy 5

São Paulo

2022

Maria Susana Joya Marodin

Avaliação do potencial oncogênico e  
imunomodulador de células estromais  
mesenquimais com trissomia 5

Evaluation of oncogenic and  
immunomodulatory potential of mesenchymal  
stem cells with trisomy 5

Dissertação apresentada ao  
Instituto de Biociências da  
Universidade de São Paulo, para a  
obtenção de Título de Mestre em  
Ciências, na Área de  
Biologia/Genética.

Orientador(a): Oswaldo Keith  
Okamoto

São Paulo

2022

Joya Marodin, Maria Susana  
Avaliação do potencial oncogênico e  
imunomodulador de células estromais mesenquimais  
com trissomia 5 / Maria Susana Joya Marodin ;  
orientador Oswaldo Keith Okamoto -- São Paulo, 2022.  
86 p.

Dissertação (Mestrado) -- Instituto de  
Biociências da Universidade de São Paulo. Programa  
de Pós-Graduação em Genética e Biologia Evolutiva.

1. Aneuploidia. 2. Célula estromal mesenquimal.  
3. Terapia celular. 4. Trissomia 5. 5.  
Tumorigênese. I. Keith Okamoto, Oswaldo, orient.  
II. Título.

## Comissão Julgadora:

---

Prof(a). Dr(a).

---

Prof(a). Dr(a).

---

Prof(a). Dr(a). Orientador(a)

## Dedicatória

---

Dedico este trabalho aos meus familiares que  
são meu alicerce e principalmente ao meu marido  
que me apoiou e motivou nos momentos mais  
difíceis.

## Agradecimentos

---

Muitas pessoas contribuíram com o desenvolvimento desse projeto de pesquisa e sobretudo, com meu crescimento profissional.

Agradeço primeiramente ao professor Oswaldo Keith por me acolher em seu grupo de pesquisa. Agradeço também pelos seus ensinamentos e discussões sobre o andamento da pesquisa.

À Patrícia, que nos dá bronca quando necessário, mas sempre está disposta a compartilhar seu conhecimento e experiência.

Agradeço a todos os colegas de laboratório que me acolheram e me ensinavam diariamente. À Alice que esteve comigo em dias difíceis e me dava o melhor conselho possível: ir dormir. À Gabi que sempre foi solícita e aberta para conversar e ajudar com o que fosse necessário. À Elisa, que em pouco tempo de convivência me ensinou muitas coisas e se tornou uma pessoa muito querida. Ao Thiago, o futuro professor da USP, por me ensinar a fazer rt-PCR e pelas longas discussões dos resultados. E à Ianaê e Letícia pela amizade, companheirismo, discussões científicas e risos de nervoso por não entender algo. Vocês tornaram essa jornada mais leve.

À Heloisa e Kaid que me deram todo o apoio necessário no biotério.

À Claudia que dispendeu vários dias me ensinando a fazer cariótipo e que com muita paciência me mostrava que eu havia confundido vários cromossomos. À Prof<sup>a</sup> Célia que cedeu seu laboratório para os ensaios.

À Prof<sup>a</sup> Ana Krepischi e Silvia, pela realização do CGH-array. Ao grupo da Prof<sup>a</sup> Mariz que sempre me ajudou emprestando e ensinando a usar equipamentos.

Às agências de fomento CAPES e FAPESP, pelo apoio financeiro que tornou possível a minha qualificação profissional e a realização desse projeto.

## Índice

---

|      |                                                         |    |
|------|---------------------------------------------------------|----|
| I.   | Introdução .....                                        | 8  |
| 1.   | Células Estromais Mesenquimais em terapia celular. .... | 8  |
| 2.   | Expansão celular.....                                   | 10 |
| 3.   | Condições <i>in vitro</i> .....                         | 11 |
| 4.   | Controle de qualidade de MSC.....                       | 13 |
| 5.   | Alterações genéticas <i>in vitro</i> .....              | 16 |
| 5.1  | Mutações gênicas .....                                  | 16 |
| 5.2. | Mutações genômicas e cromossômicas.....                 | 18 |
| 6.   | Efeitos das alterações cromossômicas.....               | 20 |
| 7.   | Transformação celular e aneuploidia.....                | 23 |
| 8.   | Transformação espontânea de MSC .....                   | 25 |
| 9.   | Trissomia 5 .....                                       | 28 |
| II.  | Objetivos .....                                         | 31 |
| III. | Materiais e Métodos.....                                | 32 |
| 1.   | Linhagens celulares .....                               | 32 |
| 2.   | Condições de cultivo .....                              | 33 |
| 3.   | Caracterização de MSC .....                             | 33 |
| 4.   | Análise citogenética.....                               | 34 |
| 4.1  | Cariótipo.....                                          | 34 |
| 4.2  | CGH-array .....                                         | 35 |
| 5.   | Crescimento populacional .....                          | 36 |
| 6.   | Proliferação celular.....                               | 37 |
| 7.   | Senescência celular.....                                | 37 |
| 8.   | Tumorigênese <i>in vivo</i> .....                       | 38 |
| 9.   | Análise de potência imunomoduladora .....               | 39 |
| 10.  | Análise estatística .....                               | 40 |
| IV.  | Resultados .....                                        | 42 |
| 1.   | Caracterização de MSC .....                             | 42 |
| 2.   | Análise citogenética.....                               | 44 |
| 3.   | Crescimento Populacional .....                          | 49 |
| 4.   | Proliferação celular.....                               | 50 |
| 5.   | Senescência.....                                        | 51 |
| 6.   | Tumorigênese <i>in vivo</i> .....                       | 53 |
| 7.   | Potência imunomoduladora.....                           | 55 |
| 7.1  | Deteção de HLA-DR por citometria de fluxo .....         | 55 |
| 7.2  | Expressão gênica.....                                   | 56 |
| V.   | Discussão.....                                          | 59 |

|                                      |    |
|--------------------------------------|----|
| VI. Conclusões .....                 | 68 |
| VII. Resumo.....                     | 69 |
| VIII. Abstract.....                  | 70 |
| IX. Referências Bibliográficas ..... | 71 |
| X. Anexos.....                       | 81 |
| XI. Biografia.....                   | 85 |

## I. Introdução

---

### 1. Células Estromais Mesenquimais em terapia celular.

Células Estromais Mesenquimais (MSC, do inglês *Mesenchymal Stromal Cells*) são células adultas multipotentes com capacidade de diferenciação em células especializadas de linhagem mesodérmica, como osteoblastos, condrócitos e adipócitos (CAPLAN, 1991). Podem ser isoladas de diversos tecidos vascularizados, tais como: medula óssea, tecido adiposo e cordão umbilical (UDER, *et al.*, 2018). Desempenham intensa atividade parácrina, pela liberação de fatores de crescimento, citocinas e microRNAs que podem desempenhar um papel imunomodulador e regenerativo (PITTENGER, *et al.*, 2019). MSC também podem ser utilizadas de maneira autóloga e alogênica, pois possuem baixa expressão de Antígeno Leucocitário Humano (HLA-I), apresentando assim baixa imunogenicidade (WANG, *et al.*, 2019). Essas características fazem das MSC um recurso promissor para terapia celular.

Arnold Caplan, em 1991, nomeou esse tipo celular de “Células-tronco mesenquimais” devido ao seu potencial de diferenciação *in vitro*. Tempos depois, o título de célula-tronco começou a ser questionado, afinal foi constatado que seu potencial de autorrenovação, inerente às células-tronco, não estava presente em todas as células da população de MSC (HORWITZ, *et al.*, 2005). Ademais, sua principal funcionalidade *in vivo*, não é a multipotência, mas sim sua atividade parácrina (CAPLAN, 2017). MSC de fato atuam na regeneração de tecidos, possuem propriedades terapêuticas, mas o termo “célula-tronco” estava criando falsas expectativas e algumas confusões sobre seu mecanismo de ação. Por esse motivo, a Sociedade Internacional de Terapia Celular (ISCT), em 2005, sugeriu a permanência do acrônimo MSC, mas a troca do nome em inglês

“*Mesenchymal Stem Cell*” por “*Mesenchymal Stromal Cell*”, um nome que remete à sua origem e localização (HORWITZ, *et al.*, 2005). Arnold Caplan (2017), também sugeriu a alteração do nome para Células sinalizadoras medicinais (do inglês, *Medicinal Signaling Cell*), mantendo o acrônimo MSC. O novo nome proposto por Caplan leva em consideração as novas descobertas a respeito dos mecanismos de ação de MSC *in vivo*, que envolve uma atividade secretora em locais lesionados.

Atualmente, estudos clínicos com MSC exploram seu potencial imunomodulador, estimulador de angiogênese e reparador de tecidos. Dentre as doenças estudadas estão Doença do enxerto vs. Hospedeiro (SÁNCHEZ-GUIJO, *et al.*, 2014); infarto do miocárdio (LEE, *et al.*, 2014); insuficiência hepática (SHI, *et al.*, 2012), isquemias de membros inferiores (BURA, *et al.*, 2014), regeneração de lesões articulares (HERNIGOU, *et al.*, 2021) e recentemente, a COVID-19 (WEI, *et al.*, 2021).

A variedade na possibilidade de terapias com MSC se deve aos seus mecanismos de ação, que são diversos. Além do potencial de diferenciação, possuem habilidade de “*Homing*”, ou seja, são capazes de migrar para tecidos lesionados em resposta a moléculas de sinalização. Sua atividade parácrina libera fatores de crescimento, que estimulam a proliferação das células progenitoras presentes no tecido lesionado e VEGF, que promove angiogênese. Em resposta a sinais inflamatórios, MSC liberam citocinas como prostaglandina E2, interleucina10 (IL-10), fator de crescimento transformador- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), antígeno leucocitário humano G (HLA-G) e indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO) que inibem proliferação de células T efetoras, inibem células natural killer (NK) e aumentam a proporção de Células T regulatórias. A ação desses fatores têm o potencial de diminuir a resposta inflamatória e auxiliar na reparação de tecidos lesionados (SQUILLARO, *et al.*, 2016; WANG, *et al.*, 2014).

Apesar de muitos estudos já terem comprovado o potencial terapêutico de MSC, alguns resultados ainda são controversos, principalmente devido à heterogeneidade de MSC e a variedade de abordagens utilizadas nos estudos (LUKOMSKA, *et al.*, 2019). Mas avanços em terapia celular com MSC têm sido alcançados. Atualmente já existem medicamentos à base de MSC aprovados para terapia celular e sendo comercializados, além de muitos outros em fase III de estudo clínico (ROBB, *et al.*, 2019).

Com o objetivo de minimizar as divergências entre os resultados dos estudos com MSC de diferentes grupos de pesquisa, a ISCT em 2006, estabeleceu critérios mínimos para a caracterização de MSC. São eles: adesão ao plástico em condições de cultivo; capacidade de diferenciação em osteoblastos, adipócitos e condrócitos sob condições de diferenciação *in vitro*; expressão positiva dos marcadores de superfície CD105, CD90 e CD73 e negativa para CD45, CD34, CD14 ou CD11b, CD79a ou CD19 e HLA-DR (DOMINICI, *et al.*, 2006). Desde então, a ISCT publica regularmente orientações de boas práticas e padronização que visam o controle de qualidade no estudo e uso clínico de MSC.

## **2. Expansão celular**

É possível isolar MSC de diversos tecidos vascularizados, entretanto, elas constituem uma proporção muito baixa da massa dos seus tecidos de origem, apenas 0,01% da medula óssea, por exemplo (PITTENGER, *et al.*, 1999). Protocolos de terapia celular utilizam, em média, entre 1 a  $2 \cdot 10^6$  células por quilo do paciente, considerando um paciente de 60 kg, seriam necessárias  $1,2 \cdot 10^8$  MSC (GALIPEAU & SENSÉBÉ, 2018). Não é possível isolar diretamente essa quantidade de MSC de um paciente. Portanto, a solução para esse problema é a expansão celular *in vitro*.

Entretanto, a expansão *in vitro* pode estar associada ao surgimento de alguns problemas, afinal se trata de um ambiente artificial com condições diferentes das encontradas no microambiente *in vivo*. Além do risco de contaminações devido à manipulação, a expansão celular pode resultar em anormalidades genéticas e/ou funcionais nas células expandidas.

### 3. Condições *in vitro*

As condições *in vitro* se diferem das condições *in vivo* em muitos aspectos. Dentre eles, a alta concentração de gás oxigênio, ausência de contato célula-célula com outros tipos celulares, ausência de fatores parácrinos inerentes ao seu microambiente, ausência de matriz extracelular e maior taxa replicativa (HAQUE, *et al.*, 2013; PITTENGER, *et al.*, 2019).

A concentração de O<sub>2</sub> no microambiente em que MSC residem *in vivo* varia entre 2 a 9%, mas quando cultivadas ficam expostas a uma concentração de 20 % de O<sub>2</sub> (HAQUE, *et al.*, 2013). A abundância de O<sub>2</sub> contribui com o acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ROS), ultrapassando a capacidade de defesa antioxidante celular, causando um estresse oxidativo celular (BUSUTTIL, *et al.*, 2003). O estresse oxidativo contribui com o acúmulo de danos ao DNA (KUIJK, *et al.*, 2020), pois ROS causam alterações estruturais e fisiológicas em moléculas e por isso são capazes de causar defeitos nos sistemas de síntese e reparo de DNA (NASTASI, *et al.*, 2020).

MSC cultivadas sob concentração fisiológica de O<sub>2</sub> (3%) apresentam mais dobras populacionais e menos alterações cromossômicas que MSC cultivadas sob condições atmosféricas (20%). Quando MSC são cultivadas com 3% de O<sub>2</sub>, mas tratadas com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, um indutor de ROS, apresentam significativamente menos dobras populacionais e maior taxa de aneuploidias. O impacto similar que a alta concentração de O<sub>2</sub> (20%) e o tratamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> causam na proliferação e estabilidade genética de

MSC, demonstram a correlação entre a alta concentração de O<sub>2</sub> e o acúmulo de ROS, assim como seu impacto na instabilidade genética de MSC (ESTRADA, *et al.*, 2012).

Outro fator que pode contribuir com o estresse oxidativo *in vitro* são as múltiplas divisões celulares que MSC sofrem quando expandidas. A intensa atividade replicativa contribui com o encurtamento de telômeros, pois MSC não possuem atividade suficiente de telomerase. O encurtamento dos telômeros está associado a um maior estresse oxidativo e à desregulação de genes responsáveis pelo controle da estabilidade cromossômica, o que resulta no aumento de aneuploidias ao longo das passagens celulares (ESTRADA, *et al.*, 2013). O encurtamento de telômeros também pode ser responsável pela ocorrência de translocações cromossômicas (BAIRD & HENDRICKSON, 2018)

Em síntese, a expansão celular acelera o envelhecimento celular, pois resulta em encurtamento de telômeros devido à alta taxa replicativa (BONAB, *et al.*, 2006); aumento de ROS devido à alta concentração de O<sub>2</sub> e disfunções mitocondriais; aumento do número de mutações devido à problemas nos mecanismos de reparo de DNA e redução da eficiência da polimerase (NERI, 2019).

Uma característica inerente à expansão celular é a ausência de células do sistema imunológico. Células senescentes com oncogenes ativos e células com instabilidade cromossômica são eliminadas pelo sistema inato e adaptativo porque liberam fatores inflamatórios como IFN $\gamma$ , que desencadeia uma resposta inflamatória (NASTASI, *et al.*, 2020). Sendo assim, o sistema imunológico ajuda a impedir a permanência de células com mutações potencialmente oncogênicas *in vivo*, processo que não ocorre *in vitro*, devido à ausência de interação com células do sistema imunológico.

As condições acima listadas contribuem simultaneamente com o aumento da probabilidade do surgimento e acúmulo de mutações em células expandidas *in vitro*. Alterações genéticas podem causar mudanças na fisiologia celular, que podem ter impacto nas propriedades terapêuticas de MSC, e na pior das hipóteses, resultar em uma transformação celular maligna (CHUNDURI & STORCHOVÁ 2019). Por esse motivo, é recomendado que produtos de MSC sejam utilizados em terapia celular na menor passagem possível, pois assim as chances aumento da instabilidade genética e alterações funcionais são minimizadas (BINATO, *et al.*, 2013). Para tanto, é necessário o estabelecimento de um controle de qualidade que inclua análises genéticas que assegurem a estabilidade genética de MSC antes da aplicação em paciente.

#### **4. Controle de qualidade de MSC**

Agências reguladoras caracterizam MSC como um Produto de Terapia Avançada a base de células. Devido à sua necessidade de expansão celular antes da aplicação clínica, são consideradas um produto de manipulação extensa. Todo tipo de cultivo celular é considerado manipulação extensa, e que requer a realização de testes de qualidade antes da liberação para uso clínico (BRASIL, 2018). Esses testes são importantes, uma vez que as técnicas de cultivo celular para expansão *ex vivo* podem trazer complicações, como a contaminação por microorganismos perigosos à saúde humana, bem como suscetibilidade ao surgimento de anormalidades genéticas e/ou funcionais nas células expandidas.

No mundo há algumas agências que regulamentam o uso de produtos de terapias avançadas, no Brasil, a ANVISA faz a regulamentação por meio da RDC 214, de 7 de fevereiro de 2018, que dá orientações aos Centros de Processamento Celular. O Canadá e EUA são

regulamentados pela Seção nº351 do Ato de Serviço de Saúde Pública dos EUA e precisam da aprovação da Food and Drugs Administration (FDA), para comercialização; e a União Européia é regulamentada pela diretiva UE nº1.394/2007 e o Comité para Terapias Avançadas (CAT – Committee for Advanced Therapies) que realiza as autorizações para comercialização. São várias as regulamentações, mas de maneira geral, todas as agências afirmam que os produtos de terapias avançadas devem ter qualidade, segurança e eficácia garantidas (CARIAS, *et al.*, 2018).

No Brasil, a RDC-Anvisa 214/2018 estabelece que MSC só podem ser liberadas para uso terapêutico em pesquisa clínica após realização e atendimento aos critérios mínimos dos seguintes testes:

- a) contagem do total de células relevantes;
- b) teste de identidade ou fenotipagem apropriado para o produto e quantificação das populações celulares presentes;
- c) viabilidade celular;
- d) teste de pureza: inclui, quando couber, a verificação de substâncias ou células que possam ser prejudiciais ao Receptor e, no caso de Manipulação Extensa, obrigatoriamente a verificação da presença de endotoxinas;
- e) testes microbiológicos: deve-se seguir o disposto no art. 49 desta Resolução e, quando aplicável, realizar a repetição dos respectivos testes no Produto Final, e, em caso de Manipulação Extensa, incluir também o teste para detecção de contaminação por micoplasma;
- f) detecção de ácido nucleico dos vírus CMV, HIV-1 e HIV-2, HTLV-I e HTLV-II, EBV, HBV, HCV e B19, e, caso aplicável, de outros agentes virais de relevância clínica em humanos, somente em caso de Manipulação Extensa para uso alogênico;
- g) citogenética, somente em caso de Manipulação Extensa; e
- h) teste de potência, quando couber: a atividade biológica relevante das células, caso conhecida, ou dos produtos sintetizados pela célula deverá ser definida e quantificada. (BRASIL, 2018, p.21)

A qualidade do produto é assegurada nas alíneas “a”, “b” e “c”, pois verificam se o tipo celular é o de interesse, assim como sua viabilidade e quantidade de células. A segurança é garantida nas alíneas “d”, “e” e “f”

pela checagem da presença de substâncias e células que podem ser prejudiciais ao receptor, assim como testes microbiológicos e detecção de alguns vírus. E a potência é assegurada na alínea “h”, pela realização de testes que detectem e quantifiquem a atividade biológica envolvida no mecanismo de ação da terapia em questão, quando conhecido. A análise citogenética, citada na alínea “g”, está relacionada à segurança e eficácia do produto, uma vez que anormalidades cromossômicas alteram a fisiologia celular, o que pode conferir à célula um potencial oncogênico ou resultar no fim de seu potencial terapêutico (CHUNDURI & STORCHOVÁ, 2019).

Além das validações que garantem a segurança de MSC, validar a permanência de sua eficácia terapêutica também é de extrema importância. A presença de moléculas relacionadas ao mecanismo de ação esperado para o tratamento em questão pode ser testada antes da infusão. Um exemplo é a checagem da manutenção das propriedades imunomodulatórias de MSC após expansão. A ISCT sugere o tratamento de MSC com citocinas ou co-cultivo com leucócitos, seguida de análise de marcadores de superfície, transcritos e/ou secretoma, a fim de avaliar mudanças relacionadas à sua resposta imunomoduladora (GALIPEAU et al., 2016; KRAMPERA et al., 2013).

Apesar da obrigatoriedade de realização de diversos testes como controle de qualidade, a RDC-Anvisa 214/2018 não estabelece quais são os limites seguros, deixando a critério dos Centros de Processamento Celular (CPC), o estabelecimento do tipo de ensaio e valores aceitáveis. O estabelecimento de limites seguros requer estudo cauteloso da literatura, pela busca de resultados de estudos clínicos e pré-clínicos.

Há ainda a possibilidade de liberação excepcional do produto, que consiste na liberação de produtos que não atendam a todos os critérios de qualidade e segurança definidos pelo CPC em situações emergenciais. O

que exige uma avaliação minuciosa e crítica de toda a equipe envolvida em relação ao risco-benefício do uso do produto. Por isso, estudos que avaliam a segurança, potência e qualidade de Produtos de Terapia Celular são de extrema importância, pois contribuem com o embasamento científico da equipe médica e do CPC para tomadas de decisão conscientes.

## **5. Alterações genéticas *in vitro*.**

MSC expandidas *in vitro* podem apresentar alterações genéticas por alguns motivos. Podem ser clones de alterações genéticas pré-existentes em mosaico de baixo grau no paciente; podem surgir durante expansão, devido à uma predisposição do paciente (BORGONOV, *et al.*, 2015; TARTE, *et al.*, 2010); ou devido às condições de cultivo (KUIJK *et al.*, 2020).

Quando isoladas, culturas primárias de MSC são geneticamente heterogêneas. Durante a expansão *ex vivo*, clones com mutações que conferem capacidade de adaptação às condições *in vitro* e com maior potencial proliferativo ficam mais frequentes, resultando em uma seleção clonal ao longo das passagens (MCLEOD & MAUCK, 2017). Portanto, clones com alterações genéticas pré-existentes *in vivo* ou que surgiram durante a expansão, podem se tornar mais frequentes na população de células. As mutações podem afetar propriedades fisiológicas e medicinais das MSC ou causar transformação neoplásica. As mutações podem ser classificadas como:

### **5.1 Mutações gênicas**

Mutações gênicas são modificações na sequência de nucleotídeos do DNA. Dentre elas estão os Polimorfismos de Nucleotídeo Único (SNPs), onde um par de base nitrogenada é substituído por outro; e os *Indels*, onde um ou mais nucleotídeos são inseridos, deletados ou duplicados da sequência de DNA (NUSSBAUM, *et al.*, 2008, p.392-394). A maior parte

dessas mutações ocorre em regiões não codificantes do DNA e não resultam em uma alteração funcional para a célula, mas durante expansão celular o número de mutações gênicas aumenta consideravelmente (CAI, *et al.*, 2014; KIM, *et al.*, 2017).

KIM e colaboradores (2017) sequenciaram MSC durante expansão e detectaram um grande aumento no número de SNPs e *Indels* entre as passagens 1 e 9. Na passagem 1 foram detectadas 64 SNPs que evoluíram para 1232 SNPs na passagem 9. Em outra linhagem do mesmo estudo, a variação foi de 41 a 2035 SNPs, no mesmo intervalo de passagens. No estudo em questão, os autores sugerem que o acúmulo de SNPs ao longo das passagens se deve ao estresse replicativo associado à atividade proliferativa.

CAI e colaboradores (2014) também realizaram o sequenciamento genético de MSC expandidas nas passagens 1, 8 e 13. O número de SNPs também aumentou ao longo do tempo de cultivo celular de 219 em P1 para 856 em P13. Ao investigar a linhagem primária de MSC, na passagem 0, verificaram que as SNPs de regiões codificantes já estavam presentes logo após isolamento, mas em concentrações muito baixas, a maior parte menor que 0,1% da população. Indicando que as mutações já estavam presentes no paciente, mas o ambiente *in vitro*, contribuiu com a seleção de seus clones.

Mutações gênicas podem atrapalhar a manutenção da qualidade e segurança de MSC, afinal mutações desse tipo em genes supressores tumorais ou proto-oncogenes podem contribuir com um processo de transformação celular maligna. Essas mutações podem ainda contribuir com o aumento da instabilidade genética caso atinjam genes envolvidos na síntese de DNA, sistemas de reparo de DNA ou relacionados com a separação de cromátides na mitose (STORCHOVA, 2012).

## 5.2. Mutações genômicas e cromossômicas

Mutações genômicas são alterações que afetam o número de cromossomos na célula, como é o caso das aneuploidias que consistem no ganho ou perda de um ou mais cromossomos. Mutações cromossômicas alteram a estrutura dos cromossomos por duplicação ou deleção de parte do cromossomo ou translocações e inversões (NUSSBAUM, *et al.*, 2008, p.392). As duplicações e deleções de parte dos cromossomos podem ser chamadas de *Copy number variation* (CNV), pois por definição CNV é a variação no número de cópias de um segmento de 1 quilobase ou mais (FEUK, *et al.*, 2006). Neste trabalho, vamos adotar os termos alteração cromossômica e alteração citogenética para qualquer mutação genômica e cromossômica.

É importante ressaltar que a maior parte das expansões de MSC são geneticamente estáveis e não apresentam aberrações cromossômicas. Ben-David e colaboradores (2011) realizaram um estudo em que calcularam a taxa de aberrações cromossômicas de 144 linhagens de MSC de diferentes origens, tais como tecido adiposo, cordão umbilical, entre outros. Para tanto, analisaram dados publicados de expressão gênica e concluíram que MSC possuem 4% de chances de apresentar uma alteração cromossômica.

Apesar desta média, a porcentagem de linhagens que apresentam alterações cromossômicas varia muito entre os estudos, desde expansões em que nenhuma linhagem apresenta alteração, quando analisada em passagem 3 (ZHANG, *et al.*, 2007), até publicações em que 25% das expansões apresentam alterações cromossômicas na passagem 1 (TARTE, *et al.*, 2010). Há situações em que alterações cromossômicas são detectadas apenas em passagens mais tardias, como passagem 6 (BINATO, *et al.*, 2013), mas também podem estar presentes nas passagens 1 e 2 (CAPELLI, *et al.*, 2014; TARTE, *et al.*, 2010).

Conforme discutido anteriormente, as condições de cultivo podem interferir na probabilidade de aquisição de alterações cromossômicas. MSC expandidas sob uma atmosfera de 3% de O<sub>2</sub> apresentam menos alterações cromossômicas que as cultivadas em atmosfera com 21% de O<sub>2</sub> (ESTRADA, *et al.*, 2012). Mas outros fatores podem influenciar, como o tempo de expansão (BINATO, *et al.*, 2013; ESTRADA, *et al.*, 2013) e as características do próprio doador (BORGONOVO, *et al.*, 2015; TARTE, *et al.*, 2010) .

Há pacientes que apresentam maiores taxas de alterações em suas expansões. Como ocorreu no estudo de Tarte e colaboradores (2010), que expandiu células de 13 pacientes e detectou a trissomia 5 em 3 expansões do mesmo paciente. Essas aneuploidias poderiam já estar presentes *in vivo* no paciente ou podem ter surgido *in vitro*, indicando que o paciente pode ter uma predisposição maior à erros mitóticos, aumentando assim a ocorrência de alterações cromossômicas em suas células. O estudo de Borgonovo e colaboradores (2015) apresenta outro caso de paciente que apresentou altas taxas de alterações citogenéticas numéricas e estruturais em todas as suas expansões, quando analisadas na passagem 2. Ambos os casos indicam que o surgimento de alterações cromossômicas pode ser dependente do doador.

A taxa de alterações citogenéticas tende a aumentar ao longo do tempo de expansão celular (BINATO, *et al.*, 2013), mas esse aumento não ocorre de forma linear e crescente. O número de células com alterações cromossômicas sofre oscilações entre as passagens (NIKITINA, *et al.*, 2018; STULTZ, *et al.*, 2016).

As oscilações no número de células aberrantes ocorrem porque tais alterações são muito deletérias para as células, podendo resultar em morte celular ou proliferação mais lenta. Mas alterações cromossômicas que não afetam negativamente a proliferação celular, podem resultar na formação

de clones que se mantêm por várias passagens no cultivo celular (BINATO et al., 2013; CAPELLI et al., 2014; STULTZ, 2016; NIKITINA et al., 2018). As MSC aberrantes capazes de gerar clones podem continuar adquirindo mais mutações que podem contribuir com sua seleção positiva e transformação maligna. Algumas aneuploidias são comuns em determinados tipos de tumores, indicando que podem contribuir com o processo de transformação neoplásica.

Nikitina e colaboradores (2018), detectaram em suas culturas de MSC, uma variedade de aberrações cromossômicas, com destaque à tetrassomia do cromossomo 8, que na passagem 12 estava presente em 12% da população. O oncogene c-MYC está localizado no braço longo do cromossomo 8, sua superexpressão aumenta o potencial proliferativo celular, o que pode explicar a alta taxa de clones com esse tipo de alteração. A monossomia do 13 é comum expansões de MSC. O gene RB1, um supressor tumoral está localizado no cromossomo 13. A ausência de uma de suas cópias causa a diminuição de sua expressão, o que parece impactar a supressão tumoral em células de origem mesenquimal, pois essa é uma aberração cromossômica comum em lipomas. A trissomia 12 por sua vez é recorrente em células tronco pluripotentes induzidas, uma aberração cromossômica comum em teratomas (BEN-DAVID, *et al.*, 2011).

Aneuploidias como as listadas acima, que aumentam o potencial proliferativo celular e são comuns em algum tipo de tumor, merecem atenção, pois são exemplos típicos de anomalias genéticas envolvidas no processo de transformação neoplásica e consequente, no desenvolvimento de tumores.

## **6. Efeitos das alterações cromossômicas.**

As alterações cromossômicas podem impactar as células de formas distintas, a depender do tipo de alteração e do cromossomo envolvido. As

inversões e translocações cromossômicas ocorrem devido a quebras de fitas duplas de DNA que foram reparadas erroneamente. A junção de sequências distintas de DNA pode inativar genes supressores tumorais, ativar oncogenes ou criar novos oncogenes quiméricos (BAIRD & HENDRICKSON, p. 99, 2018).

As aneuploidias por sua vez, são causadas por erros durante a mitose que podem causar a segregação desbalanceada dos cromossomos, resultando em células-filhas com perdas ou ganhos cromossômicos (LEVINE & HOLLAND, 2018). Apesar dos efeitos de uma aneuploidia dependerem do tipo celular, das condições ambientais e do tipo específico de alteração cromossômica, existe um padrão de características comuns à maior parte de células aneuploides (LEVINE & HOLLAND, 2018). Esse mecanismo é conhecido como resposta ao estresse associado à aneuploidia e consiste na baixa regulação de vias que regulam o ciclo celular, metabolismo de ácidos nucleicos e biogênese ribossomal; aliado à alta regulação de glicólise, autofagia, vias lisossômicas e metabolismo de membranas (CHUNDURI & STORCHOVÁ, 2019; DÜRRBAUM, *et al.*, 2014).

As aneuploidias alteram o número de cópias de centenas de genes simultaneamente, o que pode mudar seus níveis de expressão, promovendo um desbalanço gênico que resulta no fim da homeostase celular. A quantidade de mRNA e proteínas sintetizadas nas células fica desregulada, essas mudanças transcricionais resultam em estresse proteotóxico e oxidativo, crescimento lento e instabilidade genômica (CHUNDURI & STORCHOVÁ, 2019).

O estresse proteotóxico ocorre devido ao aumento na produção de proteínas. Como resposta, a degradação de proteínas se intensifica, mas esse mecanismo de compensação não é suficiente. Também aumenta a demanda pela atividade de dobramento proteico, realizada por chaperonas

que ficam com sua eficiência reduzida, resultando na produção de proteínas com dobramentos errôneos e no acúmulo de agregados proteicos (CHUNDURI & STORCHOVÁ, 2019).

Aneuploidias afetam fortemente a proliferação celular, geralmente deixando-a mais lenta (ZHU, *et al.*, 2018). Apesar de muitos estudos indicarem que aneuploidias causam uma alteração na taxa proliferativa, os mecanismos exatos não são muito bem compreendidos. Ganhos cromossômicos causam um atraso nas fases G1 e S do ciclo celular que provavelmente ocorre devido ao atraso no acúmulo de ciclinas causado pela expressão dos genes do cromossomo extra. A monossomia por sua vez pode afetar a célula pela haploinsuficiência dos genes presentes no cromossomo deletado (CHUNDURI & STORCHOVÁ, 2019). Mas sob estresse, algumas aneuploidias podem conferir vantagem adaptativa. Há casos de aumento da proliferação celular que são cromossomo específicos, como é o caso da trissomia 12 (BEN-DAVID, *et al.*, 2011).

Apesar das causas ainda precisarem ser descobertas, aneuploidias podem aumentar a instabilidade genética. Células aneuploides frequentemente sofrem mitoses anormais e apresentam altos níveis de dano ao DNA. Uma possibilidade é que a baixa expressão de fatores replicativos e os problemas de dobramento de proteínas associado ao estresse proteotóxico contribuam com a instabilidade genética (CHUNDURI, STORCHOVÁ, 2019; LEVINE & HOLLAND, 2018).

Conforme listado acima, os efeitos das aberrações cromossômicas são potencialmente deletérios para as células. Por esse motivo, MSC com alterações cromossômicas *in vitro* tendem a desaparecer em passagens posteriores (STULTZ, *et al.*, 2016). Além do estresse associado à aneuploidia, um dos motivos do breve desaparecimento da maior parte dos clones aberrantes de MSC é que grandes alterações genéticas desencadeiam uma resposta ao dano de DNA, que mediada pela expressão

de p53 e RB, resulta em senescência celular ou apoptose, impedindo o surgimento de novos clones aberrantes (OU & SCHUMACHER, 2018). Em síntese, aneuploidias tendem a ser desvantajosas para as células, pois mesmo que não desencadeiem a resposta ao dano de DNA, o estresse associado à aneuploidia reduz seu potencial proliferativo, o que favorece a sua eliminação.

## **7. Transformação celular e aneuploidia**

Há um paradoxo em relação à aneuploidia, pois da mesma maneira que está ligada ao envelhecimento celular, também está associada à tumorigênese. O envelhecimento celular é caracterizado pela senescência, que causa o fim irreversível do potencial proliferativo da célula. Entretanto, 90% dos tumores sólidos possuem aneuploidias. Esse é um indício de que há situações em que a célula consegue escapar do envelhecimento e que aneuploidias podem ser importantes no processo de tumorigênese, pois são selecionadas na maior parte dos tumores (LEVINE & HOLLAND, 2018).

O surgimento da aneuploidia em uma célula faz com que ela apresente algumas características em comum com células tumorais, tais como: mudanças metabólicas, instabilidade genética, ativação de autofagia e de resposta imunológica. Todas essas características são ruins e tendem a resultar na senescência ou apoptose de células normais, mas as células tumorais permanecem vivas porque encontram uma maneira de se adaptar. A principal adaptação é a superação do efeito antiploriferativo da aneuploidia, essa adaptação é facilitada pela instabilidade genética (CHUNDURI & STORCHOVÁ, 2019).

A transformação celular é um mecanismo que depende de múltiplas etapas, pois a célula precisa adquirir diferentes capacidades para se tornar tumoral. A instabilidade genética é considerada uma característica

possibilitadora, pois é capaz de gerar mutações aleatórias que podem conferir todas as outras características necessária a uma célula tumoral (HANAHAHAN & WEINBERG, 2011).

Nem toda célula com aneuploidia é instável geneticamente (LEVINE & HOLLAND, 2018). Entretanto, a aneuploidia pode contribuir ou ser um indício de instabilidade genética. Células aneuploides e instáveis geneticamente que mantêm seu potencial proliferativo, geram clones e são capazes de estabelecer uma nova população de células aberrantes. Os clones aberrantes podem adquirir novas mutações, que podem conferir novas características e resultar na maior adaptação celular. É por esse motivo que a instabilidade genética é o fator central na formação de tumores, pois é por meio dela que novos “*Hallmarks*” tumorais podem surgir (HANAHAHAN & WEINBERG, 2011; LEVINE & HOLLAND, 2018).

Dentre as adaptações que a instabilidade genética pode conferir, que contribuem com o processo de transformação neoplásica estão: manutenção de sinal proliferativo, escape de supressores de crescimento, resistência à morte, indução da angiogênese, capacidade de invasão e metástase e o escape da ação do sistema imunológico (HANAHAHAN & WEINBERG, 2011).

As MSC têm o potencial de induzir angiogênese e sua propriedade imunomoduladora é capaz de inibir a ação do sistema imunológico. Portanto, além das características potencialmente oncogênicas inerentes à sua fisiologia, MSC com alteração cromossômica podem estar instáveis geneticamente, permitindo assim a aquisição de novas características tumorais. Por esse motivo, expansões de MSC com aberração cromossômica clonal preocupam a comunidade científica.

## 8. Transformação espontânea de MSC

Não existem relatos de pacientes que receberam tratamento de terapia celular com MSC que desenvolveram tumores derivados das células recebidas. Entretanto, há evidências na literatura de terapias com outros tipos celulares que resultaram no desenvolvimento de tumores. Em 2009, Amariglio e colaboradores reportaram um caso de um menino que recebeu células-tronco neurais para o tratamento de ataxia telangiectasia e 4 anos depois foi diagnosticado com neoplasma glioneural. As análises genéticas compararam polimorfismo de microssatélite e tipo de HLA (antígeno leucocitário humano) do tumor, do paciente e dos doadores. Os resultados indicam que o tumor é derivado de pelo menos dois doadores de células. Relatos como esse indicam que células aplicadas em terapias podem contribuir com a formações de tumores.

É sabido que MSC de camundongos com aberrações cromossômicas são capazes de sofrer transformação maligna espontaneamente em culturas de longo prazo e dar origem a sarcomas (XIAO, *et al.*, 2013). Por esse motivo, desde que MSC humanas passaram a ser cogitadas para uso em terapia celular, seu risco de transformação maligna é amplamente discutido (BARKHOLT, *et al.*, 2013). Entretanto, MSC humanas parecem ser mais resistentes à transformação espontânea, pois muitos estudos relatam MSC humanas com aberrações cromossômicas que surgiram durante expansão, mas que não resultaram em transformação celular (CAPELLI, *et al.*, 2014; NIKITINA, *et al.*, 2018; TARTE, *et al.*, 2010; WANG, *et al.*, 2013).

Na década de 2000, surgiram duas publicações de grupos de pesquisa distintos que relatavam a transformação maligna espontânea de MSC durante expansão *in vitro* (RØSLAND, *et al.*, 2009; RUBIO, *et al.*, 2005). Entretanto, ambos os trabalhos foram retratados em 2010, pois foi constatado que a transformação celular foi resultado de uma contaminação

cruzada com células tumorais (GARCIA, *et al.*, 2010; RØSLAND, *et al.*, 2010).

Atualmente há apenas dois registros de MSC humanas que realmente sofreram transformação espontânea *in vitro* (PAN, *et al.*, 2014, WANG, *et al.*, 2005). Em ambos os casos, as células transformadas apresentaram mudanças morfológicas, maior taxa proliferativa em relação às MSC normais, deixaram de expressar alguns marcadores de superfície típicos de MSC, como CD13 e CD105, possuíam mais de uma alteração citogenética e quando inoculadas em camundongos imunodeficientes NOD/SCID, foram capazes de gerar tumores após 5 – 8 semanas da inoculação. A análise histológica dos tumores indicou uma morfologia similar à de sarcoma e liposarcoma.

As alterações sofridas por MSC transformadas são diversas. Dentre elas, as aberrações cromossômicas são de grande relevância, pois indicam instabilidade genética que é notoriamente um grande potencializador da transformação neoplásica celular. Portanto, a fim de evitar futuras complicações para o paciente, é de extrema importância garantir a qualidade e segurança de MSC antes de sua aplicação. Por esse motivo, a análise citogenética é realizada, afinal a maior preocupação em relação ao uso de MSC em terapia celular é que alterações citogenéticas resultem no surgimento e seleção de células neoplásicas que consigam causar o desenvolvimento de tumores no paciente.

Sendo assim, uma maneira eficiente de evitar células com potencial oncogênico é não utilizar MSC com aberrações cromossômicas clonais em terapia celular. Mas na prática essa não é uma tarefa muito simples, pois alguns pacientes apresentam alterações cromossômicas em todas as suas expansões (BORGONOVO, *et al.*, 2015, TARTE, *et al.*, 2010). Há situações em que apenas uma aneuploidia surge e permanece em baixa concentração na população de células, sem apresentar novas alterações

citogenéticas, nem vantagem proliferativa em relação aos clones euploides. O simples descarte de qualquer expansão com aberração cromossômica inviabilizaria o tratamento de muitos pacientes. Por esse motivo, é necessário discutir sobre quais são os limites citogenéticos seguros de produtos de MSC utilizados em terapia celular.

Para evitar a utilização de produtos de terapia celular com alterações cromossômicas que podem conferir vantagem proliferativa, especialistas do Cell Products Working Party, do Comitê de Terapias Avançadas da Agência Europeia de Medicamentos e da Sociedade Internacional de Terapia Celular e Genética (ISCT), recomendam a realização de cariótipo de 20 metáfases e estabelecem como limite de exclusão da amostra, 10% das metáfases com aberração cromossômica clonal (BARKHOLT *et al.*, 2013). Segundo às organizações, expansões celulares que não atendem a esses requisitos, não devem ser utilizadas em pacientes. Entretanto, trata-se de uma recomendação apenas e há estudos que realizaram a inoculação de MSC nos pacientes antes da liberação do resultado da análise citogenética e que com chegada do resultado do cariótipo, descobriram que haviam inoculado células de cariótipo aberrante em pacientes de terapia celular (MIZUNO, *et al.*, 2021, TARTE, *et al.*, 2010).

Situações como as expostas acima, reforçam a urgência na compreensão dos efeitos de alterações cromossômicas em MSC. A comprovação de que algum tipo de alteração citogenética apresenta potencial oncogênico criaria uma pressão para que MSC não sejam liberadas para uso antes dos resultados citogenéticos. Em contrapartida, a indicação de ausência de potencial oncogênico poderia liberar o uso de MSC com baixa concentração de alterações cromossômicas em situações excepcionais, para não inviabilizar a terapia celular.

As evidências de desenvolvimento de tumores *in vivo* utilizaram MSC humanas que já haviam sofrido transformação neoplásica durante

expansão *in vitro*, portanto já tinham morfologia alterada e alta taxa proliferativa. Esses estudos não contribuem com o conhecimento que os CPC realmente precisam, uma vez que MSC com essas características nunca seriam utilizadas em terapia celular, pois já indicavam seu potencial oncogênico. Portanto, a real pergunta é se MSC não transformadas, mas com baixas concentrações de células com alteração citogenética podem sofrer transformação *in vivo*, ou seja, dar origem a tumores nos pacientes.

MSC com aberrações cromossômicas, alterações morfológicas e alto potencial proliferativo, claramente devem ser descartadas. Mas MSC com baixa concentração de alterações cromossômicas e todos os outros parâmetros de qualidade normais precisam ser estudadas. É necessário estudar o impacto de cada alteração cromossômica que surge após expansão celular, e avaliar se são capazes de gerar clones, se possuem vantagem proliferativa e outras características que podem contribuir com o potencial oncogênico celular ou fazer com que MSC percam seu potencial terapêutico. Neste trabalho estudamos o efeito da trissomia 5 nas expansões de MSC.

## **9. Trissomia 5**

A trissomia 5 é uma aneuploidia recorrente em expansões de MSC, surge espontaneamente e já foi reportada em alguns estudos (STULTZ, *et al.*, 2016, CAPELLI, *et al.*, 2014, TARTE, *et al.*, 2010). Recentemente, a trissomia 5 também foi detectada em expansões de dois pacientes do Departamento de Hematologia e Terapia Celular do Hospital Israelita Albert Einstein (DHTC-HIAE). O objetivo da expansão era o tratamento de incontinência urinária, mas as linhagens de MSC com clones com trissomia 5, não foram utilizadas na terapia porque não atendiam aos critérios mínimos sugeridos pela ISCT.

O descarte de MSC requer a repetição do isolamento das células, expansão celular e todos os ensaios de controle de qualidade que demandam recursos e tempo. Todas essas etapas podem inviabilizar a terapia celular, desapontando paciente e equipe médica.

MSC de cariótipo normal sempre devem ter prioridade de aplicação em terapia celular, mas há situações em que uma pequena porcentagem de MSC demonstra uma alteração citogenética e não é possível repetir o isolamento de novas células. Para essas situações são necessários dados sobre os impactos de tal alteração em MSC. Esses dados podem auxiliar a equipe médica na tomada de decisão em relação ao uso ou descarte de MSC que desenvolveram alterações citogenéticas.

No Brasil, como a RDC-Anvisa 214/2018 deixa a critério de cada CPC o estabelecimento de limites seguros, estudos como este também podem fornecer embasamento científico no estabelecimento de tais limites. Para tanto, é necessário considerar a realidade clínica, na qual é relevante saber se a propriedade terapêutica é mantida e se a transformação celular poderia ocorrer *in vivo*.

Para responder a essa pergunta, este trabalho utilizou MSC expandidas para terapia celular que desenvolveram espontaneamente uma população de células com a trissomia 5 (MSC-T5). Avaliamos se MSC-T5 possui potencial oncogênico e potencial imunomodulador. Para saber se MSC-T5 pode sofrer transformação *in vitro*, verificamos as dobras populacionais (PDL) durante expansão e taxas proliferativas e de senescência celular. O potencial imunomodulador foi avaliado pelo perfil de expressão em resposta à estimulação com IFN $\gamma$ . O potencial tumorigênico *in vivo* foi verificado pela inoculação subcutânea das células em camundongos, seguida de observação dos animais por 6 meses. Todos os dados obtidos de MSC-T5 foram comparados com os de MSC de cariótipo normal e de uma linhagem de células tumorais. Caso MSC-T5

apresente parâmetros similares ao das células tumorais, este seria um indício relevante de potencial oncogênico. Em contrapartida, se o comportamento de MSC-T5 for similar ao de MSC normais, é possível que a trissomia 5 não seja capaz de iniciar um processo de transformação celular em MSC e que o uso de tais linhagens seja mais seguro do que previamente imaginado.

## II. Objetivos

---

O presente trabalho teve como objetivo geral verificar o potencial tumorigênico e imunomodulador de células mesenquimais estromais (MSC) isoladas de medula óssea humana, que apresentaram alguns clones com a trissomia 5 após cultivo *in vitro*.

São objetivos específicos deste projeto:

- I. Avaliar se MSC com trissomia 5 são capazes de gerar tumor *in vivo*.
- II. Avaliar o perfil de crescimento da população celular em culturas de MSC com trissomia 5 ao longo do tempo, comparativamente a culturas de MSC com cariótipo normal.
- III. Avaliar proliferação e senescência celular em culturas de MSC com trissomia 5, comparativamente a culturas de MSC com cariótipo normal.
- IV. Avaliar a potência imunomoduladora de culturas de MSC com trissomia 5, comparativamente às culturas de MSC com cariótipo normal.

### III. Materiais e Métodos

#### 1. Linhagens celulares

Para a realização do estudo foram utilizadas quatro linhagens de MSC derivadas da medula óssea, duas delas possuíam a trissomia 5 como aneuploidia clonal em 10 a 30% da população de células (MSC-T5) e outras duas linhagens euploides (MSC-E). A linhagem tumoral AT/RT-USP (Tumor Rabdóide/Teratóide Atípico), com capacidade de iniciação de tumor (KAID, *et al.*, 2018), foi utilizada como controle positivo na avaliação de transformação celular e potencial tumorigênico (Tabela 1).

As linhagens MSC-T5 foram cedidas pelo Departamento de Hematologia e Terapia Celular do Hospital Israelita Albert Einstein DHCT-HAE, onde foram isoladas e expandidas para uso clínico, mas devido ao surgimento espontâneo de clones com a trissomia 5, não passaram nos critérios mínimos estabelecidos pela ISCT, então seu uso clínico foi desconsiderado e as amostras doadas para pesquisa. As linhagens MSC-E e AT/RT-USP, foram gentilmente doadas pelo centro de Estudos do Genoma Humano e Células Tronco. O estudo foi devidamente autorizado pelo Comitê de Ética em Pesquisa – Seres Humanos (CAAE: 33496419.6.0000.5464; Parecer: 4.098.980).

*Tabela 1- Amostras utilizadas no estudo.*

| <b>Amostra</b> | <b>Grupo</b>                        | <b>Passagem</b> | <b>Cariótipo</b>   |
|----------------|-------------------------------------|-----------------|--------------------|
| <b>M10</b>     | Controle negativo<br><b>MSC-E</b>   | P4              | 46,XX              |
| <b>M12</b>     |                                     | P6              | 46,XY              |
| <b>T5-50</b>   | Grupo experimental<br><b>MSC-T5</b> | P4              | 46,XX/<br>47,XX,+5 |
| <b>T5-53</b>   |                                     | P6              |                    |

|                         |                                       |              |    |
|-------------------------|---------------------------------------|--------------|----|
| <b>USP7 –<br/>AT/RT</b> | Controle positivo<br>Linhagem tumoral | Imortalizada | NA |
|-------------------------|---------------------------------------|--------------|----|

NA: Não analisado

## 2. Condições de cultivo

Todas as linhagens foram cultivadas em DMEM “*Low Glucose*” (Gibco), suplementadas com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) e 1% de solução Anti-Anti (100X) *Antibiotic-Antimycotic* (Gibco). As células eram mantidas em incubadoras a 37°C sob atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. O meio de cultivo era trocado duas vezes por semana, e quando o frasco atingia uma confluência de 80%, as células eram lavadas com *Phosphate Buffered Saline* (PBS), tratadas com *TrypLE<sup>TM</sup> Express* (Gibco) por 5-6 minutos a 37°C para dissociação das células e semeadas em novos frascos de cultivo em baixa densidade (6.000 células por cm<sup>2</sup>).

## 3. Caracterização de MSC

Para a caracterização das MSC, verificamos por citometria de fluxo a expressão de marcadores de superfície típicos de MSC, conforme estabelecido pela ISCT (DOMINICI, *et al.*, 2006). As células foram marcadas por 40 minutos a 4°C com os seguintes anticorpos: PE *Mouse anti-Human* CD105 (Clone 266); APC *Mouse anti-Human* CD73 (Clone AD2); PE *Mouse Anti-Human* CD90 (Clone 5E10); FITC *Mouse Anti-Human* CD44 (Clone G44-26); PE *Mouse Anti-Human* CD166 (Clone 3A6); PE *Mouse Anti-Human* CD31 (Clone WM59); APC *Mouse Anti-Human* CD34 (Clone 581); FITC *Mouse Anti-Human* CD45 (Clone 2D1); FITC *Mouse Anti-Human* HLA-DR (Clone G46-6). Todos os anticorpos foram adquiridos da *BD Biosciences*. A citometria de fluxo foi realizada com FACS ARIA II (*BD Biosciences*), foram adquiridos pelo menos 10.000 eventos por leitura. Os resultados foram analisados com o *software*

*FlowJo*, onde primeiro o subgrupo da população de células vivas foi delimitado e depois, com os dados do controle sem marcação de fluoróforo, foram estabelecidos subgrupos de células marcadas para cada um dos fluoróforos.

## 4. Análise citogenética

### 4.1 Cariótipo

Para verificar se as linhagens de MSC atendiam aos critérios citogenéticos recomendados pela ISCT, o cariótipo com banda G foi realizado em 20 metáfases por amostra (BARKHOLT *et al.*, 2013). MSC com duas ou mais (>10%) metáfases com a mesma aberração cromossômica, foram consideradas como fora dos critérios recomendados devido à presença de alteração clonal. As aberrações cromossômicas foram descritas de acordo com o *International System of Human Cytogenetic Nomenclature* (ISCN, 2016).

O cariótipo das amostras MSC-T5 foi realizado no laboratório clínico do Hospital Israelita Albert Einstein. Para o cariótipo das linhagens MSC-E, as mesmas foram cultivadas em frascos T-75 até atingirem a confluência de 70-80%, então as células foram acondicionadas por 20 horas em meio DMEM “*Low glucose*” sem suplementação de SFB. Essa etapa de carenciamento de SFB foi realizada para aumentar o número de metáfases no fim do experimento, pois o SFB possui agentes mitógenos e, sem eles, as células param seu ciclo na fase G1. Depois da etapa de carenciamento, as células foram acondicionadas novamente em meio de cultura com SFB, sob condições ideais de cultivo. Aproximadamente 30 horas após o fim do carenciamento era possível ver em microscópio de luz que grande parte das células estavam presas com menor aderência ao frasco (ficam mais brilhantes sob a luz), um indício de entrada em fase M. Então as células foram incubadas por 4 horas em solução de 0,05µg/ml de *KaryoMAX<sup>TM</sup>*

*Colcemid*<sup>TM</sup> (Gibco) em meio de cultura, posteriormente foram dissociadas com tripsina, hipotonizadas com KCL 0,075M por 30 minutos a 37°C e fixadas em solução Metanol:Ácido acético (3:1). Para a obtenção das metáfases, a solução final de células com fixador foi dispensada gota a gota sobre a lâmina.

Para a coloração das bandas, as lâminas foram envelhecidas em estufa a 37°C, imergidas por 5 minutos em solução 2x de *Saline-Sodium Citrate buffer* (SSC) a 65°C, lavadas em água destilada, imergidas por 40-60 segundos em solução de 0,025g de tripsina em tampão Sörensen (pH 6,8) e coradas com solução de corante Giemsa 4% em tampão Sörensen por 8 minutos. As imagens das metáfases foram capturadas em microscópio *ZEISS Axioplan 2 Imaging* e analisadas no *software Ikaros*.

## 4.2 CGH-array

O CGH-array (Hibridização Genômica Comparativa) foi realizado com o objetivo de procurar por CNVs (*Copy Number Variation*) menores que o cariótipo com banda G é capaz de detectar. A análise foi realizada em colaboração com o Laboratório de Genética Humana do Instituto de Biociências – USP.

O DNA das MSC foi extraído com o kit QIAamp DNA Mini (Qiagen) de acordo com o protocolo do fabricante. O CGH-array foi realizado em plataforma 180K (Agilent Technologies, Califórnia, USA), de acordo com o protocolo do fabricante. O DNA controle deste ensaio foi masculino de cariótipo 46,XY. A análise foi realizada com o software Nexus Copy Number (Biodiscovery) e os gráficos plotados com os valores da fórmula:

$$X = \text{Log}_2 \text{PS/PC}$$

Onde:

PS é o número de probes na amostra testada.

PC é o número de probes no controle do ensaio.

Zero indica diploidia, valores negativos indicam perdas e valores positivos indicam ganhos de material genético.

## 5. Crescimento populacional

Para investigar se a trissomia 5 seria capaz de alterar o padrão de crescimento das populações de MSC-T5, as dobras populacionais cumulativas (PDL) das linhagens de MSC foram contabilizadas durante expansão celular. Antes do início da análise, as linhagens foram carenciadas em meio de cultivo sem SFB por 20 horas, para alinhamento do ciclo celular na fase G1. Após período de carenciamento, as células voltaram a ser acondicionadas em meio de cultura com suplementação normal. Quando o frasco de cultivo atingia 80% de confluência, as células eram dissociadas, contadas e semeadas.

A contagem de células foi realizada em triplicata em *Countess 3 Automated Cell Counter*. A lâmina de contagem era preparada com 10µl da solução de células diluída em solução de 0,4 de *trypan blue*. As MSC eram então semeadas em novos frascos, sempre na mesma densidade de 6.000 células/cm<sup>2</sup>.

A fórmula para o cálculo do PDL foi:

$$PDL = \log_{10}(Cf/Ci)*3.33$$

Onde:

Ci: número de células semeadas no início do período de incubação;

Cf: número de células no fim do período de incubação;

O tempo de dobra (DT) foi calculado com a fórmula:

$$DT = T*\ln_2/\ln(Cf/Ci)$$

Onde:

T: tempo de incubação em dias.

As fórmulas utilizadas são as recomendadas pelo manual de cultivo de células da ATCC (2021).

## 6. Proliferação celular

Para verificar se a taxa proliferativa de MSC-T5 era similar à de células tumorais ou de MSC-E, foi realizado um ensaio que detecta células com núcleos proliferativos com o kit *Click-iT<sup>TM</sup> EdU Cell Proliferation Kit for Imaging, Alexa Fluor (Invitrogen)*. O ensaio consiste na detecção de células com EdU em seu núcleo. O EdU (5-ethynyl-2-deoxyuridine) é um nucleosídeo análogo à timina que se incorpora ao DNA durante sua síntese. Para tanto, as células foram semeadas em triplicata em placas de 24 poços, após 48 horas foram incubadas com EdU por 4 horas. As etapas seguintes do ensaio foram realizadas segundo protocolo do fabricante. As imagens foram capturadas em microscópio *EVOS M5000 Imaging System*. As células e seus núcleos proliferativos foram contabilizados com o *software ImageJ*.

## 7. Senescência celular

Para investigar se a trissomia 5 poderia desencadear a senescência em MSC-T5, foram realizados ensaios para detectar a atividade de  $\beta$ -galactosidase associada a senescência (SA- $\beta$ -Gal), um biomarcador de senescência celular (KUMARI & JAT, 2021). Dois tipos diferentes de ensaios foram realizados, um colorimétrico, capaz de detectar células positivas e negativas para a atividade da enzima e outro com marcação fluorescente que possibilitou a quantificação da intensidade da atividade enzimática por célula.

O ensaio colorimétrico foi realizado com o kit *Senescence  $\beta$ -Galactosidase Staining (Cell Signaling)*. As células foram semeadas em triplicata em placas de 24 poços. Após 48 horas, o ensaio foi realizado

segundo orientações do fabricante. As imagens foram capturadas em microscópio *EVOS XL Core Imaging System*. Células positivas para SA- $\beta$ -Gal foram contabilizadas e sua porcentagem mensurada.

Para o ensaio de detecção de SA- $\beta$ -Gal por fluorescência, as células foram semeadas em lâminas com câmaras. Após 48 horas, as enzimas foram marcadas com o kit *CellEvent<sup>TM</sup> Senescence Green Detection (Invitrogen)* de acordo com o protocolo do fabricante. As imagens foram capturadas no microscópio *Zeiss Axio Imager Z1 ApoTome*. Cada amostra teve 200 células analisadas.

A intensidade de fluorescência foi mensurada com o *software ImageJ*. A fluorescência por célula (FC) foi calculada com a fórmula:

$$FC = FT - (AC * FB)$$

Onde:

FT = Fluorescência total capturada;

AC = Área da célula;

FB = Fluorescência do background da imagem.

## 8. Tumorigênese *in vivo*

Para verificar se MSC-T5 poderia sofrer transformação espontânea *in vivo* e gerar tumor, camundongos Balb c/NUDE imunossuprimidos de 13 semanas receberam 100.000 células por injeção subcutânea no flanco direito. Os animais foram divididos em 5 grupos, cada um com três animais. Cada grupo recebeu MSC de um paciente e um grupo controle positivo recebeu células tumorais AT/RT-USP7. Os animais foram observados por 185 dias (6 meses). Foram pesados semanalmente e os tumores foram medidos com o auxílio de um paquímetro digital. O volume tumoral (VT) (mm<sup>3</sup>) foi calculado com a seguinte fórmula (TOMAYKO & REYNOLDS, 1989):

$$VT = (\text{Diâmetro maior} * \text{Diâmetro menor}^2) / 2.$$

O estudo foi devidamente aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA e registrado sob o número 358/2019.

### **9. Análise de potência imunomoduladora**

Para avaliar se MSC-T5 eram capazes de manter sua propriedade imunomoduladora, as linhagens foram estimuladas com Interferon- $\gamma$  (IFN $\gamma$ ), uma citocina inflamatória liberada por linfócitos T. A resposta imunomoduladora foi mensurada por citometria de fluxo e rt-PCR. As linhagens M10, M12 e T5-53 foram divididas em dois grupos: as estimuladas, que foram tratadas com IFN $\gamma$  40ng/mL em meio de cultura por 48 horas e o grupo controle não estimulado que recebeu meio de cultura sem IFN $\gamma$ .

MSC quando estimuladas com IFN $\gamma$  passam a expressar o marcador de superfície HLA-DR, sendo assim, este pode ser um marcador que indique atividade imunomoduladora de MSC (GALIPEAU, *et al.*, 2016). Para a análise da expressão de HLA-DR por citometria de fluxo, as células estimuladas com IFN $\gamma$  foram soltas e encubadas por 40 minutos com o anticorpo FITC *Mouse Anti-Human* HLA-DR (Clone G46-6) da BD Pharmingen™, então foram lavadas 3 vezes com PBS e analisadas com o FACS ARIA II (BD Biosciences), foram adquiridos pelo menos 10.000 eventos por leitura. Os resultados foram analisados com o *software FlowJo* pelo mesmo método de análise descrito na análise de citometria de fluxo para caracterização celular.

Para a análise de expressão gênica por rt-PCR, as células foram lisadas e seu RNA total extraído com o kit Rneasy Micro (Qiagen). Os genes alvos foram *IDO1*, *CXCL9*, *CXCL10* e *CXCL11*. São genes envolvidos na resposta imunomoduladora de MSC e são superexpressos em MSC potentes após estímulo com IFN $\gamma$  (CHINNADURAI, *et al.*, 2018). O RNA normalizado (500ng) foi convertido em cDNA com

*SuperScript™ III Reverse Transcriptase* (Invitrogen). A síntese de cDNA resulta em uma solução de 20µl que é diluída em 10 vezes para uma solução final de 200 µl de cDNA. Nas reações de quantificação de expressão, para um volume final de 25 µl por poço, foram utilizados 2 µl de cDNA, 1µl de cada primer a 10µM para o gene alvo (Tabela 2), 12,5 µl de *Power SYBR Green PCR Master Mix* (*Applied Biosystems*) e 8,5µl de H<sub>2</sub>O DNase Free. A análise foi realizada com o *Applied Biosystems 7500 Real Time PCR System*, onde a reação foi amplificada por 40 ciclos de 15 segundos a 95°C e 1 minuto a 57°C. Os CTs (*Threshold* dos ciclos) foram extraídos e a quantificação relativa foi realizada pelo método da curva padrão. Os dados foram normalizados pela expressão de *GAPDH* e depois normalizados novamente pela expressão de M10 estimulada com IFN $\gamma$ .

*Tabela 2 - Sequência de nucleotídeos dos primers para rt-PCR.*

| Gene alvo | Orientação | Sequência                     |
|-----------|------------|-------------------------------|
| IDO 1     | Forward    | 5'-AGATGTCCGTAAGGTCTTGCC-3'   |
|           | Reverse    | 5'-ACTGCAGTCTCCATCACGAAA-3'   |
| CXCL9     | Forward    | 5'-TTCTGATTGGAGTGCAAGGAAC-3'  |
|           | Reverse    | 5'-CCTTCACATCTGCTGAATCTGGG-3' |
| CXCL10    | Forward    | 5'-CCACGTGTTGAGATCATTGCT-3'   |
|           | Reverse    | 5'-TGCATCGATTTTGCTCCCCT-3'    |
| CXCL11    | Forward    | 5'-GCTACAGTTGTTCAAGGCTTCC-3'  |
|           | Reverse    | 5'-TAAGCCTTGCTTGCTTCGAT-3'    |
| GAPDH     | Forward    | 5'-GCATCCTGGGCTACACTGA-3'     |
|           | Reverse    | 5'-CCACCACCCTGTTGCTGTA-3'     |

## 10. Análise estatística

Para verificar se os dados de MSC-T5 eram similares ao de células transformadas, comparamos os dados de T5-50 e T5-53 com o controle positivo (AT/RT-USP7) e negativo (M10 e M12). As análises de variância

foram realizadas com *One-way ANOVA* e *Tukey's multiple comparison* como pós-teste. O ensaio de fluorescência que indica a intensidade da atividade de SA- $\beta$ -gal apresentou dados não paramétricos, por esse motivo, os dados são apresentados individualmente com mediana e interquartil, a análise de variância foi realizada com o teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn's. A sobrevivência dos animais foi analisada com o teste Log-rank (Mantel-Cox). Todas as análises estatísticas foram realizadas com o software *GraphPad Prism 8*. P-values <0.05 foram considerados estatisticamente significativos (\* = <0.05; \*\* = P<0.01; \*\*\*P = <0.001; \*\*\*\* = P<0.0001).

## IV. Resultados

### 1. Caracterização de MSC

Todas as MSC utilizadas neste estudo apresentaram perfil imunofenotípico de MSC. Todas as linhagens apresentaram alta expressão de CD105, CD90, CD73, CD44 e CD166; e baixa expressão de CD45, CD34, CD31 e HLA-DR (Figuras 2 - 5). As porcentagens de células positivas para cada um dos marcadores de superfície são apresentadas na Tabela 3.

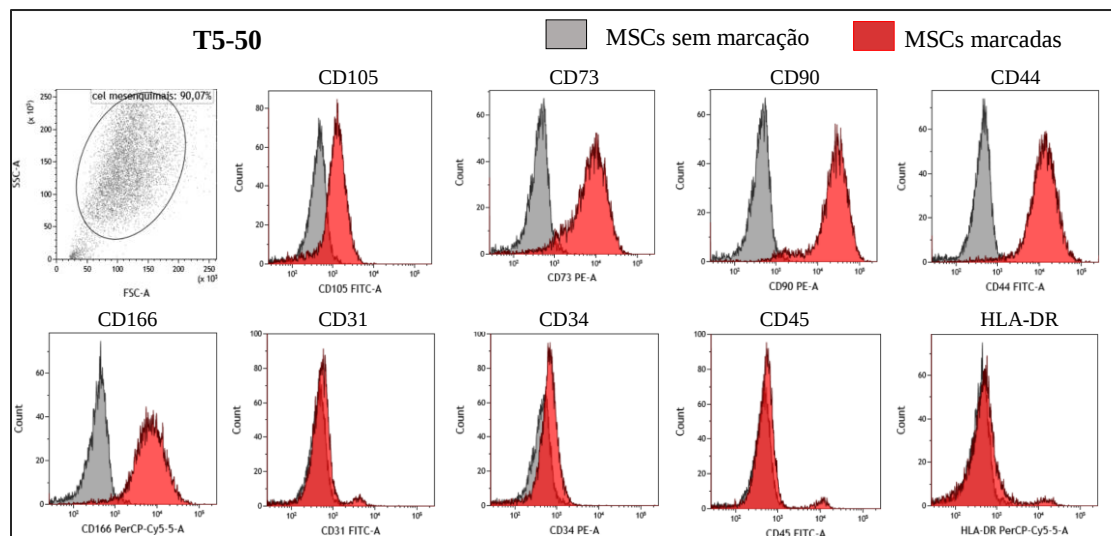


Figura 2 – Quantificação de células T5-50 positivas para os marcadores de superfície necessários para caracterização de MSC, segundo ISCT. Pico de células controle sem marcação com anticorpo em cinza e pico de células tratadas com anticorpo de interesse em vermelho. Dados concedidos pelo DHCT-HAE.

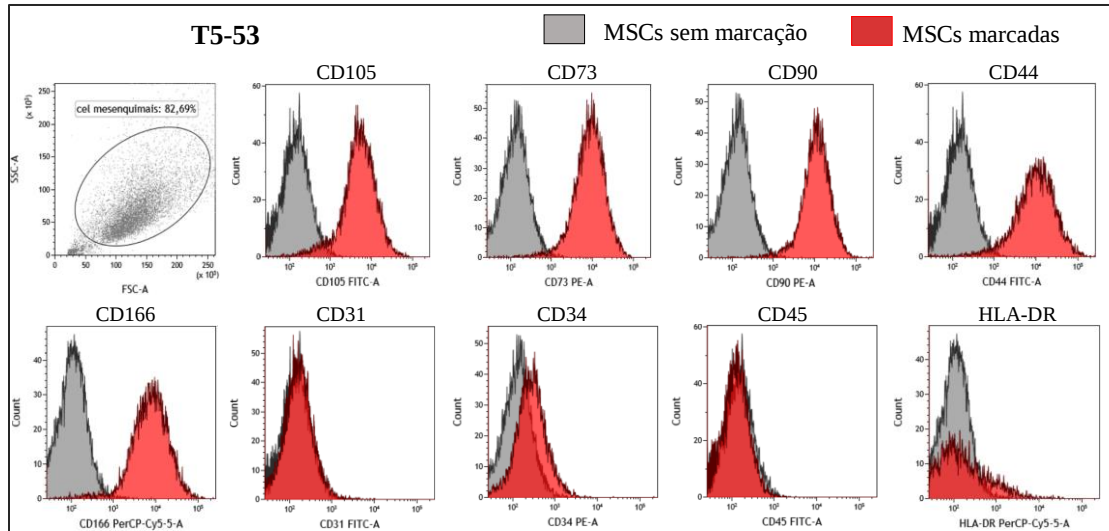


Figura 3 – Quantificação de T5-53 positivas para os marcadores de superfície necessários para caracterização de MSC, segundo ISCT. Pico de células controle sem marcação com anticorpo em cinza e pico de células tratadas com anticorpo de interesse em vermelho. Dados concedidos pelo DHCT-HAE.

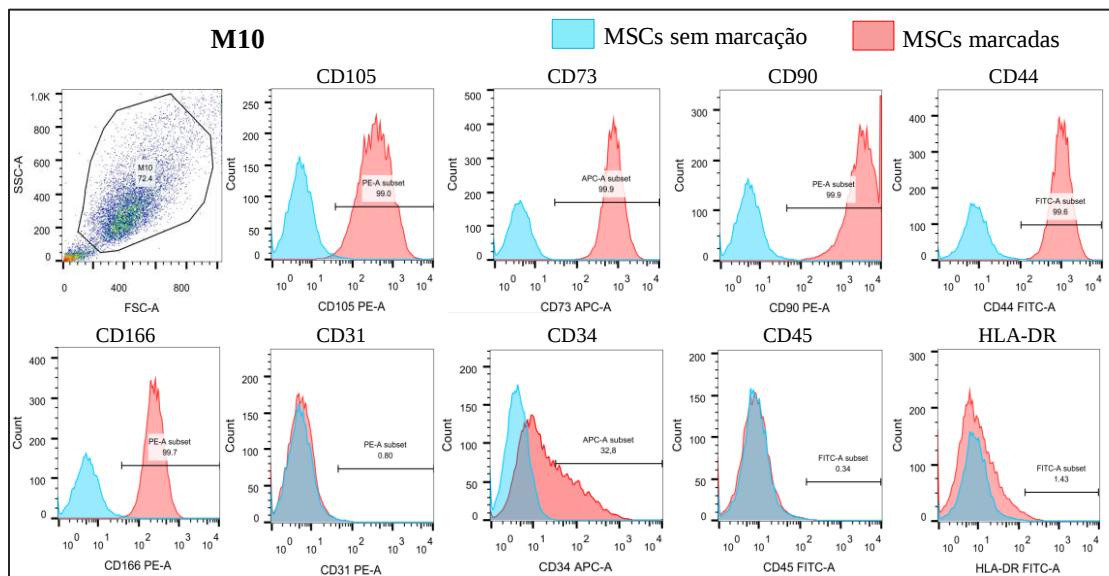


Figura 4 – Quantificação de M10 positivas para os marcadores de superfície necessários para caracterização de MSC, segundo ISCT. Pico de células controle sem marcação com anticorpo em azul e pico de células tratadas com anticorpo conjugado de interesse em vermelho.

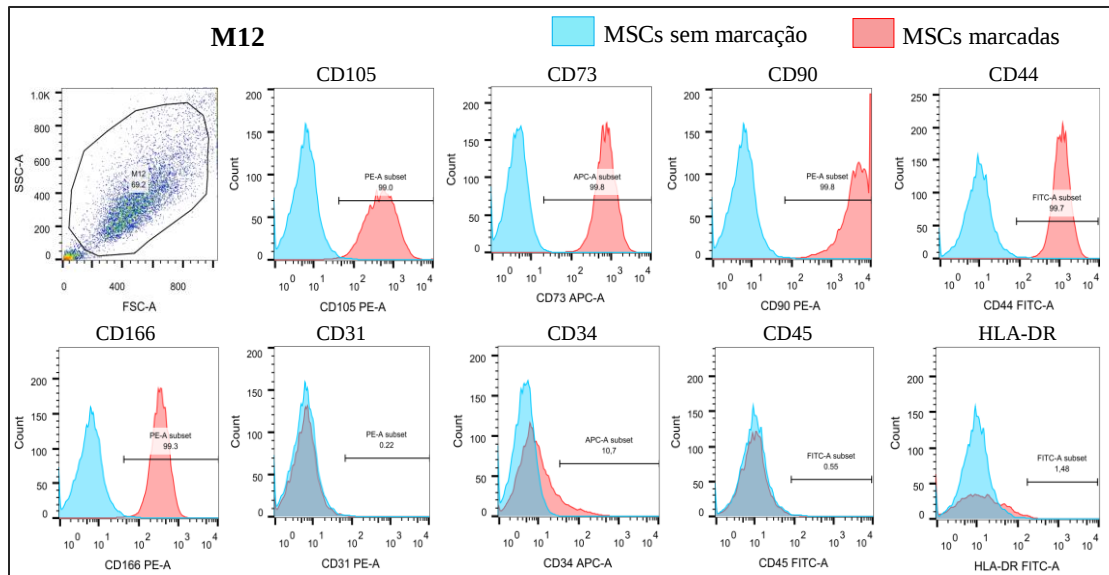


Figura 5 – Quantificação de M12 positivas para os marcadores de superfície necessários para caracterização de MSC, segundo ISCT. Pico de células controle sem marcação com anticorpo em azul e pico de células tratadas com anticorpo conjugado de interesse em vermelho.

*Tabela 3 – Porcentagem de expressão de marcadores de superfície.*

| Marcador      | M10 (%) | M12 (%) | T5-50 (%) | T5-53 (%) |
|---------------|---------|---------|-----------|-----------|
| <b>CD105</b>  | 99,0    | 99,0    | 65,3      | 91,2      |
| <b>CD73</b>   | 99,9    | 99,8    | 91,9      | 95,9      |
| <b>CD90</b>   | 99,9    | 99,8    | 95,9      | 99,6      |
| <b>CD44</b>   | 99,6    | 99,7    | 99,2      | 96,5      |
| <b>CD166</b>  | 99,7    | 99,3    | 93,4      | 99,5      |
| <b>CD31</b>   | 0,8     | 0,2     | 4,2       | 0,4       |
| <b>CD34</b>   | 32,8    | 10,7    | 0,7       | 2,4       |
| <b>CD45</b>   | 0,3     | 0,5     | 4,6       | 0,1       |
| <b>HLA-DR</b> | 1,4     | 1,48    | 5,3       | 7,4       |

## 2. Análise citogenética

As análises citogenéticas indicam que as linhagens MSC-T5 possuíam uma população de clones com trissomia 5, não atendendo aos

critérios mínimos de infusão sugeridos pela ISCT e as linhagens MSC-E possuíam cariótipo normal, sem clones com aberrações cromossômicas.

O cariótipo com banda G revelou que 10% das metáfases de T5-50 (2/20) e 30% das metáfases de T5-53 (6/20) eram 47,XX,+5. Dentre os controles, M12 apresentou 95% (19/20) de suas metáfases 46,XY e M10 tinha 75% (15/20) de suas metáfases 46,XX e 5 metáfases aberrantes, as alterações eram todas monossomias não clonais (Tabela 4) (Figura 6-9). Apesar de M10 e M12 apresentarem algumas metáfases com aberrações cromossômicas, seus resultados de cariótipo atendem aos critérios mínimos para infusão, pois não possuem aberrações cromossômicas clonais. Além disso, a perda cromossômica aleatória pode estar presente devido a um artefato de técnica que ocorre na etapa de preparação da lâmina quando se dá o rompimento da membrana plasmática e espalhamento dos cromossomos (STULTZ, *et al.*, 2016).

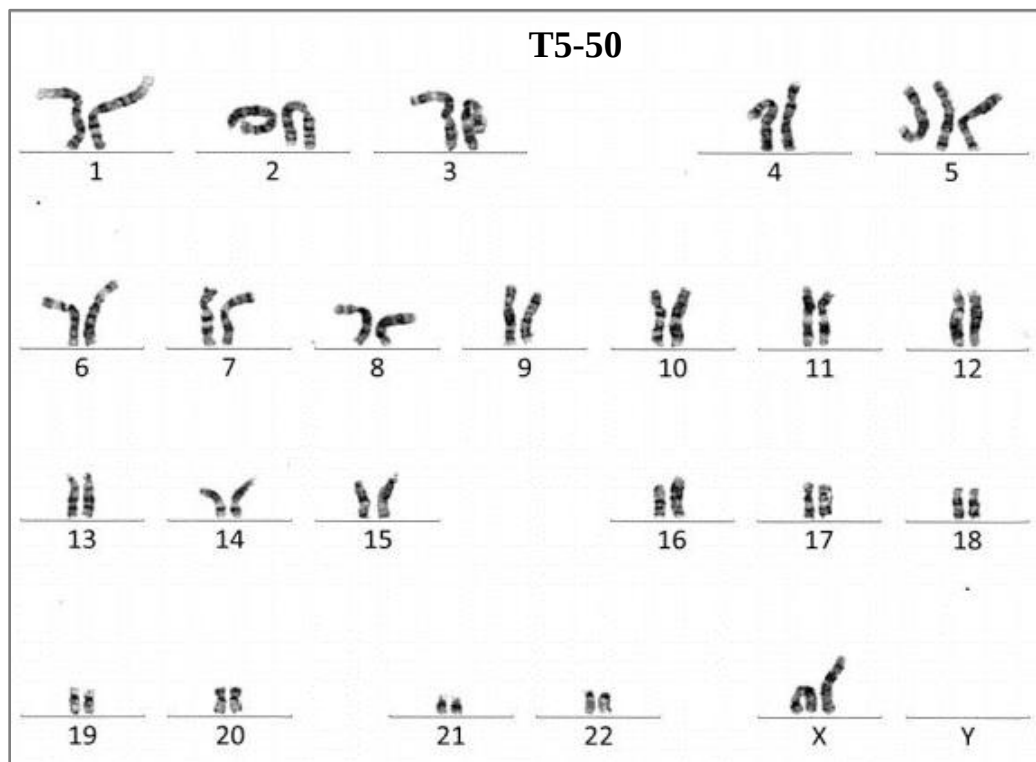


Figura 6 - Cariótipo com banda G de amostra T5-50, indicando a trissomia 5. Cariótipo 47,XX,+5.

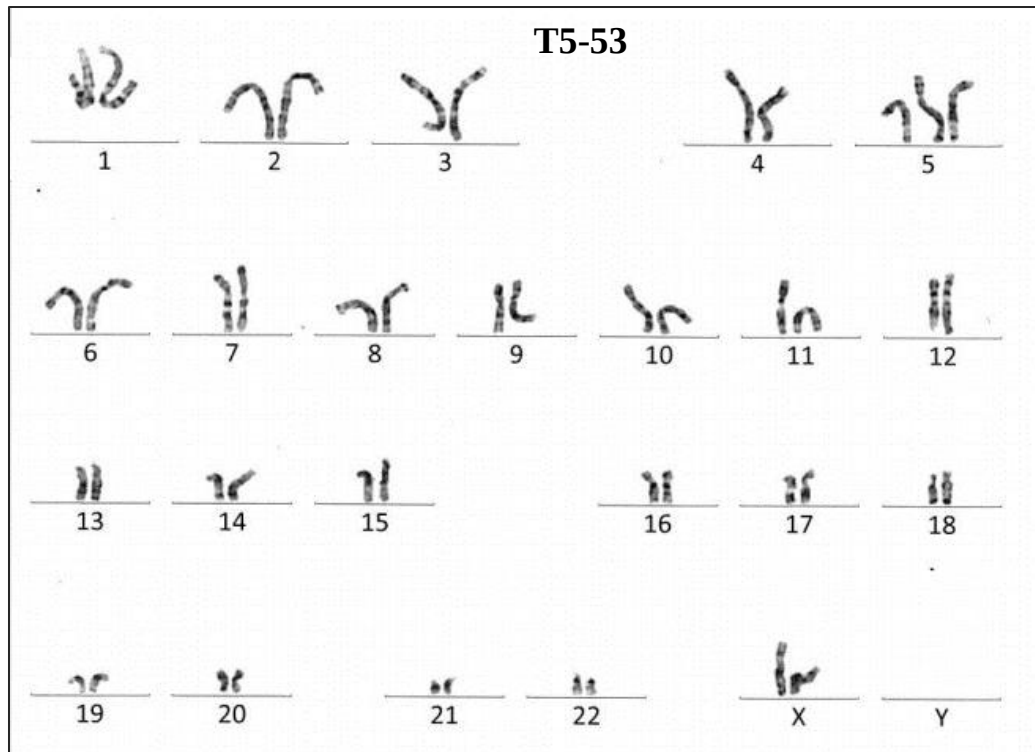


Figura 7 - Cariótipo com banda G de amostra T5-53, indicando a trissomia 5. Cariótipo 47,XX,+5.

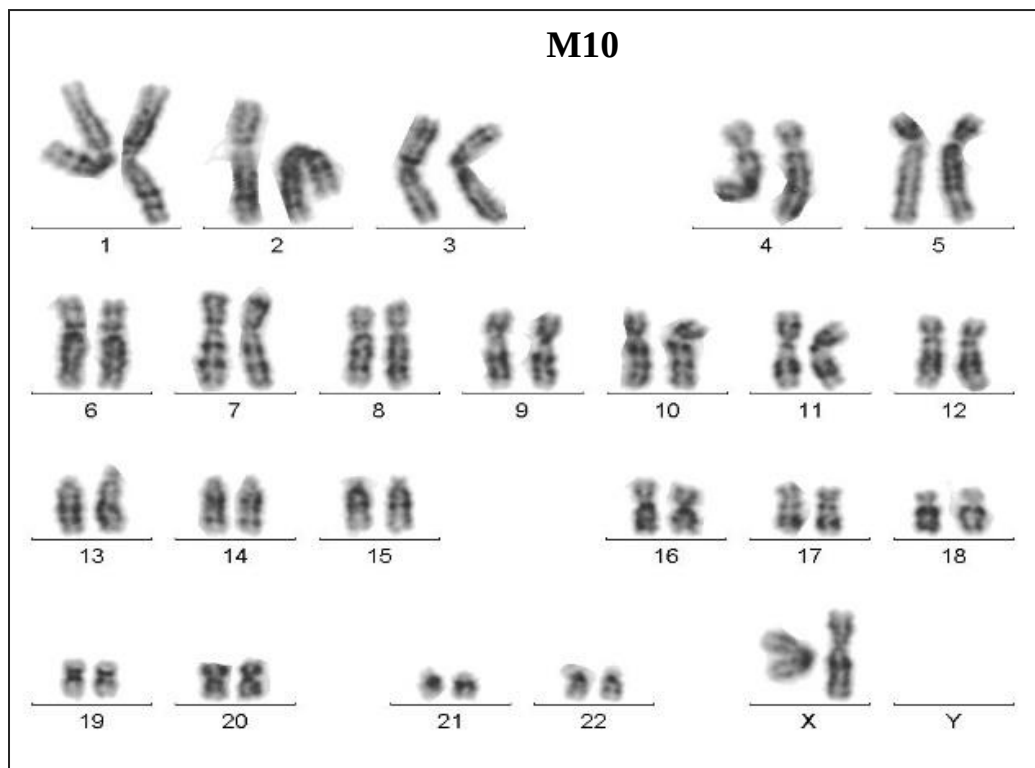


Figura 8 - Cariótipo com banda G de amostra M10: 46,XX.

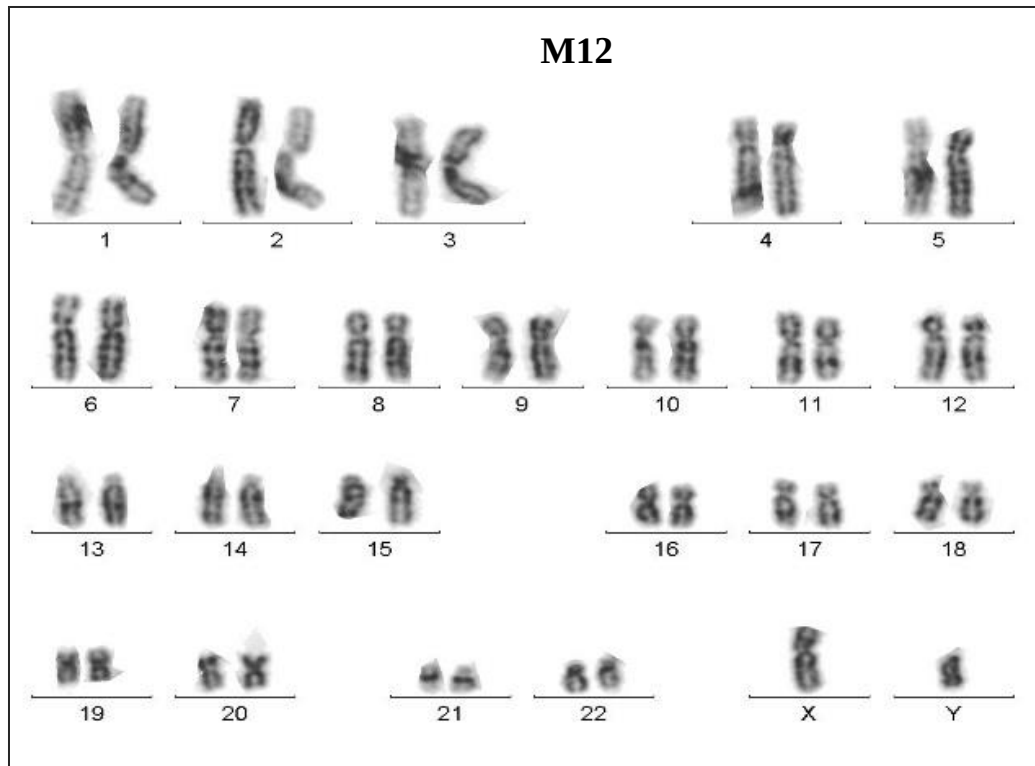


Figura 9 - Cariótipo com banda G de amostra M12: 46,XY.

O CGH-array confirmou que M10 e M12 são euploides, uma vez que CNVs raras, maiores que 500 kb, não foram detectadas em M10 e M12. Entretanto, o CGH-array da linhagem T5-53 detectou um pequeno aumento no número de cópias do cromossomo 5, indicando a presença da aneuploidia em mosaico. Como o cariótipo realizado na passagem 6 indicou a presença da trissomia 5 em cerca de 30% da população, o aumento no número de cópias do cromossomo 5 sugere a permanência dessa aneuploidia até a passagem 9, em aproximadamente 10% da população de células (Figura 10). Não foi possível realizar o CGH-array em T5-50, pois devido ao seu baixo potencial de expansão, não obtivemos células suficientes para a extração de DNA.

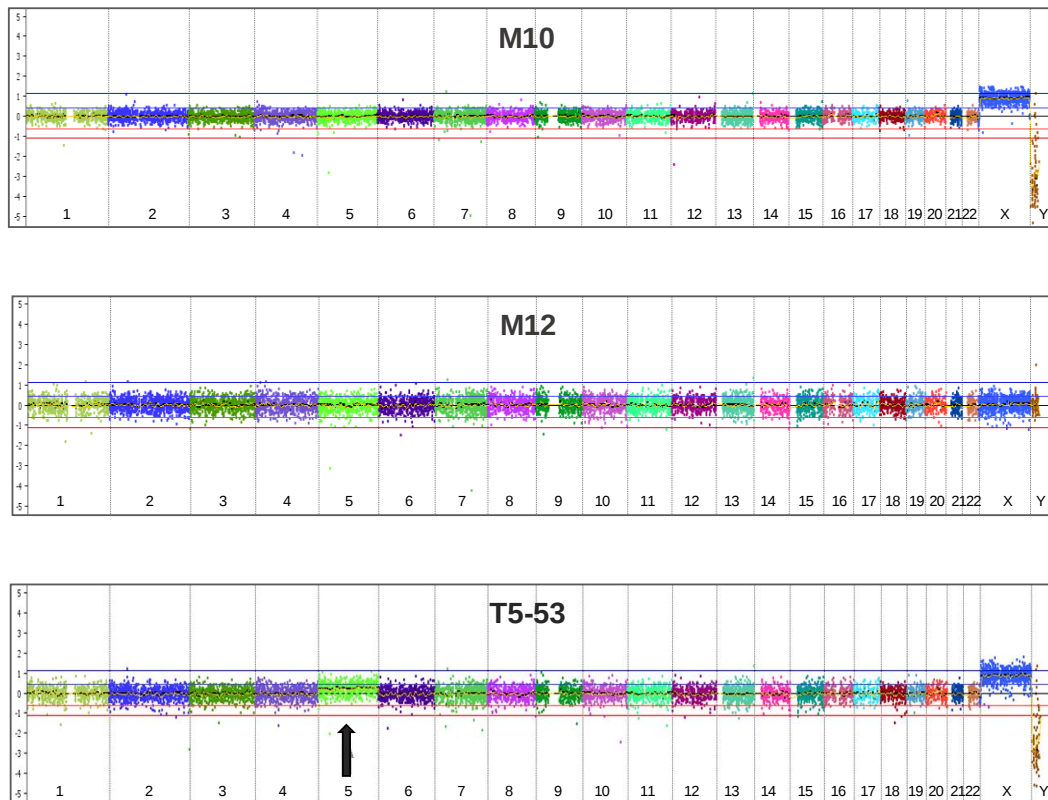


Figura 10 – Resultado do teste de CGH-array para detecção de CNVs maiores que 500kb. Cada coluna do eixo X representa um cromossomo e os valores plotados indicam a quantidade de *probes* detectadas para aquela região cromossômica em relação ao controle (46,XY). Zero indica diploidia, valores maiores que 0 indicam ganho e valores menores que 0 indicam perda de material genético.

*Tabela 4- Resultado das análises citogenéticas de MSC.*

| Amostra    | Análise citogenética | Passagem | Resultado                                                                               |
|------------|----------------------|----------|-----------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>M10</b> | Cariótipo            | 9        | 46,XX[15]/44,XX,-8,-17[1]/<br>45,XX,-5[1]/44,XX,-5,-18[1]/<br>45,XX,-22[1]/45,XX,-21[1] |
|            | CGH-array            | 9        | arr(1-22,X)x2                                                                           |
| <b>M12</b> | Cariótipo            | 10       | 46,XY[19]/44,X,-10[1]                                                                   |
|            | CGH-array            | 10       | arr(1-22,XY)x2                                                                          |

|              |           |   |                       |
|--------------|-----------|---|-----------------------|
| <b>T5-50</b> | Cariótipo | 4 | 46,XX[18]/47,XX,+5[2] |
| <b>T5-53</b> | Cariótipo | 6 | 46,XX[14]/47,XX,+5[6] |
|              | CGH-array | 9 | arr(X)×2,(5)×3 [0.1]  |

---

### 3. Crescimento Populacional

As linhagens MSC-T5 apresentaram menos dobras populacionais em relação às MSC-E, demonstrando um potencial de expansão extremamente limitado. Durante o período de 35 dias de expansão, T5-50 e T5-53 apresentaram respectivamente 0,4 e 1,7 dobras populacionais, enquanto M10 e M12, no mesmo intervalo de tempo, apresentaram 7,7 e 6,5 dobras (Figura 11). O tempo de dobra populacional de M10 e M12 entre as passagens 7 e 8 foi de 4 dias, enquanto que T5-50 e T5-53, no mesmo intervalo de passagens, apresentaram dobras populacionais a cada 26 e 27 dias, respectivamente. Ademais, T5-50 sofreu uma redução em sua população 27 dias após o início do ensaio, indicando o fim de seu potencial proliferativo. As MSC-E (M10 e M12), por sua vez, foram expandidas até a passagem 20, apresentando aumento no tempo de dobras populacionais, indicando a redução da velocidade de expansão, mas não demonstraram o fim de seu potencial proliferativo. Devido ao baixo crescimento populacional de T5-50, não foi possível realizar os ensaios subsequentes com essa linhagem, como o de proliferação e senescência celular, potência imunomoduladora e CGH-array.

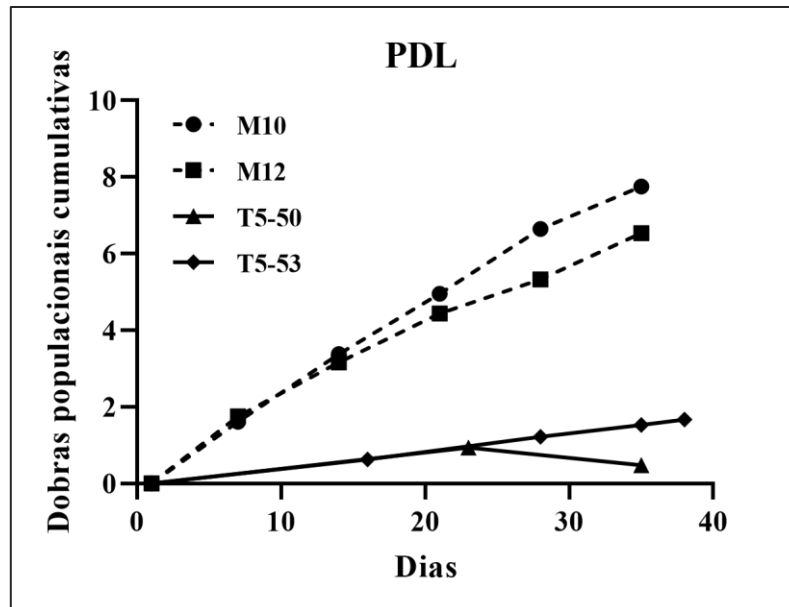


Figura 11 – Dobras populacionais cumulativas das linhagens de MSC expandidas por 35-38 dias.

#### 4. Proliferação celular

A proliferação celular de T5-53 foi significativamente menor que a dos controles MSC-E e linhagem tumoral, um comportamento diferente do esperado para células com potencial oncogênico. A porcentagem de células proliferativas foi de  $5,4 \pm 1,6$  em T5-53;  $18,4 \pm 1,6$  em M10;  $21,3 \pm 3,4$  em M12 e  $34,7 \pm 0,6$  em AT/RT-USP7 (Figura 12).

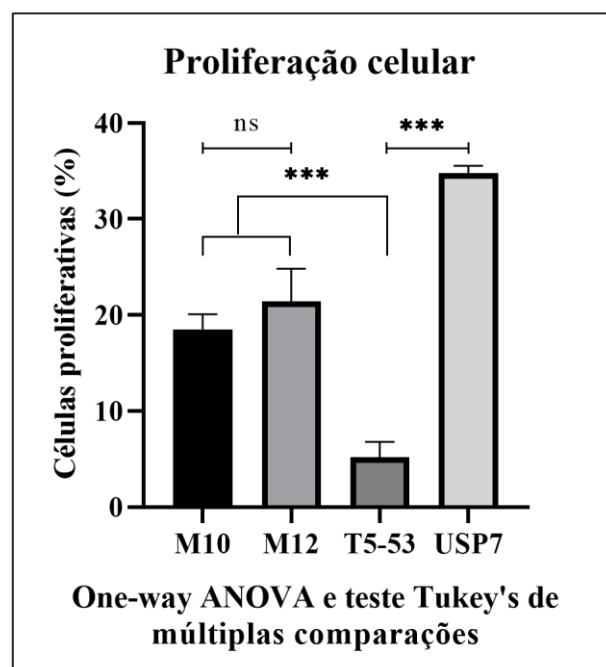


Figura 12- Porcentagem de células que apresentaram núcleos proliferativos marcados devido à incorporação de nucleosídeo análogo à timina (EdU). Exposição a EdU por 4 horas. ns: não significativo; \*\*\*:  $p < 0.001$

## 5. Senescência

Os ensaios de detecção de SA- $\beta$ -Gal indicaram que a linhagem mais senescente era T5-53. O ensaio colorimétrico de detecção de SA- $\beta$ -Gal revelou que a população de células T5-53 tinha 2,4 vezes mais células senescentes que M10 e 3,7 vezes mais que M12 ( $P < 0.0001$ ). A porcentagem de células positivas para SA- $\beta$ -Gal foi de  $74 \pm 7,8$  em T5-53,  $31 \pm 5$  em M10,  $20 \pm 2,9$  em M12 e  $2 \pm 0$  em AT/RT-USP7 (Figuras 13 e 14). O ensaio de fluorescência também indicou que a intensidade de SA- $\beta$ -Gal por célula foi significativamente maior em T5-53 em relação a MSC-E e AT/RT-USP7 ( $p < 0.0001$ ) (Figura 15).

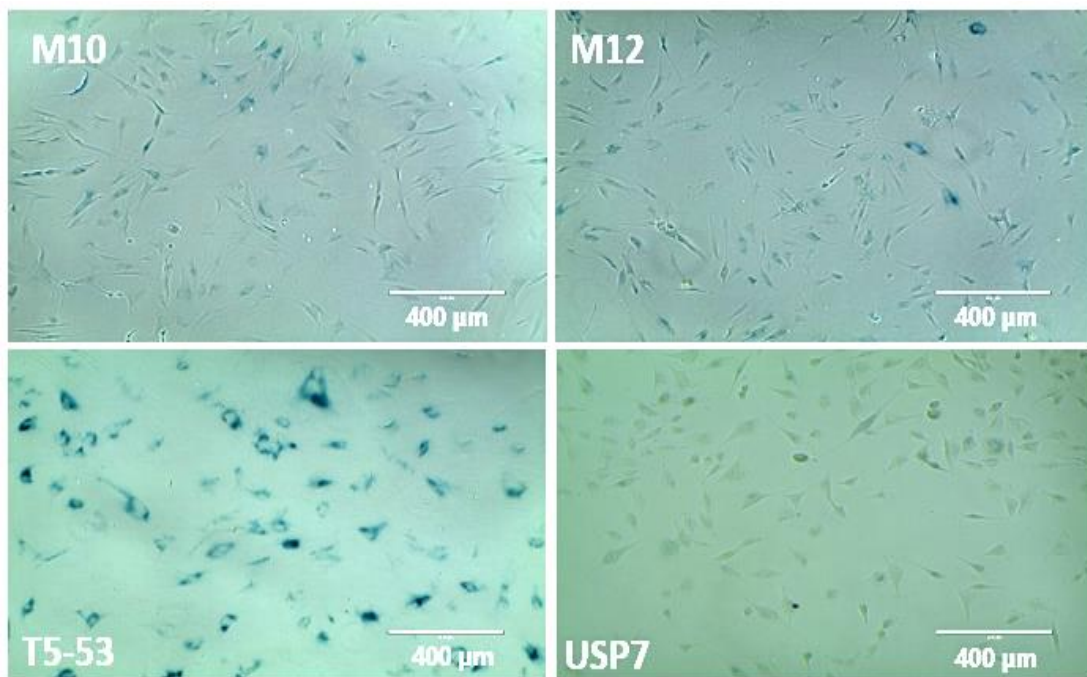


Figura 13 – Foto de linhagens de MSC após ensaio de detecção de SA- $\beta$ -Gal, marcação em azul. Imagens capturadas em microscópio *EVOS XL Core Imaging System*. Aumento 40x.

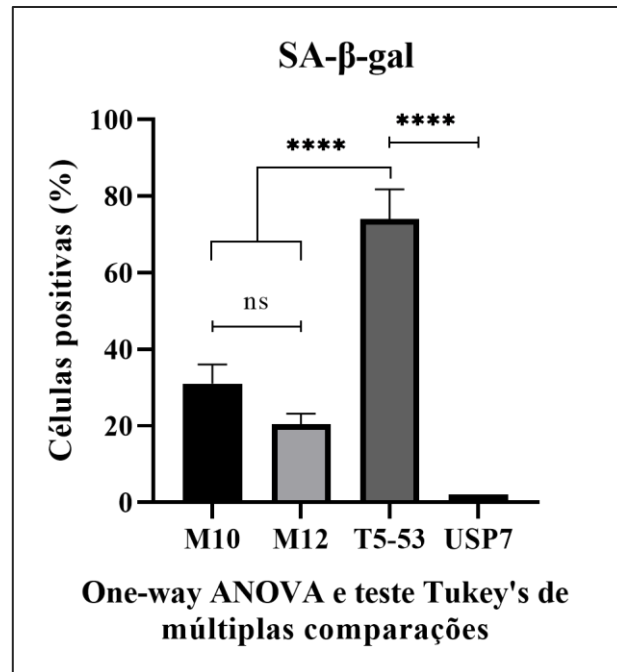


Figura 14 - Porcentagem de células positivas para a atividade de. SA-β-Gal, resultado do ensaio colorimétrico.

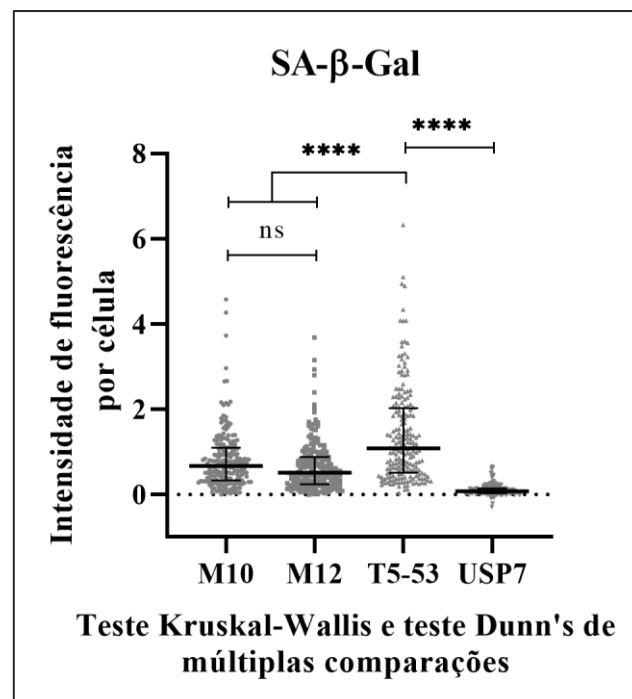


Figura 15 – Resultado do ensaio de detecção de SA-β-Gal por fluorescência. Intensidade mensurada por célula. Cada linhagem teve 200 células analisadas. Barras indicam a mediana e interquartil.

Apesar de não ter sido possível realizar ensaios de detecção de SA-β-gal em T5-50, as células dessa linhagem apresentaram uma morfologia típica de células senescentes com células grandes e achatadas (Figura 16).

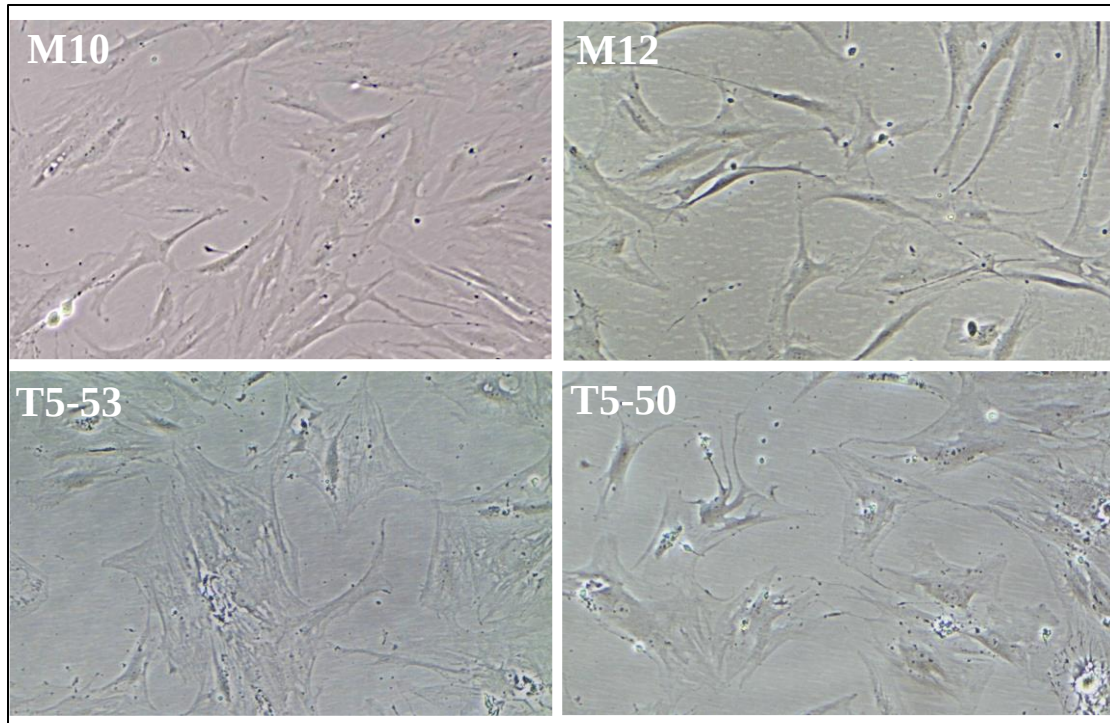


Figura 16 – Comparação da morfologia celular de M10 (Passagem 8) e M12 (Passagem 10) com T5-50 (Passagem 7) e T5-53 (Passagem 8). T5-50 e T5-53 possuem células com morfologia típica de célula senescente. Imagens capturadas em microscópio *EVOS XL Core Imaging System* com aumento de 100x.

## 6. Tumorigênese *in vivo*

Não houve desenvolvimento de tumor nos animais que receberam MSC-T5. Todos os animais que foram tratados com MSC com ou sem trissomia 5 foram observados por 6 meses e não apresentaram tumor. Dois dos três animais pertencentes ao grupo controle positivo tumoral (AT/RT-USP7) desenvolveram tumores que se tornaram visíveis entre 38 e 45 dias após a inoculação de células (Figura 17).

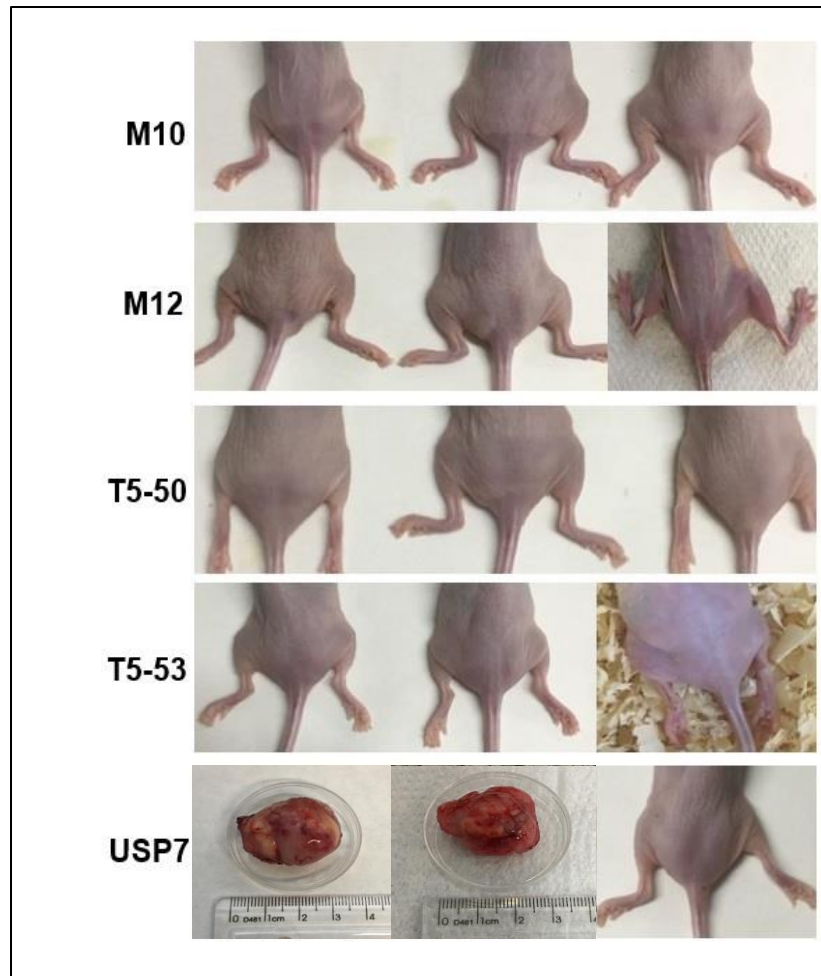


Figura 17– Fotografia dos flancos dos animais após eutanásia, região em que as células foram inoculadas. Animais 1 e 2 do grupo AT/RT-USP7 tiveram seus tumores diretamente fotografados.

Não houve diferença significativa entre as taxas de sobrevivência devido ao pequeno número de animais por grupo experimental ( $n=3$ ). Dois animais que receberam MSC tiveram que ser eutanasiados antes do fim do experimento, que durou 185 dias; um animal do grupo M12 foi eutanasiado 168 dias após a inoculação de células devido à perda de peso e um animal do grupo T5-53 foi eutanasiado 147 dias após a inoculação de células devido à perda do movimento das pernas traseiras (Tabela 5). Em ambos os animais foi realizada a análise macroscópica na região da inoculação e em toda a cavidade abdominal e tumores não foram encontrados.

*Tabela 5. Incidência de tumor, sobrevivência e sinais adversos em camundongos Nude 185 dias após injeção subcutânea de MSC ou células tumorais. Sobrevida após inoculação de células ( $p = 0.2247$ ).*

| Amostra inoculada | Descrição da amostra                          | Frequência de animais que desenvolveram tumor/total de animais | Sobrevivência 165 dias após inoculação | Sinais clínicos adversos               |
|-------------------|-----------------------------------------------|----------------------------------------------------------------|----------------------------------------|----------------------------------------|
| T5-50             | MSC humanas com alguns clones com trissomia 5 | 0/3                                                            | 100%                                   | Nenhum                                 |
| T5-53             | MSC humanas com alguns clones com trissomia 5 | 0/3                                                            | 67%                                    | 1 animal com mobilidade reduzida       |
| M10               | MSC humanas euploides                         | 0/3                                                            | 100%                                   | nenhum                                 |
| M12               | MSC humanas euploides                         | 0/3                                                            | 67%                                    | 1 animal com perda de peso consistente |
| USP7              | Células tumorais humanas ATRT                 | 2/3                                                            | 33%                                    | 2 animais desenvolveram tumor          |

## 7. Potência imunomoduladora

### 7.1 Detecção de HLA-DR por citometria de fluxo

Após estimulação de MSC com IFN $\gamma$  por 48 horas, a linhagem T5-53 não apresentou aumento na expressão de HLA-DR, enquanto nas linhagens MSC-E, o aumento foi detectado. Em M10 a expressão foi de 1,91% para 20,6% e em M12 foi de 1,94% para 19,8% da população de células (Tabela 6). Na figura 18 é possível observar um deslocamento para a direita do pico vermelho em M10 e M12, em resposta ao estímulo com IFN $\gamma$ .

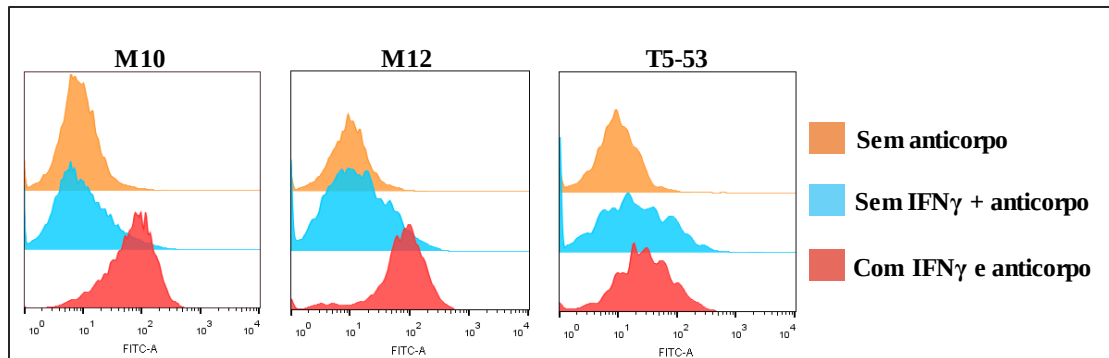


Figura 18 – Ensaio por citometria de fluxo para verificação de resposta imunomoduladora após exposição a IFN $\gamma$ . Grupo amarelo sem marcação de anticorpo. Grupo azul sem estimulação com IFN $\gamma$  e marcado com anticorpo FITC anti-HLA-DR. Grupo vermelho estimulado com IFN $\gamma$  por 48 horas e marcado com anticorpo FITC anti-HLA-DR.

Tabela 6 – Porcentagem de células HLA-DR<sup>+</sup> por citometria de fluxo. Grupo “controle” sem estímulo de IFN $\gamma$  e grupo “IFN $\gamma$ ”, estimulado com IFN $\gamma$  por 48 horas.

| Linhagem     | Controle | IFN $\gamma$ |
|--------------|----------|--------------|
| <b>M10</b>   | 1,91%    | 20,6%        |
| <b>M12</b>   | 1,94%    | 19,8%        |
| <b>T5-53</b> | 1,75%    | 1,21%        |

## 7.2 Expressão gênica.

Todas as linhagens de MSC, quando estimuladas com IFN $\gamma$ , apresentaram uma superexpressão dos genes alvos relacionados à atividade imunossupressora, em relação aos seus controles sem estimulação com IFN $\gamma$  ( $p < 0,0001$ ) (Figura 20). A análise de expressão gênica indica que mesmo com a trissomia 5, T5-53 apresenta uma resposta imunomoduladora a nível de mRNA, quando estimulada com IFN $\gamma$ , assim como as linhagens MSC-E.

A especificidade das reações com os primers desenhados pôde ser observada pelo pico único formado durante curva de dissociação da reação (Figura 19).

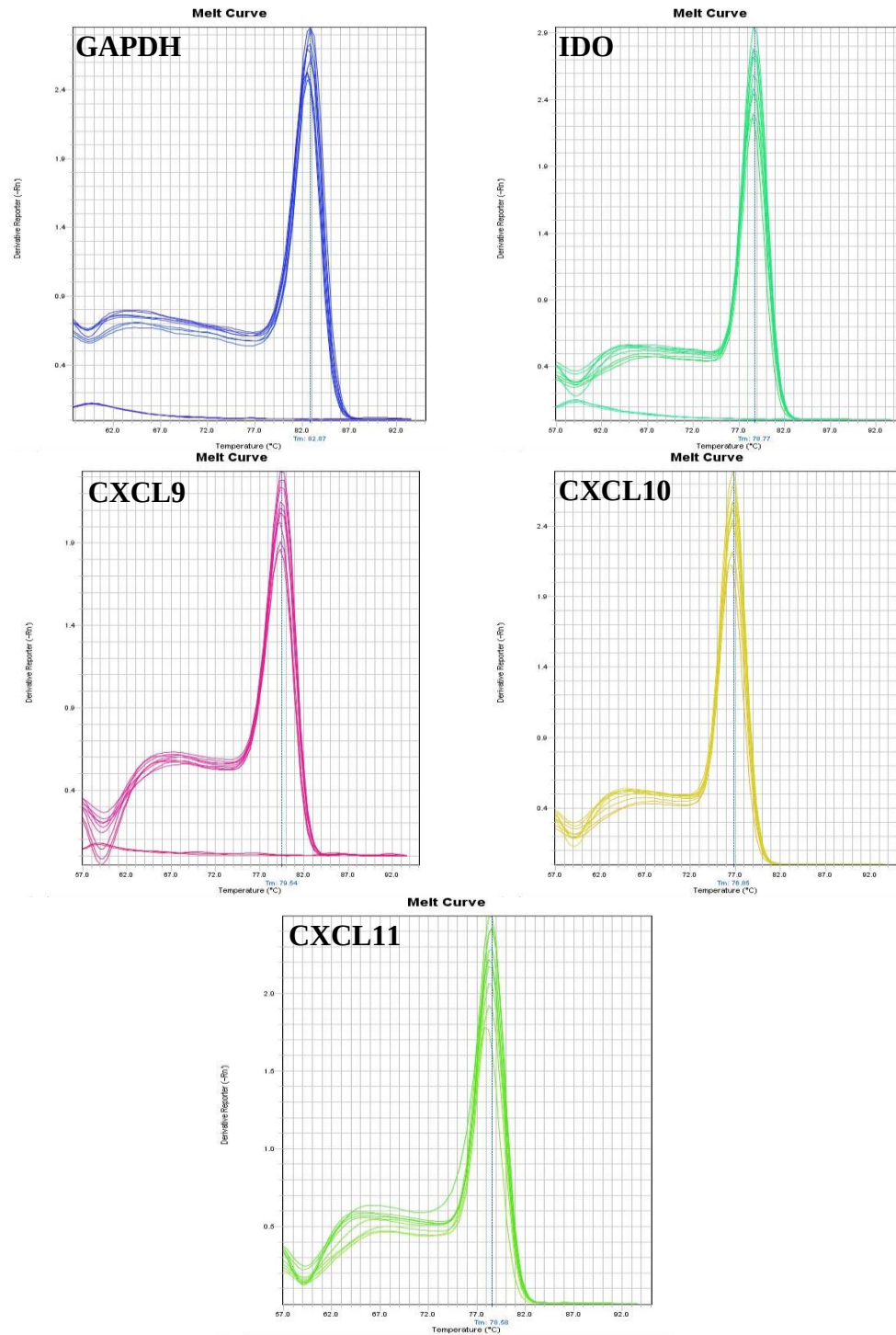


Figura 19 – Curvas de dissociação de produtos de amplificação por rt-PCR. Reações com cDNA de M10 IFN $\gamma$ . Todas as reações apresentam pico único, com as seguintes temperaturas de *melting* para cada alvo: *GAPDH* - 82,87 °C; *IDO* - 78,77 °C; *CXCL9* - 79,54 °C; *CXCL10* - 76,85 °C; *CXCL11* - 78,58 °C.

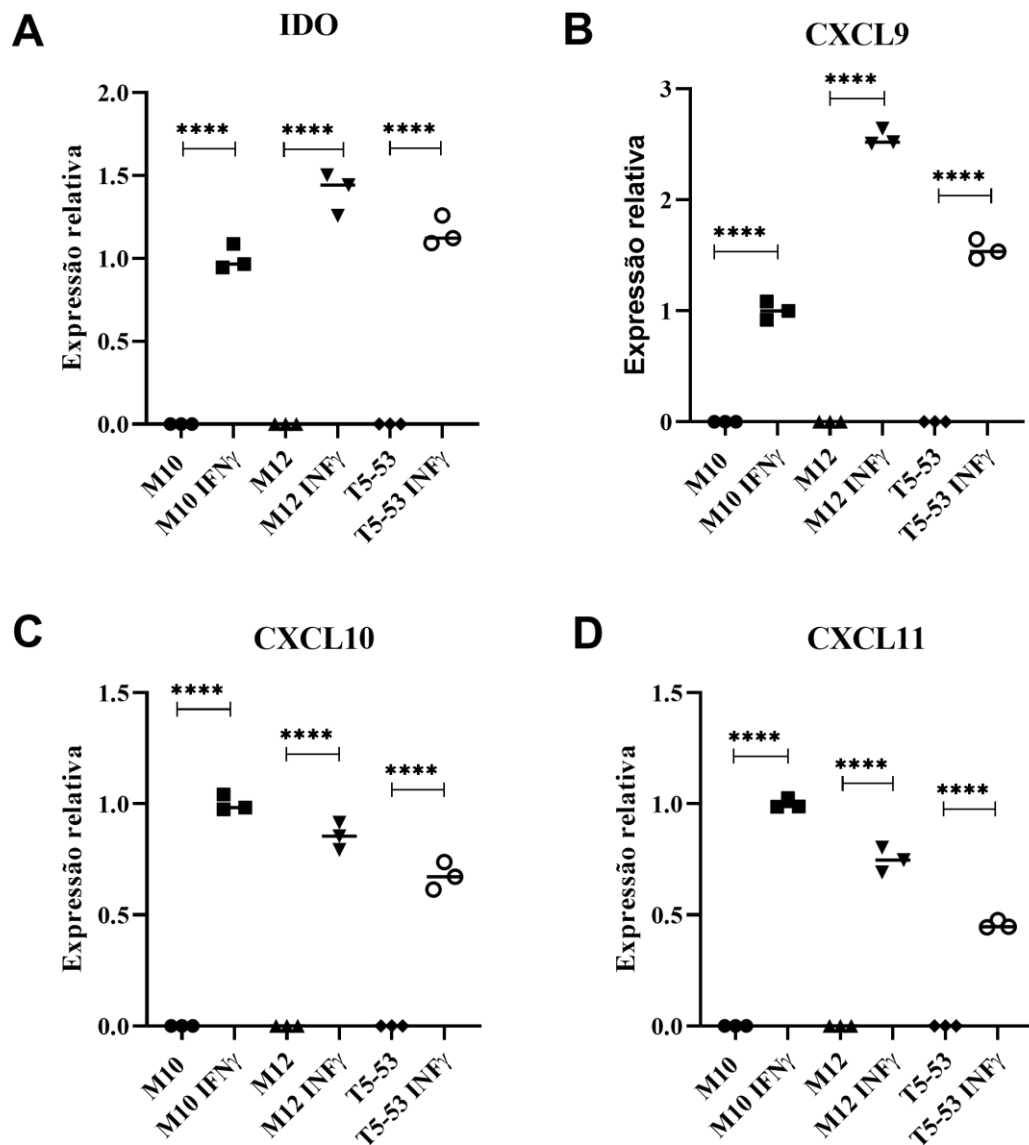


Figura 20 – Expressão relativa dos genes alvo: *IDO*, *CXCL9*, *CXCL10* e *CXCL11*. Valores normalizados pela expressão do endógeno *GAPDH* e pela expressão da amostra M10 IFN $\gamma$ . Grupos controle M10, M12 e T5-53 sem estimulação com IFN $\gamma$ . Grupos M10 IFN $\gamma$ , M12 IFN $\gamma$  e T5-53 IFN $\gamma$ , estimulado com IFN $\gamma$  40ng/mL por 48 horas. Sem diferença significativa entre os grupos controle. Comparação de expressão entre grupo controle e grupo estimulado foi significativa para todas as linhagens celulares e genes alvo (p-value <0,0001).

## V. Discussão

---

Estudos prévios que demonstraram o potencial tumorigênico de MSC não são suficientemente relevantes para auxílio na tomada de decisão da equipe médica dos CPCs, pois foram realizados com MSC que já haviam sofrido transformação neoplásica durante expansão *in vitro* (TARTE, *et al.*, 2010, WANG, 2005). Na realidade clínica, células que demonstram sinais de transformação neoplásica durante expansão, obviamente não são candidatas a aplicação no paciente. Sendo assim, o questionamento mais relevante para o contexto clínico é se MSC não transformadas, mas com baixas concentrações de alterações citogenéticas, incluindo a trissomia 5, poderiam dar origem a tumores no paciente.

Teoricamente, este é um processo cuja ocorrência é pouco provável, uma vez que a aneuploidia precisaria ser capaz de iniciar um processo de transformação neoplásica após a inoculação. A transformação de uma célula normal em célula neoplásica depende de múltiplas etapas, pois a progressão tumoral precisa do surgimento de novas mutações com potencial de conferir novas características tumorais (GRIZZI & CHIRIVA-INTERNATI, 2006). Novas mutações surgem no processo de divisão celular, seja por erros de replicação do DNA ou problemas de não-disjunção mitótica. Entretanto, MSC inoculadas *in vivo*, possuem baixo poder de fixação e geralmente permanecem pouco tempo nos tecidos (KEAN, *et al.*, 2013). Estudos que rastrearam a permanência de MSC *in vivo* não foram capazes de detectá-las 30 dias após a inoculação (PAN, *et al.*, 2014, TARTE, *et al.*, 2010). A baixa taxa de fixação de MSC nos tecidos faz com que sejam pouco propícias a sofrerem divisões celulares, pois precisam de ancoragem para sofrer mitose, apenas células transformadas conseguem se dividir independente de ancoragem,

entretanto, esse não é o caso de MSC candidatas a terapia celular (JINKA, *et al.*, 2012). Portanto, a curta permanência e baixa fixação inerentes a MSC após inoculação *in vivo*, dificultam a ocorrência de transformação neoplásica. De qualquer maneira, um pequeno número de MSC ainda é capaz de se fixar nos tecidos (PITTENGER, *et al.*, 2019) e não há como excluir a possibilidade de transformação dessas MSC, principalmente caso possuam uma alteração citogenética clonal.

A trissomia 5, além de recorrente em populações de MSC, se mostrou capaz de permanecer por longo período em tais expansões, entretanto, seus clones não apresentaram vantagem proliferativa, pois não houve um aumento na quantidade dos clones aneuploides. Apesar das técnicas citogenéticas utilizadas para quantificação da aneuploidia serem distintas, são representativas da população como um todo e sugerem que a população de células com a trissomia 5 da amostra T5-53 diminuiu ao longo das passagens. Outros estudos relatam o desaparecimento da trissomia 5 ao longo das passagens (TARTE, *et al.*, 2010; STULTZ, *et al.*, 2016). Portanto, ao contrário do que ocorre com as trissomias do 8 (NIKITINA, *et al.*, 2018) e 12 (BEN-DAVID, *et al.*, 2011), que conferem vantagem seletiva, os clones com a trissomia 5 tendem a diminuir durante o tempo de expansão. Sendo assim, a trissomia 5 não parece estar associada a uma vantagem proliferativa em expansões de MSC.

As linhagens com a trissomia 5 demonstraram baixo potencial proliferativo e menor crescimento populacional em relação às MSC euploides. Em contrapartida, as expansões de MSC com trissomia 5 do estudo de Tarte e colaboradores (2010), apresentaram dobras populacionais similares às MSC de cariótipo normal. A possível explicação para esse evento é que no estudo em questão, os clones com a trissomia 5 desapareceram rapidamente, provavelmente como resultado da seleção negativa dos clones aberrantes, o que impediu o comprometimento

da expansão como um todo. Entretanto, no presente estudo, as células com a trissomia 5 se mantiveram durante a expansão e sua presença pode ter impactado no potencial proliferativo das linhagens MSC-T5.

A resposta de senescência precoce resultou no baixo potencial proliferativo das linhagens com a trissomia 5. A senescência celular pode ser caracterizada pela alta atividade de SA- $\beta$ -Gal, perda do potencial proliferativo, alterações morfológicas e fenótipo secretivo associado a senescência (SASP) (KUMARI & JAT, 2021). A alta atividade de SA- $\beta$ -Gal revela que T5-53 ficou senescente precocemente em relação às MSC-E. Apesar da impossibilidade na realização dos ensaios de SA- $\beta$ -Gal em T5-50, podemos inferir que a linhagem ficou senescente, pois também apresentou perda do potencial proliferativo e morfologia típica de célula senescente, com células grandes e achatadas. Deste modo, as linhagens com trissomia 5 se tornaram senescentes precocemente em comparação às linhagens de MSC euploides. A presença de clones com aneuploidia pode ter contribuído com esse processo.

Aneuploidias causam desbalanços gênicos, que resultam em grande mudança fisiológica. Células aneuploides usualmente apresentam uma resposta padrão, que envolve proliferação celular mais lenta, estresse proteotóxico, maior instabilidade genética e aceleração do envelhecimento celular (CHUNDURI & STORCHOVÁ, 2019; LEVINE & HOLLAND, 2018). O estresse associado à aneuploidia pode desencadear uma resposta ao dano de DNA, ativando o gene p53 que inicia um processo de senescência celular ou apoptose (KUMARI & JAT, 2021; OU & SCHUMACHER, 2018). Portanto, células com aneuploidia geralmente apresentam um comportamento padrão que envolve menor taxa proliferativa e senescência celular.

Além do estresse padrão associado à aneuploidia, há respostas que são cromossomo específicas, ou seja, relacionadas à combinação

específica de genes presentes no cromossomo alterado. Há poucos registros na literatura sobre a resposta cromossomo específica da trissomia 5. Imagina-se que seja uma alteração cromossômica muito deletéria, uma vez que há apenas 7 registros de indivíduos que são mosaicos para essa alteração, e não há relato de indivíduo nascido vivo com a trissomia 5 completa (REITTINGER, *et al.*, 2017). Sua baixa ocorrência é indício de letalidade. Dentre os casos relatados de indivíduos mosaico, a maior parte apresenta múltiplas anomalias congênitas, restrição de crescimento intrauterino e atraso no crescimento. Além disso, há registros de que o trecho 5q35 é sensível a dosagem; sua duplicação está associada a um fenótipo nomeado como Síndrome de Sotos reversa, caracterizada por baixa estatura, microcefalia e atraso no crescimento (BERNHARDT, *et al.*, 2021). Os sintomas listados acima estão relacionados a um crescimento lento, que pode ser explicado pela proliferação lenta de células com mais cópias do cromossomo 5. Além dos dados *in vivo*, células com a trissomia e tetrassomia 5 também apresentam crescimento populacional lento *in vitro* (STINGELE, *et al.*, 2012). Portanto, é possível inferir que a trissomia 5 possivelmente está associada à menor taxa proliferativa celular.

Devido ao crescimento lento de células com a trissomia 5, era esperado que as linhagens MSC-T5 seriam mais senescentes e apresentariam um crescimento populacional mais lento que MSC euploides. Entretanto, a lentidão no crescimento populacional ocorreu em uma intensidade além da esperada. A alteração citogenética estava presente em 10-30% das MSC-T5, por esse motivo, era esperado que a senescência de T5-53 fosse entre 10-30% maior que nas MSC de cariótipo normal, mas T5-53 tinha mais que o dobro de células senescentes em relação às MSC-E. Concluímos então que a resposta de senescência não veio apenas das células aneuploides, mas também de células de cariótipo normal. Hipotetizamos que uma indução parácrina à senescência pode ter

ocorrido nessas expansões. Células senescentes possuem um fenótipo secretivo que tem o potencial de induzir a senescência das células vizinhas saudáveis pela secreção de fatores solúveis tais como TGF- $\beta$  (ACOSTA, *et al.*, 2014) . Nesse sentido, primeiro as células com a trissomia 5 teriam se tornado senescentes em resposta à aneuploidia e depois foram capazes de estimular as células vizinhas, resultando na senescência precoce de toda a população.

A senescência celular impede a transformação neoplásica porque inibe a imortalização celular, uma habilidade importante para o processo de transformação, uma vez que resulta no potencial proliferativo infinito que garante a possibilidade de aquisição de novas mutações. Por esse motivo, células com potencial neoplásico precisam se manter proliferativas evitando a senescência celular. Sendo assim, as linhagens com a trissomia 5 apresentaram um fenótipo oposto ao de uma célula transformada, com crescimento populacional lento, senescência e diminuição no número de células com a alteração cromossômica, sugerindo que a trissomia 5 não é capaz de iniciar um processo de transformação celular durante expansão *in vitro*.

Apesar das aberrações cromossômicas estarem presentes em 90% dos tumores sólidos, a ocorrência da trissomia 5 é baixa em tumores, inclusive sarcomas (BEN-DAVID, *et al.*, 2011), o tipo de tumor gerado por células de origem mesenquimal (PAN, *et al.*, 2014; WANG, *et al.*, 2005). A trissomia 5 em células tumorais geralmente está associada a outras aberrações cromossômicas (MITELMAN *et al.*, 2021). Nesse sentido, a trissomia 5 não parece ser uma alteração citogenética que contribua com o início e progressão tumoral ou com potencial de desencadear sozinha um processo de transformação neoplásica. A rara presença da trissomia 5 em alguns tipos de tumores parece ser resultado da instabilidade genética inerente à neoplasia.

MSC humanas derivadas na medula óssea com a trissomia 5 não demonstraram potencial tumorigênico quando comparadas com seus controles euploides. O processo de progressão tumoral pode ser demorado por envolver múltiplas etapas, por esse motivo, o estudo *in vivo* teve duração de 6 meses. A maior parte dos estudos que avaliam o potencial tumorigênico de MSC, duram em média de 1 a 2 meses (PAN, et al., 2014; TARTE, et al., 2010; WANG, et al., 2005). Mesmo com o longo período de observação, os camundongos Balb/c NUDE que receberam MSC com e sem trissomia 5, não desenvolveram tumor. Do mesmo modo, não há na literatura registros de MSC humanas não transformadas que causaram tumor em animais ou humanos, inclusive MSC com alterações citogenéticas. MSC com a trissomia 5 (TARTE, *et al.*, 2010) e do 7 (MIZUNO, *et al.*, 2021) já foram inoculadas em humanos, que foram acompanhados por 2 e 5 anos, respectivamente, sem sinais de formação de tumor. Até o momento só existem relatos de MSC já transformadas capazes de dar origem a tumores, portanto, não há evidência de que MSC não transformadas podem dar origem a tumores após inoculação *in vivo*.

Além da trissomia 5 aparentemente não ser capaz de iniciar um processo de transformação celular, para o contexto da terapia celular ainda é necessário saber se a alteração citogenética resulta no fim de seu potencial terapêutico. A linhagem T5-53 estava senescente quando o ensaio de potência foi realizado, entretanto a condição não inviabilizou a avaliação do impacto da trissomia sobre seu potencial imunomodulador, afinal MSC senescentes, quando estimuladas com  $\text{INF}\gamma$ , reestabelecem sua propriedade imunomoduladora, demonstrando superexpressão de IDO e diminuindo a proliferação de linfócitos em co-cultivo.(CHINNADURAI, *et al.*, 2017). T5-53 quando estimulada com  $\text{INF}\gamma$  apresentou um perfil transcricional imunomodulador (CHINNADURAI, *et al.*, 2018), similar às MSC de cariótipo normal estimuladas com  $\text{INF}\gamma$ , com superexpressão de

*IDO*, *CXCL9*, *CXCL10* e *CXCL11*. Tal resultado indica que a presença da trissomia 5 pode não impactar em seu potencial terapêutico.

Um resultado contraditório à análise de expressão gênica, foi a análise de células HLA-DR<sup>+</sup> em resposta ao estímulo com IFN $\gamma$ , uma vez que T5-53 IFN $\gamma$  não aumentou a porcentagem de células positivas para o marcador. Chinnadurai e colaboradores (2017) presenciaram o mesmo evento, detectaram que MSC senescentes não superexpressam HLA-DR quando estimuladas com IFN $\gamma$ . Entretanto, a superexpressão de HLA-DR é dispensável para o processo de imunomodulação, uma vez que MSC são capazes de inibir a proliferação de linfócitos, mesmo com o silenciamento de HLA-DR (CHINNADURAI, *et al.*, 2017). Sendo assim, HLA-DR não participa diretamente do processo de imunomodulação de MSC, portanto não é um bom marcador para a determinação de sua propriedade imunomoduladora.

A enzima diretamente relacionada a este processo é a Indoleamine-2,3-dioxygenase (*IDO*) que degrada triptofano, produzindo quinurenina que inibe a atividade de linfócitos T. O silenciamento de *IDO* diminui a atividade imunomoduladora de MSC (CHINNADURAI, *et al.*, 2017). Portanto, a superexpressão de *IDO* é um indicador mais representativo de atividade imunomoduladora. O motivo de T5-53 não demonstrar aumento de células HLA-DR<sup>+</sup> foi a sua senescência e não a perda de seu potencial imunomodulador que pôde ser demonstrado pela superexpressão de *IDO* similar à de MSC de cariótipo normal.

Vale ressaltar que devido aos diversos mecanismos de ação explorados em terapia celular, este resultado não é capaz de certificar que todas as propriedades terapêuticas de MSC são mantidas na presença da trissomia 5. Neste caso, cabe ao centro de processamento celular realizar o teste adequado para testar a potência desejada para a terapia em questão, assim como estabelecido pela Anvisa (BRASIL, 2018) e ISCT

(GALIPEAU *et al.*, 2016). Os experimentos deste estudo elucidam que mesmo com clones com trissomia 5, MSC podem manter seu potencial terapêutico, um fator que antes não era considerado.

Os achados desse estudo não devem ser extrapolados para outras alterações cromossômicas. Cada ganho, perda ou translocação cromossômica pode ter diferentes consequências. Novos estudos são necessários para a melhor compreensão das consequências de outras alterações citogenéticas em um contexto clínico. Evidentemente, a preferência para infusão no paciente deve ser dada a MSC de cariótipo normal, mas em uma situação em que a alteração citogenética surgiu espontaneamente, é importante saber sobre as consequências dessa anormalidade em terapia celular.

Além da análise citogenética, outros parâmetros podem ser considerados para avaliação do potencial oncogênico de produtos de MSC. A possibilidade de transformação celular apenas é considerada no caso da detecção de alterações citogenéticas, mas esse processo pode ser desencadeado por alterações epigenéticas, gênicas e CNVs que não poderiam ser detectadas em um cariótipo convencional, o teste genético usualmente utilizado na liberação de MSC para infusão em paciente. MSC de estudos anteriores que sofreram transformação espontânea apresentam além das alterações cromossômicas, mudanças morfológicas, mudança na expressão de marcadores de superfície, maior taxa proliferativa e menor adesão ao plástico (WANG, *et al.*, 2005; PAN, *et al.*, 2014). Os parâmetros listados acima caracterizam, de fato, MSC após transformação neoplásica. Sendo assim, tais parâmetros poderiam ser avaliados em conjunto com a informação citogenética de MSC, para uma tomada de decisão sobre sua liberação excepcional.

Os achados desse estudo revelam que a presença de clones com a trissomia 5 em expansões de MSC parece não estar associado ao aumento do potencial tumorigênico, nem perda da propriedade imunomoduladora, portanto, podem ser mais seguras e eficientes do que previamente imaginado. Tal conhecimento pode dar suporte para a tomada de decisão da equipe médica a respeito da liberação excepcional de produtos autólogos de MSC para terapia celular sob cenários críticos quando uma nova coleta ou processamento de MSC não for possível.

## VI. Conclusões

---

- MSC com a trissomia 5 não apresentaram potencial tumorigênico *in vivo*, pois não foram capazes de gerar tumor em camundongos Balb c/NUDE.
- O crescimento populacional de MSC-T5 foi inferior ao de MSC-E. Uma das linhagens apresentou perda total do potencial de expansão, indicando que a trissomia não resultou em imortalização celular.
- A taxa proliferativa de MSC com a trissomia 5 foi significativamente menor que a de MSC de cariótipo normal, indicando que a trissomia não confere vantagem proliferativa.
- MSC com a trissomia 5 apresentaram uma senescência precoce em relação às MSC-E, o que justifica a baixa taxa proliferativa e pequeno crescimento populacional. Todas essas características demonstram que a trissomia 5 não causou transformação neoplásica durante expansão, portando não foi detectado potencial oncogênico *in vitro*.
- A presença de clones com a trissomia 5 não afetou a propriedade imunomoduladora de MSC-T5, pois assim como as MSC de cariótipo normal, T5-53 demonstrou um perfil transcricional imunomodulador em resposta a estimulação com citocina inflamatória.

## VII. Resumo

---

Células estromais mesenquimais (MSC) podem ser isoladas e expandidas para uso em terapia celular. Durante o processo de expansão, podem surgir alguns clones aneuploides em suas populações, que geralmente são descartadas devido ao receio da aneuploidia poder contribuir com a formação de tumores nos pacientes. Entretanto, estudos que demonstram o potencial tumorigênico de MSC, utilizam células que já sofreram transformação neoplásica durante expansão *in vitro*. Na realidade clínica, células que demonstram sinais de transformação não são candidatas a infusão no paciente. Sendo assim, é mais relevante para o contexto clínico saber se MSC não transformadas, mas com clones com aneuploidias, incluindo a trissomia 5, poderiam dar origem a tumores nos pacientes e se são capazes de manter sua propriedade terapêutica. Para tanto, o potencial tumorigênico e imunomodulador de MSC com clones da trissomia 5 (MSC-T5) que surgiram espontaneamente durante expansão para uso clínico foi avaliado. Células tumorais, MSC-T5 e MSC euploides tiveram seu crescimento populacional, proliferação e senescência celular avaliados comparativamente. A potência imunomoduladora foi avaliada por expressão gênica em resposta a estimulação com IFN $\gamma$  e o potencial tumorigênico *in vivo* foi investigado por injeção subcutânea das células em camundongos Balb c/ NUDE. MSC-T5 não demonstrou potencial oncogênico *in vitro*, pois apresentaram baixo potencial proliferativo e senescência precoce em relação aos controles, resultando em baixo potencial de expansão. Sua resposta transcricional ao IFN $\gamma$  é compatível com MSC com potência imunomoduladora e não demonstraram potencial tumorigênico *in vivo*. Portanto, MSC-T5 são mais seguras e potentes do que previamente imaginado para uso clínico.

## VIII. Abstract

---

Mesenchymal stromal cells (MSC) can be harvested and expanded for cell therapy applications. During the expansion process, some aneuploid clones can emerge in MSC populations. These samples are usually discarded due to the risk of tumor development in patients. However, studies that show the tumorigenic potential of MSC use already transformed MSC with chromosomal alterations. In a clinic context, cells with signals of transformation are not allowed to be released into patient. Therefore, the most relevant question in a clinic context is whether non-transformed MSC with clones with cytogenetic alterations, including trisomy 5, would be able to give rise to tumors in the patient and whether they can keep its therapeutics properties. In this context, the tumorigenic and immunomodulatory potential of MSC with trisomy 5 (MSC-T5) that have emerged spontaneously during expansion for clinic use were evaluated. Tumor cells, MSC-T5 and euploid MSC were comparatively evaluated according to its population growth, cell proliferation and cell senescence. The immunomodulatory potential was evaluated by gene expression in response to IFN $\gamma$  stimulation and the *in vivo* tumorigenic potential were accessed by cell subcutaneous injection into Balb c/ NUDE mice. MSC-T5 did not show an oncogenic potential *in vitro*, as it showed a low proliferative potential and early senescence in comparison to euploid MSC and tumor controls, resulting in a low expansion potential. MSC with clones with trisomy 5 showed a transcriptional response to IFN $\gamma$ , which is compatible with MSC with immunomodulatory potency. In addition, they did not show any *in vivo* tumorigenic potential. Therefore, MSC with trisomy 5 are safer and more potent for clinical application than previously thought.

## IX. Referências Bibliográficas

---

ATCC® Animal Cell Culture Guide. Disponível em: < [https://atcc.org/en/Documents/Marketing\\_Literature/Animal\\_Cell\\_Culture\\_Guide.aspx](https://atcc.org/en/Documents/Marketing_Literature/Animal_Cell_Culture_Guide.aspx) >. Acesso em: 1 mar. 2021.

ACOSTA, J. C. *et al.* "A complex secretory program orchestrated by the inflammasome controls paracrine senescence", **Nature Cell Biology**, v. 15, n. 8, p. 978–990, 2014. DOI: 10.1038/ncb2784.A.

AMARIGLIO N. *et al.* " Donor-derived brain tumor following neural stem cell transplantation in an ataxia telangiectasia patient", **PLoS Medicine**, v.6, n.2, e1000029, 2019. DOI:10.1371/journal.pmed.1000029.

BAIRD, D. M.; HENDRICKSON, E. A. "Telomeres and Chromosomal Translocations". In: Zhang, Y. (eds) **Chromosome Translocation. Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 1044, p.89-112, 2018. Springer, Singapore. DOI: 10.1007/978-981-13-0593-1\_7

BARKHOLT, L. *et al.* "Risk of tumorigenicity in mesenchymal stromal cell-based therapies - Bridging scientific observations and regulatory viewpoints", **Cytotherapy**, v. 15, n. 7, p. 753–759, 2013. DOI: 10.1016/j.jcyt.2013.03.005.

BEN-DAVID, U.; MAYSHAR, Y.; BENVENISTY, N. "Synthesis Large-Scale Analysis Reveals Acquisition of Lineage-Specific Chromosomal Aberrations in Human Adult Stem Cells", **Stem Cell**, v. 9, n. 2, p. 97–102, 2011. DOI: 10.1016/j.stem.2011.06.013.

BERNHARDT, I. T.; GUNN, A. J.; CARTER, P. J. "Growth hormone treatment for short stature associated with duplication of the nsd1 sotos syndrome gene", **Endocrinology, Diabetes and Metabolism Case Reports**, v. 2021, 20-0033, 2021. DOI: 10.1530/EDM-20-0033.

BINATO, R. *et al.* "Stability of human mesenchymal stem cells during in

vitro culture: Considerations for cell therapy", **Cell Proliferation**, v. 46, n. 1, p. 10–22, 2013. DOI: 10.1111/cpr.12002.

BONAB, M. M. *et al.* "Aging of mesenchymal stem cell in vitro", **BMC Cell Biology**, v. 7, p. 14, 2006. DOI: 10.1186/1471-2121-7-14.

BORGONOVO, T. *et al.* "Emergence of clonal chromosomal alterations during the mesenchymal stromal cell cultivation", **Molecular Cytogenetics**, v. 8, n. 94, 2015. DOI: 10.1186/s13039-015-0197-5.

BURA, A. *et al.* "Phase I trial : the use of autologous cultured adipose-derived stroma / stem cells to treat patients with non-revascularizable critical limb ischemia", **Cytotherapy**, v. 16, n. 2, p. 245–257, 2014. DOI: 10.1016/j.jcyt.2013.11.011.

BUSUTTIL, R. A. *et al.* "Oxygen accelerates the accumulation of mutations during the senescence and immortalization of murine cells in culture", **Aging Cell**, v.2, n. 6, p. 287–294, 2003. DOI: 10.1046/j.1474-9728.2003.00066.x.

CAI, J. *et al.* "Whole-genome sequencing identifies genetic variances in culture-expanded human mesenchymal stem cells", **Stem Cell Reports**, v. 3, n. 2, p. 227–233, 2014. DOI: 10.1016/j.stemcr.2014.05.019.

CAPELLI, C. *et al.* "Frequent occurrence of non-malignant genetic alterations in clinical grade mesenchymal stromal cells expanded for cell therapy protocols", **Haematologica**, v. 99, n. 6, p.94-97, 2014. DOI: 10.3324/haematol.2014.104711.

CAPLAN, A. I. "Mesenchymal stem cells: Time to change the name!", **Stem Cells Translational Medicine**, v. 6, n. 6, p. 1445–1451, 2017. DOI: 10.1002/sctm.17-0051.

CAPLAN, A. I. "Mesenchymal stem cells", **Journal of Orthopaedic Research**, v. 9, n. 5, p. 641–650, 1991. DOI: 10.1002/jor.1100090504.

CARIAS, R. B. V. *et al.* "Qualidade dos produtos de terapias avançadas : requisitos de células extensamente manipuladas usadas em terapias

celulares e em bioengenharia ", **Vigilância Sanitária em Debate**, v. 6, n. 1, p. 84–95, 2018. DOI: 10.22239/2317-269X.01048.

CHINNADURAI, R. *et al.* "Immune dysfunctionality of replicative senescent mesenchymal stromal cells is corrected by IFN $\gamma$  priming", **Blood Advances**, v. 1, n. 11, p. 628–643, 2017. DOI: 10.1182/bloodadvances.2017006205.

CHINNADURAI, R. *et al.* "Potency Analysis of Mesenchymal Stromal Cells Using a Combinatorial Assay Matrix Approach", **Cell Reports**, v. 22, n. 9, p. 2504–2517, 2018. DOI: 10.1016/j.celrep.2018.02.013.

CHUNDURI, N. K.; STORCHOVÁ, Z. "The diverse consequences of aneuploidy", **Nature Cell Biology**, v. 21, n. 1, p. 54–62, 2019. DOI: 10.1038/s41556-018-0243-8.

DOMINICI, M. *et al.* "Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement", **Cytotherapy**, v. 8, n. 4, p. 315–317, 2006. DOI: 10.1080/14653240600855905.

DÜRRBAUM, M. *et al.* "Unique features of the transcriptional response to model aneuploidy in human cells", **BMC Genomics**, v. 15 p. 139, 2014. DOI: 10.1186/1471-2164-15-139.

ESTRADA, J. *et al.* "Culture of human mesenchymal stem cells at low oxygen tension improves growth and genetic stability by activating glycolysis", **Cell Death and Differentiation**, v. 19, n.5, p. 743–755, 2012. DOI: 10.1038/cdd.2011.172.

ESTRADA, J. C. *et al.* "Human mesenchymal stem cell-replicative senescence and oxidative stress are closely linked to aneuploidy.", **Cell death & disease**, v. 4, n.6, p.e691, 2013. DOI: 10.1038/cddis.2013.211.

FEUK, L.; CARSON, A; SCHERER, S. W. "Structural variation in the human genome". **Nature Reviews Genetics**, v. 7 , p. 85–97, 2006. DOI: 10.1038/nrg1767.

GALIPEAU, J.; SENSÉBÉ, L. "Mesenchymal Stromal Cells: Clinical Challenges and Therapeutic Opportunities", **Cell Stem Cell**, v. 22, n. 6, p. 824–833, 2018. DOI: 10.1016/j.stem.2018.05.004.

GALIPEAU, J. *et al.* "International Society for Cellular Therapy perspective on immune functional assays for mesenchymal stromal cells as potency release criterion for advanced phase clinical trials", **Cytotherapy**, v. 18, n. 2, p. 151–159, 2016. DOI: 10.1016/j.jcyt.2015.11.008.

GARCIA, S. *et al.* "Pitfalls in spontaneous in vitro transformation of human mesenchymal stem cells", **Experimental Cell Research**, v. 316, n. 9, p. 1648–1650, 2010. DOI: 10.1016/j.yexcr.2010.02.016.

GRIZZI, F.; CHIRIVA-INTERNATI, M. "Cancer: Looking for simplicity and finding complexity", **Cancer Cell International**, v. 6, n.4, 2006. DOI: 10.1186/1475-2867-6-4.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. "Hallmarks of cancer: The next generation", **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–674, 2011. DOI: 10.1016/j.cell.2011.02.013.

HAQUE, N. *et al.* "Hypoxic culture conditions as a solution for mesenchymal stem cell based regenerative therapy", **The Scientific World Journal**, v. 2013, 2013. DOI: 10.1155/2013/632972.

HERNIGOU, J. *et al.* "Role of Scaffolds, Subchondral, Intra-Articular Injections of Fresh Autologous Bone Marrow Concentrate Regenerative Cells in Treating Human Knee Cartilage Lesions: Different Approaches and Different Results". **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 8 p. 3844, 2021. DOI: 10.3390/ijms22083844.

HORWITZ, E. M. *et al.* "Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement", **Cytotherapy**, v. 7, n. 5, p. 393–395, 2005. DOI: 10.1080/14653240500319234.

JINKA, R. *et al.* "Alterations in cell-extracellular matrix interactions during progression of cancers", **International Journal of Cell Biology**, v. 2012, 219196, 2012. DOI: 10.1155/2012/219196.

KAID, C. *et al.* "Zika virus selectively kills aggressive human embryonal CNS tumor cells in vitro and in vivo", **Cancer Research**, v. 78, n. 12, p. 3363–3374, 2018. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-17-3201.

KEAN, T. J. *et al.* "MSCs: Delivery routes and engraftment, cell-targeting strategies, and immune modulation", **Stem Cells International**, v. 2013, 732742, 2013. DOI: 10.1155/2013/732742.

KIM, M. *et al.* "Passage-dependent accumulation of somatic mutations in mesenchymal stromal cells during in vitro culture revealed by whole genome sequencing", **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, 14598, 2017. DOI: 10.1038/s41598-017-15155-5.

KRAMPERA M. *et al.* MSC Committee of the International Society for Cellular Therapy (ISCT). Immunological characterization of multipotent mesenchymal stromal cells - The International Society for Cellular Therapy (ISCT) working proposal. **Cytotherapy**. v. 15, n 9, p. 1054 - 1061, 2013. DOI: 10.1016/j.jcyt.2013.02.010.

KUIJK, E. *et al.* "The mutational impact of culturing human pluripotent and adult stem cells", **Nature Communications**, v. 11, n. 1, p. 2493, 2020. DOI: 10.1038/s41467-020-16323-4.

KUMARI, R.; JAT, P. "Mechanisms of Cellular Senescence : Cell Cycle Arrest and Senescence Associated Secretory Phenotype", **Frontiers in Cell and Development Biology**, v. 9, 645593, 2021. DOI: 10.3389/fcell.2021.645593.

LEE, J. W. *et al.* "A randomized, open-label, multicenter trial for the safety and efficacy of adult mesenchymal stem cells after acute myocardial infarction", **Journal of Korean Medical Science**, v. 29, n. 1, p. 23–31, 2014. DOI: 10.3346/jkms.2014.29.1.23.

LEVINE, M. S., HOLLAND, A. J. "The impact of mitotic errors on cell proliferation and tumorigenesis", **Genes and Development**, v. 32, n. 9–10, p. 620–638, 2018. DOI: 10.1101/gad.314351.118.

LUKOMSKA, *et al.* "Challenges and Controversies in Human Mesenchymal Stem Cell Therapy", **Stem Cells International**, 2019. DOI: 10.1155/2019/9628536.

MCLEOD, C. M., MAUCK, R. L. "On the origin and impact of mesenchymal stem cell heterogeneity: New insights and emerging tools for single cell analysis", **European Cells and Materials**, v. 34, p. 217–231, 2017. DOI: 10.22203/eCM.v034a14.

MCGOWAN-JORDAN J.; SIMONS A.; SCHMID M (eds). ISCN: an international system for human cytogenomic nomenclature (2016). Basel; New York : Karger. 2016.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). " Resolução da Diretoria Colegiada - RDC No 214, de 7 de Fevereiro de 2018, dispõe sobre Boas Práticas em Células Humanas para Uso Terapêutico e pesquisa clínica". Diário Oficial da União, nº36 Poder Executivo, 22 de fev. 2018.

MITELMAN F.; JOHANSSON B.; MERTENS F. (Eds.). **Mitelman Database of Chromosome Aberrations and Gene Fusions in Cancer**. 2021. Disponível em: <https://mitelmandatabase.isb-cgc.org>. Acesso em: 7 dez. 2021.

MIZUNO, M. *et al.* "Transplantation of human autologous synovial mesenchymal stem cells with trisomy 7 into the knee joint and 5 years of follow-up", **Stem Cells Translational Medicine**, v. 10, n. 11, p. 1530–1543, 2021. DOI: 10.1002/sctm.20-0491.

NASTASI, C.; MANNARINO, L.; INCALCI, M. D. "DNA Damage Response and Immune Defense", **International Journal of Molecular Science**, v.21 , n.20 , p. 7504, 2020. DOI: 10.3390/ijms21207504

NERI, S. "Genetic Stability of Mesenchymal Stromal Cells for Regenerative Medicine Applications: A Fundamental Biosafety Aspect", **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 10, p. 2406, 2019. DOI: 10.3390/ijms20102406.

NIKITINA, V. *et al.* "Clonal chromosomal and genomic instability during human multipotent mesenchymal stromal cells long-term culture", **PLoS ONE**, v. 13, n. 2, e0192445, 2018. DOI: 10.1371/journal.pone.0192445.

NUSSBAUM, R. L. *et al.*, "Variação Genética em Indivíduos e Populações: Mutação e Polimorfismo". In: **Thompson & Thompson Genética Médica**, 7<sup>o</sup> ed., Elsevier Health Sciences Brazil, 2008.

OU, H. L., SCHUMACHER, B. "DNA damage responses and p53 in the aging process", **Blood**, v. 131, n. 5, p. 488–495, 2018. DOI: 10.1182/blood-2017-07-746396.

PAN, Q. *et al.* "Detection of spontaneous tumorigenic transformation during culture expansion of human mesenchymal stromal cells", **Experimental Biology and Medicine**, v. 239, n. 1, p. 105–115, 2014. DOI: 10.1177/1535370213506802.

PITTENGER, M. F. *et al.* "Mesenchymal stem cell perspective: cell biology to clinical progress", **NPJ Regenerative Medicine**, v. 4, n. 22, 2019. DOI: 10.1038/s41536-019-0083-6.

PITTENGER, M. F. *et al.* "Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells", **Science**, v. 284, n. 5411, p. 143–147, 1999. DOI: 10.1126/science.284.5411.143.

REITTINGER, A. M. *et al.* "A prenatal diagnosis of mosaic trisomy 5 reveals a postnatal complete uniparental disomy of chromosome 5 with multiple congenital anomalies", **American Journal of Medical Genetics, Part A**, v. 173, n. 9, p. 2528–2533, 2017. DOI: 10.1002/ajmg.a.38344.

ROBB, K. *et al.* "Mesenchymal stromal cell therapy: progress in manufacturing and assessments of potency", **Cytotherapy**, v. 21, n. 3, p.

289-306, 2018. DOI: 10.1016/j.jcyt.2018.10.014.

RØSLAND, G. V. *et al.* "Long-term Cultures of Bone Marrow – Derived Human Mesenchymal Stem Cells Frequently Undergo Spontaneous Malignant Transformation", **Cancer Research**, v.69, n. 13, p. 5331–5339, 2009. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-08-4630.

RUBIO, D. *et al.* "Spontaneous Human Adult Stem Cell Transformation", **Cancer Research**, v. 65, n. 8, p. 3035 - 3039, 2005. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-04-4194

SÁNCHEZ-GUIJO, F. *et al.* "Sequential Third-Party Mesenchymal Stromal Cell Therapy for Refractory Acute Graft-versus-Host Disease", **Biology of Blood and Marrow Transplantation**, v. 20, n. 10, p. 1580–1585, 2014. DOI: 10.1016/j.bbmt.2014.06.015.

SHI M, *et al.* "Human Mesenchymal Stem Cell Transfusion Is Safe and Improves Liver Function in Acute-on-Chronic Liver Failure Patients", **Stem Cells Translational Medicine**, v. 1, n. 10, p. 725–731, 2012. DOI: 10.5966/sctm.2012-0034

SQUILLARO, T.; PELUSO, G.; GALDERISI, U. "Clinical trials with mesenchymal stem cells: An update", **Cell Transplantation**, v. 25, n. 5, p. 829–848, 2016. DOI: 10.3727/096368915X689622. .

STINGELE, S. *et al.* "Global analysis of genome, transcriptome and proteome reveals the response to aneuploidy in human cells", **Molecular Systems Biology**, v. 8, n. 608, 2012. DOI: 10.1038/msb.2012.40.

STORCHOVA, Z., "The Causes and Consequences of Aneuploidy in Eukaryotic Cells". In **Aneuploidy in Health and Disease**, edited by Zuzana Storchova. London: IntechOpen, 2012. DOI: 10.5772/45781.

STULTZ, B. G. *et al.* "Chromosomal Stability of Mesenchymal Stromal Cells During In Vitro Culture Brian", **Cytotherapy**, v. 18, n. 3, p. 336–343, 2016. DOI: 10.1016/j.jcyt.2015.11.017.

TARTE, K. *et al.* "Clinical-grade production of human mesenchymal

- stromal cells: Occurrence of aneuploidy without transformation", **Blood**, v. 115, n. 8, p. 1549–1553, 2010. DOI: 10.1182/blood-2009-05-219907.
- TOMAYKO, M.M.; REYNOLDS, C.P. Determination of subcutaneous tumor size in athymic (nude) mice. **Cancer Chemother. Pharmacol.** 24, 148–154, 1989. DOI:10.1007/BF00300234.
- TORSVIK, A. *et al.* "Spontaneous malignant transformation of human mesenchymal stem cells reflects cross-contamination: Putting the research field on track - Letter", **Cancer Research**, v. 70, n. 15, p. 6393–6396, 2010. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-10-1305.
- UDER, C. *et al.* "Mammalian MSC from Selected Species : Features and Applications", **Cytometry Part A**, v. 93, n. 1, p. 32–49, 2018. DOI: 10.1002/cyto.a.23239.
- WANG, Y. *et al.* "Outgrowth of a transformed cell population derived from normal human BM mesenchymal stem cell culture", **Cytotherapy**, v. 7, n. 6, p. 509–519, 2005. DOI: 10.1080/14653240500363216.
- WANG, Y. *et al.* "Long-term cultured mesenchymal stem cells frequently develop genomic mutations but do not undergo malignant transformation", **Cell Death & Disease**, v. 4, p.950, 2013. DOI: 10.1038/cddis.2013.480.
- WANG, Y. *et al.* "The Plasticity of Mesenchymal Stem Cells in Regulating Surface HLA-I", **iScience**, v. 15, p. 66–78, 2019. DOI: 10.1016/j.isci.2019.04.011.
- WANG, Y. *et al.* "Plasticity of mesenchymal stem cells in immunomodulation: Pathological and therapeutic implications", **Nature Immunology**, v. 15, n. 11, p. 1009–1016, 2014. DOI: 10.1038/ni.3002.
- WEI, F. *et al.* "Efficacy and safety of umbilical cord mesenchymal stem cells for the treatment of patients with COVID-19", **Clinics**, v. 76, n. e2604, 2021. DOI: 10.6061/clinics/2021/e2604.
- XIAO, W. *et al.* "Mesenchymal stem cell transformation and sarcoma genesis", **Clinical Sarcoma Research**, v. 3, n. 1, 2013. DOI:

10.1186/2045-3329-3-10.

ZHANG, Z. X. *et al.* "Cytogenetic analysis of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells passaged in vitro", **Cell Biology International**, v. 31, n. 6, p. 645–648, 2007. DOI: 10.1016/j.cellbi.2006.11.025.

ZHU, J. *et al.* "Cellular Stress Associated with Aneuploidy", **Developmental Cell**, v. 44, n. 4, p. 420–431, 2018. DOI: 10.1016/j.devcel.2018.02.002.

## X. Anexos

### Anexo 1



#### CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada **“Avaliação do potencial oncogênico de Células Mesenquimais Estromais com alterações cromossômicas”**, registrada com o nº 358/2019, sob a responsabilidade da Prof. Dr. Oswaldo Keith Okamoto e com a participação da colaboradora Maria Susana Joya Marodin (USP) que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, em reunião de 12 de dezembro de 2019.

**Vigência da autorização:** 12/12/2019 a 10/07/2021

**Finalidade:** Pesquisa Científica

**Espécie/linhagem:**

Camundongo Isogênico (*Mus musculus*) / Linhagem BALB/c, NUDE

Idade/Peso aprox.: 7 sem/15 - 20g. Qde. e sexo: 25 (F).

Quantidade total: 25 animais

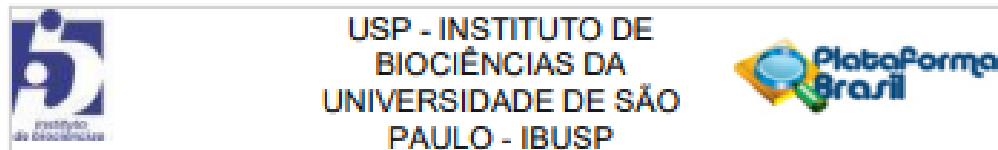
**Origem:** Biotério Central – FMUSP

**OBS.:** Qualquer intercorrência ou alteração do projeto em andamento deverá ser previamente autorizada pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA-IB.



  
Prof. Dr. Pedro Augusto Carlos Magno Fernandes  
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animal

## Anexo 2



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Avaliação do potencial oncogênico de Células Mesenquimais Estromais com alterações cromossômicas.

**Pesquisador:** Maria Susana Joya Marodin

**Área Temática:** Genética Humana:  
(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP);

**Versão:** 1

**CAAE:** 33486419.6.0000.5464

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

**Patrocinador Principal:** FUND COORD DE APERFEIÇOAMENTO DE PESSOAL DE NÍVEL SUP

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 4.098.980

#### Apresentação do Projeto:

Trata-se de estudo sobre o potencial tumorigênico de células mesenquimais estromais (MSC) com alterações cromossômicas, que se originaram espontaneamente durante cultivo "in vitro".

#### Objetivo da Pesquisa:

O objetivo geral é verificar o potencial tumorigênico de células mesenquimais estromais (MSC) isoladas de medula óssea humana que, após cultivo "in vitro", apresentaram alterações cromossômicas. Especificamente, avaliar (a) se as MSC com alterações cromossômicas são capazes de gerar tumor, quando inoculadas em camundongos; (b) proliferação e senescência dessas células quando cultivadas, em comparação com as MSC com cariótipo normal.

#### Avaliação dos Riscos e Benefícios:

As MSC para este estudo foram doadas pelo Hospital Israelita Albert Einstein (HIAE), tendo sido extraídas da medula óssea de quatro doadores e expandidas "in vitro". Assim, a utilização dessas células neste Projeto de Pesquisa não traz riscos para os doadores. No Projeto, é salientado que, apesar de muitos estudos indicarem o surgimento de anormalidades cromossômicas em MSC expandidas para uso em terapia celular, pouco se sabe sobre as consequências de tais alterações.

**Endereço:** Rua do Matão, Travessa 14, nº 321  
**Bairro:** Butantã **CEP:** 05.508-000  
**UF:** SP **Município:** SÃO PAULO  
**Telefone:** (11) 3091-6781 **E-mail:** cepibusp@ib.usp.br



USP - INSTITUTO DE  
BIOCIÊNCIAS DA  
UNIVERSIDADE DE SÃO  
PAULO - IBUSP



Continuação do Parecer: 4.098.980

"in vivo"; assim o trabalho pode contribuir para estabelecimento de protocolos, pelos Centros de Processamento Celular, relativos às MSC com alterações cromossômicas.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Análise do projeto:

- a) amostra a ser analisada: quatro amostras de células mesenquimais estromais, obtidas de medula óssea de quatro doadores e expandidas "in vitro". Cedidas pelo Hospital Israelita Albert Einstein, essas células são remanescentes de testes de qualidade para uso em terapia celular, que seriam descartadas.
- b) procedimentos a que as pessoas serão submetidas: os doadores iniciais não serão submetidos a qualquer procedimento adicional.
- c) infraestrutura disponível: adequada
- d) armazenamento de amostra: não haverá armazenamento de amostras.
- e) apoio financeiro: CAPES

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

É solicitada dispensa de TCLE, uma vez que as quatro amostras de células foram doadas pelo Hospital Israelita Albert Einstein, tendo sido extraídas de medula óssea de quatro doadores e cultivadas para uso em terapia celular; essas células foram geradas dentro do Projeto de Pesquisa "Uso de células-tronco adultas para tratamento de incontinência urinária de esforço", CAAE: 18150613.7.3005.0071, Pesquisador Responsável: Rodrigo Cerqueira de Souza. Portanto, está justificada a dispensa de TCLE.

**Recomendações:**

Não há.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Não há pendências.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Cabe à pesquisadora elaborar e apresentar, a este Comitê, relatórios anuais (parciais e final), de acordo com a Resolução nº 466/12, inciso XI.2, letra d, do Conselho Nacional de Saúde.

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

|                                                    |                                   |
|----------------------------------------------------|-----------------------------------|
| <b>Endereço:</b> Rua do Matão, Travessa 14, nº 321 | <b>CEP:</b> 05.508-090            |
| <b>Bairro:</b> Butantã                             |                                   |
| <b>UF:</b> SP                                      | <b>Município:</b> SÃO PAULO       |
| <b>Telefone:</b> (11)3091-8761                     | <b>E-mail:</b> cepibusp@ib.usp.br |



USP - INSTITUTO DE  
BIOCIÊNCIAS DA  
UNIVERSIDADE DE SÃO  
PAULO - IBUSP



Continuação do Parecer: 4.098.980

| Tipo Documento                                            | Arquivo                                       | Postagem               | Autor                     | Situação |
|-----------------------------------------------------------|-----------------------------------------------|------------------------|---------------------------|----------|
| Informações Básicas do Projeto                            | PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_DO_PROJETO_1484045.pdf | 12/06/2020<br>13:05:06 |                           | Aceito   |
| Projeto Detalhado / Brochura Investigador                 | Projeto_de_Pesquisa_Susana_atualizado.pdf     | 12/06/2020<br>13:00:57 | Maria Susana Joya Marodin | Aceito   |
| Solicitação Assinada pelo Pesquisador Responsável         | carta_de_encaminhamento.pdf                   | 14/05/2020<br>18:07:05 | Maria Susana Joya Marodin | Aceito   |
| Declaração de Pesquisadores                               | compromisso_orientador.pdf                    | 14/05/2020<br>18:01:39 | Maria Susana Joya Marodin | Aceito   |
| Declaração de Pesquisadores                               | compromisso_responsavel.pdf                   | 14/05/2020<br>18:01:13 | Maria Susana Joya Marodin | Aceito   |
| TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência | dispensa_TCLE.pdf                             | 14/05/2020<br>17:59:36 | Maria Susana Joya Marodin | Aceito   |
| Folha de Rosto                                            | folha_rosto.pdf                               | 14/05/2020<br>17:55:27 | Maria Susana Joya Marodin | Aceito   |

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

SAO PAULO, 19 de Junho de 2020

Assinado por:  
Angela Maria Vianna Morgante  
(Coordenador(a))

Endereço: Rua do Matão, Travessa 14, nº 321  
Bairro: Butantã CEP: 05.508-090  
UF: SP Município: SAO PAULO  
Telefone: (11)3091-8761 E-mail: cepibusp@ib.usp.br

## XI. Biografia

---

Maria Susana Joya Marodin

### **Formação acadêmica**

2011 – 2014

Graduação em Ciências biológicas - Universidade Santa Cecília.

2019 – Atual

Mestrado em Biologia (Genética) – Departamento de Genética e Biologia Evolutiva – Instituto de Biociências - Universidade de São Paulo.

### **Atuação profissional**

2013-2014

Estagiária bolsista na Laboratório de Tecnologia do Pescado – Instituto de Pesca.

2014 – 2021

Professora de Biologia de Educação Básica – Governo do Estado de São Paulo.

2022- Atual

Assessora científica Júnior– Igenomix Brasil.

### **Produção bibliográfica**

#### **Resumos publicados em anais de congressos**

1. **OLIVEIRA, M. S. J. M.**; GOES, C. B. ; FURLAN, E. F. . Composição centesimal de filés de Polaca do Alasca congelados ofertados no mercado da grande São Paulo. In: VI Congresso Brasileiro de Iniciação Científica, 2014, Santos. Revista Ceciliana, 2014. v. 5.

2. **OLIVEIRA, M. S. J. M.**; SANTOS, H. C. H. ; JUSTO, C. M. P. ; CARVALHO, C. R. L. . Levantamento das percepções de moradores sobre os riscos à saúde decorrentes de inundações em seus domicílios, nos bairros de Cidade Náutica e Pompeba, São Vicente (SP). In: 14º Congresso Nacional de Iniciação Científica CONIC-SEMESP, 2014, São Paulo. Anais do CONIC-SEMESP, 2014. v. 2.

3. **OLIVEIRA, M. S. J. M.**; TOMITA, R. Y. . Consumo de pescado: avaliação nutricional e benefícios à saúde. In: VIII SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DO INSTITUTO DE PESCA, 2013, Santos. Resumos do 8o Seminário de Iniciação Científica do Instituto de Pesca. Santos: Instituto de Pesca, 2013. p. 8-8.

### **Apresentações de trabalho**

1. **OLIVEIRA, M. S. J. M.**; SANTOS, H. C. H. ; JUSTO, C. M. P. ; CARVALHO, C. R. L. . Levantamento das percepções de moradores sobre os riscos à saúde decorrentes de inundações em seus domicílios, nos bairros de Cidade Náutica e Pompeba, São Vicente (SP). 2014. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

2. **OLIVEIRA, M. S. J. M.**; GOES, C. B. ; FURLAN, E. F. . Composição centesimal de filés de Polaca do Alasca congelados ofertados no mercado da grande São Paulo. 2014. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

3. **OLIVEIRA, M. S. J. M.**; TOMITA, R. Y. . Consumo de pescado: avaliação nutricional e benefícios à saúde. 2013. (Apresentação de Trabalho/Seminário).

### **Eventos**

1. XXVIII Simpósio Internacional de Hemoterapia e Terapia Celular | III Fórum Internacional de Terapia Celular Einstein. 2021 (Simpósio)

2. Apresentação oral. 14º Congresso Nacional de Iniciação Científica CONIC-SEMESP. Levantamento das percepções de moradores sobre os riscos à saúde decorrentes de inundações em seus domicílios, nos bairros de Cidade Náutica e Pompeba, São Vicente (SP). 2014. (Congresso).

3. IV Seminário de Iniciação Científica do Instituto de Pesca. 2014. (Seminário).

4. Apresentação de pôster. VI Congresso Brasileiro de Iniciação Científica. Composição centesimal de filés de Polaca do Alasca congelados ofertados no mercado da grande São Paulo. 2014. (Congresso).

5. Apresentação de pôster. VIII Seminário de Iniciação Científica do Instituto de Pesca. Consumo de pescado: avaliação nutricional e benefícios à saúde. 2013. (Seminário).