

GABRIEL LEVIN

Análise do potencial terapêutico da proteína R-Espondina 1 humana recombinante (rhRSPO1): Produção, purificação, caracterização e aplicações na regeneração de intestino delgado em modelos animais utilizando tecnologias de Engenharia Tecidual

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

São Paulo

2020

GABRIEL LEVIN

Análise do potencial terapêutico da proteína R-Espondina 1 humana recombinante (rhRSPO1): Produção, purificação, caracterização e aplicações na regeneração de intestino delgado em modelos animais utilizando tecnologias de Engenharia Tecidual

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

Área de concentração: Biotecnologia

Orientadora: Profa. Dra. Mari Cleide Sogayar

Versão corrigida. A versão original eletrônica, encontra-se disponível tanto na Biblioteca no ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

São Paulo

2020

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

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Levin, Gabriel

Análise do potencial terapêutico da proteína R-Espondina 1 humana recombinante (rhRSP01): Produção, purificação, caracterização e aplicações na regeneração de intestino delgado em modelos animais utilizando tecnologias de Engenharia Tecidual / Gabriel Levin; orientadora Mari Cleide Sogayar. -- São Paulo, 2020.
184 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. RSP01. 2. Biofármacos. 3. Intestino delgado engeheirado. 4. Unidades organóides. 5. Reparo tecidual. I. Sogayar, Mari Cleide, orientador. II. Título.

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

Candidato(a): Gabriel Levin

Titulo da Tese: Análise do potencial terapêutico da proteína R-Espondina 1 humana recombinante (rhRSPO1): Produção, purificação, caracterização e aplicações na regeneração de intestino delgado em modelos animais utilizando tecnologias de Engenharia Tecidual.
Orientador: Mari Cleide Sogayar

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou o(a) candidato(a):

Aprovado(a) **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Certificamos que o projeto intitulado “**Análise do potencial terapêutico da proteína recombinante humana RSPO1 na regeneração de intestino delgado em modelo animal utilizando tecnologias de Engenharia Tecidual**” protocolo nº 131/15 sob a responsabilidade de **Ana Cláudia Oliveira Carreira Nishiyama** e **Gabriel Levin**, apresentado pelo Departamento de Clínica Médica - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 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 aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Faculdade de Medicina da USP em reunião de 26.08.2015.

Vigência do Projeto	Julho/2019
Espécie/linhagem	Camundongo Balb/c
Nº de animais	120
Peso/Idade	7 semanas
Sexo	Macho
Origem	Biotério FMUSP

CEUA-FMUSP, 26 de Agosto de 2015



Dr. Eduardo Pompeu
Coordenador
Comissão de Ética no Uso de Animais



INSTITUTIONAL ANIMAL CARE & USE COMMITTEE (IACUC)

4650 Sunset Boulevard, Mailstop #84
Los Angeles, CA 90027
Phone: 323-361-4832 / Fax: 323-361-8054

MEMORANDUM

TO: Tracy Grikscheit, M.D.
FROM: Barbara Driscoll, Ph.D.
IACUC Chair
DATE: March 14, 2016
SUBJECT: IACUC Protocol #215-16, Three Year Rewrite Application
TITLE: "Tissue Engineering the Gastrointestinal Tract in the Mouse Model" (Mice)
STATUS: Approved
Protocol Approval Date: March 14, 2016
Protocol Expiration Date: March 14, 2019

Your Three Year Rewrite Application was approved by the IACUC. The protocol is valid for three years from the date of approval.

Please note that an Annual Renewal will be due each year, the month prior to the anniversary of your approval date. A request will be issued the beginning of December, with the first renewal being due prior to March 1, 2017.

This memo attests to the good standing and validity of *OLAW Assurance Statement #A3276-01* (effective 10-22-15 thru 10-31-19), and the compliance with all regulations from the *Animal Welfare Act/USDA APHIS Regulations, National Research Council Guide for the Care and Use of Laboratory Animals and the Public Health Service Policy on Humane Care and Use of Laboratory Animals*, for Children's Hospital Los Angeles. The Saban Animal Care Facility of Children's Hospital Los Angeles is an AAALAC Accredited facility since 1992.

If you have any questions, please contact the IACUC Office at extension 14832. Any required response will be noted above and may be submitted to the IACUC Office at Mailstop #84, or respond via email to skusumolkul@chla.usc.edu.



INSTITUTIONAL ANIMAL CARE & USE COMMITTEE (IACUC)
4650 Sunset Boulevard, Mailstop #84
Los Angeles, CA 90027
Phone: 323-361-4832 / Fax: 323-361-8054

MEMORANDUM

TO: Tracy Grikscheit, M.D.

FROM: Mark Frey, Ph.D.
IACUC Chair

DATE: February 15, 2017

SUBJECT: IACUC Protocol #390-16, New Project Application

TITLE: "Molecular Mechanisms of Zebrafish Intestine Regeneration, Repair, and Adaptation"
(Zebrafish)

STATUS: Approved

Protocol Approval Date: February 1, 2017
Protocol Expiration Date: February 1, 2020

Your New Project Application was approved by the IACUC. The protocol is valid for three years from the date of approval.

Please note that an Annual Renewal will be due each year, the month prior to the anniversary of your approval date. A request will be issued the beginning of November, with the first renewal being due prior to January 30, 2018.

This memo attests to the good standing and validity of *OLAW Assurance Statement #D16-00175* (effective 10-22-15 thru 10-31-19), and the compliance with all regulations from the *Animal Welfare Act/USDA APHIS Regulations, National Research Council Guide for the Care and Use of Laboratory Animals and the Public Health Service Policy on Humane Care and Use of Laboratory Animals*, for Children's Hospital Los Angeles. The Saban Animal Care Facility of Children's Hospital Los Angeles is an AAALAC Accredited facility since 1992.

If you have any questions, please contact the IACUC Office at extension 11469. Any required response will be noted above and may be submitted to the IACUC office at Mailstop #23, or respond via email to vvelasco@chla.usc.edu.

Dedico este trabalho:

Aos meus amados pais, Irene e Nahum, minhas referências e pilares;

À minha querida irmã Lia, meu orgulho;

À minha família e amigos, que acreditaram no meu trabalho e torceram por mim.

AGRADECIMENTOS

À **Prof. Mari Cleide Sogayar** por todos os ensinamentos, conselhos e pela oportunidade incrível de trabalhar em seu laboratório ao longo destes nove anos, junto ao seu grupo de pesquisa, interagindo e convivendo ao lado de tantos bons profissionais que contribuíram para o meu aprendizado, desenvolvimento e crescimento pessoal e profissional. Agradeço também por me mostrar o que é a Ciência, sua importância e por me dar suporte em todas as demais experiências científicas e profissionais que se abriram em decorrência do fazer Ciência;

À **Dra. Ana Claudia Oliveira Carreira** pela orientação e suporte desde o início de meu ingresso na pesquisa, como uma mãe científica, fazendo-se presente em todos os momentos de minha trajetória até aqui. Por ter me ensinado a fazer Ciência, sempre com muita ética, dedicação, determinação e perseverança. Agradeço também por toda sua sensibilidade ao me apoiar nos momentos mais desafiadores desta trajetória, sempre acreditando em meu potencial e me mostrando que não existe caminho tortuoso que não possa ser cruzado;

À **Dra. Tracy C. Grikscheit** pela oportunidade incrível de trabalhar e fazer parte de seu grupo de pesquisa de excelência na área de Medicina Regenerativa e Engenharia de Tecidos, no Saban Research Institute do Childrens Hospital Los Angeles, vivenciando de perto o que é fazer pesquisa translacional dentro de um hospital, ao lado de tantos médicos e cirurgiões, cujo foco é o tratamento de pacientes. Agradeço ainda por todos os seus ensinamentos e por toda a valorização profissional que tive nesta experiência, que me mostrou o valor do meu conhecimento científico e experiência adquiridos até ali;

Ao meu colega e mentor **Dr. Gustavo Gross Belchior**, por ter tido a ideia de projeto que deu origem a este trabalho e ter estabelecido a colaboração com o grupo da Dra. Tracy Grikscheit no Children's Hospital de Los Angeles, juntamente com a Dra. Mari Sogayar, e aberto as portas para que fosse possível a realização do meu estágio sanduíche no Saban Reseach Institute para o desenvolvimento do intestino curto engenheirado. Agradeço também pelos muitos ensinamentos, conselhos e mentoria profissional ao longo destes muitos anos de colaboração, desde a minha

IC, Doutorado, Estágio Sanduíche e entrada no mercado de trabalho junto a sua empresa Core Us Consultoria e Comunicação Científica, sempre sendo um exemplo de pessoa e profissional;

À **Dra. Tatiane Maldonado Coelho**, minha amiga e primeira mentora científica, por todos os ensinamentos profissionais e pessoais. Sou grato por ter tido a oportunidade de tomar contato com a Ciência de maneira tão positiva no início de minha IC, sob sua supervisão, entendendo a importância da ciência básica e aplicada, e aprendendo a dar os meus primeiros passos no laboratório com muito rigor científico, delicadeza, apreço pelo conhecimento e pela teoria por trás dos experimentos, criando uma base sólida para fazer ciência.

Ao **Prof. Julio Ferreira e sua aluna Dra. Kátia Gomes** pela colaboração e oportunidade de ir ao Japão participar do *Biomedical Innovation and Entrepreneurship Training Course*, uma iniciativa do programa para aceleração de projetos biotecnológicos Spark Global, realizado na Universidade de Tóquio (Spark Tokyo 2017), no qual aprendi sobre empreendedorismo e desenvolvi habilidades em design thinking, brainstorming, desenvolvimento de produtos e comercialização para necessidades médicas não atendidas;

À **Bruna Aguiar**, minha colega de NUCEL, pela sua amizade, inúmeros almoços e conversas no bandeirão e pela sua parceria e colaboração neste projeto, me ajudando no cultivo das células produtoras de rhRSPO1 e caracterização da proteína;

Aos meus colegas de CHLA, **Dr. Sam Zuber e Dr. Tony Squillaro** por todo o suporte, amizade e colaboração durante minha estadia nos EUA e no laboratório da Dra. Grikscheit (G-Unit), deixando esta experiência muito mais divertida, produtiva e prazerosa. Agradeço estes dois pelas muitas horas trabalhadas, gerando unidades organoides intestinais no laboratório e realizando as cirurgias vitais para implante dos *scaffolds* e geração dos intestinos engenheirados no centro cirúrgico animal;

Às minhas colegas de CHLA, **Dra. Kathryn Masselli e Dra. Kristin Gee** pela ajuda com os experimentos envolvendo os Zebrafish, operando e tratando destes animais.

Estas duas realizaram as cirurgias de indução de síndrome do intestino curto nos peixes, removendo parte do intestino curto dos animais com precisão incrível, e ainda fizeram as injeções intraperitoniais da droga;

À **Dra. Maria Emilia Zenteno** pela ajuda com o ensaio de atividade da rhRSPO1 *in vivo*, realizando as injeções intravenosas no plexo orbital dos camundongos;

À **Laura-Marie Nucho (MS, MBA)**, pela recepção no laboratório da Dra. Grikscheit e por toda ajuda com a compra de reagentes, treinamentos e outras questões burocráticas do Childrens Hospital de Los Angeles;

À minha colega de CHLA, **Dra. Elizabeth Gilliam** pelas discussões científicas no CHLA e pela revisão dos meus textos científicos em inglês;

Ao meu aluno **Lucas Giardulli** pela oportunidade de orienta-lo em sua primeira experiência científica e escrita de projeto, e pela ajuda com o cultivo de células produtoras de rhRSPO1;

À **Zizi de Mendonça e ao Alan Pereira** pelo suporte técnico prestado ao longo de todo este projeto, possibilitando assim a realização de todos os experimentos deste e de muitos outros projetos do laboratório da Prof. Mari;

Ao **Prof. Aldo Tonso** pelo suporte junto ao programa de pós-graduação Interunidades em Biotecnologia, no início de meu doutorado, e pela colaboração no projeto paralelo de contagem de células por medida de fluorescência com CFSE;

Ao **Dr. Mark Frey e seus alunos Jonathan Hsieh e Edie Bucar** pelo seu apoio técnico, intelectual e material para a realização do experimento de WB no CHLA;

Ao **Dr. Marcos Demasi** por ser um oráculo no laboratório e exemplo de pessoa e pesquisador, sempre me aconselhando através de discussões científicas e me ajudando em inúmeros ocasiões com seu vasto conhecimento;

Aos meus amigos e colegas de laboratório, atuais doutores e doutoras, **Túlio Pereira, Carlos DeOcesano, Raquel Arminda, Camila Leal e Lauren Camargo**, pelas muitas conversas e discussões científicas na copinha, pelas colaborações, pelos muitos ensinamentos e conselhos, pelas angústias, frustrações e também risadas e alegrias compartilhadas ao longo destes muitos anos de laboratório;

À **Dra. Marina Trombetta Lima e Dra. Marluce Mantovani**, por compartilharem comigo seu grande conhecimento e interesse pela ciência, sempre com muitas dicas, ensinamentos e conselhos.

À **Amanda Cordeiro** pela ajuda com o cultivo de células produtoras de rhRSP01 e coleta de meio condicionado;

À **Amanda Schiesner e Gabriella Manini**, pela amizade, inúmeras conversas, almoços e pelas muitas risadas no laboratório e fora dele;

À **Thamara, Alice, Mariele, Ana Paula**, minhas parceiras de bandeirão;

Ao **Alexander Munaiar e Victor Casseb** pela ajuda gráfica com as figuras;

Aos alunos de pré-iniciação científica do laboratório **Gabriel Ronatty e Franco Kraiselburd**, pela sua curiosidade, determinação e interesse insaciáveis pela Ciência, o qual tive o prazer de interagir e contribuir em sua formação;

Aos demais membros do **Grikscheit's Lab Group**: David, Alexa, Jessica, Jasmin, Jason e Maggie;

Aos outros tantos atuais e ex integrantes do **Grupo NUCEL da Dra. Sogayar**: Aduino, Aline, Ana Cris, Ana Lúcia, Barbara, Bruno, Caio, Camila, Camila, Carol, Carol, Cris, Dayliany, Darshna, Débora, Diego, Erika, Érica, Erik, Fernando, Fernando, Francesco, Francisco, Flávia, Heloisa, Henrique, Ilana, Isaura, Joes, Julia, Juliana, Larrissa, Laura, Letícia, Luis, Luiz, Mariel, Marina, Marco, Martino, Mateus, Matheus, Michelle, Míriam, Nanda, Nathali, Otto, Otávio, Patrícia, Paula, Raja,

Raquel, Renato, Ricardo, Roberta, Rômulo, Rosangela, Sandra, Talita, Talita, Tatiane, Tatiene, Thaís, Thays, Viviani, Vitor;

Aos meus pais **Irene e Nahum**, que me deram toda a estrutura necessária para atravessar mais este desafio, sempre presentes a cada momento de dificuldade e felicidade ao longo desta trajetória, acreditando nas minhas ideias, respeitando minhas escolhas e apoiando as minhas decisões.

À minha irmã **Lia**, por sempre acreditar e confiar em mim, me ensinando tanto só por existir com seus apenas 12 anos de vida até aqui, sendo um exemplo de pessoa: curiosa, compreensiva, carinhosa, atenciosa, inteligente e sensata;

À minha avó **Meiri**, que sempre me apoiou mesmo sem entender direito o que eu fazia, me dando, inclusive, um computador (laptop) no início do meu doutorado para que eu pudesse realizar o projeto, computador este que me acompanhou por todo o percurso até aqui;

À **Denise**, que me aguentou falando sobre meu projeto ao longo de muitas ocasiões, sempre ouvindo com muita atenção, entusiasmo e interesse;

Aos meus amigos **Rodolfo, Lucas, Pepo, Tom, Pet, Gil, Julia, Mariana** e tantos outros, por tornarem esta trajetória mais leve e divertida, com apoio nos momentos difíceis, risadas mil e outros muitos bons momentos compartilhados, que me deram ânimo para continuar;

À **Universidade de São Paulo (USP), Instituto de Ciências Biomédicas (ICB), Faculdade de Medicina (FM), Departamento de Clínica Médica, Instituto de Química (IQ), Núcleo de Terapia Celular e Molecular (NUCEL), Departamento de Bioquímica e ao Programa de Pós-graduação Interunidades em Biotecnologia (PPIB)**;

À **Fabia e a Eliane**, pelo suporte junto à **Secretaria do Programa de Pós-graduação Interunidades em Biotecnologia**;

À **Michely Reis** pelo apoio prestado na **Secretaria do NUCEL**;

À **Erica Nakashima** pelo apoio prestado nas dependências do Hospital Universitário e na comunicação com a Faculdade de Medicina;

Ao **Centro Avançado em Diagnóstico por Imagem da FMVZ (CADI-FMVZ-USP)**;

Ao **Saban Animal Care Facility** e ao **Departamento de Patologia do Children's Hospital Los Angeles**;

Ao **Biotério da Faculdade de Medicina da USP (FM-USP)**;

Às **agências de fomento: FAPESP, CAPES, CNPq, BNDES, FINEP, MS-DECIT, MCTIC e CIRM** que forneceram recursos para a realização deste projeto de pesquisa. O presente trabalho foi realizado com apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) - Processos 2015/11128-3 e 2017/01072-6 e Projeto Temático nº 2016/05311-2.

*“Não tenho vergonha de mudar de idéia
porque não tenho vergonha de pensar”*

Blaise Pascal

“Cada dia sabemos mais e entendemos menos”

(...)

*“O importante é não parar de questionar.
A curiosidade tem a sua própria razão para existir”*

Albert Einstein

LEVIN, G. **Análise do potencial terapêutico da proteína R-Espondina 1 humana recombinante (rhRSPO1): Produção, purificação, caracterização e aplicações na regeneração de intestino delgado em modelos animais utilizando tecnologias de Engenharia Tecidual.** 2020. 184f.

Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

RESUMO

As R-Espondinas (RSPOs) compõem uma família de proteínas secretadas conhecidas por seus papéis importantes na proliferação, diferenciação e morte celular, induzindo a via de Wnt. Estudos têm demonstrado a importância das RSPOs na regulação de vários processos tecido-específicos, em particular a proliferação de células-tronco intestinais. RSPO1 destaca-se quanto ao seu potencial uso terapêutico na área de Medicina Regenerativa, dado seu potencial mitogênico em células-tronco, em particular, na manutenção do nicho de células-tronco da cripta do intestino delgado. Neste trabalho, foram geradas plataformas estáveis de expressão da RSPO1 humana recombinante (rhRSPO1) empregando os dois sistemas de expressão de células de mamífero mais utilizados para a produção de biofármacos, células HEK293 e CHO-DG44. Descrevemos em detalhes a produção estável em altos níveis da rhRSPO1, com alto grau de pureza e devidamente caracterizada em relação à sua estrutura peptídica e padrão de glicosilação, além de sua atividade biológica *in vitro* e *in vivo*. Visando sua aplicação na regeneração de intestino, investigamos a atividade da proteína rhRSPO1 sobre o cultivo de unidades organóides intestinais (UO) e na formação de intestino delgado engenheirado (TESI, do inglês *Tissue-Engineered Small Intestine*) murino utilizando *scaffolds* biodegradáveis, bem como ensaios preliminares sobre a regeneração de fígado. Concluímos que o tratamento com rhRSPO1, e a consequente ativação da via canônica de Wnt, melhorou o cultivo de UO intestinais *in vitro*, aumentando seu tamanho e taxa de sobrevivência. Pelos ensaios de Engenharia de Tecidos *in vivo*, constatamos que o tratamento resultou em na melhora da formação do TESI, com aumento do grau de desenvolvimento dos tecidos, aumento de massa e da taxa de sucesso na pega do enxerto. Avaliamos ainda a atividade funcional da rhRSPO1 na adaptação intestinal em modelo de *zebrafish* induzido à Síndrome do Intestino Curto (SIC) pela ressecção cirúrgica da porção medial do intestino. Neste experimento de resgate, no qual a rhRSPO1 foi administrada por via intraperitoneal nos animais por

uma ou duas semanas, observamos que o tratamento aumentou a proliferação precoce de células-tronco intestinais (ISCs), o acúmulo de β -catenina e reduziu a perda de peso dos peixes após ressecção maciça do intestino, mas não interferiu nos parâmetros intestinais de adaptação e na formação de esteatose hepática neste modelo. Assim, constatamos que a rhRSPO1 é essencial para a manutenção do nicho de ISC e a homeostase do epitélio intestinal, melhorando a regeneração epitelial após lesão. Portanto, podemos concluir que a plataforma de expressão desenvolvida nesse projeto foi bem-sucedida quanto à geração de rhRSPO1 com qualidade e em quantidade suficiente para ser utilizada em estudos funcionais, em escala laboratorial, na área de Engenharia de Tecidos e Medicina Regenerativa aplicada ao tratamento da SIC em modelos animais. Concluímos ainda que o tratamento com rhRSPO1 é bastante promissor no que diz respeito à geração de um intestino engenheirado funcional e melhora dos sintomas da SIC. Entretanto, novas otimizações do processo produtivo, bem como um maior número de estudos biológicos fazem-se necessários para que tratamentos com rhRSPO1 venham a ser viáveis e seguros, futuramente, para estas e outras aplicações terapêuticas.

PALAVRAS CHAVE: R-Espondina 1 (RSPO1). Sistemas heterólogos de expressão em células de mamífero. Intestino delgado engenheirado. Unidades organóides. Reparo tecidual.

LEVIN, G. **Analysis of the therapeutic potential of recombinant human R-Spondin 1 protein (rhRSPO1): Production, purification, characterization and applications in small intestine regeneration in animal models using Tissue Engineering technologies.** 2020. 184f. Ph.D thesis (Biotechnology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

ABSTRACT

R-Spondin (RSPO) comprise a family of secreted proteins known for their important roles in cell proliferation, differentiation and death, by inducing the Wnt pathway. Several studies have demonstrated the importance of RSPOs in the regulation of several tissue-specific processes, including the proliferation of intestinal stem cells. The RSPO1 stands out with respect to its potential therapeutic use in the Regenerative Medicine field, due to its mitogenic activity in stem cells, particularly in the small intestine crypt stem cell niche maintenance. In this work, stable expression platforms of recombinant human RSPO1 (rhRSPO1) were generated using the two most used mammalian cell expression systems for the production of biopharmaceuticals, HEK293 and CHO DG44 cells. We describe in detail the stable production of rhRSPO1 at high levels, with a high degree of purity and properly characterized in relation to its peptide structure and glycosylation pattern, in addition to biological activity *in vitro* and *in vivo*. Aiming its application in intestinal regeneration, we investigated the rhRSPO1 protein activity on the cultivation of intestinal organoid units (OU) and in the formation of murine Tissue-Engineered Small Intestine (TESI) using biodegradable scaffolds, as well as in preliminary tests on liver regeneration. Based on the results, we were able to conclude that the rhRSPO1 treatment, and the consequent activation of the canonical Wnt pathway, improved the cultivation of intestinal OU *in vitro*, increasing its size and survival rate. Through the *in vivo* Tissue Engineering assays, we verified that the treatment resulted in an improvement in TESI formation, increasing its mass, degree of tissue development and engraftment success rate. We also evaluated the functional activity of rhRSPO1 in intestinal adaptation in a zebrafish short bowel syndrome (SBS) model induced by surgical resection of the medial portion of the intestine. In this rescue experiment, in which rhRSPO1 was administered intraperitoneally to the animals for one or two weeks, we observed that the treatment increased an early

intestinal stem cell (ISC) proliferation, β -catenin accumulation and fish weight loss improvement after massive intestinal resection, but did not interfere in intestinal adaptation parameters and hepatic steatosis formation in this model. Accordingly, we found that rhRSPO1 is essential for the maintenance of the ISC niche and intestinal epithelium homeostasis, improving epithelial regeneration after injury. Therefore, we can conclude that the expression platform developed in this project was successful in generating rhRSPO1 with sufficient quality and quantity to be used in laboratory scale functional studies in the Tissue Engineering and Regenerative Medicine area applied to the SBS treatment in animal models. We also concluded that the rhRSPO1 treatment is very promising with regard to the generation of a functional tissue-engineered intestine and SBS symptoms improvement. However, new optimizations of the production process, as well as a greater number of biological studies are necessary for rhRSPO1 treatments to be viable and safe, in the future, for these and other therapeutic applications.

Keywords: R-Spondin1 (RSPO1). Heterologous mammalian protein expression system. Tissue-Engineered Small Intestine. Organoid Units. Tissue Repair.

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Complicações da síndrome do intestino curto e terapias

Tabela 2 - Lista de *Primers* - PCR de colônias e sequenciamento.

Tabela 3 - Lista de Primers – qRT-PCR - UOs.

Tabela 4 - Lista de Anticorpos – IF e WB – UOs.

Tabela 5 - Lista de Primers – qRT-PCR - ZF.

Tabela 6 - Grau de pureza e rendimento do processo de purificação da rhRSPO1.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática da estrutura das RSPOs humanas.

Figura 2 - Estrutura cristalina da RSPO1.

Figura 3 - Vias de Sinalização de Wnt: Via canônica e vias não-canônicas.

Figura 4 - Via Canônica de Sinalização de Wnt: Via de Wnt dependente de beta-Catenina.

Figura 5 - Via de Wnt e RSPOs - Mecanismos de ação e receptores.

Figura 6 - Representação esquemática da formação do intestino curto engenheirado (TESI).

Figura 7 - Estrutura do epitélio intestinal.

Figura 8 - Complexidade do TESI baseada em análise histológica por coloração de H&E.

Figura 9 - Protocolos de tratamento dos *zebrafish* com rhRSPO1.

Figura 10 - Fracionamento em gel de agarose da construção pUC57/hRSPO1 e pNU1/hRSPO1 após restrição enzimática.

Figura 11 - PCR de colônias para identificação de clones bacterianos positivos para a sequência codificadora otimizada do gene *hRSPO1*.

Figura 12 - Viabilidade e produtividade das células CHO-DG44 durante o processo de amplificação gênica na presença de metotrexato para seleção de células superprodutoras de rhRSPO1.

Figura 13 - Seleção de clones celulares HEK293 superprodutores de rhRSPO1.

Figura 14 - *Western Blot* dos clones celulares e da população mista de células CHO-DG44 produtoras de rhRSPO1.

Figura 15 - Primeira etapa de purificação da rhRSPO1 por cromatografia de afinidade à heparina.

Figura 16 - Segunda etapa de purificação da rhRSPO1 por cromatografia de exclusão molecular.

Figura 17 - Purificação da rhRSPO1.

Figura 18 - Cinética de produção e estabilidade da rhRSPO1 (resultado preliminar).

Figura 19 - Curva Dose-Resposta para padronização da dosagem de rhRSPO1 em ensaio de atividade biológica *in vitro* utilizando-se células C2C12.

Figura 20 - Atividade biológica da rhRSPO1 *in vitro*.

Figura 21 - Bioatividade da rhRSPO1 *in vivo*.

Figura 22 - Desglicosilação da rhRSPO1 com PNGase F.

Figura 23 - Perfil qualitativo de glicosilação da rhRSPO1 - Ensaio de painel de lectinas.

Figura 24 - Análise de LC-MS/MS.

Figura 25 - Adaptação do clone HEK293 superprodutor de rhRSPO1 (Cl. L1) ao cultivo em suspensão.

Figura 26 - Crescimento e sobrevivência das UOs intestinais *in vitro*.

Figura 27 - UOs *in vitro* (Imagens adicionais).

Figura 28 - Proliferação celular no epitélio das UOs intestinais (Dia 6).

Figura 29 - Expressão relativa ao nível de mRNA dos principais genes da via de sinalização de Wnt nas UOs.

Figura 30 - Expressão relativa da proteína β -catenina não fosforilada (ativa) nas UOs.

Figura 31 - Desenvolvimento *in vivo* do TESI em arcabouços biodegradáveis na presença ou ausência de rhRSPO1 após explante.

Figura 32 - Marcação imunofluorescente para os diferentes tipos de células epiteliais intestinais diferenciadas.

Figura 33 - Marcação imunofluorescente de células-tronco intestinais, camada muscular e gânglios neuronais.

Figura 34 - Crescimento e sobrevivência de Unidade Organoide de Fígado (LOU) *in vitro*.

Figura 35 - Formação de fígado engenheirado (TELi) *in vivo*.

Figura 36 - Perda de peso dos *zebrafish* após cirurgias de SIC/SBS ao longo dos protocolos de uma ou duas semanas de experimentação.

Figura 37 - Parâmetros histológicos de adaptação intestinal à SIC/SBS em ZF após sete dias de tratamento (protocolo de uma semana).

Figura 38 - Parâmetros histológicos de adaptação intestinal à SIC/SBS em ZF após 14 dias de tratamento (protocolo de duas semanas).

Figura 39 - Proliferação celular no epitélio intestinal proximal em ZF em 7 ou 14 dias de tratamento após cirurgias de SIC/SBS (Ensaio de incorporação de BrdU).

Figura 40 - Morte celular no epitélio intestinal proximal de ZF em 7 ou 14 dias de tratamento após cirurgias de SIC/SBS.

Figura 41 - Expressão proteica de β -catenina no epitélio do intestino proximal dos ZF em 7 ou 14 dias de tratamento após cirurgias de SIC/SBS.

Figura 42 - Expressão relativa por qRT-PCR: (A) *ciclina D1*, (B) *c-myc*, (C) *yap1* e (D) β -catenina.

Figura 43 - Macroesteatose hepática em uma ou duas semanas de tratamento após cirurgias de SIC/SBS em ZF.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3D: Tridimensional

5-FU: 5-Fluorouracil

AER: Prega Ectodérmica Apical (do inglês, *Apical Ectodermal Ridge*)

AI: Adaptação Intestinal

ALP: Fosfatase Alcalina (do inglês, *Alkaline Phosphatase*)

Amp^r: Resistência à ampicilina

ANOVA: Análise de Variância (do inglês, *Analysis of Variance*)

Anti/Anti: Antibiótico e Antimicótico

APC: Polipose Coli Adenomatosa (do inglês, *Adenomatous Polyposis Coli*)

ATCC: *American Type Culture Collection*

Bcl-9: *B-cell CLL/lymphoma 9 protein*

BLAST®: *Basic Local Alignment Search Tool®*

BMP: Proteína Morfogenética Óssea (do inglês, *Bone Morphogenetic Protein*)

BR: Domínio Rico em Aminoácido Básico (do inglês, *Basic amino acid-rich domain*)

BrdU: Bromodeoxiuridina / 5-bromo-2'-deoxiuridina

BSA: Albumina de Soro Bovino (do inglês, *Bovine Serum Albumine*)

C-: Controle negativo

CABSI: Infecção de Corrente Sanguínea Associada ao Cateter (do inglês, *Catheter-Associated Bloodstream Infection*)

CC3: Caspase-3

cDNA: DNA complementar

CDS: Sequência Nucleotídica Codificadora (do inglês, *Coding Sequence*)

CEUA: Comissão de Ética no Uso de Animais

cGMP: Boas Práticas de Fabricação atuais (do inglês, *current Good Manufacturing Practice*)

ChgA: Cromogranina A

CHLA: Children's Hospital Los Angeles

CHO: Ovário de Hamster Chinês (do inglês, *Chinese Hamster Ovary*)

CK1: *Casein Kinase 1*

CK19: Citoqueratina 19 (do inglês, *Cytokeratin 19*)

Cl.: Clone

cm: Centímetro

CONCEA: Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

CR: Domínio Rico em Cisteína (do inglês, *Cysteine-rich domain*)

CR-FU: Domínio Semelhante à Furina Rico em Cisteína (do inglês, *Cysteine-rich furin-like domain*)

Cy3: Indocarbocianina3

D: Dia

DC: Dicroísmo Circular

DHFR: Dihidrofolato Redutase

DKK1: *Dickkopf-related protein 1*

DII4: *Delta-like ligand 4*

DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (meio Dulbecco's Modified Eagle)

DMSO: Dimetilsulfóxido

DNA: Ácido Desoxirribonucleico – ADN (do inglês, *Deoxyribonucleic Acid*)

DSA: Aglutinina de *Datura stramonium* (do inglês, *Datura stramonium agglutinin*)

Dvl: Dishevelled

E-Cad: E-Caderina

ECN: enterocolite necrosante

EGF: Fator de Crescimento Epitelial (do inglês, *Epidermal Growth Factor*)

ELISA: Ensaio Imunoenzimático (do inglês, *Enzyme-linked Immunosorbent Assay*)

EM: Exclusão Molecular

EMBL-EBI: *European Bioinformatics Institute*

ESI: Ionização por Electropulverização (do inglês, *Electrospray Ionization*)

Ex4: Exendina-4

Exp: Experimento

ExpASy: *Swiss Institute of Bioinformatics Platform*

eYFP: Proteína Fluorescente Amarela melhorada (do inglês, *enhanced Yellow Fluorescent Protein*)

FDA: *Food and Drug Administration*

FGF: Fator de Crescimento de Fibroblasto (do inglês, *Fibroblast growth factor*)

FGF3/4: Fator de Crescimento de Fibroblasto 3/4 (do inglês *Fibroblast growth factor 3/4*)

FI: Falência Intestinal

FPLC: Cromatografia Líquida Rápida de Proteína (do inglês, *Fast Protein Liquid Chromatography*)

Fst: Folistatina

FU: Domínio Semelhantes à Furina (do inglês, *Furin-like domain*)

Fzd: *Frizzled*

g: grama; força da gravidade

GAG: Glicosaminoglicanos (do inglês, *Glycosaminoglycans*)

Gal: Galactose

GF: Gel filtração

GFP: Proteína Fluorescente Verde (do inglês, *Green Fluorescent Protein*)

GlcNAc: N-acetilglicosamina

GNA: Aglutinina de *Galanthus nivalis* (do inglês, *Galanthus nivalis agglutinin*)

GSK-3 beta: *Glycogen synthase kinase 3 beta*

H&E: Hematoxilina-Eosina

HBSS: Solução Salina Tamponada de Hank (do inglês, *Hank's Balanced Salt Solution*)

HEK: Rim Embrionário Humano (do inglês, *Human Embryonic Kidney*)

Hep: Heparina

HGF: Fator de Crescimento de Hepatócitos (do inglês, *Hepatocyte Growth Factor*)

Higro: Resistência à Higromicina B

HNF4 α : Fator Nuclear de Hepatócitos 4 Alfa (do inglês, *Hepatocyte Nuclear Factor 4 alpha*)

HPLC: Cromatografia Líquida de Alta Performance (do inglês, *High Performance Liquid Chromatography*)

HRP: peroxidase de raiz forte (do inglês, *Horseradish Peroxidase*)

HSPGs: Proteoglicanos de Sulfato de Heparano (do inglês, *Heparan Sulfate Proteoglycans*)

i.p.: via intraperitoneal

i.v.: via intravenosa

IACUC: Comitê Institucional de Cuidado e Uso de Animais (do inglês, *Institutional Animal Care and Use Committee*)

IEP: Perímetro Epitelial Intestinal (do inglês, *Intestinal Epithelium Perimeter*)

IF: Imunofluorescência

IFALD: Complicações Tardias da Doença de Fígado Associada à Falência Intestinal (do inglês, *Intestinal Failure-Associated Liver Disease*)

IMARC: *International Market Analysis Research & Consulting*

Int7: Sítio comum de Integração 7 do Vírus de Tumor de Mama de Camundongo (do inglês, *Integration Site for the Mouse Mammary Tumor Virus*)

IRES: Sítio Interno de Entrada do Ribossomo (do inglês, *Internal Ribosome Entry Site*)

ISC: Células-tronco intestinais (do inglês, *Intestinal Stem Cells*)

JNK: *c-Jun N-terminal kinases*

kDa: quilodalton

KRM1: *Kremen1*

L: Litro

LB: Meio Lisogênico (do inglês, Luria-Bertani; *Lysogeny Broth*)

LC: Cromatografia Líquida (do inglês, *Liquid Chromatography*)

LGR4-6: Receptor 4-6 Acoplado à Proteína G Contendo Domínios Repetidos Ricos em Leucina (do inglês, *Leucine Rich Repeat Containing G Protein-Coupled Receptor 4-6*)

LOU: Unidades Organoides de Fígado (do inglês, *Liver Organoid Units*)

LRP5/6: Receptores de Lipoproteína de Baixa Densidade 5/6 (do inglês, *Low-Density Lipoprotein Receptor-related Protein 5/6*)

m: metro

M: Molar; Marcador de Peso Molecular

MAA: Aglutinina de *Maackia Amurensis* (do inglês, *Maackia amurensis agglutinin*)

MALDI-TOF: *Matrix-Assisted Laser Desorption / Ionization - Time Of Flight*

MC: Meio Condicionado

MCO: Meio Condicionado Original

MCS: Sítio Múltiplo de Clonagem (do inglês, *Multiple Cloning Site*)

MEC: Matriz Extracelular

mL: Mililitros

MLN: Meio Livre de Nucleosídeos

mM: Milimolar

MMTV: Vírus de Tumor de Mama de Camundongo (do inglês, *Mouse Mammary Tumor Virus*)

Mo-MuSV LTR: LTR do Vírus de Sarcoma Murino de Moloney (do inglês, *Moloney Murine Sarcoma Virus Long Terminal Repeat*)

mRNA: RNA mensageiro (do inglês, *messenger RNA*)

MS: Espectrometria de Massa (do inglês, *Mass Spectrometry*)

mTESI: TESI de camundongo (do inglês, *mouse TESI*)

MTX: Metotrexato

Muc-2: Mucina 2

MWM: Marcador de Peso Molecular (do inglês, *Molecular Weight Marker*)

Myf5: Fator Miogênico 5 (do inglês, *Myogenic Factor 5*)

NCBI: *National Center for Biotechnology Information*

NEAA: Aminoácidos Não Essenciais (do inglês, *Non Essential Amino Acids*)

NFAT: Fator Nuclear Associado às Células T (do inglês, *Nuclear Factor Associated with T cells*)

NFM: Meio Livre de Nucleosídeos (do inglês, *Nucleoside Free Media*)

NF-κB: *Nuclear Factor kappa B*

NIH: *US National Institute of Health*

nM: Nanomolar

nm: Nanômetro

NOD/SCID: Camundongo Imunodeficiente Severo Combinado Diabético não Obeso (do inglês, *Non-Obese Diabetic/Severe Combined immunodeficient mice*)

NP: Nutrição Parenteral

NPT: NP Total

NT: Não Tratado

OCM: Meio Condicionado Original (do inglês, *Original Conditioned Media*)

pb: pares de base

PBS: Solução Salina Tamponada com Fosfato (do inglês, *Phosphate Buffered Saline*)

PBSA: Solução Salina Tamponada com Fosfato sem Cálcio ou Magnésio (do inglês, *Phosphate Buffered Saline Absent*)

PCNA: Antígeno Nuclear de Célula Proliferante (do inglês, *Proliferating Cell Nuclear Antigen*)

PCP: Polaridade de Celulas Planares

PCR: Reação em Cadeia da Polimerase (do inglês, *Polymerase Chain Reaction*)

PGA/PLLA: Ácido Poliglicólico/Ácido Poli L-Láctico (do inglês, *Poly-Glycolic Acid/Poly-L-Lactic Acid*)

PNA: Aglutinina de Amendoim (do inglês, *Peanut Agglutinin*)

PNGase F: N-glicosidase F

pNU1Ø: plasmídeo pNU1 vazio

PTK7: *Tyrosine-protein kinase-like 7*

PTM: Modificações Pós-Traducionais (do inglês, *Post-Translational Modifications*)

PVP K30: Polivinilpirrolidona K30

Pygo: *Pygopus*

qRT-PCR: PCR quantitativo em Tempo Real (do inglês, *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction quantitative Real Time*)

rcf: rotações centrífugas

rh: recombinante humano(a) (do inglês, *recombinant human*)

Rho: *Ras homologous*

RNA: Ácido Ribonucleico – ARN (do inglês, *Rybonucleic Acid*)

ROCK: *Rho-associated Protein Kinase*

ROR1/2: *Receptor Tyrosine Kinase Like Orphan Receptor 1*

rpm: rotações por minuto

RSPO: Espondina Específica da Placa Basal do Tubo Neural (do inglês, *Roof plate-specific Spondin*)

Ryk: *Receptor Like Tyrosine Kinase*

SBS: Síndrome do Intestino Curto (do inglês, *Short Bowel Syndrome*)

SDS: Dodecil Sulfato de Sódio (do inglês, *Sodium Dodecyl Sulfate*)

SDS-PAGE: Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com SDS (do inglês, *Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis*)

SEM: Erro Padrão (do inglês, *Standard Error*)

SFB: Soro Fetal Bovino

SFM: Meio Livre de Soro (do inglês, *Serum Free Media*)

SHH: *Sonic Hedgehog*

SIC: Síndrome do Intestino Curto

SIC ZF: Modelo de Síndrome do Intestino Curto em *Zebrafish*

SMA: α -actina do músculo liso (do inglês, *Alpha Smooth Muscle Actin*)

SNA: Aglutinina de Sambucus Nigra (do inglês, *Sambucus Nigra Agglutinin*)

SP: Sequência de Peptídeo Sinal (do inglês, *Signal Peptide*)

SPF: Livre de Patógenos Específicos (do inglês, *Specific Pathogen Free*)

TA: Região Amplificadora de Trânsito (do inglês, *Transit-Amplifying region*)

TBS-T: Solução Salina Tamponada com Tris contendo Tween[®]20 (do inglês, *Tris-Buffered Saline with Tween[®]20*)

TCL/LEF: *T-Cell Factor/ Lymphoid Enhancer Factor*

TELi: Fígado Engenheirado (do inglês, *Tissue Engineered Liver*)

TESI: Intestino Delgado Engenheirado (do inglês, *Tissue-Engineered Small Intestine*)

TGF- β : Fator de Crescimento Transformante Beta (do inglês, *Transforming Growth Factor Beta*)

TSR: Domínio de Repetição de Trombospondina Tipo I (do inglês, *Thrombospondin Type 1 Repeat Domain*)

Tuj 1: Beta-tubulina classe III específica para neurônios (do inglês, *Neuron-specific class III beta-tubulin*)

UBS: Solução Universal de Bloqueio (do inglês, *Universal Blocking Solution*)

UI: Unidades Internacionais

Uniprot: *Universal Protein Resource*

UO: Unidade Organoide

VC: Volumes de Coluna

VEGF: Fator de Crescimento Endotelial Vascular (do inglês, *Vascular Endothelial Growth Factor*)

VEP: Perímetro Epitelial da Vilosidade (do inglês, *Villus Epithelial Perimeter*)

VH: Altura da Vilosidade (do inglês, *Villus Height*)

WB: *Western Blot*

Yap1: *Yes-associated Protein 1*

ZF: *Zebrafish*

ZF SBS: Modelo de Síndrome do Intestino Curto em *Zebrafish* (do inglês, *zebrafish short bowel syndrome model*)

ZNRF3: *Zinc and Ring Finger 3*

β -act: β -actina

μ g: Microgramas

μ L: Microlitros

μ M: Micromolar

μ m: Micrometro

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO/ REVISÃO DE LITERATURA.....	32
1.1 Biofármacos e seus sistemas de produção.....	32
1.2 R-Espondinas e sua expressão	33
1.3 Função biológica das RSPOs	34
1.4 Estrutura das RSPOs.....	39
1.5 Sinalização de RSPO e WNT	42
1.6 Implicações terapêuticas do uso de RSPO1.....	48
1.6.1 <i>Trato Gastrointestinal: problemas associados e tratamentos</i>	50
1.6.1.1 <i>Engenharia Tecidual aplicada à regeneração de intestino</i>	54
2. OBJETIVOS	59
2.1 Objetivo Geral.....	59
2.2 Objetivos Específicos	59
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	62
Capítulo I – Produção, purificação e caracterização da rhRSPO1	
3.1 Síntese da sequência codificadora do gene RSPO1 humano.....	62
3.2 Vetores Plasmideais	63
3.3 Subclonagem do inserto de cDNA no vetor plasmideal de expressão para células de mamíferos pNU1 e seleção dos clones bacterianos.....	64
3.4 Linhagens celulares e condições de cultivo	65
3.5 Transfecção das células HEK293 e CHO-DG44 (<i>dhfr^{-/-}</i>) e seleção de clones celulares	66
3.6 Análise da expressão proteica da rhRSPO1.....	69
3.7 Purificação da rhRSPO1 por cromatografia líquida rápida de proteína....	69
3.8 Atividade biológica <i>in vitro</i> da rhRSPO1.....	70
3.9 Estabilidade e cinética de produção da rhRSPO1	72
3.10 Adaptação das células HEK293 superprodutoras de rhRSPO1 ao cultivo em suspensão	72
3.11 Ensaio de atividade da rhRSPO1 <i>in vivo</i>	73
3.12 Caracterização estrutural e análise do perfil de glicosilação da rhRSPO1	74
3.12.1 <i>Ensaio de Desglicosilação com PNGase F</i>	74
3.12.2 <i>Ensaio de Lectinas do tipo ELISA (Painel de Lectinas)</i>	75
3.12.3 <i>Análise de LC-MS/MS</i>	76
3.13 Análise estatística.....	77
Capítulo II – Avaliação funcional da rhRSPO1 na Engenharia Tecidual	
3.14 Animais (camundongos)	77

3.15 Isolamento de Unidades Organoides Intestinais e de Fígado.....	77
3.16 Cultivo de UOs e quantificação do seu tamanho e taxa de sobrevivência	78
3.17 Coleta e armazenamento das UOs cultivadas <i>in vitro</i> para análises (Histologia, RNA e Proteínas)	80
3.18 Análise da expressão gênica através de qRT-PCR.....	81
3.19 Análise da expressão gênica através de Western Blot	81
3.20 Preparação do Arcabouço/ <i>Scaffold</i>	82
3.21 Implantação de UOs e Formação do TESI e TELi.....	83
3.22 Avaliação da Complexidade do TESI e formação do TELi	83
3.23 Imunoensaios (Imunofluorescência).....	85
3.24 Análise Estatística	87
Capítulo III – Avaliação funcional da rhRSPO1 na Regeneração Tecidual em modelo de Síndrome do Intestino Curto em <i>Zebrafish</i>	
3.25 Animais (<i>zebrafish</i>)	87
3.26 Procedimento cirúrgico para indução da SIC.....	88
3.27 Protocolos de tratamento, pesagem e coleta de material	88
3.28 Quantificação dos parâmetros histológicos de adaptação intestinal	90
3.29 Marcações Imunofluorescentes	90
3.31 Análise Estatística	92
4. RESULTADOS	93
Capítulo I – Produção, purificação e caracterização da rhRSPO1	
4.1 Geração da construção plasmideal pNU1/rhRSPO1	93
4.2 Seleção das células CHO-DG44 pNU1/rhRSPO1 positivas e amplificação gênica.....	96
4.3 <i>Screening</i> de clones celulares superprodutores de rhRSPO1	97
4.3.1 HEK293	97
4.3.2 CHO-DG44	99
4.4 Purificação da rhRSPO1 proveniente do meio condicionado.....	100
4.5 Cinética de produção e estabilidade da rhRSPO1	104
4.6 Atividade biológica da rhRSPO1 <i>in vitro</i>	105
4.7 Atividade biológica da rhRSPO1 <i>in vivo</i>	108
4.8 Caracterização Estrutural da rhRSPO1	109
4.8.1 Ensaio de desglicosilação com PNGase F	109
4.8.2 Ensaio de Painel de Lectinas	110
4.8.3 Análise de LC-MS/MS	111
4.9 Adaptação das células HEK293 superprodutoras de rhRSPO1 ao cultivo em suspensão	112

Capítulo II – Avaliação funcional da rhRSPO1 na Engenharia Tecidual

4.10 rhRSPO1 aumenta o tamanho e a sobrevivência de UOs intestinais <i>in vitro</i>	114
4.11 rhRSPO1 contribui para a manutenção do nicho de células-tronco	117
4.12 rhRSPO1 ativa a via de sinalização de Wnt dependente de beta-catenina	118
4.13 rhRSPO1 aumenta o tamanho e o grau de desenvolvimento do TESI <i>in vivo</i>	119
4.14 O TESI tratado com rhRSPO1 gera uma mucosa completamente diferenciada em um mês	122
4.15 O TESI tratado com rhRSPO1 apresenta um nicho intacto de células-tronco e uma camada muscular inervada	123
4.16 rhRSPO1 aumenta o tamanho de LOUs <i>in vitro</i> sem interferir em sua sobrevivência	124
4.17 LOUs semeadas sobre scaffolds geram fígado engenheirado em 1 mês	125

Capítulo III – Avaliação funcional da rhRSPO1 na Regeneração Tecidual em modelo de Síndrome do Intestino Curto em *Zebrafish*

4.18 Injeções intraperitoneais repetidas são uma estratégia de dosagem viável em ZF	127
4.19 rhRSPO1 reduz a perda de peso de ZF em 14 dias após cirurgias de SIC/SBS	128
4.20 rhRSPO1 não interfere na adaptação intestinal em modelo de SIC/SBS em ZF	128
4.21 rhRSPO1 aumenta a proliferação de células epiteliais intestinais em sete dias após cirurgia de SIC/SBS	132
4.22 rhRSPO1 não afeta a morte celular no epitélio intestinal em 7 ou 14 dias após cirurgia de SIC/SBS	133
4.23 rhRSPO1 induz uma maior expressão de β -catenina em 14 dias após cirurgia de SIC/SBS	134
4.24 rhRSPO1 parece não interferir com a expressão gênica de <i>ciclina D1</i> , <i>c-myc</i> , <i>yap1</i> e β - <i>catenina</i> a nível de mRNA em 14 dias após cirurgia de SIC/SBS	136
4.25 O tratamento com rhRSPO1 não melhora a esteatose hepática no modelo de SIC/SBS em ZF	137
5. DISCUSSÃO	139
6. CONCLUSÕES	160
7. PERSPECTIVAS FUTURAS	162
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	163
APÊNDICES E ANEXOS	177

1. INTRODUÇÃO/ REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Biofármacos e seus sistemas de produção

Biofármacos, ou medicamentos biológicos, são substâncias terapêuticas produzidas por técnicas biotecnológicas, através da expressão em células, microorganismos ou sistemas livres de células (que utilizam extratos celulares). Estes biomedicamentos possuem um mercado extremamente grande e promissor, com dados do *International Market Analysis Research & Consulting* (IMARC) estimando o valor em vendas mundiais de biofármacos excedendo a marca de US\$ 166 bilhões em 2017. Estes números foram confirmados recentemente pelos relatórios financeiros do La Marie, que indicaram um total de vendas de \$188 bilhões no ano de 2017 e \$651 bilhões em vendas acumuladas no período entre 2014-2017 (<http://www.lamerie.com> - acesso em: 03/2020).

Atualmente, diversas proteínas são produzidas por sistemas heterólogos de expressão, sendo muitas delas utilizadas para o tratamento de doenças humanas (WALSH, 2018). Dentre estas, podemos citar: a insulina, para o tratamento de diabetes; interferon, para hepatites virais; fatores VII, VIII e IX como tratamento para distúrbios de coagulação, dentre várias outras (DINGERMANN, 2008; WALSH, 2018).

Diversos sistemas de expressão já foram desenvolvidos para a produção destas biomoléculas, sendo utilizados tanto células procarióticas (bactérias) quanto eucarióticas (leveduras, células isoladas de insetos ou de mamíferos). Entretanto, a maior parte das proteínas de valor terapêutico possui formas muito complexas conferidas por modificações pós-traducionais, que dependem do sistema de expressão utilizado, sendo essenciais para a manutenção da estrutura e função da proteína. Dessa forma, por sua capacidade e eficiência na adição de modificações pós-traducionais, as células de mamíferos tem sido amplamente utilizadas como plataformas de expressão na produção de proteínas recombinantes, representando aproximadamente 80% dos medicamentos aprovados no período de 2015-2018 (WALSH, 2018).

Dentre as modificações pós-traducionais, a forma mais comum é a glicosilação, que merece especial atenção na produção de proteínas recombinantes

em sistemas heterólogos, uma vez que estas modificações podem interferir no dobramento, atividade, estabilidade e maturação da proteína, sendo dependentes do sistema de expressão utilizado (WALSH; JEFFERIS, 2006). Neste contexto, a célula CHO (*Chinese Hamster Ovary*), por sua capacidade de gerar padrões complexos de glicosilação, tem sido amplamente utilizada na produção de biofármacos produzidos em condições cGMP (*current Good Manufacturing Practice*) e aprovados por órgãos regulatórios como o FDA (Food and Drug Administration) (KIM; KIM; LEE, 2012; OMASA; ONITSUKA; KIM, 2010), sendo atualmente a célula de mamífero mais utilizada na indústria biofarmacêutica (WALSH, 2018). Outra célula amplamente empregada para estes fins é a célula HEK293 (*Human Embryonic Kidney*), a linhagem celular humana mais utilizada para a produção de biofármacos aprovados pelas agências regulatórias, também capaz de adicionar cadeias polissacarídicas complexas, em especial com a adição de tipos específicos de ácidos siálicos (CHITLARU; KRONMAN; ZEEVI; KAM *et al.*, 1998; DUMONT; EUWART; MEI; ESTES *et al.*, 2016).

1.2 R-Espondinas e sua expressão

As R-Espondinas (*Roof plate-specific Spondin*, RSPO) compõem uma família de proteínas secretadas conhecidas por seus papéis importantes na proliferação, diferenciação e morte celular, induzindo a via de Wnt (CADIGAN; PEIFER, 2009; VAN AMERONGEN; NUSSE, 2009). Sabe-se que as RSPOs são expressas em diversos tecidos embrionários e no adulto e que níveis adequados de sua expressão são fundamentais para a homeostasia e o desenvolvimento dos organismos (KAMATA; KATSUBE; MICHIKAWA; YAMADA *et al.*, 2004; KAZANSKAYA; GLINKA; DEL BARCO BARRANTES; STANNEK *et al.*, 2004). A capacidade das RSPOs de modular positivamente a via de WNT tem despertado um grande interesse, levando a investigações em diferentes sistemas *in vitro* e *in vivo* (YOON; LEE, 2012).

A família das RSPOs é composta por quatro proteínas secretadas, ricas em cisteína, as quais contêm um domínio único de repetição de trombospondina do tipo I (TSR). Estas proteínas são altamente conservadas do ponto de vista evolutivo, sendo encontradas em todos os deuterostômios, conforme dados genômicos e transcricionais (KIM; ZHAO; ANDARMANI; KAKITANI *et al.*, 2006). Durante o desenvolvimento embrionário, as *Rsp* são expressas em vários centros de

sinalização importantes neste processo, como, por exemplo, a parte dorsal do tubo neural (*roof plate*), broto caudal, crista ectodérmica apical (AER) dos membros e cérebro em formação (YOON; LEE, 2012). Estes dados, juntamente com a alta especificidade espaço-temporal da expressão de *Rsp*os em diversos tecidos, sugerem que estas proteínas desempenham papéis críticos na embriogênese. Entretanto, a importância das *Rsp*os fica ainda mais evidente pelo grande número de fenótipos aberrantes que ocorrem em decorrência da expressão deficitária destas proteínas (DE LAU; SNEL; CLEVERS, 2012). Por sua vez, a expressão das *RSPO*s em tecidos adultos humanos também indica um amplo e diversificado papel em diferentes células e na manutenção de tecidos e órgãos (KAMATA; KATSUBE; MICHIKAWA; YAMADA *et al.*, 2004; KAZANSKAYA; GLINKA; DEL BARCO BARRANTES; STANNEK *et al.*, 2004).

1.3 Função biológica das *RSPO*s

Em todo o Reino Animal, a sinalização de WNT exerce um papel central no desenvolvimento embrionário, participando da sinalização célula-célula, que regula os processos de proliferação, diferenciação, migração, adesão e mudanças de polaridade celular (NUSSE, 2005). Acredita-se que as *RSPO*s tenham efeitos pleiotrópicos nos organismos, condicionando múltiplas características diferentes através da expressão gênica diferencial durante o desenvolvimento embrionário, seguindo padrões bastante dinâmicos e específicos de expressão durante a embriogênese. O papel central das *RSPO*s no desenvolvimento embrionário e na regulação das diversas funções biológicas já mencionadas, é corroborado pela literatura científica, que descreve uma série de anormalidades fenotípicas para cada membro mutado da família das *RSPO*s.

Mutações no gene *RSPO1* humano foram identificados em indivíduos com reversão sexual do sexo feminino para masculino (XX) ou hermafroditismo verdadeiro XX (PARMA; RADI; VIDAL; CHABOISSIER *et al.*, 2006; TOMASELLI; MEGIORNI; DE BERNARDO; FELICI *et al.*, 2008). As proteínas *RSPO2* murina e humana, por sua vez, foram descritas como tendo um papel importante no desenvolvimento dos membros, crânio, pulmões e folículos pilosos (BELL; SCHREINER; WERT; MUCENSKI *et al.*, 2008; CADIEU; NEFF; QUIGNON; WALSH *et al.*, 2009; NAM; PARK; TURCOTTE; PALENCIA *et al.*, 2007; NAM; TURCOTTE;

YOON, 2007). O gene *Rspo3*, quando mutado, conduz a defeitos vasculares graves, especialmente na placenta, conforme observado em estudos de vasculogênese, angiogênese e dos sinais moleculares envolvidos nestes processos (AOKI; MIEDA; IKEDA; HAMADA *et al.*, 2007; KAZANSKAYA; OHKAWARA; HEROULT; WU *et al.*, 2008). Por fim, as várias alterações genéticas envolvidas com a falta congênita das unhas (anoníquia) se devem à síntese severamente prejudicada da proteína funcional RSPO4 (BERGMANN; SENDEREK; ANHUF; THIEL *et al.*, 2006; BLAYDON; ISHII; O'TOOLE; UNSWORTH *et al.*, 2006; BRÜCHLE; FRANK; FRANK; SENDEREK *et al.*, 2008; ISHII; WAJID; BAZZI; FANTAUZZO *et al.*, 2008).

Além disso, conforme revisto por Yoon & Lee, e atualizado neste trabalho, outros estudos têm demonstrado a importância das RSPOs na regulação de inúmeros processos celulares tecido-específicos, a citar: (a) formação óssea, (b) desenvolvimento do tecido muscular esquelético, (c) proliferação de células β do pâncreas, (d) proliferação de células-tronco intestinais, (e) formação de diversos tipos de tumores (YOON; LEE, 2012).

a- Formação óssea

A formação dos ossos, seu desenvolvimento e crescimento dependem, dentre outros fatores, da via canônica de sinalização de Wnt/ β -catenina, induzida pelas RSPOs (SHI; MAO; ZHENG; JIANG, 2016). Estudos demonstraram que mutações nos receptores LRP5, expressos por osteoblastos, aos quais ligantes WNT e RSPOs se ligam, leva a quadros de síndrome de osteoporose pseudoglioma (BOYDEN; MAO; BELSKY; MITZNER *et al.*, 2002). Mais especificamente, dentre as RSPOs, sabe-se que RSPO1 é capaz de induzir a diferenciação osteogênica em osteoblastos murinos *in vitro* (LU; KIM; LIU; ABO *et al.*, 2008) e que RSPO2 promove a maturação e mineralização destes (FRIEDMAN; OYSERMAN; HANKENSON, 2009). Outro estudo sugere que a RSPO1 apresenta um papel importante no remodelamento ósseo em células humanas, induzindo a diferenciação óssea tanto em osteoblastos primários ou linhagem celular de osteoprogenitores humanos hFOB1.19 (SHARMA; CHOI; PARK; LEE *et al.*, 2013). Além disso, pesquisas mais recentes também indicaram que a *Rspo2* promove a diferenciação osteoblástica de células ligamentares periodontais humanas imaturas (ARIMA; HASEGAWA; YOSHIDA; MITARAI *et al.*, 2019) e sugerem um novo papel da *Rspo2*

na diferenciação condrogênica e na ossificação endocondral (TAKEGAMI; OHKAWARA; ITO; MASUDA *et al.*, 2016).

b- Miogênese esquelética

A musculatura esquelética tem origem nos somitos formados pela divisão da mesoderma paraxial. Durante diferentes estágios da miogênese esquelética, a via de sinalização de WNT atua em conjunto com a via de SHH (*Sonic Hedgehog*) e de TGF- β (*Transforming Growth Factor Beta*), regulando a diferenciação e o desenvolvimento do músculo esquelético, através da modulação do fator miogênico Myf5a (BORYCKI; BRUNK; TAJBAKSH; BUCKINGHAM *et al.*, 1999; MÜNSTERBERG; LASSAR, 1995) e follistatin (Fst) (HAN; JIN; TAN; KOSCIUK *et al.*, 2014), respectivamente. Nesse processo, participam, possivelmente e de maneira sinérgica, as proteínas RSPO1, RSPO3 e WNT, todas derivadas da região do tubo neural dorsal (KAZANSKAYA; GLINKA; DEL BARCO BARRANTES; STANNEK *et al.*, 2004; NAM; TURCOTTE; YOON, 2007), em conjunto com SHH, advindo da notocorda e da placa ventral do tubo neural (BORYCKI; BRUNK; TAJBAKSH; BUCKINGHAM *et al.*, 1999; MÜNSTERBERG; LASSAR, 1995). Estudos *in vitro* e *in vivo* corroboram o envolvimento das RSPOs na miogênese esquelética, demonstrando que a participação de RSPO2 é essencial para a miogênese em *Xenopus*, no qual a superexpressão de *RSPO1* ou o tratamento com RSPO2 aumentaram a expressão de Myf5 em mioblastos C2C12 e células satélites primárias (HAN; JIN; SETO; YOON, 2011; KAZANSKAYA; GLINKA; DEL BARCO BARRANTES; STANNEK *et al.*, 2004), e que RSPO2 inibe a expressão de Fst (HAN; JIN; TAN; KOSCIUK *et al.*, 2014). Além disso, mais recentemente, a *Rspo1* foi descrita como um mediador do reparo de tecido muscular esquelético, controlando a fusão de células musculares através da regulação de vias de sinalização antagonistas de Wnt (LACOUR; VEZIN; BENTZINGER; SINCENNES *et al.*, 2017).

c- Proliferação de células- β pancreáticas

A sinalização de WNT/ β -catenina é essencial para a proliferação das células beta das ilhotas pancreáticas (RULIFSON; KARNIK; HEISER; TEN BERGE *et al.*, 2007). Sabe-se que o agonista do receptor peptídeo-1 semelhante ao glucagon,

exendina-4 (Ex4), induz a expressão de RSPO1 ao nível transcricional em células pancreáticas, levando a efeitos celulares visíveis em células de insulinoma de camundongo (MIN6), pela indução da via de Wnt (LIU; HABENER, 2008; WONG; YEUNG; SCHULTZ; BRUBAKER, 2010). Entretanto, as funções específicas que a RSPO1 desempenha, nesse e em outros processos fisiológicos, ainda não estão bem elucidadas na literatura, devido ao número escasso de trabalhos na área e à existência de resultados conflitantes. Wong e colaboradores, demonstraram que a proteína RSPO1 foi capaz de estimular a proliferação celular, diminuir a apoptose induzida por citocinas e aumentar a secreção de insulina em células- β em ensaios *in vitro* utilizando células MIN6 e células beta isoladas de camundongo (WONG; YEUNG; SCHULTZ; BRUBAKER, 2010). Contudo, a análise *in vivo*, utilizando ratos nocaute para *Rspo1*, apresentou resultados aparentemente contrários ao primeiro estudo, nos quais os animais nocaute apresentaram maior proliferação de células- β e maior resposta à insulina, sugerindo que a *Rspo1* atua inibindo estes processos (WONG; OH; CHASSOT; CHABOISSIER *et al.*, 2011). Contudo, tais diferenças podem ser consequência da dose de RSPO1 utilizada e, também, de uma possível compensação por outras RSPOs *in vivo*.

d- Proliferação de células-tronco intestinais

As RSPOs são proteínas secretadas conhecidas por induzir a proliferação de células tronco intestinais (ISCs) através da ativação da via de Wnt, com efeitos insignificantes na migração de células diferenciadas e diferenciação ao longo do eixo cripta-vilosidade (KIM; KAKITANI; ZHAO; OSHIMA *et al.*, 2005). Sabe-se que as ISCs apresentam, assim como outras células-tronco, os receptores *Lgr4* e *Lgr5*, aos quais as RSPOs se ligam para ativar a via de Wnt e induzir a proliferação celular (DE LAU; SNEL; CLEVERS, 2012; PINTO; CLEVERS, 2005). Nos tecidos intestinais, os ligantes WNT, pelo seu efeito mitogênico resultante da ativação da via WNT/ β -catenina, são essenciais para manter a homeostasia do processo de auto-renovação que ocorre no eixo cripta-vilosidade (DE LAU; BARKER; CLEVERS, 2007). Contudo, as proteínas WNT e as RSPOs não são equivalentes com relação à indução desse processo nas células-tronco intestinais *Lgr5*⁺, possivelmente atuando de maneira complementar nestes tecidos (YAN; JANDA; CHANG; ZHENG *et al.*, 2017). Em camundongos, a administração sistêmica de RSPO1 e ativação da via de

Wnt, levou a um aumento de proliferação no epitélio intestinal e consequente aumento de diâmetro (KIM; KAKITANI; ZHAO; OSHIMA *et al.*, 2005). Além disso, *in vitro*, a RSPO1 permitiu a propagação contínua de organoides intestinais que não possuem mesênquima, bem como a expansão de células ISCs isoladas (BARKER; HUCH; KUJALA; VAN DE WETERING *et al.*, 2010; OOTANI; LI; SANGIORGI; HO *et al.*, 2009; SATO; VRIES; SNIPPERT; VAN DE WETERING *et al.*, 2009) e o prolongamento da vida útil em cultura de fatias intestinais cortadas com precisão (BIGAEVA; BOMERS; BIEL; MUTSAERS *et al.*, 2019), permitindo aplicações *ex vivo*. Outro estudo recente, sugere que a RSPO1 interfere na microbiota intestinal e favorece a homeostasia deste tecido, estimulando a diferenciação de células-tronco intestinais em células de Paneth, melhorando, conseqüentemente, a secreção luminal de α -defensinas, que contribuem para a diminuição das alterações desfavoráveis da microbiota (disbiose) (HAYASE; HASHIMOTO; NAKAMURA; NOIZAT *et al.*, 2017).

e- Formação de tumores

O desbalanço na sinalização da via canônica de WNT, especialmente em quadros de hiperativação, está associado fortemente à perda do controle do ciclo celular e casos de câncer em diferentes tecidos. Dentre os tipos de câncer associados às proteínas RSPO, os mais notáveis são o câncer de mama (ALEXANDER, 2018) e carcinomas colorretais (KRAUSOVA; KORINEK, 2014). Em cânceres de mama, os genes *RSPO2* (LOWTHER; WILEY; SMITH; CALLAHAN, 2005) e *RSPO3* (THEODOROU; KIMM; BOER; WESSELS *et al.*, 2007) foram indicados como sendo sítios comuns de integração 7 (int7) do vírus de tumor de mama de camundongo (MMTV), o qual, por sua vez, está associado aos eventos iniciais da tumorigênese mamária. A inserção do vírus MMTV no gene *RSPO2* leva ainda à superexpressão deste gene e, quando inserido em *loci* dos ligantes Wnt, também leva à tumorigênese mamária. Sabe-se, ainda, que *in vitro*, a superexpressão de RSPOs, em conjunto com ligantes Wnt, leva ao aumento da capacidade invasiva em culturas 3D e potencial metastático *in vivo* (KLAUZINSKA; BALJINNYAM; RAAFAT; RODRIGUEZ-CANALES *et al.*, 2012). Em cânceres colorretais, frequentemente, a iniciação do processo maligno está associado a mutações no gene APC (*adenomatous polyposis coli*) e β -catenina, conferindo

vantagens adaptativas às células mutadas. Entretanto, estudos apontam que o gene *RSPO2* é superexpresso em cânceres colorretais de camundongo (STARR; ALLAEI; SILVERSTEIN; STAGGS *et al.*, 2009) e em linhagem malignas humanas deste tipo de câncer (KANEDA; ARAO; TANAKA; TAMURA *et al.*, 2010). Ademais, outro trabalho demonstrou que fusões gênicas envolvendo *RSPO2* e *RSPO3* são mutuamente exclusivos com mutações do gene *APC*, sendo recorrentes em 10% dos tumores de cólon (SESHAGIRI; STAWISKI; DURINCK; MODRUSAN *et al.*, 2012). Além dos cânceres de mama e carcinomas colorretais, também foi visto que *RSPO2* encontra-se superexpresso em carcinoma de células escamosas da língua (ZHANG; SONG; LING; LI *et al.*, 2019) e que os receptores *LGR6*, quando superexpressos, possivelmente aumentam a sinalização de RSPOs em carcinoma de célula escamosa esofágica (CHAI; SHEN; ZHANG; CHEN *et al.*, 2020). Contudo, outros tipos de câncer também podem estar, de alguma forma, relacionados à expressão de RSPOs, como por exemplo, cânceres de pulmão (WU; ZHANG; QIAN; WU *et al.*, 2019) e ovário (SCHINDLER; WATANABE; HOWELL, 2017).

1.4 Estrutura das RSPOs

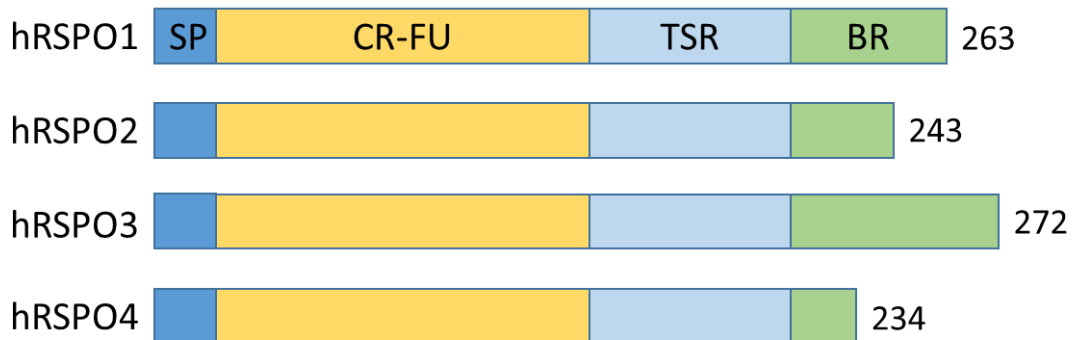


Figura 1 - Representação esquemática da estrutura das RSPOs humanas (adaptado de Yoon & Lee, 2012 (YOON; LEE, 2012)). SP, sequência de peptídeo sinal; CR-FU, domínio semelhante à furina, rico em cisteína; TSR, repetição de trombospondina tipo I; BR, domínio rico em aminoácidos básicos.

As proteínas da família das RSPOs humanas variam entre 234-272 aminoácidos e possuem sequências de aminoácidos altamente conservadas, especialmente entre os vertebrados, implicando também em funções conservadas (Figura 1). Todas as quatro RSPOs possuem quatro domínios estruturais bem definidos, a saber: (1) uma sequência de peptídeo sinal hidrofílico, (2) um domínio

semelhante à furina, rico em cisteína (CR-FU), (3) um domínio de repetição de trombospondina I (TSR), e (4) um domínio rico em aminoácidos básicos (BR) de comprimento variável (região carboxi-terminal) (YOON; LEE, 2012).

O peptídeo sinal na região amino-terminal da proteína é responsável pela sua entrada na via secretora, endereçando-a ao retículo endoplasmático, complexo de Golgi e, posteriormente, ao exterior da célula. O domínio CR-FU das proteínas RSPO é primariamente responsável por mediar a ativação da via de sinalização de WNT/ β -catenina, sendo que a deleção de todo ou parte desde domínio suprime a sua capacidade de ativar a via de sinalização canônica de WNT (KAZANSKAYA; GLINKA; DEL BARCO BARRANTES; STANNEK *et al.*, 2004; KIM; WAGLE; TRAN; ZHAN *et al.*, 2008; LI; YEN; ENDO; KLAUZINSKA *et al.*, 2009; NAM; TURCOTTE; SMITH; CHOI *et al.*, 2006). Trabalhos também sugerem que o domínio CR-FU, presente nas RSPOs, pode estar envolvido na regulação da secreção destas proteínas, sendo que a deleção deste domínio leva a uma menor detecção da proteína no meio extracelular. Contudo, não se sabe ao certo como se dá o envolvimento desta porção com o processo de secreção da RSPO (LI; YEN; ENDO; KLAUZINSKA *et al.*, 2009). O domínio CR-FU das RSPOs 1 e 3 apresentam duas repetições FU (semelhantes à furina), enquanto as RSPOs 2 e 4 possuem somente uma repetição. Sabe-se, ainda, que as repetições de furina também estão presentes em fatores de crescimento, tais como fator de crescimento epitelial (EGF), insulina, fator de crescimento de hepatócitos (HGF) e fatores neurotróficos, conforme revisto por de Lau, Snel e Clevers (DE LAU; SNEL; CLEVERS, 2012).

Kim e colaboradores demonstraram que a proteína RSPO sem os domínios TSR e BR ativa a via de sinalização canônica de WNT de forma menos eficaz (KIM; WAGLE; TRAN; ZHAN *et al.*, 2008). Dessa forma, acredita-se que estes domínios sejam responsáveis pela regulação da intensidade da ação das RSPOs na indução da via canônica de Wnt. Outros estudos sugerem, ainda, que estes domínios também são responsáveis pela associação das RSPOs à matriz extracelular (MEC), através de ligações a glicosaminoglicanos (GAG) e proteoglicanos (AYADI, 2008; HOUCK; LEUNG; ROWLAND; WINER *et al.*, 1992; KAZANSKAYA; GLINKA; DEL BARCO BARRANTES; STANNEK *et al.*, 2004; NAM; TURCOTTE; SMITH; CHOI *et al.*, 2006; OHKAWARA; GLINKA; NIEHRS, 2011) [revisto por (DE LAU; SNEL; CLEVERS, 2012)].

A proteína RSPO1 é codificada a partir do gene *RSPO1* localizado no cromossomo 1, na posição 1p34.3, composto por oito exons, apresentando três isoformas resultantes de recomposição alternativa destes, sendo a isoforma 1, denominada de isoforma canônica. A isoforma canônica, a maior das três, é codificada pelas variantes transcricionais 1 e 2 do gene *RSPO1* e compõe, juntamente com outras duas, um total de quatro variantes, transcritas a partir da fita menos do DNA, segundo a base de dados do NCBI (acesso em: 03/2020).

De acordo com a base de dados Uniprot (acesso em: 03/2020), a proteína RSPO1 (*roof plate-specific spondin1*), produzida e estudada neste trabalho, é formada por 263 resíduos de aminoácidos em sua cadeia polipeptídica e possui 28,959 kDa. Quanto às modificações pós-traducionais, análises *in silico* da proteína RSPO1 demonstraram uma estrutura tridimensional com duas alças, rica em pontes dissulfeto e estruturas secundárias do tipo folha beta pregueada (Figura 2). Além disso, estudos recentes demonstraram a presença de uma N-glicosilação na Asn137 da cadeia polipeptídica, que está relacionada com a secreção, atividade e estabilidade da RSPO1 (CHANG; HSU; WENG; CHEN *et al.*, 2016; TSUCHIYA; NIWA; SIMIZU, 2016), embora os dois artigos citados apresentem resultados divergentes quanto ao efeito da N-glicosilação sobre a proteína.

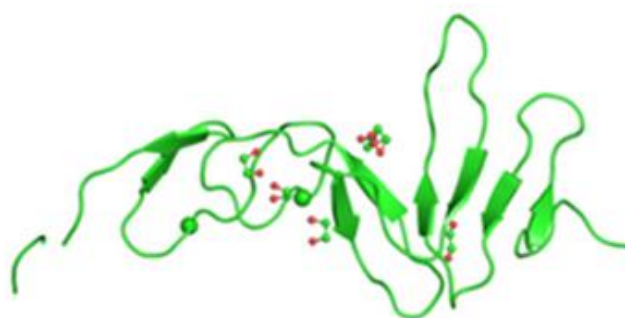


Figura 2 - Estrutura cristalina da RSPO1. A RSPO1 possui uma estrutura tridimensional com duas alças, rica em pontes dissulfeto e estruturas secundárias do tipo folha beta pregueada representadas pelas setas verdes (retirado de EMBL-EBU: Protein Data Bank in Europe - PDBe > 4bso - <<http://www.ebi.ac.uk/pdbe-srv/view/entry/4bso/summary.html>> - acesso em: 03/2020).

1.5 Sinalização de RSPO e WNT

A via de sinalização de Wnt é uma das principais vias que regulam diversos processos biológicos durante o desenvolvimento e a homeostase. Os ligantes WNT ativam dois caminhos de sinalização intracelulares principais, conhecidos como: via canônica (ou dependente de β -catenina) (CADIGAN; PEIFER, 2009; MACDONALD; TAMAI; HE, 2009) e vias independentes de β -catenina (não-canônicas), como a via Wnt/PCP e a via de Wnt/Ca²⁺ (Figura 3) (KOHN; MOON, 2005; SCHLESSINGER; HALL; TOLWINSKI, 2009; SUGIMURA; LI, 2010). Todas estas vias são iniciadas pela ligação das proteínas Wnt a receptores da família Frizzled (Fzd), porém com a participação de diferentes co-receptores. Atualmente, sabe-se que as proteínas RSPOs são capazes de induzir ambas as vias de Wnt, conforme revisto por Yoon e Lee (YOON; LEE, 2012) e De Lau et al (DE LAU; SNEL; CLEVERS, 2012). Contudo, apesar de existirem muitos estudos sobre os mecanismos de ação das RSPOs, diversas dúvidas sobre os receptores e mecanismos envolvidos na transdução de sinal destas proteínas ainda persistem.

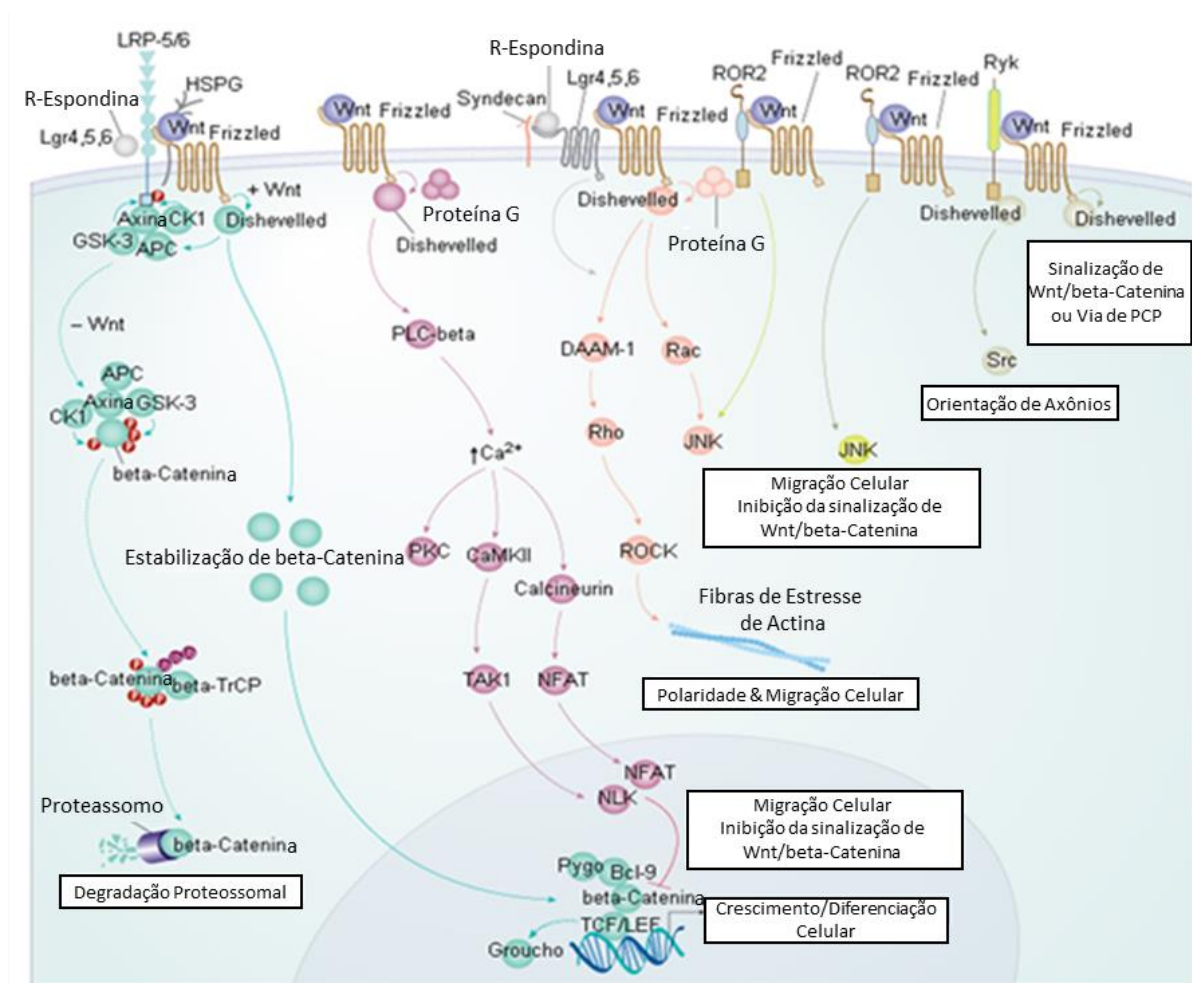


Figura 3 - Vias de Sinalização de Wnt: Via canônica e vias não-canônicas (adaptado de R&D Systems <<http://www.rndsystems.com/Pathway.aspx?p=15489&r=15433>>).

a- Via canônica:

A atividade desta via é iniciada quando proteínas secretadas da família Wnt se ligam aos receptores Fzd e aos co-receptores, proteínas relacionadas a receptores de lipoproteína de baixa densidade 5 ou 6 (LRP5/6), induzindo, assim, uma cascata de reações, que culmina na estabilização da β -catenina, sua translocação para o núcleo, ativação de fatores transcricionais e, por fim, na indução da expressão dos genes alvo de Wnt (Figura 4) (CADIGAN; PEIFER, 2009; MACDONALD; TAMAI; HE, 2009). As RSPOs exercem seu papel principal no crescimento celular e diferenciação através da via canônica de sinalização de Wnt/ β -catenina.

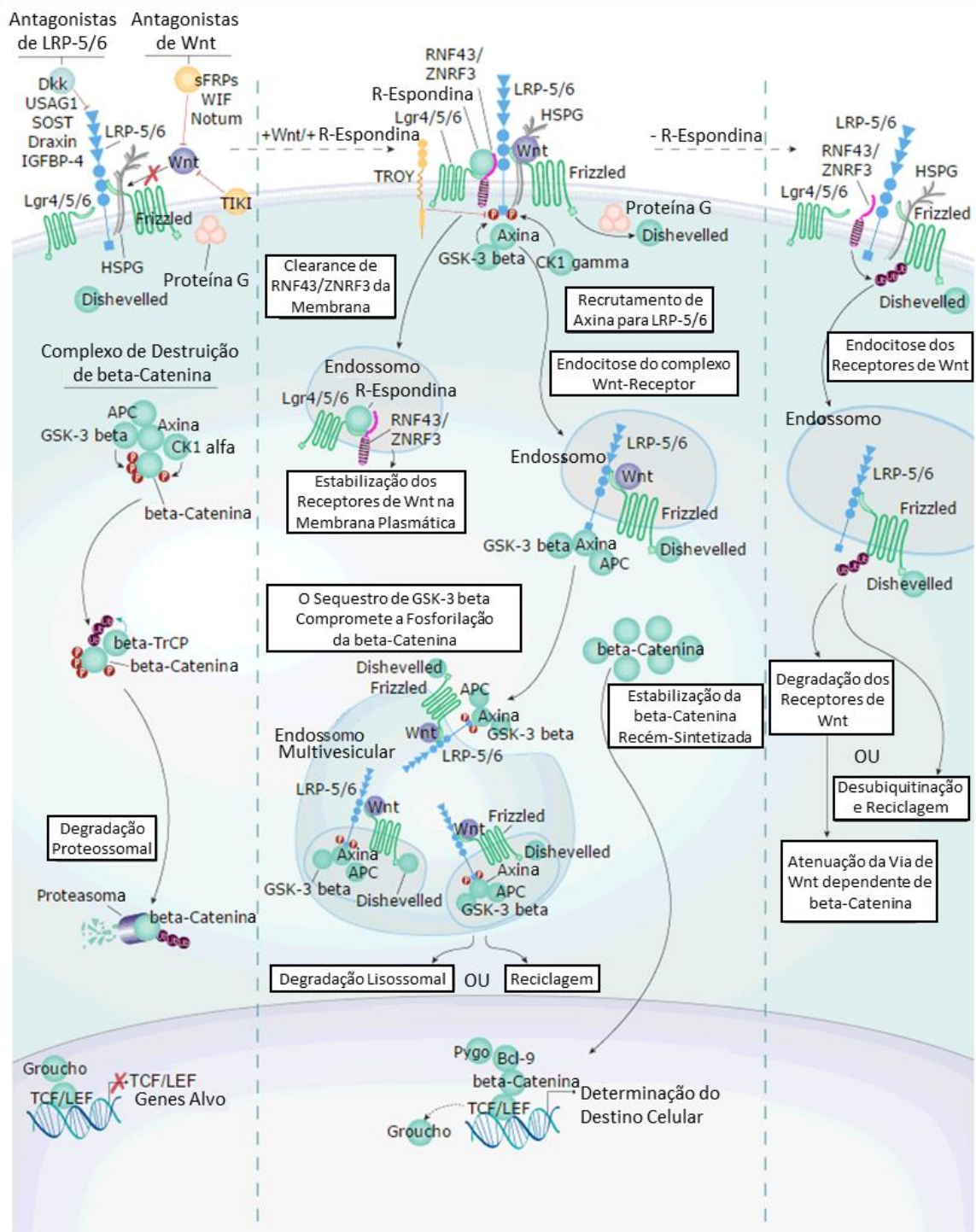


Figura 4 - Via Canônica de Sinalização de Wnt: Via de Wnt dependente de beta-Catenina (adaptado de R&D Systems - <<https://www.rndsystems.com/pathways/wnt-signaling-pathways-beta-catenin-dependent-wnt-signaling>>).

De maneira mais detalhada, a associação dos ligantes Wnt aos receptores Fzd e LRP5/6 ativa a proteína Dishevelled (Dvl) a qual, por sua vez, recruta o complexo de degradação de β -catenina, formado por Axina, APC, GSK-3 beta e CK1. Neste contexto, esse grande complexo proteico é internalizado em

endossomos e corpos multivesiculares, impedindo que as Kinases GSK-3 beta e CK1 catalisem a fosforilação das novas moléculas de β -catenina citoplasmáticas. Quando fosforiladas, as moléculas de beta-catenina são ubiquitinadas pela enzima ubiquitina ligase E3 e endereçadas para o proteassoma, no qual são degradadas. Dessa forma, quando ativada, a via de Wnt estabiliza as moléculas de β -catenina, que passam a se acumular no citoplasma, são translocadas para o núcleo da célula, e ativam os fatores transcricionais da família TCL/LEF, juntamente com os co-ativadores Bcl-9 e Pygopus (Pygo), que induzem a expressão dos genes alvo de Wnt.

Conforme revisto por De Lau, Snel e Clevers, 2012, esta via é controlada por uma série de antagonistas extracelulares que inibem a via, como Dkk1, e agonistas, como as RSPOs, que a potencializam (DE LAU; SNEL; CLEVERS, 2012). De maneira resumida, conforme revisto por Abo & Clevers, a indução da via de WNT pelas RSPOs ocorre, basicamente, através de dois eixos moleculares, que são responsáveis por bloquear a internalização dos receptores dos ligantes WNT, aumentando, conseqüentemente, sua disponibilidade na superfície celular para ativação da via (ABO; CLEVERS, 2012). No primeiro eixo molecular, a ativação da via de WNT pela RSPO1 se dá através do bloqueio da internalização do receptor LRP6 por um mecanismo que envolve a inibição da interação entre DKK1 e Kremen (BINNERTS; KIM; BRIGHT; PATEL *et al.*, 2007). No segundo eixo molecular, entretanto, a ativação ocorre através da regulação da renovação do complexo receptor WNT, um heterodímero formado pelos receptores LRP6 e FZD, que ocorre através do eixo ZNRF3 (HAO; XIE; ZHANG; CHARLAT *et al.*, 2012). Além disso, sabe-se que esta renovação dos receptores FZD, mediada pelas RSPOs, necessita dos receptores LGR para ocorrer.

Apesar da literatura científica descrever a existência desses dois eixos moleculares pelos quais a RSPO1 potencializa a via de Wnt, resultados conflitantes ainda geram dúvida quanto aos mecanismos moleculares e receptores de superfície celular relacionados à RSPO. Estudos *in vitro* revelaram que todas as RSPOs se ligam a receptores do tipo Lgr4-6 (CARMON; GONG; LIN; THOMAS *et al.*, 2011; DE LAU; BARKER; LOW; KOO *et al.*, 2011; GLINKA; DOLDE; KIRSCH; HUANG *et al.*, 2011) para induzir a via canônica de Wnt/ β -catenina, sendo apontados como os principais receptores da família das RSPOs. Contudo, outros estudos também

indicam que tais proteínas são capazes de se ligar a Lrp5-6 (KAZANSKAYA; GLINKA; DEL BARCO BARRANTES; STANNEK *et al.*, 2004; LI; YEN; ENDO; KLAUZINSKA *et al.*, 2009; NAM; TURCOTTE; SMITH; CHOI *et al.*, 2006; WEI; YOKOTA; SEMENOV; DOBLE *et al.*, 2007) e Kremen1 (KRM1) (BINNERTS; KIM; BRIGHT; PATEL *et al.*, 2007), uma proteína transmembrana conhecida por regular negativamente o receptor LRP6 por endocitose mediada por DKK1. Contudo, a proteína KRM1 ainda pode ser questionada como um receptor específico para RSPO1, visto que no trabalho citado (BINNERTS; KIM; BRIGHT; PATEL *et al.*, 2007) utilizou-se heparina solúvel no ensaio de ligação, a qual as RSPOs se ligam. Dessa forma, a adição de heparina ao ensaio poderia fazer com que a RSPO1 se complexasse à ela, comportando-se de um modo diferente da proteína nativa. Sabe-se, ainda, que as RSPOs atuam inibindo a proteína ZNRF3 (HAO; XIE; ZHANG; CHARLAT *et al.*, 2012), uma ubiquitina-ligase E3 transmembrana, e ligam-se ao domínio extracelular do receptor FZD8 para indução da via de Wnt (NAM; TURCOTTE; SMITH; CHOI *et al.*, 2006), embora, aparentemente, as RSPOs liguem-se fracamente aos receptores FZD (LI; YEN; ENDO; KLAUZINSKA *et al.*, 2009; WEI; YOKOTA; SEMENOV; DOBLE *et al.*, 2007). Segundo Hao e colaboradores, a proteína ZNRF3 promove a ubiquitinação do receptor Frizzled e sua subsequente degradação. Portanto, a inibição de ZNRF3 pelas RSPOs leva a um aumento nos níveis dos receptores FZD e LRP6 na membrana celular (HAO; XIE; ZHANG; CHARLAT *et al.*, 2012).

Parte dessa controvérsia sobre os receptores de RSPOs pode ser explicada por estudos que sugerem uma ação sinérgica dessas proteínas com ligantes Wnt (KAZANSKAYA; GLINKA; DEL BARCO BARRANTES; STANNEK *et al.*, 2004; KIM; KAKITANI; ZHAO; OSHIMA *et al.*, 2005). Conforme observado em diferentes tipos celulares, o co-tratamento com RSPO e WNT leva à ativação da via canônica de Wnt de maneira mais acentuada em diversos contextos biológicos (KAZANSKAYA; GLINKA; DEL BARCO BARRANTES; STANNEK *et al.*, 2004; KIM; KAKITANI; ZHAO; OSHIMA *et al.*, 2005). Em outro trabalho recente, foi observada a não equivalência das proteínas WNT e RSPOs com relação à indução de auto-renovação nas células-tronco intestinais LGR5⁺, destacando a cooperação entre essas proteínas (YAN; JANDA; CHANG; ZHENG *et al.*, 2017). Além disso, os padrões de expressão de RSPOs e WNT durante a embriogênese, com

sobreposição no broto caudal, no tubo neural dorsal e na prega ectodérmica apical (AER) de brotos dos membros em camundongo, reforçam a tese de sua ação conjunta (KAZANSKAYA; GLINKA; DEL BARCO BARRANTES; STANNEK *et al.*, 2004; NAM; TURCOTTE; YOON, 2007). Portanto, acredita-se que o co-tratamento com estas duas proteínas pode potencializar ainda mais a atividade da via de Wnt *in vivo*, aonde já se observa uma grande sobreposição de sua expressão gênica. Os mecanismos de ação e receptores pelos quais a RSPO1 ativa a via de Wnt estão sumarizados na Figura 5.

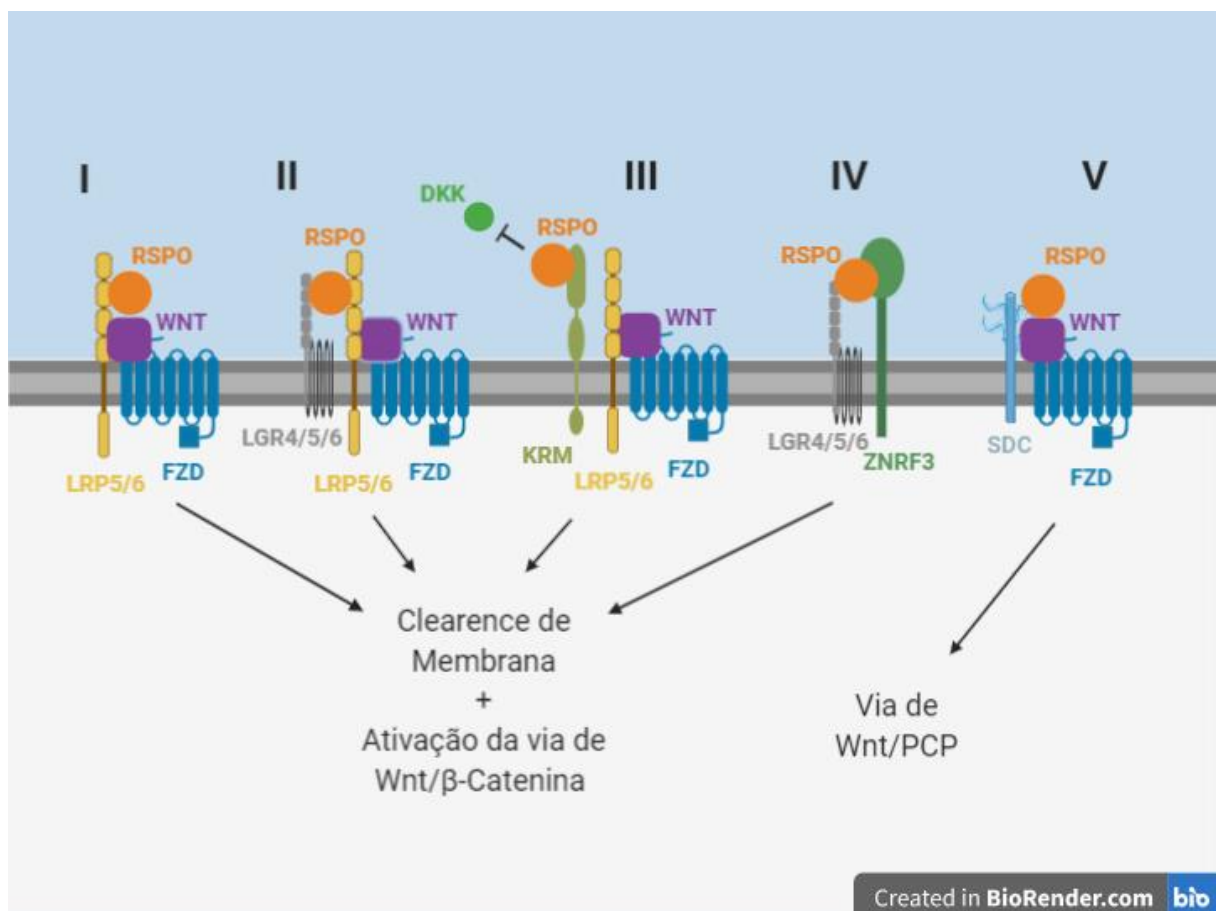


Figura 5 - Via de Wnt e RSPOs - Mecanismos de ação e receptores.

b- Vias não-canônicas:

Ao menos duas vias independentes de β -catenina, ambas com efeito inibitório na via canônica de Wnt, são conhecidas e bem caracterizadas na literatura, a saber: a via de polaridade celular planar (PCP) e a via de Wnt/ Ca^{2+} (KOHN; MOON, 2005;

SCHLESSINGER; HALL; TOLWINSKI, 2009; SUGIMURA; LI, 2010). A via de Wnt/PCP é iniciada com a ligação de Wnt aos receptores Frizzled e co-receptores ROR1/2, Ryk ou PTK7, levando à internalização do complexo ligante-receptor. Esta internalização ativa proteínas correlacionadas com a via de Rho/ROCK, ativando a polimerização de actina e a proteína JNK, as quais participam, conjuntamente, na regulação da migração e polaridade celular. Sindecanos aparecem como os principais receptores de RSPOs na via de Wnt/PCP, atuando em conjunto com receptores da família Frizzled (OHKAWARA; GLINKA; NIEHRS, 2011). Entretanto, estudos de ligação apontam que somente as proteínas RSPO2 e RSPO3 ligam-se a estas moléculas com elevada afinidade, por meio de seu domínio TSR, ao passo que esta ligação não ocorre para as proteínas RSPO1 e RSPO4.

A via de Wnt/Ca²⁺, por sua vez, é iniciada pelos receptores FZD ativando uma sinalização celular acoplada à proteína G. Esta ativação induz uma cascata de reações que culmina na ativação do fator de transcrição NFAT (*Nuclear Factor Associated with T cells*), ativando genes que regulam os processos de migração e destino celular (DE, 2011). Entretanto, para esta via, parece não haver evidências da participação das RSPOs neste processo.

1.6 Implicações terapêuticas do uso de RSPO1

Dentre as RSPOs, a RSPO1, parece destacar-se dentre as demais no que diz respeito ao seu potencial uso terapêutico e geração de biofármacos, especialmente na área de Medicina Regenerativa, visto seu potencial mitogênico sobre células-tronco. Este potencial vem sendo confirmado em diversos estudos que tem evidenciado o uso de RSPO1 em modelos de tratamento para diversas doenças (YOON; LEE, 2012).

Conforme mencionado anteriormente, a ativação da via de WNT/ β -catenina pela RSPO1 é necessária para induzir a proliferação das células beta das ilhotas pancreáticas (RULIFSON; KARNIK; HEISER; TEN BERGE *et al.*, 2007). Portanto, uma possível aplicação terapêutica da RSPO1 é a utilização desta proteína para o tratamento de Diabetes Mellitus, induzindo o crescimento das células produtoras de insulina nos pacientes, através da regulação da via canônica de WNT. Entretanto, estudos na literatura, apresentam algumas divergências quanto ao efeito da RSPO1

sobre a proliferação das células beta pancreáticas, citoproteção e secreção de insulina, dependendo do modelo de estudo utilizado, sendo esses efeitos aparentemente induzidos *in vitro* (WONG; YEUNG; SCHULTZ; BRUBAKER, 2010) e inibidos *in vivo* (WONG; OH; CHASSOT; CHABOISSIER *et al.*, 2011) em modelo animal. Dessa forma, embora Wong e colaboradores especulem uma possível compensação por outras Rspos *in vivo* para explicar tal divergência (WONG; OH; CHASSOT; CHABOISSIER *et al.*, 2011), fica evidente a necessidade de mais estudos até que esta proteína possa ser utilizada terapeuticamente para o tratamento da síndrome diabética em humanos.

Apesar da função oncogênica da RSPO1 em cânceres de mama e de cólon (DE LAU; SNEL; CLEVERS, 2012), trabalhos sugerem uma ação oposta em outros modelos. Dois artigos indicam a *RSPO1* como um potencial gene supressor de tumor em leucemia linfocítica aguda e crônica (KUANG; TONG; YANG; LIN *et al.*, 2008; TONG; WIERDA; LIN; KUANG *et al.*, 2010), enquanto outro trabalho mais recente demonstrou que a *RSPO1* suprime a metástase em câncer de cólon (ZHOU; GENG; WANG; YI *et al.*, 2017) e que também pode ser utilizada como um biomarcador para prognóstico de cânceres de pulmão (WU; ZHANG; QIAN; WU *et al.*, 2019). Dessa forma, fica em evidência, portanto, não só a necessidade de mais estudos, mas, também, que a *RSPO1* pode ter uma possível aplicação terapêutica no tratamento destes tipos de câncer. Além das implicações já mencionadas, acredita-se, ainda, no potencial terapêutico das proteínas RSPO sobre artrite e outras doenças articulares, conforme apontado em um estudo de 2010 (KRÖNKE; UDERHARDT; KIM; STOCK *et al.*, 2010).

Além das doenças mencionadas, a *RSPO1* vem sendo sugerida e estudada para o tratamento de diversas doenças intestinais. Um dos possíveis usos terapêuticos da *RSPO1* é para o tratamento de mucosite em pacientes com câncer submetidos à quimioterapia com agentes antiproliferativos (VAN VLIET; HARMSEN; DE BONT; TISSING, 2010) ou radioterapia (LEY; GALUBA; SALATHE; MELIN *et al.*, 2017), uma vez que estes tipos de tratamento têm como principal efeito colateral a inflamação da mucosa de revestimento do tubo digestivo. Outra utilização da *RSPO1* seria no tratamento de doenças inflamatórias do intestino, como a doença de Crohn, situação na qual as células epiteliais intestinais sofrem morte celular contínua devido à resposta inflamatória (KIM; KAKITANI; ZHAO; OSHIMA *et al.*,

2005; ZHAO; DE VERA; NARUSHIMA; BECK *et al.*, 2007). Em ambos os modelos, o potencial terapêutico de RSPO1 foi verificado em ensaios *in vivo*, reduzindo os sintomas decorrentes tanto da indução de mucosite através do quimioterápico 5-Fluorouracil (5-FU) (KIM; KAKITANI; ZHAO; OSHIMA *et al.*, 2005) como no modelo da doença inflamatória do intestino em camundongo (ZHAO; DE VERA; NARUSHIMA; BECK *et al.*, 2007). Outra aplicação terapêutica bastante interessante, que será melhor abordada neste trabalho, consiste na utilização da RSPO1, combinada à Engenharia Tecidual, para a geração de um Intestino Engenheirado, que poderia ser utilizado no tratamento, por exemplo, da síndrome do intestino curto (SIC) (BELCHIOR; SOGAYAR; GRIKSCHEIT, 2014). Ademais, outros trabalhos também apontam possíveis efeitos benéficos da RSPO1 no fígado, induzindo a proliferação de células tronco LGR5+ em quadros de insuficiência hepática (LIN; FANG; LIU; WANG *et al.*, 2017) e protegendo hepatócitos de camundongos em lesões (LI; LIU; LOU; MULHOLLAND *et al.*, 2019), suscitando, também, a possibilidade futura de geração de fígado engenheirado.

1.6.1 Trato Gastrointestinal: problemas associados e tratamentos

O trato gastrointestinal é responsável pelo influxo apropriado de nutrientes, calorias e fluidos para o corpo humano, garantindo o crescimento em crianças e a manutenção do peso em adultos (BEATTIE; BARCLAY; WILSON, 2010). Atualmente, são conhecidas uma série de disfunções intestinais decorrentes de problemas genéticos e de outros fatores que levam a diversos tipos de transtornos associados e à queda na qualidade de vida de pacientes. A síndrome do intestino curto (SIC), assim como doenças inflamatórias intestinais (doença de Crohn e colite ulcerativa), síndrome do intestino irritável e outras doenças, são responsáveis por perda de capacidade absorptiva e falência intestinal (FI).

A FI resulta da obstrução, dismotilidade, ressecção cirúrgica, defeitos congênitos ou perda da capacidade de absorção relacionada a doenças, sendo caracterizada pela inabilidade de se manter o balanço de proteínas, energia, fluidos, eletrólitos e micronutrientes (O'KEEFE; BUCHMAN; FISHBEIN; JEEJEEBHOY *et al.*, 2006). A síndrome do intestino curto é o tipo mais comum de insuficiência intestinal, afetando adultos e crianças, manifestando-se como resultado de 50-75% de perda da superfície intestinal, seja por ressecção cirúrgica ou malformação congênita

(BEATTIE; BARCLAY; WILSON, 2010; O'KEEFE; BUCHMAN; FISHBEIN; JEEJEEBHOY *et al.*, 2006; SPENCER; NEAGA; WEST; SAFRAN *et al.*, 2005; STOLLMAN; NEUSTATER; ROGERS, 1996; THOMPSON, 1994; THOMPSON; ROCHLING; WESEMAN; MERCER, 2012). Gastrosquise, má rotação intestinal com vólculo, atresia e enterocolite necrosante (ECN) estão entre as principais causas de perda de superfície intestinal e desenvolvimento da SIC em crianças, sendo a ECN a mais frequente (GRANT; ABU-ELMAGD; REYES; TZAKIS *et al.*, 2005; QUIRÓS-TEJEIRA; AMENT; REYEN; HERZOG *et al.*, 2004; REYES; BUENO; KOCOSHIS; GREEN *et al.*, 1998; SUDAN; THOMPSON; BOTHA; GRANT *et al.*, 2007). Já em crianças mais velhas ou adultos, complicações pós-operatórias, câncer, trauma, problemas de motilidade e doença de Crohn também podem levar ao desenvolvimento da SIC (GUTIERREZ; KANG; JAKSIC, 2011; LADEFOGED; HESSOV; JARNUM, 1996; NIGHTINGALE; LENNARD-JONES, 1993; THOMPSON; ROCHLING; WESEMAN; MERCER, 2012). Essa perda intestinal leva a uma baixa absorção nutricional e de fluidos, resultando na perda de peso, desequilíbrio eletrolítico e outros sintomas (O'KEEFE; BUCHMAN; FISHBEIN; JEEJEEBHOY *et al.*, 2006), podendo levar ao óbito.

De acordo com O'Keefe *et al.*, dados precisos sobre a incidência e prevalência da SIC são difíceis de determinar, principalmente devido à falta de consenso e precisão na definição dessa síndrome (O'KEEFE; BUCHMAN; FISHBEIN; JEEJEEBHOY *et al.*, 2006). No entanto, uma pesquisa realizada na Europa sugere uma incidência e prevalência médias em torno de três e quatro casos por milhão de pessoas, respectivamente (BAKKER; BOZZETTI; STAUN; LEON-SANZ *et al.*, 1999; THOMPSON; ROCHLING; WESEMAN; MERCER, 2012). Já nos EUA, dados de 1995, indicam que aproximadamente 40.000 adultos receberam nutrição parenteral (PN) em suas casas, 150.000 receberam nutrição enteral (HOWARD; AMENT; FLEMING; SHIKE *et al.*, 1995) e aproximadamente 20.000 receberam NP total (NPT) (BYRNE; PERSINGER; YOUNG; ZIEGLER *et al.*, 1995). Thompson acrescenta, ainda, que a SIC afeta 15% dos pacientes submetidos à ressecção intestinal (THOMPSON, 2000). Apesar dos tratamentos que reduziram drasticamente a mortalidade de pacientes com SIC, os dados disponíveis sugerem que, em 1999, um em cada três pacientes hospitalizados com SIC ainda falecia em hospitais dentro de um período de cinco anos (MESSING; CRENN; BEAU;

BOUSTRON-RUAULT *et al.*, 1999). Entre crianças, a situação é ainda mais grave, com uma taxa média de sobrevivência em três anos de apenas 60% após transplante (KATO; TZAKIS; SELVAGGI; GAYNOR *et al.*, 2006). Wales sugere que a incidência de SIC é de aproximadamente 24,5 casos por 100.000 recém-nascidos (WALES; DE SILVA; KIM; LECCE *et al.*, 2004), enquanto Cole aponta uma incidência próxima a 1% (COLE; HANSEN; HIGGINS; ZIEGLER *et al.*, 2008), sendo correlacionada com o peso no momento do nascimento. Contudo, atualmente, ainda não existem dados sobre a incidência de SIC no Brasil.

Conforme revisto por Belchior e colaboradores, a mortalidade associada à SIC não ocorre apenas durante o período pós-operatório, em decorrência de complicações relacionadas ao processo cirúrgico ou à própria doença, ocorrendo, também, devido a complicações tardias (BELCHIOR; SOGAYAR; GRIKSCHEIT, 2014). Dados apontam para uma mortalidade de mais de 50% dos pacientes que recebem nutrição parenteral por cinco anos, reduzindo bastante em pessoas que desmamaram da NP (GUTIERREZ; KANG; JAKSIC, 2011; NUCCI; BURNS; ARMAH; LOWERY *et al.*, 2008). Dentre as diversas complicações que surgem em consequência da NP (Tabela 1), vale destacar a doença de fígado associada à falência intestinal (*IFALD*, do inglês *Intestinal Failure-Associated Liver Disease*) e sepse, principalmente associados à infecção sanguínea associada ao cateter (*CABSI*, do inglês *Catheter-Associated Bloodstream Infection*), como as principais causas de mortalidade associada à SIC (BELCHIOR; SOGAYAR; GRIKSCHEIT, 2014; PEYRET; COLLARDEAU; TOUZET; LORAS-DUCLAUX *et al.*, 2011).

Tabela 1 - Complicações da síndrome do intestino curto e terapias (adaptado de Thompson *et al.*, 2012 (THOMPSON; ROCHLING; WESEMAN; MERCER, 2012))

Relacionadas a cateter

Infecção

Perda de acesso vascular

Hepatobiliares

Doença hepática relacionada à falência intestinal

Colelitíase

Metabólicas

Anormalidade fluídicas e eletrolíticas

Acidose D-láctea

Deficiência de micronutrientes

Doença metabólica do osso

Osteoporose e osteomalácia

Renais

Falência renal crônica

Nefrolitíase

Gastrointestinais

Hipersecreção gástrica

Supercrescimento bacteriano no intestino delgado

Mudanças na flora colônica

Após ressecção maciça do intestino delgado, um aumento acentuado na área da superfície de absorção intestinal permite, muitas vezes, que alguns pacientes mantenham a homeostase nutricional apesar da perda intestinal, processo este chamado de adaptação intestinal. Entretanto, nem sempre a adaptação intestinal é suficiente para manter o status nutricional do paciente e, nesses casos, intervenções farmacológicas e cirúrgicas fazem-se necessárias (NUCCI; BURNS; ARMAH; LOWERY *et al.*, 2008). Embora alguns fatores positivos e negativos tenham sido identificados, os mecanismos celulares e moleculares que resultam em uma adaptação intestinal (AI) bem-sucedida não estão bem definidos. É provável que a ativação do Wnt esteja envolvida na AI, pois vários modelos demonstraram que a sinalização do Wnt é fundamental para a recuperação e regeneração intestinal após a lesão. Entretanto, mais estudos são necessários nesta área para que fármacos que induzem esta via sejam alternativas na clínica (BERNAL; STEHR; ZHANG; PROFITT *et al.*, 2005; LI; LEE; CADETE; ZHU *et al.*, 2019; WHYTE; SMITH; HELMS, 2012).

Apesar da existência de terapias para melhorar os sintomas da SIC, não existem tratamentos curativos hoje e, em muitos casos, o tratamento cirúrgico é inevitável, além da suplementação por via da NP. Essas cirurgias envolvem procedimentos complexos associados a altas taxas de morbimortalidade em crianças e adultos, altos custos e dependem da disponibilidade de órgãos para doação, da compatibilidade do órgão e do uso de drogas imunossupressoras (BHARADWAJ; TANDON; GOHEL; BROWN *et al.*, 2017; GRANT; ABU-ELMAGD; REYES; TZAKIS *et al.*, 2005; KATO; TZAKIS; SELVAGGI; GAYNOR *et al.*, 2006; MESSING; CRENN; BEAU; BOUTRON-RUAULT *et al.*, 1999; REYES; BUENO; KOCOSHIS; GREEN *et al.*, 1998). Nesse contexto, a Terapia Celular com células-tronco e a Engenharia de Tecidos surgem como uma nova opção terapêutica para

diversas disfunções intestinais, com a possibilidade de geração de um intestino engenheirado para transplante autólogo.

1.6.1.1 Engenharia Tecidual aplicada à regeneração de intestino

Várias abordagens têm sido utilizadas para geração de intestino delgado engenheirado (TESI, do inglês *Tissue-Engineered Small Intestine*), por técnicas de Engenharia Tecidual, sendo a principal delas baseada no uso de um arcabouço polimérico tridimensional biodegradável semeado com unidades organoides intestinais (UO), implantadas em uma região vascularizada para maturação *in vivo* (Figura 6) (BARTHEL; SPEER; LEVIN; SALA *et al.*, 2012; FINKBEINER; FREEMAN; WIECK; EL-NACHEF *et al.*, 2015; GRANT; MOJICA; SALA; HILL *et al.*, 2015; GRIKSCHEIT; SIDDIQUE; OCHOA; SRINIVASAN *et al.*, 2004; HOU; CHANG; TRECARTIN; BARTHEL *et al.*, 2018; SALA; KUNISAKI; OCHOA; VACANTI *et al.*, 2009; SPURRIER; GRIKSCHEIT, 2013). Essas técnicas, vieram para substituir as primeiras tentativas não bem-sucedidas de geração de intestino engenheirado baseadas em remendo seroso e semeadura de conduítes com células epiteliais isoladas, nas quais havia um baixo crescimento celular (NGUYEN; THOMPSON, 1990; THOMPSON; HARTY; SAIGH; GIGER, 1988).

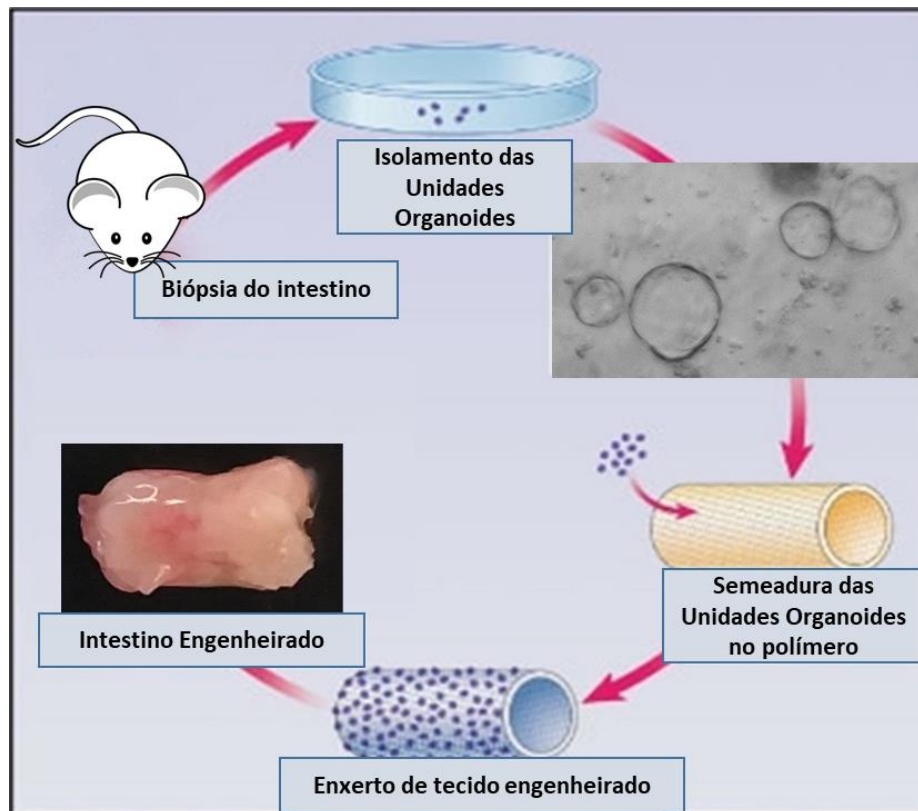


Figura 6 - Representação esquemática da formação do intestino curto engenheirado (TESI) (adaptado de Guner et al. 2008 (GUNER; CHOKSHI; PETROSYAN; UPPERMAN *et al.*, 2008)).

As unidades organoides são aglomerados multicelulares, contendo um lúmen, composto por epitélio e mesênquima, que são capazes de secretar fatores de sinalização importantes para a manutenção dessas estruturas (HOU; CHANG; TRECARTIN; BARTHEL *et al.*, 2018). Entre outras coisas, o sucesso dessa técnica baseia-se na capacidade das UOs de povoar o *scaffold* com células proliferativas, as quais originam os diferentes tipos de células intestinais no TESI resultante, recapitulando a arquitetura, organização e dinâmica regenerativa do órgão nativo. Diferentemente das culturas de células Lgr5+ ou criptas, as UOs contendo mesênquima são capazes de sobreviver *in vitro* sem a adição de fatores de sinalização, como EGF, R-espondina1, Dll4, Noggin ou Wnt3a (HOU; CHANG; TRECARTIN; BARTHEL *et al.*, 2018; WATSON; MAHE; MÚNERA; HOWELL *et al.*, 2014). No entanto, a suplementação com fatores peptídicos pode melhorar a sobrevivência das UOs e a formação de TESI, como observado para enteróides (ABO; CLEVERS, 2012; BELCHIOR; SOGAYAR; GRIKSCHIT, 2014; MAHE; AIHARA; SCHUMACHER; ZAVROS *et al.*, 2013; MATTHEWS; SALA; SPEER;

WARBURTON *et al.*, 2011; SATO; STANGE; FERRANTE; VRIES *et al.*, 2011; SATO; VRIES; SNIPPERT; VAN DE WETERING *et al.*, 2009; SCHUIJERS; CLEVERS, 2012; WATSON; MAHE; MÚNERA; HOWELL *et al.*, 2014), melhorando sua funcionalidade.

O epitélio da mucosa intestinal é composto principalmente por quatro tipos diferentes de células especializadas, a saber: enterócitos, células de Paneth, células calciformes e células enteroendócrinas (SCHUIJERS; CLEVERS, 2012; VAN DER FLIER; CLEVERS, 2009) (Figura 7). Esses diferentes tipos celulares se diferenciam das células-tronco intestinais Lgr5+ à medida que as células filhas se distanciam da base da cripta, em um processo muito dinâmico ao longo do eixo cripta-vilosidade, sofrendo apoptose uma vez que atingem o ápice da vilosidade. As vilosidades intestinais se projetam na mucosa em direção ao lúmen, sendo compostas, predominantemente, por enterócitos (células absorventes), células calciformes (células secretoras de muco) e células enteroendócrinas (células secretoras de hormônios). Por outro lado, as criptas são invaginações do epitélio, que partem da base das vilosidades e amadurecem à medida que migram na direção oposta. A base da cripta é habitada por células-tronco intestinais (ISCs) e células de Paneth, que garantem, respectivamente, a regeneração do epitélio pela produção de novas células que formam uma região com alta taxa proliferativa chamada de região de amplificação TA (do inglês, *transit-amplifying region*) e a manutenção do nicho das células-tronco (Figura 7) (BARKER; VAN ES; KUIPERS; KUJALA *et al.*, 2007; DAY, 2006; SATO; STANGE; FERRANTE; VRIES *et al.*, 2011; SCHUIJERS; CLEVERS, 2012; VAN DER FLIER; CLEVERS, 2009).

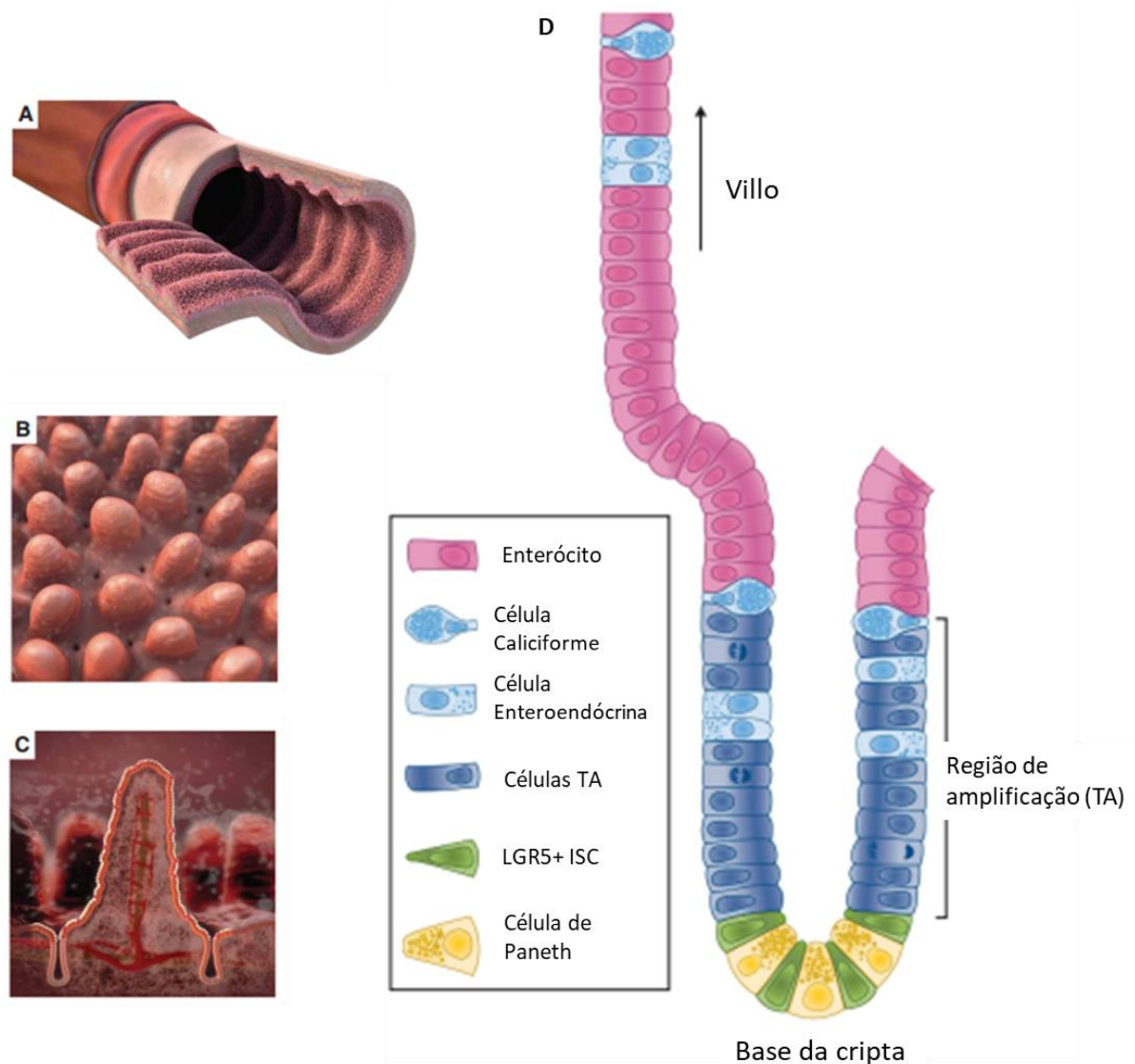


Figura 7 - Estrutura do epitélio intestinal. (adaptado de Schuijers & Clevers 2012 (SCHUIJERS; CLEVERS, 2012)). (A) Epitélio da superfície interna do intestino delgado, composto por um grande número de vilosidades; (B) Detalhe para a região das vilosidades; (C) Detalhe para a estrutura da cripta e vilão; (D) Composição celular do epitélio intestinal no eixo cripta-vilão.

As técnicas para geração de TESI podem melhorar e expandir o tratamento da SIC. Para garantir a funcionalidade do TESI, é necessário formar um epitélio intestinal completo, bem como uma camada muscular inervada associada, promovendo peristaltismo coordenado e absorção adequada de nutrientes e fluidos. Embora as UOs possam gerar TESI contendo todos esses elementos sem a adição de fatores exógenos de crescimento e diferenciação (HOU; CHANG; TRECARTIN; BARTHEL *et al.*, 2018; SALA; MATTHEWS; SPEER; TORASHIMA *et al.*, 2011), é desejável otimizar esse processo para formar tecidos funcionais maiores e mais

eficientes, para futuras terapias humanas. Nesse contexto, a proteína recombinante humana R-espondina1 (rhRSPO1), dada sua atividade mitogênica nas células-tronco intestinais, juntamente com outros fatores peptídicos, pode ser um elemento-chave para melhorar a formação, desenvolvimento e funcionalidade do TESI. Para tanto, faz-se necessária a geração de uma plataforma celular estável e eficiente, capaz de produzir altos níveis de rhRSPO1 com atividade biológica, possibilitando a condução de estudos investigativos aplicados à regeneração tecidual. Portanto, o trabalho aqui apresentado teve, como objetivo, gerar uma plataforma estável e eficiente para produção contínua de rhRSPO1, com alto grau de pureza e atividade biológica, utilizando as duas linhagens celulares de mamíferos mais utilizadas para a geração de biofármacos complexos, CHO-DG44 e HEK293, e avaliar a capacidade terapêutica desta proteína no cultivo de UO, formação do TESI e fígado engenheirado (TELi) ou diretamente como uma droga para o tratamento da SIC.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O objetivo geral deste trabalho foi gerar uma plataforma celular estável para expressão da proteína RSPO1 recombinante humana (rhRSPO1), utilizando as células HEK293 (humana) e CHO-DG44 (hamster), obtendo-se um produto proteico purificado, caracterizado e biologicamente ativo, para utilização na terapia celular aplicada à regeneração de intestino e órgãos associados, avaliando sua atividade no cultivo de unidades organoides intestinais (UO), formação do intestino delgado engenheirado (TESI), cultivo de unidades organoides de fígado (LOU), formação de fígado engenheirado (TELi) e no tratamento da síndrome do intestino curto.

2.2 Objetivos Específicos

Capítulo I – Produção, purificação e caracterização da rhRSPO1

- Sintetizar a sequência codificadora do gene *RSPO1* humano;
- Subclonar o inserto de cDNA da hRSPO1 no vetor plasmideal de expressão para células de mamíferos pNU1 e selecionar os clones bacterianos transformantes contendo o inserto de interesse;
- Transfectar células HEK293 e CHO-*dhfr*^{-/-} com a construção pNU1/hRSPO1 ou com o vetor pNU1 sem inserto (controle);
- Isolar clones celulares HEK293 superprodutores de rhRSPO1;
- Selecionar as células transfectantes CHO-DG44 *dhfr*-positivas através do cultivo em meio de cultura livre de nucleosídeos;
- Submeter a população mista de células CHO-*dhfr*^{-/-} transfectadas à amplificação gênica do *locus* da enzima DHFR através de seleção com metotrexato (MTX);
- Isolar clones celulares CHO-DG44 superprodutores de rhRSPO1 e verificar expressão desta proteína presente no meio condicionado livre de soro fetal bovino;
- Padronizar um protocolo de purificação da proteína recombinante hRSPO1;

- Detectar os níveis de expressão da proteína recombinante através de ensaio imunoenzimático (ELISA);
- Caracterizar a estrutura proteica e o perfil de glicosilação da rhRSPO1 através de ensaios de espectrometria de massas, ensaios de desglicosilação com PNGase F, painel de lectinas e digestão por endoglicosidases e LC/MS-MS;
- Avaliar a atividade biológica de rhRSPO1 *in vitro* e *in vivo*.

Capítulo II – Avaliação funcional da rhRSPO1 na Engenharia Tecidual

II-A – Intestino Engenheirado (TESI, *Tissue Engineered Small Intestine*)

- Avaliar a atividade biológica *in vitro* da rhRSPO1 no cultivo de unidades organoides intestinais (OU) de camundongo
 - Crescimento – tamanho/ área;
 - Sobrevivência;
 - Proliferação;
 - Morfologia;
 - Sinalização celular – via de Wnt.
- Avaliar a contribuição da rhRSPO1 para o desenvolvimento de intestino delgado engenheirado (TESI) *in vivo*, em modelo murino
 - Tamanho e massa;
 - Grau de desenvolvimento/ Histologia;
 - Proliferação;
 - Tipos celulares no epitélio intestinal e mesênquima.

II-B (Extra) – Fígado Engenheirado (TELi, *Tissue Engineered Liver*)

- Avaliar a atividade biológica *in vitro* da rhRSPO1 no cultivo de unidades organoides hepáticas (LOU) de camundongo
 - Crescimento – tamanho/ área;
 - Sobrevivência;
 - Morfologia.
- Avaliar a contribuição da rhRSPO1 para o desenvolvimento de fígado murino engenheirado (TELi) *in vivo*
 - Tamanho e massa;

- Tipos celulares no epitélio intestinal e mesênquima;
- Grau de desenvolvimento/ Histologia.

Capítulo III – Avaliação funcional da rhRSPO1 na Regeneração Tecidual em modelo de Síndrome do Intestino Curto em *Zebrafish*

- Avaliar os efeitos biológicos *in vivo* da rhRSPO1 em modelo de *Zebrafish* com síndrome do intestino curto (ZF SBS)
 - Status clínico/ Perda de peso;
 - Parâmetros Intestinais – histologia;
 - Proliferação celular;
 - Morte celular;
 - Sinalização celular;
 - Esteatose hepática.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Capítulo I – Produção, purificação e caracterização da rhRSPO1

3.1 Síntese da sequência codificadora do gene RSPO1 humano

A partir da sequência nucleotídica codificadora (CDS) da variante 1 do gene *RSPO1* depositada no banco de dados do NCBI (NM_001038633), contendo 791 pb, foi feita a síntese da sequência de cDNA, pela empresa GenScript USA Inc. (Piscataway, NJ, EUA). A sequência nucleotídica sintetizada é resultado da modificação da sequência original codificadora do gene *RSPO1* após o processo de otimização de códons, segundo o algoritmo OptimumGene™, visando otimizar a eficiência da expressão gênica em células CHO mantendo a sequência proteica íntegra. Para otimização de códons, diversos parâmetros foram considerados, entre eles (mas não somente): Viés de uso do códon; Conteúdo do GC; Conteúdo de dinucleotídeos CpG; Estrutura secundária do mRNA; Sítios de *splicing* enigmáticos; Sítios Poli-A prematuros; Sítios chi internos e sítios de ligação ribossômica; Ilhas CpG negativas; Motivo de instabilidade do RNA (ARE); Sequências de repetição (repetição direta, repetição reversa e repetição de díade); Sítios de restrição que podem interferir na clonagem.

Sequência Otimizada (803 bases, GC%: 56.15)

GAATTC

ATGCGACTGGGGCTGTGTGTGGTGGCTCTGGTGCTGAGTTGGACCCATCTGACAATCTCCTCTCGTGGTATCAAA
GGTAAACGGCAGAGGCGGATCAGCGCCGAAGGCTCTCAGGCTTGCGCAAAGGGATGCGAGCTGTGTTCCGAAGTG
AATGGCTGCCTGAAAGTGTAGCCCAAACTGTTTCATCCTGCTGGAGCGTAACGACATTCGCCAAGTGGGGTCTGC
CTGCCTTCTTGTCCCCCTGGTTACTTTGACGCCCCGGAATCCAGATATGAACAAGTGCATCAAGTGAAAATTGAG
CACTGCGAGGCCTGCTTCTCCATAATTTTTGCACCAAGTGTAAGAGGGCCTGTACCTGCACAAAGGAAGATGC
TATCCTGCATGTCCAGAGGGTCCAGCGCCGTAACGGTACAATGGAATGCTCTAGTCCCGCTCAGTGTGAGATG
TCAGAAATGGTCCCCCTGGGGCCCTTGCTCTAAGAAACAGCAGCTGTGTGGGTTTCAGACGCGGTAGTGAGGAACGC
ACACGACGTGTGCTGCACGCTCCTGTGCGGCGACCATGCAGCCTGTTCCGATACCAAGGAGACAAGGCGGTGCAC
GTGAGACGCGTCCCATGTCCCGAAGGCCAGAAGCGACGTAAAGGCGGACAGGGAAGGCGGGAGAACGCTAATCGA
AACCTGGCAAGGAAGGAGAGTAAAGAAGCCGGGGCTGGTTCAAGACGCCGAAAGGGACAGCAACAACAGCAGCAG
CAGGGCACTGTGGGACCACTGACCAGCGCAGGACCCGCC

GCGGCCGC

Sequência Proteica

MRLGLCVVALVLSWTHLTISSRGIKGRQRRISAEGSQACAKGCELCSEVNGCLKCSPKL
 FILLERNDIRQVGVCLPSCPPGYFDARNPDMNKCIKCKIEHCEACFSHNFCTKCKEGLYL
 HKGRCYPACPEGSSAANGTMECSSPAQCEMSEWSPWGPCSKKQQLCGFRRGSEERTRRVL
 HAPVGDHAACSDTKETRRCTVRRVPCPEGQKRRKGGQGRRENANRNLARKEKEAGAGSR
 RRKGQQQQQQGTVGPLTSAGPA

3.2 Vetores Plasmideais

pNU1

Vetor plasmideal bicistrônico de expressão em células de mamífero, desenvolvido em nosso laboratório a partir do vetor pIQID (DEMASI; DE S MOLINA; BOWMAN-COLIN; LOJUDICE *et al.*, 2016), com a inserção de um sítio múltiplo de clonagem (*MCS - multiple cloning site*) e a remoção dos elementos de recombinação Gateway®. O vetor pNU1 possui os seguintes elementos principais: a- sinal de poliadenilação (*PolyA signal*); b- sítio interno de entrada do ribossomo (*IRES – Internal Ribosome Entry Site*); c- promotor de beta-actina de galinha; d- acentuador (*enhancer*) de citomegalovírus (*CMV IE*); e- sequência codificadora do mDHFR (*CDS - coding sequence*); f- origem de replicação de Col E1 (*Col E1 Ori*); g- gene de resistência a ampicilina (*Amp^r*); h- sítio múltiplo de clonagem (*MCS*). ”

pX343

Vetor plasmideal de seleção, derivado do vetor pY3 (BLOCHLINGER; DIGGELMANN, 1984), apresenta o gene bacteriano de resistência à higromicina B (*Hgro^r*) sob controle do LTR do vírus de sarcoma murinho de Moloney (*Mo-MuSV LTR - Moloney Murine Sarcoma Virus Long Terminal Repeat*) clonado em pBR322 (Costanzi *et al.*, 1990).

pUC57

Vetor plasmideal de clonagem, isolado da cepa DH5 α de *E. coli* (GenScript – Cat. No. SD1176). Contém o elemento de resistência à ampicilina (Amp^r) e sítio múltiplo de clonagem (MCS).

3.3 Subclonagem do inserto de cDNA no vetor plasmideal de expressão para células de mamíferos pNU1 e seleção dos clones bacterianos

O produto sintetizado foi digerido com as enzimas de restrição *EcoRI* e *NotI* para liberação do inserto de interesse gerando extremidades coesivas para a troca do vetor. Em seguida, foi realizada a digestão do vetor para expressão em células de mamíferos pNU1, desenvolvido pelo nosso grupo, com as mesmas enzimas de restrição. Após separação e purificação dos produtos de digestão, estes foram submetidos à reação de ligação, catalisada pela enzima T4 DNA Ligase (Thermo Fisher Scientific Inc.) e, o produto desta reação foi inserido em células da bactéria *E. coli* XI1 Blue MRF' por eletroporação. As colônias transformantes, resistentes ao meio seletivo contendo ampicilina, antibiótico ao qual o vetor confere resistência, foram selecionadas através de reações de PCR de colônias com *primers* específicos para as regiões flangeadoras dos sítios *EcoRI* e *NotI* do vetor pNU1 (Tabela 2), amplificando o CDS otimizado da *hRSPO1*. Os clones positivos foram cultivados em meio de cultura LB contendo ampicilina para preparação de DNA plasmideal com a construção pNU1/hRSPO1. O produto plasmideal obtido foi submetido a reações de sequenciamento de DNA (método Sanger), utilizando o BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific Inc.), para confirmação da integridade do inserto em etapa anterior às transformações das células HEK293 e CHO-DG44. Para comparação, as sequências amplificadas foram alinhadas à sequência codificadora otimizada original através da ferramenta BLAST® (Basic Local Alignment Search Tool, NCBI). O mesmo par de primers específicos para o vetor pNU1 foi utilizado para amplificação do inserto de *hRSPO1* no vetor durante as reações de sequenciamento.

Tabela 2 - Lista de Primers - PCR de colônias e sequenciamento.

Primer	Sequência Forward	Sequência Reverse
pNU1_seq4	GCCTTCTTCTTTTTCTACAGC	GAATTGGCCGCCCTAGATGCATGC

3.4 Linhagens celulares e condições de cultivo

Três linhagens celulares foram utilizadas neste trabalho: HEK293 e CHO-DG44, para expressão da rhRSPO1, e C2C12, para os ensaios de atividade osteogênica *in vitro*. Todos os estoques celulares foram mantidos nos respectivos meios de cultivo contendo 10% dimetilsulfóxido (DMSO) a -190°C, em reservatório contendo nitrogênio líquido. Para garantir o controle microbiológico do processo, todas as linhagens foram testadas para a presença de Micoplasma por análise de produtos de reação em cadeia de polimerase (*PCR - Polymerase Chain Reaction*), conforme descrito previamente por Uemori e colaboradores (UEMORI; ASADA; KATO; HARASAWA, 1992).

HEK293

Células HEK293 foram adquiridas da *American Type Culture Collection* (ATCC- ATCC® Number: CRL-1573™) e cultivadas em garrafas T de superfície aderente em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB), 1mM de piruvato de sódio, 1,2g/L de bicarbonato de sódio, 25mg/L de ampicilina e 100mg/L de estreptomicina, em atmosfera umidificada contendo 2% CO₂-98% ar a 37°C.

CHO-DG44

Células CHO-DG44 cGMP (Freedom™ DG44 Kit), adaptadas ao crescimento em suspensão e desenvolvidas para a produção de proteínas recombinantes em condições controladas (*current Good Manufacturer's Practice*), foram adquiridas da empresa Thermo Fisher Scientific Inc. CHO-DG44 é uma variante da linhagem CHO, sendo deficiente para expressão da enzima diidrofolato redutase (DHFR). Para o cultivo das células CHO-DG44, dois diferentes meios de cultivo do sistema Freedom (Freedom System - Gibco®) foram utilizados, a saber: Meio CD DG44, o qual foi utilizado para a manutenção das células DG44, e o Meio CD OptiCHO™, sem ribonucleosídeos e desoxirribonucleosídeos, utilizado para a seleção de células *dhfr* positivas.

As células parentais CHO *dhfr*^{-/-} foram mantidas em garrafas T em meio de cultivo CD DG44 suplementado com 8mM de L-glutamina em atmosfera umidificada contendo 8% CO₂-92% ar a 37°C para manter o valor do pH próximo ao fisiológico.

C2C12

As células C2C12 foram adquiridas da ATCC (ATCC® CRL-1772™) e cultivadas em garrafas T de superfície aderente em meio DMEM suplementado com 10% de SFB, 1,2g/L de bicarbonato de sódio, 25mg/L de ampicilina e 100mg/L de estreptomicina, em atmosfera umidificada contendo 2% CO₂-98% ar a 37°C. As células foram cultivadas em baixa densidade celular de modo a se evitar a diferenciação mioblástica, uma vez que esta linhagem celular se diferencia rapidamente em miotubos quando mantida em altas densidades celulares.

3.5 Transfecção das células HEK293 e CHO-DG44 (*dhfr*^{-/-}) e seleção de clones celulares

HEK293

Células HEK293 foram co-transfectadas de maneira estável com a construção plasmideal pNU1/hRSPO1, juntamente com o vetor pX343 (higro^r), em uma razão de 40:1, respectivamente, utilizando-se lipossomas (Lipofectamine® 2000, Thermo Fisher Scientific Inc.). Após 48h, as células transformantes foram selecionadas em meio contendo 100µg/mL de higromicina B e, após mais 48h estas foram diluídas, semeadas em baixa densidade em placas de 60mm e mantidas em meio seletivo (DMEM 10% SFB com 100µg/mL de higromicina B) para o crescimento de colônias celulares isoladas, provenientes de uma única célula, para o isolamento de clones celulares. Quando as colônias celulares isoladas adquiriram um tamanho de aproximadamente 0,5cm, estas foram coletadas individualmente, com auxílio de anel de clonagem de aço inoxidável, e transferidas para novas placas para estabelecer linhagens clonais. Após o isolamento de clones celulares HEK293 transfectantes, a cultura foi mantida em frascos aderentes, sob as mesmas condições de cultivo descritas acima.

CHO-DG44

Células CHO-DG44 (*dhfr*^{-/-}) foram transfectadas, de maneira estável, com a construção plasmideal pNU1/hRSPO1 utilizando-se lipossomas (FreeStyle MAX™ Reagent, Thermo Fisher Scientific Inc.) suspensos no meio de transfecção OptiPRO™ SFM. As células *dhfr* positivas foram selecionados através de cultivo em meio de cultura CD OptiCHO™ livre de ribonucleosídeos e de desoxirribonucleosídeos, suplementado com 8mM de L-glutamina, em atmosfera umidificada de 8% CO₂-92% ar a 37 °C. A população mista de células CHO-DG44, contendo a construção pNU1/hRSPO1, foi submetida ao processo de amplificação gênica do *locus* da enzima DHFR, mediada pela seleção das populações celulares obtidas após manutenção das culturas na presença de doses crescentes de metotrexato (MTX), uma droga inibitória do metabolismo do ácido fólico, conforme descrito por Kaufman e colaboradores (KAUFMAN; WASLEY; SPILIOTES; GOSSELS *et al.*, 1985). Duas estratégias de amplificação gênica foram utilizadas para avaliar o incremento da expressão de rhRSPO1 ao longo do processo: a) Elevação abrupta da dose de MTX (30nM, 300nM e 3µM); b) Elevação gradual da dose de MTX (30nM, 60nm, 120nm, 250nM, 500nM e 1µM). A avaliação da eficiência do processo de amplificação gênica foi realizada pela quantificação dos níveis da proteína rhRSPO1 secretada para o meio de cultura através do imunoenensaio *Dot Blot*. Para os testes utilizou-se meio de cultura condicionado pelas células produtoras de rhRSPO1, em diferentes etapas do processo de amplificação gênica com MTX.

Após o estabelecimento da melhor condição para produção da rhRSPO1, no que diz respeito ao processo de amplificação gênica por MTX, a população mista de células selecionada foi cultivada por três passagens na ausência de MTX e, então, foi utilizada para o isolamento de clones celulares. Para o isolamento de clones, diversas estratégias metodológicas foram utilizadas na tentativa de otimizar o processo de geração de clones celulares CHO-DG44 produtoras de rhRSPO1 em suspensão a partir da população mista selecionada que apresentou a maior expressão da rhRSPO1.

Inicialmente, como estratégia de isolamento de clones celulares, foi utilizado o método de diluição limitante, de acordo com as instruções do fabricante do sistema

Freedom™ DG44 Kit (ThermoFisher Scientific). Para tanto, foram feitas diluições da suspensão de células para as concentrações de 0,5 e 0,25 células por poço, e estas foram semeadas em placa de 96 poços na presença do meio de isolamento CD FortiCHO™ completo ou o meio CD OptiCHO™, ambos com diferentes concentrações de meio condicionado para padronização da melhor condição. Além dessas condições, também foram testados meios de cultivo acrescidos de 10 ou 20% de meio condicionado da linhagem CHO-DG44 parental ou da linhagem produtora de rhRSPO1. Logo após a semeadura, os poços foram observados sob microscópio óptico de campo invertido para confirmação do número de células por poço, sendo considerados para o estabelecimento de uma cultura clonal apenas aqueles contendo inicialmente uma única célula por poço.

Como segunda tentativa, optou-se pela realização da estratégia de sorteio de uma única célula (*single cell sorting*) em placas de 96 poços, utilizando o citômetro de fluxo e *cell sorter* FACSArialI (BD), a fim de se aumentar o número amostral com essa metodologia. Além dessas, uma terceira estratégia foi proposta para assegurar a viabilidade do clone celular após o isolamento. Para tanto, células CHO-DG44 parentais (*dhfr*^{-/-}) foram adicionadas a cada poço após a realização do *single cell sorting* com as células produtoras de rhRSPO1, com o intuito de ajudar no condicionamento do meio de cultivo, sendo posteriormente eliminadas em cultivo seletivo na ausência de nucleosídeos (CD DG44 Medium).

Em uma quarta estratégia metodológica, as células CHO-DG44 contendo a construção gênica pNU1-RSPO1, provenientes da condição selecionada no processo de amplificação com MTX, foram selecionadas manualmente (*hand picking*), com o auxílio de micropipetador e do microscópio óptico invertido Evos (Evos system – ThermoFisher Scientific), e semeadas em placas de 384 poços. Para tanto, em cada poço, utilizou-se 20µL do meio de cultivo CD FortiCHO™ completo (6mM de L-Glutamina e 1X HT), acrescido de 20% de meio condicionado pela população mista produtora de rhRSPO1. Os clones isolados foram mantidos de acordo com as recomendações de cultivo do fabricante (5%CO₂ - 95% ar, 37 °C).

3.6 Análise da expressão proteica da rhRSPO1

Os níveis proteicos de rhRSPO1 liberada para o meio condicionado por cada clone celular foram analisados utilizando-se imunoenaios de *Dot Blot*, *Western Blot* e o kit de ELISA específico para RSPO1 humana (R-Spondin 1 humano DuoSet ELISA - R&D). Para os imunoblots, utilizou-se o anticorpo monoclonal contra hRSPO1 (ab81600 - Abcam). Para células HEK293, o meio de cultura utilizado nos ensaios foi condicionado durante 48h por cada clone celular (10^6 células) em placa de 60 mm com 10% de soro fetal bovino (SFB) ou meio sem soro (SFM). Como controle negativo, foi utilizado meio condicionado por células HEK293 transfectadas com o vetor pNU1 vazio (pNU1Ø). Para células CHO-DG44, o meio de cultura foi condicionado durante 72h, quer pela população mista selecionada, quer por cada clone celular, plaqueados em frascos T, a uma densidade inicial de 3×10^5 células/mL, e cultivados sob condições estáticas (sem agitação). O meio condicionado por células CHO-DG44 produtoras de rhRSPO1 foi analisado utilizando-se os mesmos imunoenaios.

3.7 Purificação da rhRSPO1 por cromatografia líquida rápida de proteína

Para a purificação da rhRSPO1 foi utilizado o sistema Äkta Purifier UPC-100 (GE Healthcare), de cromatografia líquida rápida de proteína (FPLC, *Fast Protein Liquid Chromatography*). Para tanto, foi realizada uma cromatografia de afinidade, utilizando-se a coluna cromatográfica HiTrap™ Heparin HP, seguida de uma cromatografia de exclusão molecular com a coluna Superdex 75 10/300 GL (GE Healthcare). A proteína purificada foi caracterizada através de *Western Blot* e quantificada por ELISA. A pureza da proteína foi mensurada utilizando-se a técnica de coloração com prata (ProteoSilver™ Plus Silver Stain Kit, Sigma-Aldrich) após SDS-PAGE e posterior análise densitométrica utilizando-se o software ImageJ.

Para a primeira etapa de purificação da rhRSPO1, por cromatografia de afinidade, foi utilizada uma coluna de heparina de 5mL (HiTrap™ Heparin HP, GE Healthcare). Os tampões foram filtrados e degaseificados, a saber: tampão de equilíbrio (40mM Tris com 4M Uréia, pH 7,4) e de eluição (40mM Tris, 1M NaCl, 4M Uréia, pH 7,4). Durante todo o processo, foi utilizada um fluxo constante de 3mL/min, respeitando o limite de pressão de 0,7MPa. Antes da aplicação da amostra, a coluna foi preparada com 2 Volumes de Coluna (VC) de tampão de equilíbrio e, em

seguida, a amostra de meio condicionado foi carregada ao sistema. Após a aplicação da amostra, a coluna foi lavada com 5VC para retirada das proteínas não ligadas e, em seguida, as proteínas ligadas foram eluídas em um gradiente segmentado de NaCl com três segmentos, a saber: segmento 1 - 356mM; segmento 2 - 713mM; e segmento 3 - 1M de NaCl. Após a purificação, a coluna foi lavada com 2VC de tampão 40mM Tris-HCl pH 7,4 contendo 2M de NaCl e reequilibrada com 5VC de tampão de equilíbrio. As concentrações de NaCl utilizadas no gradiente segmentado do protocolo de purificação foram previamente definidas a partir de ensaios preliminares de padronização utilizando gradiente linear de NaCl, de modo a otimizar a separação da rhRSPO1 das demais proteínas presentes na amostra de meio condicionado e a sua recuperação.

Para a segunda etapa de purificação, com a coluna de exclusão molecular (Superdex 75 10/300 GL, GE Healthcare), foi utilizado o tampão 40mM Tris-HCl pH 7,4, com 713mM NaCl e 5% Trealose, devidamente filtrado em membrana 0,22 μ m e degaseificado. Antes da corrida, a coluna foi equilibrada com 2VC de tampão e, em seguida, carregada com a amostra proveniente da filtração com coluna de heparina. Anteriormente à aplicação, a amostra foi previamente concentrada para um volume de 300 μ L, utilizando-se ultrafiltração com filtro de corte de 10kDa. Durante todo o processo, um fluxo de 0,5mL/min foi utilizado, respeitando o limite de pressão de 1,8MPa e os eluatos foram coletados.

3.8 Atividade biológica *in vitro* da rhRSPO1

A atividade biológica da rhRSPO1 foi testada *in vitro* através de um ensaio colorimétrico de atividade de fosfatase alcalina (ALP), utilizando-se células C2C12, submetidas à diferenciação osteoblástica mediada pela ativação da via de WNT/ β -catenina, após tratamento com rhRSPO1, conforme metodologia adaptada de Lu e colaboradores (LU; KIM; LIU; ABO *et al.*, 2008). Para tanto, células C2C12 foram plaqueadas em baixa densidade (5x10³ células por poço) em placas de 24 poços, em meio DMEM, suplementado com 10% SFB e cultivadas por 48h até que atingissem aproximadamente 80% de confluência. No dia zero de tratamento, o meio de cultura foi trocado por meio DMEM 5% SFB (GRANJEIRO; OLIVEIRA; BUSTOS-VALENZUELA; SOGAYAR *et al.*, 2005) contendo 100 ou 200ng/mL de rhRSPO1, individualmente ou combinada com 100ng/mL de rhWnt-3a (R&D - Cod 5036-WN)

(KIM; KAKITANI; ZHAO; OSHIMA *et al.*, 2005; LU; KIM; LIU; ABO *et al.*, 2008) e, dois dias depois, as células foram induzidas novamente com a mesma dose da proteína. No 5^o. dia de tratamento, as células foram coletadas, lisadas, utilizando-se um tampão de lise (0,5M Tris pH 9,0, 0,9% NaCl e 1% Triton X-100) e as amostras foram centrifugadas a 12.000g durante 15min.

O teste de atividade de ALP foi realizado de acordo com as instruções do fabricante do Kit para Ensaio Colorimétrico ALP (Labtest) em um ensaio adaptado para placas com 96 poços. Posteriormente, 10µL de cada lisado celular foram misturados com 50µL de tampão de reação (150mM NaCl, pH 10,1), e a mistura foi incubada à 37°C por 5min. A reação foi interrompida com 200µL de reagente de coloração (94mM citrato de sódio, 250mM NaOH), sendo, em seguida, realizada a leitura da absorbância a 590nm. Meio condicionado por células HEK293 transfectadas com o vetor pNU1 vazio foi utilizado como controle negativo, enquanto a proteína rhRSPO1 comercial, produzida pela empresa R&D (Cod 4645-RS/CF), foi utilizada como amostra de referência. Como controle positivo, utilizou-se meio condicionado por células 293T superprodutoras da proteína rhBMP7, que induz a diferenciação osteogênica em células C2C12 (BUSTOS-VALENZUELA; HALCSIK; BASSI; DEMASI *et al.*, 2010).

As doses de rhRSPO1 utilizadas nos ensaios de atividade biológica *in vitro* foram determinadas com base na curva dose-resposta resultante do ensaio de ALP preliminar para padronização. Para a padronização, foram utilizadas quantidades crescentes de meio condicionado pelo clone HEK293 Cl.21 na condição de cultivo livre de soro, variando entre 250µL e 1µL de meio condicionado por poço (250, 100, 50, 25, 5, 1µL), correspondentes às doses aproximadas de 500, 200, 100, 50, 10 e 2ng/mL de rhRSPO1, respectivamente. Todas as amostras foram previamente filtradas em filtro de 0,22 µm (MILLEX GP Filter Unit – Millipore Express PES Membrane) para esterilização e a amostra de rhRSPO1 proveniente da etapa 2 da purificação por cromatografia de afinidade à heparina (Hep) passou, ainda, por uma troca de tampão para remoção da uréia, utilizando-se ultrafiltração em coluna de corte de 10kDa. Tampão Tris-HCl 40 mM pH 7,4, contendo NaCl 713 mM e trealose a 5%, foi utilizado na troca de tampão, em volume 10 vezes maior que o volume da amostra.

3.9 Estabilidade e cinética de produção da rhRSPO1

Foram realizados ensaios preliminares para avaliar a cinética de produção da rhRSPO1 pelas células HEK293 e CHO-DG44. Os meios condicionados por essas células foram coletados nas condições com soro fetal bovino (SFB) e sem (SFM), e com condicionamento por diferentes períodos de tempo (24h, 48h, 72h). Com o intuito de avaliar a estabilidade da proteína rhRSPO1 no meio condicionado e na solução de eluição da purificação, estas amostras foram submetidas a diferentes condições de acondicionamento e períodos de tempo de armazenamento. Nos estudos preliminares da estabilidade da proteína, as amostras foram mantidas a 4°C (geladeira) ou a -80°C (ultra-freezer) por um período de três meses ou submetidas a ciclos consecutivos de congelamento e descongelamento. Para tanto, foram utilizados os imunoenaios *Dot Blot* e ELISA para avaliar os níveis de rhRSPO1 nas amostras.

Como forma de estabilização da rhRSPO1, a proteína purificada, eluída em tampão 40mM Tris-HCl pH 7,4, com 150mM NaCl e 5% trealose foi alíquotada em alíquotas de 200µL em tubos eppendorf e liofilizada de acordo com as especificações a seguir. Para tanto, as alíquotas de rhRSPO1 foram congeladas em gelo seco e submetidas ao processo de liofilização no equipamento Freeze Dry System LYPH-LOCK 12 (LABCONCO) a -50°C e pressão de 500 microns de Hg, por 45min, até a desidratação completa da amostra. Após este processo, as amostras liofilizadas foram armazenadas a -80°C até a data de sua reconstituição e uso.

3.10 Adaptação das células HEK293 superprodutoras de rhRSPO1 ao cultivo em suspensão

A fim de adaptar os clones selecionados de célula HEK293 superprodutoras de rhRSPO1 ao cultivo em suspensão, foi realizada a troca do meio de cultivo para o meio HyQSFM4 HEK293 (Hyclone), próprio para células em suspensão, e as células foram cultivadas em garrafas T próprias para este tipo de cultivo. Para obter melhores resultados, duas estratégias diferentes de adaptação foram testadas: substituição completa do meio de cultura (100% de meio fresco para cultura em suspensão) ou substituição gradual (50% de meio fresco para cultura em suspensão e 50% de meio condicionado da cultura aderente a cada passagem). Foi adicionado

um agente anti-aglutinante (*Anti-clumping*, Life Technologies) às culturas para evitar a formação de agregados celulares e, conseqüentemente, a morte celular por cisalhamento. As células foram acompanhadas durante 20 passagens.

3.11 Ensaio de atividade da rhRSPO1 *in vivo*

Toda a experimentação animal foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina em 26/08/2015 (protocolo nº 131/15), Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil, de acordo com o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

Os camundongos BALB/c do tipo selvagem utilizados neste estudo foram fornecidos pelo Biotério SPF (*Specific Pathogen Free*) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e mantidos na instalação para experimentação animal durante o período do experimento. Todos os animais utilizados no estudo eram do sexo masculino, adultos (10-12 semanas), pesando 22-29g (média=25,2g), mantidos em grupos de até seis animais em gaiolas ventiladas (Alesco), com aparas de madeira e enriquecimento ambiental, a 22°C e umidade controlada, ciclos definidos de claro/escuro (12/12h), recebendo água filtrada autoclavada e alimentos Nuvital irradiados *ad libitum*.

A atividade biológica da rhRSPO1 foi testada *in vivo* utilizando-se, como modelo, camundongos BALB-c, conforme descrito por Kim e colaboradores (KIM; KAKITANI; ZHAO; OSHIMA *et al.*, 2005). Para tanto, foram injetados 50µg de rhRSPO1 (N=7) ou solução salina veículo (40mM Tris, 150mM NaCl, 5% Trealose), como controle negativo, por via intravenosa (i.v), por três dias consecutivos pela manhã. Como forma de randomização, os animais foram selecionados aleatoriamente para alocação nos grupos experimentais. As amostras foram aplicadas por injeção retro-orbital utilizando-se agulha de insulina individual descartável (0,3mm), em um volume de 200µL por aplicação. Antes da aplicação, as amostras foram concentradas e seu tampão (Tris 40mM, NaCl 150mM, trealose a 5%) foi trocado utilizando-se uma coluna de corte de 10kDa para redução da concentração de sal. Após o tratamento, os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂ e o diâmetro do jejuno médio foi medido para avaliar o efeito estimulatório da rhRSPO1 sobre o crescimento deste tecido. Além disso, foi realizada a análise

histológica do tecido para avaliar a influência do tratamento com rhRSPO1 sobre o órgão.

Para análise histológica, as amostras foram coletadas e fixadas em paraformaldeído a 4%. Após a fixação, os tecidos foram lavados em solução salina tamponada com fosfato (*PBS - phosphate buffered saline*), desidratados em concentrações crescentes de etanol, diafanizados em xilol e incluídos em meio de inclusão de parafina Histosec (Merck Millipore). Os tecidos embebidos em parafina foram seccionados em cortes de 5µm de espessura, utilizando-se um micrótomo automático (Leica-RM2165), os quais foram colocados em lâminas histológicas e corados com hematoxilina-eosina (H&E). As lâminas foram registradas com o software NIS-Elements em um microscópio Nikon 80i (CADI-FMVZ) e a análise das imagens foi realizada utilizando-se o software ImageJ. Para determinar o comprimento médio do eixo cripta-vilosidade da região média do jejuno após os tratamentos (variável quantitativa contínua), o comprimento entre a base da cripta e o ápice das vilosidades foi medido para o maior número possível de pares cripta-vilosidade intactos. Os valores médios obtidos para cada animal foram utilizados como replicatas biológicas.

3.12 Caracterização estrutural e análise do perfil de glicosilação da rhRSPO1

Para caracterização da rhRSPO1 produzida, as amostras obtidas do sistema de purificação otimizado por FPLC foram submetidas à espectrometria de massa e outros ensaios. O perfil de glicosilação da proteína foi analisado por meio de ensaios de desglicosilação através da digestão com PNGase F, painel de lectinas e digestão com endoglicosidases, seguida de espectrometria de massa do tipo LC/MS-MS.

3.12.1 Ensaio de Desglicosilação com PNGase F

Para verificar a presença de N-glicosilação na proteína rhRSPO1 purificada produzida neste trabalho, esta proteína foi submetida à digestão com a enzima PNGase F (New England Biolabs) sob condições desnaturantes, de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante. Para tanto, 1µg de rhRSPO1 foi incubado em Tampão Desnaturante de Glicoproteína (SDS a 0,5%, DTT 40mM) a 100°C por

10min. Após a desnaturação, 1 Unidade de PNGase F foi adicionada à amostra em Tampão de Reação 1X (fosfato de sódio 50 mM, 1% NP-40, pH 7,5), e a reação foi incubada a 37°C por 1h. 100ng de amostra digerida com PNGase F ou sem tratamento foram fracionados em SDS-PAGE a 15% e analisados pelos métodos de coloração de Prata e *Western Blot*, conforme descrito anteriormente.

3.12.2 Ensaio de Lectinas do tipo ELISA (Painel de Lectinas)

Para obter um perfil qualitativo de glicosilação da proteína RSPO1 humana recombinante, o ensaio de painel de lectina com diferentes lectinas foi realizado com o DIG glycan differentiation kit (ROCHE), de acordo com o protocolo adaptado de Legardinier et al (LEGARDINIER; KLETT; POIRIER; COMBARNOUS *et al.*, 2005). Para tanto, os poços da placa de ELISA (NUNC-Immuno Plate/MaxiSorp-NUNC) foram revestidos com 200ng/mL de rhRSPO1 purificada e glicoproteínas padrão (carboxipeptidase, transferrina, fetuína, asilofetuína), como controles. Tipos específicos de resíduos de glicanos foram detectados na molécula de rhRSPO1 por meio das diferentes lectinas do painel: aglutinina de *Galanthus nivalis* (GNA, Manose Terminal (ligação 1-3, 1-6 ou 1-2) (glicosilação N- ou O-ligada)), aglutinina de *Sambucus nigra* (SNA, Dissacarídeo Ácido Siálico-Galactose (ligação 2-6) (glicosilação N- ou O-ligada), aglutinina de *Maackia amurensis* (MAA, Dissacarídeo Ácido Siálico-Galactose (ligação 2-3) (glicosilação N- ou O-ligada)), aglutinina de amendoim (PNA, Dissacarídeo Galactose-N-acetilgalactosamina (ligação 1-3) (glicosilação O-ligada)), aglutinina de *Datura stramonium* (DSA, Dissacarídeo Galactose-N-acetilglicosamina (ligação 1-4) (glicosilação N- ou O-ligada), e resíduos de N-acetilglicosamina (glicosilação O-ligada)). O tampão de purificação (tampão Tris-HCl 40mM, NaCl 713mM e trealose a 5%, pH 7,4), veículo da rhRSPO1, foi utilizado como controle negativo.

As proteínas foram diluídas em tampão carbonato de sódio 0,1M, pH 9,6, aplicadas à placa de ELISA e incubadas *overnight* a 4°C. A placa foi lavada três vezes com PBSA e incubada por 2h com solução salina tamponada com Tris-HCl contendo Tween[®]20 a 0,05% (TBS-T) + Polivinilpirrolidona K30 a 2% (PVP K30 - Sigma Aldrich) a 4°C, para bloqueio de sítios inespecíficos. Após três novas lavagens com PBSA (3X), foi realizada a etapa de ligação das lectinas a resíduos específicos das cadeias laterais de glicanos e, para tanto, utilizou-se um painel de

cinco lectinas conjugadas à digoxigenina (listadas acima), componentes do kit comercial (DIG Glycan Differentiation Kit – Roche). Para a ligação, as lectinas específicas acopladas a digoxigenina foram incubadas por 1h a 4°C, sendo feitas, em seguida, três lavagens com PBSA, e incubação com o anticorpo monoclonal anti-digoxigenina conjugado à enzima fosfatase alcalina (diluição 1: 6.000) por 1h a 4°C. Para a etapa de detecção, a placa foi lavada outras 5x com PBSA e, então, adicionou-se o substrato da enzima fosfatase alcalina BCIP (5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato) (BluePhos Microwell Phosphatase Substrate System (KPL)). Após 30 minutos, a reação foi interrompida com EDTA (APStop Solution™) e as amostras foram lidas em espectrofotômetro em comprimento de onda de 600nm (faixa de 595-650 nm).

3.12.3 Análise de LC-MS/MS

A amostra obtida do sistema de purificação otimizado por FPLC foi submetida à separação eletroforética em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), em condições desnaturante e redutora, e, em seguida, as proteínas foram coradas com azul de Coomassie. A banda correspondente à rhRSPO1 foi descorada em água e digerida com a enzima Glu-C (Sigma-Aldrich), utilizando-se o protocolo padrão para digestão e extração de proteínas para análise por espectrometria de massa do tipo LC-MS/MS, conforme determinado por Aebersold e Goodlett (AEBERSOLD; GOODLETT, 2001). As amostras foram submetidas à análise por espectrometria de massa em tandem utilizando-se o equipamento Thermo Scientific FT-ICR Orbitrap LC-MS/MS System (Thermo Fisher Scientific), com ionização por electropulverização (ESI - *electrospray ionization*) como fonte de íons, modo de fragmentação CID ou CAD (íons y e b), e modos de varredura MS e MS/MS do tipo FT-ICR/Orbitrap e Armadilha de íon linear (*Linear Ion Trap*), respectivamente. As modificações pós-traducionais (PTM) foram identificadas pelo deslocamento de massa dos fragmentos peptídicos no espectro de massa em tandem resultante, os quais foram comparados com a massa de referência teórica de PTMs da ferramenta FindMod da plataforma *Swiss Institute of Bioinformatics Platform* (ExpASy).

3.13 Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando-se o GraphPad Prism 6.0, Software Inc, EUA. Os *outliers* foram removidos pelo método ROUT. O teste de Análise de Variância (ANOVA) (teste *post hoc* de Tukey) e o teste t não paramétrico (Mann-Whitney) foram usados para medir a atividade da rhRSPO1 nos ensaios *in vitro* e *in vivo*, respectivamente. Diferenças estatisticamente significativas foram consideradas quando $p < 0,05$.

Capítulo II – Avaliação funcional da rhRSPO1 na Engenharia Tecidual

3.14 Animais (camundongos)

Os experimentos de geração de tecidos engenheirados a partir de unidades organoides murinas foram desenvolvidos durante o período de estágio sanduíche no The Saban Research Institute do Children's Hospital de Los Angeles (CHLA), sob orientação da Dra. Tracy C. Grikscheit (*Developmental Biology and Regenerative Medicine Program, Saban Research Institute, Children's Hospital Los Angeles, Los Angeles CA, United States of America*). Todos os experimentos envolvendo camundongos foram realizadas de acordo com os protocolos aprovados pelo Comitê Institucional de Cuidado e Uso de Animais (IACUC) do Children's Hospital Los Angeles, que adere às Diretrizes de Bem-Estar Animal de Laboratório do NIH (*US National Institute of Health's Office of Laboratory Animal Welfare Guidelines*) (Aprovação #215). Camundongos do tipo C57BL/6 selvagem (000664 - The Jackson Laboratory), Actina^{egfp} (SALA; MATTHEWS; SPEER; TORASHIMA *et al.*, 2011), Lgr5^{egfp} (008875 - The Jackson Laboratory) e camundongos imunodeficientes NOD/SCID (*non-obese diabetic/severe combined immunodeficient mice*, 005557 - The Jackson Laboratory) foram mantidos sob as condições e cuidados padrão para manutenção de camundongos C57BL/6.

3.15 Isolamento de Unidades Organoides Intestinais e de Fígado

O processo de isolamento das UOs foi adaptado a partir do protocolo publicado anteriormente pelo grupo da Dra. Grikscheit (GRANT; MOJICA; SALA; HILL *et al.*, 2015; HOU; CHANG; TRECARTIN; BARTHEL *et al.*, 2018; SALA;

MATTHEWS; SPEER; TORASHIMA *et al.*, 2011). Camundongos C57BL/6 Lgr5^{egfp}, com duas semanas de idade (14-16 dias), previamente genotipados utilizando-se *primers* específicos, foram sacrificados em câmara de CO₂ e o intestino delgado foi coletado. Os tecidos ressectados foram abertos longitudinalmente e lavados vigorosamente cinco vezes com solução salina tamponada de Hank (HBSS, 14170-112, Life Technology) gelada, contendo antibiótico e antimicótico (Anti/Anti, 15240062, Life Technology), para remover o conteúdo intestinal. Os intestinos foram fragmentados em pedaços de 1x1mm², lavados duas vezes em HBSS/ Anti/Anti gelado, sedimentados à 164g (*rcf*) (Eppendorf 5810R - 1.000rpm) entre lavagens e digeridos em solução de HBSS contendo 800 unidades/mL de colagenase tipo IV (CLS-4, Worthington) e 0,12mg/mL de dispase (17105-041, Gibco), durante 20min a 37°C. Após este período, a digestão foi interrompida com soro fetal bovino a 10% (FBS, Invitrogen) em meio DMEM (*high-glucose Dulbecco's modified Eagle's medium*, 10566-016, Invitrogen), o sedimento (*pellet*) foi dissociado em pedaços menores com a pipeta e centrifugado à 41g (*rcf*) (Eppendorf 5810R - 500rpm) por 5min para remoção de células individuais (singletes). O *pellet* resultante, contendo as UOs intestinais, foi ressuspendido em DMEM suplementado com 10% de SFB, aminoácidos não essenciais (NEAA, 11140-076, Life Technology) e antibiótico/antimicótico, precipitado novamente a 105g (*rcf*) (Eppendorf 5810R - 800rpm), sendo o sobrenadante removido.

Os fígados dos camundongos C57BL/6 também foram coletados para a geração de unidades organoides de fígado (*LOU*). Para tanto, utilizou-se o mesmo protocolo de isolamento de UOs intestinais, porém com um período de tempo de digestão enzimática de apenas 15min, dada a menor rigidez do tecido hepático.

3.16 Cultivo de UOs e quantificação do seu tamanho e taxa de sobrevivência

O sedimento (*pellet*) de UOs foi ressuspendido em quatro volumes de DMEM/ 10% FBS/ Anti/Anti/ NEAA e misturado em partes iguais com matriz de Matrigel (*reduced growth factor Matrigel matrix* - 354230, Corning). Em seguida, esta suspensão celular foi semeada em placas de cultura para células aderentes, formando um ambiente tridimensional (3D) para o crescimento das UOs. Dois experimentos diferentes foram realizados com as UOs intestinais, para avaliar a sua

taxa de sobrevivência e crescimento. Para tanto, 40 μ L da suspensão de OUs intestinais na matriz de Matrigel foram plaqueados em placas de 24 poços para o experimento de avaliação da taxa de sobrevivência e 60 μ L foram semeados em placas de 12 poços para os experimentos de crescimento. As placas foram incubadas a 37°C por 20min para polimerização do Matrigel e, em seguida, em meio de cultura (DMEM/ 10% FBS/ Anti/Anti/ NEAA) contendo rhRSPO1 (200 ou 500ng/mL) ou PBS (grupo controle), foi adicionado aos poços (LEVIN; KOGA; BELCHIOR; CARREIRA *et al.*, 2020). As culturas de UOs foram mantidas em incubadora a 37°C e 5% de CO₂, com trocas periódicas de meio de cultivo a cada dois dias.

Para avaliar a taxa de sobrevivência das UOs intestinais em cultura, as UOs encontradas em quatro campos aleatórios por poço, identificados no fundo da placa, foram contadas ao longo do eixo z, sob microscópio óptico, por todos os dias de cultivo durante uma semana. Para cada condição, a taxa de sobrevivência foi indiretamente calculada pela razão (*ratio*) entre o número médio de UOs em cada dia e o número médio de UOs no primeiro dia de cultivo (número da UO a cada dia/ número da UO no Dia 1). Para avaliar o crescimento das UOs em cultura, oito campos aleatórios por poço, pré-estabelecidos, foram fotografados ao longo do eixo z, sob o microscópio Leica (DMI6000B) nos dias 1, 3 e 6 de cultivo. A partir destes registros, a área transversal de cada UOs foi determinada utilizando-se o software ImageJ, sendo a área média de todas as unidades organoides identificadas nos oito campos aleatórios selecionados em cada poço considerada como uma replicata técnica. Para cada experimento, foram utilizadas três replicatas biológicas, com três replicatas técnicas por condição.

Para avaliar a influência do tratamento com rhRSPO1 sobre as unidades organoides de fígado (LOUs), os mesmos parâmetros de crescimento e sobrevivência descritos acima foram analisados, porém, pequenas adaptações metodológicas foram implementadas a fim de otimizar a coleta de dados nos experimentos deste modelo. Dessa forma, o crescimento e taxa de sobrevivência das LOUs foram avaliados simultaneamente em um mesmo experimento. Para tanto, 120 μ L da suspensão de LOUs na matriz de Matrigel foram plaqueados em placas de 35mm e estas foram cultivadas sob as mesmas condições de cultivo descritas anteriormente. Entretanto, para registro das culturas, cada placa foi dividida em quatro quadrantes, sendo a área total de um dos quadrantes, para o

plano focal da base da placa, registrada por completo sob o microscópio óptico nos dias 1, 3 e 5 de cultivo. Dessa forma, a partir do grande banco de imagens geradas, o número total de LOUs e área transversal de cada uma destas foi mensurado simultaneamente utilizando-se o software ImageJ, sendo estes dados analisados da mesma maneira descrita anteriormente para avaliação do crescimento e da taxa de sobrevivência das UOs intestinais. Assim como para as UOs intestinais, para cada experimento, foram realizadas três replicatas biológicas, com três replicatas técnicas por condição.

3.17 Coleta e armazenamento das UOs cultivadas *in vitro* para análises (Histologia, RNA e Proteínas)

As unidades organoides dos experimentos realizados *in vitro* foram coletadas nos dias 3 e 6 (dia 5 para as LOUs) de cultivo para análises de qRT-PCR, *Western blot* e histológica, respeitando-se a forma adequada de coleta e acondicionamento de cada material. Vale ressaltar que apenas as UOs das placas onde não houve estresse desnecessário nas células foram coletadas, preservando sua integridade para as análises WB e qRT-PCR. Para tanto, coletou-se gentilmente o Matrigel dos poços contendo as UOs, transferindo-os para tubos cónicos de 15mL, que foram centrifugados à 193g (*rcf*) (Eppendorf 5810R) por 5min para sedimentação do Matrigel e das células. Para preparação das amostras para as análises histológicas (H&E e Imunofluorescência), o *pellet* contendo as UOs foi embebido em agarose de baixo ponto de fusão (*low melting agarose*) à 3% em PBSA, sendo, em seguida, fixado *overnight* em formalina (23-305-510, Fisher HealthCare) e incluído em parafina, conforme descrito na literatura (HOU; CHANG; TRECARTIN; BARTHEL *et al.*, 2018). Para os experimentos de extração de RNA total e análise da expressão gênica por qRT-PCR, o *pellet* contendo as UOs foi colocado em solução de preservação *RNA Later* (AM7021, Lifetech) e acondicionado a -80°C. Para quantificação de proteínas totais e experimentos de *Western blot*, foram preparados extratos celulares a partir do *pellet* de UOs em tampão RIPA+ (NaCl 150mM, Tris 50mM, EDTA 1mM, EGTA 1mM, Triton X-100 1%, SDS 0,1%, desoxicolato de sódio a 0,5%, pH 7,4 + inibidor de protease Halt cocktail (1:100; P87786, Thermo-Fischer) + inibidor de fosfatase cocktail 2 (1:100; P5726, Sigma-Aldrich) + inibidor de fosfatase cocktail 3 (1:100; P0044, Sigma-Aldrich)). Antes de armazenadas a -80°C,

as alíquotas do extrato proteico destinados aos experimentos de *Western blot* foram previamente desnaturadas, misturando-se tampão de amostra (*loading buffer*) desnaturante, contendo β -mercaptoetanol, e incubando as amostras a 98°C por 5min.

3.18 Análise da expressão gênica através de qRT-PCR

O RNA total das amostras de UOs intestinais do terceiro dia de cultivo (UO dia 3), tratadas com 500ng/mL de rhRSPO1 ou PBSA (controle), foi extraído com o RNeasy Mini Kit (74134, Qiagen). 500ng de RNA total foram utilizados para a síntese de cDNA com o *iScript™ Reverse Transcription Supermix* (1708841, Bio-Rad). Os níveis de expressão relativa de mRNA dos genes *ciclina D1*, *Lgr5* e β -*catenina* foram avaliados com o LightCycler® 480 SYBR Green I Master no sistema LightCycler® 480 (04707516001, Roche). Todas as etapas seguiram as instruções do fabricante. Um ciclo de dissociação foi executado após cada ciclo para verificar ampliações não específicas. Os níveis de expressão relativa de mRNA foram estimados pelo método delta delta Ct ($\Delta\Delta Ct$) (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001), utilizando *Gapdh* como o gene endógeno (*housekeeping*) para normalização. Todos os *primers* (Eurofins Genomics) utilizados estão listados na Tabela 3.

Tabela 3 - Lista de Primers – qRT-PCR - UOs.

<i>Primer</i>	Conc. (nM)	Sequência <i>Forward</i>	Sequência <i>Reverse</i>
<i>Ciclina D1</i>	600	CAGAAGTGCGAAGAGGAGGTC	TCATCTTAGAGGCCACGAACAT
β - <i>Catenina</i>	600	CCCAGTCCTTCACGCAAGAG	CATCTAGCGTCTCAGGGAACA
<i>Lgr5</i>	600	CTTCACTCGGTGCAGTGCT	CAGCCAGCTACCAAATAGGTG
<i>Gapdh</i>	200	CTCCCACTCTTCCACCTTCG	GCCTCTTTGCTCAGTGTCC

3.19 Análise da expressão gênica através de Western Blot

A partir dos extratos celulares das UOs intestinais do terceiro dia de cultivo (Dia 3), tratadas com 500ng/mL de rhRSPO1 ou PBSA (controle), em tampão RIPA⁺, a quantidade de proteínas totais em cada amostra foi quantificada por meio do ensaio colorimétrico *Bio-Rad DC Protein* (Bio-Rad). Os experimentos de *Western*

blot foram realizados com o sistema *Thermo-Fischer*. Para esse fim, 20µg de proteínas totais, previamente misturada com tampão de amostra (*loading buffer*) redutor, contendo β-mercaptoetanol, foi aplicada ao gel de poliacrilamida (NW00080BOX, Invitrogen Bolt 8% Bis-Tris Plus). Após eletroforese, as proteínas foram transferidas para a membrana de nitrocelulose com o sistema *iBlot™ Transfer Stack* (IB301002, Thermo Fischer). Leite desnatado a 5% foi utilizado para bloqueio de sítios inespecíficos e diluição dos anticorpos: anti-β-catenina não-fosforilada (ativa) (1:1000; #8814, Cell Signaling) e anti-β-actina (1:1.000; SC-69879, Santa Cruz Biotechnology), anticorpo IgG anti-coelho (1:1.000; #70745, Cell Signaling) e anti-camundongo (1:1.000; #70746, Cell Signaling) conjugados à HRP. Todos os anticorpos utilizados foram listados na Tabela 4. Para revelação, os reagentes *Immobilon Western* (WBKLS0500, Millipore) foram utilizados como substrato quimioluminescente para a HRP (*Horseradish Peroxidase*), sendo adicionados à membrana de nitrocelulose no momento da exposição no equipamento de fotodocumentação *Scanner Western Blot quimioluminescente C-DiGit* (LI-COR). A análise densitométrica quantitativa da membrana de *Western blot* foi realizada utilizando o software ImageJ. O resultado final da expressão da β-catenina ativa foi gerado após normalização com a expressão constitutiva do gene endógeno β-actina.

3.20 Preparação do Arcabouço/Scaffold

O arcabouço/*scaffold* biodegradável de PGA/PLLA (ácido poliglicólico/ácido poli L-lático) utilizado nos experimentos de engenharia tecidual foi preparado de acordo com as instruções descritas em artigo anterior do grupo da Dra. Grikscheit (SALA; MATTHEWS; SPEER; TORASHIMA *et al.*, 2011). Estruturas cilíndricas (5mm de comprimento, 4mm de diâmetro) foram formadas em suporte de vidro a partir de feltro plano de ácido poliglicólico não-tecido (*nonwoven*) de dois milímetros de espessura (densidade aparente, 60mg/cm³; porosidade > 95%) (Concordia Fibers) e seladas com 5% de ácido poli-L-Lático (Durect Corporation) em clorofórmio (Sigma-Aldrich). Após a esterilização com etanol absoluto (100%), os polímeros foram revestidos com 0,4mg/mL de solução de colágeno tipo I (Sigma-Aldrich) para permitir a adesão celular, por 20min a 4°C, lavados com PBS e armazenados a seco à temperatura ambiente. Os polímeros foram armazenados em um dessecador, a fim de evitar a hidrólise e a degradação prematuras do polímero.

3.21 Implantação de UOs e Formação do TESI e TELi

UOs intestinais foram semeadas em arcabouços biodegradáveis (*scaffolds*) e implantadas na região do omento de camundongos NOD/SCID adultos para a geração do TESI, conforme descrito anteriormente (SALA; MATTHEWS; SPEER; TORASHIMA *et al.*, 2011). Para tanto, os arcabouços cilíndricos de PGA/PLLA, medindo 5mm de comprimento, foram semeados com 60µL do *pellet* de UOs de intestino e mantidos em gelo até o momento da implantação. Para avaliar a influência da rhRSPO1 na formação de TESI, cada complexo *scaffold*+OU foi tratado com: 5µg de rhRSPO1 ou o volume equivalente de PBS (controle). Metade da massa de rhRSPO1 ou PBS foi semeada diretamente sob o *scaffold*, enquanto a metade restante foi misturada à alíquota de UOs previamente a semeadura. Os arcabouços semeados com as UOs intestinais foram implantados na região do omento de camundongos receptores NOD/SCID e deixados para maturação *in vivo* por 30 dias. Após este período, os *scaffolds* foram então explantados, dissecados cuidadosamente para remoção do tecido adjacente, pesados em balança analítica de precisão (AB204-S, Mettler Toledo) e fixados em formalina para inclusão em parafina. Durante a necropsia dos animais, os tecidos adjacentes foram analisados quanto à presença de tumores.

A fim de se avaliar a possibilidade de geração de um fígado engenheirado (TELI, do inglês *Tissue Engineered Liver*) e a influência do tratamento com rhRSPO1 neste modelo, LOUs foram semeadas nos scaffolds seguindo-se o mesmo protocolo experimental e tratamentos (5µg de rhRSPO1 ou PBS) utilizados com as OUs intestinais. Entretanto, para a maturação *in vivo* destes tecidos, os complexos *scaffold*+LOU foram implantados subcutaneamente e explantados após 30 dias, sendo processados conforme descrito anteriormente.

3.22 Avaliação da Complexidade do TESI e formação do TELi

Cortes histológicos das amostras de TESI e TELi geradas neste trabalho, foram seccionados transversalmente seguindo a mesma orientação, corados com Hematoxilina e Eosina (H&E) e analisados em microscópio óptico de contraste de fase para observar o nível de organização do epitélio engenheirado. Para fins de comparação, os tecidos intestinais foram avaliados quanto ao seu grau de

desenvolvimento e classificados independentemente por três cientistas com experiência prévia na observação e classificação de epitélio intestinal engenheirado. As amostras foram classificadas de acordo com o grau de complexidade do epitélio intestinal engenheirado, sendo divididas em quatro diferentes graus de desenvolvimento (Figura 8): Complexidade baixa - epitélio pouco desenvolvido na forma de rosetas (A); Complexidade média-baixa - epitélio linear contínuo (B); Complexidade moderada - epitélio contínuo com estruturas semelhantes à criptas e vilosidades rudimentares (C); Complexidade alta - epitélio contínuo com criptas bem definidas, vilosidades e presença clara de células secretoras (D). Os resultados finais, apresentando o grau de desenvolvimento do epitélio intestinal engenheirado (TESI) das amostras de cada um dos grupos, foram gerados a partir dos valores de consenso obtidos nas três avaliações histológicas independentes.

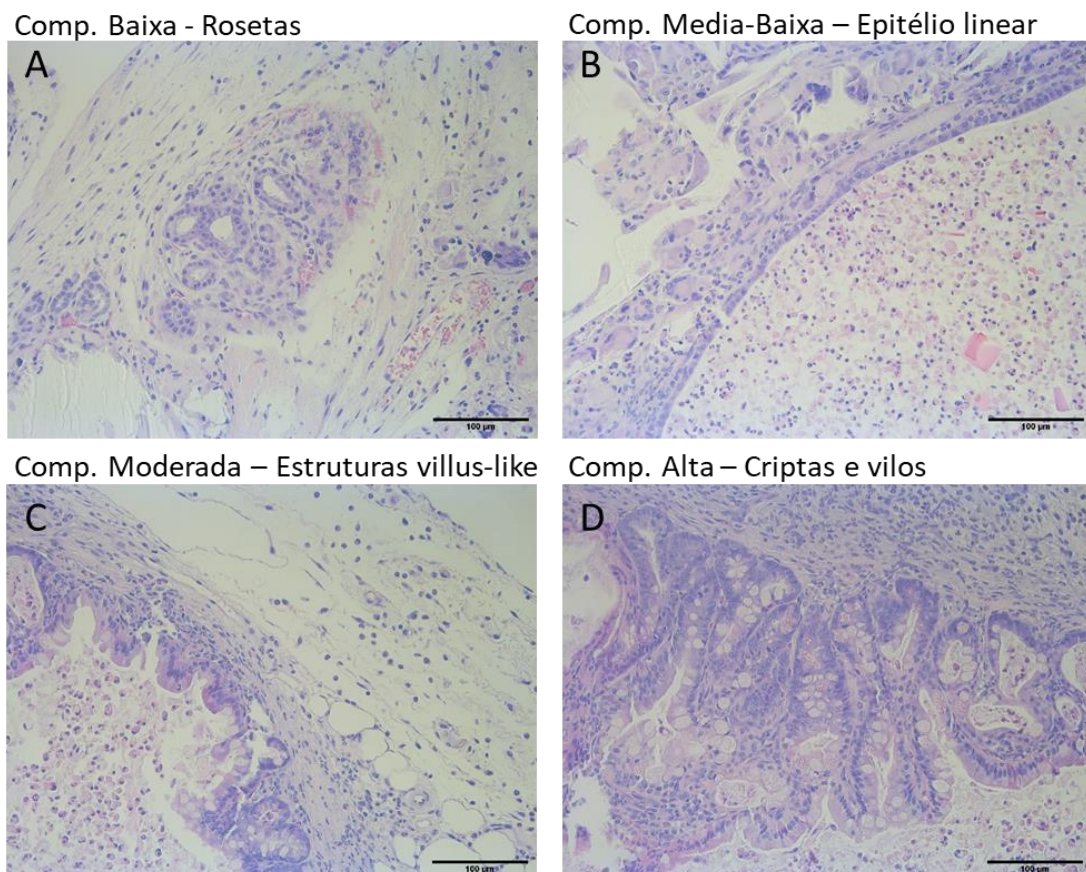


Figura 8 - Complexidade do TESI baseada em análise histológica por coloração de H&E. (A) Complexidade Baixa - epitélio pouco desenvolvido na forma de rosetas; **(B)** Complexidade Media-Baixa - epitélio linear contínuo; **(C)** Complexidade Moderada - epitélio contínuo com estruturas semelhante à criptas e vilosidades rudimentares; **(D)** Complexidade Alta - epitélio contínuo com criptas bem definidas, vilosidades e presença clara de células secretoras. Comp: complexidade. Figura adaptada de Levin *et al.*, 2020 (LEVIN; ZUBER; SQUILLARO; SOGAYAR *et al.*, 2020).

3.23 Imunoensaios (Imunofluorescência)

Os tecidos embebidos em parafina foram seccionados transversalmente em micrótomo, seguindo a mesma orientação, em secções de 5µm de espessura, que foram dispostas em lâminas histológicas carregadas positivamente. As secções foram desparafinizadas em solução *HistoChoice Clearing Agent* (H2779, Sigma-Aldrich) por dois banhos consecutivos e incubadas com concentrações decrescentes de etanol (100%, 95%, 75%, 50%, 30%) até a completa reidratação do tecido em água deionizada. A etapa de recuperação antigênica foi realizada com solução de desmascaramento de antígeno à base de citrato (H3300, Vector Labs) ou solução de desmascaramento à base de Tris (H3301, Vector Labs), aquecidas no micro-ondas em potência média (50%), por três vezes de 4min com intervalos de 30seg entre elas. Após retornar à temperatura ambiente, as amostras foram lavadas em PBS-T (PBS + 0,1% de Tween 20) e os sítios inespecíficos de ligação foram bloqueados com a solução universal de bloqueio *Universal Blocking Solution* (UBS - 1% BSA, 0,1% *cold fish skin gelatin*, 0,5% Triton-X 100 e 1x PBS) suplementada com soro de burro a 2% (D9663, Sigma-Aldrich). Os tecidos foram incubados durante a noite (*overnight*) a 4°C na presença dos diferentes anticorpos primários, diluídos em UBS + 2% de soro de burro. Alternativamente, para as amostras de TELi, foi utilizado um protocolo otimizado no qual as lavagens foram realizadas com tampão TBS+0,5% Triton X-100 e a recuperação antigênica com tampão Tris-EDTA (10mM Tris, 1mM EDTA, pH 8,4), sendo mantidas as demais etapas do processo.

Os seguintes anticorpos primários foram utilizados nos imunoensaios: Albumina (1:200; A80-229A, Bethyl), CK19 (1:200; Ab52625, Abcam), Cromogranina A (ChGA, 1:400; ab15160, Abcam), E-Caderina (1:100; 610181, BD), GFP (1:200; Ab290, Abcam), HNF4α (1:200; Ab41898, Abcam), Ki-67 (1:200; RM9106S1, Thermo-Fisher), Lisozima (1:100; A0099, Dako), Mucina2 (1:100; sc15334, Santa Cruz), PCNA (1:400; Ab29, Abcam), D-actina do músculo liso (SMA, 1:100; Ab5694, Abcam), Tuj1 (1:1000; 801202, BioLegend) e Vilina (1:100; sc-66022, Santa Cruz). Para a detecção, os tecidos foram incubados por 1h em temperatura ambiente com os seguintes anticorpos secundários: *Alexa Fluor 488 donkey anti-goat* (LifeTech), *Alexa Fluor 488 donkey anti-mouse* (LifeTech), *Alexa Fluor 488 donkey anti-rabbit* (LifeTech), *Alexa Fluor 555 donkey anti-mouse* (LifeTech), *Alexa Fluor 555 donkey anti-rabbit* (LifeTech). As lâminas foram montadas com meio de montagem

Vectashield contendo DAPI (H1200, Vector Labs). Todos os anticorpos estão listados na Tabela 4.

Tabela 4 - Lista de Anticorpos – IF e WB – UOs.

Anticorpos Primários (alvo)	Ab	Espécie	Diluição	Ensaio	Ref. N°	Fabricante
Albumina	<i>pAb</i>	<i>goat</i>	1:200	IF	A80-229A	Bethyl
β -catenina não-fosforilada	<i>mAb</i>	<i>rabbit</i>	1:1000	WB	#8814	Cell Signaling
β -actina	<i>mAb</i>	<i>mouse</i>	1:100	WB	SC-69879	Santa Cruz
CK19	<i>mAb</i>	<i>rabbit</i>	1:200	IF	Ab52625	Abcam
Cromogranina A	<i>pAb</i>	<i>rabbit</i>	1:400	IF	ab15160	Abcam
E-Caderina	<i>mAb</i>	<i>mouse</i>	1:100	IF	610181	BD
GFP	<i>pAb</i>	<i>rabbit</i>	1:200	IF	Ab290	Abcam
HNF4 α	<i>mAb</i>	<i>mouse</i>	1:200	IF	Ab41898	Abcam
Ki-67	<i>mAb</i>	<i>rabbit</i>	1:200	IF	RM9106S1	Thermo-Fisher
Lisozima	<i>pAb</i>	<i>rabbit</i>	1:100	IF	A0099	Dako
Mucina2	<i>pAb</i>	<i>rabbit</i>	1:100	IF	sc-15334	Santa Cruz
PCNA	<i>mAb</i>	<i>mouse</i>	1:400	IF	Ab29	Abcam
D-actina do músculo liso (SMA)	<i>pAb</i>	<i>rabbit</i>	1:100	IF	Ab5694	Abcam
Tuj1	<i>mAb</i>	<i>mouse</i>	1:1000	IF	801202	BioLegend
Vilina	<i>mAb</i>	<i>mouse</i>	1:100	IF	sc-66022	Santa Cruz
Anticorpos Secundários	Ab	Espécie	Diluição	Ensaio	Ref. N°	Fabricante
<i>anti-mouse IgG HRP linked</i>	<i>pAb</i>	<i>goat</i>	1:1000	WB	#70746	Cell Signaling
<i>anti-rabbit IgG HRP linked</i>	<i>pAb</i>	<i>goat</i>	1:1000	WB	#70745	Cell Signaling
<i>anti-goat Alexa Fluor 488</i>	<i>pAb</i>	<i>donkey</i>	1:200	IF	A-21447	LifeTech
<i>anti-mouse Alexa Fluor 488</i>	<i>pAb</i>	<i>donkey</i>	1:200	IF	A-21202	LifeTech

<i>anti-rabbit Alexa Fluor 488</i>	<i>pAb</i>	<i>donkey</i>	1:200	IF	A-21206	LifeTech
<i>anti-mouse Alexa Fluor 555</i>	<i>pAb</i>	<i>donkey</i>	1:200	IF	A-31570	LifeTech
<i>anti-rabbit Alexa Fluor 555</i>	<i>pAb</i>	<i>donkey</i>	1:200	IF	A-31572	LifeTech

3.24 Análise Estatística

A análise estatística foi realizada utilizando-se o software GraphPad Prism 6.0 (Software Inc, EUA) e diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$. A análise de variância ANOVA (teste *post hoc* de Tukey) foi utilizada para quantificação do tamanho das UOs e taxa de sobrevivência. O teste t de Student foi utilizado para o ensaio de proliferação de UOs, qRT-PCR, Western blots e determinação da massa do TESI. O teste estatístico não paramétrico de Mann-Whitney foi utilizado para quantificação do grau máximo de desenvolvimento do TESI (*TESI complexity scores*). Para todas as análises, os *outliers* foram removidos pelo método ROUT.

Capítulo III – Avaliação funcional da rhRSPO1 na Regeneração Tecidual em modelo de Síndrome do Intestino Curto em *Zebrafish*

3.25 Animais (*zebrafish*)

Os experimentos para avaliação funcional dos efeitos da rhRSPO1 na regeneração intestinal em modelo de síndrome do intestino curto em *zebrafish* (peixe paulistinha) (SIC ZF ou *ZF SBS – zebrafish short bowel syndrome model*) também foram desenvolvidos durante o período de estágio sanduíche no The Saban Research Institute do CHLA, sob orientação da Dra. Tracy C. Grikscheit (*Developmental Biology and Regenerative Medicine Program, Saban Research Institute, Children's Hospital Los Angeles, Los Angeles CA, United States of America*). Todos os experimentos envolvendo *zebrafish* foram realizados de acordo com os protocolos aprovados pelo IACUC do CHLA, que adere às Diretrizes de Bem-Estar Animal de Laboratório do NIH (Aprovação #390). Todos os *zebrafish*

utilizados eram machos adultos e foram mantidos de acordo com as condições e cuidados padrão para manutenção destes animais. Vale destacar que a decisão de utilizar, apenas, ZF macho no presente estudo tem como fundamentação os estudos anteriores com esse modelo de SIC, que constataram a existência de variações no peso de ZF fêmea devido à produção de ovos, os quais interferiram nas análises da perda de peso dos animais (SCHALL; HOLOYDA; GRANT; LEVIN *et al.*, 2015).

3.26 Procedimento cirúrgico para indução da SIC

A atividade funcional da rhRSPO1 na adaptação intestinal foi avaliada no modelo de síndrome do intestino curto em *zebrafish*, desenvolvido pelo grupo do Dr. Grikscheit (SCHALL; HOLOYDA; GRANT; LEVIN *et al.*, 2015), em um experimento de resgate. Nesse modelo, peixes paulistinha (*zebrafish* - ZF) macho adultos, foram submetidos à ressecção cirúrgica da porção média do intestino (S2 e S3), conforme descrito em Schall *et al.*, 2015, a fim de induzir com precisão as respostas fisiológicas que ocorrem na SIC (do inglês, SBS – *short bowel syndrome*) em humanos. Para o procedimento cirúrgico, os ZF foram anestesiados em metanosulfato de triclaína a 0,02% (Sigma-Aldrich, Cat# E10521) e uma incisão ventral de 3mm foi realizada. O intestino distal foi ligado e um estoma proximal criado com ressecção dos segmentos intervenientes. A cirurgia simulada (grupo sham) consistiu em uma laparotomia ventral sem ressecção intestinal.

3.27 Protocolos de tratamento, pesagem e coleta de material

Após período de recuperação da cirurgia (SIC/SBS ou sham), os peixes foram anestesiados em metanosulfato de triclaína a 0,02% e injetados por via intraperitoneal (i.p.) com 0,8µg rhRSPO1 em 30µL de PBS estéril (grupo experimental) ou 30µL de PBS apenas (grupo controle) para o grupo controle, de acordo com os protocolos listados na Figura 9. No protocolo de uma semana, cada ZF recebeu injeções a partir do dia 4 do pós-operatório (D4), recebendo o tratamento a cada dois dias até a coleta no dia 7 do pós-operatório (D7), totalizando três injeções de RSPO1 ou veículo nesse período. No protocolo de duas semanas, cada ZF recebeu injeções a partir do dia 5 do pós-operatório (D5), recebendo o tratamento a cada dois dias até a coleta no dia 14 do pós-operatório (D14), em um total de oito injeções de RSPO1 ou veículo nesse período. Os ZF do grupo sham

foram utilizados como grupo de referência (*sham*) e submetido aos mesmos tratamentos que os peixes do grupo SBS (rhRSPO1 vs. PBS). Como forma de randomização, os animais foram selecionados aleatoriamente e alocados nos quatro grupos experimentais (n=12 por grupo): sham+PBS, sham+RSPO1, SBS+PBS, SBS+RSPO1.

Durante o experimento, os ZF foram inicialmente pesados após a cirurgia (D0) e, depois, nos dias 7 e 14 pós-operatório (D7 e D14, respectivamente), sendo a perda de peso utilizada como indicativo da gravidade da condição da SIC. Antes da pesagem em balança de precisão, os peixes ZF foram anestesiados em metanosulfato de tricaina a 0,02% e depois levemente secos em papel toalha. Todos os pesos foram relatados como porcentagem do peso inicial \pm o erro padrão da média. No dia da coleta, os ZF receberam injeções peritoneais de 2,5mg/mL de BrdU (B5002-1G, Sigma Life Sciences) (30 μ L em PBS) 4h antes da eutanásia. Para cada animal, a porção proximal (S1) e distal (S4) do intestino, bem como o fígado, foram coletados em formalina (23-305-510, Fisher HealthCare) para inclusão em parafina e posterior análise histológica e imunofluorescência, ou em *RNA later* (AM7021, Lifetech) para análise por qRT-PCR.

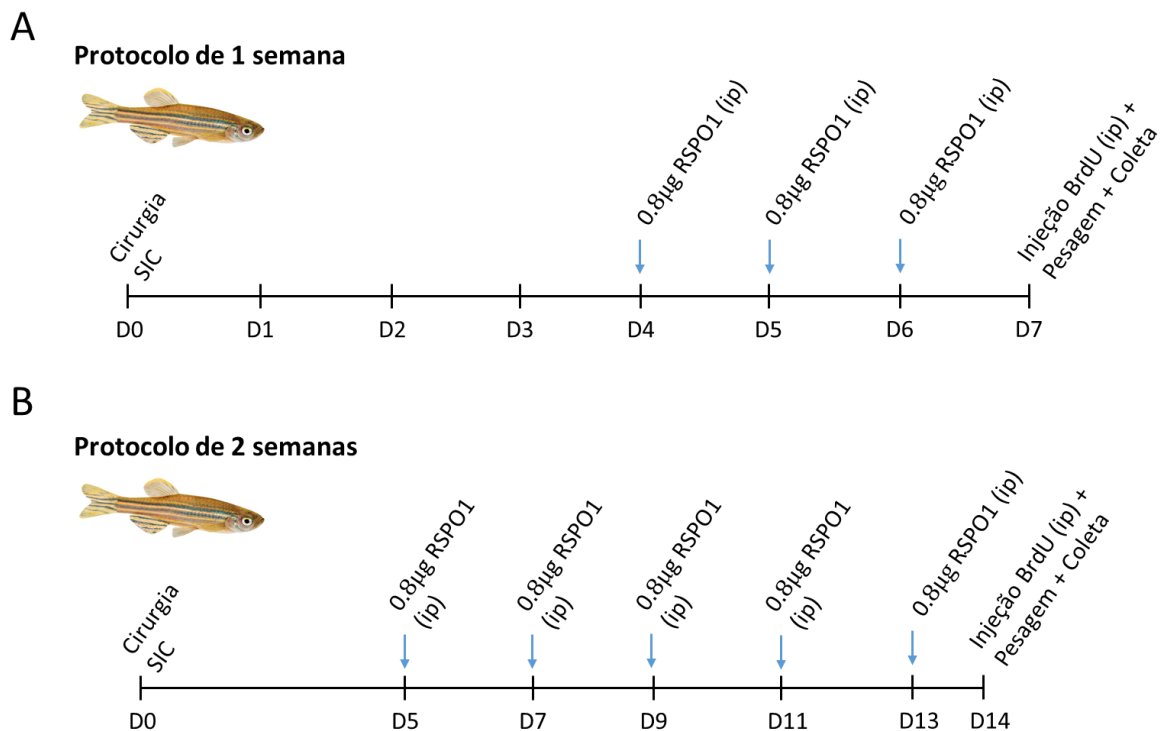


Figura 9 - Protocolos de tratamento dos zebrafish com rhRSPO1. ZF adultos foram submetidos à ressecção cirúrgica da porção média do intestino para induzir a SIC ou a

laparotomia sem ressecção intestinal (sham) no dia 0 (D0) e submetidos aos tratamentos. (A) - protocolo de uma semana de tratamento; (B) - Protocolo de duas semanas de tratamento. As setas azuis representam injeções intraperitoneais de rhRSPO1 ou PBS.

3.28 Quantificação dos parâmetros histológicos de adaptação intestinal

Os segmentos intestinais proximais fixados em formalina foram incluídos em parafina e seccionados em micrótomo com 5µm de espessura. As secções foram então desparafinizadas, reidratadas e depois coradas com hematoxilina (Sigma-Aldrich, Cat # MHS16-500ML) e eosina (Sigma-Aldrich, Cat # HT110332-1L). As lâminas foram registradas em microscópio de campo claro (Leica DM5500, Buffalo Grove, IL) e os parâmetros histológicos de adaptação intestinal foram medidos a partir de imagens representativas de uma única seção intestinal para cada ZF. A altura da vilosidade (VH, do inglês *villus height*) foi definida como a altura de uma única vilosidade, da base até a sua ponta. O perímetro epitelial da vilosidade (VEP, do inglês *villus epithelial perimeter*) foi definido como o contorno de uma única dobra da vilosidade e o perímetro epitelial intestinal (IEP, do inglês *intestinal epithelium perimeter*) foi definido como o contorno de toda a circunferência epitelial interna. Finalmente, a circunferência foi medida como o perímetro externo de toda a seção. Somente vilosidades completas foram incluídas na análise, sendo que o IEP/circunferência medidos apenas a partir de seções intestinais completas. Todas as medidas foram realizadas com o software ImageJ (NIH.gov) e relatadas em µm±SEM (erro padrão).

3.29 Marcações Immunofluorescentes

Para os experimentos de imunofluorescência, lâminas histológicas contendo seções de 5µm de segmentos intestinais foram desparafinizadas e reidratadas em série. A recuperação do antígeno foi realizada aquecendo-se as lâminas no microondas em 10mM de citrato de sódio (pH 6, Vector Cat# H-3300) por 12 minutos a meia potência (50%), com intervalos de 30 segundos a cada 4min. As lâminas foram resfriadas à temperatura ambiente e lavadas em solução salina tamponada com fosfato (PBS, Bioland Scientific, Cat# PBS01-02) com 0,1% de Tween (PBS-T, Amresco; cat# 9005-64-5), depois incubadas individualmente com os anticorpos primários anti-BrdU (1:100, BD Bioscience, B44), anti-CC3 (1:100, Cell Signaling Technology, cat# 9661) e anti-β-catenina (1:1000, Sigma, C2206) a 4°C *overnight*. As lâminas foram então lavadas com PBS-T e incubadas com anticorpo secundário

conjugado com indocarbocianina3 (Cy3, Jackson Immunoresearch, Cat# 712-165-150) por 1h à temperatura ambiente. Após mais uma lavagem com PBS-T, as lâminas foram contracoradas e montadas utilizando Vectashield com DAPI (Vector, cat# H-1200). As imagens foram adquiridas com o microscópio de fluorescência (Leica DM1600B, Buffalo Grove, IL) com magnificação de 20x.

Para as análises, as marcações imunofluorescentes foram quantificadas pela contagem do número de células epiteliais positivas por vilosidades intestinal, sendo representadas pelo valor da média \pm o erro padrão. Para avaliar a proliferação celular, foram consideradas as células BrdU+/vilosidades. Para avaliação da morte celular, considerou-se as células CC3+/vilosidade. Para avaliação da quantidade de β -catenina, foram consideradas as células β -catenina+/vilosidade.

3.30 qRT-PCR

O RNA total das amostras da porção proximal do intestino dos ZF submetidos ao protocolo de duas semanas de tratamento com rhRSPO1 ou PBS (controle), foi extraído com o RNeasy Micro Kit (74034, Qiagen). 500ng de RNA total foram utilizados para a síntese de cDNA com o *iScript™ Reverse Transcription Supermix* (1708841, Bio-Rad). Os níveis de expressão relativa de mRNA dos genes *ciclina D*, *β -catenina*, *c-myc* e *Yap1* dos ZF foram avaliados com o LightCycler® 480 SYBR Green I Master no sistema LightCycler® 480 (04707516001, Roche). Todas as etapas seguiram as instruções do fabricante. Um ciclo de dissociação foi executado após cada ciclo para verificar amplificações não específicas. Os níveis de expressão relativa de mRNA foram estimados pelo método delta delta Ct ($\Delta\Delta Ct$) (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001), utilizando *Gapdh* como o gene endógeno (*housekeeping*) para normalização. Todos os *primers* (Eurofins Genomics) utilizados estão listados na Tabela 5.

Tabela 5 - Lista de Primers – qRT-PCR - ZF.

<i>Primer</i>	<i>Sequência Forward</i>	<i>Sequência Reverse</i>
<i>Ciclina D</i>	GCCAAACTGCCTATACATCAG	TGTCGGTGCTTTTCAGGTAC
<i>β-catenina</i>	CACTGCTCCACTCACAGAGC	CTCCAGTCTCGTTCCAGGTC
<i>c-myc</i>	TAACAGCTCCAGCAGCAGTG	GCTTCAAACCTAGGGGACTG
<i>Yap1</i>	CATCATGAACCCAGCCTCA	CTCCTTCTGAGGTAATAGCTTGTTCC

<i>Gapdh</i>	GACGCTGGTGCTGGTATTGCT	CTACTCCTTGGAGGCCATGTGT
--------------	-----------------------	------------------------

3.31 Análise Estatística

A análise estatística dos experimentos envolvendo os ZF foi realizada usando o software GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software Inc, EUA) e diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$. A análise de variância ANOVA (teste post hoc de Bonferroni ou Tukey) foi utilizada para avaliar a perda de peso dos animais (*two-way*), as medidas dos parâmetros da superfície intestinal (*one-way*), proliferação celular por BrdU (*one-way*), morte celular por caspase 3 (*one-way*), quantidade de β -catenina e ensaios de qRT-PCR (*one-way*). Para todas as análises, os *outliers* foram removidos pelo método ROUT.

4. RESULTADOS

Capítulo I – Produção, purificação e caracterização da rhRSPO1

Os resultados apresentados neste primeiro capítulo da tese estão compilados e discutidos no manuscrito “*Production, purification and characterization of recombinant human R-spondin1 (RSPO1) protein stably expressed in human HEK293 cells*”, publicado na revista científica BMC Biotechnology (LEVIN; KOGA; BELCHIOR; CARREIRA *et al.*, 2020).

4.1 Geração da construção plasmideal pNU1/hRSPO1

A sequência codificadora otimizada do gene *RSPO1* foi transferida do vetor pUC57, na qual foi sintetizada, para o vetor de expressão pNU1 conforme demonstrado na Figura 10. A colônia bacteriana B6, de *E. coli*, positiva para a construção pNU1-RSPO1, foi identificada por reação de PCR de colônia (Figura 11) e, em seguida, utilizada para amplificação da construção plasmideal gerada para transfecção das células de mamífero. O resultado do sequenciamento permitiu constatar uma identidade de 100% no contig referente a CDS otimizada da *RSPO1*, quando alinhada à sequência sintetizada originalmente, confirmando sua integridade para transfecção. O resultado do alinhamento realizado com a ferramenta BLAST segue abaixo, com as informações referentes ao sequenciamento descritas no cabeçalho:

Contig1

Sequence ID: lcl| Query_13873 Length: 1318 Number of Matches: 1

Related Information
Range 1: 418 to 1232

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1506 bits(815)	0.0	815/815(100%)	0/815(0%)	Plus/Plus
Query 1	GAATTCGCCACCACTATGCGACTGGGGCTGTGTGTGGTGGCTCTGGTGCTGAGTTGGACC	60		
Sbjct 418	GAATTCGCCACCACTATGCGACTGGGGCTGTGTGTGGTGGCTCTGGTGCTGAGTTGGACC	477		

```

Query 61 CATCTGACAATCTCCTCTCGTGGTATCAAAGGTAAACGGCAGAGGCGGATCAGCGCCGAA 120
|
Sbjct 478 CATCTGACAATCTCCTCTCGTGGTATCAAAGGTAAACGGCAGAGGCGGATCAGCGCCGAA 537
Query 121 GGCTCTCAGGCTTGCGCAAAGGGATGCGAGCTGTGTTCCGAAGTGAATGGCTGCCTGAAG 180
|
Sbjct 538 GGCTCTCAGGCTTGCGCAAAGGGATGCGAGCTGTGTTCCGAAGTGAATGGCTGCCTGAAG 597
Query 181 TGTAGCCCAAAACTGTTTCATCCTGCTGGAGCGTAACGACATTCGCCAAGTGGGGGTCTGC 240
|
Sbjct 598 TGTAGCCCAAAACTGTTTCATCCTGCTGGAGCGTAACGACATTCGCCAAGTGGGGGTCTGC 657
Query 241 CTGCCTTCTTGTCCCCCTGGTTACTTTGACGCCCGGAATCCAGATATGAACAAGTGCATC 300
|
Sbjct 658 CTGCCTTCTTGTCCCCCTGGTTACTTTGACGCCCGGAATCCAGATATGAACAAGTGCATC 717
Query 301 AAGTGTAATAATTGAGCACTGCGAGGCCTGCTTCTCCATAATTTTTGCACCAAGTGTAAA 360
|
Sbjct 718 AAGTGTAATAATTGAGCACTGCGAGGCCTGCTTCTCCATAATTTTTGCACCAAGTGTAAA 777
Query 361 GAGGGCCTGTACCTGCACAAAGGAAGATGCTATCCTGCATGTCCAGAGGGGTCCAGCGCC 420
|
Sbjct 778 GAGGGCCTGTACCTGCACAAAGGAAGATGCTATCCTGCATGTCCAGAGGGGTCCAGCGCC 837
Query 421 GCTAACGGTACAATGGAATGCTCTAGTCCCGCTCAGTGTGAGATGTCAGAATGGTCCCC 480
|
Sbjct 838 GCTAACGGTACAATGGAATGCTCTAGTCCCGCTCAGTGTGAGATGTCAGAATGGTCCCC 897
Query 481 TGGGGCCCTTGCTCTAAGAAACAGCAGCTGTGTGGGTTTCAGACGCGGTAGTGAGGAACGC 540
|
Sbjct 898 TGGGGCCCTTGCTCTAAGAAACAGCAGCTGTGTGGGTTTCAGACGCGGTAGTGAGGAACGC 957
Query 541 ACACGACGTGTGCTGCACGCTCCTGTGCGGACCATGCAGCCTGTTCCGATACCAAGGAG 600
|
Sbjct 958 ACACGACGTGTGCTGCACGCTCCTGTGCGGACCATGCAGCCTGTTCCGATACCAAGGAG 1017
Query 601 ACAAGGCGGTGCACGTGTGAGACGCGTCCCATGTCCCGAAGGCCAGAAGCGACGTAAAGGC 660
|
Sbjct 1018 ACAAGGCGGTGCACGTGTGAGACGCGTCCCATGTCCCGAAGGCCAGAAGCGACGTAAAGGC 1077
Query 661 GGACAGGGAAGGCGGGAGAACGCTAATCGAAACCTGGCAAGGAAGGAGAGTAAAGAAGCC 720
|
Sbjct 1078 GGACAGGGAAGGCGGGAGAACGCTAATCGAAACCTGGCAAGGAAGGAGAGTAAAGAAGCC 1137
Query 721 GGGGCTGGTTCAAGACGCCGAAAGGGACAGCAACAACAGCAGCAGCAGGGCACTGTGGGA 780
|
Sbjct 1138 GGGGCTGGTTCAAGACGCCGAAAGGGACAGCAACAACAGCAGCAGCAGGGCACTGTGGGA 1197
Query 781 CCACTGACCAGCGCAGGACCCGCTAGGCGGCCGC 815
|
Sbjct 1198 CCACTGACCAGCGCAGGACCCGCTAGGCGGCCGC 1232

```

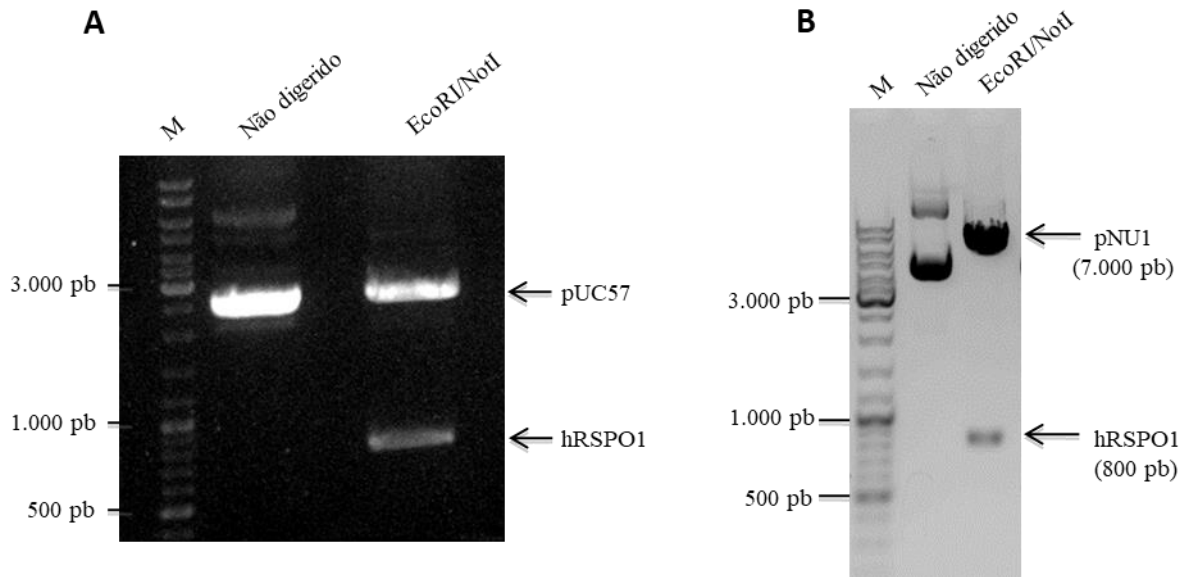



Figura 10 - Fracionamento em gel de agarose da construção pUC57/hRSPO1 e pNU1/hRSPO1 após restrição enzimática. Para o isolamento da banda correspondente à sequência codificadora da hRSPO1 para troca de vetor, a amostra de pUC57/hRSPO1 foi submetida à dupla digestão com as enzimas *EcoRI* e *NotI* e fracionada em gel de agarose 0,8% (A). Para confirmar a troca de vetor, a amostra da construção pNU1/hRSPO1 foi submetido à dupla digestão com as mesmas enzimas e fracionado em gel de agarose 1% (B) corado com brometo de etídeo. A construção não digerida também foi aplicado ao gel, como controle. M: Marcador de peso molecular (GeneRuler™ DNA Ladder Mix, Thermo Fisher Scientific Inc.). Massa de DNA por amostra: 2µg (A) ou 1µg (B). Figura adaptada de Levin *et al.*, 2020 (LEVIN; KOGA; BELCHIOR; CARREIRA *et al.*, 2020).

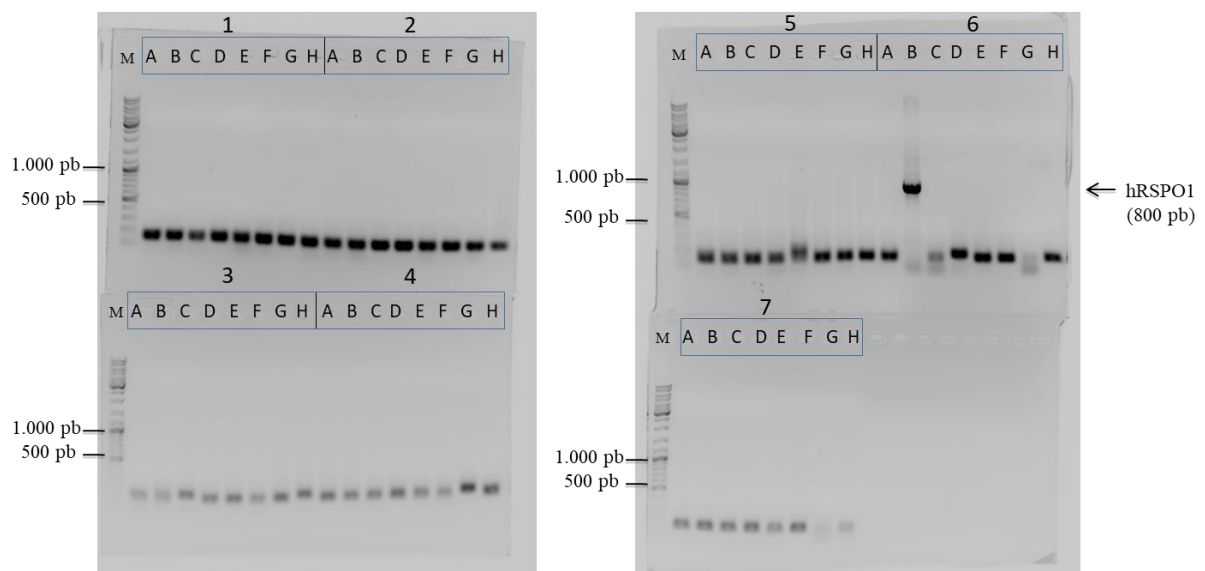


Figura 11 - PCR de colônias para identificação de clones bacterianos positivos para a sequência codificadora otimizada do gene *hRSPO1*. Colônias transformantes, resistentes à ampicilina, foram selecionadas através da análise das reações de PCR com *primers* específicos para as regiões do vetor pNU1 flanqueadoras da CDS otimizada da *hRSPO1*, sendo a colônia B6 identificada como positiva para a reação.

4.2 Seleção das células CHO-DG44 pNU1/hRSPO1 positivas e amplificação gênica

Após transfecção das células CHO-DG44 com a construção pNU1/RSPO1, estas foram cultivadas em meio livre de nucleosídeos para seleção de células *dhfr* positivas, e mantidas em cultivo até o estabelecimento de uma cultura estável e com alta viabilidade celular. O processo de amplificação gênica do *locus* da enzima *dhfr* com MTX foi conduzido a fim de se aumentar os níveis de expressão de rhRSPO1 pelas células. O acompanhamento completo do processo de seleção e amplificação gênica das células CHO-DG44 está apresentado na Figura 12A. Através dos resultados dos imunoenaios de *Dot Blot*, foi possível constatar o aumento nos níveis de expressão da proteína rhRSPO1 ao longo do processo de amplificação gênica, conforme esperado, indicando um pico de expressão na população mista estabelecida na presença de 250nM de MTX e um decaimento nas populações mantidas em doses maiores de MTX (Fig. 12B). A população mista de células CHO-DG44 pNU1/hRSPO1 com 250nM de MTX foi selecionada para o isolamento de clones celulares. Os melhores resultados com relação ao incremento da expressão de rhRSPO1 foram alcançados no processo de elevação gradual da dose de MTX. Os resultados obtidos durante a elevação abrupta da dose de MTX não estão apresentados neste trabalho.

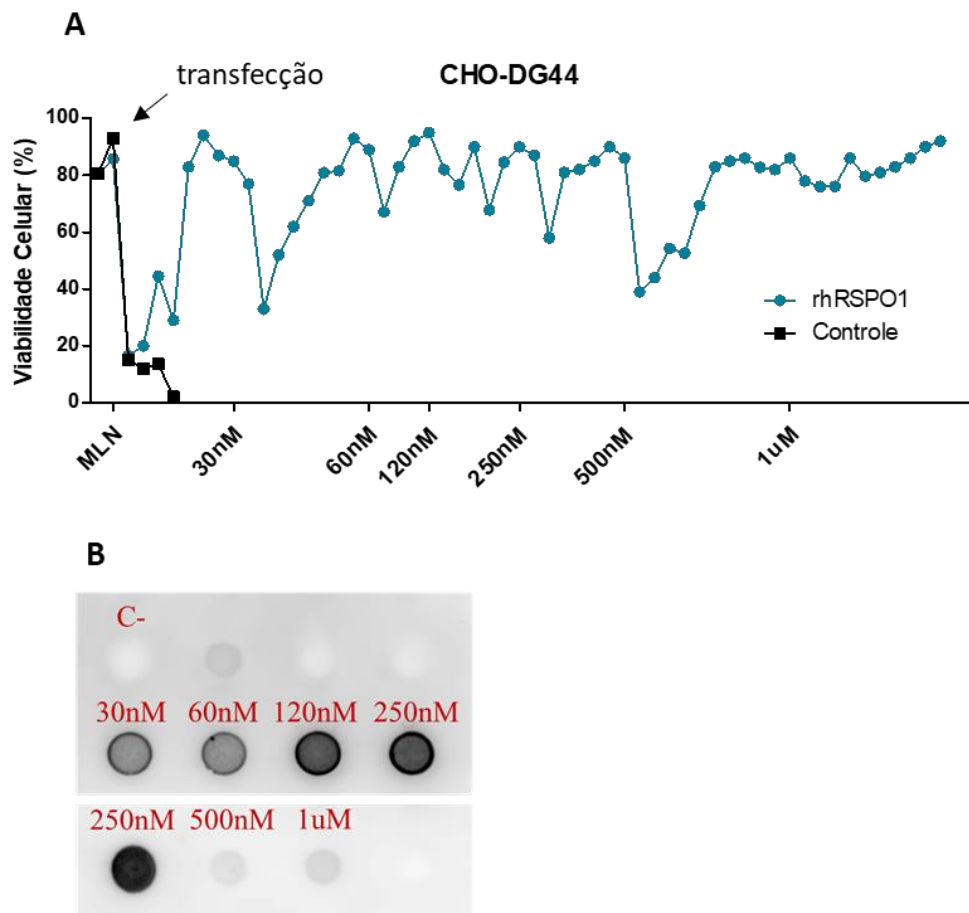


Figura 12 - Viabilidade e produtividade das células CHO-DG44 durante o processo de amplificação gênica na presença de metotrexato para seleção de células superprodutoras de rhRSPO1. (A) Seleção de células CHO-DG44 *dhfr*-positivas em meio livre de nucleosídeos (MLN) e expostas a concentrações crescentes de MTX de maneira gradual (30, 60, 120, 250, 500nM e 1uM). (B) Imunoensaio de *Dot Blot* avaliando o incremento da expressão de rhRSPO1 ao longo do processo de amplificação gênica. Meio de cultura condicionado durante 72h por células CHO-DG44 transfectadas com o vetor de expressão contendo uma sequência de cDNA não correlata foi utilizado como controle negativo (C-).

4.3 Screening de clones celulares superprodutores de rhRSPO1

4.3.1 HEK293

A fim de se obter um clone celular superprodutor de rhRSPO1, com altos níveis de expressão, foram isolados 37 clones de células HEK293 transfectantes, dos quais 10 foram selecionados de acordo com sua capacidade de crescimento em cultura. Os clones selecionados foram plaqueados na presença e na ausência de soro fetal bovino (SFB), e tiveram os meios condicionados coletados para análise após 72h de condicionamento. Os meios condicionados foram utilizados no

imunoensaio de *Dot Blot* para comparação dos níveis de produção de rhRSPO1 de cada clone, nas mesmas condições de cultivo e condicionamento, com o intuito de selecionar os clones mais produtivos para quantificação da expressão proteica. O resultado do *Dot Blot* para *screening* de clones, apresentado na Figura 13, demonstrou que vários clones celulares apresentaram uma alta produção de rhRSPO1, em condições de cultivo tanto na presença como na ausência de SFB.

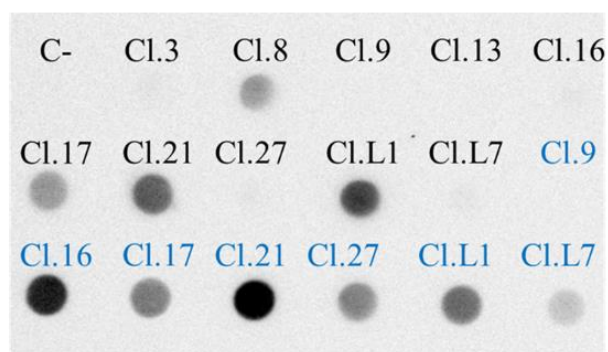


Figura 13 - Seleção de clones celulares HEK293 superprodutores de rhRSPO1. Para analisar os níveis de expressão da proteína rhRSPO1 em diferentes clones celulares derivados de células HEK293 foi utilizado o ensaio de *Dot Blot* com anticorpo monoclonal específico anti-hRSPO1. Os meios utilizados foram condicionados pelos diferentes clones (10^6 células) por um período de 48h de condicionamento, em placas de 60mm, na presença de 10% de SFB (preto) ou na ausência de SFB (azul). Meio condicionado por células HEK293 transfectadas com o vetor pNU1 vazio foi utilizado como controle negativo (C-).

Após o *screening* por *Dot Blot* dos clones HEK293 transfectantes produtores de rhRSPO1, os clones intitulados Cl.21 e Cl.L1 foram selecionados para dar andamento à quantificação da produção de rhRSPO1 por ELISA e aos testes de atividade biológica *in vitro*. Os meios condicionados dos clones selecionados, mantidos na presença e na ausência de SFB, foram diluídos e dosados para a rhRSPO1 utilizando-se o Human R-Spondin 1 DuoSet ELISA kit (R&D). Os resultados indicaram uma alta produção de rhRSPO1 nas duas condições, sendo ligeiramente maior quando as células foram cultivadas em meio contendo SFB. O clone celular HEK293 Cl.21 atingiu uma produção volumétrica de $1,25\mu\text{g/mL}$ de rhRSPO1 quando cultivado na presença de SFB e $0,93\mu\text{g/mL}$ na ausência de soro, enquanto o clone Cl.L1 chegou a $1,94\mu\text{g/mL}$ e $1,21\mu\text{g/mL}$, na presença ou na ausência de SFB, respectivamente.

4.3.2 CHO-DG44

Após a tentativa de isolamento de clones por diluição limitante não ter alcançado sucesso, concluiu-se que as células CHO-DG44 isoladas não eram capazes de proliferar e gerar uma cultura clonal viável nas condições utilizadas no experimento. Embora a estratégia de utilizar *cell sorting* tenha permitido um aumento do número amostral, as células CHO-DG44 isoladas ainda se mostraram incapazes de gerar uma cultura clonal viável, mesmo quando semeadas juntamente com células CHO-DG44 parentais (dhfr^{-/-}). Apesar de promissora, esta última abordagem também se mostrou ineficiente, sendo verificada a morte total das células CHO-DG44 nos poços, quando cultivadas em meio livre de nucleosídeos. Apesar do insucesso na geração de linhagens clonais derivadas de uma única célula CHO-DG44 superprodutora de rhRSPO1, constatou-se que a condição de cultivo mais promissora, na qual as células individualizadas foram capazes de completar os primeiros ciclos de proliferação em cultura, foi aquela em que se utilizou o meio de isolamento CD FortiCHO™ completo (6mM de L- Glutamina e 1X HT) acrescido de 20% de meio condicionado pela população mista produtora de rhRSPO1.

Mesmo com as inúmeras estratégias para isolamento de clones CHO-DG44 pNU1-RSPO1, somente a quarta estratégia metodológica, na qual as células CHO-DG44 pNU1-RSPO1, provenientes da condição com 250nM de MTX, foram selecionadas manualmente (*hand picking*) e semeadas em placa de 384 poços, foi capaz de gerar clones celulares viáveis. Nesta condição, três clones viáveis de células CHO-DG44 produtoras de rhRSPO1, nomeados P3B16, P4B22, P3D7, foram isolados e tiveram a sua produção analisada por *Western Blot* (Figura 14). Entretanto, a proteína rhRSPO1 não foi detectada em nenhum dos clones isolados.



Figura 14 - Western Blot dos clones celulares e da população mista de células CHO-DG44 produtoras de rhRSPO1. 40 μ L das amostras de meio condicionado foram aplicados ao gel SDS-PAGE. M: Marcador de peso molecular. YFP: Controle negativo com a proteína *Yellow Fluorescent Protein* (YFP) produzida por células CHO-DG44. 250nM MTX: população mista de células CHO-DG44 produtoras de rhRSPO1 na condição com 250nM MTX. P3B16, P4B22, P3D7: clones celulares isolados de células CHO-DG44 produtoras de rhRSPO1 na condição com 250nM MTX. Cl.21: Clone 21 da célula HEK293 produtora de rhRSPO1. As amostras indicadas em vermelho e preto na figura correspondem àquelas produzidas em células CHO-DG44 e HEK293, respectivamente.

4.4 Purificação da rhRSPO1 proveniente do meio condicionado

O processo de purificação da proteína rhRSPO1 produzida nas duas linhagens de células de mamífero consistiu de duas etapas cromatográficas sequenciais, a saber: 1- cromatografia de afinidade à heparina (Figura 15) e 2- cromatografia de exclusão molecular (Figura 16). No cromatograma da primeira etapa de purificação da rhRSPO1, com coluna de heparina (Fig. 15A), é possível observar a presença de três picos de absorvância no comprimento de onda de 280nm da luz UV, um em cada patamar de NaCl, indicando a liberação de proteínas com diferentes graus de afinidade à coluna. O ensaio de *Western Blot* (Fig. 15B) das frações da purificação, utilizando anticorpo monoclonal específico anti-RSPO1, revelou que a rhRSPO1 foi preferencialmente liberada no segundo *step* de concentração de NaCl (713mM), correspondendo ao pico de absorvância observado nesta etapa. Na segunda fase do protocolo de purificação, com a coluna de exclusão molecular, foi possível observar que a rhRSPO1 foi liberada majoritariamente nas frações A10+A11 do eluato da purificação, como pode ser visto na Fig. 16B.

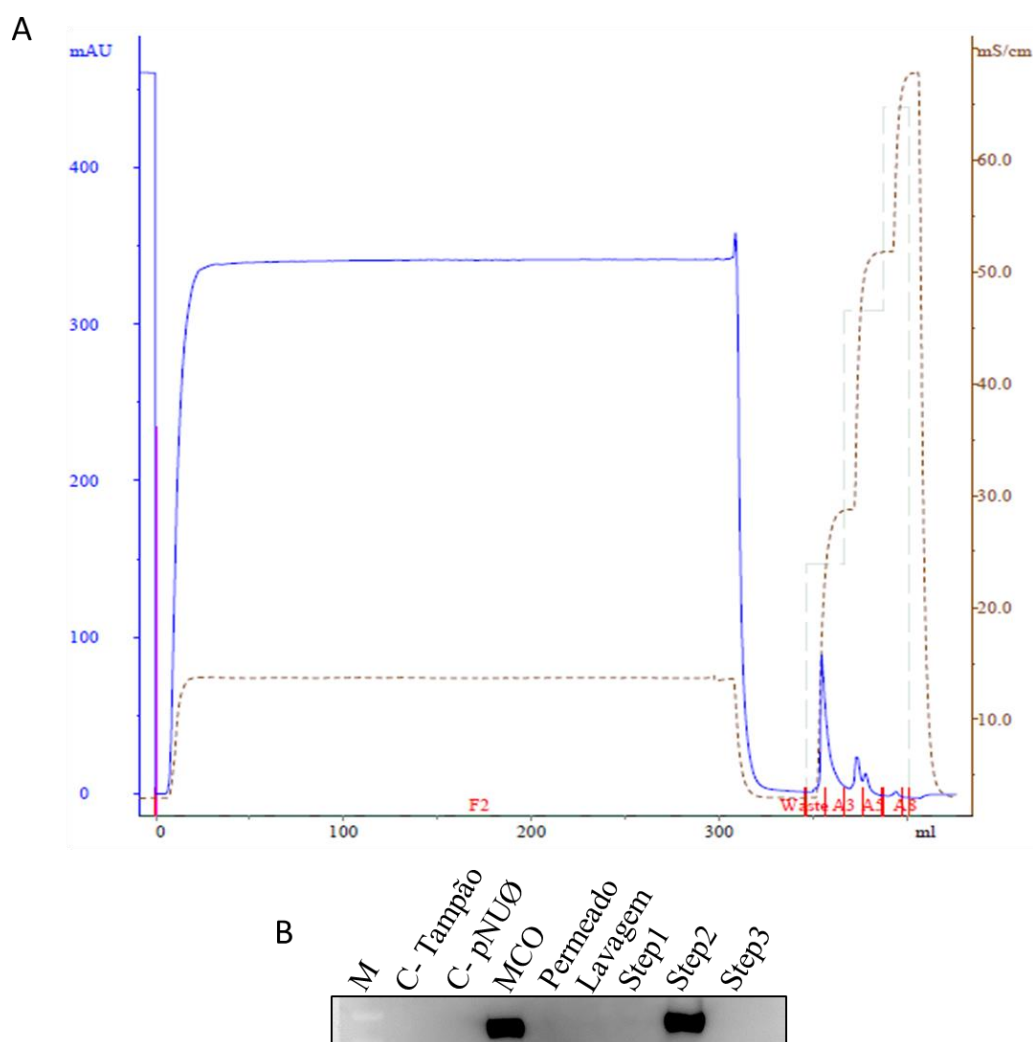


Figura 15 - Primeira etapa de purificação da rhRSPO1 por cromatografia de afinidade à heparina. Meio condicionado pelo clone celular Cl.L1 derivado das células HEK293, o qual é superprodutor de rhRSPO1, tendo sido utilizado para a purificação da proteína. **(A)** Cromatograma representando o processo de purificação da rhRSPO1 com coluna de heparina, em gradiente segmentado de três segmentos (*steps*) de NaCl. A linha azul representa a absorbância no comprimento de onda de 280nm da luz UV e a linha pontilhada marrom representa a condutância da amostra. **(B)** *Western Blot* das frações da purificação, detectando a liberação da proteína alvo. Foram utilizadas amostras do permeado, da lavagem e do eluato: Step1 (A1+A2); Step2 (A4+A5); Step3 (A7). O tampão de equilíbrio da purificação (C- Tampão) e meio condicionado por células HEK293 transfectadas com o vetor pNU1 vazio (C- pNUØ) foram utilizados como controles negativos. Meio Condicionado Original (MCO) do clone Cl.L1, contendo rhRSPO1, foi utilizado como controle positivo de referência. Figura adaptada de Levin *et al.*, 2020 (LEVIN; KOGA; BELCHIOR; CARREIRA *et al.*, 2020).

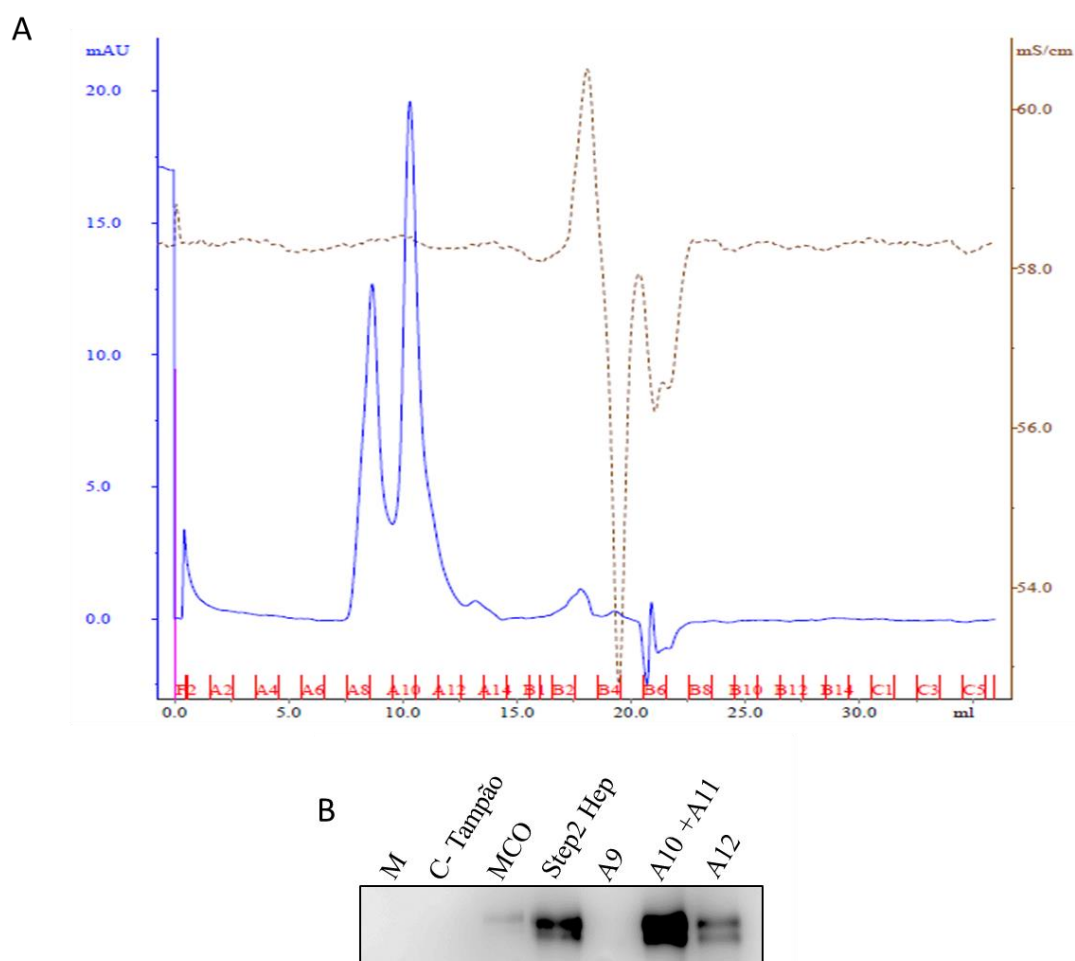


Figura 16 - Segunda etapa de purificação da rhRSP01 por cromatografia de exclusão molecular. Neste processo de purificação, foi utilizada a amostra contendo rhRSP01 proveniente do Step2 da purificação com coluna de heparina. A linha azul representa a absorbância no comprimento de onda de 280nm da luz UV e a linha pontilhada marrom representa a condutância da amostra. **(A)** Cromatograma representando o processo de purificação da rhRSP01 utilizando-se coluna de exclusão molecular. **(B)** *Western Blot* das frações da purificação, detectando-se a liberação da proteína alvo no eluato. Tampão Tris-HCl foi utilizado como controle negativo (C- Tampão) e o meio condicionado original (MCO) e Step2 da purificação com coluna de heparina (Step2 Hep) foram utilizados como referências. Figura adaptada de Levin *et al.*, 2020 (LEVIN; KOGA; BELCHIOR; CARREIRA *et al.*, 2020).

O grau de pureza da rhRSP01 ao longo das etapas de purificação pode ser observado na Figura 17 e na Tabela 6. A partir dos resultados apresentados foi possível observar uma redução na presença de proteínas contaminantes, de diferentes pesos moleculares, à medida que as etapas de purificação foram implementadas. A amostra proveniente das frações A10+A11 do processo de exclusão molecular, realizado sequencialmente à cromatografia de afinidade à heparina, apresentou um alto grau de pureza (90%), sendo maior que a amostra

mais rica purificada com apenas uma etapa cromatográfica (63%), e quase 30 vezes maior quando comparada ao meio condicionado original (3,2%). O processo utilizado apresentou, ainda, uma alta eficiência de purificação quanto ao rendimento após a cromatografia de afinidade à heparina, com nenhuma perda no total de rhRSPO1. No entanto, apesar do aumento do nível de pureza, a adição da etapa de gel filtração aumentou a perda de rhRSPO1 ao longo do processo, resultando em uma taxa de recuperação de 50% (Tabela 6).

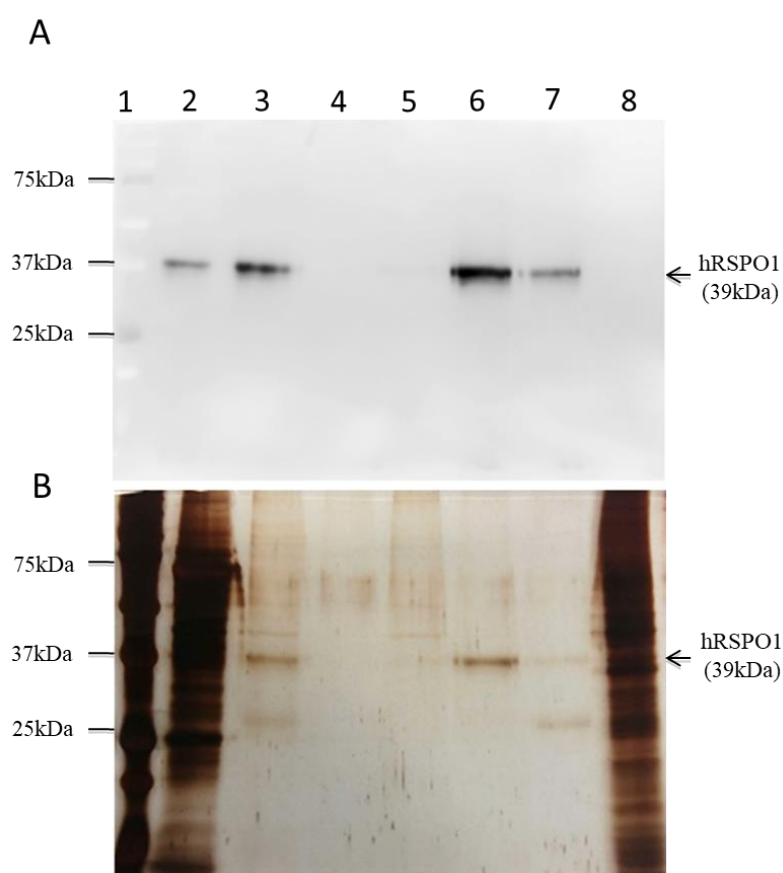


Figura 17 - Purificação da rhRSPO1. Análise da rhRSPO1 purificada por (A) Western Blot utilizando anticorpo monoclonal anti-RSPO1 e (B) SDS-PAGE corado com prata. Amostras: 1- Marcador de peso molecular; 2- Meio condicionado original do clone Cl.L1; 3- Step2 (após coluna de afinidade à heparina); 4- Fração A8 da coluna de exclusão molecular; 5- Fração A9 da coluna de exclusão molecular; 6- Fração A10 da coluna de exclusão molecular; 7- Fração A11 da coluna de exclusão molecular; 8- meio condicionado por células HEK293 transfectadas com o vetor pNU1 vazio (controle negativo). Figura adaptada de Levin *et al.*, 2020 (LEVIN; KOGA; BELCHIOR; CARREIRA *et al.*, 2020).

Tabela 6 - Grau de pureza e rendimento do processo de purificação da rhRSPO1. A eficiência do processo de purificação foi calculada dividindo-se a massa de rhRSPO1 em

cada fração pela massa de rhRSPO1 inicial utilizada no processo. A pureza da rhRSPO1 em cada etapa do processo de purificação foi avaliada por SDS-PAGE corado com prata e subsequente análise densitométrica utilizando o software ImageJ. Os resultados são apresentados em porcentagens. Meio condicionado original (Cl.L1); Cromatografia de Afinidade com Heparina (Step 2); Cromatografia de Exclusão Molecular (Fracções A10+A11).

Amostras	Eficiência (%)	Pureza (%)
Meio Condicionado Original	-	3,2
Coluna de Afinidade à Heparina	100	63
Coluna de Exclusão Molecular	52	90

4.5 Cinética de produção e estabilidade da rhRSPO1

Os resultados obtidos no ensaio de cinética de produção da proteína rhRSPO1 pelas células CHO-DG44 e HEK293 apontaram um incremento de produção da proteína no meio condicionado com o aumento do tempo de condicionamento, com um pico em 72h (Figura 18A). Análises da estabilidade da proteína rhRSPO1 indicaram uma perda na quantidade de proteína após repetidos ciclos de congelamento e descongelamento (Fig. 18B) e aumento no tempo de armazenamento, sendo esta sutil nas amostras congeladas e bem acentuada quando as amostras foram armazenadas a 4°C (Fig. 18C). Portanto, fica evidente a baixa estabilidade da proteína rhRSPO1 durante o armazenamento e a necessidade de se utilizar a proteína fresca ou após curto período de tempo de congelamento nos ensaios.

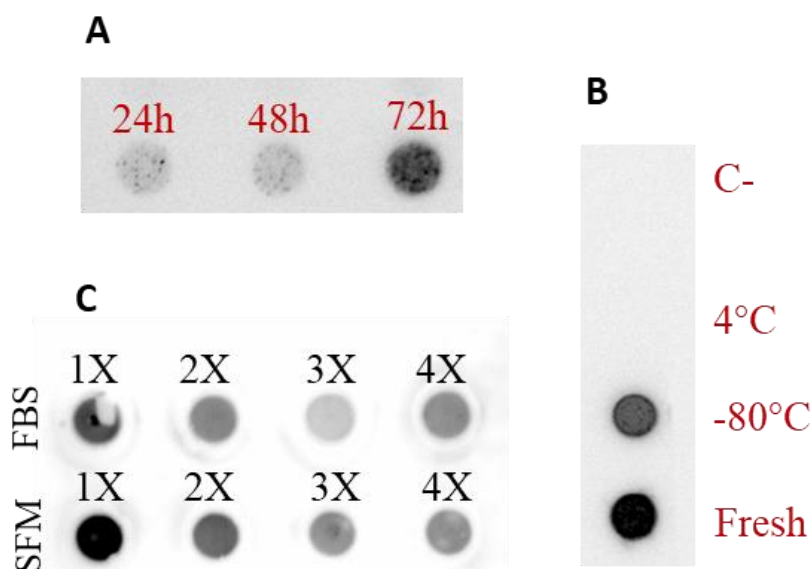


Figura 18 - Cinética de produção e estabilidade da rhRSPO1 (resultado preliminar). Para avaliar a cinética de produção e a estabilidade da rhRSPO1, meios condicionados por células CHO-DG44 produtoras de rhRSPO1 foram coletados após diferentes períodos de tempo de condicionamento e submetidos a diferentes períodos e condições de armazenamento. **(A)** *Dot Blot* para avaliação da cinética de produção da rhRSPO, as amostras utilizadas tiveram um tempo de condicionamento de 24h, 48h ou 72h. **(B)** *Dot Blot* para avaliação da estabilidade da rhRSPO1 armazenada sob diferentes condições, as amostras utilizadas no ensaio foram mantidas por três meses a 4°C ou a -80°C. **(C)** *Dot Blot* para avaliação da estabilidade da rhRSPO1 frente a ciclos de congelamento e descongelamento. Para a análise, os meios condicionados por célula HEK293 produtoras de rhRSPO1 na presença (FBS) ou na ausência (SFM) de soro fetal bovino foram submetidos a ciclos consecutivos de congelamento e descongelamento (1, 2, 3 ou 4 vezes).

4.6 Atividade biológica da rhRSPO1 *in vitro*

Para avaliar a atividade biológica da proteína rhRSPO1 *in vitro*, foi realizado um ensaio de indução de osteogênese, utilizando-se células C2C12, no qual a indução da atividade de fosfatase alcalina (ALP) foi quantificada. O ensaio *in vitro* demonstrou que a proteína rhRSPO1 produzida pelas células HEK293 possui atividade biológica neste modelo (Figura 19 e 20). Com base na curva dose-resposta de rhRSPO1 (Fig. 19) a concentração de 200ng/mL de rhRSPO1 foi selecionada como sendo a dose ótima para indução da diferenciação osteogênica de células C2C12 nos ensaios definitivos para quantificação da atividade biológica *in vitro* (Fig. 20).

As células C2C12 induzidas através de duas doses de rhRSPO1 provenientes dos clones selecionados (Cl.21 e Cl.L1) produziram por volta de 8UI/mL de ALP no meio de cultura, valor significativamente maior que o controle, indicando uma

mesma atividade específica da proteína, independentemente do clone celular produtor (Fig. 20A). Em concordância com a literatura, as células tratadas com a proteína rhRSPO1 em conjunto com Wnt-3a apresentaram um efeito significativamente maior do que quando estas proteínas foram utilizadas individualmente (Fig. 20B). Ademais, o resultado mostra que a proteína rhRSPO1 purificada, produzida pelo clone Cl.L1, manteve sua atividade biológica *in vitro* e apresentou uma intensidade de indução da diferenciação osteogênica em células C2C12 semelhante àquela produzida pela proteína comercialmente disponível, independentemente do seu nível de pureza (Fig. 20B).

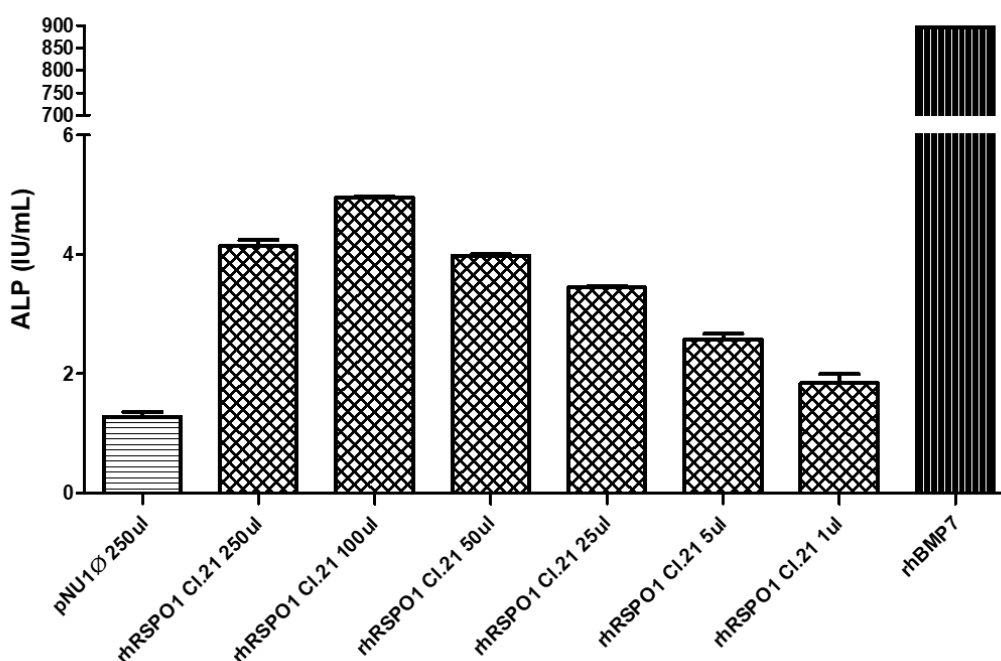


Figura 19 - Curva Dose-Resposta para padronização da dosagem de rhRSPO1 em ensaio de atividade biológica *in vitro* utilizando-se células C2C12. Ensaio colorimétrico de fosfatase alcalina (ALP) a partir do lisado de células C2C12 induzidas à diferenciação osteogênica através do tratamento com diferentes quantidades de meio condicionado pelo clone HEK293 Cl.21 contendo rhRSPO1 (250, 100, 50, 25, 5, 1uL). Com base em quantificação por ELISA, as concentrações aproximadas de rhRSPO1 utilizadas correspondem a aproximadamente: 500ng/mL (250uL), 200ng/mL (100uL), 100ng/mL (50uL), 50ng/mL (25uL), 10ng/mL (5uL) e 2ng/mL (1uL). Meio condicionado por células HEK293 contendo o vetor pNU1 vazio (pNU1Ø) e meio condicionado por células 293T expressando BMP7 humana recombinante (rhBMP) foram utilizados como controles negativo e positivo, respectivamente.

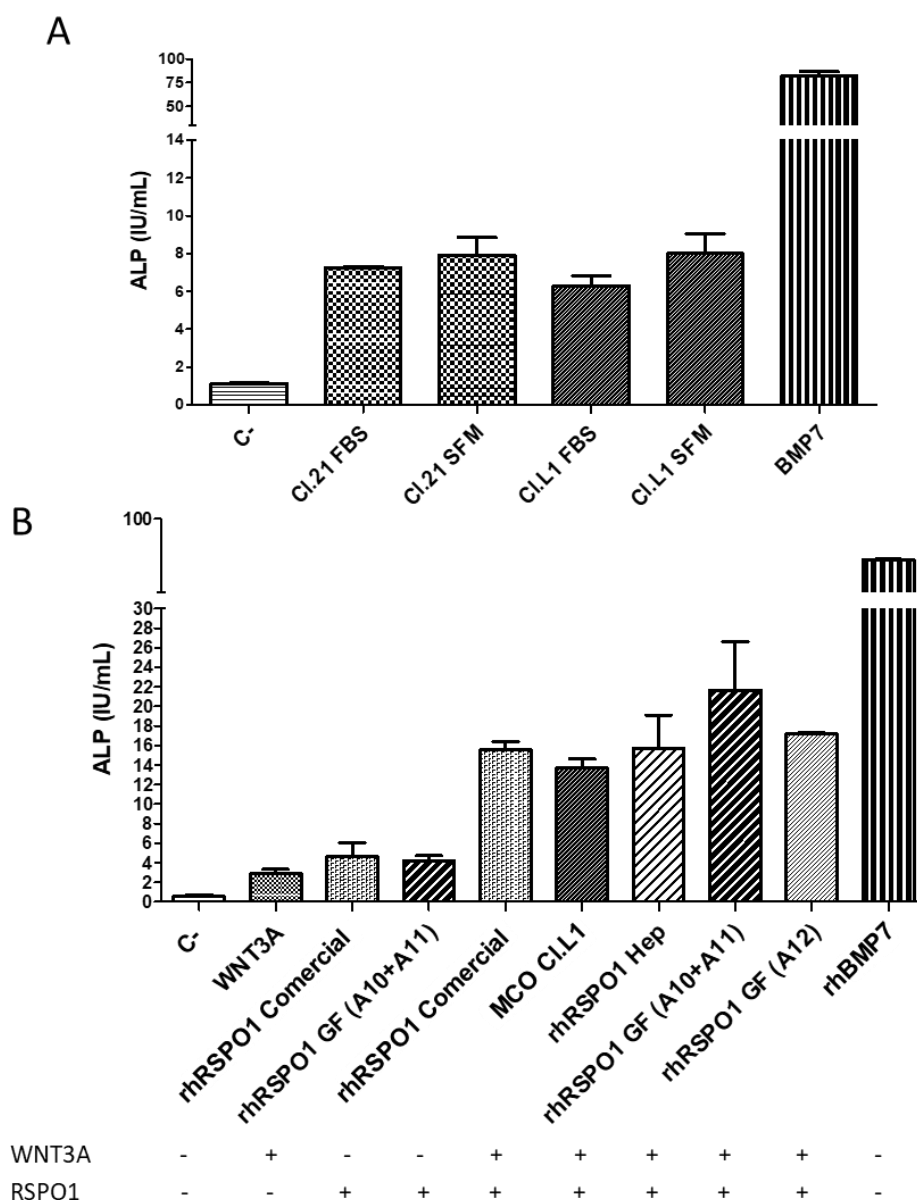


Figura 20 - Atividade biológica da rhRSPO1 *in vitro*. Ensaio colorimétrico de fosfatase alcalina (ALP) a partir do lisado de células C2C12 induzidas à diferenciação osteogênica através do tratamento com a proteína rhRSPO1. **(A)** Comparação da atividade biológica específica da rhRSPO1 produzida pelos clones Cl.21 e Cl.L1 - 200ng/mL de rhRSPO1 provenientes do meio condicionado produzido por cada um destes clones na presença de 10% de soro fetal bovino (FBS) ou na ausência deste (SFM), foram utilizados na indução. **(B)** Atividade biológica da rhRSPO1 purificada - 100ng/mL de rhRSPO1, proveniente do meio condicionado original (MCO) ou das várias etapas de purificação, e/ou 100ng/mL de WNT3A foram utilizados para indução osteogênica. MCO: Meio condicionado original do Cl.L1; Hep: rhRSPO1 proveniente do Step2 da purificação com coluna de heparina após troca de tampão; GF: rhRSPO1 proveniente da segunda etapa cromatográfica utilizando-se Gel Filtração (frações A10+A11 e A12). Meio DMEM contendo 5% de FBS (C-) e o meio condicionado por células 293T expressando BMP7 recombinante humano (rhBMP) foram utilizados como controle negativo e positivo, respectivamente. A proteína rhRSPO1 disponível comercialmente (R&D Systems - Cod 4645-RS/CF) foi utilizada como amostra de referência para comparação (rhRSPO1 Comercial). O símbolo (+) indica a presença da

proteína recombinante listada, enquanto os traços (-) indicam sua ausência. O teste estatístico ANOVA (teste *post hoc* de Tukey) foi utilizado para comparação e as diferenças estatísticas foram consideradas significativas quando $p < 0,05$. Figura adaptada de Levin *et al.*, 2020 (LEVIN; KOGA; BELCHIOR; CARREIRA *et al.*, 2020).

4.7 Atividade biológica da rhRSPO1 *in vivo*

Para avaliar a atividade biológica da rhRSPO1 *in vivo*, administrou-se a proteína em solução salina por via intravenosa em camundongos BALB/c, conforme descrito na seção Material e Métodos. Após tratamento por três dias consecutivos, a análise histológica mostrou uma diferença significativa entre os grupos rhRSPO1 ($498,4 \pm 19,76 \mu\text{m}$) e Controle ($381,7 \pm 31,65 \mu\text{m}$), com relação ao comprimento médio da cripta-vilosidade na região medial do jejuno (Figura 21), sugerindo que o tratamento com rhRSPO1 induziu o crescimento do epitélio intestinal neste modelo animal. Além disso, a análise macroscópica do diâmetro da porção medial do jejuno dos camundongos tratados com rhRSPO1 apresentou uma tendência de aumento quando comparada aos animais que receberam apenas solução salina. No entanto, esta diferença macroscópica não foi estatisticamente significativa, possivelmente por consequência de uma limitação técnica na forma de medição empregada utilizando paquímetro (dados não mostrados). Todos os animais listados na metodologia foram incluídos na análise dos resultados.

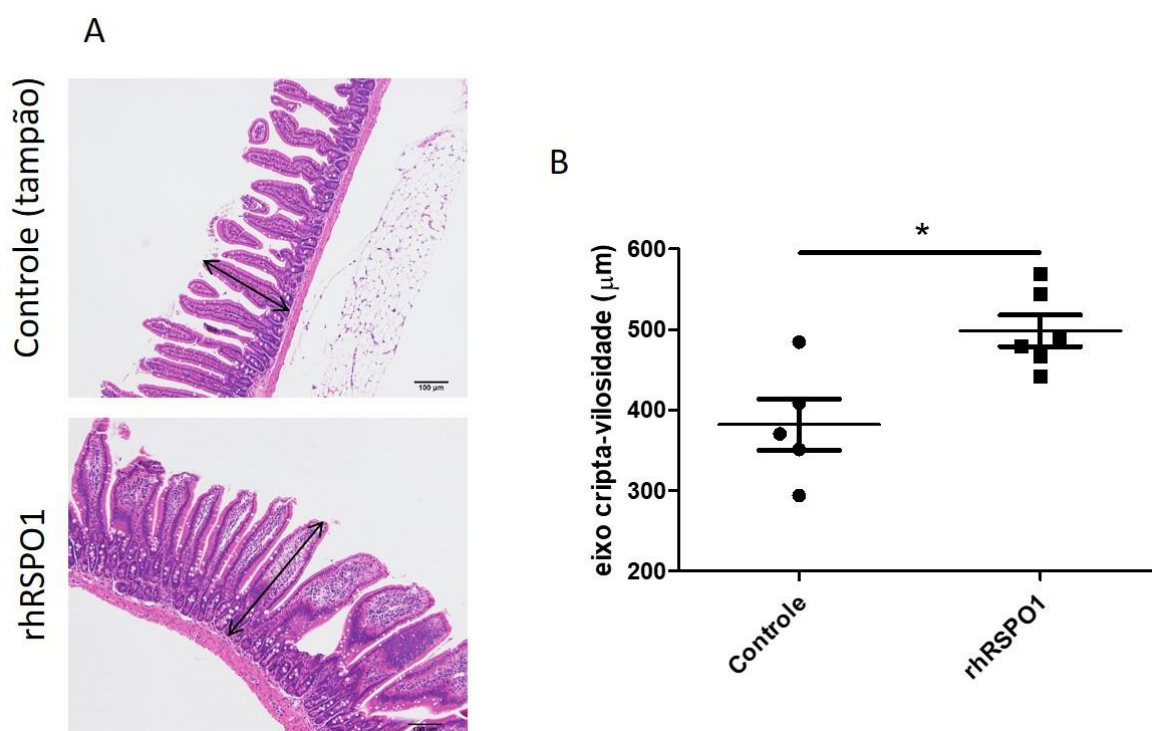


Figura 21 - Bioatividade da rhRSPO1 *in vivo*. Camundongos BALB/c foram injetados por via intravenosa (i.v.) com 50 µg de rhRSPO1 (N=6) ou PBSA (N=5), como controle negativo, durante três dias consecutivos. A porção medial do jejuno foi coletada para análise histológica para avaliar o efeito indutor da rhRSPO1 sobre o crescimento deste tecido. **(A)** Análise histológica (H&E). **(B)** Comprimento do eixo cripta-vilosidade. As setas indicam o eixo cripta-vilosidade e a barra de escala corresponde a 100µm. A análise estatística foi realizada com o teste t não paramétrico de Mann-Whitney e as diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$ (*). Figura adaptada de Levin *et al.*, 2020 (LEVIN; KOGA; BELCHIOR; CARREIRA *et al.*, 2020).

4.8 Caracterização Estrutural da rhRSPO1

4.8.1 Ensaio de desglicosilação com PNGase F

Conforme pode ser observado na Figura 22, a digestão da proteína rhRSPO1 com N-glicosidase F (PNGase F) resultou em um aumento da migração eletroforética desta proteína em condições desnaturantes, indicando que a rhRSPO1 produzida neste trabalho apresenta N-glicosilação.

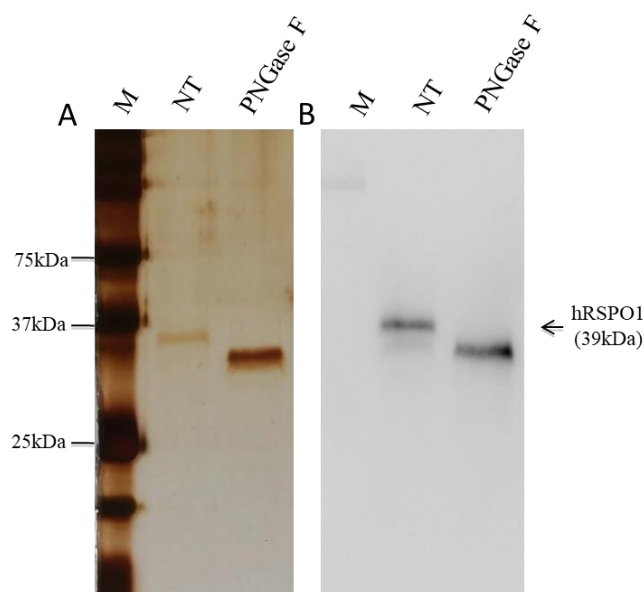


Figura 22 - Desglicosilação da rhRSPO1 com PNGase F. Amostras de 100ng de rhRSPO1 purificada (frações A10+A11 da cromatografia de exclusão molecular), previamente desglicosiladas com N-glicosidase F (PNGase F) ou sem tratamento (NT), foram aplicadas ao gel, sob condições desnaturantes. **(A)** SDS-PAGE corado com prata. **(B)** Western Blot utilizando-se anticorpo monoclonal anti-RSPO1. M - Marcador de peso molecular. Figura adaptada de Levin *et al.*, 2020 (LEVIN; KOGA; BELCHIOR; CARREIRA *et al.*, 2020).

4.8.2 Ensaio de Pannel de Lectinas

A análise da proteína rhRSPO1 utilizando-se o *Lectin Panel kit* demonstrou um perfil de glicosilação que inclui sialilação terminal nos resíduos O- ou N-ligados, como indicado pela ligação de lectinas SNA (*Sambucus nigra agglutinin*) e MAA (*Maackia amurensis agglutinin*). SNA (valor relativo 0,15) indica a presença do dissacarídeo ácido siálico-galactose com ligação do tipo 2-6, enquanto o MAA indica a presença deste mesmo dissacarídeo com ligação 2-3 (valor relativo 0,12). A detecção de DSA (*Datura stramonium agglutinin* - valor relativo 0,17) indica que algumas moléculas na amostra também apresentam estruturas dissacarídeas galactose-N-acetilglicosamina (Gal(1-4)-GlcNAc) N- ou O-ligadas e/ou resíduos de N-acetilglicosamina (GlcNAc) O-ligados. A lectina GNA (*Galanthus nivalis agglutinina*) também foi identificada na amostra, entretanto, o resultado é inconclusivo para determinar a presença de manose terminal, uma vez que o sinal para esta lectina também foi detectado no tampão de eluição utilizado como controle negativo. A partir desse resultado (Figura 23), é possível inferir que o rhRSPO1 gerado em nosso laboratório possui estruturas de glicanos híbridas contendo ácido siálico terminal, N-acetilglicosamina e/ou resíduos de galactose.

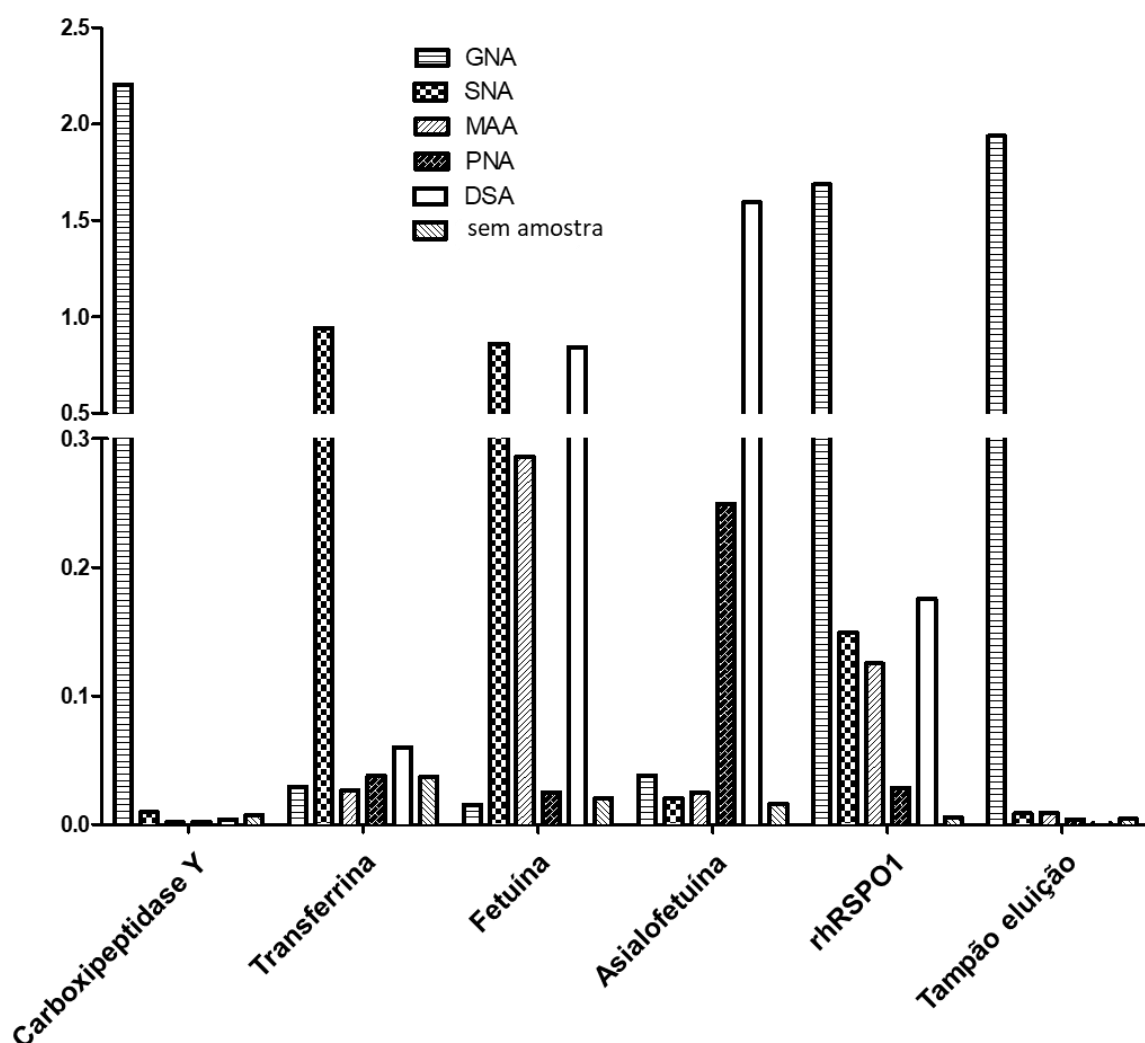


Figura 23 - Perfil qualitativo de glicosilação da rhRSPO1 - Ensaio de painel de lectinas.

A placa de ELISA foi revestida com 200ng/mL de rhRSPO1 purificada e glicoproteínas padrão (carboxipeptidase, transferrina, fetuína, asialofetuína), como controles. Tipos específicos de resíduos de glicanos foram detectados na molécula de rhRSPO1 por meio das diferentes lectinas do painel: *GNA* (Manose Terminal (ligações 1-3, 1-6 ou 1-2) N- ou O-ligada); *SNA* (Dissacarídeo Ácido Siálico-Galactose (ligação 2-6) N- ou O-ligado); *MAA* (Dissacarídeo Ácido Siálico-Galactose (ligação 2-3) N- ou O-ligado); *PNA* (Dissacarídeo Galactose-N-acetilgalactosamina (ligação 1-3) O-ligado); *DSA* (Dissacarídeo Galactose-N-acetilglicosamina (ligação 1-4) N- ou O-ligado e resíduos de N-acetilglicosamina O-ligados). O tampão de purificação (tampão Tris-HCl 40mM, NaCl 713mM e trealose a 5%, pH 7,4), veículo da rhRSPO1, foi utilizado como controle negativo. Figura adaptada de Levin *et al.*, 2020 (LEVIN; KOGA; BELCHIOR; CARREIRA *et al.*, 2020).

4.8.3 Análise de LC-MS/MS

A análise de proteínas por cromatografia líquida (*LC – liquid chromatography*), seguida por espectrometria de massa (*MS – mass spectrometry*), demonstrou que a proteína rhRSPO1 produzida possui massa molecular de 28,94kDa. Por sua vez, a

análise em *tandem* de LC-MS/MS permitiu a geração de informações adicionais sobre o padrão de glicosilação desta proteína, confirmando a localização de um sítio de glicosilação na Asn137 pela presença de uma massa de 162Da (Figura 24). Esta massa, consistentemente encontrada no espectro de massas do experimento, indica a presença de glicosilação (glicação). Entretanto, embora prevista, a massa de uma O-GlcNAc, correspondente a 203Da, não foi encontrada.

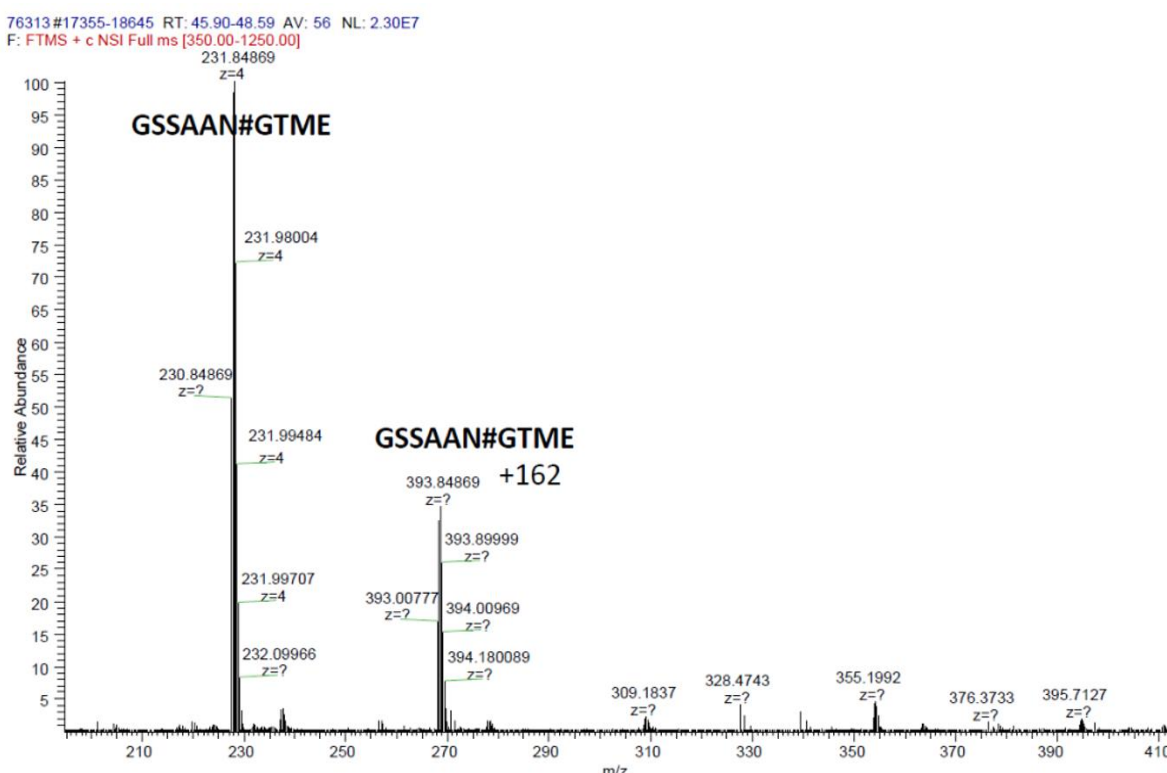


Figura 24 - Análise de LC-MS/MS. Para identificação do perfil de glicosilação, a amostra de rhRSP01 obtida no sistema de purificação por HPLC otimizado foi submetida à análise espectrométrica de massa (LC-MS/MS). Figura adaptada de Levin *et al.*, 2020 (LEVIN; KOGA; BELCHIOR; CARREIRA *et al.*, 2020).

4.9 Adaptação das células HEK293 superprodutoras de rhRSP01 ao cultivo em suspensão

Após 20 passagens celulares, constatou-se que, as células, mesmo com a adição de agentes anti-aglutinação (*anti-clumping*), em ambas as condições (adaptação direta e adaptação gradual), mantinham-se ancoradas à superfície da garrafa (Figura 25). Neste contexto, tal abordagem foi interrompida, cogitando-se testar, futuramente, o uso de microcarreadores celulares para cultivo em aderência, como um método alternativo para atingir altas densidades celulares.

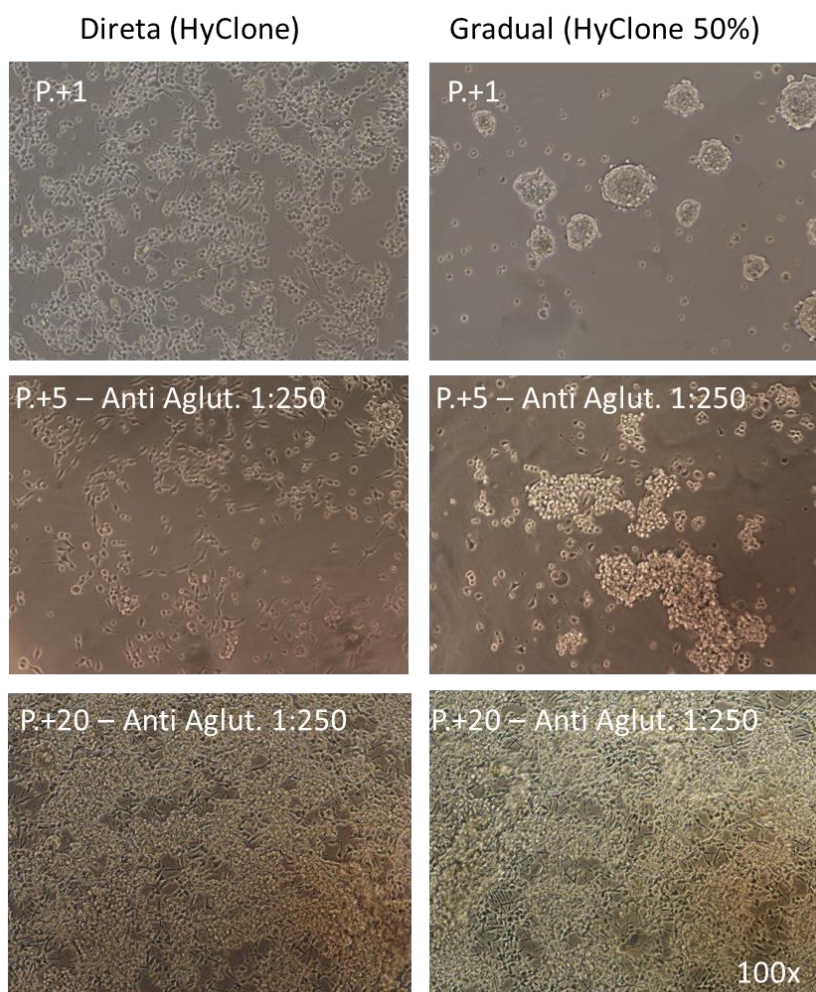


Figura 25 - Adaptação do clone HEK293 superprodutor de rhRSP01 (Cl. L1) ao cultivo em suspensão. As células foram adaptadas utilizando-se duas estratégias: substituição Direta (100% de meio fresco para cultura em suspensão) ou Gradual (50% de meio fresco para cultura em suspensão e 50% de meio condicionado da cultura aderente) e cultivadas na presença de reagente anti aglutinante (*anti-clumping* 1:250) ao longo de 20 passagens. Anti Aglut: Anti Aglutinante adicionado ao cultivo. Aumento 100x.

Capítulo II – Avaliação funcional da rhRSP01 na Engenharia Tecidual

Os resultados apresentados neste segundo capítulo da tese estão compilados e discutidos no manuscrito “*R-Spondin 1 (RSP01) Increases Mouse Intestinal Organoid Unit Size and Survival in vitro and Improves Tissue-Engineered Small Intestine Formation in vivo*”, publicado na revista científica *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* (LEVIN; ZUBER; SQUILLARO; SOGAYAR *et al.*, 2020).

II-A – Unidades Organoides Intestinais *in vitro*

Durante o período de cultura, as taxas de crescimento e sobrevivência das UOs intestinais foram avaliadas e as células foram coletadas no terceiro dia de cultivo para análise da expressão de genes-alvo ao nível de mRNA (qRT-PCR) e proteína (imunofluorescência e *Western blot*). Os resultados obtidos estão apresentados abaixo e a metodologia detalhada pode ser encontrada na seção Material e Métodos.

4.10 rhRSPO1 aumenta o tamanho e a sobrevivência de UOs intestinais *in vitro*

O tratamento de unidades organoides intestinais com rhRSPO1 *in vitro* resultou em um aumento no tamanho e na taxa de sobrevivência destas. Após três dias de cultivo, o tamanho das UOs tratadas com rhRSPO1 (500ng/mL) foi 2,7 vezes superior ao do grupo controle ($8.784,9 \pm 1.148,35 \mu\text{m}^2$ SEM vs $3.239,13 \pm 601,71 \mu\text{m}^2$ SEM, $p < 0,01$) e 5,7 vezes maior no dia 6 ($21.033,03 \pm 1.714,65 \mu\text{m}^2$ SEM vs $3.681,85 \pm 428,21 \mu\text{m}^2$ SEM, $p < 0,001$) (Figura 26A, B e C). Imagens adicionais representando o crescimento das UOs sob as diferentes condições de cultivo (rhRSPO1 ou PBS) e tempos experimentais (Dias 1, 3 e 6), para cada experimento independente, estão apresentadas na Figura 27. Vale destacar que as UOs tratadas com rhRSPO1 perdem sua forma esférica perfeita após seis dias de tratamento, tornando-se estruturas tridimensionais mais complexas, com projeções e reentrâncias no epitélio, como pode ser observado nas Figuras 26A, B e E e na Figura 27. Adicionalmente, uma melhora na sobrevivência foi observada a partir do segundo dia de cultivo, representando um aumento de duas vezes na sobrevivência das UOs entre o dia 3 ($0,767 \pm 0,104$ SEM vs $0,454 \pm 0,094$ SEM, $p < 0,05$) e 6 ($0,747 \pm 0,025$ SEM vs $0,3365 \pm 0,050$ SEM, $p < 0,01$) de cultivo (Fig. 26D). A análise histológica por coloração de H&E indicou a formação de UOs com um epitélio colunar simples, contendo uma região luminal em seu interior (Fig. 26E).

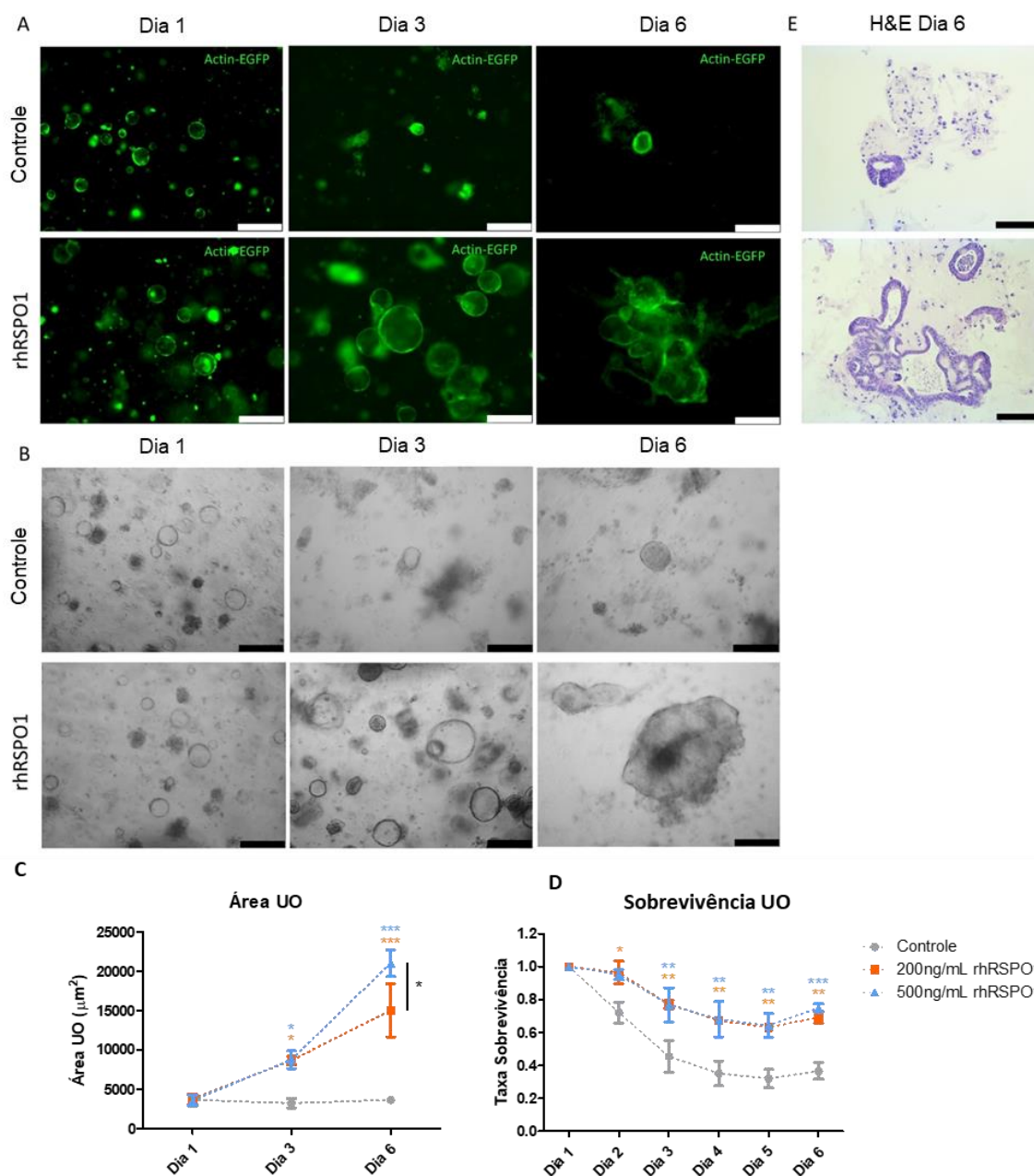


Figura 26 - Crescimento e sobrevivência das UOs intestinais *in vitro*. Imagens de (A) Fluorescência ou (B) Campo claro de UOs intestinais actina^{GFP} após 1, 3 e 6 dias de tratamento com rhRSPO1 (200 ou 500ng/mL) ou PBS (controle) em cultura. (C) UOs tratadas com rhRSPO1 apresentaram uma área maior em comparação com o grupo controle a partir do terceiro dia, tornando-se 5,7 vezes maior no dia 6. (D) Um aumento de sobrevivência foi observado a partir do segundo dia de cultivo, representando um incremento de duas vezes na sobrevivência das UOs entre os dias 3 e 6 dias. (E) Coloração H&E de UOs do Dia 6. O teste de ANOVA (teste post hoc de Tukey) foi realizado para quantificação do tamanho da UOs e da taxa de sobrevivência. * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,0005$. As barras de escala das Figuras 1A e 1B correspondem a 250 μm , enquanto as barras de escala da Figura 1E são equivalentes a 100 μm . Figura adaptada de Levin *et al.*, 2020 (LEVIN; ZUBER; SQUILLARO; SOGAYAR *et al.*, 2020).

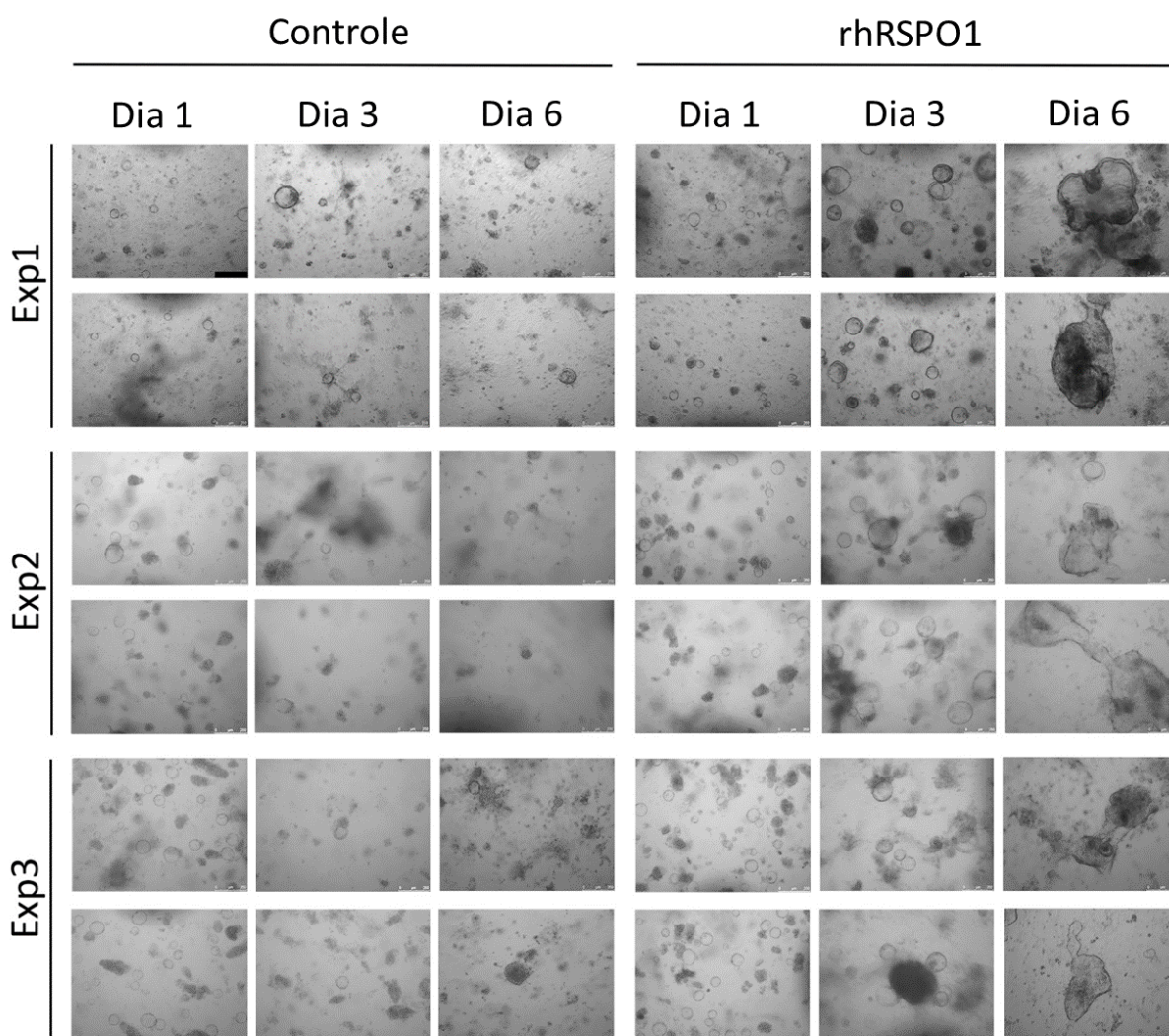


Figura 27 - UOs *in vitro* (Imagens adicionais). Imagens de microscopia óptica de campo claro representando o crescimento de OUs intestinais *in vitro* após 1, 3 e 6 dias de tratamento com rhRSPO1 (500ng/mL) ou PBS (controle) em três experimentos independentes, cada um dos quais com duas replicatas técnicas ilustradas. A barra de escala corresponde a 250µm e todas as imagens foram obtidas com a mesma magnitude de ampliação sob microscópio óptico. Figura adaptada de Levin *et al.*, 2020 (LEVIN; ZUBER; SQUILLARO; SOGAYAR *et al.*, 2020).

Possivelmente, o aumento do tamanho das unidades organoides após o tratamento com rhRSPO1 é uma consequência do aumento da proliferação e sobrevivência celular. No entanto, devido à fragilidade das UOs no dia 6 de cultivo e às dificuldades técnicas na obtenção de réplicas biológicas, não foi possível verificar um aumento significativo na taxa proliferativa do epitélio das UOs (células Ki67⁺/ células E-cad⁺ nas UOs) através de imunofluorescência das lâminas histológicas ou coloração de montagem total (*whole mount staining*) para microscopia confocal (Figura 28).

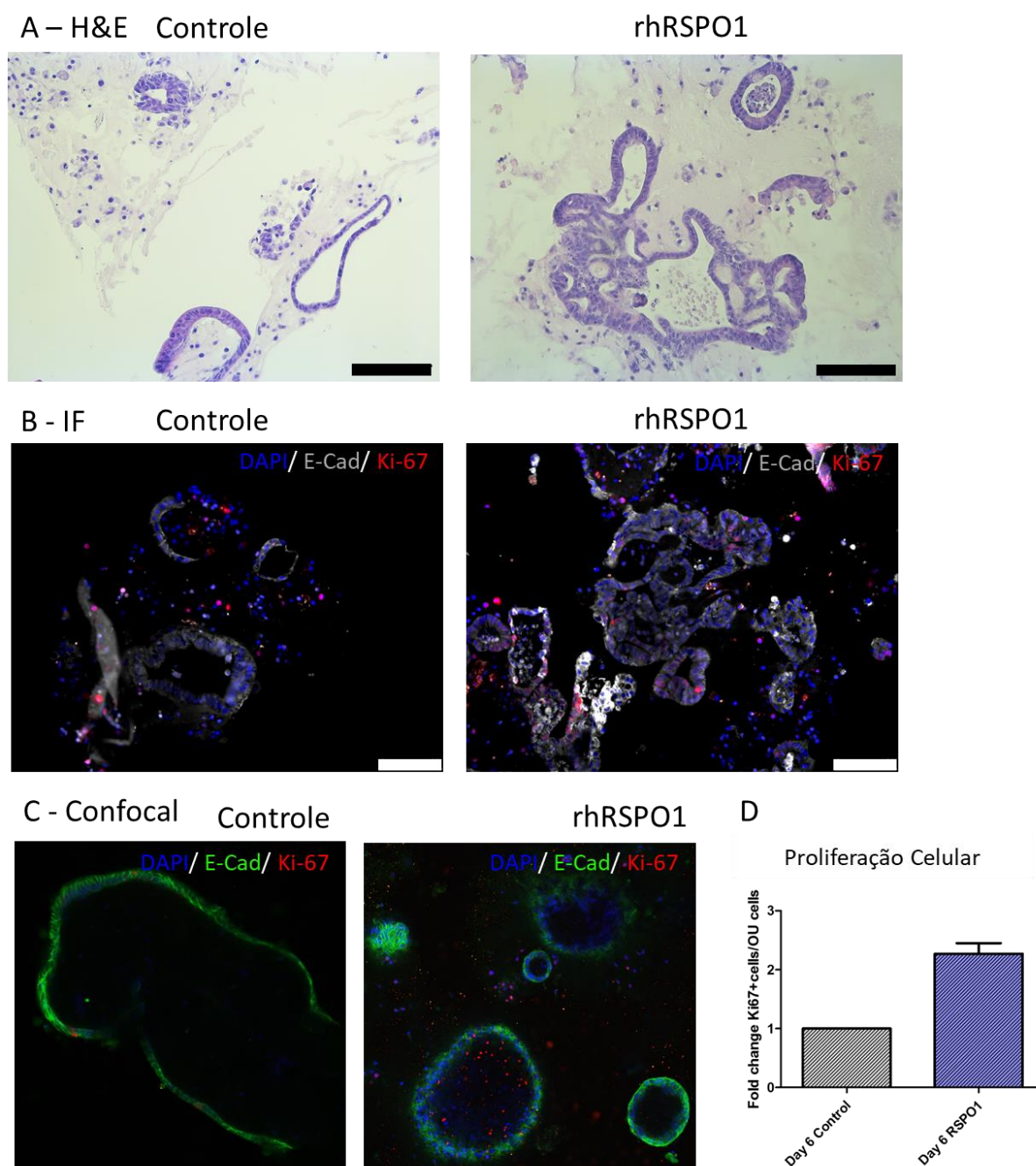


Figura 28 - Proliferação celular no epitélio das UOs intestinais (Dia 6). (A) UOs no Dia 6 coradas com H&E. (B) Análise de proliferação por Imunofluorescência (Ki67/E-caderina). (C) Análise de proliferação por coloração de montagem total (*whole mount staining* - (Ki67/E-caderina) e microscopia confocal. (D) Fold Change de proliferação nas UOs (células Ki67+/ células epiteliais da UO). N=2.

4.11 rhRSP01 contribui para a manutenção do nicho de células-tronco

Sabe-se que o *Lgr5* é um marcador de células-tronco e, também, o principal receptor da proteína RSP01, atuando através da indução da via de WNT. Os dados apresentados na Figura 29, indicaram uma expressão relativa de *Lgr5* ao nível de

mRNA 3,3 vezes maior em relação ao grupo controle nas UOs tratadas com rhRSPO1 do dia 3 ($3,70 \pm 0,90$ SEM vs $1,128 \pm 0,28$ SEM, $p=0,009$), indicando uma maior prevalência relativa de células-tronco ou uma maior adaptação celular para gerar mais moléculas receptoras Lgr5 (Fig. 29A). Não foram observadas diferenças significativas nos níveis de expressão relativa do gene-alvo da via de Wnt relacionado ao ciclo celular, *Ciclina D1*, e de β -catenina (Fig. 29B e C).

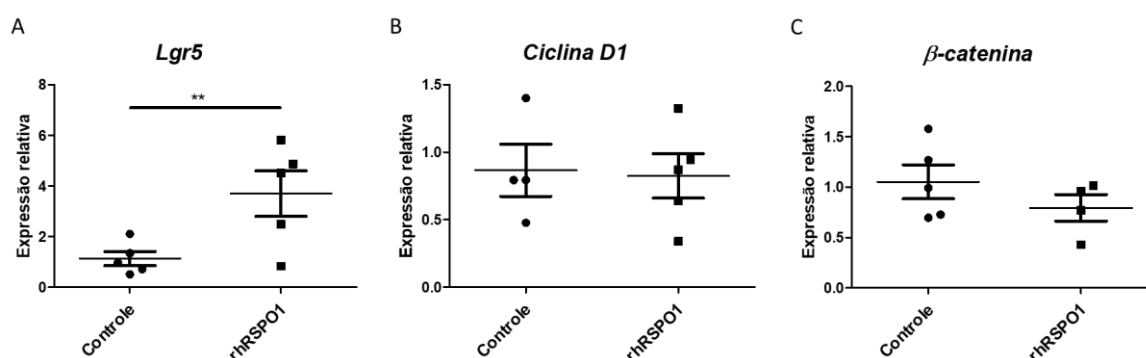


Figura 29 - Expressão relativa ao nível de mRNA dos principais genes da via de sinalização de Wnt nas UOs. Para o ensaio de qRT-PCR, foram utilizadas UOs no dia 3 do tratamento com rhRSPO1 (500ng/mL) ou PBS. **(A)** *Lgr5*; **(B)** *Ciclina D1*; **(C)** β -catenina. Os dados do experimento foram normalizados em relação a expressão de *Gapdh*, utilizado como gene endógeno de referência e o teste t de Student foi utilizado para análise estatística. ** $p < 0,005$. Figura adaptada de Levin *et al.*, 2020 (LEVIN; ZUBER; SQUILLARO; SOGAYAR *et al.*, 2020).

4.12 rhRSPO1 ativa a via de sinalização de Wnt dependente de beta-catenina

O aumento da β -catenina não fosforilada (ativa) nas UOs do terceiro dia de cultivo no grupo tratado com rhRSPO1, observado pelo ensaio *Western blot* (Figura 30A), confirma a ativação da via canônica de Wnt, também chamada de via dependente da β -catenina. Para quantificação da β -catenina ativa, foi realizada a análise densitométrica da membrana de *Western blot*, indicando um aumento de 4,8 vezes na concentração da proteína, em comparação ao controle ($4,865 \pm 1,066$ SEM vs $1,000 \pm 0,0$ SEM, $p=0,034$), após normalização em relação à proteína de referência β -actina (Fig. 30B).

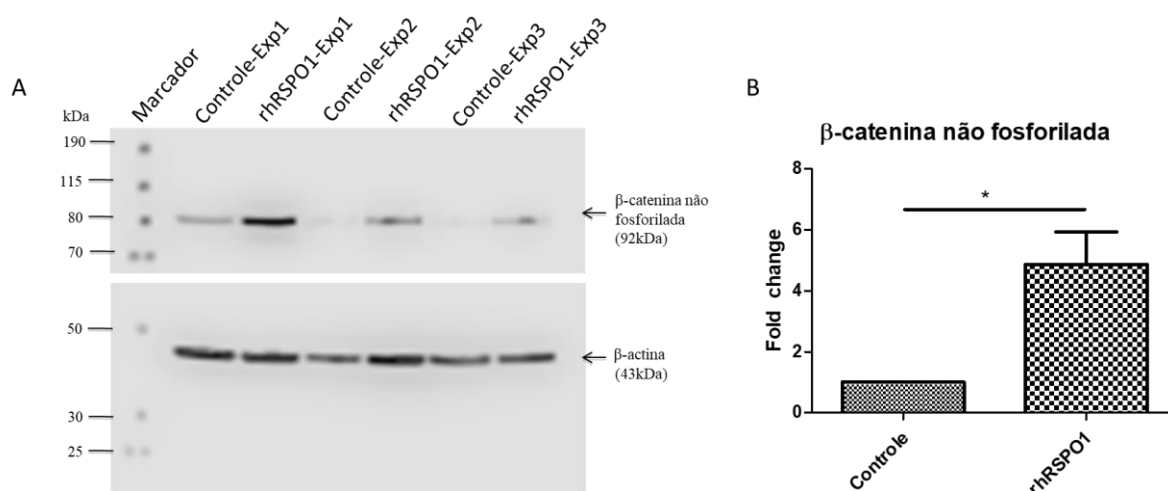


Figura 30 - Expressão relativa da proteína β -catenina não fosforilada (ativa) nas UOs. Para o ensaio de *Western blot*, foram utilizadas UOs do dia 3 de cultivo, tratadas com rhRSPO1 (500ng/mL) ou PBS, em três experimentos independentes. (A) Membrana de *Western blot* após marcação para β -catenina não fosforilada (ativa) e β -actina. (B) Resultado da análise densitométrica da membrana de WB (quantificação). O teste t de Student foi utilizado para análise estatística. * $p < 0,05$. Figura adaptada de Levin *et al.*, 2020 (LEVIN; ZUBER; SQUILLARO; SOGAYAR *et al.*, 2020).

B.1.2 – Formação de Intestino Delgado Engenheirado (TESI) *in vivo*

Para avaliar a atividade da rhRSPO1 na formação do intestino delgado engenheirado (TESI, do inglês *Tissue-Engineered Small Intestine*), OUs intestinais de camundongo foram semeadas em arcabouços biodegradáveis, na presença ou na ausência de rhRSPO1, e implantadas no omento de camundongos NOD/SCID para geração do TESI (Figura 31). Após 30 dias, os explantes foram coletados, pesados, fixados em formalina e embebidos em parafina para análise histológica e imunofluorescência para diferentes marcadores celulares.

4.13 rhRSPO1 aumenta o tamanho e o grau de desenvolvimento do TESI *in vivo*

Após 30 dias de maturação *in vivo*, os explantes previamente tratados com rhRSPO1 apresentaram tamanho e massa maiores do que aqueles que receberam apenas solução salina ($81,93 \pm 5,718$ mg SEM vs $58,80 \pm 2,040$ mg SEM, $p=0,0033$) (Fig. 31A e B). A análise histológica dos tecidos engenheirados e seus respectivos graus de complexidade do epitélio intestinal indicaram que os arcabouços previamente tratados com rhRSPO1, antes da semeadura das UOs, desenvolveram um epitélio intestinal mais maduro, apresentando vilosidades e criptas bem formadas

(Fig. 31C). Os tecidos engenheirados foram avaliados às cegas por três pesquisadores independentes, os quais encontraram, consistentemente, uma maior complexidade de organização tecidual no grupo tratado com rhRSPO1, especialmente em relação à presença de criptas e vilosidades maduras (Fig. 31D e E). Além disso, os arcabouços tratados com rhRSPO1 foram capazes de gerar TESIs, com algum grau de organização, em todos os oito arcabouços implantados semeados com UOs (100%), enquanto o grupo controle (PBS) permitiu o desenvolvimento de TESI em apenas 6 dos 9 explantes (66,6%). Nenhum tumor ou estrutura anormal foi encontrado durante a necropsia dos animais e processamento das amostras TESI.

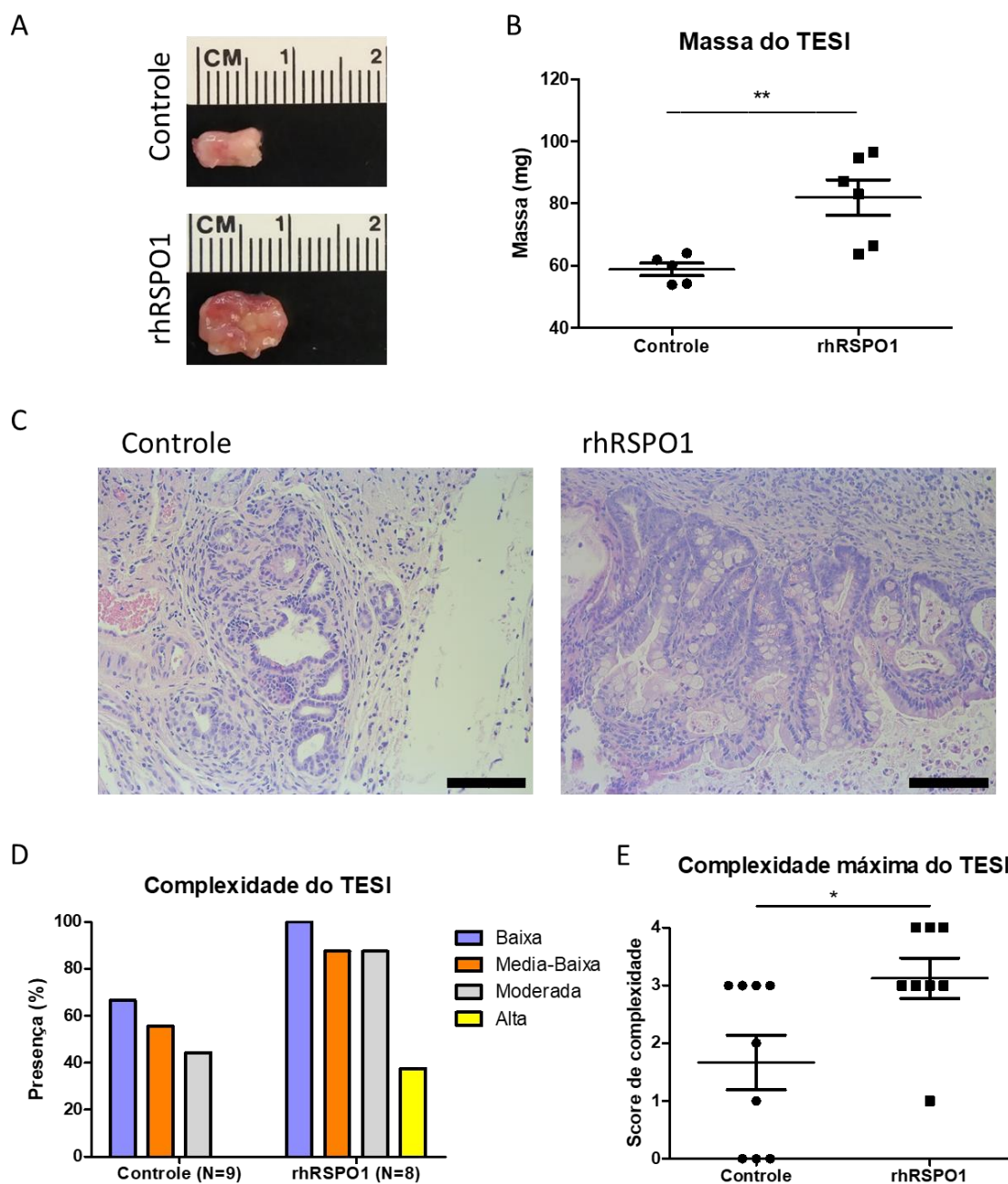


Figura 31 - Desenvolvimento *in vivo* do TESI em arcabouços biodegradáveis na presença ou ausência de rhRSPO1 após explante. (A) explantes de TESI após um mês de maturação *in vivo*; (B) massa do TESI após explante; (C) coloração H&E do TESI; (D) complexidade do TESI; (E) complexidade máxima do TESI. Os scores 1-4 de complexidade do TESI correspondem a baixa, média-baixa, moderada ou alta complexidade, respectivamente. * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$. As barras de escala correspondem a 100 μ m. Figura adaptada de Levin *et al.*, 2020 (LEVIN; ZUBER; SQUILLARO; SOGAYAR *et al.*, 2020).

4.14 O TESI tratado com rhRSPO1 gera uma mucosa completamente diferenciada em um mês

O TESI gerado foi caracterizado qualitativamente quanto à sua estrutura e composição através de imunofluorescência com marcadores específicos para cada um dos tipos celulares diferenciados do epitélio intestinal. Como pode ser visto na Figura 32 (marcação em vermelho), o TESI apresentou todos os principais tipos de células do epitélio intestinal, a saber: enterócitos (células absorventes, Villina⁺), células caliciformes (células secretoras de muco, Muc-2⁺), células de Paneth (Células condicionadoras do nicho de células tronco, Lisozima⁺) e células enteroendócrinas (células secretoras de hormônios, ChgA⁺). O revestimento epitelial do TESI exposto à rhRSPO1 apresentou uma cobertura completa de enterócitos ao longo de sua extensão, como pode ser observado na marcação para Villina (Fig. 32A-C), uma proteína associada à estrutura da borda em escova (microvilosidades) presente no intestino. Além disso, foi possível identificar a presença de células caliciformes ao longo do eixo cripta-vilosidade, bem como a presença de mucina na região luminal marcada com o anticorpo anti-Muc-2 (Fig. 32D-F). As células de Paneth, marcadas com o anticorpo anti-Lisozima, são responsáveis pela secreção de fatores importantes para a manutenção do nicho das células-tronco, estando localizadas na parte inferior da cripta, local aonde também residem as células-tronco intestinais (Fig. 32G-I). As células enteroendócrinas, secretoras de hormônios, estão localizadas ao longo das vilosidades, identificadas pela marcação de cromogranina A (ChgA⁺) (Fig. 32J-L).

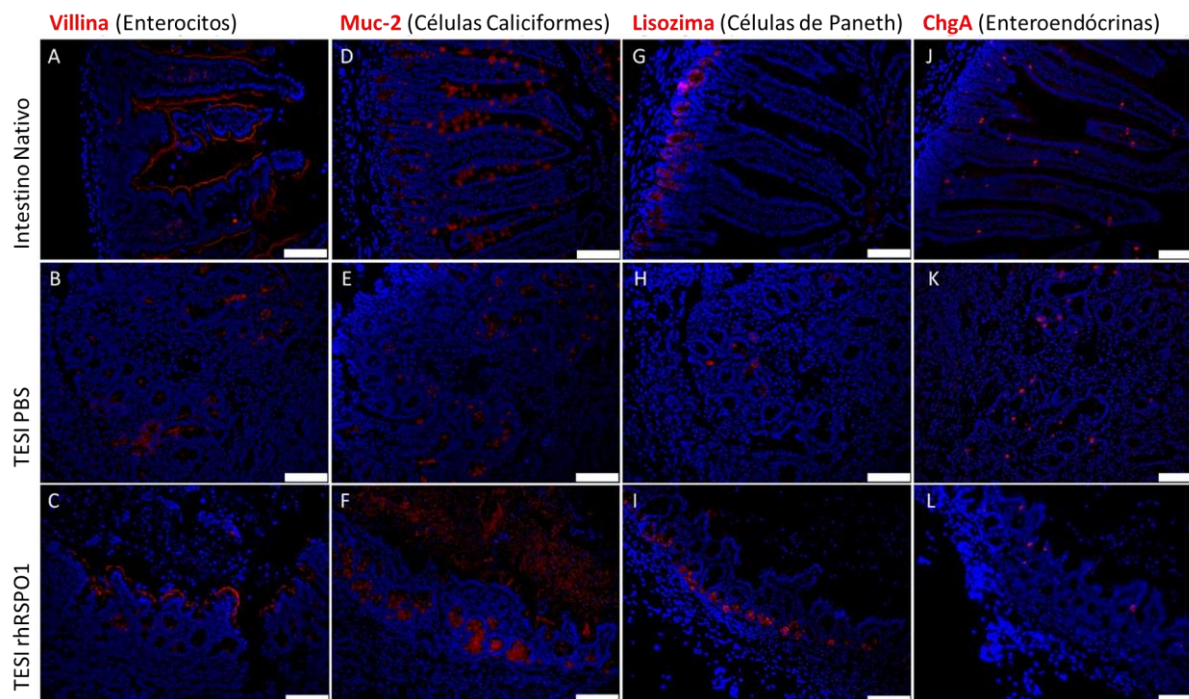


Figura 32 - Marcação imunofluorescente para os diferentes tipos de células epiteliais intestinais diferenciadas. Grupos (linhas): intestino delgado nativo de camundongo (Intestino Nativo), TESI de camundongo tratado com PBS (TESI PBS), TESI de camundongo tratado com rhRSPO1 (TESI rhRSPO1). Marcações (vermelho): proteínas Vilina (**A-C**), Muc-2 (**D-F**), Lisozima (**G-I**) e ChgA (**J-L**). As barras de escala correspondem a 100 μ m. Figura adaptada de Levin *et al.*, 2020 (LEVIN; ZUBER; SQUILLARO; SOGAYAR *et al.*, 2020).

4.15 O TESI tratado com rhRSPO1 apresenta um nicho intacto de células-tronco e uma camada muscular innervada

O TESI tratado com rhRSPO1 apresenta células-tronco intestinais e células em proliferação, bem como uma camada muscular e uma rede neural associada à camada epitelial do TESI (Figura 33). As células GFP⁺ (verde) indicam a presença de células-tronco Lgr5⁺ na base da cripta (Fig. 33A-C), mesma região povoada pelas células de Paneth. Estas são sucedidas por células amplificadoras de trânsito (TA), células no estado proliferativo detectadas pela marcação com PCNA⁺ (vermelho) (Fig. 33A-C). A camada do músculo liso (vermelho) é identificada pela expressão da α -actina do músculo liso (SMA⁺) abaixo do epitélio intestinal em verde (E-caderina) (Fig. 33D-F). A presença de gânglios neuronais é identificada pela marcação de Tuj-1⁺ (vermelho) (Fig. 33G-I). Os tecidos corados com H&E foram utilizados para análise histológica comparativa (Fig. 33J-L).

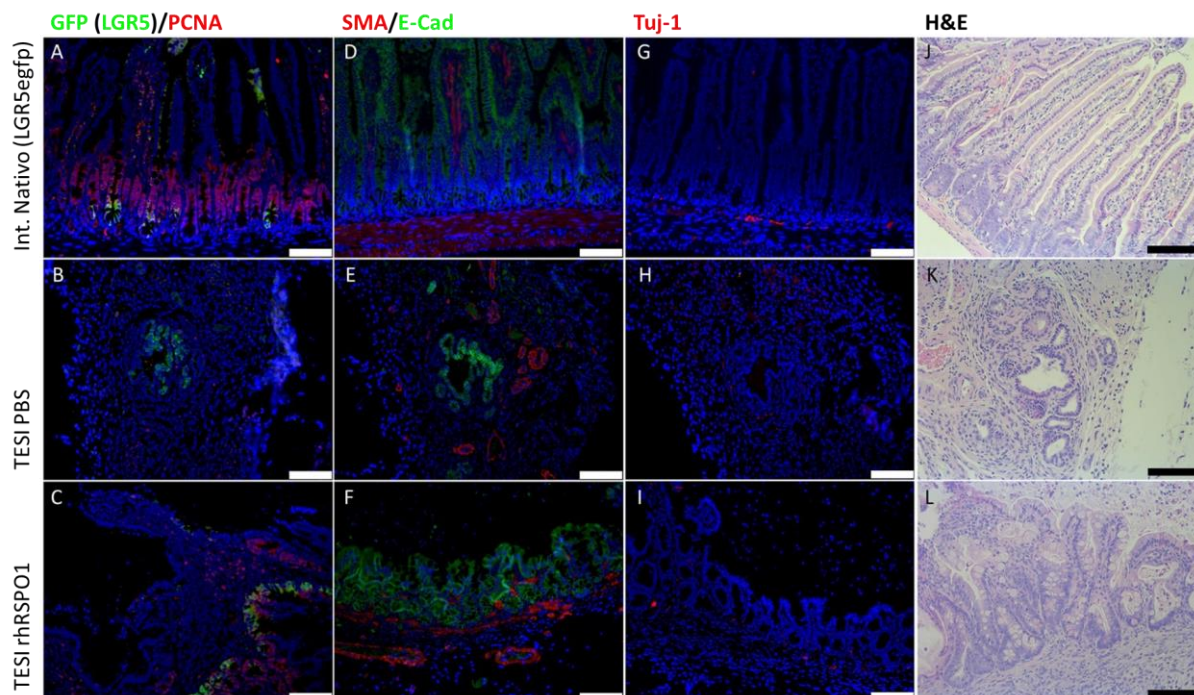


Figura 33 - Marcação imunofluorescente de células-tronco intestinais, camada muscular e gânglios neuronais. Grupos (linhas): intestino delgado nativo de camundongo, TESI de camundongo tratado com PBS (TESI PBS), TESI de camundongo tratado com rhRSPO1 (TESI rhRSPO1). Marcações: GFP (verde)/ PCNA (vermelho) (A-C), SMA (vermelho)/ E-caderina (verde) (D-F), Tuj-1 (vermelho) (G-I), H&E (J-L). As barras de escala correspondem a 100µm. Figura adaptada de Levin *et al.*, 2020 (LEVIN; ZUBER; SQUILLARO; SOGAYAR *et al.*, 2020).

II-B – Unidades Organoides de Fígado (LOU) *in vitro* e Formação de Fígado Engenheirado (TELi) *in vivo*

4.16 rhRSPO1 aumenta o tamanho de LOUs *in vitro* sem interferir em sua sobrevivência

Ensaio adicional utilizando-se unidades organoides do fígado (LOU) *in vitro* também demonstraram um crescimento de 3,5 vezes ($19.637,450 \pm 4.862,178 \mu\text{m}^2$ SEM vs $5.529,455 \pm 1.003,574 \mu\text{m}^2$ SEM, $p < 0,01$) após cinco dias de cultivo na presença de rhRSPO1 (500ng/mL), quando comparado àquelas que receberam PBS (Figura 34A-C). Com relação à taxa de sobrevivência das LOUs, não foi possível verificar diferença significativa entre as unidades organoides tratadas com rhRSPO1 e o grupo controle em nenhum dos dias de cultivo, uma vez que essas taxas foram bastante altas nos dois grupos (Fig. 34D). Assim como para as UOs intestinais, a análise histológica após coloração de H&E indicou a formação de UOs com um epitélio colunar simples, contendo uma região luminal em seu interior (Fig. 34B).

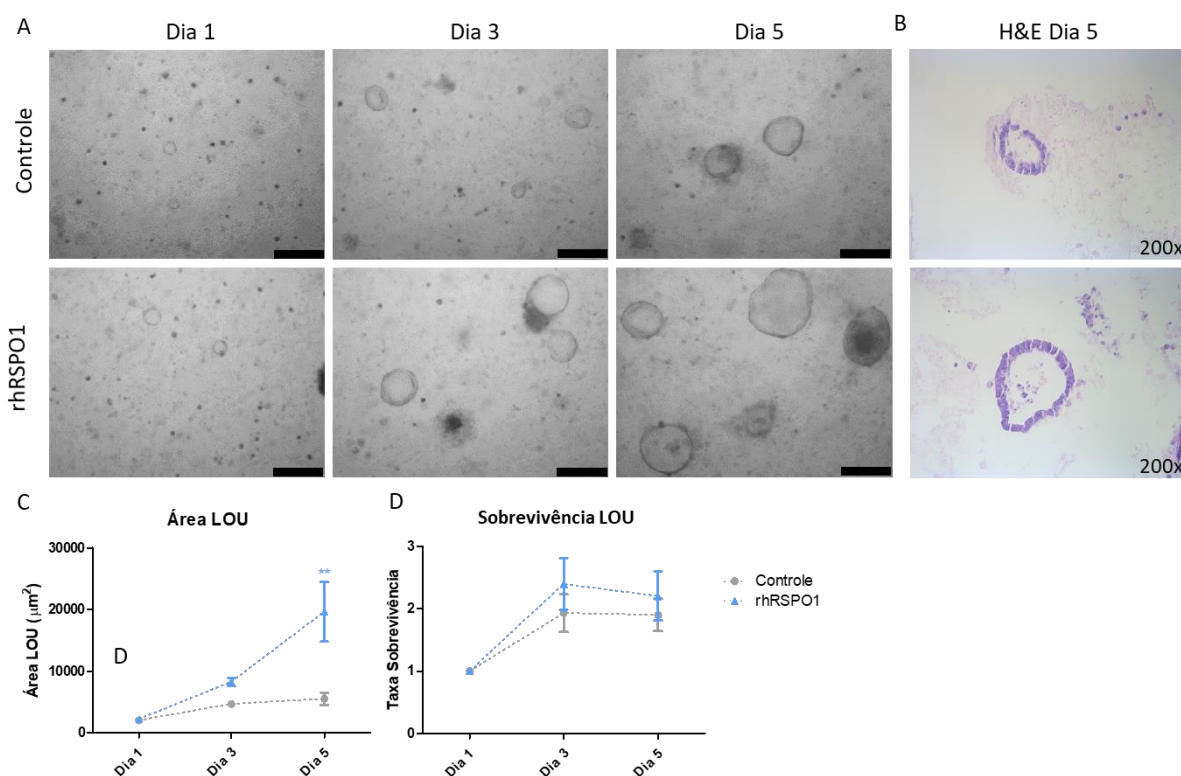


Figura 34 - Crescimento e sobrevivência de Unidade Organoide de Fígado (LOU) *in vitro*. (A) LOU nos dias 1, 3 e 5 de tratamento com rhRSPO1 ou PBS (controle) em cultura. (B) Coloração H&E de LOUs do Dia 5 de cultivo. (C) LOUs tratadas com rhRSPO1 apresentaram uma área maior em comparação com o grupo controle no dia 5. (D) Nenhuma diferença na taxa de sobrevivência foi observada durante a cultura. O teste ANOVA (teste post hoc de Bonferroni) foi utilizado para quantificação do tamanho das LOUs e taxa de sobrevivência. ** $p < 0,005$. As barras de escala das Figuras 1A correspondem a $250\mu\text{m}$, enquanto as figuras 1B foram adquiridas com magnitude de amplificação de 200x.

4.17 LOUs semeadas sobre scaffolds geram fígado engenheirado em 1 mês

Resultados preliminares demonstraram que é possível gerar um fígado engenheirado a partir de arcabouços semeados com LOUs na presença ou ausência de rhRSPO1 (Figura 35). A caracterização por IF do TELi murino, tratado com rhRSPO1, demonstrou a presença de colangiócitos (células CK19⁺) formando ductos biliares e alguns poucos hepatócitos bem organizados (células HNF4 α ⁺) após um mês de maturação *in vivo*, porém sem secreção de albumina (Fig. 35B). Entretanto, a baixa eficiência do processo e o número reduzido de replicatas biológicas impossibilitou a comparação do desenvolvimento de TELi entre o grupo tratado com rhRSPO1 e o grupo controle com PBS neste modelo.

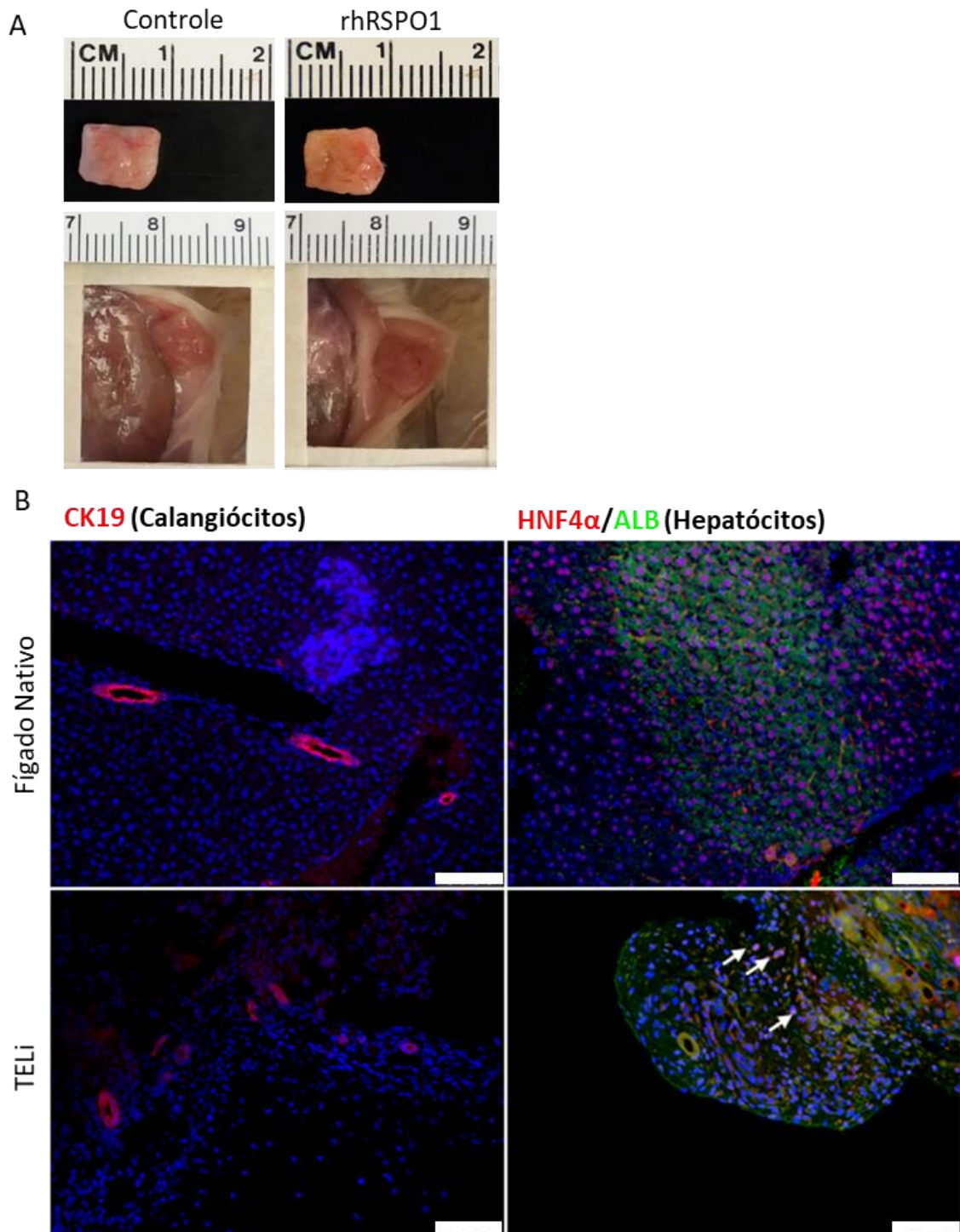


Figura 35 - Formação de fígado engenheirado (TELi) *in vivo*. (A) Explantes após um mês de maturação *in vivo* – *ex situ* (cima) e *in situ* (baixo). (B) Imunofluorescência - Marcações: CK19 (vermelho), HNF4 α (vermelho)/ Albumina (verde). Grupos (linhas): fígado nativo de camundongo, TELi de camundongo. A marcação indica a presença de colangiócitos (CK19⁺), formando ductos biliares, e hepatócitos (HNF4 α ⁺ - setas brancas) no TELi e fígado nativo de camundongo. A barras de escala correspondem a 100 μ m.

Capítulo III – Avaliação funcional da rhRSPO1 na Regeneração Tecidual em modelo de Síndrome do Intestino Curto em *Zebrafish*

Os resultados apresentados neste terceiro capítulo da tese estão compilados e discutidos no manuscrito “*R-spondin1 enhances Wnt signaling and decreases weight loss in short bowel syndrome zebrafish*”, submetido à uma revista científica bem-conceituada na área de pesquisa cirúrgica e em fase final de resposta.

4.18 Injeções intraperitoneais repetidas são uma estratégia de dosagem viável em ZF

Embora a injeção intraperitoneal tenha sido descrita como um método de administração de medicamentos em *zebrafish*, injeções intraperitoneais repetidas após cirurgia intra-abdominal, por um curto período de tempo, não foram relatadas anteriormente. Para determinar se injeções intraperitoneais repetidas consistem em um método viável para administração de rhRSPO1, inicialmente, projetamos um experimento piloto no qual a proteína foi administrada aos ZF com SIC (SBS ZF) durante um período de uma semana (Fig. 9A). Para tanto, os ZF receberam um total de três injeções de rhRSPO1 ou veículo sozinho a partir do quarto dia pós-operatório, dia no qual os ferimentos da cirurgia já estavam fechados, permitindo, assim, a permanência da medicação no espaço intraperitoneal dos ZF. Neste experimento, as injeções intraperitoneais repetidas de rhRSPO1 foram bem toleradas pelos animais, com uma sobrevivência global de 85%, sendo 75% no grupo SBS+RSPO1, 91% no grupo SBS+PBS, 83% no grupo sham+RSPO1 e 91% no grupo sham+PBS. Este resultado é consistente com a sobrevivência relatada anteriormente pelo grupo da Dra. Grikscheit, que varia entre 67-90% após a cirurgia de SIC/SBS (ISANI; GEE; SCHALL; SCHLIEVE *et al.*, 2019; SCHALL; HOLOYDA; GRANT; LEVIN *et al.*, 2015). Além disso, ainda em concordância com a literatura, apesar do estresse adicional das injeções intraperitoneais repetidas, não houve diferença significativa na perda de peso entre nenhum dos grupos no dia 7 pós-operatório (Figura 36A) (SCHALL; HOLOYDA; GRANT; LEVIN *et al.*, 2015; SCHALL; HOLOYDA; ISANI; SCHLIEVE *et al.*, 2017).

4.19 rhRSPO1 reduz a perda de peso de ZF em 14 dias após cirurgias de SIC/SBS

O tratamento dos animais com a proteína rhRSPO1 durante sete dias após as cirurgias de SIC/SBS ou sham, não permitiu detectar diferenças significativas na perda de peso entre os grupos (Figura 36A). Entretanto, após 14 dias e cinco injeções, os peixes SBS que receberam rhRSPO1 perderam 16,7% menos peso do que os peixes SBS que receberam apenas PBS ($89,6\pm 5,8\%$ vs $72,9\pm 3,3\%$, $p=0,017$) (Fig. 36B). Consistente com o trabalho anterior do grupo da Profa. Grikscheit (SCHALL; HOLOYDA; GRANT; LEVIN *et al.*, 2015; SCHALL; HOLOYDA; ISANI; SCHLIEVE *et al.*, 2017), após duas semanas, os peixes SBS PBS perderam uma quantidade significativa de peso, em comparação com os peixes do grupo sham PBS ($72,9\pm 3,3\%$ vs $95,4\pm 4,0\%$, $p=0,0002$) (Fig. 36B). Não houve diferença na perda de peso entre os grupos SBS RSPO1 e os dois grupos sham (Fig. 36B).

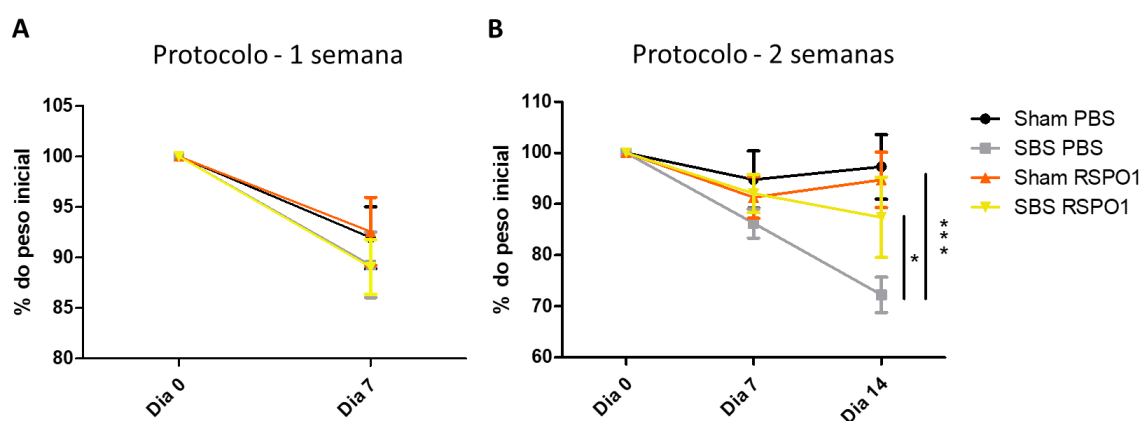


Figura 36 - Perda de peso dos zebrafish após cirurgias de SIC/SBS ao longo dos protocolos de uma ou duas semanas de experimentação. ZF foram alocados em quatro grupos: sham PBS, SBS PBS, sham RSPO1 e SBS RSPO1. Após cirurgia de SIC/SBS ou simulada (sham), os peixes receberam injeções diárias de RSPO1 (0,8ug) em PBS ou PBS apenas de acordo com os protocolos de (A) uma semana ou (B) duas semanas de tratamento.

4.20 rhRSPO1 não interfere na adaptação intestinal em modelo de SIC/SBS em ZF

Os marcadores histológicos validados de adaptação intestinal, incluindo VH, VEP, IEP e circunferência, foram medidos a partir de cortes histológicos do intestino proximal dos ZF transcorridos 7 ou 14 dias pós cirurgias. Após sete dias, as vilosidades dos peixes dos grupos SBS PBS e SBS RSPO1 eram maiores e mais

complexas do que os respectivos peixes do grupo sham (Figura 37), o que é consistente com os resultados anteriores do grupo da Dra. Grikscheit (SCHALL; HOLOYDA; GRANT; LEVIN *et al.*, 2015). Aos 14 dias, a diferença entre os grupos tratados com rhRSPO1 (Sham RSPO1 vs SBS RSPO1) diminuiu a ponto de não ser mais detectada em nenhum dos parâmetros observados, possivelmente por um efeito do tratamento com rhRSPO1 (Figura 38). Entretanto, em ambos os protocolos, nenhuma diferença entre os grupos SBS PBS e SBS RSPO1 foi detectada em nenhum dos parâmetros observados. Dessa forma, o tratamento com rhRSPO1 parece não interferir na adaptação intestinal em resposta à SIC.

Em uma semana, a VH apareceu aumentada em peixes SBS PBS em comparação com sham ($222,2 \pm 9,6 \mu\text{m}$ vs $170,8 \pm 10,3 \mu\text{m}$, $p=0,006$) (Figura 37E). Contudo, não houve diferença no VH entre os peixes SBS RSPO1 e sham RSPO1 ($229,8 \pm 12,8 \mu\text{m}$ vs $200,3 \pm 7,4 \mu\text{m}$, $p=0,2$) ou entre SBS PBS e SBS RSPO1 ($222,2 \pm 9,6 \mu\text{m}$ vs $229,8 \pm 12,8 \mu\text{m}$, $p=0,9$) (Fig. 37E). Da mesma forma, a VEP aumentou tanto no grupo SBS PBS quanto em SBS RSPO1 em comparação com os respectivos grupos sham ($512,4 \pm 19,3 \mu\text{m}$ vs $374 \pm 13,9 \mu\text{m}$, $p=0,0007$, $537,1 \pm 35,7 \mu\text{m}$ vs $436,4 \pm 8,6 \mu\text{m}$, $p=0,02$, respectivamente), mas não houve diferença entre os dois grupos SBS ($512,4 \pm 19,3 \mu\text{m}$ vs $537,1 \pm 35,7 \mu\text{m}$, $p=0,8$) (Fig. 37F). O IEP aumentou no grupo SBS PBS comparado ao sham PBS ($11.457 \pm 522 \mu\text{m}$ vs $8.476 \pm 129 \mu\text{m}$, $p=0,01$), mas não houve diferença entre nenhum dos outros grupos (Fig. 37G). Por fim, a circunferência aumentou nos grupos SBS PBS e SBS RSPO1 em comparação com seus respectivos grupos controle ($4.112 \pm 103 \mu\text{m}$ vs $2.954 \pm 275 \mu\text{m}$, $p=0,006$, $4.146 \pm 208 \mu\text{m}$ vs $3.277 \pm 144 \mu\text{m}$, $p=0,04$, respectivamente) (Fig. 37H). Não houve diferença entre SBS PBS e SBS RSPO1 ($4.112 \pm 103 \mu\text{m}$ vs $4.146 \pm 208 \mu\text{m}$, $p=0,9$) (Fig. 37H).

Conforme esperado em duas semanas, a VH apareceu aumentado nos peixes do grupo SBS PBS em comparação com sham PBS ($203 \pm 6,2 \mu\text{m}$ vs $138,8 \pm 3,9 \mu\text{m}$, $p=0,03$) (Fig. 38E). Entretanto, não houve diferença na VH entre os grupos SBS PBS e SBS RSPO1 ($203 \pm 6,2 \mu\text{m}$ vs $196,8 \pm 21,1 \mu\text{m}$, $p=0,99$), SBS RSPO1 e sham RSPO1 ($196,8 \pm 21,1 \mu\text{m}$ vs $196,4 \pm 21,1 \mu\text{m}$, $p>0,99$) ou entre sham RSPO1 e SBS PBS ($196,4 \pm 21,1 \mu\text{m}$ vs $203 \pm 6,2 \mu\text{m}$, $p=0,99$) (Fig. 38E). Um padrão semelhante foi observado para a VEP, com aumento em peixes do grupo SBS PBS em comparação com peixes sham PBS ($458,2 \pm 17,9 \mu\text{m}$ vs $325,3 \pm 15,9 \mu\text{m}$, $p=0,04$) e nenhuma diferença entre SBS RSPO1 ($464,9 \pm 42,7 \mu\text{m}$ vs $458,2 \pm 17,9 \mu\text{m}$, $p=0,99$) ou

sham RSPO1 e SBS PBS ($440,4 \pm 39,3 \mu\text{m}$ vs $458,2 \pm 17,9 \mu\text{m}$, $p=0,97$) (Fig. 38F). Para o IEP e circunferência, não houve nenhuma diferença detectada, possivelmente em decorrência do tamanho amostral utilizado (Fig. 38G-H).

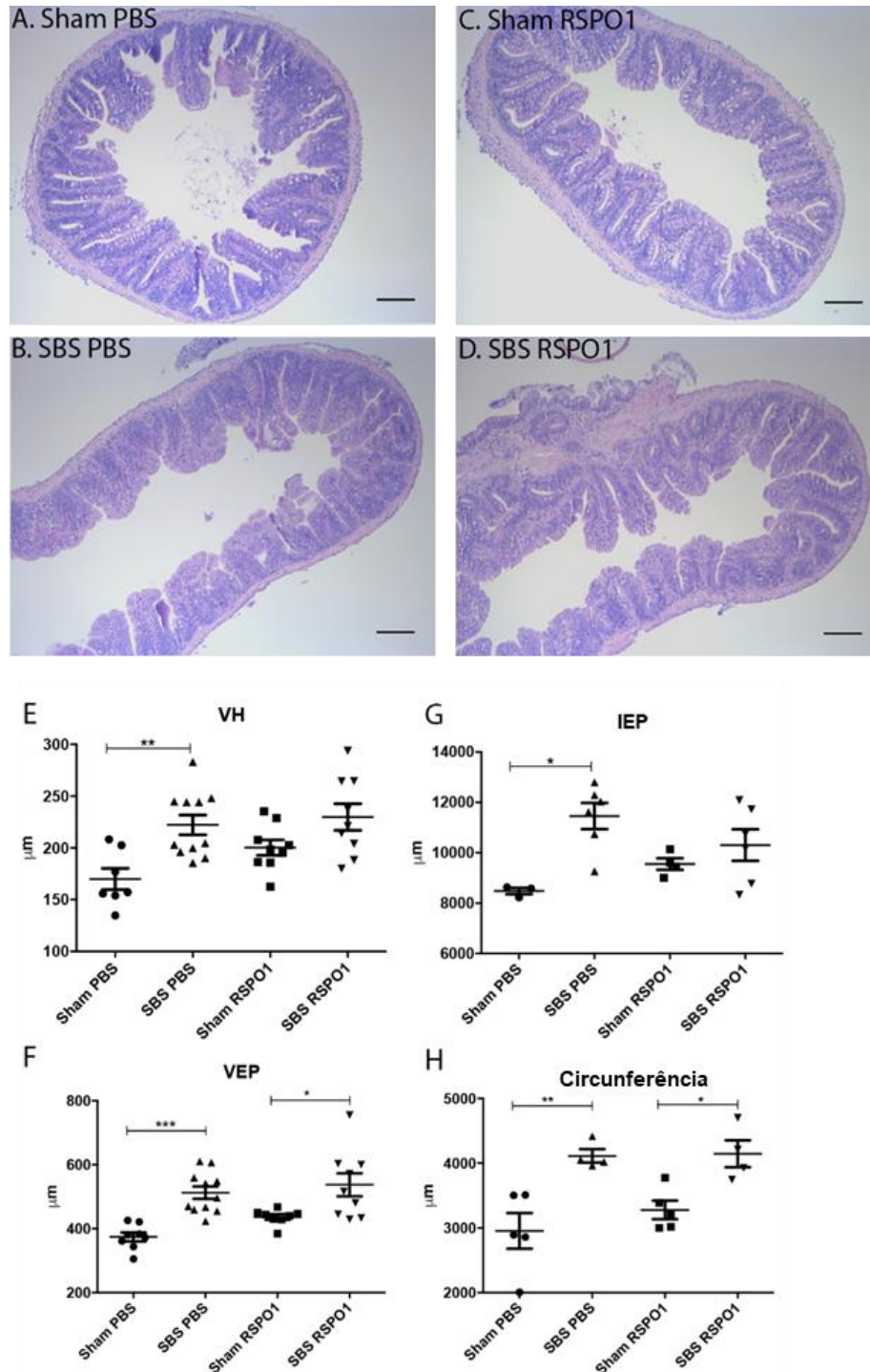


Figura 37 - Parâmetros histológicos de adaptação intestinal à SIC/SBS em ZF após sete dias de tratamento (protocolo de uma semana). Coloração com hematoxilina e eosina dos segmentos intestinais proximais dos grupos: sham PBS (A), SBS PBS (B), sham

RSPO1 (C) e SBS RSPO1 (D). Quantificações dos parâmetros intestinais: altura da vilosidade (VH) (E), perímetro do epitélio da vilosidade (VEP) (F), perímetro do epitélio intestinal (PEI) (G) e circunferência (H) dos segmentos intestinais proximais de cada grupo. Todas as barras de escala correspondem a 100 μ m. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

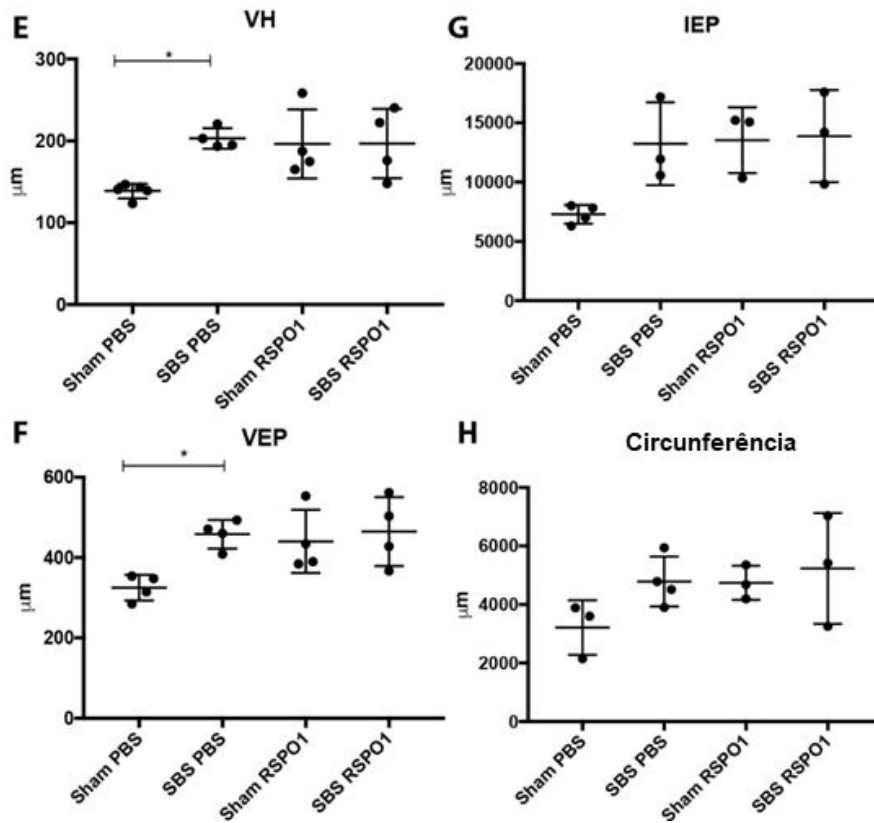
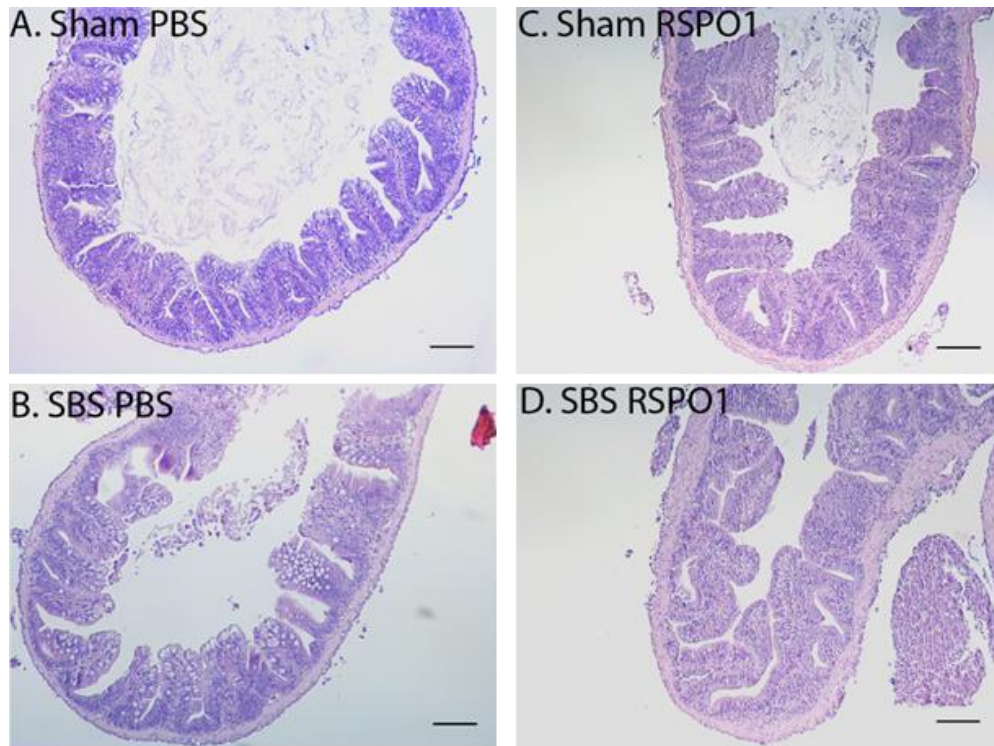


Figura 38 - Parâmetros histológicos de adaptação intestinal à SIC/SBS em ZF após 14 dias de tratamento (protocolo de duas semanas). Coloração com hematoxilina e eosina dos segmentos intestinais proximais dos grupos: sham PBS (A), SBS PBS (B), sham RSPO1 (C) e SBS RSPO1 (D). Quantificações dos parâmetros intestinais: altura da vilosidade (VH) (E), perímetro do epitélio da vilosidade (VEP) (F), perímetro do epitélio intestinal (PEI) (G) e circunferência (H) dos segmentos intestinais proximais de cada grupo. Todas as barras de escala correspondem a 100µm. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

4.21 rhRSPO1 aumenta a proliferação de células epiteliais intestinais em sete dias após cirurgia de SIC/SBS

BrdU é um análogo sintético da timidina, sendo absorvido durante a divisão ativa das células e incorporado ao DNA. Neste trabalho, o BrdU foi administrado aos ZF antes da coleta e detectado por imunofluorescência como forma de quantificação do número de células em proliferação (Figura 39). Após uma semana, os peixes SBS PBS apresentaram aumento no número de células BrdU+/vilosidade em comparação aos peixes sham PBS ($4,3 \pm 0,5$ células BrdU+/vilosidade vs $1,9 \pm 0,5$ células BrdU+/vilosidade, $p = 0,03$) (Fig. 39A, B, E), corroborando achados anteriores (Schall et al., 2015). Da mesma forma, os peixes SBS RSPO1 apresentaram um aumento na incorporação de BrdU em comparação com o grupo sham RSPO1 ($7,1 \pm 0,6$ células BrdU+/vilosidade vs $2,8 \pm 0,4$ células BrdU+/vilosidade, $p = 0,001$) (Fig. 39C-E). Entretanto, o que é interessante destacar é o aumento de 1,6 vezes no número de células BrdU+/vilosidade nos peixes SBS RSPO1 em resposta ao tratamento, quando comparados ao seu respectivo grupo controle SBS PBS ($7,1 \pm 0,6$ células BrdU+/vilosidade vs $4,3 \pm 0,5$ células BrdU+/vilosidade, $p = 0,001$) (Fig. 39B, D, E).

Em duas semanas, conforme visto anteriormente, também houve um aumento da marcação epitelial de BrdU em peixes dos grupos SBS PBS em comparação com sham PBS ($8,6 \pm 1,3$ células BrdU+/vilosidade vs $3,2 \pm 0,4$ células BrdU+/vilosidades, $p = 0,04$) (Fig. 39F, G, J). Contudo, neste protocolo não foi possível detectar diferenças significativas entre os grupos SBS RSPO1 e sham RSPO1 ($6,5 \pm 2,2$ células BrdU+/vilosidade vs $5,5 \pm 0,2$ células BrdU+/vilosidades, $p = 0,97$) (Fig. 39H-J) ou entre SBS RSPO1 e SBS PBS ($6,5 \pm 2,2$ células BrdU+/vilosidades vs $8,6 \pm 1,3$ células BrdU+/vilosidades, $p = 0,67$) (Fig. 39G, I, J), possivelmente devido à alta variabilidade nestes grupos.

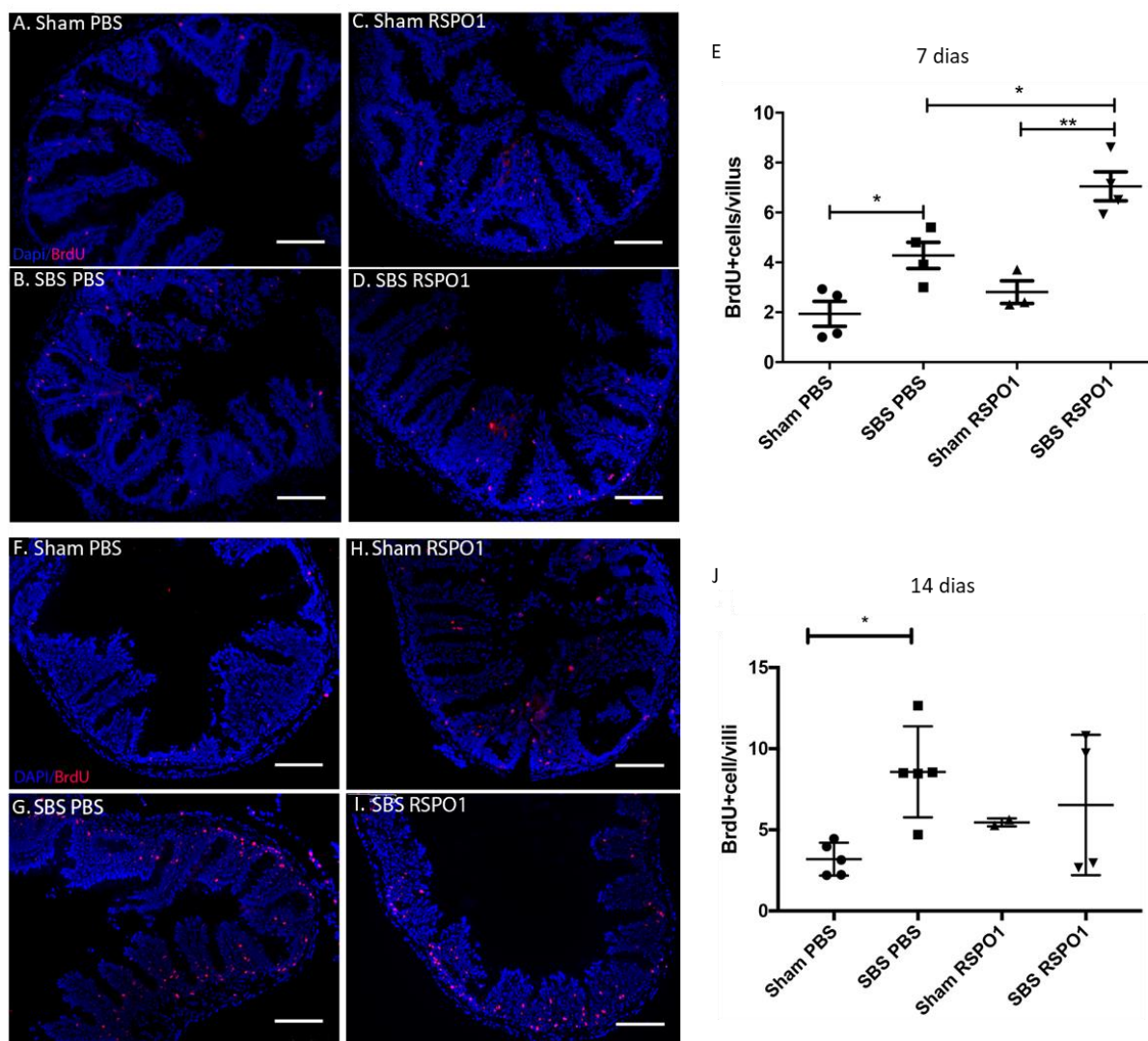


Figura 39 - Proliferação celular no epitélio intestinal proximal em ZF em 7 ou 14 dias de tratamento após cirurgias de SIC/SBS (Ensaio de incorporação de BrdU). Marcação imunofluorescente das secções intestinais proximais indicando células positivas para BrdU (em vermelho) após 7 (protocolo de uma semana) ou 14 dias (protocolo de duas semanas), respectivamente, nos grupos: sham PBS (A, F), sham RSP01 (C, H), SBS PBS (B, G), SBS RSP01 (D, I). Quantificação de células BrdU+/vilosidade (E, J). As barras de escala correspondem a 100µm. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

4.22 rhRSP01 não afeta a morte celular no epitélio intestinal em 7 ou 14 dias após cirurgia de SIC/SBS

A imunofluorescência para CC3, um marcador de morte celular, demonstrou que a rhRSP01 não interfere no processo de morte celular no epitélio intestinal de ZF em 7 (Figura 40A-E) ou 14 dias (Fig. 40F-J) de tratamento após cirurgias de SIC/SBS ou sham. Neste período, não houve nenhuma diferença significativa na marcação de CC3 entre nenhum dos grupos (Fig. 40), o que sugere que o processo

cirúrgico de indução da SIC/SBS, assim como o tratamento com rhRSPO1, também não interfere na morte celular.

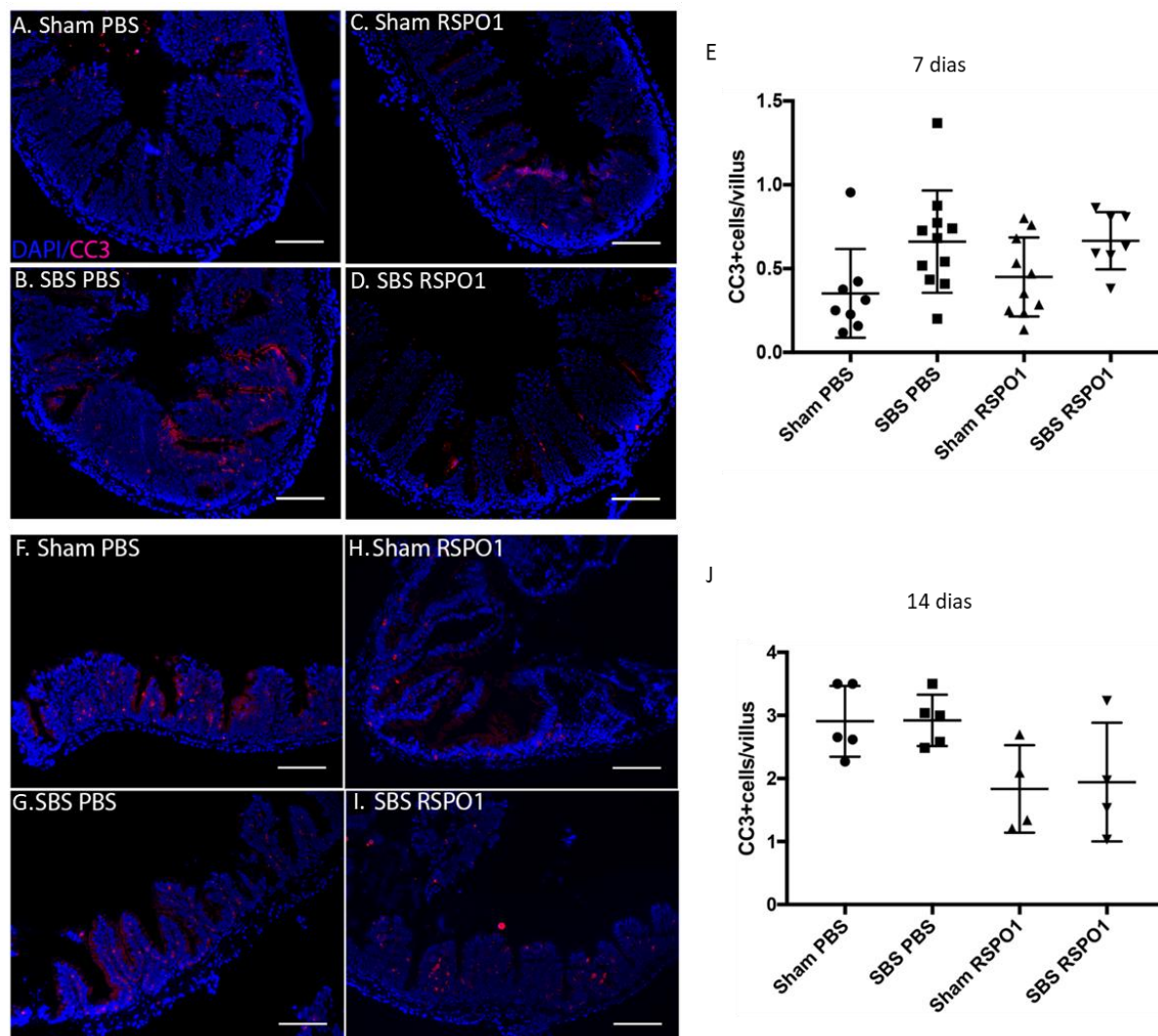


Figura 40 - Morte celular no epitélio intestinal proximal de ZF em 7 ou 14 dias de tratamento após cirurgias de SIC/SBS. Marcação imunofluorescente das secções intestinais proximais indicando células positivas para CC3 (em vermelho) após 7 (protocolo de uma semana) ou 14 dias (protocolo de duas semanas), respectivamente, nos grupos: sham PBS (A, F), sham RSPO1 (C, H), SBS PBS (B, G), SBS RSPO1 (D, I). Quantificação de células CC3+/vilosidade (E, J). As barras de escala correspondem a 100 μ m.

4.23 rhRSPO1 induz uma maior expressão de β -catenina em 14 dias após cirurgia de SIC/SBS

A marcação imunofluorescente para β -catenina, um importante mediador da via canônica de Wnt, demonstrou níveis elevados de expressão da proteína nos grupos SBS, após 7 dias (Figura 41A-E), e nos grupos tratados com rhRSPO1, transcorridos 14 dias das cirurgias de SIC/SBS ou sham (Figura 41F-J), sugerindo

indução dessa via. Após uma semana, os peixes SBS PBS e SBS RSPO1 apresentaram aumento no número de células β -catenina+/vilosidade nos segmentos intestinais em comparação aos seus respectivos controles sham, sham PBS ($3,07 \pm 0,23$ células β -catenina+/vilosidade vs $1,15 \pm 0,11$ células β -catenina+/vilosidade, $p < 0,0001$) (Fig. 41A, B, E) e sham RSPO1 ($3,35 \pm 0,28$ células β -catenina+/vilosidade vs $1,87 \pm 0,18$ células β -catenina+/vilosidade, $p = 0,0002$) (Fig. 41C-E). No entanto, não houve diferença significativa entre os dois tratamentos nos grupos SBS ($3,07 \pm 0,23$ células β -catenina+/vilosidades vs $3,35 \pm 0,28$ células β -catenina+/vilosidades, $p = 0,8$) (Figura 41B, D, E). Após o período de duas semanas, houve aumento de células β -catenina+ no grupo SBS RSPO1 em comparação com sham SBS PBS ($4,4 \pm 0,14$ células β -catenina+/vilosidades vs $2,66 \pm 0,11$ células β -catenina+/vilosidades, $p < 0,0001$) (Fig. 41G, I, J). Além disso, também foi observado um aumento de células β -catenina+ em decorrência da cirurgia de SIC/SBS, tanto nos grupos SBS PBS em comparação com o sham PBS ($2,66 \pm 0,11$ células β -catenina+/vilosidades vs $1,02 \pm 0,12$ células β -catenina+/vilosidades, $p = 0,0001$) (Fig. 41F, G, J), quanto nos grupos SBS RSPO1 vs sham RSPO1 ($4,4 \pm 0,14$ células β -catenina+/vilosidades vs $3,0 \pm 0,28$ células β -catenina+/vilosidades, $p = 0,0008$) (Fig. 41H-J).

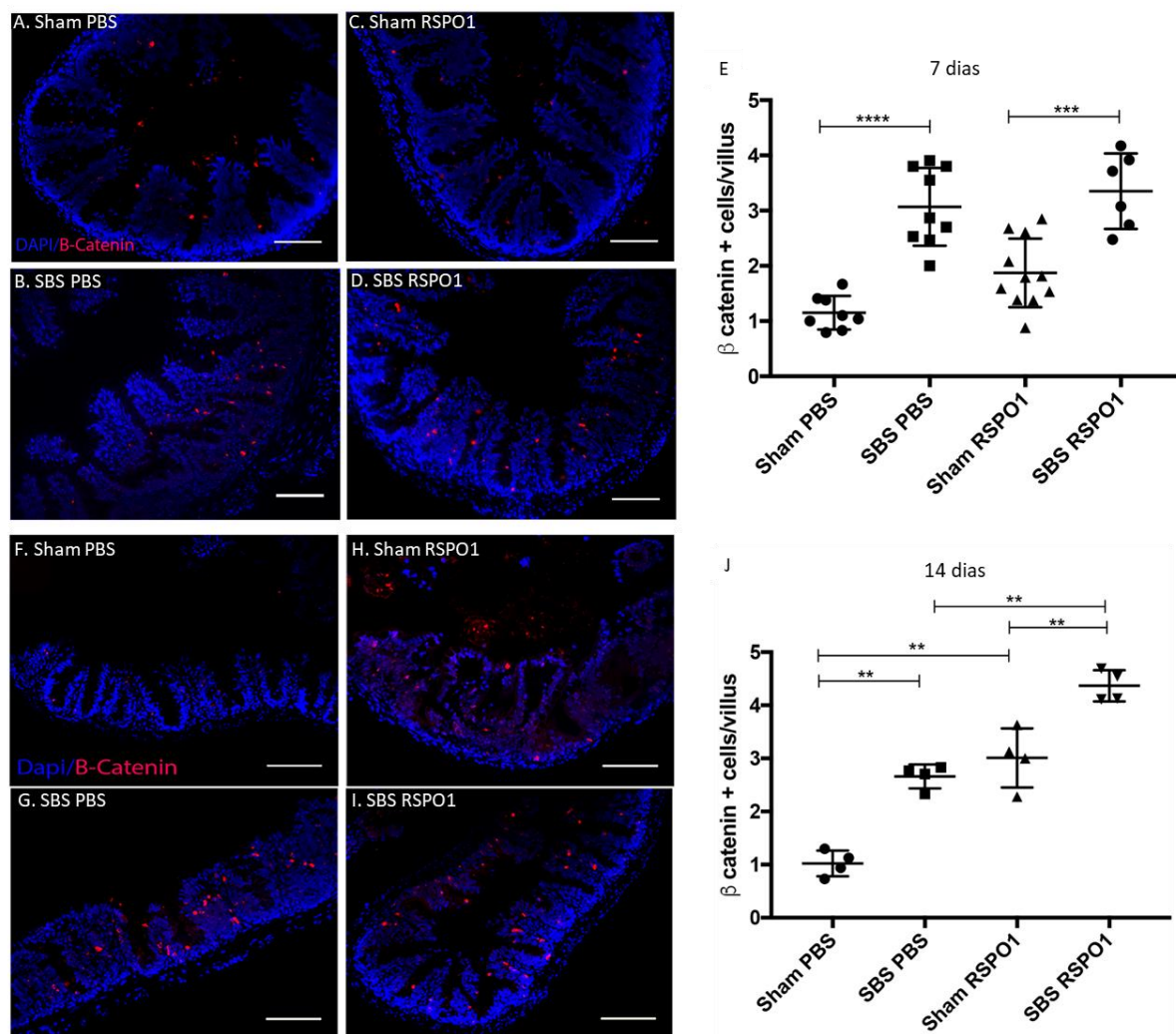


Figura 41 - Expressão proteica de β -catenina no epitélio do intestino proximal dos ZF em 7 ou 14 dias de tratamento após cirurgias de SIC/SBS. Marcação imunofluorescente de secções intestinais proximais mostrando células positivas para β -catenina (em vermelho) após 7 (protocolo de uma semana) ou 14 dias (protocolo de duas semanas), respectivamente, nos grupos: nos grupos: sham PBS (A, F), SBS PBS (B, G), sham RSP01 (C, H) e SBS RSP01 (D, I). Quantificação de células β -catenina+/vilosidade (E, J). As barras de escala correspondem a 100 μ m. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

4.24 rhRSP01 parece não interferir com a expressão gênica de *ciclina D1*, *c-myc*, *yap1* e β -catenina a nível de mRNA em 14 dias após cirurgia de SIC/SBS

Dado o tamanho amostral utilizado e a variabilidade dos resultados de qRT-PCR dos genes alvo selecionados, não foi possível verificar nenhuma correlação significativa entre os tratamentos realizados e/ou as cirurgias de SIC/SBS ou sham (Figura 42). Portanto, nenhuma diferença significativa entre os grupos foi observada para a expressão relativa de mRNA dos seguintes genes: *ciclina D1* (Fig. 42A), relacionada com o ciclo celular; *c-myc* (Fig. 42B), um fator de transcrição e dos

genes alvo da via de Wnt; *yap1* (Fig. 42C), um regulador transcricional envolvido com a proliferação celular, e; β -*catenina*, um mediador da via canônica de Wnt (Fig. 42D).

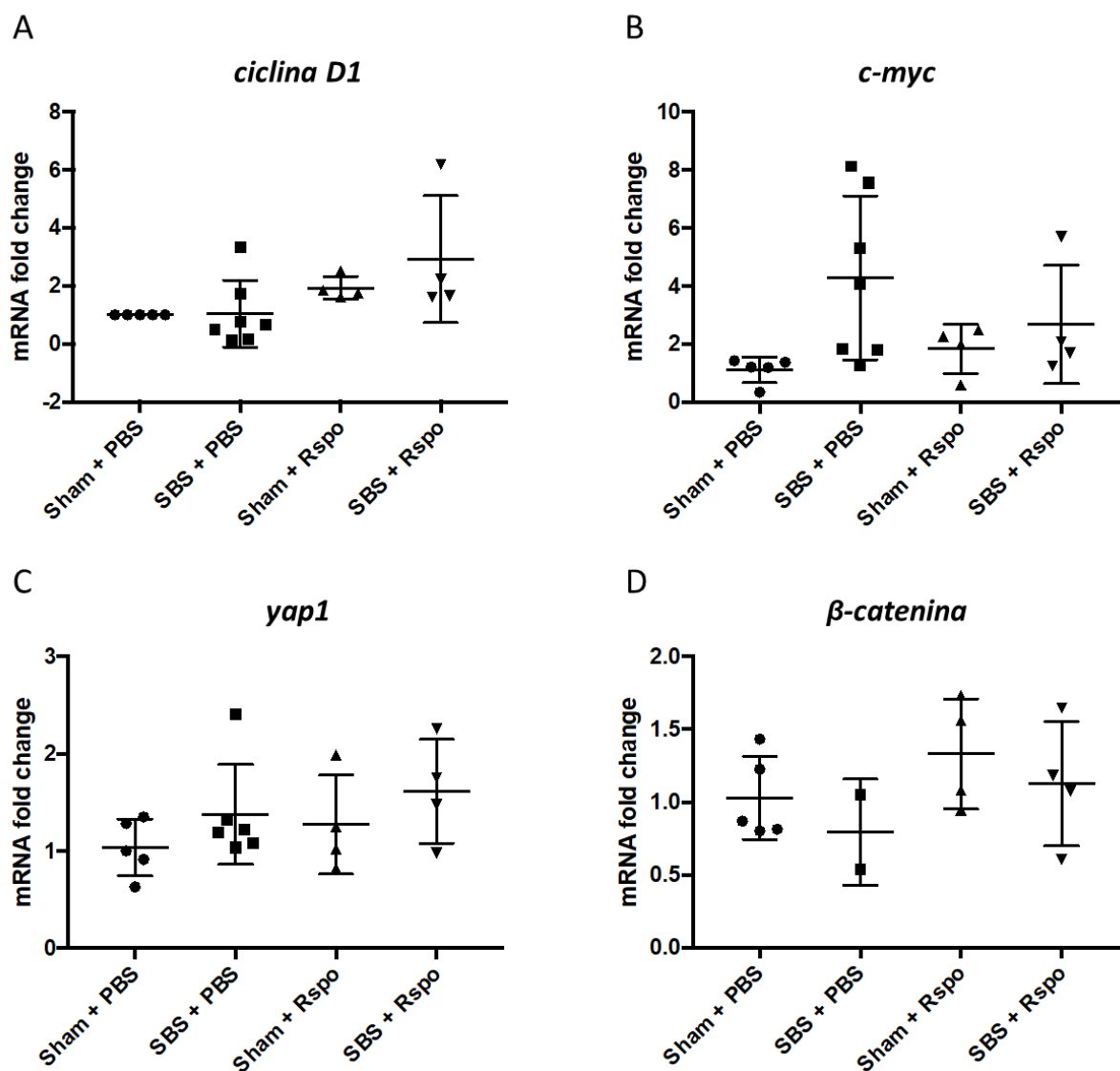


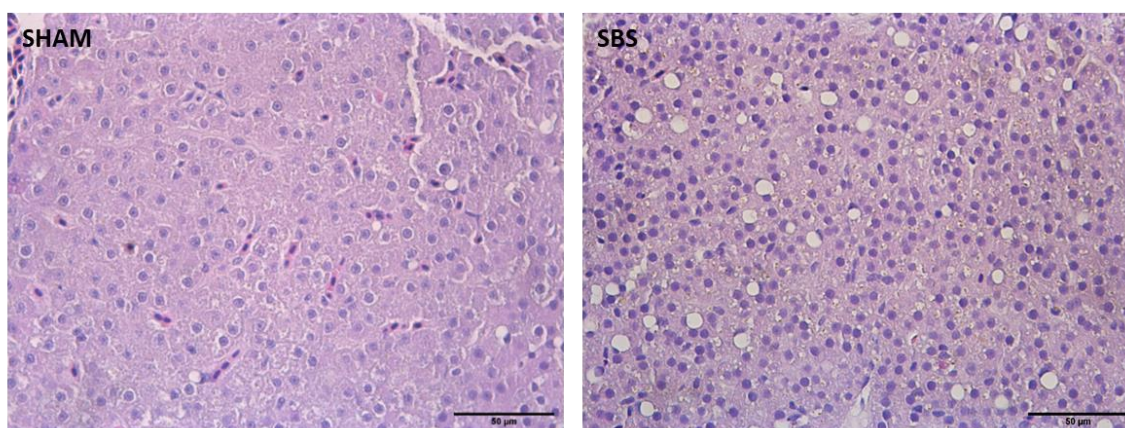
Figura 42 - Expressão relativa por qRT-PCR: (A) *ciclina D1*, (B) *c-myc*, (C) *yap1* e (D) β -*catenina*. Amostras do intestino proximal de ZF após 14 dias de tratamento (rhRSPO1 ou PBS) após cirurgias de SIC/SBS. Grupos: sham PBS, SBS PBS, sham RSP01 e SBS RSP01. Os dados do experimento foram normalizados em relação à expressão de *Gapdh*, utilizado como gene endógeno de referência. ** $p < 0,005$.

4.25 O tratamento com rhRSPO1 não melhora a esteatose hepática no modelo de SIC/SBS em ZF

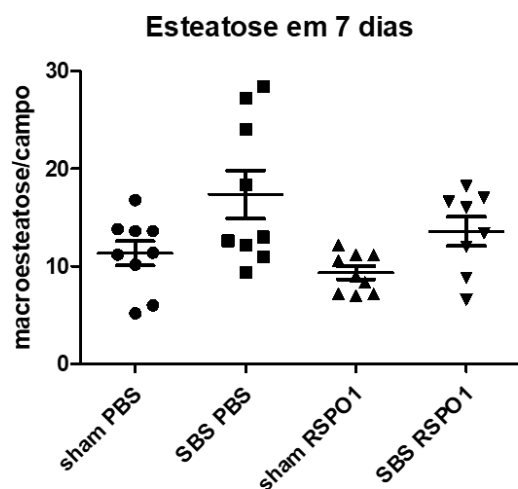
De acordo com o resultado esperado para o modelo de SIC, a contagem do número de focos de macroesteatose hepática por campo de magnificação resultou

na detecção de um aumento significativo do número de focos nos grupos SBS em relação a sham, 14 dias após as cirurgias (Figura 43A-C). Tanto o grupo SBS PBS quanto SBS RSPO1 apresentaram um aumento de 2,5 vezes nos focos de macroesteatose hepática em relação a seus respectivos grupos controle, sham PBS ($23,1 \pm 1,7$ vs $8,95 \pm 0,38$, $p < 0,0001$) e sham RSPO1 ($21,3 \pm 1,5$ vs $8,4 \pm 1,8$, $p < 0,0001$), respectivamente (Fig. 43C). Entretanto, neste experimento, não foi possível verificar diferenças significativas na correlação entre a contagem de focos de macroesteatose e os tratamentos com rhRSPO1 ou PBS (Fig. 43C).

A



B



C

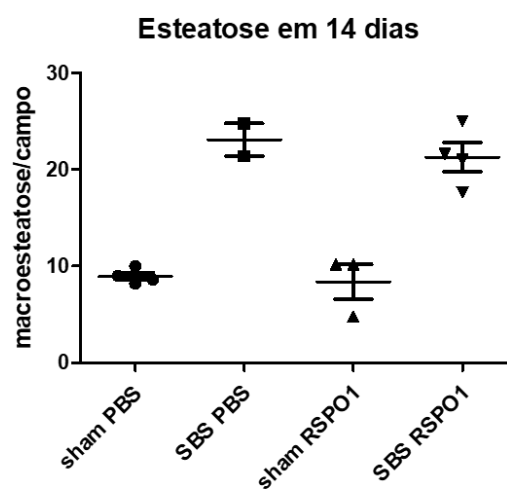


Figura 43 - Macroesteatose hepática em uma ou duas semanas de tratamento após cirurgias de SIC/SBS em ZF. Grupos: sham PBS, SBS PBS, sham RSPO1 e SBS RSPO1. (A) coloração de H&E de fígado de ZF; Quantificação de focos de macroesteatose hepática por campo de magnificação em (B) uma ou (C) duas semanas. As barras de escala correspondem a 50µm.

5. DISCUSSÃO

Capítulo I – Produção, purificação e caracterização da rhRSPO1

Neste trabalho, descrevemos a produção, purificação e caracterização da RSPO1 humana recombinante expressa utilizando células HEK293 e CHODG44, os dois sistemas de expressão de células de mamífero mais utilizados para a produção de biofármacos. A proteína rhRSPO1 produzida foi purificada, caracterizada em relação à sua estrutura peptídica e padrão de glicosilação, além da atividade biológica *in vitro* e *in vivo*. Durante esse processo, uma nova estratégia de purificação, utilizando duas etapas cromatográficas sequenciais, foi projetada para otimizar a produção da proteína alvo com alta eficiência e pureza.

Os resultados aqui apresentados indicam que o sistema de expressão de células HEK293 foi eficiente para a produção de rhRSPO1, resultando em níveis elevados de produção e atividade biológica. A proteína rhRSPO1 produzida pode ser detectada no meio de cultivo celular através dos imunoenaios de *Dot Blot*, *Western Blot* e ELISA, confirmando assim a secreção da proteína para o meio extracelular. Tal resultado é consistente com a presença de uma sequência de peptídeo sinal putativa, e corrobora os relatos da literatura que descrevem a secreção das RSPOs para o meio extracelular (KAZANSKAYA; GLINKA; DEL BARCO BARRANTES; STANNEK *et al.*, 2004; NAM; TURCOTTE; SMITH; CHOI *et al.*, 2006). Segundo Nam e colaboradores, a localização subcelular das proteínas RSPO no retículo endoplasmático e no complexo de Golgi indica que RSPOs são processadas através da via secretora canônica (NAM; TURCOTTE; SMITH; CHOI *et al.*, 2006). Contudo, ao contrário de trabalhos que descrevem uma baixa detecção das RSPOs no meio condicionado, possivelmente pela associação dessas à matriz extracelular (MEC), à superfície celular, ou a ambas (KAZANSKAYA; GLINKA; DEL BARCO BARRANTES; STANNEK *et al.*, 2004; NAM; TURCOTTE; SMITH; CHOI *et al.*, 2006), no presente trabalho, a proteína rhRSPO1 produzida em células HEK293 foi detectada em altos níveis. Neste sistema de expressão, o clone superprodutor Cl.L1 atingiu uma concentração de 1,94µg/mL e 1,21µg/mL de rhRSPO1 no meio condicionado, em cultivo na presença e na ausência de SFB, respectivamente. Já para o sistema de células CHO-DG44, a quantificação da expressão de rhRSPO1 pelo ensaio de ELISA mostrou-se ineficiente, possivelmente devido a algum

componente presente no meio de cultura utilizado com estas células. Ademais, a comparação relativa da expressão de rhRSPO1 por imunoblots não mostrou uma produção expressiva neste sistema em comparação com as células HEK293.

Proteoglicanos de sulfato de heparano (HSPGs), incluindo Sindecanos e Glipicanos, estão localizados na superfície da célula e na MEC, funcionando como reguladores de diversas vias de sinalização celular, incluindo WNT, FGF, BMP, e SHH (FICO; MAINA; DONO, 2011; LIN, 2004). De acordo com a literatura, o tratamento de células com heparina solúvel ou clorato de sódio, um inibidor para a sulfatação de GAGs, aumenta significativamente o nível da proteína RSPO livre detectada no meio condicionado e das proteínas RSPOs fortemente ligadas à heparina imobilizada (NAM; TURCOTTE; SMITH; CHOI *et al.*, 2006), o que sugere que as RSPOs podem se ligar aos HSPGs. Contudo, como a rhRSPO1 produzida neste trabalho foi detectada em níveis elevados no meio condicionado, outras estratégias para se aumentar a liberação dessa proteína não foram necessárias, evitando, assim, o uso de aditivos na cultura.

Estudos de deleção de domínio demonstraram que a proteína RSPO sem o domínio BR ou sem ambos os domínios TSR e BR foi facilmente detectada como uma proteína solúvel no meio condicionado (KAZANSKAYA; GLINKA; DEL BARCO BARRANTES; STANNEK *et al.*, 2004; NAM; TURCOTTE; SMITH; CHOI *et al.*, 2006), apresentando afinidade significativamente inferior à heparina (NAM; TURCOTTE; SMITH; CHOI *et al.*, 2006). Entretanto, um estudo posterior verificou que a proteína RSPO sem esses domínios ativa a via de sinalização canônica de WNT de forma menos eficaz (KIM; WAGLE; TRAN; ZHAN *et al.*, 2008). Portanto, dessa forma, neste trabalho optou-se pela produção da proteína rhRSPO1 com a sua estrutura completa, sem a deleção de qualquer domínio.

A proteína rhRSPO1, produzida e purificada neste trabalho, mostrou-se biologicamente ativa, com atividade biológica *in vitro* semelhante à rhRSPO1 comercialmente disponível (R&D), conforme demonstrado por ensaio de fosfatase alcalina após indução osteogênica de células C2C12. Consistente com a ação sinérgica das RSPOs com os ligantes WNT, descrita anteriormente, a adição de Wnt-3a durante a indução de células C2C12 com rhRSPO1 elevou os níveis de fosfatase alcalina produzidos em relação aqueles verificados com a proteína rhRSPO1 sozinha, indicando, portanto, que a diferenciação osteoblástica ocorreu de

maneira mais pronunciada (KIM; KAKITANI; ZHAO; OSHIMA *et al.*, 2005; LU; KIM; LIU; ABO *et al.*, 2008). Além disso, o ensaio de atividade biológica *in vivo*, no qual camundongos foram injetados (i.v.) com 50µg de rhRSPO1 por três dias consecutivos, demonstrou que esta proteína também possui atividade biológica nesse modelo. Um aumento do diâmetro do intestino delgado (jejuno médio) dos animais foi observado na análise histológica dos tecidos, embora essa diferença não tenha sido observada macroscopicamente. A altura do eixo da cripta-vilosidade foi significativamente maior nos animais tratados com rhRSPO1 em comparação ao grupo controle, sugerindo que a rhRSPO1 induziu o crescimento do epitélio intestinal, provavelmente pela indução de proliferação em células-tronco intestinais (LGR5+) (DE LAU; BARKER; CLEVERS, 2007; KIM; KAKITANI; ZHAO; OSHIMA *et al.*, 2005; OOTANI; LI; SANGIORGI; HO *et al.*, 2009; SATO; VRIES; SNIPPERT; VAN DE WETERING *et al.*, 2009). No entanto, vale ressaltar que, apesar do efeito indutivo significativo da rhRSPO1 no crescimento intestinal, essa proteína não foi capaz de duplicar o diâmetro intestinal nos animais, conforme relatado por Kim e colaboradores nesse mesmo modelo (KIM; KAKITANI; ZHAO; OSHIMA *et al.*, 2005), possivelmente devido à variabilidade entre os animais ou precisão das técnicas de medições.

Em relação à purificação da rhRSPO1, vale ressaltar que, neste trabalho, desenvolvemos uma nova estratégia de purificação usando duas etapas cromatográficas sequenciais, permitindo otimizar a produção da proteína alvo de maneira estável e com alto grau de pureza (90%). Ao longo do processo, houve um aumento no nível de pureza da proteína alvo a cada etapa cromatográfica, resultando em um enriquecimento de quase 30 vezes em relação à amostra inicial. Primeiramente, a cromatografia de afinidade permitiu a separação das proteínas com domínios de ligação à heparina, incluindo a rhRSPO1, das demais e, em seguida, a cromatografia de exclusão molecular possibilitou a separação das proteínas por tamanho. Anteriormente, três artigos principais da literatura descreveram brevemente a produção da proteína RSPO1 humana recombinante em células de mamíferos (KIM; KAKITANI; ZHAO; OSHIMA *et al.*, 2005; TSUCHIYA; NIWA; SIMIZU, 2016; ZHAO; DE VERA; NARUSHIMA; BECK *et al.*, 2007). Kim e colaboradores usaram células HEK293 adaptadas ao crescimento em suspensão, como sistema biológico para expressão de rhRSPO1, obtendo níveis proteicos em

torno de 2,5mg/L, com alta pureza (KIM; KAKITANI; ZHAO; OSHIMA *et al.*, 2005). Paralelamente, Zhao e colaboradores expressaram RSPO1 recombinante na linhagem celular CHO, atingindo também um alto nível de pureza, contudo, detalhes sobre a expressão das proteínas não foram revelados (ZHAO; DE VERA; NARUSHIMA; BECK *et al.*, 2007). Em ambos os artigos, cromatografia de troca iônica foi utilizada para purificação da rhRSPO1. Por outro lado, Tsuchiya *et al.*, utilizaram a linhagem celular de fibrossarcoma humano HT1080 para expressar a rhRSPO1 e esferas de Heparina/Sepharose 6 (*Heparin Sepharose 6 beads*) para purificação das proteínas, porém, detalhes do processo, bem como o nível de pureza atingido, também não foram descritos (TSUCHIYA; NIWA; SIMIZU, 2016).

Outros dois grupos também expressaram fragmentos de RSPO1 em outros sistemas que não células de mamíferos. Moad e Pioszak utilizaram células de bactérias *E. coli* para expressar de forma estável os domínios 1-2 semelhantes à furina ricos em cisteína (CR-FU1-2) da proteína RSPO1, acreditando na metodologia como uma forma de produção de baixo custo (MOAD; PIOSZAK, 2013). Wang e colaboradores, por sua vez, também expressaram e purificaram um fragmento de RSPO1 humano contendo os domínios CR-FU1-2, utilizando células de insetos infectadas com baculovírus (WANG; HUANG; ZHANG; YU *et al.*, 2013). No entanto, conforme mencionado anteriormente, embora alguns autores afirmem que o domínio CR-FU é suficiente para potencializar a via WNT (KAZANSKAYA; GLINKA; DEL BARCO BARRANTES; STANNEK *et al.*, 2004), um outro estudo afirma que as proteínas sem os domínios BR e TSR ativam a via canônica de WNT de forma menos eficiente (KIM; WAGLE; TRAN; ZHAN *et al.*, 2008).

As análises de caracterização estrutural da rhRSPO1 produzida no presente trabalho permitiram acrescentar informações importantes aos dados já presentes na literatura, descrevendo, pela primeira vez, a composição de glicano de sua cadeia de oligossacarídeos. A partir do ensaio de glicosilação por LC-MS/MS realizado, foi possível confirmar a presença de uma N-glicosilação na Asn137 da cadeia polipeptídica pela presença de uma massa de 162Da no espectro, conforme descrito por outros autores (CHANG; HSU; WENG; CHEN *et al.*, 2016; TSUCHIYA; NIWA; SIMIZU, 2016). Embora a análise de LC-MS/MS tenha levado à identificação de glicosilação (glicação), uma análise mais ampla, incluindo os resultados da digestão enzimática com PNGase F e painel de lectinas, apontam para a presença de uma

estrutura de glicanos híbrida mais complexa, contendo ácido siálico terminal, N-acetilglucosamina e/ou galactose. O fato de outros tipos de glicosilação não terem sido encontrados pela análise de LC-MS/MS não descarta a possibilidade da existência de tais estruturas na amostra, uma vez que fragmentos com múltiplos eventos de glicosilação são frequentemente protegidos da digestão enzimática e não geram fragmentos ionizados, especialmente devido à sua natureza hidrofóbica. Portanto, os resultados do painel de lectinas e a digestão com PNGase F complementam a análise LC-MS/MS, gerando uma descrição mais robusta do perfil de glicosilação da rhRSPO1.

As N-glicosilações desempenham um papel crucial durante a maturação e secreção de muitas proteínas (MOREMEN; TIEMEYER; NAIRN, 2012). A partir de ensaios com proteínas mutantes desglicosilada, Chang et al. concluíram, em 2016, que a presença de N-glicosilação na Asn137 interfere positivamente na secreção da proteína rhRSPO1 para o meio extracelular, na estabilidade intracelular e, de maneira sutil, na estabilidade da proteína secretada, sendo importante para seu acúmulo no meio de cultura (CHANG; HSU; WENG; CHEN *et al.*, 2016). Estes autores sugerem, ainda, que a glicosilação é importante para o dobramento da rhRSPO1 e não interfere com sua capacidade de ligação à heparina. Entretanto, de maneira oposta, em 2017, Tsuchiya e colaboradores demonstraram que a N-glicosilação reduziu a secreção de rhRSPO1 para o meio de cultura e, também, sua capacidade de induzir a via canônica de Wnt (TSUCHIYA; NIWA; SIMIZU, 2016). Os resultados conflitantes apresentados por esses dois grupos destacam a importância de caracterizar o perfil de glicosilação da rhRSPO1, uma vez que as proteínas recombinantes utilizadas em cada um desses artigos foram geradas utilizando diferentes sistemas de expressão e que, possivelmente, apresentam diferenças em seu perfil de glicosilação.

Resultados da literatura sugerem que a glico-engenharia pode ser utilizada para melhorar a função terapêutica de proteínas recombinantes. A adição de ácidos siálicos terminais às cadeias de glicanos das proteínas, como observado na rhRSPO1 produzida neste trabalho, contribui positivamente para uma maior estabilidade e meia-vida de diferentes proteínas (WALSH, 2010) e pode, também, reduzir possíveis reações imunes (LÜBBERS; RODRÍGUEZ; VAN KOOYK, 2018). Portanto, a caracterização da glicosilação da rhRSPO1 realizada no presente

trabalho avança ainda mais na tentativa de elucidar as divergências presentes na literatura em relação ao papel da glicosilação no dobramento, secreção, estabilidade e atividade biológica da rhRSPO1, dependendo do sistema de expressão utilizado. Vale ressaltar que as proteínas produzidas em células humanas HEK apresentam alta similaridade, no que diz respeito às modificações pós-traducionais e função, comparadas às que ocorrem naturalmente em humanos, justificando, assim, a escolha desse sistema para expressão da rhRSPO1 (BANDARANAYAKE; ALMO, 2014). Contudo, experimentos adicionais fazem-se necessários para concluir a caracterização dos glicanos presentes na rhRSPO1 em cada sistema de expressão e elucidar os resultados divergentes sobre os efeitos da N-glicosilação na atividade da proteína obtidos pelos dois grupos mencionados acima. Além disso, estes experimentos também poderão contribuir para melhor compreender as possíveis correlações existentes entre a glicosilação da rhRSPO1 e sua secreção, estabilidade e atividade biológica.

Conforme mencionado anteriormente, todas as proteínas RSPOs possuem um domínio TSR1, que se liga à heparina ou HSPGs (NAM; TURCOTTE; SMITH; CHOI *et al.*, 2006). C-manosilação e O-fucosilação foram indicadas como formas de glicosilação domínio-específicas do módulo de trombospondina tipo 1 (HOFSTEENGE; HUWILER; MACEK; HESS *et al.*, 2001). Embora prevista, a massa de 203Da relativa a uma O-GlcNac não foi encontrada na rhRSPO1 pela análise de LC-MS/MS. A análise por espectrometria de massas também forneceu informações sobre a massa da rhRSPO1, que é de 29kDa, conforme descrito, também, nas bases de dados. Contudo, a migração eletroforética da proteína rhRSPO1, consistente com uma massa molecular de aproximadamente 39kDa foi observada através da eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE) sob condição redutora e desnaturante, conforme também relatado por outros na literatura, possivelmente devido a alterações na conformação tridimensional da proteína ou glicosilação.

Conforme já destacado anteriormente, a proteína RSPO1 possui um grande potencial terapêutico principalmente no campo da Medicina Regenerativa, dado o seu potencial mitogênico sobre células-tronco. De acordo com Abo & Clevers, o uso de moduladores da via de WNT, como proteínas RSPO, pode ser uma opção clinicamente mais segura do que o uso de ligantes WNT, em vista de sua

capacidade de regenerar tecidos lesionados sem violar a ordem natural de eventos de regeneração tecidual (ABO; CLEVERS, 2012). Portanto, ao contrário dos ligantes WNT, que têm um efeito pleiotrópico no organismo, a RSPO1 poderia ser utilizada para potencializar a reparação tecidual de tecidos específicos, evitando, assim, possíveis efeitos colaterais indesejados em outros tecidos do corpo, uma vez que a indução da via de WNT por essas proteínas é tecido-restrita. Além disso, a não equivalência das proteínas WNT e RSPOs em relação à indução da auto-renovação nas células-tronco intestinais LGR5+ foi observada em um trabalho publicado recentemente (YAN; JANDA; CHANG; ZHENG *et al.*, 2017), destacando a cooperação que ocorre entre essas proteínas. Portanto, as metodologias aqui descritas para produção e purificação de RSPO1 humana recombinante, biologicamente ativa, a ser utilizada em terapia celular, abrem novos caminhos para otimização adicional de seu bioprocessamento produtivo e podem contribuir, no futuro, para o tratamento de condições médicas, como mucosite induzida por quimioterapia (VAN VLIET; HARMSSEN; DE BONT; TISSING, 2010) ou radiação (LEY; GALUBA; SALATHE; MELIN *et al.*, 2017), doenças inflamatórias intestinais (KIM; KAKITANI; ZHAO; OSHIMA *et al.*, 2005; ZHAO; DE VERA; NARUSHIMA; BECK *et al.*, 2007), diabetes (LIU; HABENER, 2008; WONG; YEUNG; SCHULTZ; BRUBAKER, 2010), doenças articulares (KUANG; TONG; YANG; LIN *et al.*, 2008) e câncer (KUANG; TONG; YANG; LIN *et al.*, 2008; TONG; WIERDA; LIN; KUANG *et al.*, 2010; ZHOU; GENG; WANG; YI *et al.*, 2017), conforme sugerido anteriormente por vários autores com base em modelos animais.

Portanto, nessa primeira etapa do trabalho, foi gerada uma plataforma estável para a produção de hRSPO1 recombinante em células HEK293, bem como um protocolo eficiente e reprodutível para a purificação desta proteína, permitindo, assim, a produção de um produto proteico purificado, totalmente caracterizado e biologicamente ativo para ser utilizado na engenharia de tecidos e estudos investigativos. O presente trabalho abre caminho para uma otimização adicional do bioprocessamento de produção da rhRSPO1, visando sua aplicação biofarmacêutica no futuro. Além disso, a caracterização estrutural da cadeia peptídica da rhRSPO1, bem como do seu perfil de glicosilação, identificando estruturas de glicanos como ácido siálico terminal, N-acetilglucosamina e/ou galactose, devem contribuir para uma melhor compreensão desta proteína no futuro, em relação à sua atividade,

estabilidade e outros fatores importantes para seu uso clínico e em pesquisa. No entanto, um número maior de estudos ainda é necessário para se entender por completo os mecanismos moleculares envolvidos na atividade, secreção, estabilidade e outros aspectos envolvidos no reparo tecidual da RSPO1.

Capítulo II – Avaliação funcional da rhRSPO1 na Engenharia Tecidual

Capítulo II–A – OU/TESI

Na segunda etapa do trabalho, dando continuidade à colaboração com o grupo da Professora Tracy C. Grikscheit, da University of Southern California em Los Angeles e do Saban Research Institute do Children's Hospital Los Angeles, Califórnia, EUA, estabelecida previamente, investigou-se a atividade biológica da proteína RSPO1 recombinante humana, produzida e purificada em nosso laboratório, sobre o cultivo de unidades organóides intestinais (UO) murinas e a formação de intestino delgado engenheirado (TESI, do inglês *Tissue-Engineered Small Intestine*).

Para criar um intestino delgado funcional e viável, utilizando engenharia de tecidos, novas abordagens para melhorar a formação de TESI são necessárias. Entre os vários desafios e dificuldades para viabilizar essa forma de tratamento, a manutenção e expansão de UOs intestinais *in vitro*, para geração de TESI com massa suficiente para transplante, é crucial (BELCHIOR; SOGAYAR; GRIKSCHIEIT, 2014; GRANT; MOJICA; SALA; HILL *et al.*, 2015; HOU; CHANG; TRECARTIN; BARTHEL *et al.*, 2018). Dado que a rhRSPO1 exibe atividade mitogênica em células-tronco intestinais e promove a cultura de enteróides *in vitro*, atuando através da ativação da via de Wnt, neste trabalho buscamos superar esses gargalos aplicando essa proteína à cultura de UO intestinais e durante a formação de TESI.

No presente trabalho, mostramos que as unidades organoides intestinais de camundongos tratadas com rhRSPO1 exibem tamanho e sobrevivência aumentados *in vitro* (Figura 26), uma melhoria que pode ser útil para subsequente geração de TESI, particularmente nos casos em que o material de origem do doador é limitado. Este efeito da rhRSPO1 é consequência da ativação da via canônica de Wnt/ β -catenina, evidenciada pelo aumento da expressão da proteína β -catenina não fosforilada (ativa) nas UOs tratadas com rhRSPO1 (Figura 30). Conforme esperado,

não foram observadas diferenças na expressão total do gene β -catenina ao nível transcricional, uma vez que a ativação da via de Wnt atua estabilizando a β -catenina ao nível preteico. Sabe-se que a proteína β -catenina não fosforilada ativa é estabilizada pela ativação da via de Wnt, se acumula no citoplasma e é translocada para o núcleo das células, passo essencial para a ativação de fatores transcricionais e genes alvo de Wnt, responsáveis por desencadear a resposta proliferativa nas células (CADIGAN; PEIFER, 2009; DE LAU; SNEL; CLEVERS, 2012; MACDONALD; TAMAI; HE, 2009).

Conforme mencionado anteriormente, embora os ligantes RSPO1 e Wnt induzam a proliferação de células-tronco, essas proteínas têm ações diferentes no processo de auto-renovação do epitélio intestinal (YAN; JANDA; CHANG; ZHENG *et al.*, 2017). Sabe-se que a RSPO1 atua como um mitógeno nas células-tronco intestinais Lgr5+ (PINTO; CLEVERS, 2005), apresentando um efeito sinérgico com as proteínas Wnt para potencializar a via canônica de sinalização de Wnt/ β -catenina (KAZANSKAYA; GLINKA; DEL BARCO BARRANTES; STANNEK *et al.*, 2004; KIM; KAKITANI; ZHAO; OSHIMA *et al.*, 2005). Wnt se liga aos receptores Fzd para ativar essa via, enquanto a RSPO1 se liga aos receptores acoplados à proteína G contendo repetições ricas em leucina 4-6 (Lgr4-6), potencializando seu efeito. A ligação RSPO1-Lgr4-6 aumenta a renovação dos receptores de Wnt através da inibição da proteína ZNRF3, aumentando consequentemente a disponibilidade desses receptores na membrana celular (CARMON; GONG; LIN; THOMAS *et al.*, 2011; DE LAU; BARKER; LOW; KOO *et al.*, 2011; GLINKA; DOLDE; KIRSCH; HUANG *et al.*, 2011; HAO; XIE; ZHANG; CHARLAT *et al.*, 2012; SCHUIJERS; CLEVERS, 2012). Portanto, como Lgr5 é um marcador de células-tronco, assim como o principal receptor da RSPO1, o aumento da expressão relativa deste receptor no grupo de UO tratadas com rhRSPO1, em comparação com o grupo controle, evidencia um aumento na concentração relativa de células-tronco nas UOs ou na produção desses receptores (Figura 29). Em ambos os casos, os resultados sugerem que o tratamento com rhRSPO1 promove tanto a manutenção do nicho de células-tronco das UOs quanto sua potencialidade (*stemness*).

Vários relatos na literatura demonstraram ser possível formar TESI a partir de unidades organoides de diferentes organismos, incluindo murinos (GRANT; MOJICA; SALA; HILL *et al.*, 2015; GRIKSCHIEIT; SIDDIQUE; OCHOA; SRINIVASAN

et al., 2004; HOU; CHANG; TRECARTIN; BARTHEL *et al.*, 2018; SALA; MATTHEWS; SPEER; TORASHIMA *et al.*, 2011), porcino (SALA; KUNISAKI; OCHOA; VACANTI *et al.*, 2009) e humano (FINKBEINER; FREEMAN; WIECK; EL-NACHEF *et al.*, 2015; GRANT; MOJICA; SALA; HILL *et al.*, 2015; HOU; CHANG; TRECARTIN; BARTHEL *et al.*, 2018; LEVIN; BARTHEL; SPEER; SALA *et al.*, 2013), semeadas em arcabouços poliméricos. Embora tenha sido possível melhorar os sintomas da SIC em ratos Lewis com a implantação de TESI *in vivo* (GRIKSCHEIT; SIDDIQUE; OCHOA; SRINIVASAN *et al.*, 2004), até o presente momento essa tecnologia ainda não foi testada para resgatar os sintomas da SIC em outras espécies, como camundongos e humanos, apesar de as funções digestivas e absorptivas do TESI já terem sido demonstradas nesses modelos (GRANT; MOJICA; SALA; HILL *et al.*, 2015). Portanto, a fim de otimizar a formação do TESI e melhorar as quantidades de material de partida e subsequente desenvolvimento do intestino tecido-engenheirado resultante, neste trabalho, geramos TESI de camundongo (mTESI) a partir de UOs tratadas com rhRSPO1. Pelos resultados obtidos, pudemos observar a formação de TESI em ambos os grupos experimentais, controle (PBS) e tratado com rhRSPO1, porém com diferenças evidentes quanto ao grau de maturidade dos tecidos e eficiência do processo. Foi observada uma melhora na formação do TESI na presença de rhRSPO1, evidenciada por uma taxa de sucesso da pega do enxerto aumentada, maior massa do TESI e maior nível de desenvolvimento em relação ao grupo controle (Figura 31).

A adição de rhRSPO1 ao TESI aumentou significativamente sua eficiência de formação, levando à obtenção de epitélio intestinal engenheirado em 100% das amostras tratadas (N=8), em comparação a 66,6% no grupo controle (N=9). Desses, aproximadamente 40% (3/8) atingiram o grau máximo de desenvolvimento (alta complexidade), apresentando epitélio intestinal contendo vilosidades maduras, criptas e células secretoras bem desenvolvidas. Embora não tenhamos observado a formação de TESI maduro (tecido de alta complexidade) no grupo controle, mantido na ausência de rhRSPO1, resultados anteriores do grupo da Dra. Grikscheit demonstraram ser sim possível alcançar tal resultado na ausência de fatores peptídicos de crescimento exógenos (SALA; MATTHEWS; SPEER; TORASHIMA *et al.*, 2011), contudo a eficiência reduzida nessas condições ressalta a necessidade de otimização do processo.

Para garantir a funcionalidade do TESI, é imprescindível se manter a estrutura correta do tecido, assemelhando-a ao intestino nativo. Portanto, a fim de avaliar a estrutura do TESI, os tecidos engenheirados foram qualitativamente caracterizados em relação aos componentes celulares presentes no epitélio intestinal, bem como componentes do sistema nervoso entérico e estruturas mesenquimais associadas, incluindo a camada muscular. Marcadores celulares específicos indicaram a formação de um epitélio intestinal engenheirado contendo todos os tipos de células diferenciadas em seus devidos respectivos locais, com a presença de enterócitos totalmente polarizados revestindo o epitélio, células caliciformes ao longo de todo o eixo cripta-vilosidade, células de Paneth na base da cripta, e células enteroendócrinas ao longo das vilosidades (Figura 32). Os enterócitos, que recobrem o epitélio com sua borda em escova (microvilosidades), garantem uma boa superfície de absorção, enquanto as células caliciformes secretam muco para o lúmen. As células enteroendócrinas secretam hormônios, que regulam o funcionamento intestinal, controlando o peristaltismo, o apetite, a função secretora de outras glândulas e outros processos fisiológicos. As células de Paneth, por sua vez, são responsáveis pela secreção de vários fatores peptídicos na região da base da cripta, condicionando seu ambiente para manter o nicho das células-tronco (DAY, 2006; POTTEN; GANDARA; MAHIDA; LOEFFLER *et al.*, 2009; SATO; STANGE; FERRANTE; VRIES *et al.*, 2011; VAN DER FLIER; CLEVERS, 2009).

Além de células totalmente diferenciadas, o epitélio do TESI induzido com rhRSPO1 apresentou ainda células-tronco Lgr5+ na base da cripta, e uma região de células amplificadoras de trânsito (TA) com alta taxa proliferativa na zona de transição cripta-vilosidade (Figura 33), conhecidas por sua importância na promoção do processo de auto-renovação intestinal (POTTEN; GANDARA; MAHIDA; LOEFFLER *et al.*, 2009; SCHUIJERS; CLEVERS, 2012). Ademais, assim como no intestino nativo, a presença de uma camada muscular e gânglios neuronais, localizados abaixo do epitélio intestinal, também foram observados no TESI induzido por rhRSPO1 (Fig. 33).

Embora Zhao e colaboradores argumentem que o tratamento com RSPO1 pode reduzir o risco tumorigênico, diminuindo a inflamação em doenças inflamatórias intestinais (ZHAO; DE VERA; NARUSHIMA; BECK *et al.*, 2007), vários outros autores sugerem que a sinalização aberrante da via de Wnt, especialmente a

hiperativação, está fortemente associada à presença de vários tipos de câncer em humanos e camundongos, incluindo câncer de cólon (YOON; LEE, 2012). Sendo assim, embora Abo & Clevers argumentem que o uso terapêutico do RSPO1 é mais seguro que os ligantes da via de WNT (ABO; CLEVERS, 2012), deve-se atentar à possibilidade de desenvolvimento de tumores resultantes do uso terapêutico da rhRSPO1. Portanto, é importante notar que, no presente estudo, não foram encontrados tumores durante a necropsia dos animais ou no processamento de amostras de TESI. Contudo, estudos adicionais e com maior tempo de duração são necessários para garantir a segurança de futuras terapias com rhRSPO1.

Portanto, nesta segunda parte do trabalho, podemos concluir que o tratamento com RSPO1 humano recombinante, e a consequente ativação da via canônica de Wnt, melhora o cultivo de unidades organoides intestinais de camundongo (UO) *in vitro*, aumentando seu tamanho e taxa de sobrevivência. Além disso, o tratamento de *scaffolds* e UO intestinais com rhRSPO1 melhorou a formação de mTESI *in vivo*, aumentando sua massa, desenvolvimento e taxa de sucesso de pega do enxerto. Essa melhoria do protocolo TESI permitiu a geração eficiente de TESI bem desenvolvido, contendo um epitélio intestinal engenheirado com estruturas de criptas e vilosidades maduras, compostos por células absorventes, células secretoras, células enteroendócrinas, células de Paneth, células TA e células-tronco, devidamente envoltas por uma musculatura inervada. Portanto, o tratamento com rhRSPO1 representa um importante avanço na otimização do processo de formação de TESI murino, indicando que, no futuro, possivelmente essa proteína poderá ser utilizada para melhorar a viabilidade clínica dessa terapia no tratamento de pacientes com SIC.

Capítulo II-B – LOU/TELi

Conforme mencionado anteriormente, além das complicações imediatas que podem ocorrer no período pós-operatório, a mortalidade associada à SIC no longo prazo se deve em grande parte à doença de fígado associada à falência intestinal (IFALD, do inglês *Intestinal Failure-Associated Liver Disease*), que é muito prevalente (PEYRET; COLLARDEAU; TOUZET; LORAS-DUCLAUX *et al.*, 2011). Em humanos, os dados clínicos apontam para o desenvolvimento de IFALD entre 40-60% das crianças com SIC que necessitam de nutrição parenteral, resultando em

aumento da morbidade dos pacientes (PICHLER; HORN; MACDONALD; HILL, 2012). Em casos severos da doença faz-se necessário o transplante de fígado, ou até mesmo transplantes viscerais combinados, de fígado e intestino (HAWKSWORTH; DESAI; KHAN; KAUFMAN *et al.*, 2018). Contudo, apesar de muitos pacientes necessitarem de transplante total do fígado, atualmente, apenas uma porcentagem pequena da necessidade global por transplantes é atendida devido à escassez de doadores.

Neste contexto, pensando de maneira global sobre a SIC, seus efeitos primários e secundários sobre a saúde dos pacientes e as suas possíveis formas de tratamento, é importante se atentar também para o fígado nos pacientes com SIC afetados pela IFALD. Segundo a literatura especializada, sabe-se que as células-tronco do fígado apresentam os receptores LGR5 em sua superfície e que a indução da via de Wnt por RSPO1 possibilita a expansão *in vitro* destas células isoladamente (HUCH; DORRELL; BOJ; VAN ES *et al.*, 2013). Outro trabalho demonstrou que a combinação de HGF/RSPO1 foi capaz de melhorar o quadro de insuficiência hepática, induzindo as células tronco LGR5+ deste tecido (LIN; FANG; LIU; WANG *et al.*, 2017). Além disso, mais recentemente, foi demonstrado que LGR4 e RSPO1 foram capazes de proteger os hepatócitos de camundongos de lesões, através da inibição da sinalização de NF- κ B (LI; LIU; LOU; MULHOLLAND *et al.*, 2019). Sendo assim, juntamente com o grupo da Dra. Grickscheit, decidimos investigar, também, a influência do tratamento com rhRSPO1 no cultivo de unidades organoides de fígado (LOUs) *in vitro* e no processo de formação de fígado engenheirado murino (TELi) *in vivo*.

Em um trabalho anterior do grupo da Dra. Grikscheit, foram gerados pedaços de fígado tecido-engenheirado (TELi) a partir de unidades organoides de fígado humano (hLOU), semeadas em scaffolds de PGA/PLLA (MAVILA; TRECARTIN; SPURRIER; XIAO *et al.*, 2017). As LOUs são agrupamentos multicelulares contendo células hepáticas, células-tronco e progenitoras adultas, sendo capazes de gerar TELi apresentando hepatócitos e colangiócitos maduros, produzir e secretar albumina humana no soro do hospedeiro, além de proporcionar um resgate funcional em modelo murino deficiente em arginase (MAVILA; TRECARTIN; SPURRIER; XIAO *et al.*, 2017). Contudo, apesar dos resultados promissores, mais evidências e

dados científicos sobre este modelo são necessários, assim como formas de otimizar ainda mais este processo.

Os experimentos *in vitro* com as unidades organoides de fígado demonstraram que o tratamento com rhRSPO1 melhora o crescimento destas, resultando em LOUs significativamente maiores após cinco dias de cultivo (Figura 35A, C). Além disso, observamos que o tratamento com rhRSPO1 não interferiu na sobrevivência das LOUs neste período, que mantiveram sua alta taxa de sobrevivência em ambos os grupos, controle e rhRSPO1, independentemente do tratamento (Fig. 35D). Diferentemente das UOs intestinais, que estão presentes em grandes números desde o início do processo de isolamento e se deterioram ao longo do cultivo (Fig. 26D), a cultura das LOUs se inicia com um baixo número de células após a etapa de isolamento e apresenta um aumento ao longo do tempo até atingir um platô (Fig.35D). Vale destacar ainda que, ao contrário das UOs intestinais, que se tornaram estruturas tridimensionais mais complexas com projeções e reentrâncias no epitélio, quando tratadas com rhRSPO1, as LOUs mantiveram sua forma esférica perfeita ao longo do cultivo (Fig. 35A-B).

Os resultados preliminares referentes à construção de TELi demonstram ser possível sua formação após 30 dias de maturação subcutânea *in vivo*, tanto na presença quanto na ausência de rhRSPO1 (Fig. 35A). O TELi gerado apresentou colangiócitos maduros organizados na forma de ductos biliares e hepatócitos imaturos, ainda incapazes de secretar albumina (Fig. 35B). Entretanto, ao contrário dos resultados robustos obtidos anteriormente pelo grupo da Dra. Grikscheit neste modelo (MAVILA; TRECARTIN; SPURRIER; XIAO *et al.*, 2017), no presente trabalho, não obtivemos uma eficiência de formação de TELi tal que possibilitasse o desenvolvimento de um tecido maduro, possivelmente devido ao baixo número amostral e as dificuldades técnicas inerentes à execução dos protocolos do modelo. O baixo número de hepatócitos e a ausência de albumina, um marcador de hepatócitos maduros, evidenciam a necessidade de otimização do processo e utilização de grupos amostrais maiores, a fim de permitir a formação de TELis mais desenvolvidos, para que seja possível, então, avaliar de maneira adequada a influência do tratamento com rhRSPO1 neste modelo. Entretanto, vale ressaltar que o anticorpo anti-albumina utilizado neste experimento para marcação da albumina murina, segundo informações do fabricante, possui uma maior afinidade pela

proteína humana, deixando, portanto, dúvidas quanto à identificação de hepatócitos maduros de maneira subestimada na análise.

Portanto, nessa etapa do trabalho, observamos que o tratamento com rhRSPO1 é capaz de aumentar o tamanho de LOUs *in vitro* sem interferir com a sobrevivência destas, de modo a possibilitar um aumento da massa de LOUs para formação de TELi e transplante, passo importante para os casos nos quais a fonte celular doadora é escassa. Entretanto, para que seja possível avaliar a influência do tratamento com rhRSPO1 na formação de TELi de maneira adequada, otimizações do processo, bem como um maior número de tentativas são necessárias.

Capítulo III – Avaliação funcional da rhRSPO1 na Regeneração Tecidual em modelo de Síndrome do Intestino Curto em *Zebrafish*

Sabemos hoje que a adaptação intestinal é essencial para a obtenção de uma autonomia enteral bem-sucedida em pacientes com síndrome do intestino curto e, embora os mecanismos subjacentes a este processo ainda não tenham sido elucidados, a via canônica de Wnt/ β -catenina parece ser crítica na expansão epitelial que ocorre após a ressecção. Portanto, nesta terceira etapa do trabalho, avaliamos a atividade funcional da rhRSPO1 na adaptação intestinal em modelo de peixe paulistinha (*Zebrafish*) induzido à síndrome do intestino curto (SIC/SBS), desenvolvido previamente pelo grupo da Dra. Grikscheit (SCHALL; HOLOYDA; GRANT; LEVIN *et al.*, 2015). Conforme descrito anteriormente, nesse modelo de estudo, *zebrafish* adultos foram submetidos à ressecção cirúrgica da porção média do intestino, a fim de induzir, com precisão, as respostas fisiológicas que ocorrem na SIC. Em seguida, os ZF foram, então, tratados com injeções intraperitoneais de rhRSPO1 em um experimento de resgate, a fim de se avaliar as respostas dos animais ao tratamento.

Com base nos resultados gerados neste modelo, é possível acreditar que, futuramente, a R-espondina1 recombinante humana possa vir a ter aplicações como uma terapia pós-operatória de curto prazo para melhorar a adaptação intestinal e diminuir a perda imediata de peso após ressecção maciça do intestino em pacientes com SIC. Segundo inúmeros trabalhos na literatura, o uso de RSPOs tem sido considerado para possíveis terapias em processos de doenças intestinais nos quais existe lesão e regeneração intestinal. A proteína RSPO3, por exemplo, melhora a

regeneração epitelial do cólon e, certamente, pode atuar em outros alvos, como doenças inflamatórias intestinais (ABO; CLEVERS, 2012; HARNACK; BERGER; ANTANAVICIUTE; VIDAL *et al.*, 2019; ZHAO; DE VERA; NARUSHIMA; BECK *et al.*, 2007). No presente trabalho, relatamos, pela primeira vez, que injeções intraperitoneais sequenciais, aplicadas após a ressecção intestinal, constituem um método viável para a administração de medicamentos em *zebrafish*, mesmo com cinco injeções realizadas no intervalo de duas semanas. Além disso, a administração intraperitoneal de rhRSPO1 diminuiu a perda de peso nos *zebrafish* com síndrome do intestino curto (ZF SBS) (Figura 36), com aumento simultâneo das células β -catenina+ no intestino, indicando aumento da ativação da via canônica de sinalização de Wnt, possivelmente acentuada pelo aumento de β -catenina já induzido pela SIC (Figura 41) (AL ALAM; DANOPOULOS; SCHALL; SALA *et al.*, 2015; SCHALL; THORNTON; ISANI; HOLOYDA *et al.*, 2017).

Embora a família de proteínas RSPO seja altamente conservada entre os vertebrados, no início do presente trabalho, não se sabia, de antemão, se haveria homologia suficiente entre a RSPO1 humana e aquela de *zebrafish*, de modo a se obter uma resposta molecular adequada à administração de RSPO1 recombinante humana nos peixes. Sabe-se que a homologia presente entre a rhRSPO1 humana e de *zebrafish* é de apenas 51%, entretanto, os dois domínios semelhantes à furina presentes nestas proteínas apresentam, respectivamente, 65% e 73% de homologia entre as espécies (KIM; ZHAO; ANDARMANI; KAKITANI *et al.*, 2006; ZHANG; LI; SUN; LIU *et al.*, 2011). Por sua vez, os domínios de trombospondina e C terminal da rhRSPO1 de *zebrafish* compartilham uma baixa homologia com a proteína RSPO1 humana, apesar de estudos em *Xenopus* indicarem que essas regiões são dispensáveis para a sinalização de Wnt, sendo necessários apenas os domínios semelhantes à furina (*furin-like*) (KAZANSKAYA; GLINKA; DEL BARCO BARRANTES; STANNEK *et al.*, 2004; ZHANG; LI; SUN; LIU *et al.*, 2011). Endereçando este questionamento, nossos resultados demonstraram que a administração de rhRSPO1 nos peixes com SIC (grupo SBS RSPO1) diminuiu a perda de peso dos animais e aumentou o acúmulo de β -catenina nas células intestinais, indicando, sim, a existência de homologia suficiente entre as proteínas RSPO1 humana e de ZF para observar um efeito biológico mensurável. Apesar de o receptor Lgr5 não ter sido identificado em *zebrafish*, o receptor Lgr4, ao qual rhRSPO1 também se liga, foi identificado no intestino destes animais, corroborando,

assim, a atividade biológica observada em nossos resultados. Além disso, receptores Lgr4-6 foram identificados em medaka, um peixe teleósteo intimamente relacionado ao *zebrafish* (AGHAALLAEI; GRUHL; SCHAEFER; WERNET *et al.*, 2016; HIROSE; SHIMODA; KIKUCHI, 2011).

Com os dados de peso dos ZF no dia da cirurgia, após uma semana (D7) e após duas semanas (D14), foi possível rastrear sua perda de peso ao longo do experimento (Figuras 36). De acordo com os resultados descritos anteriormente na literatura para este modelo (SCHALL; HOLOYDA; GRANT; LEVIN *et al.*, 2015), diferenças significativas na perda de peso dos animais entre os grupos sham e SBS só puderam ser observadas após 14 dias da operação, o que valida este modelo de SIC em ZF e confirma que a adaptação intestinal ocorre naturalmente após a perda do intestino. A grave perda de peso dos animais no grupo SBS pode ser interpretada como a manifestação clínica da SIC, na qual a ausência de uma grande parte do intestino leva à deficiência nutricional e consequente perda de peso.

Em uma semana, injeções intraperitoneais repetidas não afetaram a sobrevivência ou a perda de peso dos animais, ambas concordantes com os achados anteriores neste modelo (AL ALAM; DANOPOULOS; SCHALL; SALA *et al.*, 2015; SCHALL; HOLOYDA; GRANT; LEVIN *et al.*, 2015). No entanto, após 14 dias, a rhRSPO1 melhorou a perda de peso associada à SIC nos ZF tratados. Após este período de duas semanas, com um total de cinco doses de rhRSPO1 injetadas intraperitonealmente, os ZF com SIC do grupo SBS RSPO1, perderam significativamente menos peso do que os peixes do grupo controle SBS PBS, que receberam somente solução veículo e tinha pesos iniciais equivalentes aos peixes do grupo sham (Fig. 36). Embora nenhuma diferença na perda de peso dos animais tenha sido observada no protocolo mais curto (uma semana), com apenas três doses de rhRSPO1, neste período, houve um aumento da proliferação de células epiteliais intestinais em decorrência do tratamento, evidenciado pelo aumento de células positivas para BrdU em peixes SBS+rhRSPO1, em comparação com peixes SBS+PBS (Figura 39E). No entanto, transcorridos 14 dias de experimento, esse aumento de proliferação celular não foi mantido (Fig. 39J), resultado este inesperado frente aos resultados do modelo original, no qual injeções intraperitoneais adicionais não foram administradas e as células BrdU+ ainda aumentavam nesse momento (SCHALL; HOLOYDA; GRANT; LEVIN *et al.*, 2015). Uma possível explicação para esse resultado é que, possivelmente, a administração de rhRSPO1 aumenta a

proliferação celular no epitélio intestinal inicialmente, mas, após 14 dias com doses repetidas de rhRSPO1, a resposta proliferativa em resposta à SIC já está de tal forma maximizada que é impossível observar os efeitos do tratamento com rhRSPO1. Já quanto à sobrevivência das células do epitélio intestinal, a administração de rhRSPO1 não alterou o número de células positivas para CC3 por vilosidade e, portanto, não altera os eventos relativos de morte celular.

Da mesma forma, as medições da área da superfície intestinal, utilizadas como indicadores para adaptação intestinal, embora aumentadas após a ressecção do órgão, não foram estatisticamente diferentes após a administração de rhRSPO1 exógena em ambos os intervalos de uma ou duas semanas. No entanto, transcorridos 14 dias da cirurgia, parece existir uma tendência de aumento na complexidade das dobras das vilosidades nos peixes do grupo sham que receberam injeções de rhRSPO1 (sham+rhRSPO1), uma vez que não houve diferença estatisticamente significativa na altura da vilosidade (VH) ou no perímetro do epitélio da vilosidade (VEP) entre esse grupo e os grupos SBS. Conforme observado anteriormente neste trabalho, a administração da rhRSPO1 humana recombinante em camundongos BALB/c adultos, sem ressecção prévia ou lesão intestinal, também resultou em aumento da altura da cripta-vilosidade (LEVIN; KOGA; BELCHIOR; CARREIRA *et al.*, 2020). Yan et al identificaram que a super expressão isolada de rhRSPO1 em camundongos expande o número de células-tronco intestinais Lgr5+ ao longo da cripta, mas não induz a hipertrofia das vilosidades, a menos que haja administração concomitante de um ligante Wnt (YAN; JANDA; CHANG; ZHENG *et al.*, 2017). Isso sugere que a indução prévia de ISCs por ligantes Wnt é necessária para a resposta proliferativa destas células em resposta à rhRSPO1. Entretanto, apesar de, até certo ponto, a iniciação do processo de adaptação intestinal por ligantes Wnt poder ser induzida pela própria ressecção maciça do intestino, o aumento acentuado na área da superfície intestinal que ocorre nesta situação, possivelmente, impede a observação de efeitos adicionais decorrentes da administração de rhRSPO1 isoladamente.

Embora não tenha havido diferenças estatisticamente significativas nas medidas da área da superfície intestinal com o tratamento de rhRSPO1, a proliferação de células epiteliais intestinais aumentou transcorridos sete dias da cirurgia no grupo SBS RSPO1, retornando aos níveis do controle SBS PBS após 14 dias (Fig. 39E-J). Por outro lado, ao contrário da proliferação, a marcação de β -

catenina apresentou um aumento nos animais com a SIC 14 dias após as cirurgias e início do tratamento com rhRSPO1 (Figura 41). Resultados prévios do grupo neste modelo indicaram que a proliferação de células epiteliais intestinais ocorre já a partir do terceiro dia pós-operatório e atinge um pico em torno de 7-14 dias, retornando aos níveis basais no 30º dia do pós-operatório (ISANI; GEE; SCHALL; SCHLIEVE *et al.*, 2019). Dessa forma, com base em nossos resultados, observamos que a administração de rhRSPO1 induz um aumento na proliferação precoce de células epiteliais, o que possivelmente auxilia na preservação do peso dos animais através da expansão precoce da população de ISCs nos *zebrafish*. Corroborando estes achados, a superexpressão de R-espondina1 em camundongos aumentou o número de ISC Lgr5+ no interior da cripta, contudo, estudos de rastreamento de linhagem demonstraram não haver aumento da proliferação dessas células (YAN; JANDA; CHANG; ZHENG *et al.*, 2017). Dessa forma, embora não tenha havido diferenças visíveis na morte celular por apoptose, a expansão das células-tronco intestinais de *zebrafish*, ainda não identificadas, pode melhorar a eficiência de reposição das células extruídas do ápse das vilosidades.

Como não houve um aumento perceptível da área da superfície intestinal, o mecanismo exato pelo qual a administração de rhRSPO1 diminui a perda de peso na SIC ainda precisa ser elucidado. Contudo, com a ativação aumentada da via de Wnt após o tratamento com rhRSPO1, surgiu-se a ideia de que, possivelmente, alterações na composição celular do epitélio intestinal ocorram de modo a melhorar a eficiência de absorção nutricional. Sabe-se que a ativação da sinalização da via de Wnt pode alterar o equilíbrio das células secretoras e absorventes no epitélio intestinal. Em camundongos, a sinalização de Wnt promove a diferenciação de células de Paneth, e, contrariamente, a super-expressão do inibidor de Wnt, Dkk1, leva à perda completa da linhagem secretora (PINTO; GREGORIEFF; BEGTHEL; CLEVERS, 2003). Além disso, a repressão da sinalização de Wnt diminui a hiperplasia celular secretora após a inibição de Notch (TIAN; BIEHS; CHIU; SIEBEL *et al.*, 2015). A ativação da sinalização de Wnt por rhRSPO1 pode alterar, ainda, outros aspectos da função das células epiteliais intestinais, particularmente o metabolismo e a captação de nutrientes. Em modelos de câncer de ovário e colorretal, a sinalização de Wnt tem sido implicada em alterações no metabolismo celular, particularmente no que diz respeito ao metabolismo da glicose e à oxidação de ácidos graxos (LEE; JEON; JU; KIM *et al.*, 2012; SCHWARTZ; WU; KARDIA;

LEVIN *et al.*, 2003). Além disso, postula-se que os correceptores LRP5 e LRP6, que interagem com as RSPOs formam um complexo com Wnt e FZD, e estão relacionadas à homeostase lipídica e no metabolismo da glicose (FUJINO; ASABA; KANG; IKEDA *et al.*, 2003; GO, 2015). Nesse sentido, camundongos com deficiência de LRP5 apresentaram diminuição da depuração de quilomícrons e secreção de insulina (FUJINO; ASABA; KANG; IKEDA *et al.*, 2003).

Neste capítulo do presente trabalho, vimos que a via canônica de Wnt/ β -catenina é crucial para a manutenção do nicho de células tronco intestinais (ISC) e homeostase do epitélio intestinal em *zebrafish*. Observamos, ainda, que a ativação da sinalização canônica de Wnt melhora a regeneração epitelial após lesão de intestino nesses animais. Os resultados aqui apresentados, demonstraram que a administração de rhRSPO1 aumenta a proliferação precoce de células-tronco intestinais e o acúmulo de β -catenina, melhorando, ainda, a perda de peso dos animais após ressecção maciça do intestino delgado. Entretanto, uma melhor compreensão dos complexos mecanismos moleculares envolvidos na adaptação intestinal após a SIC faz-se necessária para que seja possível a indicação de alvos terapêuticos que possam aumentar a adaptação intestinal em futuras terapias em humanos.

Dada a prevalência de crianças afetadas pela IFALD decorrente de SIC, conforme mencionado anteriormente (PEYRET; COLLARDEAU; TOUZET; LORAS-DUCLAUX *et al.*, 2011; PICHLER; HORN; MACDONALD; HILL, 2012), investigamos, também, o efeito da rhRSPO1 sobre a esteatose hepática dos ZF induzidos à SIC, a fim de se verificar possíveis melhoras nos sintomas da doença com a aplicação sistêmica dessa proteína recombinante. Resultados anteriores do grupo demonstraram que a síndrome do intestino curto, induzida pela ressecção cirúrgica da parte medial do intestino, resulta em aumento da esteatose hepática no modelo de *zebrafish* (GEE; ISANI; SHILLINGFORD; GRIKSCHEIT, 2018). Estes resultados, somados ao fato de que o mecanismo pelo qual a SIC induz a formação de esteatose hepática continua desconhecido até o momento, torna este modelo de ZF muito promissor para o estudo dessa condição médica.

Para esta etapa do trabalho, nossa hipótese norteadora foi que a rhRSPO1 poderia reduzir a formação de esteatose no fígado dos ZF induzidos à SIC, dada a sua capacidade de estimular a proliferação de células-tronco hepáticas LGR5+ (HUCH; DORRELL; BOJ; VAN ES *et al.*, 2013), reduzir o quadro de insuficiência

hepática em camundongos (LIN; FANG; LIU; WANG *et al.*, 2017) e de induzir o crescimento de LOU murina *in vitro* (Fig. 34). Conforme descrito na literatura, e também em nossos resultados, a contagem de focos de macrosteatose hepática por campo de alta magnificação nas lâminas de H&E demonstrou um aumento da severidade da condição nos animais em decorrência da SIC (Figura 43). Entretanto, o tratamento com doses múltiplas de rhRSPO1, injetados por via i.p., não resultou na melhoria esperada para o acúmulo de gordura no fígado, sugerindo que, provavelmente, essa proteína não possui um potencial terapêutico capaz de conter o avanço do desenvolvimento de IFALD em pacientes com SIC por meio dessa abordagem.

6. CONCLUSÕES

Nesse trabalho, foram geradas plataformas estáveis de expressão da proteína rhRSPO1 nas duas linhagens de células de mamífero mais utilizadas na indústria farmacêutica para a geração de biofármacos complexos atualmente, CHODG44 e HEK293. A geração da plataforma estável para a produção de hRSPO1 recombinante em células humanas HEK293, bem como o estabelecimento do protocolo eficiente e reprodutível para a purificação desta proteína, permitiram a geração de um produto proteico purificado, totalmente caracterizado e biologicamente ativo para ser utilizado em Engenharia Tecidual e estudos investigativos visando à Medicina Regenerativa. Verificamos que a rhRSPO1 produzida apresentou atividade biológica no cultivo de unidades organoides de intestino e de fígado murino *in vitro*, em ensaios de Engenharia de Tecidos *in vivo*, melhorando o processo de formação de intestino engenheirado, e, também, utilizando-se o modelo de ZF induzidos a SIC, melhorando a perda de peso dos animais.

Nos experimentos com as UO intestinais, pudemos concluir que o tratamento com rhRSPO1, e a consequente ativação da via canônica de Wnt, melhorou o cultivo de unidades organoides intestinais de camundongo (UO) *in vitro*, aumentando seu tamanho e taxa de sobrevivência. Já para os experimentos adicionais com UO de fígado (LOU), observamos que a rhRSPO1 foi capaz de induzir apenas o crescimento destas, não interferindo em sua taxa de sobrevivência. A partir do tratamento de *scaffolds* e UO intestinais com rhRSPO1 nos ensaios de Engenharia de Tecidos *in vivo*, constatamos que o tratamento resultou em uma melhora na formação do mTESI, com aumento do desenvolvimento dos tecidos, aumento de massa e taxa de sucesso na pega do enxerto. Experimentos adicionais, demonstraram que os fragmentos de intestino engenheirado formados apresentaram uma estrutura bem desenvolvida, apresentando um epitélio engenheirado completo, com estruturas de criptas e vilosidades maduras, contendo todos os tipos celulares diferenciados (células absorventes, células secretoras, células enteroendócrinas, células de Paneth), células em trânsito de amplificação e células-tronco, devidamente envoltas por uma musculatura inervada.

Utilizando o modelo de *zebrafish* induzido à síndrome do intestino curto, concluímos que a rhRSPO1 e a via canônica de Wnt/ β -catenina são cruciais para a manutenção do nicho de células-tronco intestinais (ISC) e a homeostase do epitélio intestinal, melhorando a regeneração epitelial após lesão. Os resultados aqui apresentados, demonstraram que a administração de rhRSPO1 aumentou a proliferação precoce de células-tronco intestinais, o acúmulo de β -catenina e uma melhora na perda de peso dos animais após ressecção maciça do intestino delgado, mas não interferiu nos parâmetros intestinais de adaptação e na formação de esteatose hepática neste modelo. Dessa forma, uma melhor compreensão dos complexos mecanismos moleculares envolvidas na adaptação intestinal após a SIC faz-se necessária para que seja possível a indicação de alvos terapêuticos que possam aumentar a adaptação para futuras terapias em humanos.

Portanto, os resultados obtidos permitem concluir que a plataforma de expressão desenvolvida durante este trabalho foi bem-sucedida quanto à geração de rhRSPO1 com qualidade e em quantidade suficiente para ser utilizada em estudos investigativos, em escala laboratorial, na área de Engenharia de Tecidos e Medicina Regenerativa aplicada ao tratamento da Síndrome do Intestino Curto, em modelos animais. Além disso, concluímos que o tratamento com rhRSPO1 é bastante promissor no que diz respeito à geração de um intestino engenheirado funcional visando o tratamento da SIC. Porém, apesar de os resultados obtidos avançarem na direção de novas alternativas clínicas para a SIC, novas otimizações do processo produtivo, bem como um maior número de estudos *in vitro*, *in vivo*, pré-clínicos e clínicos fazem-se necessários para que estes tratamentos venham a ser viáveis e seguros, futuramente, para estas e outras condições médicas e aplicações terapêuticas.

7. PERSPECTIVAS FUTURAS

- Otimizar o processo produtivo da rhRSPO1 em suas várias etapas de produção;
- Continuar a caracterização da rhRSPO1 quanto à sua estabilidade, cinética de produção, farmacocinética e farmacodinâmica;
- Avaliar o papel da glicosilação sobre a atividade biológica e estabilidade da rhRSPO1;
- Avaliar combinações da rhRSPO1 e outros fatores peptídicos de crescimento e diferenciação sobre a geração do TESI (ex: VEGF, PDGF-BB);
- Avaliar a influência da rhRSPO1 em UO intestinais e TESI humanos;
- Estudar os mecanismos moleculares por trás da melhora na perda de peso de ZF com SIC com o tratamento de rhRSPO1.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

- ABO, A.; CLEVERS, H. Modulating WNT receptor turnover for tissue repair. **Nat Biotechnol**, 30, n. 9, p. 835-836, Sep 2012.
- AEBERSOLD, R.; GOODLETT, D. R. Mass spectrometry in proteomics. **Chem Rev**, 101, n. 2, p. 269-295, Feb 2001.
- AGHAALLAEI, N.; GRUHL, F.; SCHAEFER, C. Q.; WERNET, T. *et al.* Identification, visualization and clonal analysis of intestinal stem cells in fish. **Development**, 143, n. 19, p. 3470-3480, 10 2016.
- AL ALAM, D.; DANOPOULOS, S.; SCHALL, K.; SALA, F. G. *et al.* Fibroblast growth factor 10 alters the balance between goblet and Paneth cells in the adult mouse small intestine. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, 308, n. 8, p. G678-690, Apr 2015.
- ALEXANDER, C. M. The Wnt Signaling Landscape of Mammary Stem Cells and Breast Tumors. **Prog Mol Biol Transl Sci**, 153, p. 271-298, 01 2018.
- AOKI, M.; MIEDA, M.; IKEDA, T.; HAMADA, Y. *et al.* R-spondin3 is required for mouse placental development. **Dev Biol**, 301, n. 1, p. 218-226, Jan 2007.
- ARIMA, M.; HASEGAWA, D.; YOSHIDA, S.; MITARAI, H. *et al.* R-spondin 2 promotes osteoblastic differentiation of immature human periodontal ligament cells through the Wnt/ β -catenin signaling pathway. **J Periodontal Res**, 54, n. 2, p. 143-153, Apr 2019.
- AYADI, L. Molecular modelling of the TSR domain of R-spondin 4. **Bioinformatics**, 3, n. 3, p. 119-123, 2008.
- BAKKER, H.; BOZZETTI, F.; STAUN, M.; LEON-SANZ, M. *et al.* Home parenteral nutrition in adults: a european multicentre survey in 1997. ESPEN-Home Artificial Nutrition Working Group. **Clin Nutr**, 18, n. 3, p. 135-140, Jun 1999.
- BANDARANAYAKE, A. D.; ALMO, S. C. Recent advances in mammalian protein production. **FEBS Lett**, 588, n. 2, p. 253-260, Jan 2014.
- BARKER, N.; HUCH, M.; KUJALA, P.; VAN DE WETERING, M. *et al.* Lgr5(+ve) stem cells drive self-renewal in the stomach and build long-lived gastric units in vitro. **Cell Stem Cell**, 6, n. 1, p. 25-36, Jan 2010.
- BARKER, N.; VAN ES, J. H.; KUIPERS, J.; KUJALA, P. *et al.* Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5. **Nature**, 449, n. 7165, p. 1003-1007, Oct 2007.
- BARTHEL, E. R.; SPEER, A. L.; LEVIN, D. E.; SALA, F. G. *et al.* Tissue engineering of the intestine in a murine model. **J Vis Exp**, n. 70, p. e4279, 2012.
- BEATTIE, L. M.; BARCLAY, A. R.; WILSON, D. C. Short bowel syndrome and intestinal failure in infants and children. **Paediatrics and Child Health**, 20, n. 10, p. 485-491, 2010.

BELCHIOR, G. G.; SOGAYAR, M. C.; GRIKSCHIT, T. C. Stem cells and biopharmaceuticals: vital roles in the growth of tissue-engineered small intestine. **Seminars in Pediatric Surgery**, 23, n. 3, p. 141–149, 2014.

BELL, S. M.; SCHREINER, C. M.; WERT, S. E.; MUCENSKI, M. L. *et al.* R-spondin 2 is required for normal laryngeal-tracheal, lung and limb morphogenesis. **Development**, 135, n. 6, p. 1049-1058, Mar 2008.

BERGMANN, C.; SENDEREK, J.; ANHUF, D.; THIEL, C. T. *et al.* Mutations in the gene encoding the Wnt-signaling component R-spondin 4 (RSPO4) cause autosomal recessive anonychia. **Am J Hum Genet**, 79, n. 6, p. 1105-1109, Dec 2006.

BERNAL, N. P.; STEHR, W.; ZHANG, Y.; PROFITT, S. *et al.* Evidence for active Wnt signaling during postresection intestinal adaptation. **J Pediatr Surg**, 40, n. 6, p. 1025-1029; discussion 1029, Jun 2005.

BHARADWAJ, S.; TANDON, P.; GOHEL, T. D.; BROWN, J. *et al.* Current status of intestinal and multivisceral transplantation. **Gastroenterol Rep (Oxf)**, 5, n. 1, p. 20-28, 02 2017.

BIGAEVA, E.; BOMERS, J. J. M.; BIEL, C.; MUTSAERS, H. A. M. *et al.* Growth factors of stem cell niche extend the life-span of precision-cut intestinal slices in culture: A proof-of-concept study. **Toxicol In Vitro**, 59, p. 312-321, Sep 2019.

BINNERTS, M. E.; KIM, K. A.; BRIGHT, J. M.; PATEL, S. M. *et al.* R-Spondin1 regulates Wnt signaling by inhibiting internalization of LRP6. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 104, n. 37, p. 14700-14705, Sep 2007.

BLAYDON, D. C.; ISHII, Y.; O'TOOLE, E. A.; UNSWORTH, H. C. *et al.* The gene encoding R-spondin 4 (RSPO4), a secreted protein implicated in Wnt signaling, is mutated in inherited anonychia. **Nat Genet**, 38, n. 11, p. 1245-1247, Nov 2006.

BLOCHLINGER, K.; DIGGELMANN, H. Hygromycin B phosphotransferase as a selectable marker for DNA transfer experiments with higher eucaryotic cells. **Mol Cell Biol**, 4, n. 12, p. 2929-2931, Dec 1984.

BORYCKI, A. G.; BRUNK, B.; TAJBAKHS, S.; BUCKINGHAM, M. *et al.* Sonic hedgehog controls epaxial muscle determination through Myf5 activation. **Development**, 126, n. 18, p. 4053-4063, Sep 1999.

BOYDEN, L. M.; MAO, J.; BELSKY, J.; MITZNER, L. *et al.* High bone density due to a mutation in LDL-receptor-related protein 5. **N Engl J Med**, 346, n. 20, p. 1513-1521, May 16 2002.

BRÜCHLE, N. O.; FRANK, J.; FRANK, V.; SENDEREK, J. *et al.* RSPO4 is the major gene in autosomal-recessive anonychia and mutations cluster in the furin-like cysteine-rich domains of the Wnt signaling ligand R-spondin 4. **J Invest Dermatol**, 128, n. 4, p. 791-796, Apr 2008.

BUSTOS-VALENZUELA, J. C.; HALCSIK, E.; BASSI, E. J.; DEMASI, M. A. *et al.* Expression, purification, bioactivity, and partial characterization of a recombinant human bone morphogenetic protein-7 produced in human 293T cells. **Mol Biotechnol**, 46, n. 2, p. 118-126, Oct 2010.

BYRNE, T. A.; PERSINGER, R. L.; YOUNG, L. S.; ZIEGLER, T. R. *et al.* A new treatment for patients with short-bowel syndrome. Growth hormone, glutamine, and a modified diet. **Ann Surg**, 222, n. 3, p. 243-254; discussion 254-245, Sep 1995.

CADIEU, E.; NEFF, M. W.; QUIGNON, P.; WALSH, K. *et al.* Coat variation in the domestic dog is governed by variants in three genes. **Science**, 326, n. 5949, p. 150-153, Oct 2009.

CADIGAN, K. M.; PEIFER, M. Wnt signaling from development to disease: insights from model systems. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, 1, n. 2, p. a002881, Aug 2009.

CARMON, K. S.; GONG, X.; LIN, Q.; THOMAS, A. *et al.* R-spondins function as ligands of the orphan receptors LGR4 and LGR5 to regulate Wnt/beta-catenin signaling. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 108, n. 28, p. 11452-11457, Jul 2011.

CHAI, T.; SHEN, Z.; ZHANG, Z.; CHEN, S. *et al.* LGR6 is a potential diagnostic and prognostic marker for esophageal squamous cell carcinoma. **J Clin Lab Anal**, p. e23121, Jan 2020.

CHANG, C. F.; HSU, L. S.; WENG, C. Y.; CHEN, C. K. *et al.* N-Glycosylation of Human R-Spondin 1 Is Required for Efficient Secretion and Stability but Not for Its Heparin Binding Ability. **Int J Mol Sci**, 17, n. 6, 2016.

CHITLARU, T.; KRONMAN, C.; ZEEVI, M.; KAM, M. *et al.* Modulation of circulatory residence of recombinant acetylcholinesterase through biochemical or genetic manipulation of sialylation levels. **Biochem J**, 336 (Pt 3), p. 647-658, Dec 1998.

COLE, C. R.; HANSEN, N. I.; HIGGINS, R. D.; ZIEGLER, T. R. *et al.* Very low birth weight preterm infants with surgical short bowel syndrome: incidence, morbidity and mortality, and growth outcomes at 18 to 22 months. **Pediatrics**, 122, n. 3, p. e573-582, Sep 2008.

DAY, R. M. Epithelial stem cells and tissue engineered intestine. **Curr Stem Cell Res Ther**, 1, n. 1, p. 113-120, Jan 2006.

DE, A. Wnt/Ca²⁺ signaling pathway: a brief overview. **Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)**, 43, n. 10, p. 745-756, Oct 2011.

DE LAU, W.; BARKER, N.; CLEVERS, H. WNT signaling in the normal intestine and colorectal cancer. **Front Biosci**, 12, p. 471-491, 2007.

DE LAU, W.; BARKER, N.; LOW, T. Y.; KOO, B. K. *et al.* Lgr5 homologues associate with Wnt receptors and mediate R-spondin signalling. **Nature**, 476, n. 7360, p. 293-297, Aug 2011.

DE LAU, W. B.; SNEL, B.; CLEVERS, H. C. The R-spondin protein family. **Genome Biol**, 13, n. 3, p. 242, 2012.

DEMASI, M. A.; DE S MOLINA, E.; BOWMAN-COLIN, C.; LOJUDICE, F. H. *et al.* Enhanced Proteolytic Processing of Recombinant Human Coagulation Factor VIII B-Domain Variants by Recombinant Furins. **Mol Biotechnol**, 58, n. 6, p. 404-414, Jun 2016.

DINGERMANN, T. Recombinant therapeutic proteins: production platforms and challenges. **Biotechnol J**, 3, n. 1, p. 90-97, Jan 2008.

DUMONT, J.; EUWART, D.; MEI, B.; ESTES, S. *et al.* Human cell lines for biopharmaceutical manufacturing: history, status, and future perspectives. **Crit Rev Biotechnol**, 36, n. 6, p. 1110-1122, Dec 2016.

FICO, A.; MAINA, F.; DONO, R. Fine-tuning of cell signaling by glypicans. **Cell Mol Life Sci**, 68, n. 6, p. 923-929, Mar 2011.

FINKBEINER, S. R.; FREEMAN, J. J.; WIECK, M. M.; EL-NACHEF, W. *et al.* Generation of tissue-engineered small intestine using embryonic stem cell-derived human intestinal organoids. **Biol Open**, 4, n. 11, p. 1462-1472, 2015.

FRIEDMAN, M. S.; OYSERMAN, S. M.; HANKENSON, K. D. Wnt11 promotes osteoblast maturation and mineralization through R-spondin 2. **J Biol Chem**, 284, n. 21, p. 14117-14125, May 2009.

FUJINO, T.; ASABA, H.; KANG, M. J.; IKEDA, Y. *et al.* Low-density lipoprotein receptor-related protein 5 (LRP5) is essential for normal cholesterol metabolism and glucose-induced insulin secretion. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 100, n. 1, p. 229-234, Jan 2003.

GEE, K.; ISANI, M. A.; SHILLINGFORD, N. M.; GRIKSCHEIT, T. C. Short Bowel Syndrome Results in Increased Hepatic Steatosis in a Zebrafish Model. **Journal of the American College of Surgeons**, 227, n. 4, p. S202, 2018.

GLINKA, A.; DOLDE, C.; KIRSCH, N.; HUANG, Y. L. *et al.* LGR4 and LGR5 are R-spondin receptors mediating Wnt/ β -catenin and Wnt/PCP signalling. **EMBO Rep**, 12, n. 10, p. 1055-1061, Oct 2011.

GO, G. W. Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein 6 (LRP6) Is a Novel Nutritional Therapeutic Target for Hyperlipidemia, Non-Alcoholic Fatty Liver Disease, and Atherosclerosis. **Nutrients**, 7, n. 6, p. 4453-4464, Jun 2015.

GRANJEIRO, J. M.; OLIVEIRA, R. C.; BUSTOS-VALENZUELA, J. C.; SOGAYAR, M. C. *et al.* Bone morphogenetic proteins: from structure to clinical use. **Braz J Med Biol Res**, 38, n. 10, p. 1463-1473, Oct 2005.

GRANT, C. N.; MOJICA, S. G.; SALA, F. G.; HILL, J. R. *et al.* Human and mouse tissue-engineered small intestine both demonstrate digestive and absorptive function. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, 308, n. 8, p. G664-677, Apr 2015.

GRANT, D.; ABU-ELMAGD, K.; REYES, J.; TZAKIS, A. *et al.* 2003 report of the intestine transplant registry: a new era has dawned. **Ann Surg**, 241, n. 4, p. 607-613, Apr 2005.

GRIKSCHAIT, T. C.; SIDDIQUE, A.; OCHOA, E. R.; SRINIVASAN, A. *et al.* Tissue-engineered small intestine improves recovery after massive small bowel resection. **Ann Surg**, 240, n. 5, p. 748-754, Nov 2004.

GUNER, Y. S.; CHOKSHI, N.; PETROSYAN, M.; UPPERMAN, J. S. *et al.* Necrotizing enterocolitis--bench to bedside: novel and emerging strategies. **Semin Pediatr Surg**, 17, n. 4, p. 255-265, Nov 2008.

GUTIERREZ, I. M.; KANG, K. H.; JAKSIC, T. Neonatal short bowel syndrome. **Semin Fetal Neonatal Med**, 16, n. 3, p. 157-163, Jun 2011.

HAN, X. H.; JIN, Y. R.; SETO, M.; YOON, J. K. A WNT/beta-catenin signaling activator, R-spondin, plays positive regulatory roles during skeletal myogenesis. **J Biol Chem**, 286, n. 12, p. 10649-10659, Mar 2011.

HAN, X. H.; JIN, Y. R.; TAN, L.; KOSCIUK, T. *et al.* Regulation of the follistatin gene by RSPO-LGR4 signaling via activation of the WNT/ β -catenin pathway in skeletal myogenesis. **Mol Cell Biol**, 34, n. 4, p. 752-764, Feb 2014.

HAO, H. X.; XIE, Y.; ZHANG, Y.; CHARLAT, O. *et al.* ZNRF3 promotes Wnt receptor turnover in an R-spondin-sensitive manner. **Nature**, 485, n. 7397, p. 195-200, May 2012.

HARNACK, C.; BERGER, H.; ANTANAVICIUTE, A.; VIDAL, R. *et al.* R-spondin 3 promotes stem cell recovery and epithelial regeneration in the colon. **Nat Commun**, 10, n. 1, p. 4368, 09 2019.

HAWKSWORTH, J. S.; DESAI, C. S.; KHAN, K. M.; KAUFMAN, S. S. *et al.* Visceral transplantation in patients with intestinal-failure associated liver disease: Evolving indications, graft selection, and outcomes. **Am J Transplant**, 18, n. 6, p. 1312-1320, 06 2018.

HAYASE, E.; HASHIMOTO, D.; NAKAMURA, K.; NOIZAT, C. *et al.* R-Spondin1 expands Paneth cells and prevents dysbiosis induced by graft-versus-host disease. **J Exp Med**, 214, n. 12, p. 3507-3518, Dec 2017.

HIROSE, K.; SHIMODA, N.; KIKUCHI, Y. Expression patterns of *lgr4* and *lgr6* during zebrafish development. **Gene Expr Patterns**, 11, n. 7, p. 378-383, Oct 2011.

HOFSTEENGE, J.; HUWILER, K. G.; MACEK, B.; HESS, D. *et al.* C-mannosylation and O-fucosylation of the thrombospondin type 1 module. **J Biol Chem**, 276, n. 9, p. 6485-6498, Mar 2001.

HOU, X.; CHANG, D. F.; TRECARTIN, A.; BARTHEL, E. R. *et al.* Short-term and long-term human or mouse organoid units generate tissue-engineered small intestine without added signalling molecules. **Exp Physiol**, 103, n. 12, p. 1633-1644, 12 2018.

HOUCK, K. A.; LEUNG, D. W.; ROWLAND, A. M.; WINER, J. *et al.* Dual regulation of vascular endothelial growth factor bioavailability by genetic and proteolytic mechanisms. **J Biol Chem**, 267, n. 36, p. 26031-26037, Dec 1992.

HOWARD, L.; AMENT, M.; FLEMING, C. R.; SHIKE, M. *et al.* Current use and clinical outcome of home parenteral and enteral nutrition therapies in the United States. **Gastroenterology**, 109, n. 2, p. 355-365, Aug 1995.

HUCH, M.; DORRELL, C.; BOJ, S. F.; VAN ES, J. H. *et al.* In vitro expansion of single Lgr5+ liver stem cells induced by Wnt-driven regeneration. **Nature**, 494, n. 7436, p. 247-250, Feb 2013.

ISANI, M. A.; GEE, K.; SCHALL, K.; SCHLIEVE, C. R. *et al.* Wnt signaling inhibition by monensin results in a period of Hippo pathway activation during intestinal adaptation in zebrafish. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, 316, n. 6, p. G679-G691, 06 2019.

ISHII, Y.; WAJID, M.; BAZZI, H.; FANTAUZZO, K. A. *et al.* Mutations in R-spondin 4 (RSPO4) underlie inherited anonychia. **J Invest Dermatol**, 128, n. 4, p. 867-870, Apr 2008.

KAMATA, T.; KATSUBE, K.; MICHIKAWA, M.; YAMADA, M. *et al.* R-spondin, a novel gene with thrombospondin type 1 domain, was expressed in the dorsal neural tube and affected in Wnts mutants. **Biochim Biophys Acta**, 1676, n. 1, p. 51-62, Jan 2004.

KANEDA, H.; ARAO, T.; TANAKA, K.; TAMURA, D. *et al.* FOXQ1 is overexpressed in colorectal cancer and enhances tumorigenicity and tumor growth. **Cancer Res**, 70, n. 5, p. 2053-2063, Mar 2010.

KATO, T.; TZAKIS, A. G.; SELVAGGI, G.; GAYNOR, J. J. *et al.* Intestinal and multivisceral transplantation in children. **Ann Surg**, 243, n. 6, p. 756-764; discussion 764-756, Jun 2006.

KAUFMAN, R. J.; WASLEY, L. C.; SPILIOTES, A. J.; GOSSELS, S. D. *et al.* Coamplification and coexpression of human tissue-type plasminogen activator and murine dihydrofolate reductase sequences in Chinese hamster ovary cells. **Mol Cell Biol**, 5, n. 7, p. 1750-1759, Jul 1985.

KAZANSKAYA, O.; GLINKA, A.; DEL BARCO BARRANTES, I.; STANNEK, P. *et al.* R-Spondin2 is a secreted activator of Wnt/beta-catenin signaling and is required for Xenopus myogenesis. **Dev Cell**, 7, n. 4, p. 525-534, Oct 2004.

KAZANSKAYA, O.; OHKAWARA, B.; HEROULT, M.; WU, W. *et al.* The Wnt signaling regulator R-spondin 3 promotes angioblast and vascular development. **Development**, 135, n. 22, p. 3655-3664, Nov 2008.

KIM, J. Y.; KIM, Y. G.; LEE, G. M. CHO cells in biotechnology for production of recombinant proteins: current state and further potential. **Appl Microbiol Biotechnol**, 93, n. 3, p. 917-930, Feb 2012.

KIM, K. A.; KAKITANI, M.; ZHAO, J.; OSHIMA, T. *et al.* Mitogenic influence of human R-spondin1 on the intestinal epithelium. **Science**, 309, n. 5738, p. 1256-1259, Aug 2005.

KIM, K. A.; WAGLE, M.; TRAN, K.; ZHAN, X. *et al.* R-Spondin family members regulate the Wnt pathway by a common mechanism. **Mol Biol Cell**, 19, n. 6, p. 2588-2596, Jun 2008.

KIM, K. A.; ZHAO, J.; ANDARMANI, S.; KAKITANI, M. *et al.* R-Spondin proteins: a novel link to beta-catenin activation. **Cell Cycle**, 5, n. 1, p. 23-26, Jan 2006.

KLAUZINSKA, M.; BALJINNYAM, B.; RAAFAT, A.; RODRIGUEZ-CANALES, J. *et al.* Rspo2/Int7 regulates invasiveness and tumorigenic properties of mammary epithelial cells. **J Cell Physiol**, 227, n. 5, p. 1960-1971, May 2012.

KOHN, A. D.; MOON, R. T. Wnt and calcium signaling: beta-catenin-independent pathways. **Cell Calcium**, 38, n. 3-4, p. 439-446, 2005 Sep-Oct 2005.

KRAUSOVA, M.; KORINEK, V. Wnt signaling in adult intestinal stem cells and cancer. **Cell Signal**, 26, n. 3, p. 570-579, Mar 2014.

KRÖNKE, G.; UDERHARDT, S.; KIM, K. A.; STOCK, M. *et al.* R-spondin 1 protects against inflammatory bone damage during murine arthritis by modulating the Wnt pathway. **Arthritis Rheum**, 62, n. 8, p. 2303-2312, Aug 2010.

KUANG, S. Q.; TONG, W. G.; YANG, H.; LIN, W. *et al.* Genome-wide identification of aberrantly methylated promoter associated CpG islands in acute lymphocytic leukemia. **Leukemia**, 22, n. 8, p. 1529-1538, Aug 2008.

LACOUR, F.; VEZIN, E.; BENTZINGER, C. F.; SINCENNES, M. C. *et al.* R-spondin1 Controls Muscle Cell Fusion through Dual Regulation of Antagonistic Wnt Signaling Pathways. **Cell Rep**, 18, n. 10, p. 2320-2330, 03 2017.

LADEFOGED, K.; HESSOV, I.; JARNUM, S. Nutrition in short-bowel syndrome. **Scand J Gastroenterol Suppl**, 216, p. 122-131, 1996.

LEE, S. Y.; JEON, H. M.; JU, M. K.; KIM, C. H. *et al.* Wnt/Snail signaling regulates cytochrome C oxidase and glucose metabolism. **Cancer Res**, 72, n. 14, p. 3607-3617, Jul 2012.

LEGARDINIER, S.; KLETT, D.; POIRIER, J. C.; COMBARNOUS, Y. *et al.* Mammalian-like nonsialyl complex-type N-glycosylation of equine gonadotropins in Mimic insect cells. **Glycobiology**, 15, n. 8, p. 776-790, Aug 2005.

LEVIN, D. E.; BARTHEL, E. R.; SPEER, A. L.; SALA, F. G. *et al.* Human tissue-engineered small intestine forms from postnatal progenitor cells. **J Pediatr Surg**, 48, n. 1, p. 129-137, Jan 2013.

LEVIN, G.; KOGA, B. A. A.; BELCHIOR, G. G.; CARREIRA, A. C. O. *et al.* Production, purification and characterization of recombinant human R-spondin1 (RSPO1) protein stably expressed in human HEK293 cells. **BMC Biotechnol**, 20, n. 1, p. 5, 01 2020.

LEVIN, G.; ZUBER, S. M.; SQUILLARO, A. I.; SOGAYAR, M. C. *et al.* R-Spondin 1 (RSPO1) Increases Mouse Intestinal Organoid Unit Size and Survival in vitro and Improves Tissue-Engineered Small Intestine Formation in vivo. **Front. Bioeng. Biotechnol.** , 2020.

LEY, S.; GALUBA, O.; SALATHE, A.; MELIN, N. *et al.* Screening of Intestinal Crypt Organoids: A Simple Readout for Complex Biology. **SLAS Discov**, 22, n. 5, p. 571-582, Jun 2017.

LI, B.; LEE, C.; CADETE, M.; ZHU, H. *et al.* Impaired Wnt/ β -catenin pathway leads to dysfunction of intestinal regeneration during necrotizing enterocolitis. **Cell Death Dis**, 10, n. 10, p. 743, Oct 2019.

LI, S. J.; YEN, T. Y.; ENDO, Y.; KLAUZINSKA, M. *et al.* Loss-of-function point mutations and two-furin domain derivatives provide insights about R-spondin2 structure and function. **Cell Signal**, 21, n. 6, p. 916-925, Jun 2009.

LI, Z.; LIU, S.; LOU, J.; MULHOLLAND, M. *et al.* LGR4 protects hepatocytes from injury in mouse. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, 316, n. 1, p. G123-G131, 01 2019.

LIN, X. Functions of heparan sulfate proteoglycans in cell signaling during development. **Development**, 131, n. 24, p. 6009-6021, Dec 2004.

LIN, Y.; FANG, Z. P.; LIU, H. J.; WANG, L. J. *et al.* HGF/R-spondin1 rescues liver dysfunction through the induction of Lgr5. **Nat Commun**, 8, n. 1, p. 1175, 10 2017.

LIU, Z.; HABENER, J. F. Glucagon-like peptide-1 activation of TCF7L2-dependent Wnt signaling enhances pancreatic beta cell proliferation. **J Biol Chem**, 283, n. 13, p. 8723-8735, Mar 2008.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, 25, n. 4, p. 402-408, Dec 2001.

LOWTHER, W.; WILEY, K.; SMITH, G. H.; CALLAHAN, R. A new common integration site, Int7, for the mouse mammary tumor virus in mouse mammary tumors identifies a gene whose product has furin-like and thrombospondin-like sequences. **J Virol**, 79, n. 15, p. 10093-10096, Aug 2005.

LU, W.; KIM, K. A.; LIU, J.; ABO, A. *et al.* R-spondin1 synergizes with Wnt3A in inducing osteoblast differentiation and osteoprotegerin expression. **FEBS Lett**, 582, n. 5, p. 643-650, Mar 2008.

LÜBBERS, J.; RODRÍGUEZ, E.; VAN KOOYK, Y. Modulation of Immune Tolerance via Siglec-Sialic Acid Interactions. **Front Immunol**, 9, p. 2807, 2018.

MACDONALD, B. T.; TAMAI, K.; HE, X. Wnt/ β -catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. **Dev Cell**, 17, n. 1, p. 9-26, Jul 2009.

MAHE, M. M.; AIHARA, E.; SCHUMACHER, M. A.; ZAVROS, Y. *et al.* Establishment of Gastrointestinal Epithelial Organoids. **Curr Protoc Mouse Biol**, 3, n. 4, p. 217-240, 2013.

MATTHEWS, J. A.; SALA, F. G.; SPEER, A. L.; WARBURTON, D. *et al.* VEGF optimizes the formation of tissue-engineered small intestine. **Regen Med**, 6, n. 5, p. 559-567, Sep 2011.

MAVILA, N.; TRECARTIN, A.; SPURRIER, R.; XIAO, Y. *et al.* Functional Human and Murine Tissue-Engineered Liver Is Generated from Adult Stem/Progenitor Cells. **Stem Cells Transl Med**, 6, n. 1, p. 238-248, 01 2017.

MESSING, B.; CRENN, P.; BEAU, P.; BOUTRON-RUAULT, M. C. *et al.* Long-term survival and parenteral nutrition dependence in adult patients with the short bowel syndrome. **Gastroenterology**, 117, n. 5, p. 1043-1050, Nov 1999.

MOAD, H. E.; PIOSZAK, A. A. Reconstitution of R-spondin:LGR4:ZNRF3 adult stem cell growth factor signaling complexes with recombinant proteins produced in *Escherichia coli*. **Biochemistry**, 52, n. 41, p. 7295-7304, Oct 2013.

MOREMEN, K. W.; TIEMEYER, M.; NAIRN, A. V. Vertebrate protein glycosylation: diversity, synthesis and function. **Nat Rev Mol Cell Biol**, 13, n. 7, p. 448-462, Jun 2012.

MÜNSTERBERG, A. E.; LASSAR, A. B. Combinatorial signals from the neural tube, floor plate and notochord induce myogenic bHLH gene expression in the somite. **Development**, 121, n. 3, p. 651-660, Mar 1995.

NAM, J. S.; PARK, E.; TURCOTTE, T. J.; PALENCIA, S. *et al.* Mouse R-spondin2 is required for apical ectodermal ridge maintenance in the hindlimb. **Dev Biol**, 311, n. 1, p. 124-135, Nov 2007.

NAM, J. S.; TURCOTTE, T. J.; SMITH, P. F.; CHOI, S. *et al.* Mouse cristin/R-spondin family proteins are novel ligands for the Frizzled 8 and LRP6 receptors and activate beta-catenin-dependent gene expression. **J Biol Chem**, 281, n. 19, p. 13247-13257, May 2006.

NAM, J. S.; TURCOTTE, T. J.; YOON, J. K. Dynamic expression of R-spondin family genes in mouse development. **Gene Expr Patterns**, 7, n. 3, p. 306-312, Jan 2007.

NGUYEN, B. L.; THOMPSON, J. S. Growing small-intestinal neomucosa in serosa-lined pouches. **Curr Surg**, 47, n. 4, p. 269-271, 1990 Jul-Aug 1990.

NIGHTINGALE, J. M.; LENNARD-JONES, J. E. The short bowel syndrome: what's new and old? **Dig Dis**, 11, n. 1, p. 12-31, 1993.

NUCCI, A.; BURNS, R. C.; ARMAH, T.; LOWERY, K. *et al.* Interdisciplinary management of pediatric intestinal failure: a 10-year review of rehabilitation and transplantation. **J Gastrointest Surg**, 12, n. 3, p. 429-435; discussion 435-426, Mar 2008.

NUSSE, R. Wnt signaling in disease and in development. **Cell Res**, 15, n. 1, p. 28-32, Jan 2005.

O'KEEFE, S. J.; BUCHMAN, A. L.; FISHBEIN, T. M.; JEEJEEBHOY, K. N. *et al.* Short bowel syndrome and intestinal failure: consensus definitions and overview. **Clin Gastroenterol Hepatol**, 4, n. 1, p. 6-10, Jan 2006.

OHKAWARA, B.; GLINKA, A.; NIEHRS, C. Rspo3 binds syndecan 4 and induces Wnt/PCP signaling via clathrin-mediated endocytosis to promote morphogenesis. **Dev Cell**, 20, n. 3, p. 303-314, Mar 2011.

OMASA, T.; ONITSUKA, M.; KIM, W. D. Cell engineering and cultivation of chinese hamster ovary (CHO) cells. **Curr Pharm Biotechnol**, 11, n. 3, p. 233-240, Apr 2010.

OOTANI, A.; LI, X.; SANGIORGI, E.; HO, Q. T. *et al.* Sustained in vitro intestinal epithelial culture within a Wnt-dependent stem cell niche. **Nat Med**, 15, n. 6, p. 701-706, Jun 2009.

PARMA, P.; RADI, O.; VIDAL, V.; CHABOISSIER, M. C. *et al.* R-spondin1 is essential in sex determination, skin differentiation and malignancy. **Nat Genet**, 38, n. 11, p. 1304-1309, Nov 2006.

PEYRET, B.; COLLARDEAU, S.; TOUZET, S.; LORAS-DUCLAUX, I. *et al.* Prevalence of liver complications in children receiving long-term parenteral nutrition. **Eur J Clin Nutr**, 65, n. 6, p. 743-749, Jun 2011.

PICHLER, J.; HORN, V.; MACDONALD, S.; HILL, S. Intestinal failure-associated liver disease in hospitalised children. **Arch Dis Child**, 97, n. 3, p. 211-214, Mar 2012.

PINTO, D.; CLEVERS, H. Wnt control of stem cells and differentiation in the intestinal epithelium. **Exp Cell Res**, 306, n. 2, p. 357-363, Jun 2005.

PINTO, D.; GREGORIEFF, A.; BEGTHEL, H.; CLEVERS, H. Canonical Wnt signals are essential for homeostasis of the intestinal epithelium. **Genes Dev**, 17, n. 14, p. 1709-1713, Jul 2003.

POTTEN, C. S.; GANDARA, R.; MAHIDA, Y. R.; LOEFFLER, M. *et al.* The stem cells of small intestinal crypts: where are they? **Cell Prolif**, 42, n. 6, p. 731-750, Dec 2009.

QUIRÓS-TEJEIRA, R. E.; AMENT, M. E.; REYEN, L.; HERZOG, F. *et al.* Long-term parenteral nutritional support and intestinal adaptation in children with short bowel syndrome: a 25-year experience. **J Pediatr**, 145, n. 2, p. 157-163, Aug 2004.

REYES, J.; BUENO, J.; KOCOSHIS, S.; GREEN, M. *et al.* Current status of intestinal transplantation in children. **J Pediatr Surg**, 33, n. 2, p. 243-254, Feb 1998.

RULIFSON, I. C.; KARNIK, S. K.; HEISER, P. W.; TEN BERGE, D. *et al.* Wnt signaling regulates pancreatic beta cell proliferation. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 104, n. 15, p. 6247-6252, Apr 2007.

SALA, F. G.; KUNISAKI, S. M.; OCHOA, E. R.; VACANTI, J. *et al.* Tissue-engineered small intestine and stomach form from autologous tissue in a preclinical large animal model. **J Surg Res**, 156, n. 2, p. 205-212, Oct 2009.

SALA, F. G.; MATTHEWS, J. A.; SPEER, A. L.; TORASHIMA, Y. *et al.* A multicellular approach forms a significant amount of tissue-engineered small intestine in the mouse. **Tissue Eng Part A**, 17, n. 13-14, p. 1841-1850, Jul 2011.

SATO, T.; STANGE, D. E.; FERRANTE, M.; VRIES, R. G. *et al.* Long-term expansion of epithelial organoids from human colon, adenoma, adenocarcinoma, and Barrett's epithelium. **Gastroenterology**, 141, n. 5, p. 1762-1772, Nov 2011.

SATO, T.; VRIES, R. G.; SNIPPERT, H. J.; VAN DE WETERING, M. *et al.* Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. **Nature**, 459, n. 7244, p. 262-265, May 2009.

SCHALL, K. A.; HOLOYDA, K. A.; GRANT, C. N.; LEVIN, D. E. *et al.* Adult zebrafish intestine resection: a novel model of short bowel syndrome, adaptation, and intestinal stem cell regeneration. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, 309, n. 3, p. G135-145, Aug 2015.

SCHALL, K. A.; HOLOYDA, K. A.; ISANI, M.; SCHLIEVE, C. *et al.* Intestinal adaptation in proximal and distal segments: Two epithelial responses diverge after intestinal separation. **Surgery**, 161, n. 4, p. 1016-1027, 04 2017.

SCHALL, K. A.; THORNTON, M. E.; ISANI, M.; HOLOYDA, K. A. *et al.* Short bowel syndrome results in increased gene expression associated with proliferation, inflammation, bile acid synthesis and immune system activation: RNA sequencing a zebrafish SBS model. **BMC Genomics**, 18, n. 1, p. 23, 01 2017.

SCHINDLER, A. J.; WATANABE, A.; HOWELL, S. B. LGR5 and LGR6 in stem cell biology and ovarian cancer. **Oncotarget**, 9, n. 1, p. 1346-1355, Jan 2017.

SCHLESSINGER, K.; HALL, A.; TOLWINSKI, N. Wnt signaling pathways meet Rho GTPases. **Genes Dev**, 23, n. 3, p. 265-277, Feb 2009.

SCHUIJERS, J.; CLEVERS, H. Adult mammalian stem cells: the role of Wnt, Lgr5 and R-spondins. **EMBO J**, 31, n. 12, p. 2685-2696, Jun 2012.

SCHWARTZ, D. R.; WU, R.; KARDIA, S. L.; LEVIN, A. M. *et al.* Novel candidate targets of beta-catenin/T-cell factor signaling identified by gene expression profiling of ovarian endometrioid adenocarcinomas. **Cancer Res**, 63, n. 11, p. 2913-2922, Jun 2003.

SESHAGIRI, S.; STAWISKI, E. W.; DURINCK, S.; MODRUSAN, Z. *et al.* Recurrent R-spondin fusions in colon cancer. **Nature**, 488, n. 7413, p. 660-664, Aug 2012.

SHARMA, A. R.; CHOI, B. S.; PARK, J. M.; LEE, D. H. *et al.* Rspo 1 promotes osteoblast differentiation via Wnt signaling pathway. **Indian J Biochem Biophys**, 50, n. 1, p. 19-25, Feb 2013.

SHI, G. X.; MAO, W. W.; ZHENG, X. F.; JIANG, L. S. The role of R-spondins and their receptors in bone metabolism. **Prog Biophys Mol Biol**, 122, n. 2, p. 93-100, Nov 2016.

SPENCER, A. U.; NEAGA, A.; WEST, B.; SAFRAN, J. *et al.* Pediatric short bowel syndrome: redefining predictors of success. **Ann Surg**, 242, n. 3, p. 403-409; discussion 409-412, Sep 2005.

SPURRIER, R. G.; GRIKSCHIT, T. C. Tissue engineering the small intestine. **Clin Gastroenterol Hepatol**, 11, n. 4, p. 354-358, Apr 2013.

STARR, T. K.; ALLAEI, R.; SILVERSTEIN, K. A.; STAGGS, R. A. *et al.* A transposon-based genetic screen in mice identifies genes altered in colorectal cancer. **Science**, 323, n. 5922, p. 1747-1750, Mar 2009.

STOLLMAN, N. H.; NEUSTATER, B. R.; ROGERS, A. I. Short-bowel syndrome. **Gastroenterologist**, 4, n. 2, p. 118-128, Jun 1996.

SUDAN, D.; THOMPSON, J.; BOTHAS, J.; GRANT, W. *et al.* Comparison of intestinal lengthening procedures for patients with short bowel syndrome. **Ann Surg**, 246, n. 4, p. 593-601; discussion 601-594, Oct 2007.

SUGIMURA, R.; LI, L. Noncanonical Wnt signaling in vertebrate development, stem cells, and diseases. **Birth Defects Res C Embryo Today**, 90, n. 4, p. 243-256, Dec 2010.

TAKEGAMI, Y.; OHKAWARA, B.; ITO, M.; MASUDA, A. *et al.* R-spondin 2 facilitates differentiation of proliferating chondrocytes into hypertrophic chondrocytes by enhancing Wnt/ β -catenin signaling in endochondral ossification. **Biochem Biophys Res Commun**, 473, n. 1, p. 255-264, Apr 2016.

THEODOROU, V.; KIMM, M. A.; BOER, M.; WESSELS, L. *et al.* MMTV insertional mutagenesis identifies genes, gene families and pathways involved in mammary cancer. **Nat Genet**, 39, n. 6, p. 759-769, Jun 2007.

THOMPSON, J. S. Management of the short bowel syndrome. **Gastroenterol Clin North Am**, 23, n. 2, p. 403-420, Jun 1994.

THOMPSON, J. S. Comparison of massive vs. repeated resection leading to short bowel syndrome. **J Gastrointest Surg**, 4, n. 1, p. 101-104, 2000 Jan-Feb 2000.

THOMPSON, J. S.; HARTY, R. J.; SAIGH, J. A.; GIGER, D. K. Morphologic and nutritional responses to intestinal patching following intestinal resection. **Surgery**, 103, n. 1, p. 79-86, Jan 1988.

THOMPSON, J. S.; ROCHLING, F. A.; WESEMAN, R. A.; MERCER, D. F. Current management of short bowel syndrome. **Curr Probl Surg**, 49, n. 2, p. 52-115, Feb 2012.

TIAN, H.; BIEHS, B.; CHIU, C.; SIEBEL, C. W. *et al.* Opposing activities of Notch and Wnt signaling regulate intestinal stem cells and gut homeostasis. **Cell Rep**, 11, n. 1, p. 33-42, Apr 2015.

TOMASELLI, S.; MEGIORNI, F.; DE BERNARDO, C.; FELICI, A. *et al.* Syndromic true hermaphroditism due to an R-spondin1 (RSPO1) homozygous mutation. **Hum Mutat**, 29, n. 2, p. 220-226, Feb 2008.

TONG, W. G.; WIERDA, W. G.; LIN, E.; KUANG, S. Q. *et al.* Genome-wide DNA methylation profiling of chronic lymphocytic leukemia allows identification of epigenetically

repressed molecular pathways with clinical impact. **Epigenetics**, 5, n. 6, p. 499-508, Aug 2010.

TSUCHIYA, M.; NIWA, Y.; SIMIZU, S. N-glycosylation of R-spondin1 at Asn137 negatively regulates its secretion and Wnt/ β -catenin signaling-enhancing activity. **Oncol Lett**, 11, n. 5, p. 3279-3286, May 2016.

UEMORI, T.; ASADA, K.; KATO, I.; HARASAWA, R. Amplification of the 16S-23S Spacer Region in rRNA Operons of Mycoplasmas by the Polymerase Chain Reaction. **Systematic and Applied Microbiology**, 15, n. 2, p. 181-186, 1992.

VAN AMERONGEN, R.; NUSSE, R. Towards an integrated view of Wnt signaling in development. **Development**, 136, n. 19, p. 3205-3214, Oct 2009.

VAN DER FLIER, L. G.; CLEVERS, H. Stem cells, self-renewal, and differentiation in the intestinal epithelium. **Annu Rev Physiol**, 71, p. 241-260, 2009.

VAN VLIET, M. J.; HARMSSEN, H. J.; DE BONT, E. S.; TISSING, W. J. The role of intestinal microbiota in the development and severity of chemotherapy-induced mucositis. **PLoS Pathog**, 6, n. 5, p. e1000879, May 2010.

WALES, P. W.; DE SILVA, N.; KIM, J.; LECCE, L. *et al.* Neonatal short bowel syndrome: population-based estimates of incidence and mortality rates. **J Pediatr Surg**, 39, n. 5, p. 690-695, May 2004.

WALSH, G. Post-translational modifications of protein biopharmaceuticals. **Drug Discov Today**, 15, n. 17-18, p. 773-780, Sep 2010.

WALSH, G. Biopharmaceutical benchmarks 2018. **Nat Biotechnol**, 36, n. 12, p. 1136-1145, 12 2018.

WALSH, G.; JEFFERIS, R. Post-translational modifications in the context of therapeutic proteins. **Nat Biotechnol**, 24, n. 10, p. 1241-1252, Oct 2006.

WANG, D.; HUANG, B.; ZHANG, S.; YU, X. *et al.* Structural basis for R-spondin recognition by LGR4/5/6 receptors. **Genes Dev**, 27, n. 12, p. 1339-1344, Jun 2013.

WATSON, C. L.; MAHE, M. M.; MÚNERA, J.; HOWELL, J. C. *et al.* An in vivo model of human small intestine using pluripotent stem cells. **Nat Med**, 20, n. 11, p. 1310-1314, Nov 2014.

WEI, Q.; YOKOTA, C.; SEMENOV, M. V.; DOBLE, B. *et al.* R-spondin1 is a high affinity ligand for LRP6 and induces LRP6 phosphorylation and beta-catenin signaling. **J Biol Chem**, 282, n. 21, p. 15903-15911, May 2007.

WHYTE, J. L.; SMITH, A. A.; HELMS, J. A. Wnt signaling and injury repair. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, 4, n. 8, p. a008078, Aug 2012.

WONG, V. S.; OH, A. H.; CHASSOT, A. A.; CHABOISSIER, M. C. *et al.* R-spondin1 deficiency in mice improves glycaemic control in association with increased beta cell mass. **Diabetologia**, 54, n. 7, p. 1726-1734, Jul 2011.

WONG, V. S.; YEUNG, A.; SCHULTZ, W.; BRUBAKER, P. L. R-spondin-1 is a novel beta-cell growth factor and insulin secretagogue. **J Biol Chem**, 285, n. 28, p. 21292-21302, Jul 2010.

WU, L.; ZHANG, W.; QIAN, J.; WU, J. *et al.* R-spondin family members as novel biomarkers and prognostic factors in lung cancer. **Oncol Lett**, 18, n. 4, p. 4008-4015, Oct 2019.

YAN, K. S.; JANDA, C. Y.; CHANG, J.; ZHENG, G. X. Y. *et al.* Non-equivalence of Wnt and R-spondin ligands during Lgr5(+) intestinal stem-cell self-renewal. **Nature**, 545, n. 7653, p. 238-242, 05 2017.

YOON, J. K.; LEE, J. S. Cellular signaling and biological functions of R-spondins. **Cell Signal**, 24, n. 2, p. 369-377, Feb 2012.

ZHANG, L.; SONG, Y.; LING, Z.; LI, Y. *et al.* R-spondin 2-LGR4 system regulates growth, migration and invasion, epithelial-mesenchymal transition and stem-like properties of tongue squamous cell carcinoma via Wnt/ β -catenin signaling. **EBioMedicine**, 44, p. 275-288, Jun 2019.

ZHANG, Y.; LI, F.; SUN, D.; LIU, J. *et al.* Molecular analysis shows differential expression of R-spondin1 in zebrafish (*Danio rerio*) gonads. **Mol Biol Rep**, 38, n. 1, p. 275-282, Jan 2011.

ZHAO, J.; DE VERA, J.; NARUSHIMA, S.; BECK, E. X. *et al.* R-spondin1, a novel intestinotrophic mitogen, ameliorates experimental colitis in mice. **Gastroenterology**, 132, n. 4, p. 1331-1343, Apr 2007.

ZHOU, X.; GENG, L.; WANG, D.; YI, H. *et al.* R-Spondin1/LGR5 Activates TGF β Signaling and Suppresses Colon Cancer Metastasis. **Cancer Res**, Sep 2017.

APÊNDICES E ANEXOS

LISTA DE APÊNDICES E ANEXOS

A - CHLA ACCEPTANCE LETTER – Pg.177

B - ARTIGOS CIENTÍFICOS – Pg.178

1. Publicados – Pg.178

2. Aceitos para publicação – Pg. 181

3. Submetidos – Pg.181

C - ARTIGOS DE DIVULGAÇÃO CIENTÍFICA – Pg.182



USC University of
Southern California

DIVISION OF
PEDIATRIC SURGERY

Tracy C. Grikscheit, MD, FACS, FAAP
Attending Pediatric Surgeon
Associate Professor of Surgery
USC Keck School of Medicine
tgrikscheit@chla.usc.edu

March 15, 2017

Dr. Carlos Britto Cruz,
Scientific Director
FAPESP-Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
São Paulo, Brazil

Re: Letter of support for Gabriel Levin

Children's Hospital Los Angeles (CHLA) accepts current Ph.D. student, Gabriel Levin as a research intern and will provide the necessary instructional/administrative support. I will be supervising his research during his internship at CHLA. Mr. Levin will not be receiving any type of monetary compensation from Children's Hospital Los Angeles during the time of his internship.

Respectfully,

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Tracy C. Grikscheit".

Tracy C. Grikscheit, MD

ARTIGOS PUBLICADOS

[J Tissue Eng.](#) 2020 Jan-Dec; 11: 2041731420905701.

PMCID: [PMC7225796](#)

Published online 2020 Apr 27. doi: [10.1177/2041731420905701](#)


PMID: [32435442](#)

Induced pluripotent stem cell-derived enteric neural crest cells repopulate human aganglionic tissue-engineered intestine to form key components of the enteric nervous system

[David F Chang](#)^{1,*}, [Samuel M Zuber](#)^{1,*}, [Elizabeth A Gilliam](#)¹, [Laura-Marie A Nucho](#)¹, [Gabriel Levin](#)¹, [Fengnan Wang](#)¹, [Anthony I Squillaro](#)¹, [Sha Huang](#)^{2,3}, [Jason R Spence](#)^{2,3,4} and [Tracy C Grikscheit](#)^{1,5,6}

► [Author information](#) ► [Article notes](#) ► [Copyright and License information](#) [Disclaimer](#)

Abstract

Go to: 


Models for enteric neuropathies, in which intestinal nerves are absent or injured, are required to evaluate possible cell therapies. However, existing options, including transgenic mice, are variable and fragile. Here immunocompromised mice were implanted with human pluripotent stem cell-derived tissue-engineered small intestine 10 weeks prior to a second survival surgery in which enteric nervous system precursor cells, or saline controls, were injected into the human intestinal organoid-derived tissue-engineered small intestine and analyzed 4 weeks later. Human intestinal organoid-derived tissue-engineered small intestine implants injected with saline as controls illustrated formation of intestinal epithelium and mesenchyme without an enteric nervous system. Second surgical introduction of human pluripotent stem cell-generated enteric nervous system precursors into developing human intestinal organoid-derived tissue-engineered small intestine implants resulted in proliferative migratory neuronal and glial cells, including multiple neuronal subtypes, and demonstrated function in contractility assays.

Keywords: Tissue-engineered small intestine, human intestinal organoids, enteric nervous system, Hirschsprung disease

[BMC Res Notes.](#) 2020 Feb 4;13(1):57. doi: [10.1186/s13104-020-4914-8](#).

Fluorescence-based method is more accurate than counting-based methods for plotting growth curves of adherent cells.

[Pereira TE](#)^{1,2}, [Levin G](#)¹, [DeOcesano-Pereira C](#)^{1,3}, [Caodaglio AS](#)¹, [Fujita A](#)⁴, [Tonso A](#)⁵, [Sogayar MC](#)^{6,7}.

 [Author information](#)

Abstract

OBJECTIVE: Cell growth curves constitute one of the primary assays employed to analyze cell proliferation dynamics of in vitro cultured cells under specific culture conditions. From the cell growth curve, it is possible to assess the behavior of proliferating cells under different conditions, such as drug treatment and genomic editions. Traditionally, growth curves for adherent cells are obtained by seeding the cells in multiple-well plates and counting the total number of cells at different time points. Here, we compare this traditional method to the fluorescence-based method, which is based on the CFSE fluorescence decay over time.

RESULTS: The fluorescence-based method is not dependent on the determination of the total number of cells, but rather is approached by assessing the fluorescence of a sample of single cells from a cell population at different time points after plating. Therefore, this method is not biased due to either cell loss during harvesting or to the presence of cellular debris and cell clumps. Moreover, the fluorescence-based method displays lower variation among different measurements of the same time point, which increases the reliability on the determination of lag, log and stationary phase transitions.

KEYWORDS: Cell proliferation assessment; Doubling time determination; Fluorescence-based method; Growth curves

PMID: 32019595 PMCID: [PMC7001368](#) DOI: [10.1186/s13104-020-4914-8](#)

BMC Biotechnol. 2020 Jan 20;20(1):5. doi: 10.1186/s12896-020-0600-0.

Production, purification and characterization of recombinant human R-spondin1 (RSPO1) protein stably expressed in human HEK293 cells.

Levin G¹, Koga BAA^{1,2}, Belchior GG¹, Carreira ACO^{3,4}, Sogayar MC^{5,6}.

⊕ Author information

Abstract

BACKGROUND: The R-Spondin proteins comprise a family of secreted proteins, known for their important roles in cell proliferation, differentiation and death, by inducing the Wnt pathway. Several studies have demonstrated the importance of RSPOs in regulation of a number of tissue-specific processes, namely: bone formation, skeletal muscle tissue development, proliferation of pancreatic β -cells and intestinal stem cells and even cancer. RSPO1 stands out among RSPOs molecules with respect to its potential therapeutic use, especially in the Regenerative Medicine field, due to its mitogenic activity in stem cells. Here, we generated a recombinant human RSPO1 (rhRSPO1) using the HEK293 cell line, obtaining a purified, characterized and biologically active protein product to be used in Cell Therapy. The hRSPO1 coding sequence was synthesized and subcloned into a mammalian cell expression vector. HEK293 cells were stably co-transfected with the recombinant expression vector containing the hRSPO1 coding sequence and a hygromycin resistance plasmid, selected for hygromycin resistance and subjected to cell clones isolation.

RESULTS: rhRSPO1 was obtained, in the absence of serum, from culture supernatants of transfected HEK293 cells and purified using a novel purification strategy, involving two sequential chromatographic steps, namely: heparin affinity chromatography, followed by a molecular exclusion chromatography, designed to yield a high purity product. The purified protein was characterized by Western blotting, mass spectrometry and in vitro (C2C12 cells) and in vivo (BALB/c mice) biological activity assays, confirming the structural integrity and biological efficacy of this human cell expression system. Furthermore, rhRSPO1 glycosylation analysis allowed us to describe, for the first time, the glycan composition of this oligosaccharide chain, confirming the presence of an N-glycosylation in residue Asn137 of the polypeptide chain, as previously described. In addition, this analysis revealing the presence of glycan structures such as terminal sialic acid, N-acetylglucosamine and/or galactose.

CONCLUSION: Therefore, a stable platform for the production and purification of recombinant hRSPO1 from HEK293 cells was generated, leading to the production of a purified, fully characterized and biologically active protein product to be applied in Tissue Engineering.

KEYWORDS: HEK293 cells; Heterologous mammalian protein expression system; Peptide growth factors; Recombinant human R-spondin1 (RSPO1); Tissue engineering

PMID: 31959207 PMCID: [PMC6971977](#) DOI: [10.1186/s12896-020-0600-0](#)

Reprod Biol Endocrinol. 2018 Nov 13;16(1):116. doi: 10.1186/s12958-018-0422-2.

Spatio-temporal expression profile of matrix metalloproteinase (Mmp) modulators Reck and Sparc during the rat ovarian dynamics.

Levin G¹, Coelho TM^{1,2}, Nóbrega NG¹, Trombetta-Lima M^{1,2}, Sogayar MC^{1,2}, Carreira ACO^{3,4,5}.

⊕ Author information

Abstract

BACKGROUND: Matrix metalloproteinases (Mmps) and their tissue inhibitors (Timps) are widely recognized as crucial factors for extracellular matrix remodeling in the ovary and are involved in follicular growth, ovulation, luteinization, and luteolysis during the estrous cycle. Recently, several genes have been associated to the modulation of Mmps activity, including Basigin (Bsg), which induces the expression of Mmps in rat ovaries; Sparc, a TGF- β modulator that is related to increased expression of Mmps in cancer; and Reck, which is associated with Mmps inhibition. However, the expression pattern of Mmp modulators in ovary dynamics is still largely uncharacterized.

METHODS: To characterize the expression pattern of Mmps network members in ovary dynamics, we analyzed the spatio-temporal expression pattern of Reck and Sparc, as well as of Mmp2, Mmp9 and Mmp14 proteins, by immunohistochemistry (IHC), in pre-pubertal rat ovaries obtained from an artificial cycle induced by eCG/hCG, in the different phases of the hormone-induced estrous cycle. We also determined the gene expression profiles of Mmps (2, 9, 13, 14), Timps (1, 2, 3), Sparc, Bsg, and Reck to complement this panel.

RESULTS: IHC analysis revealed that Mmp protein expression peaks at the early stages of folliculogenesis and ovulation, decreases during ovulation-luteogenesis transition and luteogenesis, increasing again during corpus luteum maintenance and luteolysis. The protein expression patterns of these metalloproteinases and Sparc were inverse relative to the pattern displayed by Reck. We observed that the gene expression peaks of Mmps inhibitors Reck and Timp2 were closely paralleled by Mmp2 and Mmp9 suppression. The opposite was also true: increased Mmp2 and Mmp9 expression was concomitant to reduced Reck and Timp2 levels.

CONCLUSION: Therefore, our results generate a spatio-temporal expression profile panel of Mmps and their regulators, suggesting that Reck and Sparc seem to play a role during ovarian dynamics: Reck as a possible inhibitor and Sparc as an inducer of Mmps.

KEYWORDS: Extracellular matrix; Folliculogenesis; Mmps system; Ovary remodeling; Reck; Sparc

PMID: 30424792 PMCID: [PMC6234678](#) DOI: [10.1186/s12958-018-0422-2](#)

Dev Comp Immunol. 2017 Sep;74:144-153. doi: 10.1016/j.dci.2017.04.007. Epub 2017 Apr 13.

Functional characterization of neotropical snakes peripheral blood leukocytes subsets: Linking flow cytometry cell features, microscopy images and serum corticosterone levels.

de Carvalho MPN¹, Queiroz-Hazarbassanov NGT², de Oliveira Massoco C², Sant'Anna SS³, Lourenço MM³, Levin G⁴, Sogayar MC⁵, Grego KF³, Catão-Dias JL².

⊕ Author information

Abstract

Reptiles are the unique ectothermic amniotes, providing the key link between ectothermic anamniotes fish and amphibians, and endothermic birds and mammals; becoming an important group to study with the aim of providing significant knowledge into the evolutionary history of vertebrate immunity. Classification systems for reptiles' leukocytes have been described by their appearance rather than function, being still inconsistent. With the advent of modern techniques and the establishment of analytical protocols for snakes' blood by flow cytometry, we bring a qualitative and quantitative assessment of innate activities presented by snakes' peripheral blood leukocytes, thereby linking flow cytometric features with fluorescent and light microscopy images. Moreover, since corticosterone is an important immunomodulator in reptiles, hormone levels of all blood samples were measured. We provide novel and additional information which should contribute to better understanding of the development of the immune system of reptiles and vertebrates.

Copyright © 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

KEYWORDS: Flow cytometric analysis (FACS); Immune system; Oxidative burst; Phagocytosis; Reptile

PMID: 28414083 DOI: [10.1016/j.dci.2017.04.007](https://doi.org/10.1016/j.dci.2017.04.007)

ARTIGOS ACEITOS PARA PUBLICAÇÃO**ORIGINAL RESEARCH ARTICLE**

Front. Bioeng. Biotechnol. | doi: 10.3389/fbioe.2020.00476

R-Spondin 1 (RSPO1) Increases Mouse Intestinal Organoid Unit Size and Survival in vitro and Improves Tissue-Engineered Small Intestine Formation in vivo

Provisionally accepted The final,

formatted version of the article will be published soon. [Notify me](#)

 Gabriel Levin¹,  Samuel M. Zuber²,  Anthony I. Squillaro²,  Mari Cleide Sogayar¹, Tracy C. Grikscheit^{2*} and  Ana Claudia O. Carreira^{1*}

¹University of São Paulo, Brazil²Saban Research Institute, Children's Hospital Los Angeles, United States**ARTIGOS SUBMETIDOS**

BELCHIOR, G.G.; LEVIN, G; SOGAYAR, M.C; CARREIRA, A.C.O. Production of Recombinant Human Vascular Endothelial Growth Factor A isoforms (rhVEGFs) in HEK293 cells aiming at the generation of biopharmaceuticals. BMC Biotechnology. BBIT-D-19-00142

MASELLI, K.*; LEVIN, G.*; GEE, K.; CARREIRA, A.C.O.; SOGAYAR, M.C.O.; GRIKSCHIT, T.C. R-spondin1 enhances Wnt signaling and decreases weight loss in short bowel syndrome zebrafish. JOURNAL OF SURGICAL RESEARCH. JSURGRES-D-20-00329

ARTIGOS DE DIVULGAÇÃO CIENTÍFICA

GENÉTICA E SOCIEDADE

Biofármacos: sua importância e as técnicas utilizadas em sua produção

Ana Claudia Oliveira Carreira, Gabriel Levin, Tatiane Maldonado Coelho,
Gustavo Gross Belchior, Mari Cleide Sogayar

Instituto de Química, Departamento de Bioquímica, MJCEL-NETCEM-Faculdade de Medicina,
Universidade de São Paulo.

Autor para correspondência: ancoc@iq.usp.br

Genética e Sociedade, Vol. 8, Nº 2, 1, 2018

Medicina Regenerativa e Engenharia de Tecidos

Gabriel Levin¹, Gustavo Gross Belchior², Mari Cleide Sogayar³, Ana Claudia O. Correia^{1,4}

¹ Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina, NIICEL (Núcleo de Terapia Celular e Molecular), Departamento de Clínica Médica, São Paulo, SP

² Core-UH Comunicação Científica, SP

³ Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Departamento de Anatomia dos Animais Domésticos e Selvagens, São Paulo, SP

Autor para correspondência – amocelli@usp.br