



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



REPROGRAMAÇÃO DE FIBROBLASTOS DE PELE E CÉLULAS DO CORDÃO UMBILICAL POR MEIO DE PLASMÍDEOS VIRAIS E TRANSPOSONS NA PRODUÇÃO DE IPS EQUINAS

MIDYAN DAROZ GUASTALI

Tese apresentada ao Instituto de Biociências,
Câmpus de Botucatu, UNESP, para obtenção
do título de Doutor no Programa de Pós-
Graduação em Biologia Geral e Aplicada,
Área de concentração Biologia Celular,
Estrutural e Funcional.

Profa. Dra. Fernanda Da Cruz Landim

BOTUCATU – SP

2016

Programa de Pós-graduação em Biologia Geral e Aplicada
Distrito de Rubião Júnior s/n CEP 18618-000 Cx Postal 510 Botucatu-SP Brasil
Tel (14) 3811-6148 Fax (14) 3811-6148 posgraduacao@ibb.unesp.br



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

"Júlio de Mesquita Filho"

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

REPROGRAMAÇÃO DE FIBROBLASTOS DE PELE E CÉLULAS
DO CORDÃO UMBILICAL POR MEIO DE PLASMÍDEOS
VIRAIS E TRANSPOSONS NA PRODUÇÃO DE IPS EQUINAS

MIDYAN DAROZ GUASTALI

FERNANDA DA CRUZ LANDIM

Tese apresentada ao Instituto de Biociências,
Câmpus de Botucatu, UNESP, para obtenção
do título de Doutor no Programa de Pós-
Graduação em Biologia Geral e Aplicada,
Área de concentração Biologia Celular,
Estrutural e Funcional.

Profa. Dra. Fernanda Da Cruz Landim

BOTUCATU – SP

2016

Programa de Pós-graduação em Biologia Geral e Aplicada
Distrito de Rubião Júnior s/n CEP 18618-000 Cx Postal 510 Botucatu-SP Brasil
Tel (14) 3811-6148 Fax (14) 3811-6148 posgraduacao@ibb.unesp.br

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Guastali, Midyan Daroz.

Reprogramação de fibroblastos de pele e células do cordão umbilical por meio de plasmídeos virais e transposons na produção de iPS equinas / Midyan Daroz Guastali. - Botucatu, 2016

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Fernanda da Cruz Landim

Capes: 20601000

1. Equino. 2. Reprogramação celular. 3. Fibroblastos. 4. Cordão umbilical. 5. Células-tronco. 6. Elementos de DNA transponíveis. 7. Plasmídeos.

Palavras-chave: Caracterização celular; Células-tronco de pluripotência induzida; Cordão umbilical equino; Fibroblastos equinos; Reprogramação celular.

À minha família que
com muito carinho e apoio
não mediu esforços para que eu
chegasse a esta etapa da minha vida.

Aos meus pais Olga e Antonio, meu padrasto-pai Joel e ao meu irmão Mathias que sempre estiveram presentes e são fundamentais em minha vida, dando-me suporte, carinho e segurança nos momentos importantes, suportaram minha ausência diária e compartilham desta conquista.

Ao meu esposo Renê e ao meu filho Arthur, que são minhas fontes de energia para seguir em frente e são responsáveis pelo sucesso até aqui.

À minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Fernanda da Cruz Landim, pela oportunidade, pela confiança, pelo auxílio e orientação em todos os momentos da realização do projeto e acima de tudo pela amizade e ensinamentos.

Aos meus amigos do Laboratório Lança: Amanda, Bianca, Bruna, Carol Guapa, Carolzinha IC, Carol Destro, Carol Moraes, Danielle, Elaine, Isadora, Leandro obrigada pela convivência diária, partilhando cada descoberta, dividindo medos, incertezas e inseguranças, mas somando entusiasmos, forças e alegrias, que tornaram os meus dias sempre melhores.

Às minhas amigas Dani e Rosiara pela profunda amizade de tantos anos, que sempre estiveram ao meu lado apesar da distância.

À Fabiana Fernandes Bressan, pela paciência infinita, parceria e contribuição preciosa neste trabalho.

À Cláudia de Camargo Tozato, pela sintonia, amizade e transmissão de conhecimento de PCR em tempo real.

À Camila de Paula Freitas Dell'Aqua pela disponibilidade e discussão dos resultados das citometria de fluxo.

À Mariana de Lara Campos Arcuri pela colaboração, troca de experiências e realização dos experimentos de eletroporação.

Aos professores Flávio Vieira Meirelles, João Pessoa Araújo Júnior e Ivan de Godoy Maia que generosamente cederam os respectivos laboratórios para a realização de parte dos experimentos, meu muito obrigada.

Aos colegas dos demais laboratórios e funcionários do FMVZ, pela convivência diária e ajuda na realização do projeto.

Ao Instituto de Biociências de Botucatu pelo conhecimento científico adquirido ao longo do curso de pós-graduação.

À FAPESP (2012/18735-4) pelo auxílio financeiro e incentivo à pesquisa.

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, por permitir a realização dos experimentos deste trabalho.

Aos integrantes da banca examinadora, por disponibilizarem parte de seu tempo para a análise da tese.

A todas as pessoas que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização desse trabalho, que acreditaram em meu sucesso e caminharam ao meu lado, meus mais sinceros agradecimentos.

RESUMO

As pesquisas envolvendo a biologia das células-tronco abordam um amplo espectro de fenômenos, que vão desde o nível tecidual e celular, até o seu uso em terapias celulares. Esta crescente atenção sugere que é necessário estudar conceitos básicos da biologia das células-tronco para compreender completamente os processos de diferenciação funcional. Desta forma, o instrumento da reprogramação celular por meio da manipulação gênica fornece subsídios para melhor compreender os processos de renovação e diferenciação que constituem as características fundamentais das células-tronco. A obtenção dessas células em medicina veterinária visa validar diversos modelos experimentais domésticos, como o equino, na busca de novos fármacos e terapias alternativas para reabilitação. Uma série de estudos, porém, ainda são necessários para que tais aplicações sejam viáveis, uma vez que os mecanismos fundamentais das técnicas empregadas ainda não estão totalmente elucidados. Embora a reprogramação celular por meio de vetores virais tenha sido relatada com sucesso em diversas espécies animais, outras técnicas também podem ser empregadas, como o uso de transposons, sequências de DNAs capazes de se movimentar de uma região para outra no genoma de uma célula. Não se tem conhecimento de qual o melhor tipo celular a ser utilizado, e nem tão pouco qual a metodologia de reprogramação mais eficiente. Sabe-se que o cordão umbilical possui uma reserva rica em células-tronco mesenquimais, as quais por serem multipotentes podem melhorar a eficiência de obtenção de células de pluripotência induzida (iPS) em comparação ao uso de fibroblastos, pouco eficientes ao serem reprogramados. O objetivo deste trabalho foi obter iPS por meio de mecanismo viral e não-viral de fibroblastos adultos e células do cordão umbilical equino, visando observar qual o tipo de infecção e qual o tipo de célula é mais eficiente para reprogramação celular. Ambos os tipos celulares foram infectados com vetores virais e transposons contendo os genes OCT-4, SOX-2, c-MYC, KLF-4; as células transformadas foram avaliadas quanto a morfologia, imunocitoquímica e citometria de fluxo com os marcadores típicos de células-tronco pluripotentes e também quanto as alterações causadas no perfil de expressão gênica das células pelo método de PCR em tempo real; por fim as células reprogramadas foram induzidas a se diferenciarem em tecidos dos 3 folhetos germinativos. Os resultados demonstraram que tanto os fibroblastos quanto as células do cordão umbilical submetidos à infecção viral apresentaram características de células pluripotentes como morfologia característica, marcação positiva para fatores de pluripotência e expressão gênica específica. Os corpos embrióides formados também apresentaram marcação imunocitoquímica para ectoderme, mesoderme e endoderme. Apesar do tempo para

início da formação das colônias serem parecidos (7 dias para os fibroblastos e 6 dias para as células do cordão umbilical), a expansão das colônias dos fibroblastos reprogramados foi lenta, com a 1ª passagem realizada 30 dias após a infecção em comparação com as colônias de cordão umbilical, nas quais a 1ª passagem foi realizada após 15 dias. Não foi verificada reprogramação efetiva as infecções com transposons em nenhum dos dois tipos celulares. Conclui-se que o método de infecção por vetor viral em células do cordão umbilical é mais eficiente do que em fibroblastos e que em ambos os tipos celulares, o mecanismo de transposons não resultou em células reprogramadas.

Palavras-chave: Caracterização celular, Células-tronco de pluripotência induzida, Cordão umbilical equino, Fibroblastos equinos, Reprogramação celular.

ABSTRACT

Researches on the biology of stem cells cover a broad spectrum of phenomena, ranging from tissue and cellular level, to their use in cell therapy. This growing attention suggests that is necessary to study basic concepts of stem cells organization in order to fully understand the functional differentiation processes. Thus, the cell reprogramming through gene manipulation provides grants to better understand the processes of renewal and differentiation which are the essential characteristics of stem cells. Obtaining these cells in veterinary medicine aims to validate various household experimental models, such as horses, on the search for new drugs and alternative therapies for rehabilitation. However, a number of studies is still necessary for such applications to be feasible, since the fundamental mechanisms of techniques employed are not fully elucidated yet. Although cell reprogramming using viral plasmid has been reported with success in several animal species, other techniques may also be employed, such use transposons, this is, DNAs sequences capable of moving from one region to another in the cell genome. The unawareness of what the best cell type to be used, and nor what is the most efficient reprogramming methodology. It is known that the cord has rich reserves mesenchymal stem cells, which are multipotent and can improve the efficiency of obtaining the induced Pluripotent Stem Cells (iPS) compared to the use of fibroblast, inefficient to be reprogrammed. The aim of this study was to obtain iPS through viral transfection and non-viral adult fibroblasts and equine cord cells, aiming to observe which transfection and cell type is more efficient for cell reprogramming. Both cell types was infected with viral vectors and transposons containing the genes OCT-4, SOX-2, c-MYC, and KLF-4; transformed cells were evaluated for morphology, immunocytochemistry and flow cytometry with the typical pluripotent stem cells markers and also for the changes caused in the gene expression profile of the cells by the PCR real time method; finally reprogrammed cells were induced to reprogram to differentiate into three germ layers tissues. The results showed that fibroblasts and cord cells subjected to viral infection presented pluripotent cell characteristics such as morphology, positive staining for antibodies and specific gene expression, immunocytochemistry of the formed embryoid bodies also showed labeling for ectoderm, mesoderm and endoderm. Despite the time to start colonies formation is very similar (7 days for fibroblasts and 6 days for cord cells), the expansion of reprogrammed fibroblasts colonies was slow, with the 1st performed 30 days post-infection in comparison with umbilical cord colonies, in which the 1st pass on cord colonies after 15 days. No effective reprogramming of transposon infections was observed in either cell type. It is concluded that the method of viral

vector infection in umbilical cord cells is more efficient than in fibroblasts and that in both cell types, the mechanism of transposons did not result in reprogrammed cells.

Keywords: Cell Characterization, induced Pluripotent Stem Cells, Equine cord, Equine Fibroblasts, Reprogramming Cell.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Delineamento experimental.....	15
Figura 2. Processamento do cordão umbilical equino. A. Materiais utilizados: placa de Petri, amostra do cordão umbilical, pinça, tesoura, bisturi e cabo. B. Divulcionamento da matriz para retirada de veia e artérias umbilicais. C. Fragmentos da matriz. D. Tecido sob ação da enzima collagenase. E. Filtração da solução para obtenção das células. F. Pellet formado após centrifugação da solução. G. Plaqueamento das células. H. Início da expansão do cultivo celular (20X). I. Confluência do cultivo (20X).....	19
Figura 3. Mapa do vetor lentiviral EF1a-hSTEMCCA (OKSM) Figura adaptada do catálogo n. SCR544 (humano) Millipore.....	21
Figura 4. Mapa do vetor transposon PiggyBac e Super PiggyBac Transposase. . Adaptado do catálogo PB 1-PiggyBac™ Transposon Vector System. System Biosciences.....	24
Figura 5. Imagem do plasmídeo STEMCCA indicando as regiões dos genes-alvo e primers. Geneious version 7.1.3.....	33
Figura 6. Cultivos celulares em 1ª passagem. A. Fibroblastos adultos equinos (100X), B. Células da matriz do cordão umbilical equino (100x). C. Fibroblastos embrionários murinos (200X).....	34
Figura 7. Células em cultivo pós-reprogramação. Fibroblastos adultos reprogramados: A: 7 dias, C: 11 dias e E: 18 dias. Células reprogramadas do cordão umbilical equino: B: 7 dias, D: 11 dias e F: 18 dias. Os círculos vermelhos delimitam as colônias sem formação. Em A, a barra de escala representa 1:100µm, em B, C, D, E e F, as barras representam 1:200µm.....	36
Figura 8. Imunofluorescência das colônias de fibroblastos adultos reprogramados, expressando marcação positiva para Oct-4 (A) e Nanog (C), sendo (B) e (D) suas respectivas marcações de núcleo com DAPI.(Kit: SCR078 Fluorescent Human ES/iPS Cell Characterization Kit-Millipore). Em A e B as barras representam 1: 50µm, em C e D as barras representam 1:100µm.....	38
Figura 9. Imunofluorescência das colônias de células reprogramadas de cordão umbilical, expressando marcação positiva para Oct-4 (A), Sox-2 (C) e Tra-1-81 (E), sendo (B), (D) e (F) suas respectivas marcações de núcleo com DAPI. Em A, B, C e D as barras representam 1:50µm, em E e F as barras representam 1:100µm.....	39
Figura 10: Marcação positiva da enzima fosfatase alcalina em fibroblastos adultos reprogramados equinos. As setas vermelhas evidenciam a monocamada de sustentação (FEM). Em A e B as barras representam 1:200µm. Em C e D aumento 200X.....	41
Figura 11: Marcação positiva da enzima fosfatase alcalina em células reprogramadas do cordão umbilical equino. As setas vermelhas evidenciam a monocamada de sustentação (FEM). Aumento 200X.....	41

Figura 12. Morfologia dos corpos embrióides originados dos experimentos em suspensão. A, B, C e D originados de fibroblastos adultos reprogramados, E e F originados de células reprogramadas do cordão umbilical. As barras representam 1:200µm.....	43
Figura 13. Imunocitoquímica dos corpos embrióides originados de fibroblastos adultos reprogramados. A: MAP-2; B: Tubulina; C: Troponina; D: Vimentina. Os asteriscos representam a marcação positiva dos respectivos anticorpos. As barras representam 1:50µm.....	44
Figura 14. Imunocitoquímica dos corpos embrióides originados de fibroblastos adultos reprogramados. E: Alfafetoproteína; F: Citoqueratina. Os asteriscos representam a marcação positiva dos respectivos anticorpos As barras representam 1:50µm.....	45
Figura 15. Imunocitoquímica dos corpos embrióides originados de células reprogramadas do cordão umbilical. A: MAP-2; B: Tubulina; C: Troponina; D: Vimentina. . Os asteriscos representam a marcação positiva dos respectivos anticorpos As barras representam 1:50µm.....	46
Figura 16. Imunocitoquímica dos corpos embrióides originados de células reprogramadas do cordão umbilical. E: Alfafetoproteína; F: Citoqueratina. G e H: Controle técnico. . Os asteriscos representam a marcação positiva dos respectivos anticorpos As barras representam 1:50µm.....	47
Figura 17. Gráficos de amplificação do plasmídeo STEMCCA puro e diluições seriadas para teste dos oligonucleotídeos. Os números indicam as reações para cada gene: 1. OCT-4; 2. SOX-2; 3. C-MYC; 4.KLF-4.....	49
Figura 18. Curva de Melting das reações de qPCR plasmídeo STEMCCA. Os números indicam os genes avaliados: A: OCT-4; B: SOX-2; C: c-MYC; D: KLF-4.....	49
Figura 19. Gráfico de amplificação das amostras de fibroblastos adultos, fibroblastos adultos reprogramados, células do cordão umbilical e células reprogramadas do cordão umbilical nas reações de qPCR sem a enzima transcriptase reversa (A) e com a enzima transcriptase reversa (B).....	50
Figura 20. Gráfico de amplificação da curva padrão e amostras para o gene OCT-4 (A). Curva de Melting da curva padrão e amostras para o gene OCT-4 (B).....	51
Figura 21. Gráfico de amplificação da curva padrão e amostras para o gene SOX-2 (A). Curva de Melting da curva padrão e amostras para o gene SOX-2 (B).....	52
Figura 22. Gráfico de amplificação da curva padrão e amostras para o gene c-MYC (A). Curva de Melting da curva padrão e amostras para o gene c-MYC (B).....	53
Figura 23. Gráfico de amplificação da curva padrão e amostras para o gene KLF-4 (A). Curva de Melting da curva padrão e amostras para o gene KLF-4 (B).....	54

Figura 24. Gráfico de amplificação da curva padrão e amostras para o gene GAPDH equino	
(A). Curva de Melting da curva padrão e amostras para o gene GAPDH equino	
(B).....	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Anticorpos utilizados e as respectivas marcações dos folhetos embrionários.....	28
Tabela 2. Contagem das colônias nos cultivos.....	37
Tabela 3. Porcentagem de marcação dos anticorpos entre 8 a 10 mil eventos analisados na citometria de fluxo.....	40
Tabela 4: Produção dos corpos embrióides por duas técnicas diferentes de ambos os tipos celulares reprogramados.....	42
Tabela 5: Imunohistoquímica dos corpos embrióides originados de fibroblastos adultos reprogramados e de células reprogramadas do cordão umbilical.....	43
Tabela 6. Sequência de oligonucleotídeos iniciadores.....	48
Tabela 7. Quantificação do RNA das amostras.....	50
Tabela 8. Desempenho das reações de PCR em tempo real para os genes.....	56
Tabela 9. Quantificação relativa dos genes nas amostras.....	56

LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

CO₂ – dióxido de carbono

C-MYC – v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog

CTE – célula-tronco embrionária (plural ou singular)

dNTP – desoxirribonucleotídeos trifosfatados

EF1 α – Elongation factor 1 α (Fator de alongamento 1 alfa)

EGFP – enhanced green fluorescent protein (proteína verde fluorescente melhorada)

FEM- Fibroblastos embrionários murinos

FT – fator de transcrição (plural ou singular)

iPS – célula-tronco de pluripotência induzida

IRES – Internal ribosome entry site (Sítio interno de ligação ao ribossomo)

KLF-4 – Krüppel-like factor 4

OCT-4 – octamer-binding transcription factor 4

OSKM – OCT-4 (ou POU5F1), SOX-2, KLF-4 e c-MYC

PCR – Polymerase chain reaction (reação em cadeia da polimerase)

qPCR – PCR quantitativo

RNA – ácido ribonucleico

RT – Reverse transcriptase (Transcriptase reversa)

SOX-2 – SRY (sex determining region Y-box 2 (região determinante do sexo no cromossomo Y, box 2)

SSEA – stage-specific embryonic antigen (antígeno embrionário estágio-específico)

TRA – tumor-related antigen

LISTA DE SÍMBOLOS E UNIDADES

cm – centímetro

g – grama

L – litro

mg – miligrama

mL – mililitro

nm – nanômetro

nM - nanomol

PB – PiggyBac

U – unidades

μL – microlitro

μm - micrômetro

μg - micrograma

oC – graus Celsius

% – porcentagem

α – alfa

β – beta

® – Marca Registrada

™ – Trademark

LISTA DE REAGENTES E MATERIAIS DE CONSUMO

Aminoácidos essenciais - BME Amino Acids Solution 50× – (Sigma 6766)

Aminoácidos não-essenciais – Eagle's minimum essential medium (MEM) - (Sigma M7145)-

Anfotericina B – (Gibco 15290)

Azul de Triplan – Tryplan Blue (Sigma T8154)

B-Mercaptoetanol – (Sigma 6250)

DAPI – 4',6-diamidino-2-phenylindole (4',6-diamidino-2-fenilindol)

DMEM baixa glicose – Dulbecco's modified eagle's médium (Gibco - 10567)

DMEM alta glicose - Dulbecco's modified eagle's médium (Gibco 11995-065)

DMEM/F12 Knockout (Gibco-12660-012)

DMSO – dimetilsulfóxido (Sigma 2650)

F12- Ham's F12 Nutrient Mixture (Gibco 11765-054)

FGF- Fibroblast Growth Factor Basic Human Recombinant, expressed in E.coli (Sigma - F0291).

Frascos de cultivo 25cm²: (Sarstedt, 83.1810): Produzida em Poliestireno, Área de crescimento: 25cm², 50 ml, estéril, Volume de trabalho: 5mL.

LB Ágar – (Sigma – L2897)

L-Glutamina – (Sigma - G3126)

LIF- Leukemia Inhibitory Factor, Human Recombinant, expressed in E. coli (Sigma- L5283)

KSR- knockout sérum replacement (Gibco 10828-028)

PBS – Phosphate buffered saline (Tampão fosfato salino) (Gibco 10010-023)

Penicilina/Estreptomicina (Gibco 15140)

Placa 6 poços: (Sarstedt, 83.1839): Produzida em Poliestireno, Dimensões Externas: 85,4x127,6 mm, Dimensões dos poços: 35x17,5 mm, Área de Crescimento: 9,6 cm², Volume de trabalho: 3 mL

Placa de Petri 100mm - Área de Crescimento: 60,8cm², Diâmetro: 87,8mm- Dimensões: 22,0mm x 95,6mm

Polibreno - (Sigma - TR1003)

SFB – soro bovino fetal (origem: América do Sul) (Gibco 12657-029)

Trypsin- Tryple Express – (Gibco 12604-021)

SUMÁRIO

Introdução.....	1
Revisão da Literatura.....	3
1.Células-tronco: definição e classificação.....	3
2.Células-tronco Embrionárias (CTE).....	3
3.Células-tronco de pluripotência induzida (iPS).....	5
4.Regulação molecular da pluripotência.....	8
5.Métodos de reprogramação.....	9
Objetivos e Hipóteses.....	14
Objetivo geral.....	14
Objetivos específicos.....	14
Hipóteses.....	14
Materiais e Métodos.....	13
1.Delineamento experimental.....	15
2.Colheita, cultivo e criopreservação das células.....	16
2.1.Fibroblastos adultos equinos.....	16
2.2.Células da Matriz do Cordão Umbilical Equino.....	18
2.3.Cultivo Primário de Fibroblastos Embrionários Murinos (FEM).....	19
3.Transfecção, expansão e reprogramação.....	20
3.1.Vetores lentivirais.....	20
3.2.Transformação, clonagem bacteriana e purificação plasmidial.....	21
3.3.Produção das partículas lentivirais.....	22
3.4.Transdução celular com lentivírus.....	22
3.5.Repique celular.....	23
3.6.Avaliação da eficiência de reprogramação.....	24
3.7.Replicação dos transposons.....	24
4.Caracterização celular.....	26

4.1.Imunomarcção das colônias e citometria de fluxo.....	26
4.2.Atividade da fosfatase alcalina.....	27
4.3.Diferenciação celular espontânea e imunocitoquímica.....	28
4.4.Diferenciação celular induzida- formação de corpos embrióides em suspensão e imunocitoquímica.....	29
4.5.Diferenciação celular induzida-formação de corpos embrióides em gotas suspensas (hanging drop) e imunocitoquímica.....	29
4.6.PCR em tempo real.....	30
4.6.1.Extração de RNA.....	30
4.6.2.Tratamento com DNase.....	31
4.6.3.Quantificação do RNA.....	31
4.6.4.Síntese de cDNA.....	31
4.6.5.PCR quantitativa (qPCR).....	31
4.6.6.Desenho dos oligonucleotídeos iniciadores.....	32
4.6.7.Teste dos primers.....	33
Resultados.....	32
1.Cultivos celulares.....	32
1.1.Fibroblastos adultos equinos.....	32
1.2.Células da matriz do cordão equino.....	32
1.3.Fibroblastos embrionários murinos (FEM).....	34
2.Transfecção, expansão e reprogramação.....	35
3. Caracterização celular.....	37
3.1.Imunofluorescência.....	37
3.2.Citometria de fluxo.....	39
3.3. Atividade da fosfatase alcalina.....	40
3.4. Diferenciação celular espontânea e imunocitoquímica.....	42
3.5. Diferenciação celular induzida - formação de corpos embrióides em suspensão e em gotas suspensas e imunocitoquímica.....	42

4. PCR em tempo real.....	48
4.1. Sequências de oligonucleotídeos iniciadores.....	48
4.2. Teste dos primers.....	48
4.3. Teste da enzima DNase.....	50
4.4. Quantificação relativa das amostras.....	51
Discussão.....	57
Conclusão.....	65
Referências Bibliográficas.....	66

INTRODUÇÃO

Em 2006, Shinya Yamanaka desenvolveu uma técnica revolucionária para a produção de células pluripotentes, através da reprogramação genética de células adultas de camundongos e, em 2007, de células humanas. As células foram reprogramadas pela adição de quatro genes - OCT-4, SOX-2, KLF-4 e C-MYC – por meio do uso de vetores virais (vírus modificados que integram os fatores para dentro da célula a ser reprogramada) (TAKAHASHI & YAMANAKA, 2006).

Após o sucesso na criação de células pluripotentes induzidas humanas experimentos mediados por transdução viral em fibroblastos de pele em cães (KWON et al., 2012), ovinos (BAO et al., 2011), caprinos (REN et al., 2011), suínos (ROBERTS et al., 2009), bovinos (CAO et al., 2012) e equinos (NAGY et al., 2012).

A maior parte das pesquisas utiliza a interferência genética viral na geração de iPS. Esta reprogramação pode ser conseguida usando uma série de técnicas com eficiências diferentes (SOMMER et al, 2009), porém trata-se de um método pouco seguro em que o DNA do vírus pode replicar-se ao mesmo tempo que reprograma as células causando danos silenciosos e letais.

Sendo assim, Kim et al (2012) iniciaram pesquisas utilizando microRNA, Patel et al (2010) e Belay et al (2011) começaram a explorar a reprogramação celular mediada por transposons (segmentos de DNA que têm a capacidade de mover-se e replicar-se dentro do genoma).

A tecnologia do transposon pode simplificar bastante a maneira com que a reprogramação é conduzida, além de ser um método mais seguro, pois a eliminação da partícula viral, reduz os custos e o tempo na prática laboratorial. Apesar das técnicas para geração de iPS constituírem possíveis aliadas à terapia celular autóloga, é importante ressaltar que a aplicação prática dessas células modificadas ainda precisa ser estudada e avaliada antes de qualquer tipo de transplante ou uso indiscriminado (LIU, 2008).

Os estudos relacionados à biologia básica das iPS são recentes, limitados e há pouca informação sobre essas células em animais de grande porte. Entretanto, os campos de pesquisa em medicina regenerativa e clonagem reprodutiva estão se expandindo rapidamente em animais. Esta área é de especial interesse para muitos investigadores em equinos, pois há a possibilidade de isolar e/ou gerar de células pluripotentes desses animais para biotecnologia da reprodução. Neste contexto, torna-se interessante utilizar o cavalo como um organismo

modelo para o estudo da geração de células pluripotentes induzidas utilizando-se de uma técnica alternativa e segura.

A reprogramação pode ser realizada em diferentes tipos celulares, majoritariamente são usadas células de pele, e poucos experimentos com outros tipos celulares. Em contraste, os fibroblastos humanos são passíveis de manipulações em cultura, mas apresentam baixa eficiência ($< 0,01\%$) e sua fase de reprogramação é lenta (~ 1 mês) (TAKAHASHI & YAMANAKA, 2006, TAKAHASHI et al., 2007). Dessa forma, Panopoulos et al. (2011) procuraram encontrar um tipo de célula que poderia ser facilmente isolado e expandido, e ainda poderia ser rapidamente e eficientemente reprogramada. Estes autores estudaram a reprogramação rápida de células endoteliais da veia umbilical humana (HUVECs), com uma eficiência de aproximadamente 2,5-3% (300 vezes maior que a eficiência de reprogramação dos fibroblastos). As HUVECs podem ser obtidas facilmente em grandes quantidades sem etapas de purificação (BAUDIN et al., 2007), fazendo destas uma fonte de células somáticas indicada para avanços dos conhecimentos dos mecanismos que regem a reprogramação.

Células-tronco mesenquimais derivadas das membranas placentárias, líquido amniótico, cordão umbilical ou tecidos fetais possuem grande potencial de expansão e de diferenciação (SAITO et al, 2005; GUCCIARDO et al, 2008). Pesquisas de diversos grupos mostraram que células-tronco derivadas dos anexos fetais, como as do cordão umbilical equino são abundantes, e por apresentarem multipotencialidade, poderiam ser mais facilmente reprogramáveis. Tais células exibem algumas características de células-tronco embrionárias como a expressão de alguns marcadores de pluripotência como Oct-4, grande capacidade proliferativa, sem demonstrar imunogenicidade e tumorigenicidade. Desta forma, o potencial de diferenciação das células do cordão umbilical seria intermediário, ou seja, seu grau de diferenciação estaria entre o das pluripotentes embrionárias e o das multipotentes adultas (CREMONESI et al., 2011). Estas características abriram uma nova perspectiva no estudo da biotecnologia da reprodução, clonagem ou terapia celular das mais variadas espécies.

Estudos sobre a manutenção e diferenciação de células pluripotentes são longos, complexos e caros, além de não garantirem uma elevada porcentagem do tipo celular ou estado de maturação desejados, sendo necessária a utilização de várias técnicas de otimização para cada tecido e organismo a fim de maximizar o rendimento e qualidade das linhagens (LEWITZKY e YAMANAKA, 2007). A obtenção de uma linhagem mais semelhante possível com as células-tronco embrionárias é imprescindível para modelagem de algumas

doenças genéticas e o desenvolvimento de fármacos (GONZÁLEZ et al, 2011; VIERBUCHEN e WERNIG, 2012).

Diante da baixa eficiência de reprogramação dos fibroblastos utilizando-se vetores virais, torna-se necessário estudar melhores mecanismos para reprogramação de outros tipos celulares. Assim sendo, as células do cordão umbilical aliada à metodologia de reprogramação mediada por transposons podem resultar na geração de linhagens de iPS equinas em tempo reduzido e mais confiáveis para aplicação terapêutica no futuro próximo.

Revisão da literatura

1. Células-tronco: definição e classificação

Células-tronco são, por definição, células com capacidade de autorenovação e de diferenciação (WATT e HOGAN, 2000). As células-tronco humanas já foram isoladas de diferentes fontes, desde embriões até variados tecidos adultos, e seu maior interesse reside na possibilidade de utilização na medicina regenerativa, substituindo tecidos adultos. Essas células podem ser classificadas, de acordo com sua origem, em células-tronco embrionárias (CTE), quando derivadas da massa interna do blastocisto, ou células-tronco adultas, quando derivadas de tecidos somáticos (WANG et al, 2010).

As células-tronco também podem ser classificadas de acordo com seu potencial de diferenciação. Desse modo, células-tronco totipotentes possuem a capacidade de diferenciar-se em todos os tecidos que formam o organismo, em mamíferos, os representantes são o zigoto e os blastômeros até o estágio de 8-16 células. Progressivamente, as células-tronco pluripotentes são células que possuem a capacidade de gerar todos os diferentes tipos celulares adultos, mas perderam a capacidade de gerar alguns tecidos extra-embrionários. As células-tronco embrionárias, obtidas da massa celular interna do embrião, são exemplos de células pluripotentes. Por sua vez, as células-tronco multipotentes podem se diferenciar em apenas alguns tipos celulares de uma determinada linhagem, por exemplo, as células-tronco hematopoéticas e as células-tronco mesenquimais. Por fim, as células-tronco unipotentes constituem as células-tronco que podem se diferenciar em um único tipo celular, como a espermatogônia que só se diferencia em espermatozoides (JAENISCH e YOUNG, 2008).

2. Células-tronco embrionárias (CTE)

As células-tronco embrionárias (CTE) tem origem de embriões mamíferos em estágio de blastocisto. Retiradas da massa celular interna, tais células, ainda não diferenciadas, podem dar origem a todos os tecidos do indivíduo adulto, e assim, podem ser mantidas em cultura, estabelecendo uma linhagem de células pluripotentes (ZAGO & COVAS, 2006).

As células embrionárias apresentam características específicas que as caracterizam como células-tronco pluripotentes, tais como proliferação prolongada, capacidade de autorrenovação, capacidade de diferenciação clonal nas três linhagens germinativas (ectoderme, mesoderme e endoderme) e a presença de marcadores específicos associados ao estado altamente indiferenciado, como, por exemplo, Oct-4 e Nanog (IVANOVA et al., 2003).

As CTE foram primeiramente estabelecidas em 1981, a partir de embriões de camundongo e demonstraram capacidade de se diferenciar em uma grande variedade de tipos celulares (MARTIN, 1981). Em 1998, culturas de CTE humanas foram estabelecidas pela primeira vez. O interesse nas CTE está na possível aplicação no tratamento de diversas doenças crônico-degenerativas, como a Doença de Parkinson, lesões da coluna espinhal e diabetes (THOMSON et al., 1998).

As células-tronco adultas, isoladas da medula óssea e do sangue de cordão umbilical, por exemplo, possuem uma capacidade limitada de diferenciação e não podem se diferenciar em muitos tipos celulares. Ao contrário, as CTE possuem a capacidade de originar todos os tipos de células somáticas e germinativas, com potencial para serem utilizadas em terapias de transplantes, e também no descobrimento de novas drogas (THOMSON et al., 1998). Além disso, derivar uma linhagem de CTE implica em congelar um estágio muito precoce e transiente do desenvolvimento embrionário *in vitro*. Isso permite estudar e investigar os princípios e mecanismos que controlam a pluripotência e a diferenciação dos diferentes tipos celulares (WANG et al, 2010). Entretanto, existem algumas dificuldades éticas e técnicas relacionadas ao uso de CTE humanas. A utilização de CTE retiradas de blastocistos humanos implica na destruição desses embriões, gerando discussões de fundo religioso e ético. Dentre as dificuldades técnicas, há a problemática da possibilidade de formação de tumores e de rejeição ao transplante alogênico (HENTZE et al., 2009).

Nesse contexto, a reprogramação de células somáticas para um estágio progenitor pluripotente mostra-se uma alternativa para o uso de CTE. Essa reprogramação pode ser obtida por meio da transferência do núcleo de uma célula somática para um oócito que teve

seu núcleo previamente retirado (WILMUT et al.,1997), ou ainda quando células somáticas são fusionadas com CTE (COWAN et al., 2005). Isto indica que oócitos não fertilizados e CTE possuem fatores que podem conferir pluripotencialidade. Entretanto, essas técnicas esbarram em dificuldades técnicas e na dependência de doações voluntárias de um grande número de oócitos (BOYER et al, 2006).

Deste modo, alguns estudos se concentraram na identificação de fatores de transcrição (FT) responsáveis por conferir a pluripotencialidade e em induzir a expressão desses fatores em células somáticas com o objetivo de gerar células-tronco de pluripotência induzida (iPS) (TAKAHASHI e YAMANAKA,2006; MAHERALI et al., 2007; WERNIG et al., 2007). Essas células mostram-se uma importante alternativa para o uso de CTE, sem esbarrar nas questões éticas.

3.Células-tronco de pluripotência induzida (iPS)

As células-tronco de pluripotência induzida (iPS) são células obtidas a partir da expressão forçada de fatores de transcrição relacionados à pluripotência, permitindo que uma célula já diferenciada tenha seu estado diferenciado revertido a um estado semelhante ao de célula tronco embrionária (TAKAHASHI e YAMANAKA, 2006).

A reprogramação *in vitro* de células somáticas, para a geração de iPS possibilita a transposição de barreiras que restringem o uso das CTE humanas, visto que ela consiste na geração de células pluripotentes sem a necessidade do uso de um embrião ou de transferências nucleares de células somáticas, contornando questões éticas e evitando uma possível reação imunológica do organismo, no caso da utilização terapêutica (BELLIN et al., 2012).

A descoberta da tecnologia de produção das células iPS foi fundamentada na hipótese de que a reprogramação nuclear é um processo conduzido por fatores solúveis que estão presentes no oócito e que desempenham papéis críticos na manutenção do estado pluripotente das CTE (YAMANAKA, 2008).

Inicialmente, a geração de iPS foi possível pela combinação de quatro genes relacionados a pluripotência, OCT-4 (ou POU5F1), SOX-2, KLF-4 e c-MYC (OSKM), e este se tornou o método mais comum aplicado na reprogramação *in vitro* de células somáticas (TAKAHASHI & YAMANAKA, 2006; OKITA et al., 2007; WERNIG et al., 2007; LOWRY et al., 2008).

Embora essa combinação original de FT seja a mais utilizada, células iPS podem ser obtidas substituindo KLF4 e C-MYC por NANOG e LIN28 (YU et al., 2007) e utilizando-se diferentes combinações dos FT tradicionais (KIM et al., 2008; HUANGFU et al., 2008; NAKAGAWA et al., 2008; SHI et al., 2008; WERNIG et al., 2008).

A reprogramação celular já foi realizada com células provenientes de diferentes espécies e fontes, e também já foram estabelecidos diferentes protocolos que utilizam diferentes formas de indução, tais como vírus não-integrativos a proteínas, vetores episomais a microRNAs (GONZÁLEZ, 2011).

A introdução desses genes de pluripotência exógenos em células somáticas induz a expressão de genes endógenos pertencentes à rede autorregulatória transcricional de pluripotência (JAENISCH & YOUNG, 2008). Essa regulação positiva dos fatores endógenos direciona ao silenciamento dos genes exógenos através da metilação dos promotores. O silenciamento total dos FT exógenos estabelece o limite entre células iPS parcialmente reprogramadas e as totalmente reprogramadas, sendo que nas iPS totalmente reprogramadas os FT exógenos estão silenciados e a manutenção do estado pluripotente torna-se completamente dependente do circuito transcricional endógeno (HOTTA & ELLIS, 2008).

Com relação as suas características, Takahashi e Yamanaka (2006) demonstraram que estas células adquirem propriedades similares as CTE com relação à morfologia, proliferação, expressão de alguns dos genes marcadores de CTE e formação de tumores contendo uma variedade de tecidos originários dos três folhetos embrionários após o transplante subcutâneo destas células em camundongos NOD/SCID. Esse resultado foi confirmado e expandido em uma série de trabalhos, utilizando diversos tipos celulares animais e humanos, que estabeleceram que as células iPS são molecular e funcionalmente similares as CTE (MAHERALI et al., 2007; WERNIG et al., 2007; OKITA et al., 2008; AOI et al., 2008; LOWRY et al., 2008; ZHAO et al., 2009; PICANÇO-CASTRO et al., 2011), compartilhando similaridades como o potencial de crescimento celular, a atividade da telomerase, os padrões de metilação do DNA e de modificações de histonas e a expressão de marcadores de superfície, incluindo Ssea-1, Ssea-3, Ssea-4, Tra ('tumor-related antigen')-1-60, Tra- 1-81 (LEWITZKY, 2007; WANG et al., 2010; SCHEPER & COPRAY, 2009), assim como o padrão de expressão gênica. Quanto a esta última, as células iPS expressam um grande número de marcadores de pluripotência, mas em um nível de expressão mais baixo comparado as CTE (WANG et al, 2010).

O potencial das células iPS de originar uma progênie diferenciada capaz de restaurar funções fisiológicas *in vivo* foi explorado em modelos murinos de anemia falciforme (HANNA et al., 2007), doença de Parkinson (WERNIG et al., 2008) e Hemofilia A (XU et al., 2009). Em humanos, a reprogramação tem sido realizada a partir de células de pacientes com várias doenças neurodegenerativas como esclerose lateral amiotrófica (ELA) (DIMOS et al., 2008), atrofia muscular espinhal (AME) (EBERT et al., 2009), e doença de Parkinson (SOLDNER et al., 2009), além de várias doenças genéticas de herança complexa ou Mendeliana (PARK et al., 2008). Recentemente, as iPS estão sendo empregadas como plataforma experimental para modelo de doenças *in vitro*. Vários grupos demonstraram que tipos celulares relacionados com uma doença são diferenciados a partir de células iPS e são capazes de reproduzir fielmente os fenótipos das doenças (EBERT et al., 2009; KU et al., 2010; ITZHAKI et al., 2011; LIU et al., 2011; ZHANG et al., 2011). A descoberta das iPS abriu uma nova possibilidade para o desenvolvimento de modelos de doença *in vitro* em humanos para a investigação da fisiopatologia e no auxílio ao desenvolvimento de drogas (MARCHETTO et al., 2010; RASHID et al., 2010; JANG et al., 2011; NGUYEN et al., 2011; YAZAWA et al., 2011), e esse, em curto prazo, é um dos aspectos mais importantes dessa tecnologia.

Os primeiros estudos clínicos em humanos iniciaram-se em 2014 em que o grupo liderado pela pesquisadora Masayo Takahashi iniciou os estudos com interesse em transplantar células autólogas reprogramadas e diferenciadas em pacientes com Degeneração Macular associada à idade. Foram removidas algumas células da pele de um paciente, estas foram reprogramadas para um estágio de pluripotência e então induzidas a produzir células do pigmento da retina. O transplante dessas células foi realizado sem complicações. Inúmeros testes de controle foram realizados em macacos e camundongos, não observando rejeição ou formação de tumores. Existem outros estudos que estão em andamento cujos resultados vão esclarecer ainda mais o assunto (SUGITA et al, 2016).

Com um crescimento acelerado, a área da pluripotência induzida reconheceu a necessidade de protocolos eficientes e reprodutíveis, que permitissem a geração de células iPS clinicamente seguras. Eficiência, reprodutibilidade e segurança são determinados principalmente pelos métodos utilizados para introduzir os fatores de transcrição nas células somáticas de interesse e pela extensão das modificações genômicas necessárias para a geração destas células (WANG et al, 2010).

4.Regulação molecular da pluripotência

O balanço entre manutenção da pluripotência e indução da diferenciação celular é mantido por um conjunto de fatores genéticos e epigenéticos. No cerne desse controle molecular, encontra-se a tríade de fatores de transcrição (FT) OCT-4, SOX-2 e NANOG, que detém um complexo mecanismo de auto-regulação, dependente de seus níveis de expressão. Oct-4, Sox-2 e Nanog podem se ligar aos seus próprios promotores, co-ocupar sítios genômicos de centenas de genes comuns (JAENISCH e YOUNG, 2008) e também podem se ligar aos promotores dos outros dois genes, KLF-4 e c-MYC facilitando assim, a manutenção do estado de pluripotência. Ainda, esses três fatores podem controlar outros FT que atuam na pluripotencialidade ou induzem a diferenciação (BOYER et al., 2006).

A interconexão dos fatores OCT-4, SOX-2 e NANOG justifica como a reprogramação celular pode se iniciar apenas com a superexpressão de Oct-4 e Sox-2 nos fibroblastos. Esses dois fatores exógenos podem ativar os lócus endógenos da tríade, promovendo assim a indução e manutenção da pluripotência (JAENISCH e YOUNG, 2008).

Fatores epigenéticos e transcricionais também são responsáveis pela manutenção da pluripotência. A cromatina das CTE se apresenta na forma de eucromatina, isto é, transcricionalmente acessíveis, com numerosas histonas acetiladas. Ao contrário, durante a diferenciação, há uma redução na acetilação e um concomitante aumento de formação de heterocromatina (BOYER et al., 2006).

Na tentativa de esclarecer as alterações moleculares que ocorrem durante a geração de iPS, foi proposto um modelo em que as alterações ocorrem em duas principais “ondas”. Durante a primeira onda, as células somáticas sofrem alterações transcricionais e mudanças na cromatina, que afetam genes envolvidos no ciclo celular, na replicação do DNA e no processo denominado transição mesenquimal-epitelial, que também ocorre durante o desenvolvimento normal. Em paralelo, as células apresentam redução da expressão de genes que culminam com a supressão da identidade de células diferenciadas (GUEST e ALLEN, 2007).

Na fase intermediária onde ocorre o aumento da expressão de genes envolvidos nos estágios iniciais da transição para a pluripotência, as células refratárias à reprogramação e células competentes à reprogramação co-existem. Durante a segunda onda, as células ativam

hierarquicamente genes envolvidos no estabelecimento e manutenção da pluripotência e sofrem alterações nos padrões de metilação do DNA, que ajudam a consolidar o estágio reprogramado (BUGANIM et al., 2012; HANSSON et al., 2012; POLO et al., 2012; SANCHO-MARTINEZ I, 2013).

Estudos nesse sentido ajudam a compreender o processo de reprogramação e contribuem para o desenvolvimento de estratégias mais eficientes, rápidas e seguras de geração de iPS.

Apesar de já serem conhecidas novas combinações de fatores que são capazes de reverter o estado de diferenciação celular estabelecido em diferentes tipos celulares, os quatro fatores de Yamanaka, OSKM continuam sendo os mais utilizados, principalmente pela sua robustez e capacidade de reprogramar a maioria dos tipos celulares. Os fatores OSKM têm um efeito sinérgico, funcionando em conjunto para ultrapassar os resilientes sistemas celulares intrínsecos de proteção de identidade (JAENISCH e YOUNG, 2008).

Assim, neste sistema, a expressão de OCT-4 E SOX-2 promovem majoritariamente um efeito desestabilizador da ordem transcricional estabelecida, recrutando NANOG, formando um núcleo autoregulatório de pluripotência. Este “núcleo”, uma vez estabelecido, ativa vias de sinalização como a via da MAPK1 (responsável pela integração de vários sinais bioquímicos como proliferação, diferenciação, regulação e desenvolvimento de transcrição) e WNT3 (consiste de genes estruturalmente relacionados que codificam para proteínas secretadas de sinalização e atuam em diversos processos do desenvolvimento, regulação do destino celular e padronização durante a embriogênese). Por outro lado, os fatores KLF4 E C-MYC, como reguladores da divisão celular, têm uma atividade mitogênica, forçando alterações constantes no estado epigenético da célula, o que aumenta fortemente a cinética e eficiência do processo (LIU, 2008).

5.Métodos de reprogramação

Trabalhos mostram reprogramação favorável e eficiente (RAIS et al. 2013) utilizando os métodos integrativos, nos quais vetores principalmente virais semelhantes aos usados por Yamanaka ainda são os mais comuns (EGLI et al., 2008;YAMANAKA, 2012; EL-KARIM et al 2013;. TAKAHASHI E YAMANAKA,2013; TURKSEN, 2013). Porém, os métodos

integrativos induzem mutações insercionais, não sendo nem seguros nem desejáveis para aplicações clínicas. Além disso, embora os vetores retrovirais e lentivirais fiquem reprimidos em células imaturas como nas iPS, quando diferenciadas estas células podem reativar essas inserções, agindo como um contador de estímulo para o processo de diferenciação, diminuindo o rendimento final do processo, evitando uma manutenção estável do fenótipo diferenciado e produzindo uma população heterogênea em vários estados de diferenciação (LIU, 2008).

Já no mecanismo de reprogramação não-integrativa como adenoviral e transfecção plasmidial são gerados clones de iPS com algum nível de marcação epigenética remanescente do tipo celular a partir do qual foram desenvolvidas e por isso alguns autores a avaliam como ineficientes (LI et al, 2013).

Desde a publicação do primeiro método de reprogramação por entrega retroviral, vários métodos e abordagens para induzir a pluripotência em células somáticas foram desenvolvidos. Paralelamente a estas novas técnicas um conjunto padrão de testes tem sido definido, a fim de resolver adequadamente a contribuição e melhoria que cada método traz (LI et al, 2013).

Uma estratégia de reprogramação que encaixa todos os propósitos e fins de aplicação ainda não foi concebida. Porém há uma variedade de estratégias que podem ser usadas, dependendo da aplicação final para obter uma linhagem de iPS útil. Há duas principais aplicações de pesquisa quando se considera células iPS: a primeira está relacionada à pesquisa básica, com foco em decifrar os mecanismos de reprogramação, diferenciação e identidade da célula e, uma segunda está direcionada às aplicações clínicas e terapias baseadas em iPS. (BELAY et al, 2011).

Quando as células não são necessárias para uso clínico, um método rápido, eficiente e reprodutível é desejável, e dessa forma, a presença de DNA integrado é tolerável. No estudo de mecanismos de doença e o desenvolvimento de modelos para teste farmacológicos, a utilização de lentivírus integrativos induzíveis fornecem resultados eficientes e robustos. Por outro lado, quando são consideradas aplicações clínicas, a prevenção de modificações genômicas é estritamente necessária por razões de segurança, e então os métodos não-integrativos representam a única opção razoável (TURKSEN, 2013).

Neste contexto, com a necessidade de um método de alta eficiência que preserve a sequência genômica original, os sistemas transponíveis podem ser bons candidatos como vetores de entrega, devido às suas características incorporadas de vetor integrativo, com uma expressão estável e a eficiência relativamente alta de reprogramação, juntamente com a possibilidade de ser excisado do genoma. O desenvolvimento de protocolos de entrega de fatores e de reprogramação tem permitido uma transposição segura com geração de células de melhor qualidade para a pesquisa, garantindo a qualidade e confiança nos resultados. Dentre os vários transposons utilizados em células de mamíferos, a maioria pertence à família TC1, como Sleeping Beauty e hAT-like Tol2, e à superfamília PiggyBac (KIM E PYYKKO et al, 2011).

O transposon PiggyBac (PB) foi isolado pela primeira vez a partir de lagarta da couve, *Trichoplusia ni*, em 1989. No entanto, só recentemente surgiu como uma ferramenta confiável em biologia molecular para a entrega de carga genética e mutagênese de inserção. Rapidamente essa ferramenta tornou-se a opção de escolha devido à sua capacidade de reprogramação, ausência de repressão de transposase e, acima de tudo, sua perfeita mobilização de “cortar-colar” restituindo a sequência original em mais de 98% após remobilização (LI, 2013).

As primeiras iPS reprogramadas com um transposon PiggyBac foram obtidos por Woltjen et al em 2009, que utilizou como fonte fibroblastos fetais de humanos e de camundongos. A derivação de iPS livre de inserção permite o estabelecimento de melhores modelos celulares de iPS e adiciona um novo nível de segurança para o uso dessas células em aplicações biomédicas. No entanto, por ser baseada em várias tentativas de baixa eficiência que consistem em transfecções consecutivas, com diluição de plasmídeo resultaram num baixo rendimento global. Além disso, a possibilidade constante de integração aleatória força a uma caracterização molecular de cada clone produzido, o que é trabalhoso e dispendioso (KIM e PYYKKO, 2011).

O transposon PiggyBac foi recentemente demonstrado como funcional em várias linhagens de células humanas e de camundongo. O sistema de PB transposon/transposase requer apenas as repetições terminais invertidas flanqueando um transgene e a expressão transiente da enzima transposase para catalisar eventos de inserção ou excisão (KIM E PYYKKO et al, 2011). Woltjen et al (2009) demonstraram reprogramação eficiente e bem sucedida de fibroblastos embrionários murino e humano utilizando o sistema PB. Células iPS

estáveis foram geradas e expressaram marcadores de pluripotência característicos, assim como ensaios de diferenciação, mostraram também que as inserções PB individuais podem ser removidas das linhagens de células iPS estabelecidas, e que é possível a reprogramação independente de vírus.

Ao aliar a eficiência e reprodutibilidade dos métodos de reprogramação integrativos com a possibilidade de posterior excisão, os transposons, nomeadamente o PiggyBac, devido à sua ínfima taxa de mutação após excisão, surge como vetor promissor para a administração de fatores de reprogramação celular (KIM E PYYKKO et al, 2011).

Assim, torna-se essencial o estudo de métodos mais eficientes na geração de células iPS, associado a protocolos de caracterização molecular e funcional com o intuito de validar a pluripotência das células geradas, garantindo a segurança do método e a possível aplicação terapêutica.

JUSTIFICATIVA

Avaliar qual o tipo celular (fibroblastos adultos ou células da matriz do cordão umbilical) apresenta reprogramação mais efetiva e qual o método de reprogramação (mediada por transdução lentiviral ou mediada por transfecção de transposons) é mais eficiente.

OBJETIVO GERAL

Obter e caracterizar células equinas pluripotentes por meio da tecnologia de reprogramação induzida mediante a utilização de fatores de transcrição dispostos em vetores virais ou em transposon PiggyBac.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estabelecer uma linhagem celular pluripotente geneticamente induzida de células-tronco equinas (eiPS) originadas de fibroblastos adultos e de células da matriz do cordão umbilical equino.
- Comparar a eficiência de reprogramação celular *in vitro* de fibroblastos adultos e de células da matriz do cordão umbilical equino.
- Comparar a eficiência da transdução lentiviral e da transfecção mediada por transposons em fibroblastos adultos e em células da matriz do cordão umbilical.

HIPÓTESES

Devido à multipotência e menor idade das células da matriz do cordão umbilical, espera-se que sejam mais facilmente reprogramadas do que fibroblastos adultos, que são unipotentes e com idade avançada.

O método de infecção celular mediado por transposons é mais seguro e rápido, por isso espera-se que seja mais eficiente para reprogramar os tipos celulares estudados do que o método de transdução lentiviral.

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Delineamento experimental

Neste estudo, fibroblastos adultos equinos e células da matriz do cordão umbilical equino cultivados *in vitro* foram submetidos à reprogramação celular induzida por meio de inserção lentiviral, e por meio de inserção de transposons segundo esquema baseado na Figura 1 e descrito a seguir.

Após aproximadamente 20 dias de indução *in vitro*, as colônias formadas foram individualmente repicadas e cultivadas.

Estas células foram cultivadas *in vitro* e caracterizadas quanto à morfologia, expressão de fosfatase alcalina, imunofluorescência, citometria de fluxo, formação e morfologia de corpos embrióides e expressão gênica.

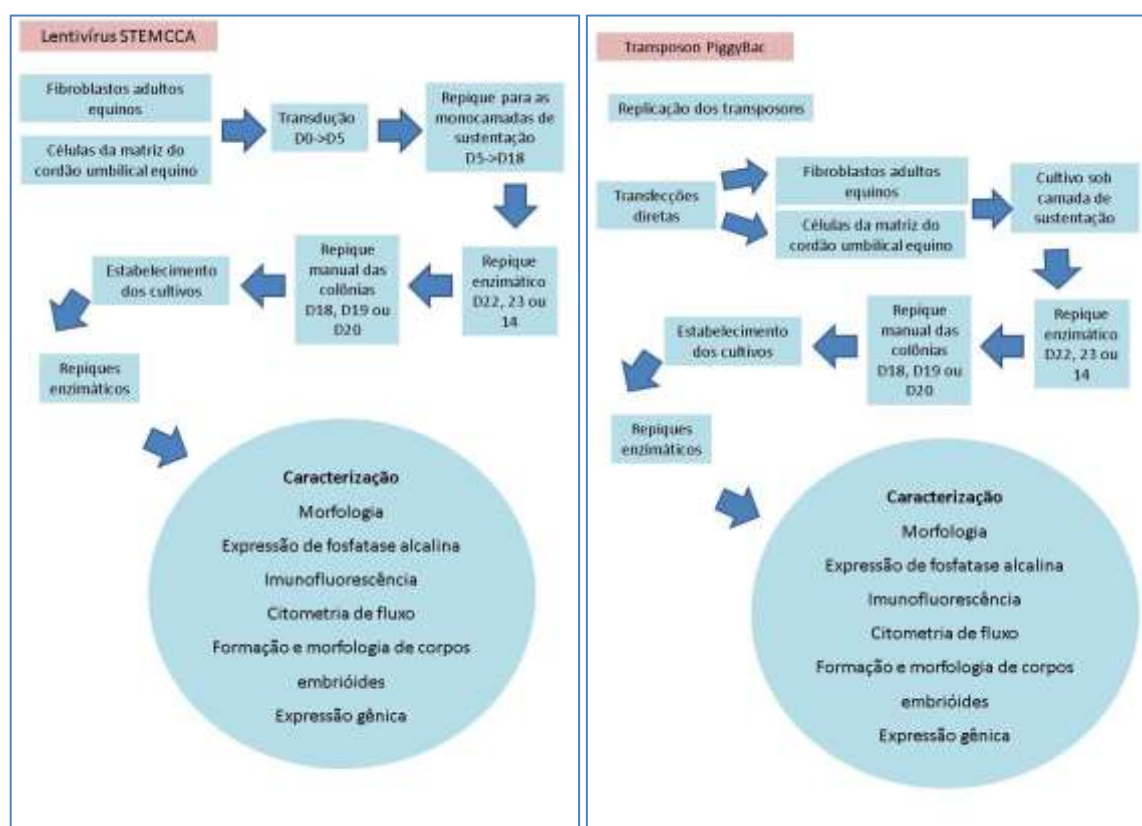


Figura 1. Delineamento experimental.

Os experimentos para obtenção das células iPS descritas neste estudo foram realizados com a colaboração da Prof. Dr. Fabiana Fernandes Bressan e do Prof. Dr. Flávio Vieira Meirelles com experiência no desenvolvimento de iPS equinas (Laboratório de Morfofisiologia Molecular e Desenvolvimento – LMMD - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos –USP- Pirassununga – Brasil).

Os experimentos de eletroporações das células foram realizados pela mestrandia Mariana de Lara Campos Arcuri e Prof. Dr. Ivan de Godoy Maia com experiência em transfecção plasmidial (Laboratório de Genética Molecular de Plantas do Instituto de Biociências de Botucatu – UNESP)

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ-UNESP), sob o protocolo 27/2013-CEUA.

2. Colheita, cultivo e criopreservação das células.

2.1 Fibroblastos adultos

Fragmentos de aproximadamente 1 cm³ de tecido epidermal de 5 éguas adultas da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia-UNESP-Botucatu-SP foram coletadas para obtenção dos fibroblastos. Estes fragmentos foram retirados por meio de biópsia de pele realizada na região do flanco. Os animais receberam anestesia local infiltrativa com 10 mL de lidocaína. Os fragmentos foram lavados em solução fisiológica por duas vezes, e colocadas em frasco de transporte com PBS em temperatura ambiente. A amostra coletada foi processada em placas de Petri (60 mm de diâmetro) com PBS. O tecido foi fragmentado (média de 1 mm³ cada pedaço) com o auxílio de duas lâminas 11 de bisturi tipo Bard-Paker. Os fragmentos foram lavados duas vezes com solução tampão fosfato sem cálcio e magnésio (PBS), com pH 7,4.

Os fragmentos foram semeados em quatro frascos de cultivo de 25cm² previamente banhados com SFB e incubados durante meia hora em estufa a 37°C em atmosfera úmida contendo 95% de ar e 5% CO₂, para favorecer sua aderência à superfície. Após esse tempo, foi adicionado meio cultivo composto por DMEM alta glicose contendo 10% SFB, 100UI/mL penicilina/100µg/mL estreptomicina, 3 µg/mL anfotericina B. Em cada frasco foi colocado cerca de 5 mL de meio, o suficiente para cobrir os fragmentos.

O acompanhamento do crescimento celular foi realizado a cada 24 horas em microscópio invertido. Após 5 dias foi realizada a primeira troca de meio de cultivo dos frascos. Uma vez que se iniciou o crescimento celular ao redor dos explantes, o meio de cultivo foi renovado a cada três dias.

Quando 70% do frasco de cultura se encontrava coberto por células (subconfluência), foi realizada a passagem, em que foram removidos os meios das garrafas, estas foram lavadas com solução de PBS, e adicionados de 1 mL de tripsina a 37°C. As garrafas foram mantidas em estufa a 37,5° C por no máximo 10 minutos até que todas as células se soltassem do fundo. Realizou-se então a neutralização com 1 mL de SFB, essa mistura foi centrifugada a 1500 rpm por 5 minutos para lavagem e formação do pellet. O pellet foi ressuscitado em 1 mL de meio de cultivo composto por DMEM alta glicose contendo 10% SFB, 100UI/mL penicilina/100µg/mL estreptomicina, 3µg/mL anfotericina B e as células foram plaqueadas em placas de 6 poços, numa concentração de 1000 células/poço.

Quando as células estavam com 70% de confluência, foram criopreservadas em uma solução contendo 10% de DMSO e 90% de SFB, e armazenadas em botijões de nitrogênio líquido. Após o descongelamento à 25°C, foi realizado teste de viabilidade celular, em que foi estimado o número de células viáveis com o uso do corante azul de Trypan.

Resumidamente, 50µL da suspensão celular foi adicionada a 50 µL do azul de Trypan (0,3%) e posteriormente 10µL dessa mistura foram colocados em cada hemi-câmera da câmara de

Neubauer para a realização da contagem. A concentração de 10^4 células foi semeada em garrafas de cultivo celular. Ao iniciar a expansão celular, o meio de cultivo foi renovado a cada 3 dias. Quando atingiram novamente 70% de confluência, foi realizada passagem e estavam preparadas para as metodologias de transdução e transfecção.

2.2 Células da Matriz do Cordão Umbilical Equino

O cordão umbilical equino foi colhido de 5 animais neonatos, durante partos que ocorreram no Centro de Biotecnologia em Reprodução Equina (CERBEC – Posto de Monta) na cidade Botucatu-SP, e em Haras da região de Botucatu.

As amostras de cordão umbilical foram lavadas com PBS, acondicionadas em tubos do tipo Falcon de 50 mL contendo meio de cultivo composto por DMEM baixa glicose, 20% de SFB, 100UI/mL penicilina/100µg/mL estreptomicina, 3µg/mL anfotericina B e transportadas em tubos refrigerados a 4°C até o laboratório.

No laboratório as amostras de cordão umbilical foram lavadas em PBS com 100UI/mL penicilina/100µg/mL estreptomicina, dissecadas para remoção total dos vasos sanguíneos, e então o tecido extravascular foi fragmentado e submetido à digestão enzimática, realizada em uma solução de collagenase a 0,004% (Sigma Aldrich, USA) em PBS, durante 15 minutos a 37°C. Após o tempo de digestão, as amostras foram filtradas com filtro de 70µm, desprezando os fragmentos retidos, e centrifugadas com 1 ml de DMEM alta glicose por 10 minutos a 2000rpm. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuspensionado e cultivado em garrafas com meio composto de DMEM alta glicose, 10% de SFB, 100UI penicilina, 100µg/mL estreptomicina, 3µg/mL de anfotericina B a 37,5°C em atmosfera úmida contendo 95% de ar e 5% CO₂. As células foram plaqueadas em placas de 6 poços, numa concentração de 1000 células/poço. O processamento das amostras de cordão umbilical está mostrado na Figura 2.

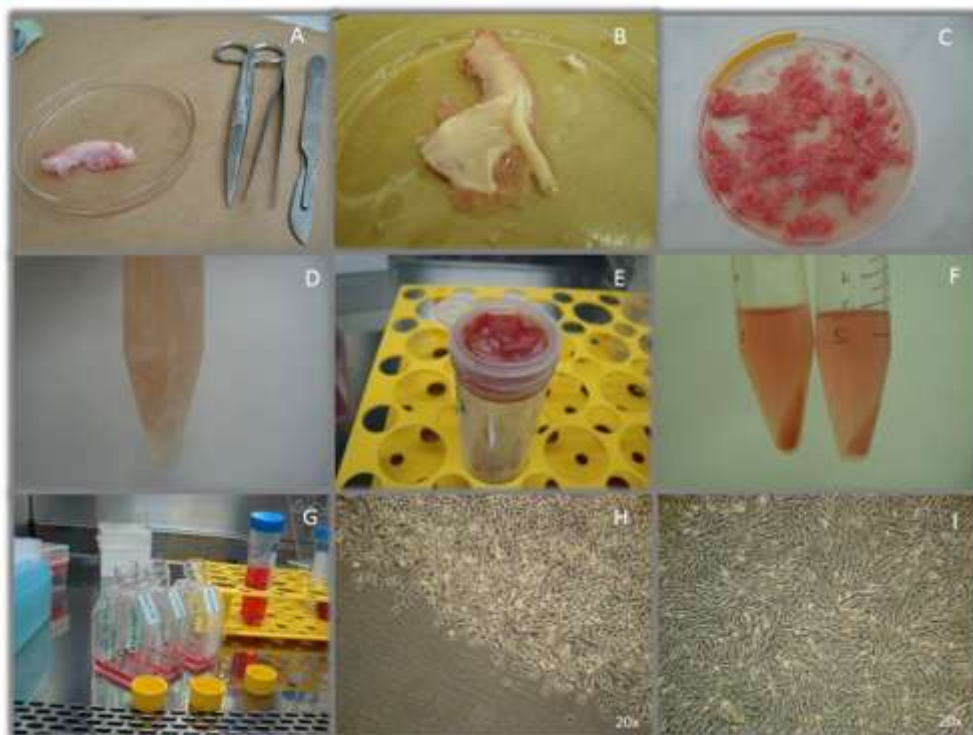


Figura 2. Processamento do cordão umbilical equino. A. Materiais utilizados: placa de Petri, amostra do cordão umbilical, pinça, tesoura, bisturi e cabo. B. Divulcionamento da matriz para retirada de veia e artérias umbilicais. C. Fragmentos da matriz. D. Tecido sob ação da enzima collagenase. E. Filtração da solução para obtenção das células. F. Pellet formado após centrifugação da solução. G. Plaqueamento das células. H. Início da expansão do cultivo celular (20X). I. Confluência do cultivo (20X).

As trocas de meio foram realizadas a cada 3 dias até a confluência. Para evitar uma possível diferenciação espontânea devido à presença do meio com alta glicose, nas trocas foi utilizado meio DMEM baixa glicose, contendo 20% de SFB, 100UI penicilina/100µg/mL estreptomicina, 3µg/mL de anfotericina B. As garrafas confluentes (70%) foram submetidas ao processo de tripsinização e, criopreservadas e teste de viabilidade celular da mesma maneira dos fibroblastos adultos equinos.

2.3 Cultivo Primário de Fibroblastos Embrionários Murinos (FEM):

Fêmeas murinas foram eutanasiadas no dia 14 de gestação pela técnica de deslocamento cervical. Após lavagem do abdômen com álcool 70%, a pele e peritônio foram abertos com

instrumentos estéreis, e o útero foi retirado. O útero foi lavado três vezes em solução PBS com 100UI/mL penicilina/100µg/mL estreptomicina, 3µg/mL anfotericina B e cortado para retirada dos fetos. As vísceras dos fetos foram retiradas e as carcaças lavadas novamente com a solução PBS acrescida de antibióticos. Após a lavagem as carcaças foram maceradas em pedaços muito pequenos, e foi adicionado 5 ml de solução a 0,25% de tripsina e incubando-se o material em estufa de CO₂ por 20-30min. Após a retirada do material da estufa realizou-se a neutralização da ação da tripsina com meio DMEM alta glicose acrescido de 20% de SFB e 100UI/mL penicilina/100µg/mL estreptomicina, 3µg/mL anfotericina B. O material foi dividido em garrafas de cultivo (calculou-se tecido de três embriões por garrafa) e incubado durante 12 horas. Após 24 horas o meio foi trocado e as garrafas permaneceram em cultivo até atingir a confluência de 70%. Após realizou-se a criopreservação em nitrogênio líquido e teste da viabilidade celular da mesma maneira dos fibroblastos adultos equinos. Para o recultivo das células, descongelou-se as alíquotas, e o pellet foi cultivado em placas de 6 poços com meio DMEM baixa glicose contendo 20% de SFB, 100UI penicilina/100µg/mL estreptomicina, 3µg/mL de anfotericina B a 37,5°C em atmosfera úmida contendo 95% de ar e 5% CO₂ até atingirem 70% de confluência. Para o bloqueio do crescimento celular, o meio de cultivo foi substituído por 4,0 ml de solução contendo mitomicina C (Mitomycin C from *Streptomyces caespitosus* power), na concentração 10µg/ml, por 12 horas. Em seguida, as garrafas foram lavadas por duas vezes com meio DMEM baixa glicose e mais duas vezes com PBS. Em seguida as células foram tripsinizadas, lavadas e plaqueadas em placas de 6 poços (5x10³ células por poço) para servirem como monocamada de sustentação (FEM) do cultivo das iPS.

3 Transfecção, expansão e reprogramação.

3.1 Vetores lentivirais

Foram utilizados vetores lentivirais policistrônicos excisáveis STEMCCA (Stem Cell cassette, Sommer et al., 2009; Figura. 3) contendo as sequências codificantes de OCT-4, SOX-2, c-MYC e KLF-4 humanos (hSTEMCCA).

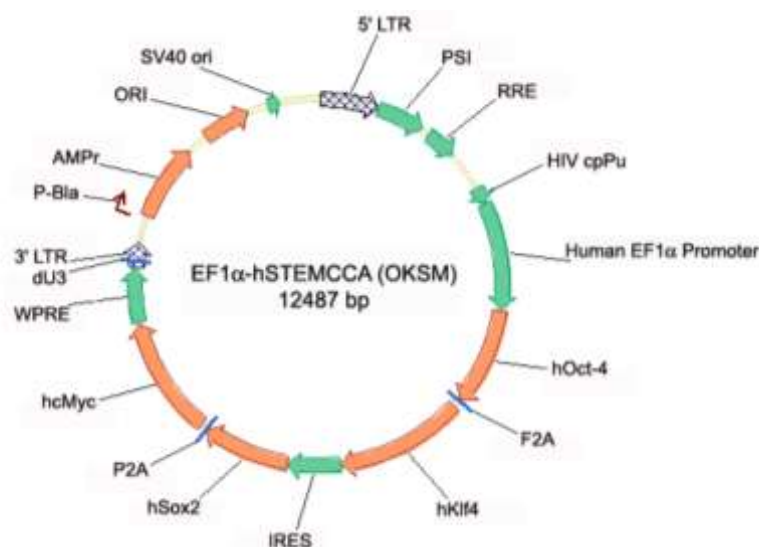


Figura 3. Mapa do vetor lentiviral EF1α-hSTEMCCA (OKSM). Figura adaptada do catálogo n. SCR544 (humano) Millipore.

3.2 Transformação, clonagem bacteriana e purificação plasmidial

Para o plasmídeo utilizado foram realizadas as etapas de transformação e clonagem bacteriana e purificação plasmidial por Maxi-Prep, como descrito a seguir.

Para a transformação bacteriana foram utilizados aproximadamente 1µg de DNA plasmidial em 100µL de bactérias quimicamente competentes DH5α. Foi realizado o protocolo de choque térmico que consistiu na incubação da bactéria com o DNA plasmidial em gelo por 15 min, incubação a 42°C por 45s, nova incubação em gelo por 5 min e cultivo a 37°C com agitação (225rpm) por 50 min. Em seguida foi realizada o cultivo e seleção clonal em placas de meio LB Ágar adicionado de 100µg/ml do antibiótico de seleção Ampicilina por aproximadamente 16h (durante a noite) em incubadora a 37°C.

Três colônias de bactérias foram selecionadas e cultivadas em um pré-inóculo de 2ml de meio LB Ágar com ampicilina por 8h e congeladas em -80°C com uma solução de glicerol a 35% para a obtenção de estoques plasmidiais em bactérias ou novamente cultivadas para a extração e purificação plasmidial. Para tal, um dos cultivos foi novamente incubado por aproximadamente 16h em 100ml de meio LB Ágar com ampicilina a 37°C em agitação de 225rpm, peletizadas e submetidas à extração do DNA plasmidial pelo kit MaxiPrep EndoFree (Qiagen) segundo recomendações do fabricante.

Os estoques plasmidiais purificados foram quantificados por Nanodrop e são mantidos a -20°C até o momento da utilização.

3.3 Produção das partículas lentivirais

As partículas lentivirais foram produzidas através da lipofecção de células 293FT (Invitrogen) com o reagente Lipofectamina 2000 (Invitrogen). Para tal, 5×10^6 células 293FT foram plaqueadas no dia anterior em placas de cultivo de 100mm de modo que apresentassem 90% de confluência no momento da transdução. Foram utilizados 12 µg dos vetores STEMCCA e 2 µg de cada vetor auxiliar, de acordo com o protocolo já estabelecido no laboratório LMMD-USP-Pirassununga.

O processo de lipofecção ocorreu entre 12 a 16 horas (durante a noite), e então o meio foi recolhido 24, 48 e 72hs pós-transfecção. Em cada um desses tempos os meios eram recolhidos, repostos, filtrados e mantidos a 4°C até serem concentrados em ultracentrífuga (Beckman Coulter) por 1h40min a 48960g no rotor SW28.

3.4 Transdução celular com lentivírus

50 µL do concentrado viral acrescido de 8 ng/mL de polibreno foram adicionados sob o cultivo prévio dos fibroblastos adultos e sob as células da matriz do cordão umbilical.

Ambos os cultivos celulares foram plaqueados no dia anterior com 10^5 células por poço em placa de 6 poços.

Cinco dias pós-transdução, as células foram tripsinizadas e transferidas para placas contendo FEM, por no mínimo 14 dias e alimentadas com meio específico para produção de iPS, composto por DMEM/F12 Knockout suplementado com 20% de substituto de soro knockout, 1% de L- glutamina, 1:1000 B-mercaptoetanol, 1% aminoácidos não essenciais, 10µg/mL bFGF (Fibroblast Growth Factor Basic) e antibióticos (100UI/mL penicilina/100µg/mL estreptomicina). Após os 14 dias, as células foram transferidas para placas cobertas previamente com monocamada de fibroblastos embrionários murinos e alimentadas com meio de cultivo de iPS.

3.5 Repique celular

O primeiro repique ou passagem celular foi realizado manualmente para os dois tipos celulares reprogramados. A partir da segunda passagem, os clones puderam ser repicados através de incubação com tripsina por aproximadamente 3 minutos em incubadora. Aos 15 dias foram realizados repiques mecânicos, e a cada 3 dias passagens químicas das colônias para novas placas de 6 poços contendo monocamada de fibroblastos embrionários murinos e meio específico para iPS. Após 3 passagens químicas as células foram criopreservadas em uma solução contendo 10% de DMSO e 90% de SFB, e armazenadas em botijões de nitrogênio líquido. Após o descongelamento à 25°C, as células foram transferidas para placas de 6 poços contendo FEM e o meio de cultivo DMEM:F12 (1:1), suplementado com 20% SFB, 100UI/mL penicilina/100µg/mL estreptomicina, 3µg/mL anfotericina B, 1% de aminoácidos não essenciais, 1% de aminoácidos essenciais, 0,1mM de B-Mercaptoetanol, 0,1mM de Piruvato de Sódio, 1000U/mL de LIF e 10µg/mL de bFGF. O meio de cultivo foi renovado a cada 3 dias.

3.6 Avaliação da eficiência de reprogramação

As células de ambas as fontes foram fotografadas nos dias 3, 6, 7 e 15 pós-transdução para acompanhar o crescimento das primeiras colônias.

A eficiência de reprogramação foi avaliada pelo número de colônias formadas após a quarta passagem, que se estabeleceu em placa de cultivo de 100 mm tratadas com FEM.

Para avaliar essa eficiência foram selecionados aleatoriamente 10 campos (aumento de 10x em microscópio ótico invertido) em 4 diferentes placas de cada um dos cultivos, e então foram contadas as colônias encontradas nos 10 diferentes campos.

3.7 Replicação dos transposons

Foi utilizado o Piggy Bac transposon PB-EF1a-Oct4-Sox2-Klf4-Myc-IRES-GFP Human 4-in-1 iPSC Vector (System Bioscience SBI, PB630A-1). Os transposons e a respectiva transposase possuem o seguinte mapa, ilustrado na Figura 4:

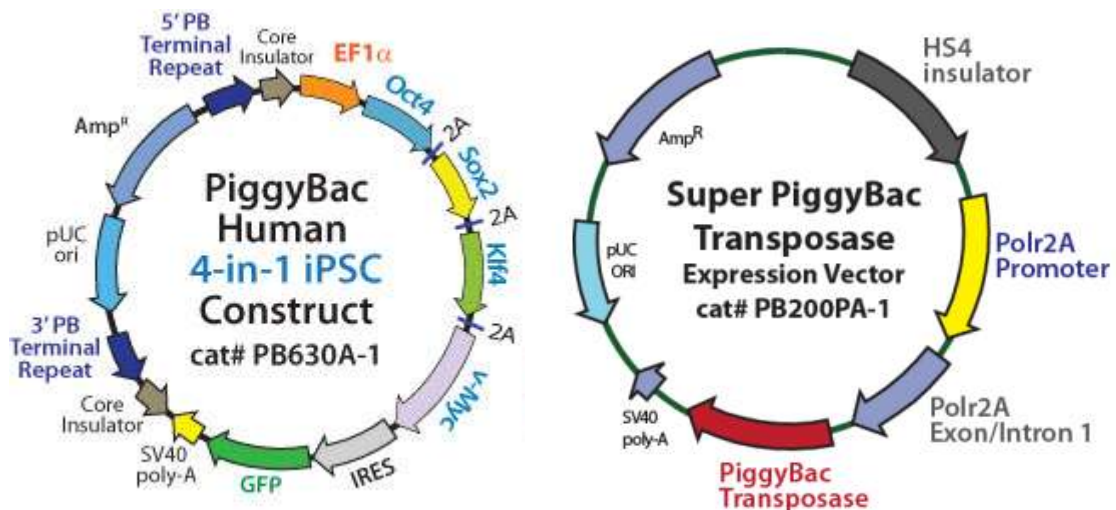


Figura 4: Mapa do vetor transposon PiggyBac e Super PiggyBac Transposase. Adaptado do catálogo PB 1-PiggyBac™ Transposon Vector System. System Biosciences.

Foram conduzidos experimentos de replicação dos transposons, já que a amostra inicial era insuficiente para realizar todas as reprogramações. Para tanto, foram testadas 3

tipos de bactérias eletro-competentes (cepas DH5 α de *Escherichia coli*, cepas de *Haemophilus influenzae* e cepas de *Acinetobacter baylyi*) para replicarem um transposon-teste, com a mesma quantidade de bases nitrogenadas dos transposons Piggybac, disponível no laboratório de citogenética do Departamento de Genética do Instituto de Biociências-Botucatu.

Adicionou-se 2uL de DNA do transposon-teste a 50 uL de estoque de bactérias eletrocompetentes, misturou-se delicadamente, acondicionando a amostra em gelo por 5 minutos. Transferiu-se a mistura para uma cubeta de eletroporação previamente resfriada e, então, eletroporou-se a amostra com auxílio do equipamento Electroporator 2510 Eppendorf ajustado às seguintes condições: resistência de 200 Ω e voltagem 1400V, uma vez ajustados os parâmetros, aplicou-se dois pulsos. Ressuspendeu-se o material em 1 mL de meio SOC (2% de Triton x, 0.5% de extrato de levedura, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, and 20 mM glicose) o qual foi posteriormente coletado da cubeta de eletroporação e cuidadosamente transferido para um microtubo estéril com capacidade de 1,5mL. Uma vez ressuspensas, as células transformadas foram incubadas sob agitação de 140 rpm a 37° em estufa Orbital Shaker Forma Scientific por uma hora. Transcorrido o tempo, o material foi plaqueado em meio seletivo composto por solução nutritiva LB Ágar e o antibiótico Ampicilina, as placas foram mantidas nas condições citadas acima por 12 horas durante a noite e as colônias selecionadas foram utilizadas para o prosseguimento do método.

Como a replicação não foi possível nem com o transposon-teste nem com o Piggybac, foram realizadas transfecções com o transposon Piggybac diretamente nas células da matriz do cordão e nos fibroblastos adultos. Adicionou-se 2 ug transposon a 0,5ug transposase em tubo cônico contendo 10⁵ células, misturou-se delicadamente. Transferiu-se a mistura para uma cubeta de eletroporação e, então, eletroporou-se a amostra com auxílio do equipamento Electroporator 2510 Eppendorf ajustado às seguintes condições: resistência de 200 Ω e voltagem 1400V, uma vez ajustados os parâmetros, aplicou-se dois pulsos. Após a

eletroporação, adicionou-se à cubeta 1 mL de meio específico de iPS: DMEM:F12 (1:1), suplementado com 20% SFB, 100UI/mL penicilina/100µg/mL estreptomicina, 3µg/mL anfotericina B, 1% de aminoácidos não essenciais, 1% de aminoácidos essenciais, 0,1mM de B-Mercaptoetanol, 0,1mM de Piruvato de Sódio e 1000U/mL de LIF e 10µg/mL de bFGF, a mistura foi posteriormente coletada da cubeta de eletroporação e cuidadosamente transferido para uma placa de 6 poços contendo FEM e meio de cultivo.

O meio de cultivo foi renovado a cada 3 dias. As células foram cultivadas em estufa a 37°C em atmosfera úmida contendo 95% de ar e 5% CO₂ e avaliadas nos dias 3, 6, 7 e 15 pós-transdução, seguindo a mesma metodologia das reprogramações lentivirais já citada.

4 Caracterização celular

4.1 Imunomarcação das colônias e citometria de fluxo

Para a imunomarcação, células em sexta passagem foram fixadas com paraformaldeído 4% e seguido o protocolo de imunofluorescência do fabricante. Foram utilizados os seguintes anticorpos primários:

Kit 1: SCR001 ES Cell Characterization Kit-Millipore

- Oct-4 (monoclonal mouse, MAB4305-20),
- Nanog (monoclonal rabbit, ab80892, Abcam),
- Ssea-1 (monoclonal mouse, MAB4301-20),
- Ssea-3 (monoclonal mouse, MAB4303-20),
- Ssea-4 (monoclonal mouse, MAB4304-20),
- Tra-1-60 (monoclonal mouse, MAB4360-20),
- Tra-1-81 (monoclonal mouse, MAB4381—20).

Kit 2: SCR078 Fluorescent Human ES/iPS Cell Characterization Kit-Millipore

- Mouse anti-Oct-4 (POU5f1), clone 7F9.2, Alexa Fluor® 488 conjugate (Part No. MAB4419A4).
- Mouse anti-Sox-2, clone 10H9.1, Cy3 conjugate (Part No. MAB4423C3),
- Mouse anti-Nanog, clone 7F7.1, Alexa Fluor® 488 conjugate (Part No. MABD24A4),
- Mouse anti-Tra-1-60, clone Tra-1-60, Cy3 conjugate (Part No. MAB4360C3),
- Mouse anti-Tra-1-81, clone Tra-1-81, Cy3 conjugate (Part No. MAB4381C3).

As marcações das placas foram analisadas no microscópio invertido de fluorescência (Leica DMI 3000B) do laboratório LANÇA.

Para a citometria de fluxo as amostras foram tripsinizadas e ressuspensas em PBS, divididas em alíquotas contendo 400 mil células e incubadas com os anticorpos do Kit 2 (específicos para citometria de fluxo) por uma hora, seguida de três lavagens e incubação com DAPI para visualização dos núcleos celulares. As amostras foram analisadas no citômetro FACS Calibur BD®, o Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária sob os cuidados da funcionária Camila de Paula Freitas Dell'Aqua. Foram realizados os controles de autofluorescência das células e controle negativo para todos os anticorpos. Analisou-se uma média de 8 a 10 mil células para cada um dos anticorpos. Porcentagens acima de 2% foram consideradas marcação positiva.

4.2 Atividade da fosfatase alcalina

A coloração da fosfatase alcalina foi realizada nos cultivos de fibroblastos adultos e células de cordão umbilical em placas de 6 poços. Ambos os tipos celulares foram lavadas uma vez com DPBS, fixadas e coradas com uma solução de Fast Red Violet, Naphthol AS-BI e água. O kit de coloração Millipore SCR-078 foi utilizado de acordo com as instruções do fabricante. Depósitos insolúveis de corante vermelho indicam os sítios de atividade da fosfatase alcalina.

4.3 Diferenciação celular espontânea e imunocitoquímica

Visando conduzir à diferenciação espontânea das células reprogramadas, foi excluído o LIF (fator inibidor de leucemia) e o bFGF do meio de cultivo de iPS. Tal protocolo foi iniciado quando as células estavam em sexta passagem. Após 20 dias de cultivo o meio foi retirado e as células fixadas em paraformaldeído a 4% por 30 minutos. Após 3 lavagens em PBS os cultivos celulares foram incubados seguindo o protocolo do fabricante dos kits. Foram utilizados os seguintes anticorpos primários, listados na Tabela 1:

Tabela 1. Anticorpos utilizados e as respectivas marcações dos folhetos embrionários :

Anticorpos	Marcação
α -fetoproteína (Monoclonal mouse Anti α -fetoprotein AFP antibody, clone C3, Sigma, A8452)	Endoderme
citoqueratina (Monoclonal Mouse Cytoqueratin clones AE1/AE3, Dako, M3515)	
tropônica cardíaca-I (Polyclonal rabbit Troponic I-C H41-cTnI, Santa Cruz Biotechnology, Sc 98830)	Mesoderme
vimentina (Monoclonal Mouse Anti-vimentin clone V9, Dako, M0725)	
β -III-tubulina (Polyclonal Rabbit Anti β -Tubulin III antibody, Sigma, T2200)	Ectoderme
Map-2 (Monoclonal mouse Anti-MAP2 antibody, clone AP20, Millipore, MAB3418)	

A metodologia foi realizada em triplicatas, foram avaliadas também amostras controle- técnico para todos os anticorpos.

4.4. Diferenciação celular induzida- formação de corpos embrióides em suspensão e imunocitoquímica

Para a produção de corpos embrióides foi semeada uma concentração de aproximadamente 3×10^4 células reprogramadas (em sexta passagem) em placa de Petri (100mm) contendo 8ml de meio de cultivo de iPS sem a presença de LIF, bFGF e FEM. Os cultivos foram incubados em estufa úmida a 37° C numa atmosfera com 5% CO₂ durante 7 dias, após esse período os agregados celulares em 3D foram filtrados em filtros de 0,22 µm, lavados em PBS, fixados em 4% de glutaraldeído e encaminhados para o Laboratório de Análises Histológicas, do Departamento de Patologia Veterinária-FMVZ-UNESP-Botucatu, onde foram submetidos ao processamento de inclusão em parafina para realização de cortes e produção de lâminas para avaliação imunohistoquímica das 3 camadas germinativas: ectoderme, mesoderme e endoderme. Para tanto, foram utilizados os mesmos anticorpos listados acima para diferenciação espontânea das células. O protocolo utilizado foi o sugerido pelo fabricante dos kits. As imunomarcações foram analisadas e fotografadas em microscópio de luz.

A metodologia foi realizada em triplicatas, foram avaliadas também amostras controle- técnico para todos os anticorpos.

4.5. Diferenciação celular induzida-formação de corpos embrióides em gotas suspensas (hanging drop) e imunocitoquímica

Na técnica de “hanging drop” as células são cultivadas em gotas suspensas de 50µl dispostas na tampa da placa de Petri (100mm), e 1 ml de PBS na base da placa para evitar o

ressecamento do cultivo. Foram semeadas 3×10^4 células/ml (em sexta passagem) em gotas suspensas de meio de cultivo de iPS sem a presença de LIF, bFGF e FEM. Esse sistema foi incubado em estufa 100% úmida, 37°C e 5% de CO₂, metade do meio das gotas foi substituído a cada 2 dias. Após 10 dias em cultivo, os corpos embrióides foram lavados em PBS, fixados em 4% de glutaraldeído e encaminhados para o Laboratório de Análises Histológicas, do Departamento de Patologia Veterinária-FMVZ-UNESP-Botucatu, onde foram submetidos ao processamento de inclusão em parafina para realização de cortes e produção de lâminas para avaliação imunohistoquímica das 3 camadas germinativas: ectoderme, mesoderme e endoderme. Para tanto, foram utilizados os mesmos anticorpos listados acima para diferenciação espontânea das células. O protocolo utilizado foi o sugerido pelo fabricante dos kits. As imunomarcações foram analisadas e fotografadas em microscópio de luz.

A metodologia foi realizada em triplicatas, foram avaliadas também amostras controle- técnico para todos os anticorpos.

4.6.PCR em tempo real

Todo o procedimento de PCR em tempo real foi realizado no Laboratório de Diagnóstico Molecular (LDM)-IBB-UNESP-Botucatu/SP sob a supervisão da pós-doutoranda Cláudia de Camargo Tozato e do Prof.º Dr. João Pessoa Araújo Júnior.

4.6.1.Extração de RNA

Os RNAs totais das amostras de fibroblastos adultos, fibroblastos adultos reprogramados, células de cordão umbilical e células reprogramadas do cordão umbilical foram extraídos através do kit Total RNA Purification kit (Norgen Biotec Corp, 17200), conforme as recomendações do fabricante. Após a extração, armazenamos os RNAs em caixas devidamente especificadas a uma temperatura de -80°C até posterior utilização.

4.6.2. Tratamento com DNase

Com a finalidade de eliminar DNA genômico, o RNA extraído foi tratado com a enzima RQ1 RNase-Free DNase (Promega, M6101), conforme as instruções do fabricante. Para verificar a ação da enzima, foram realizadas reações de One-Step RT-qPCR das amostras tratadas com e sem a enzima de transcrição reversa. Para isso, foram utilizados 10 µl de GoTaq® 1-Step RT-qPCR (A6020; Promega), 300 nM de primer do gene Klf4, água q.s.p. e 0.4 µL do mix de RT nas reações que continham a enzima RT. As condições de ciclagem utilizadas foram as indicadas pelo fabricante.

4.6.3. Quantificação do RNA

O RNA extraído foi quantificado no espectrofotômetro NanoVue Plus, GE Healthcare, nos comprimentos de onda de 260 nm e 280 nm. O grau de pureza das amostras é dado pela relação A260/A280, considerando o RNA puro, ou seja, livre de contaminantes, quando compreendida entre $1.8 \leq \text{razão} \leq 2.2$. A concentração foi calculada em µg/mL.

4.6.4. Síntese de cDNA

A síntese do DNA complementar (cDNA) foi realizada através do kit RevertAid First Strand cDNA (K1622 –Thermo Fischer Scientific). Foram utilizados 0.5 µg de RNA previamente tratado com DNase, 0.2 µg de primer randômico, 1 µL de inibidor de RNase, 2 µL de DNTP, 4 µL de tampão e 1 µL de MMLV para cada reação de 20 µL, conforme as instruções do fabricante.

4.6.5. PCR quantitativa (qPCR)

A qPCR foi realizada utilizando o 10 µl de GoTaq® qPCR Master Mix, 300nM de cada primer, água livre de nuclease q.s.p. e 2 µl de cDNA. Como controle negativo da reação para cada gene foi utilizado água ultrapura livre de nuclease. As leituras da fluorescência foram realizadas pelo equipamento 7500 Real-Time PCR (Applied Biosystems) a cada ciclo

de amplificação e, posteriormente, analisados pelo Sequence Detection Software (SDS) v1.3 (Applied Biosystems). Todas as reações foram submetidas às mesmas condições de análise e normalizadas pelo sinal do corante de referência passiva ROX para correção de flutuações na leitura decorrentes a variações de volume e evaporação ao longo da reação. O resultado, expresso em valor de CT (Cycle Threshold), se refere ao número de ciclos de PCR necessários para que o sinal o fluorescente atinja o limiar de detecção.

A eficiência da reação de amplificação de cada gene-alvo e cálculo da quantificação relativa foram realizadas utilizando a amostra de cDNA de células reprogramadas do cordão umbilical pura, que recebeu o valor de 100, e diluição seriadas até 10^{-3} (valor de 1). A amostra de células reprogramadas do cordão umbilical foi escolhida para confecção da curva padrão por apresentar o menor CT nas reações de RT-qPCR testadas anteriormente. O gráfico gerado pela concentração de cDNA e os respectivos valores de CT foram empregados para o cálculo da equação de regressão, correlação entre as variáveis pelo R-quadrado e quantificação das amostras. (PFAFFL, 2001).

A análise dos resultados e a estatística foram realizados utilizando-se software Sequence Detection Software (SDS) v1.3 (Applied Biosystems).

4.6.6. Desenho dos oligonucleotídeos iniciadores

Os oligonucleotídeos iniciadores da PCR foram desenhados através da sequencia do plasmídeo pSTEMCCA com o programa Geneious version 7.1.3 (<http://www.geneious.com>, Kearse et al., 2012), evidenciados na Figura 5.

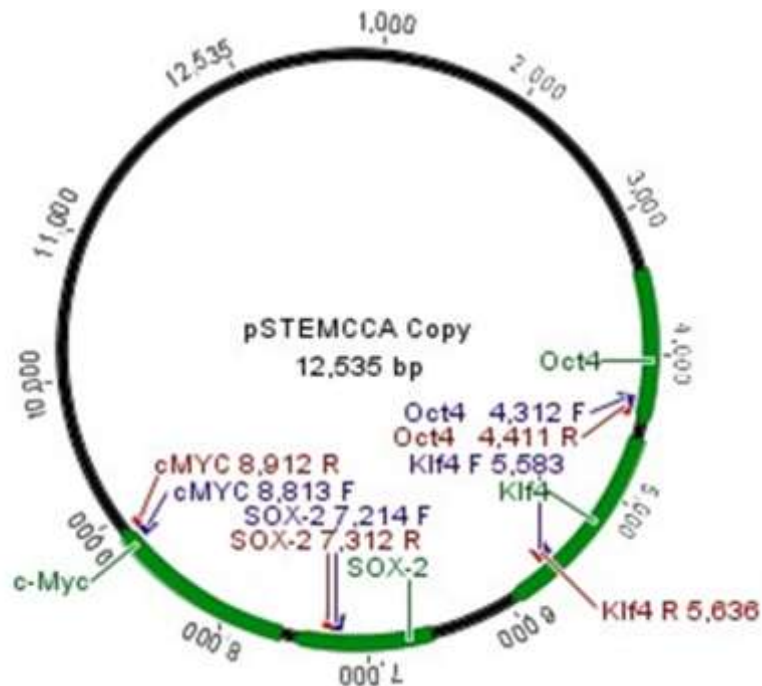


Figura 5. Imagem do plasmídeo STEMCCA indicando as regiões dos genes-alvo e primers. Geneious version 7.1.3.

4.6.7. Teste dos primers

Os oligonucleotídeos iniciadores desenhados foram testados para avaliar eficiência utilizando diluições seriadas do plasmídeo STEMCCA. Foram realizadas diluições até 10^{-3} em água ultrapura livre de nucleases. A qPCR foi realizada conforme descrito acima. Como controle negativo foi utilizado água ultrapura livre de nucleases.

RESULTADOS

1. Cultivos celulares

1.1 Fibroblastos adultos equinos

Os fibroblastos adultos equinos iniciaram sua expansão na placa com 10 dias pós-plaqueamento dos fragmentos de pele. Os cultivos atingiram confluência de 70% em 15 dias, com viabilidade de 95% após o cultivo primário, 90% entre as passagens (Figura 6A) e 85% pós-descongelamento.

1.2. Células da matriz do cordão equino

As células da matriz do cordão umbilical equino iniciaram sua expansão na placa com 5 dias pós-plaqueamento. Os cultivos atingiram confluência de 70% em 9 dias, com viabilidade de 95% após o cultivo primário, 90% entre as passagens (Figura 6B) e 85% pós-descongelamento.

1.3. Fibroblastos embrionários murinos

Os fibroblastos embrionários murinos iniciaram sua expansão na placa com 10 dias pós-plaqueamento. Os cultivos atingiram confluência de 70% em 17 dias, com viabilidade de 93% após o cultivo primário, 88% entre as passagens (Figura 6C) e 75% pós-descongelamento.

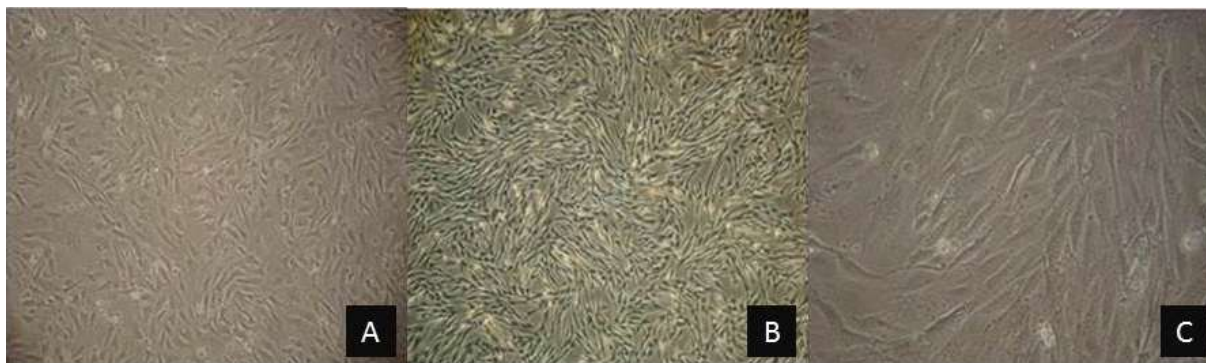


Figura 6. Cultivos celulares em 1ª passagem. A. Fibroblastos adultos equinos (100X), B. Células da matriz do cordão umbilical equino (100x). C. Fibroblastos embrionários murinos (200X).

2. Transfecção, expansão e reprogramação

-Lentivírus STEMCCA

As primeiras colônias indicativas da presença de células reprogramadas começaram a se formar com 7 e 6 dias de cultivo, respectivamente para os fibroblastos adultos e células do cordão umbilical. Apesar do tempo para início da formação das colônias serem parecidos, a expansão das colônias após a reprogramação de fibroblastos foi mais lenta, sendo a 1ª passagem realizada 30 dias pós-transdução. Já a expansão das colônias de células do cordão umbilical foi mais rápida, sendo que 15 dias pós-transdução já foi possível realizar a 1ª passagem. Após a 1ª passagem, a curva de crescimento de ambos os cultivos se igualou. Os cultivos permaneceram viáveis e as colônias continuaram a se multiplicar no decorrer de 15 dias, conforme mostrado na Figura 7.

Ambos os cultivos desenvolveram colônias finas, com bordas definidas, formadas por pequenas células de tamanho uniforme e aparência hexagonal, com núcleo evidente contendo um ou dois nucléolos, tanto nos cultivos primários como após as passagens.

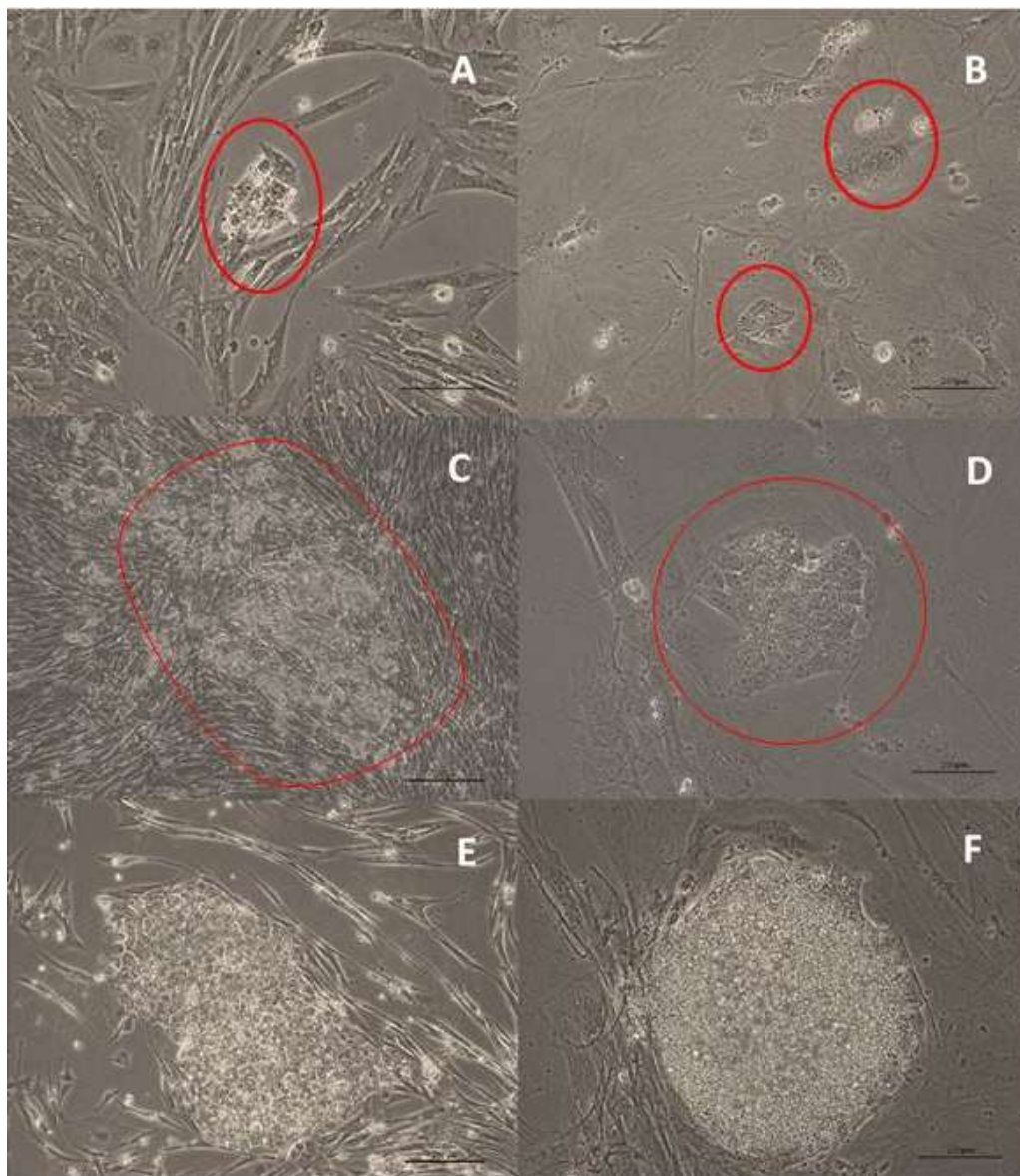


Figura 7. Células em cultivo pós-reprogramação. Fibroblastos adultos reprogramados: A: 7 dias, C: 11 dias e E: 18 dias. Células reprogramadas do cordão umbilical equino: B: 7 dias, D: 11 dias e F: 18 dias. Os círculos vermelhos delimitam as colônias sem formação. Em A, a barra de escala representa 1:100µm, em B, C, D, E e F, as barras representam 1:200µm.

Para avaliar a eficiência da reprogramação mediada por transdução lentiviral, foram plaqueadas sob FEM uma concentração de 10^4 fibroblastos reprogramados por placa de Petri (100mm), sob 4 placas, o mesmo foi realizado com as células reprogramadas do cordão umbilical. Os dados encontram-se plotados na Tabela 2.

Tabela 2. Contagem das colônias nos cultivos

Tipo celular	Número de colônias por placa				Total	Média	Desvio-padrão
	Placa 1	Placa 2	Placa 3	Placa 4			
Fibroblastos adultos reprogramados	95	73	87	69	324	81	10,49
Células reprogramadas do cordão umbilical	94	86	84	98	362	90,5	5,72

-Transposon PiggyBac

As transfecções realizadas com transposon PiggyBac não resultaram em reprogramações efetivas em nenhum dos dois tipos celulares, os cultivos não apresentaram colônias em 10 dias pós-transfecções, conforme estabelecido pelo protocolo do fabricante e a literatura científica. Os cultivos permaneceram em observação por 30 dias em estufa, com trocas de meio a cada 3 dias, porém sem sucesso.

3. Caracterização celular

3.1. Imunofluorescência

Os fibroblastos adultos reprogramados, foram submetidos à análise por imunofluorescência utilizando os dois kits de marcação (**Kit 1:** SCR001 ES Cell Characterization Kit-Millipore; **Kit 2:** SCR078 Fluorescent Human ES/iPS Cell Characterization Kit-Millipore), mas a marcação positiva para Oct-4 e Nanog só foi obtida com o kit 2 (Figura 8).

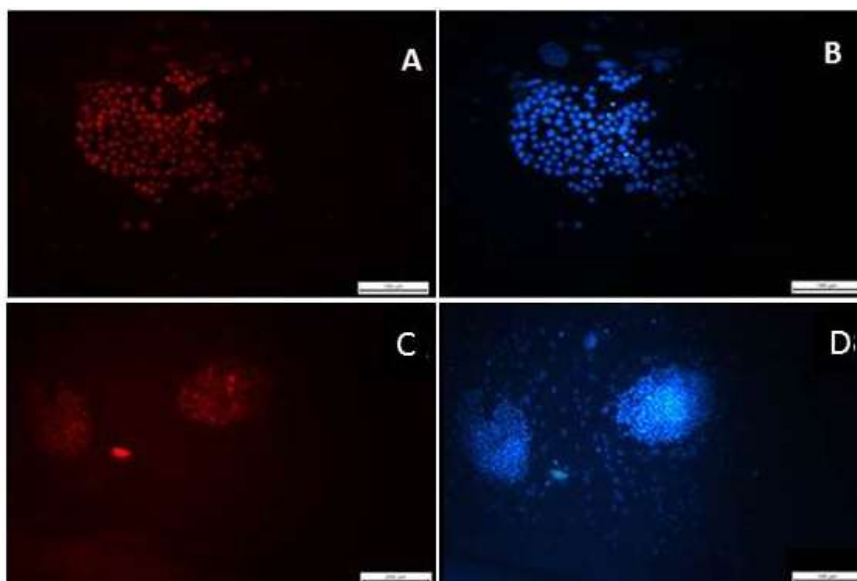


Figura 8. Imunofluorescência das colônias de fibroblastos adultos reprogramados, expressando marcação positiva para Oct-4 (A) e Nanog (C), sendo (B) e (D) suas respectivas marcações de núcleo com DAPI.(Kit: SCR078 Fluorescent Human ES/iPS Cell Characterization Kit-Millipore). Em A e B as barras representam 1: 50 μ m, em C e D as barras representam 1:100 μ m.

Já as colônias de células do cordão umbilical marcaram positivamente para Oct-4 (kit 1), Sox-2 (kit 2) e Tra-1-81 (kit 2), conforme a Figura 9.

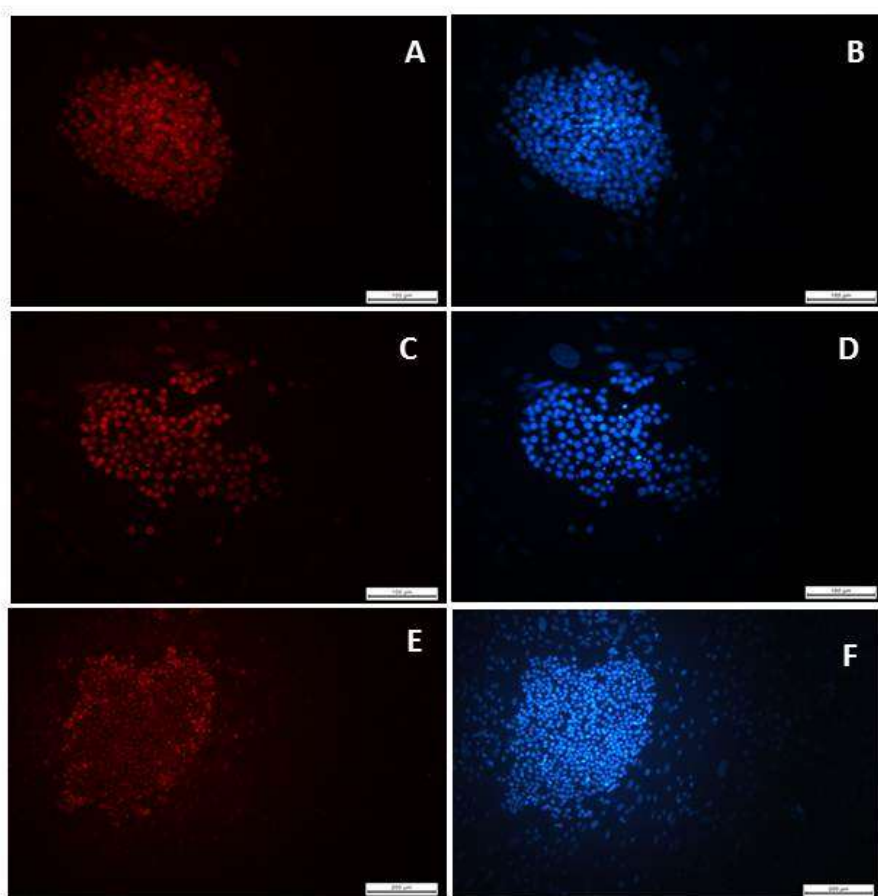


Figura 9. Imunofluorescência das colônias de células reprogramadas de cordão umbilical, expressando marcação positiva para Oct-4 (A), Sox-2 (C) e Tra-1-81 (E), sendo (B), (D) e (F) suas respectivas marcações de núcleo com DAPI. Em A, B, C e D as barras representam 1:50µm, em E e F as barras representam 1:100µm.

3.2. Citometria de fluxo

Através da análise por citometria de fluxo, observou-se que os fibroblastos reprogramados apresentaram marcação positiva para Oct-4, Sox-2, Nanog e Tra-1-60. Já as células reprogramadas do cordão umbilical marcaram positivamente para Oct-4, Nanog, Tra-1-60 e Tra-1-81. Os dados estão descritos na Tabela 3:

Tabela 3. Porcentagem de marcação dos anticorpos entre 8 a 10 mil eventos analisados na citometria de fluxo.

Marcadores	Tipos celulares			
	Células reprogramadas do cordão umbilical equino (%)	Células do cordão umbilical equino (%)	Fibroblastos adultos reprogramados (%)	Fibroblastos adultos (%)
Oct-4	12,1	0	30,2	0
Sox-2	0	0	12,0	0
Nanog	71,1	0	14,5	0
Tra-1-60	11,9	0	16,3	0
Tra-1-81	12,1	0	0	0
Média das diferenças percentuais	21,4	0	14,6	0
Desvio-padrão relativo	117,8	0	66,14	0

Foi analisada apenas uma linhagem de cada tipo celular, todos os anticorpos foram analisados em triplicata para cada um dos tipos celulares.

3.3. Atividade da fosfatase alcalina

A atividade da fosfatase alcalina pode também ser claramente detectada nos fibroblastos adultos reprogramados e nas células reprogramadas do cordão umbilical, conforme mostrado nas Figuras 10 e 11.

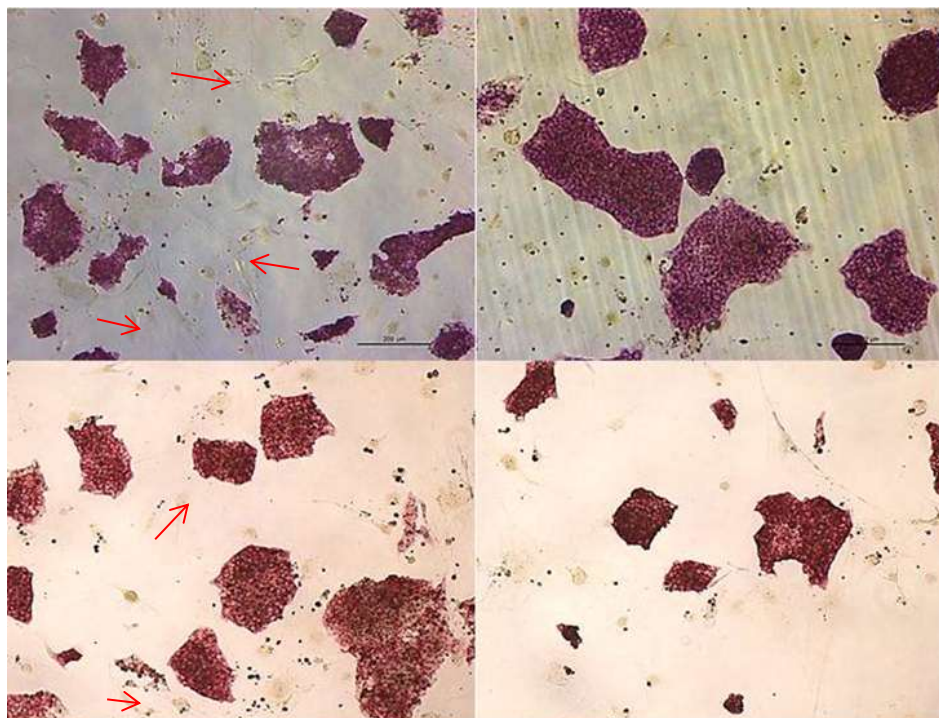


Figura 10: Marcação positiva da enzima fosfatase alcalina em fibroblastos adultos reprogramados equinos. As setas vermelhas evidenciam a monocamada de sustentação (FEM). Em A e B as barras representam 1:200 μ m. Em C e D aumento 200X.

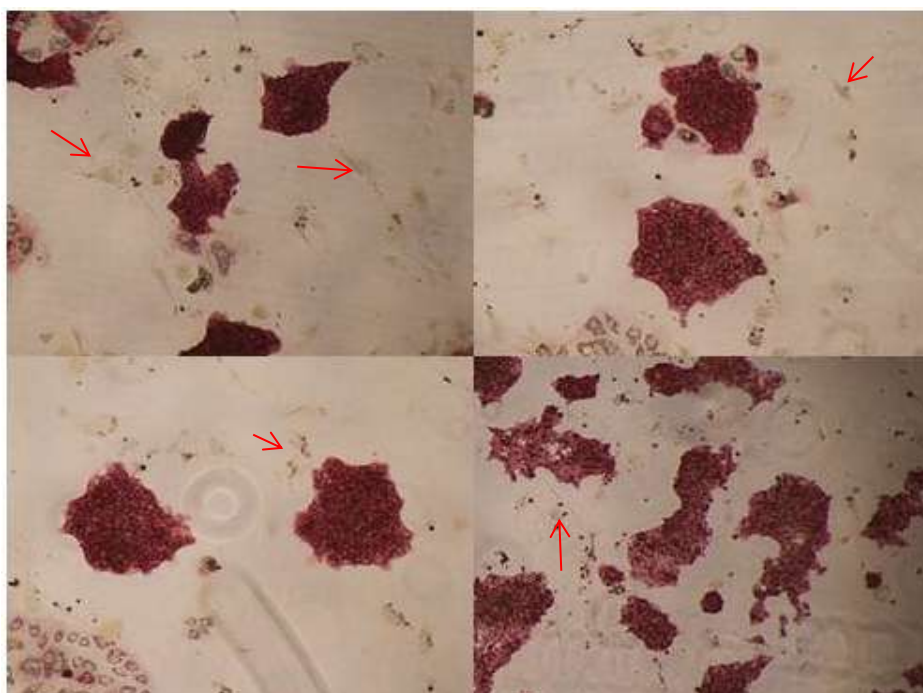


Figura 11: Marcação positiva da enzima fosfatase alcalina em células reprogramadas do cordão umbilical equino. As setas vermelhas evidenciam a monocamada de sustentação (FEM). Aumento 200X.

3.4. Diferenciação celular espontânea e imunocitoquímica

Tanto os fibroblastos quanto as células reprogramadas do cordão umbilical não apresentaram marcação para nenhum dos anticorpos.

3.5. Diferenciação celular induzida - formação de corpos embrióides em suspensão e em gotas suspensas e imunocitoquímica

Tanto pela técnica de semeadura das células em suspensão quanto pela técnica de gotas suspensas foi possível produzir corpos embrióides, porém a eficiência de formação na primeira técnica foi 3 vezes maior do que na segunda. Dados evidenciados na Tabela 4:

Tabela 4: Produção dos corpos embrióides por duas técnicas diferentes de ambos os tipos celulares reprogramados.

	Em suspensão		Em gota suspensa (em 15 gotas)	
	Fibroblastos adultos reprogramados	Células reprogramadas do cordão umbilical	Fibroblastos adultos reprogramados	Células reprogramadas do cordão umbilical
1º experimento	522	498	176	186
2º experimento	538	588	161	177
3º experimento	585	546	165	190
Média	548,3	544	167,3	184,3
Desvio-padrão	26,7	36,8	6,3	5,4

Para a realização dos procedimentos de inclusão do material para imunohistoquímica foram utilizados os corpos embrióides (Figura 12) originados dos experimentos em suspensão devido a maior quantidade.

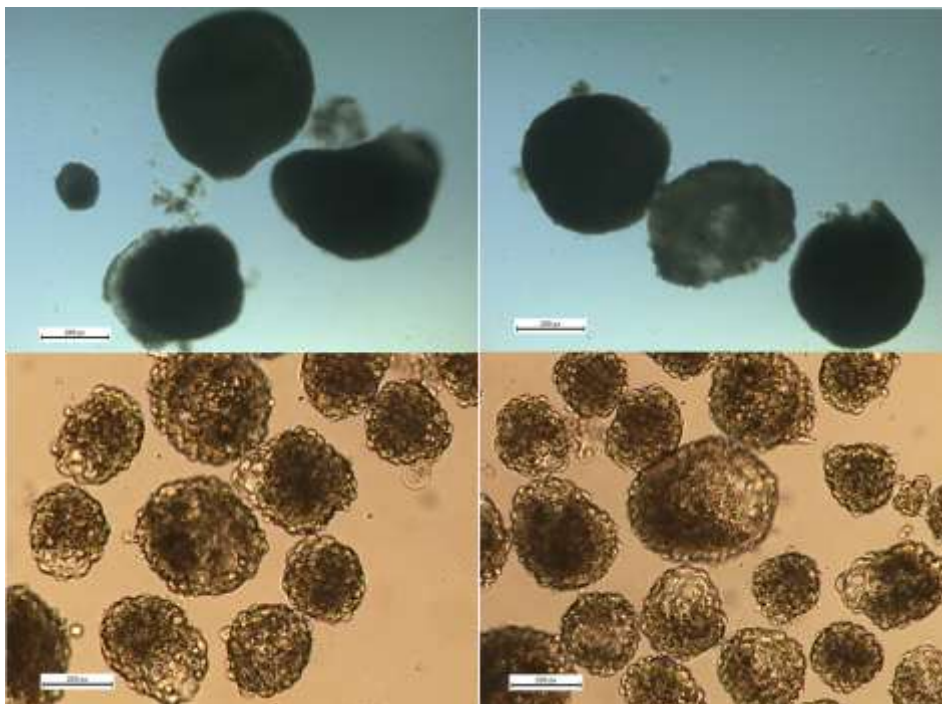


Figura 12. Morfologia dos corpos embrióides originados dos experimentos em suspensão. A, B, C e D originados de fibroblastos adultos reprogramados, E e F originados de células reprogramadas do cordão umbilical. As barras representam 1:200µm.

Tabela 5: Imunohistoquímica dos corpos embrióides originados de fibroblastos adultos reprogramados e de células reprogramadas do cordão umbilical.

	Marcadores ectoderme		Marcadores mesoderme		Marcadores endoderme	
	MAP 2	Tubulina	Troponina	Vimentina	Alfafetoproteína	Citoqueratina
Fibroblastos adultos reprogramados	+	+	+	+	+	+
Células reprogramadas do cordão umbilical	+	+	+	+	+	-

As Figuras 13 e 14 evidenciam as imunomarcações dos cortes histológicos dos corpos embrióides originados dos fibroblastos adultos reprogramados, e as Figuras 15 e 16 evidenciam as imunomarcações dos cortes histológicos dos corpos embrióides originados das células reprogramadas do cordão umbilical. Tanto o controle negativo quanto as células reprogramadas de ambas as fontes não apresentaram marcação para os marcadores listados acima.

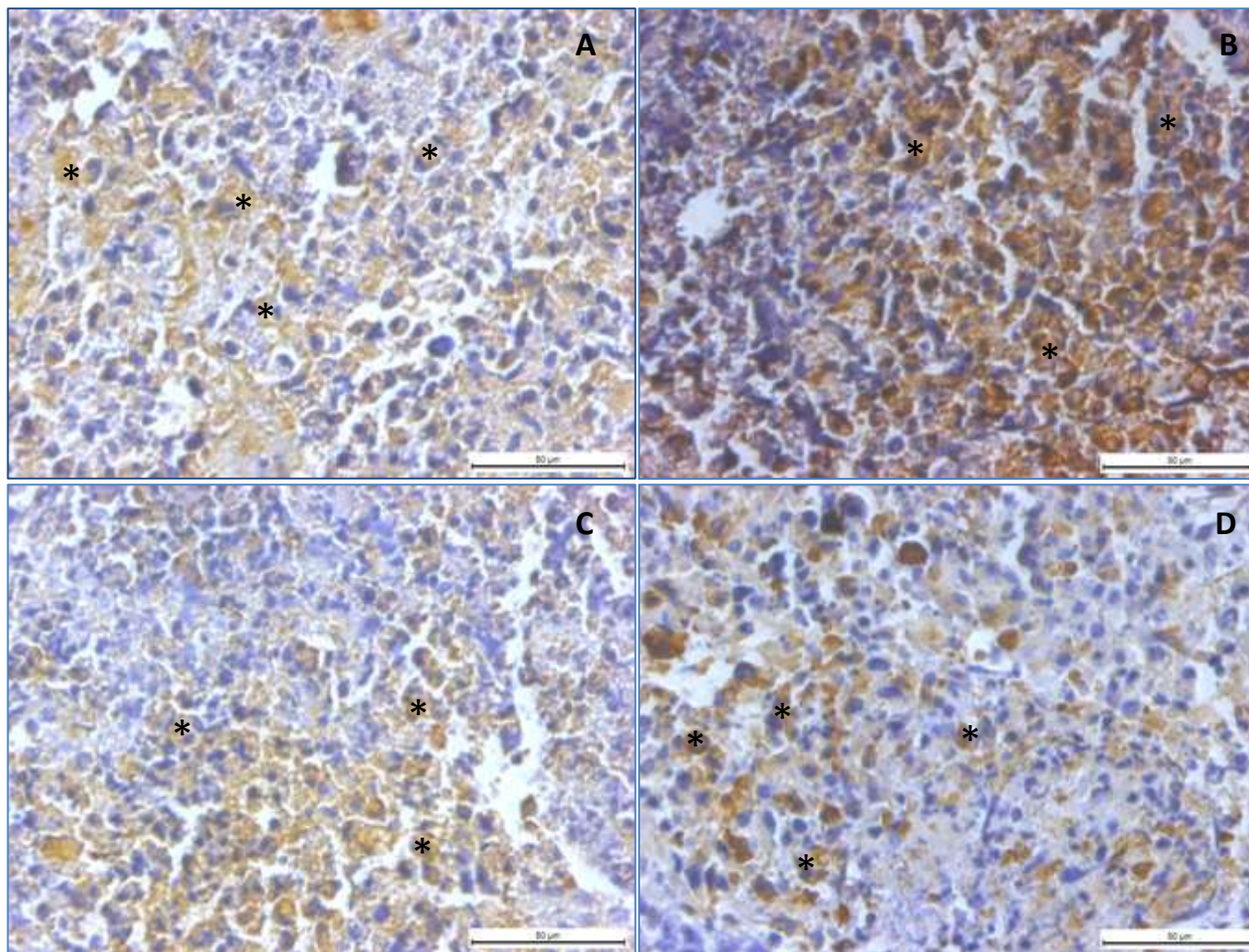


Figura 13. Imunocitoquímica dos corpos embrióides originados de fibroblastos adultos reprogramados. A: MAP-2; B: Tubulina; C: Troponina; D: Vimentina. Os asteriscos representam a marcação positiva dos respectivos anticorpos. As barras representam 1:50μm.

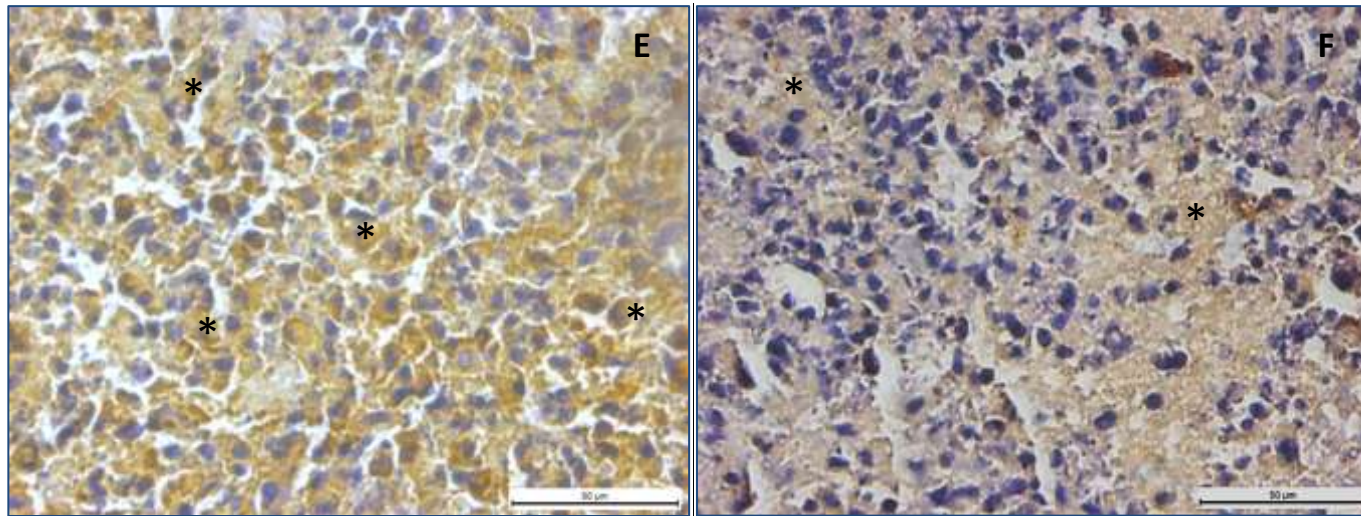


Figura 14. Imunocitoquímica dos corpos embrióides originados de fibroblastos adultos reprogramados. E: Alfafetoproteína; F: Citoqueratina. Os asteriscos representam a marcação positiva dos respectivos anticorpos As barras representam 1:50µm.

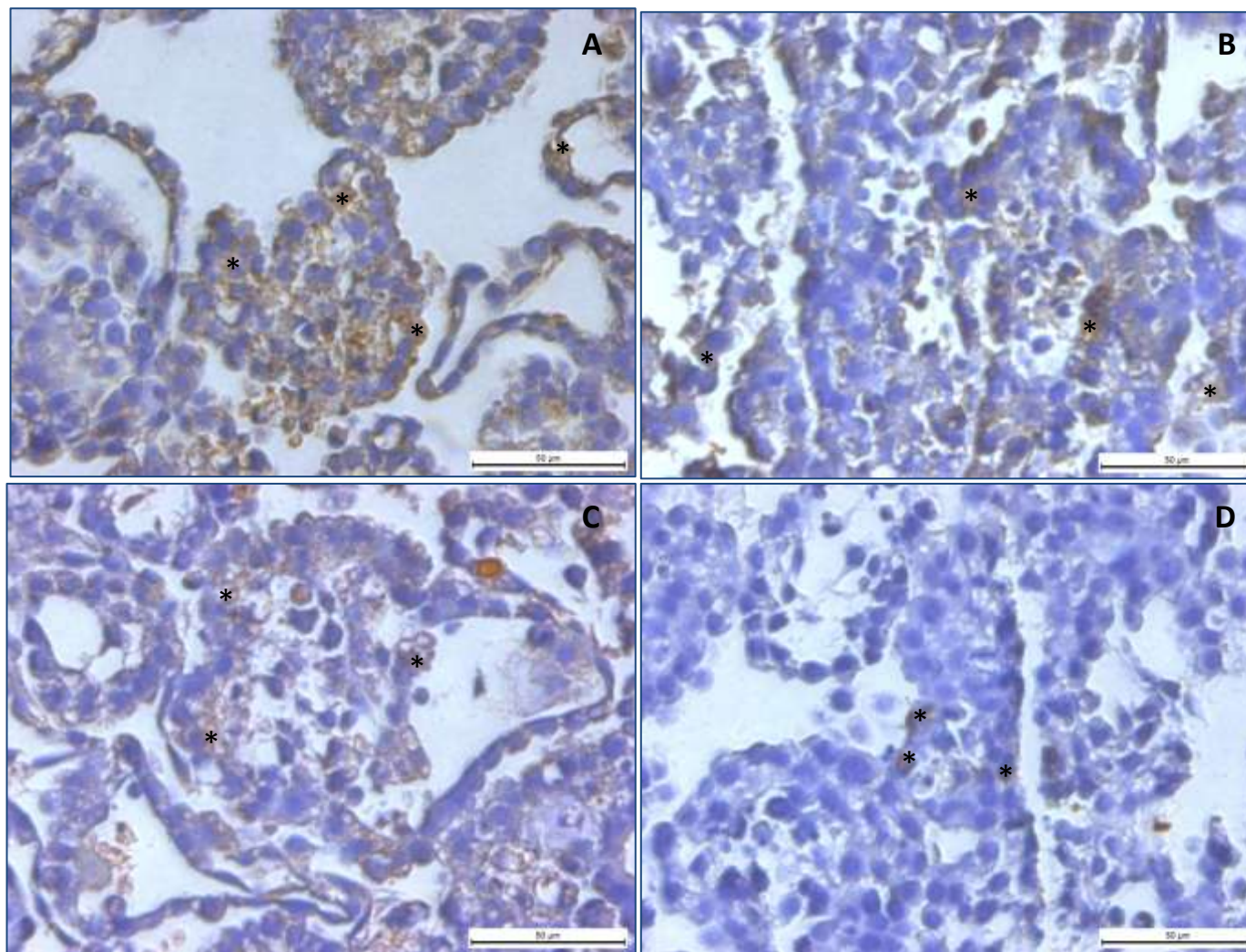


Figura 15. Imunocitoquímica dos corpos embrióides originados de células reprogramadas do cordão umbilical. A: MAP-2; B: Tubulina; C: Troponina; D: Vimentina. . Os asteriscos representam a marcação positiva dos respectivos anticorpos As barras representam 1:50µm.

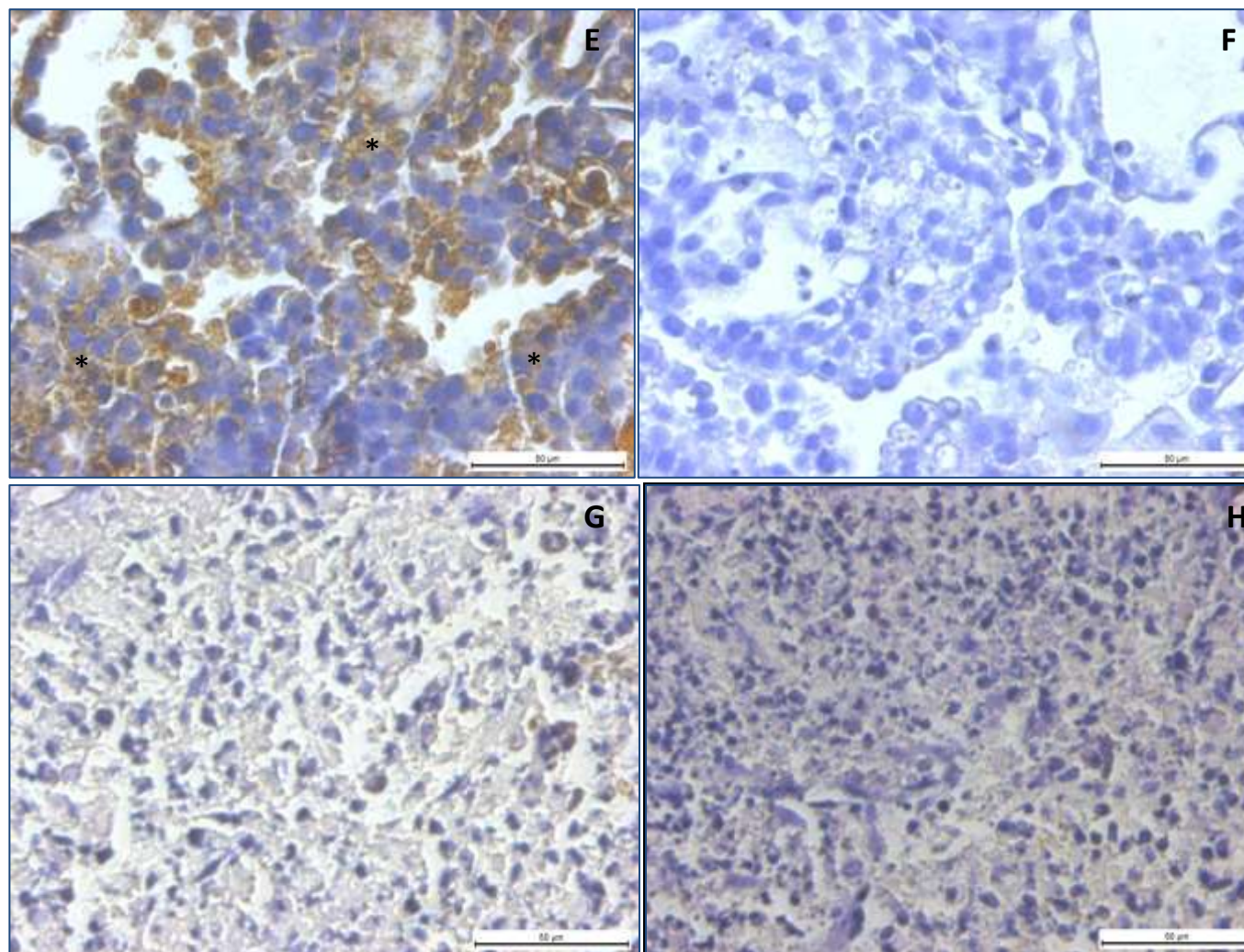


Figura 16. Imunocitoquímica dos corpos embrióides originados de células reprogramadas do cordão umbilical. E: Alfafetoproteína; F: Citoqueratina. G e H: Controle técnico. . Os asteriscos representam a marcação positiva dos respectivos anticorpos As barras representam 1:50µm.

4. PCR em tempo real

4.1. Sequências de oligonucleotídeos iniciadores

Os oligonucleotídeos iniciadores desenhados para quantificação da expressão gênica estão indicados na tabela 6.

Tabela 6. Sequência de oligonucleotídeos iniciadores.

Genes e primers	Sequência de oligonucleotídeos	Tamanho do produto (pb)
c-MYC		
c-MYC 8,813 F	CCAAGCAGAGGAGCAAAAGC	100
c-MYC 8,912 R	CGCACAAGAGTTCCGTAGCT	
SOX-2		
SOX-2 7,214 F	GCAGACCTACATGAACGGCT	99
SOX-2 7,312 R	GACTTGACCACCGAACCCAT	
KLF4		
KLF-4 5,583 F	GCCCAATTACCCATCCTTCCT	75
KLF-4 5,636 R	GGCATGAGCTCTTGGTAATGGA	
OCT-4		
OCT-4 4,312 F	GCTGGGTCTCCTTTCTCAGG	100
OCT-4 4,411 R	ACAGTGCAGTGAAGTGAGGG	
GADPH		
	F: TGTCATCAACGGAAAGGC, R:GCATCAGCAGAAGGAGCA,	183

4.2 Teste dos primers

Os oligonucleotídeos iniciadores desenhados amplificaram as amostras do plasmídeo STEMCCA e suas respectivas diluições. Na figura 25 é possível verificar o gráfico de amplificação da amostra pura e diluições até 10^{-3} para cada gene. A amostra negativa não foi amplificada em nenhuma reação.

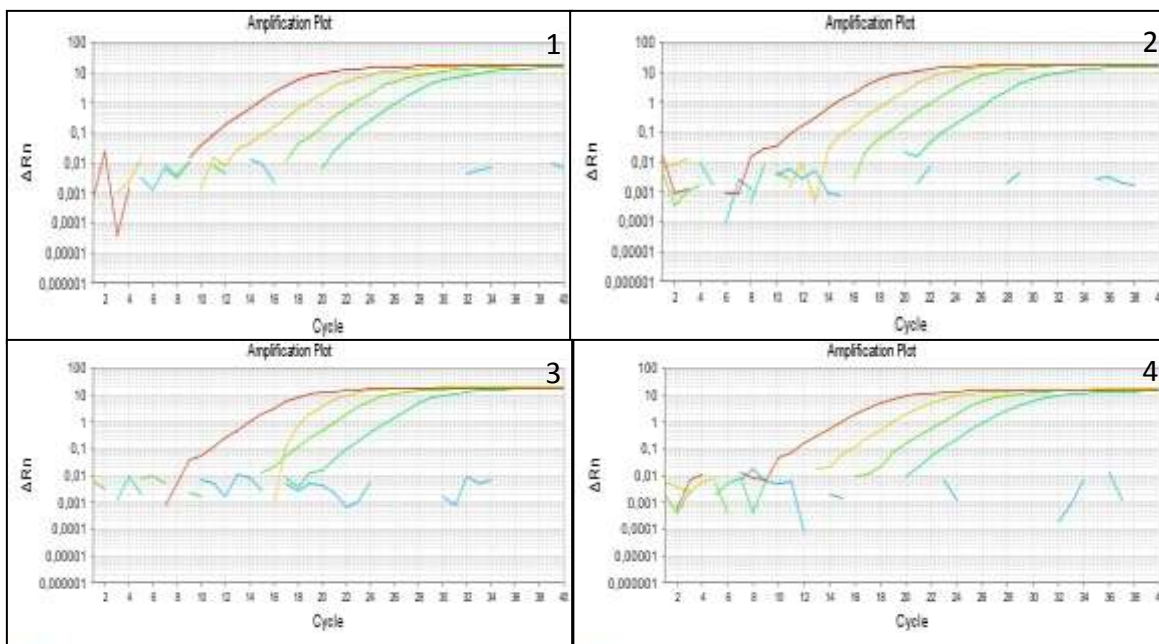


Figura 17. Gráficos de amplificação do plasmídeo STEMCCA puro e diluições seriadas para teste dos oligonucleotídeos. Os números indicam as reações para cada gene: 1. OCT-4; 2. SOX-2; 3. C-MYC; 4. KLF-4.

Na curva de Melting da qPCR foi verificado somente um pico específico para cada gene testado e as temperaturas foram: 84,0°C; 85,2°C; 80,26°C; 82,45°C para OCT-4, SOX-2, c-MYC E KLF-4, respectivamente. O controle negativo não exibiu pico.

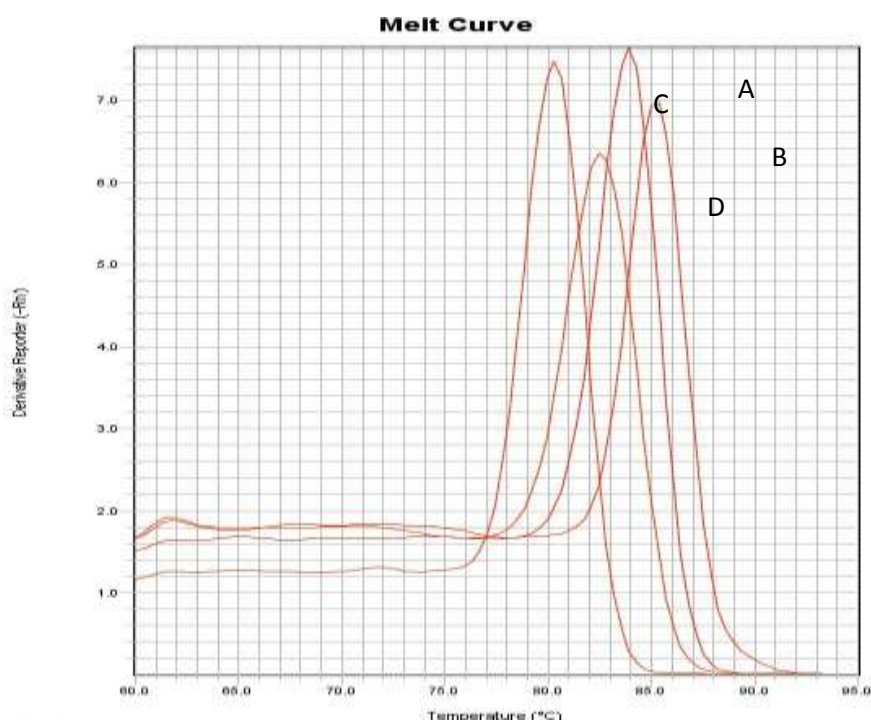


Figura 18. Curva de Melting das reações de qPCR plasmídeo STEMCCA. Os números indicam os genes avaliados: A: OCT-4; B: SOX-2; C: c-MYC; D: KLF-4.

O resultado da quantificação do RNA extraído das amostras encontra-se na tabela 7 abaixo:

Tabela 7. Quantificação do RNA das amostras.

Amostras	Quantificação do RNA ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)
Fibroblastos adultos	0,144
Fibroblastos adultos reprogramados	0,109
Células do cordão umbilical	0,130
Células reprogramadas do cordão umbilical	0,186

4.3. Teste da enzima DNase

As amostras de RNA total extraídas de fibroblastos adultos, fibroblastos adultos reprogramados, células do cordão umbilical e células reprogramadas do cordão umbilical foram tratadas com a enzima DNase e foram testadas para verificar a presença de DNA genômico. Na figura 25 é possível verificar que não houve amplificação nas amostras testadas na qPCR sem a adição da enzima de transcrição reversa, portanto foram negativas, exceto a amostra de cordão umbilical que em que houve amplificação de produto inespecífico no final da reação, com temperatura do pico gerado na curva de Melting de 76,8°C diferente do produto amplificado com RT-qPCR foi de 73,96°C.

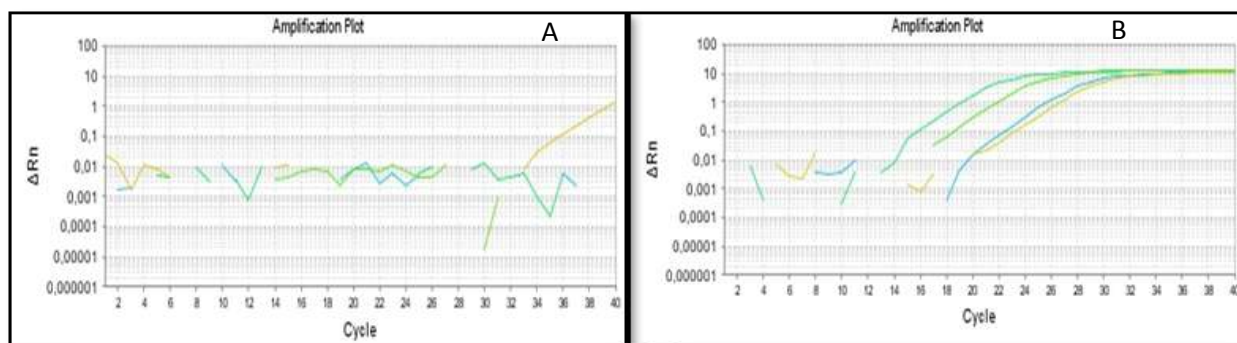


Figura 19. Gráfico de amplificação das amostras de fibroblastos adultos, fibroblastos adultos reprogramados, células do cordão umbilical e células reprogramadas do cordão umbilical nas reações de qPCR sem a enzima transcriptase reversa (A) e com a enzima transcriptase reversa (B).

4.4. Quantificação relativa das amostras

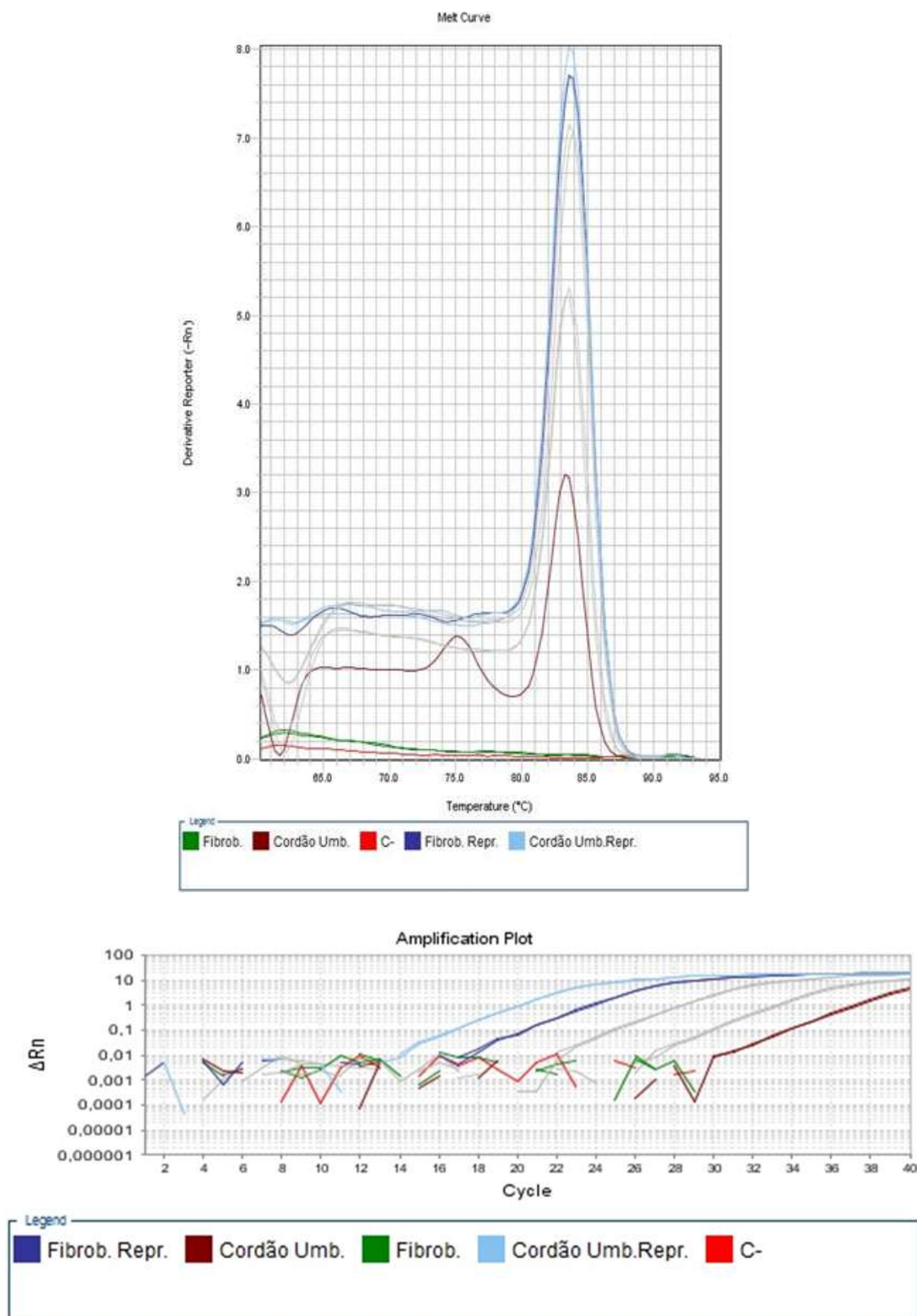


Figura 20. Gráfico de amplificação da curva padrão e amostras para o gene OCT-4 (A). Curva de Melting da curva padrão e amostras para o gene OCT-4 (B).

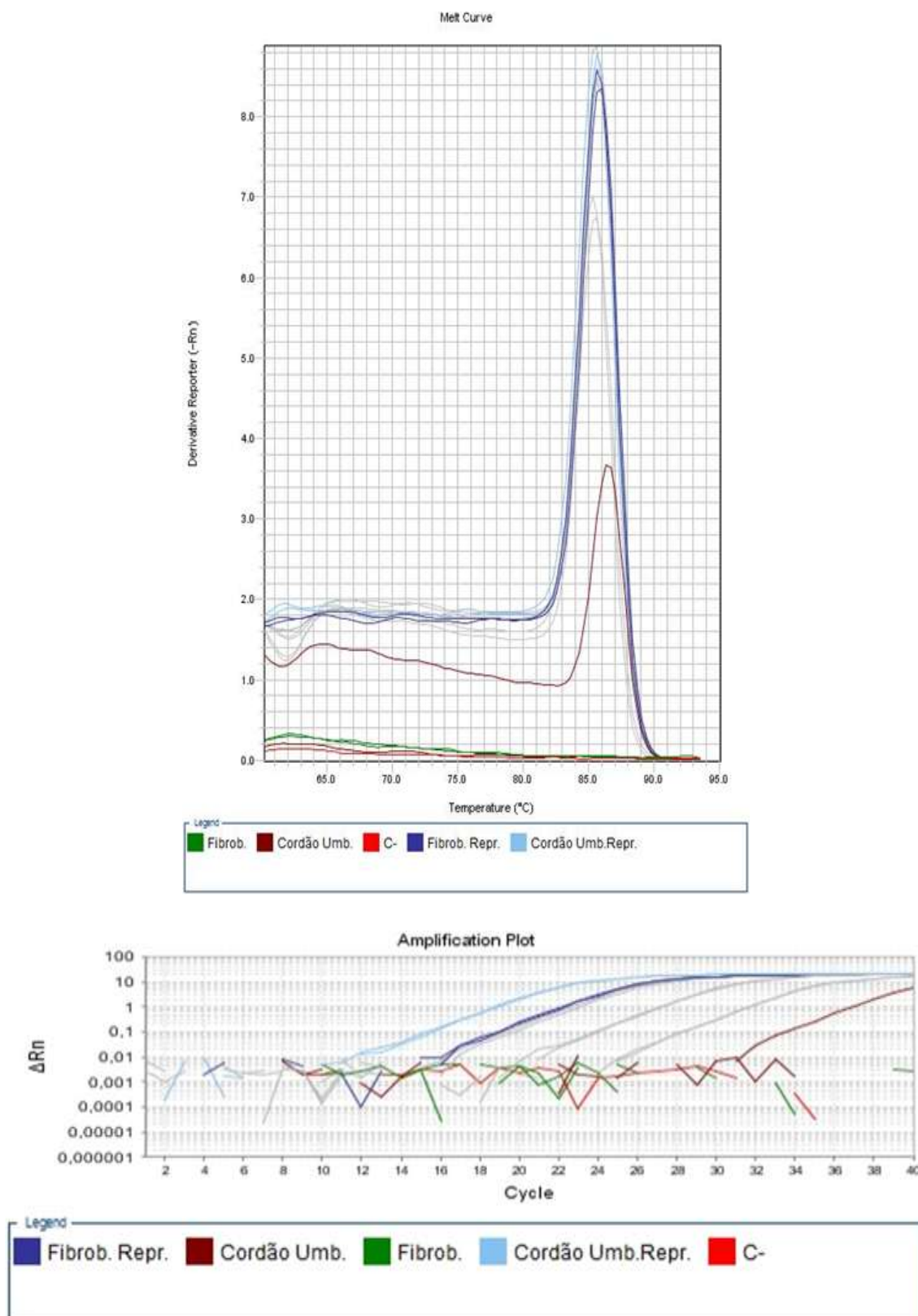


Figura 21. Gráfico de amplificação da curva padrão e amostras para o gene SOX-2 (A). Curva de Melting da curva padrão e amostras para o gene SOX-2(B).

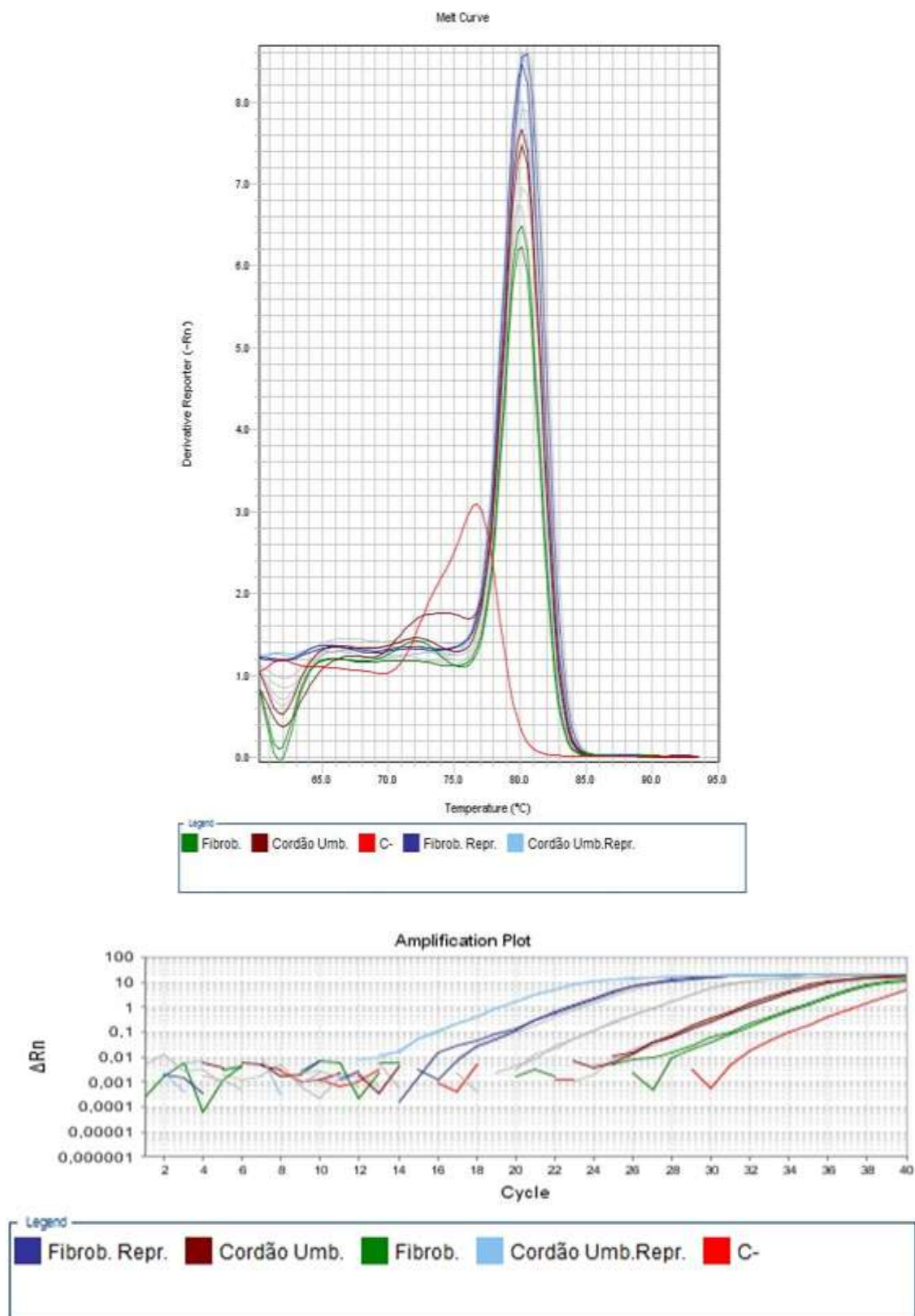


Figura 22. Gráfico de amplificação da curva padrão e amostras para o gene cMYC (A). Curva de Melting da curva padrão e amostras para o gene cMYC (B).

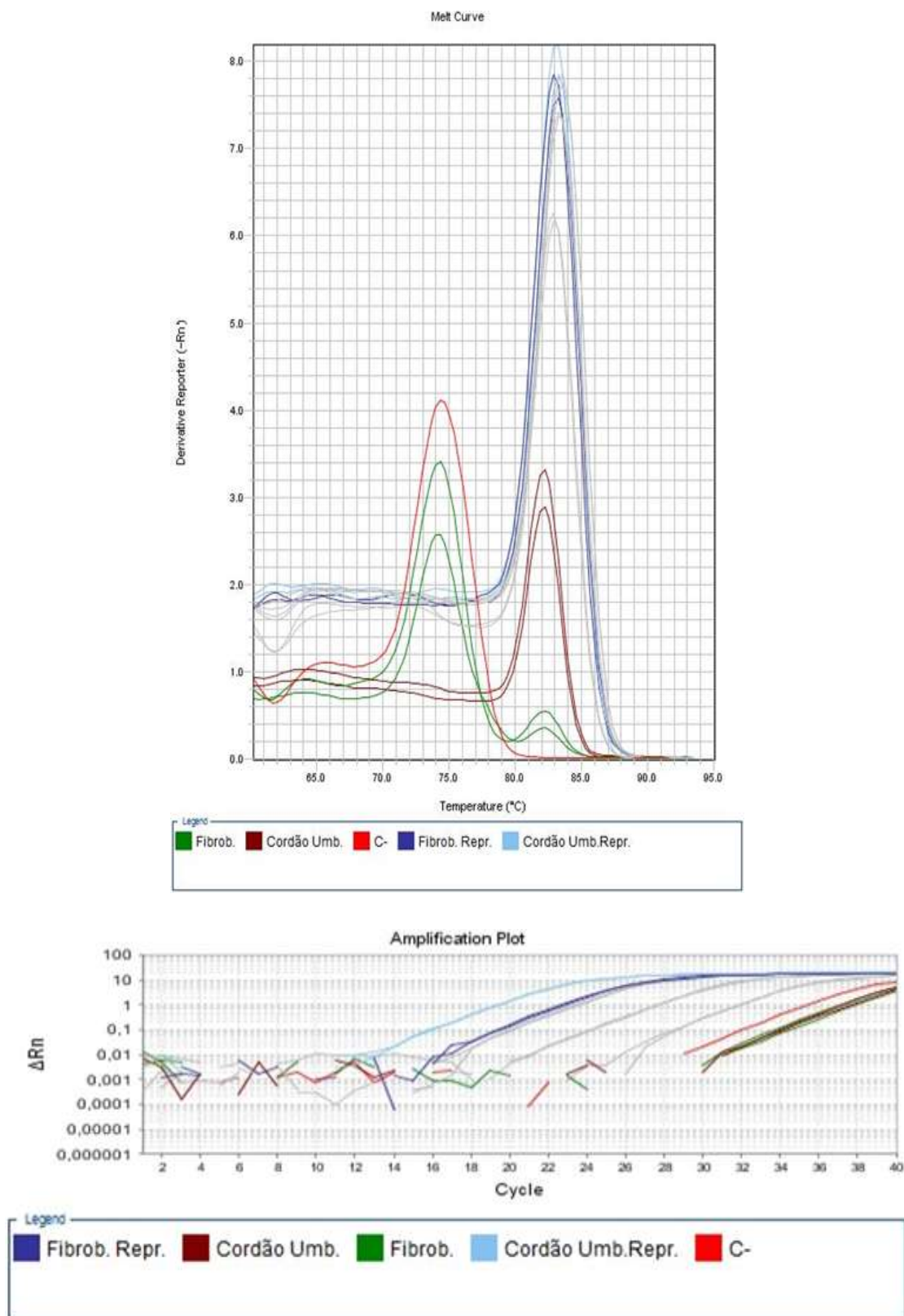


Figura 23. Gráfico de amplificação da curva padrão e amostras para o gene Klf4 (A). Curva de Melting da curva padrão e amostras para o gene Klf4 (B).

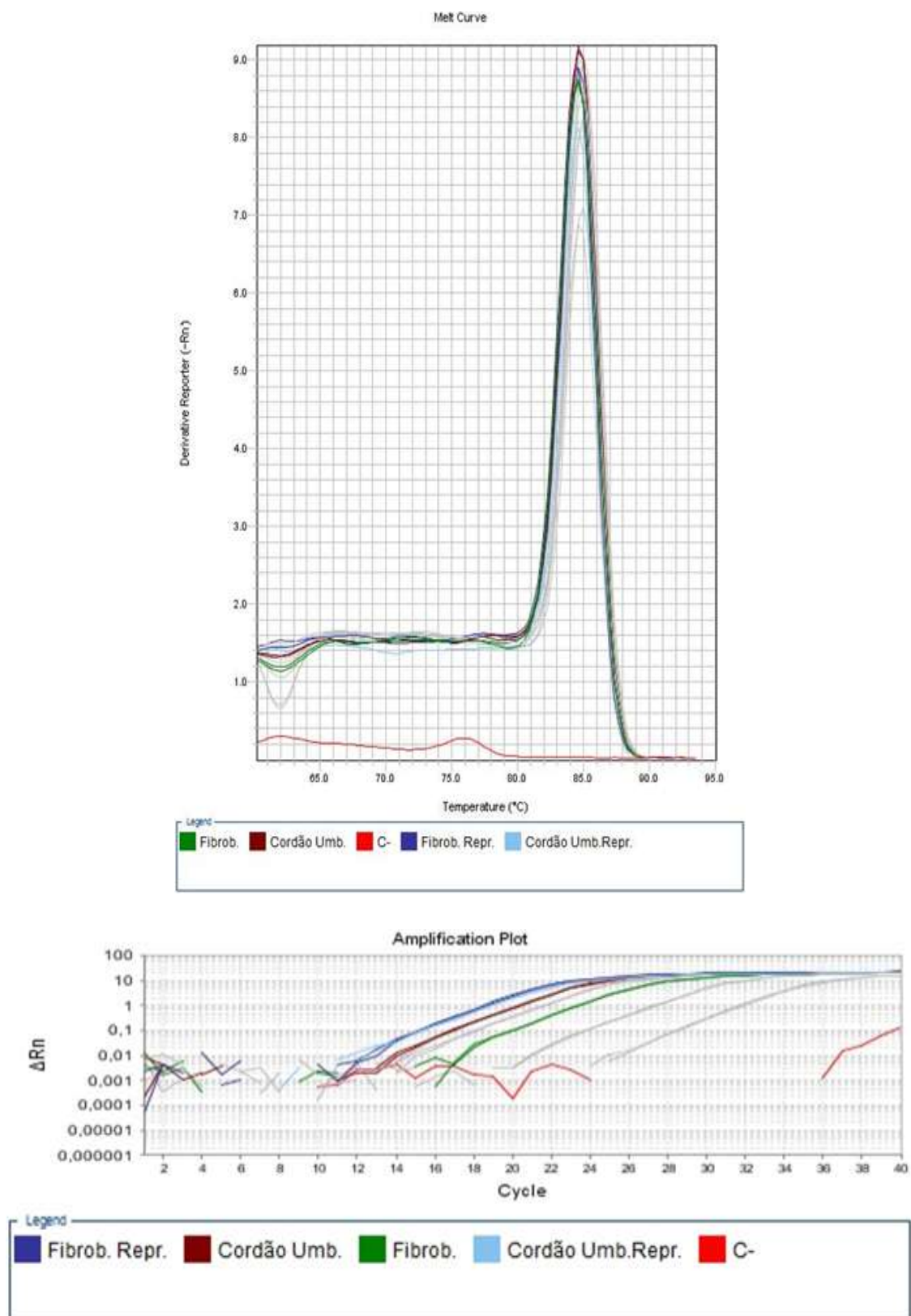


Figura 24. Gráfico de amplificação da curva padrão e amostras para o gene GAPDH equino(A). Curva de Melting da curva padrão e amostras para o gene GAPDH equino (B).

Os parâmetros avaliados na quantificação relativa estão listados nas tabelas 8 e 9:

A eficiência das reações é dada por:

$$[\text{Eficiência} = 10(-1/\text{slope}) - 1]$$

Tabela 8. Desempenho das reações de PCR em tempo real para os genes.

Gene	R ²	Eff (%)	Slope	Y-Inter
OCT-4	0,998	69,69	-4,354	28,369
c-MYC	0,998	74,129	-4,152	27,156
SOX-2	0,999	70,909	-4,296	27,372
KLF-4	1,0	74,066	-4,154	26,783
GAPDH	0,999	71,543	-4,267	29,081

Tabela 9. Quantificação relativa dos genes nas amostras.

	OCT-4 (Ct/Tm)	c-MYC (Ct/Tm)	SOX-2 (Ct/Tm)	KLF-4 (Ct/Tm)	GAPDH (Ct/Tm)
Fibroblastos adultos	0 (-/-)	0,02 (34,2/79,9)	0 (-/-)	0,004 (36,65/74,34*)	6,715 (25,09/84,62)
Fibroblastos reprogramados adultos	13,473 (23,45/83,76)	13,081 (22,5/80,16)	14,985 (22,32/85,65)	15,417 (21,8/83,08)	85,55 (20,19/84,45)
Células do cordão umbilical	0,011 (36,9/84,62)	0,092 (31,46/80,16)	0,006 (37,02/86,5)	0,004 (36,54/82,2)	34,422 (21,94/84,79)
Células reprogramadas do cordão umbilical	100 (19,76/83,5)	100 (18,92/80,16)	100 (18,9/85,4)	100 (18,5/83,08)	100 (21,94/84,79)

0= Indeterminável, provavelmente.

Ct= Cycle Threshold

Tm= Melting Temperature

DISCUSSÃO

Neste trabalho foi possível estabelecer uma linhagem celular pluripotente geneticamente induzida de células-tronco equinas (eiPS) originadas de fibroblastos adultos e de células da matriz do cordão umbilical equino.

Os cultivos pré-reprogramação tanto das amostras de fibroblastos de pele como das células do cordão umbilical equino apresentaram adesão à superfície plástica do frasco de cultivo e morfologia fibroblastóide. O tempo para que 70% de confluência fosse atingido foi mais curto para células do cordão umbilical equino (9 dias de cultivo) em comparação com os fibroblastos de pele (15 dias de cultivo). Estes resultados corroboram com achados relatados em estudos com células humanas (ZHANG E FAN, 2010), caninas (LEE et al., 2012), equinos (KOCH et al., 2007) e bovinos (CORRADETTI et al., 2013). No entanto, estas diferenças podem estar relacionadas ao método de processamento dos fragmentos teciduais mais do que ao tipo celular, uma vez que os fibroblastos foram isolados a partir do crescimento de células nas bordas dos explantes de pele, e as células de cordão umbilical, foram isoladas a partir de tecido digerido.

A metodologia de congelação utilizada se mostrou eficiente para a formação de um banco de células, uma vez que a viabilidade média das amostras foi de 85% de células viáveis e todas as amostras puderam ser re-expandidas.

Embora iPS já tenham sido produzidas a partir da reprogramação de diversos tipos celulares, os fibroblastos de pele são as células mais amplamente utilizadas na reprogramação. Isto se dá principalmente pela facilidade de obtenção deste tipo celular. Por exemplo, fibroblastos humanos são passíveis de reprogramação em cultura. No entanto, isto ocorre de forma lenta (1 mês) e com baixa eficiência (0,01%) (TAKAHASHI et al, 2007, YU et al, 2007).

Variações na expressão endógena de fatores de transcrição e diferenças epigenéticas existentes entre os vários tipos celulares podem afetar a eficiência de reprogramação. Panopoulos et al (2011) testaram a reprogramação de vários lotes de células endoteliais de veia umbilical humana (HUVEC), e encontraram eficiência de reprogramação entre 2,5-3%.

As células mesenquimais estromais (MSC) são células multipotentes presentes em diversos tecidos de origem mesodermal, incluindo as membranas fetais. Estas células expressam níveis detectáveis de alguns dos principais genes reguladores presentes nas células tronco embrionárias (CTE) e também apresentam uma expressão aumentada de KLF4, um dos fatores de transcrição clássicos utilizados na geração de iPS, sendo portanto, fortes candidatas a geração de células reprogramadas (PICANÇO-CASTRO et al., 2011).

Sendo assim, o presente trabalho comparou a eficiência de reprogramação entre fibroblastos e células mesenquimais do cordão umbilical de equino. Os resultados mostraram que, para ambos os tipos celulares, a metodologia de transdução com lentivírus EF1 α -human STEMCCA (OKSM) (Millipore, SCR544) que contém os fatores de transcrição OCT-4, SOX-2, c-MYC e KLF-4 foi eficiente. O início da formação de colônias de células semelhantes à iPS foi observado após 6 dias da transdução quando células do CU foram usadas e 7 dias quando utilizou-se fibroblastos. Estes resultados estão de acordo com o observado por Panopoulos et al (2011) que testaram a reprogramação de vários lotes de células endoteliais de veia umbilical humana (HUVEC), com aparecimento inicial das colônias no dia 6 dia de cultivo.

Saito, et al (2002) descreveram a dissecação da massa celular interna de blastocistos equinos com 6 a 7 dias e cultivo em meio de cultivo DMEM com SFB. As células-tronco obtidas foram cultivadas em placa contendo FEM, sem a presença de LIF, e foi possível a manutenção *in vitro* da cultura estabilizada por mais que 56 passagens. Estas células foram

marcadas para os genes indicativos de indiferenciação: OCT-4, STAT-3, SSEA-1 e também para fosfatase alcalina.

Embora no cultivo primário, as colônias de iPS obtidas a partir de fibroblastos tenham tido um crescimento mais lento (30 dias, em comparação com 15 dias para células de CU), após a primeira passagem, a multiplicação das colônias de ambos os grupos se igualou (ao redor de 15 dias). Por outro lado, o número de colônias contadas em placas onde a transdução foi realizada utilizando células do cordão umbilical equino (90/ placa) foi maior em comparação com o uso de fibroblastos de pele (81/placa). Este resultado indica que as células-tronco mesenquimais podem ser reprogramadas mais rapidamente e/ou com maior eficiência em comparação a outros tipos celulares mais especializados. Esta característica tem sido atribuída, em grande parte, a expressão endógena aumentada dos genes de pluripotência e a um padrão epigenético particular em comparação com uma célula diferenciada, (ZHENG et al., 2009).

Sabidamente as células pluripotentes apresentam algumas características que indicam tratar-se de uma célula indiferenciada como: a atividade de fosfatase alcalina, presença do fator de transcrição OCT-4, alta atividade da telomerase e uma variedade de marcadores celulares reconhecidos por anticorpos monoclonais nos antígenos estágio-específicos embrionários (DONAVAM et al. 2001).

Atualmente, os critérios mais comuns de seleção para a caracterização das células-tronco embrionárias humanas e murinas são a presença de fenótipo típico, que essencialmente é descrito pela razão núcleo/citoplasma alta; o padrão de expressão de marcadores de superfície e intracelulares (ex. Ssea-1, Ssea-3/4, Tra-1-60, Tra-1-81, Nanog, Oct-4); alta atividade de telomerase e pluripotência in vitro e in vivo (SIDHU e TUCH, 2006). Em animais domésticos, porém, tais critérios ainda não são muito elucidados. Apesar de relatos de isolamento de colônias de células obtidas da massa celular interna de blastocistos que

correspondem a alguns dos critérios requeridos para as células humanas e murinas, o isolamento e cultivo destas células-tronco diferem das características apresentadas acima e também entre si (GJORRET; MADDOX-HYTTEL, 2005; WANG et al., 2005; PANT; KEEFER, 2009).

Os marcadores de pluripotência utilizados no presente experimento são reativos para humanos, ratos e camundongos, e devido à falta de marcadores específicos para a espécie equina, foram utilizados na possibilidade de ocorrência de reação cruzada (PARIS et al, 2010). Através do uso de duas técnicas (imunofluorescência e citometria de fluxo), evidenciamos que as células reprogramadas da matriz do cordão umbilical e fibroblastos reprogramados expressaram pelo menos 4 marcadores específicos para pluripotência dos 5 aos que foram submetidos, indicando padrão pluripotente.

Além disso, tanto as células reprogramadas do cordão umbilical equino como os fibroblastos adultos reprogramados apresentaram alta atividade da fosfatase alcalina. Adicionalmente, as colônias de células iPS geradas apresentaram aspecto semelhantes às de células obtidas da massa celular interna de blastocistos equinos, conforme descrito por Lima-Neto (2010).

No entanto, o padrão de expressão dos marcadores diferiu tanto entre os tipos de células, como entre as metodologias utilizadas. A expressão de Oct-4 foi observada em todas as amostras, tanto através da imunofluorescência, como da citometria de fluxo. Isso já era esperado, uma vez que este fator está contido no vetor utilizado. Por outro lado, a presença do Sox-2 foi observada nas células reprogramadas do cordão umbilical equino somente através da imunofluorescência e nos fibroblastos reprogramados, somente através da citometria de fluxo. Estas diferenças podem estar relacionadas a não especificidade dos anticorpos utilizados.

A marcação observada nas colônias através da técnica de imunofluorescência foi bastante evidente, diferenciando com clareza as células reprogramadas dos fibroblastos murinos da camada de sustentação. Por outro lado, na citometria de fluxo foi observada marcação positiva, mas em uma porcentagem reduzida de células (próxima de 11 a 12% para a maioria dos marcadores). Este resultado, provavelmente está associado ao fato de que na citometria foram contadas 8 a 10 mil células advindas de uma população mista contendo células reprogramadas e também fibroblastos murinos.

Além do Oct-4 e do Sox-2 foi observada marcação positiva também para NANOG em ambos os tipos celulares que sofreram reprogramação. O NANOG é um fator específico endógeno, uma vez que o vetor STEMCCA não contém este cDNA. Dessa forma, é possível afirmar que o NANOG pode ser considerado um repórter de pluripotência, uma vez que sua expressão foi ativada e encontrou-se presente em células cultivadas por várias passagens.

O OCT-4, SOX-2 e NANOG, são fatores-chave da rede auto-regulatória transcricional da pluripotência em células-tronco embrionárias (CTE), e nossos resultados com células reprogramadas demonstraram expressão desejável destes fatores. JAENISH & YOUNG (2008) observaram que a expressão de Sox- manteve um padrão similar à expressão de Nanog quando colônias de iPS foram comparadas entre si, sugerindo que a regulação gênica de ambos deve estar intrinsicamente relacionada.

Estudos têm demonstrado que o Sox-2 forma um complexo com o Oct-4, o qual ativa a transcrição de numerosos genes relacionados à condição pluripotente das células-tronco embrionárias, dentre eles o NANOG (KURODA et al., 2005; RODDA et al., 2005), que se autorregula e também regula positivamente outros genes, proporcionando a manutenção da condição pluripotente destas células (BOYER et al., 2005;).

A glicoproteína de alto peso molecular, Tra-1-60 também foi expressa pelas células reprogramadas nos dois grupos. A Tra-1-60 é uma proteína de superfície envolvida na

regulação celular durante a embriogênese e oncogenes, sendo um marcador importante de células pluripotentes como as células-tronco de carcinoma embrionário humano, células germinativas embrionárias e células-tronco embrionárias humanas (VRANA et al., 2003).

Além de atuarem de forma autoregulatória, os fatores de indução da pluripotência reprimem a expressão de genes reguladores do desenvolvimento que levam à diferenciação. Da mesma forma, co-regulam positivamente a expressão de genes envolvidos na autorrenovação e pluripotência (BOYER et al., 2005). Esses genes são desativados à medida que se inicia a diferenciação das linhagens de células que constituirão os tecidos adultos (ZAGO, 2006).

É conhecido que fibroblastos da monocamada de sustentação secretam promotores da manutenção do estado indiferenciado como o fator de crescimento de fibroblasto (FGF), fator transformador de crescimento β (TGF β), activinas, proteínas e antagonistas da sinalização de proteínas morfogenéticas ósseas (BMP) que promovem a manutenção do estado indiferenciado (WANG et al., 2005).

Pedersen (2002) relata o LIF (Leukemia inhibitory factor) como sendo um fator liberado por fibroblastos embrionários murinos, cujo efeito consiste em ativar o fator STAT 3 indispensável para a continuação da multiplicação de células indiferenciadas (NIWA et al., 1998). A ativação de STAT 3 é essencial para a manutenção da pluripotência, mesmo sem a presença de LIF (MATSUDA et al., 1999). Possivelmente os fatores de transcrição OCT- 4 e STAT-3 interagem afetando a função dos mesmos genes (NIWA et al., 2000).

Matsuda et al (1999) estudaram um amplo perfil da expressão gênica em CTE murinas induzidas à diferenciação por meio da retirada do LIF a fim de identificar genes cuja alteração da expressão estivesse relacionada com a perda da pluripotência, porém em nosso trabalho a retirada do LIF e do bFGF não levou a perda da pluripotência nas colônias iPS. Após a retirada da LIF e do bFGF do cultivo, as colônias de células reprogramadas não apresentavam

mudança de morfologia, nem tão pouco marcação pelos anticorpos α -fetoproteína, troponina cardíaca-I e β -III-tubulina indicando que a retirada destes fatores não foi suficiente para induzir a diferenciação espontânea das células cultivadas.

Por outro lado, nos ensaios de diferenciação induzida, a ausência de LIF e bFGF associada a remoção da FEM levou a produção eficiente de corpos embrióides que expressaram marcadores dos 3 folhetos germinativos, corroborando com os achados de Woltjen et al e Sommer et al (2009) que estudaram a reprogramação de fibroblastos fetais humanos e equinos, respectivamente, indicando que as linhagem reprogramadas podem ser induzidas a diferenciarem-se em tecidos.

Para produção dos corpos embrióides foram utilizadas duas metodologias, o cultivo em suspensão na placa e o cultivo em gotas suspensas. Embora a produção de corpos embrióides tenha sido eficiente com ambas as metodologias, o cultivo em placas originou um maior número de estruturas, talvez pelo maior volume em cultivo.

As análises quantitativas de PCR em tempo real demonstraram que os genes estudados de pluripotência estavam expressos somente nas linhagens reprogramadas, originadas de fibroblastos adultos. Por outro lado as células do cordão umbilical apresentaram uma expressão baixa dos genes inseridos, mas em quantidades muito menores, do que o observado nas amostras reprogramadas. Estes resultados indicam que o vetor STEMCCA foi realmente o responsável pela entrega do RNA que conferiu pluripotencialidade às células. Sommer et al (2010) também utilizaram o vetor STEMCCA para gerar iPS humanas e por PCR em tempo real encontraram expressão dos genes Ssea-1 e Sox-2, marcação positiva para fosfatase alcalina e para uma variedade de marcadores de células-tronco pluripotentes.

Dessa forma, o sistema de reprogramação mediado por transdução lentiviral utilizado neste trabalho pode ser considerado um sistema confiável, eficiente e reproduzível na geração de iPS, que seriam transcricionalmente mais próximas as CTE (CHIN et al., 2010). Neste caso

o comportamento das células reprogramadas em cultivo pode ter seguido o de CTE-like, descrito por Saito et al. (2002).

Por outro lado, Nagy et al(2011) relataram o sucesso da geração de células iPS equina por meio do sistema de transposon Piggybac, porém como fonte utilizaram fibroblastos fetais de equinos, diferentemente do presente trabalho, que utilizou fibroblastos adultos. Talvez a idade celular seja a explicação por não ter sido possível reprogramar os fibroblastos. Teoricamente uma célula somática adulta já se encontra com um padrão estabelecido de sua linhagem, e uma células somática fetal é mais passível de ser modificada (TAKAHASHI e YAMANAKA, 2013).

No presente trabalho não foi possível responder se a eficiência de reprogramação é mais alta por meio dos plasmídeos virais ou por transposons, já que não houve sucesso na reprogramação das células utilizando transposons devido ao baixo número de tentativas realizadas, frente à impossibilidade de replicação do transposon.

O acesso às linhagens de iPS equina não só é de grande valor para a medicina veterinária, mas também abrem possibilidades para usar o cavalo como um modelo pré-clínico excelente para terapias futuras baseadas em células-tronco humanas. Relatamos a derivação bem sucedida de células iPS a partir de fibroblastos adultos e de células do cordão umbilical equino. No entanto, a caracterização desta linhagem representou um desafio significativo principalmente devido à falta de anticorpos específicos de pluripotência equina o que nos limitou a utilizar marcadores contra rato, humanos ou coelho e, que após testes pilotos, demonstraram reagir de forma cruzada com os epítomos de equinos correspondentes. Apesar disso, foi possível determinar que as linhagens de iPS obtidas exibem um fenótipo pluripotente com base na expressão de marcadores-chave, na atividade da fosfatase alcalina, na formação de corpos embrióides representando todas as três camadas germinais embrionárias, e na expressão quantitativa dos genes repórteres.

CONCLUSÃO

CONCLUSÃO

As linhagens de iPS obtidas tanto de células da matriz do cordão umbilical quanto de fibroblastos equinos por meio da inserção de um vetor policistrônico carreando os quatro fatores clássicos de pluripotência apresentaram características de células pluripotentes, com morfologia característica de colônias de CTE-like, alta expressão de fosfatase alcalina e de fatores típicos de células pluripotentes humanas e murinas.

Apesar do sistema lentiviral para reprogramação ser considerado genomicamente integrativo, possui características importantes como capacidade de transferir grande inserto exógeno nas células-alvo e transformá-las geneticamente, apresentar baixa imunogenicidade além de fácil manipulação. Tais atributos contribuíram para o sucesso da geração de células reprogramadas nesse trabalho, ao contrário do sistema de reprogramação mediado por transposons, que apesar de não integrativo, não se mostrou efetivo nem eficiente.

A diferenciação das colônias nos 3 tecidos embrionários não foi obtida somente com a retirada da LIF e bFGF, mas foi também necessário a remoção da camada de sustentação para que houvesse o início da diferenciação nas 3 linhagens embrionárias.

Dessa forma, o presente trabalho trouxe grande contribuição ao conhecimento sobre reprogramação celular uma vez que é pioneiro na utilização de células mesenquimais extraídas do cordão umbilical para produção de iPS equinas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVAREZ, C.V.; GARCIA-LAVANDEIRA, M.; GARCIA-RENDUELES, M.E.; DIAZ-RODRIGUEZ, E.; GARCIA-RENDUELES, A.R.; PEREZ-ROMERO, S.; VILA, T.V.; RODRIGUES, J.S.; LEAR, P.V.; BRAVO, S.B. Defining stem cell types: understanding the therapeutic potential of ESCs, ASCs, and iPS cells. *J Mol Endocrinol*, 30; 49(2):R89-111, 2012.
- AOI, T., et al. Generation of pluripotent stem cells from adult mouse liver and stomach cells. *Science*, 321(5889): p. 699-702, 2008.
- BAO, L.; HE, L.; CHEN, J.; WU, Z.; LIAO, J.; RAO, L.; REN, J.; LI, H.; ZHU, H.; QIAN, L.; GU, Y.; DAI, H.; XU, X.; ZHOU, J.; WANG, W.; CUI, C.; XIAO, L. Reprogramming of ovine adult fibroblasts to pluripotency via drug-inducible expression of defined factors. *Cell Res*. 21(4):600-8, 2011.
- BAUDIN, B.; BRUNEEL, A.; BOSSELUT, N.; VAUBOURDOLLE, M. A protocol for isolation and culture of human umbilical vein endothelial cells. *Nat Protoc*. 2:481-485, 2007.
- BELAY, E.; DASTIDAR, S.; VANDENDRIESSCHE, T.; CHUAH, M.K. Transposon-mediated gene transfer into adult and induced pluripotent stem cells. *Curr Gene Ther*. v.11(5), p.406-13, 2011.
- BELLIN, M. et al. Induced pluripotent stem cell: the new patient? *Nature reviews. Molecular Cell Biology*, v. 13, p. 713-726, 2012.
- BOYER, L., MATHUR, D. & JAENISCH, R. 2006. Molecular control of pluripotency. *Curr Opin Genet Dev*, 16: p. 455-62.
- BUGANIM, Y. et al. Single-cell expression analyses during cellular reprogramming reveal an early stochastic and a late hierarchic phase. *Cell [S.I.]*, v. 150, n. 6, p. 1209-22, 2012.
- CAO, H.; YANG, P.; PU, Y.; SUN, X.; YIN, H.; ZHANG, Y.; ZHANG, Y.; LI, Y.; LIU, Y.; FANG, F.; ZHANG, Z.; TAO, Y.; ZHANG, X. Characterization of Bovine Induced Pluripotent Stem Cells by Lentiviral Transduction of Reprogramming Factor Fusion Proteins. *Int J Biol Sci*. v.8(4), p. 498-511, 2012.
- CHIN, M.H., PELLEGRINI, M., PLATH, K., LOWRY, W.E. 2010. Molecular analyses of human induced pluripotent stem cells and embryonic stem cells. *Cell Stem Cell*, 7(2): p. 263-9, 2010.
- CORRADETTI, B.; MEUCCI, A.; BIZZARO, D.; CREMONESI, F.; LANGE CONSIGLIO, A. Mesenchymal stem cells from amnion and amniotic fluid in the bovine. *Reproduction*, 145(4):391-400, 2013.
- COWAN, C. A. et al. Nuclear reprogramming of somatic cells after fusion with human embryonic stem cells. *Science [S.I.]*, v. 309, n. 5739, p. 1369-73, 2005.
- CREMONESI, F.; CORRADETTE, B.; LANGE CONSIGLIO A. Fetal adnexa derived stem cells from domestic animal: progress and perspectives. *Theriogenology* v.75, p.1400-15, 2011.
- DIMOS, J.T.; RODOLFA, K.T.; NIAKAN, K.K.; WEISENTHAL, L.M.; MITSUMOTO, H.; CHUNG, W.; CROFT, G.F.; SAPHIER, G.; LEIBEL, R.; GOLAND, R.; WICHTERLE, H.; HENDERSON, C.E.; EGGAN, K. Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons. *Science*, 321(5893): p. 1218-21, 2008.
- DONOVAN, J.P.; GEARHART, J. The end of the beginning for pluripotent stem cells. *Nature*, v. 414, p. 399-405, 2001.
- EBERT, A.D.; YU, J.; ROSE, F.F.Jr; MATTIS, V.B.; LORSON, C.L.; THOMSON, J.A.; SVENDSEN, C.N. Induced pluripotent stem cells from a spinal muscular atrophy patient. *Nature*, 457: p. 277-80, 2009.

EGLI, D.; G. BIRKHOFF, et al. Mediators of reprogramming: transcription factors and transitions through mitosis." *Nature reviews. Molecular cell biology* 9(7): 505-516, 2008.

EL-KARIM, E.; E. HAGOS, et al. Krüppel-like factor 4 regulates genetic stability in mouse embryonic fibroblasts. *Molecular cancer* 12: 89, 2013.

GJORRET J.O.; MADDOX-HYTTEL, P. Attempts towards derivation and establishment of bovine embryonic stem cell-like cultures. *Reprod Fertil Dev.* 2005;17(1-2):113-24. Review.

GONZÁLEZ F, B. S.; BELMONTE JCI. Methods for making induced pluripotent stem cells: reprogramming à la carte. *NA TURE REVIEWS GENETICS [S.I.]*, v. 12, n. 4, p.231–242, 2011.

GUCCIARDO, L.; LORIES, R.; OCHSENBEIRI-KÖLBLE, N.; DONE, E.; ZWIJSEN, A.; DEPREST, J. Fetal mesenchymal stem cells: isolation, properties and potencial use in perinatology and regenerative medicine. *Int J Obstet Gynaecol.* 16:166-72, 2008.

GUEST, D.J.; ALLEN, W.R. Expression of cell-surface antigens and embryonic stem cell pluripotency genes in equine blastocysts. *Stem Cells Dev.*16(5):789–96, 2007.

HALL, V. Porcine embryonic stem cells: a possible source for cell replacement therapy. *Stem Cell Rev.* 2008 Dec;4(4):275-82.

HANNA, J.; WERNIG, M.; MARKOULAKI, S.; SUN, C.W.; MEISSNER, A.; CASSADY, J.P.; BEARD, C.; BRAMBRINK, T.; WU, L.C.; TOWNES, T.M.; JAENISCH, R. Treatment of sickle cell anemia mouse model with iPS cells generated from autologous skin. *Science*, 318: p. 1920-3, 2007.

HANSSON, J. et al. Highly coordinated proteome dynamics during reprogramming of somatic cells to pluripotency. *Cell Rep [S.I.]*, v. 2, n. 6, p. 1579-92, 2012.

HENTZE, H. et al. Teratoma formation by human embryonic stem cells: Evaluation of essential parameters for future safety studies. *Stem Cell Res [S.I.]*, 2009.

HOTTA, A. & ELLIS, J. Retroviral vector silencing during iPS cell induction: an epigenetic beacon that signals distinct pluripotent states. *J Cell Biochem.*, 105: p. 940-8, 2008.

HUANGFU, D.; OSAFUNE, K.; MAEHR, R.; GUO, W.; EIJKELENBOOM, A.; CHEN, S.; MUHLESTEIN, W. & MELTON, D. Induction of pluripotent stem cells from primary human fibroblasts with only Oct3/4 and SOX2. *Nat Biotechnol.*, 26: p. 1269-75, 2008.

ITZHAKI, I.; MAIZELS, L.; HUBER, I.; ZWI-DANTSIS, L.; CASPI, O.; WINTERSTERN, A.; FELDMAN, O.; GEPSTEIN, A.; ARBEL, G.; HAMMERMAN, H.; BOULOS, M.; GEPSTEIN, L. Modelling the long QT syndrome with induced pluripotent stem cells. *Nature*, 471: p. 225-9, 2011.

IVANOVA, N. et al. Dissecting self-renewal in stem cells with RNA interference. *Nature [S.I.]*, v. 442, n. 7102, p. 533-8, 2006.

JAENISCH, R.; YOUNG, R. Stem cells, the molecular circuitry of pluripotency and nuclear reprogramming. *Cell [S.I.]*, v. 132, n. 4, p. 567-82, 2008.

JANG, J.; KANG, H.C.; KIM, H.S.; KIM, J.Y.; HUH, Y.J.; KIM, D.S.; YOO, J.E.; LEE, J.A.; LIM, B.; LEE, J.; YOON, T.M.; PARK, I.H.; HWANG, D.Y.; DALEY, G.Q.; KIM, D.W. Induced pluripotent stem cell models from X-linked adrenoleukodystrophy patients. *Ann Neurol*, 70: p. 402-9, 2011.

KEARSE, M.; MOIR, R.; WILSON, A.; STONES-HAVAS, S.; CHEUNG, M.; STURROCK, S.; BUXTON, S.; COOPER, A.; MARKOWITZ, S.; DURAN, C.; THIERER, T.; ASHTON, B.; MENTJIES, P., & DRUMMOND,

- A. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, 28(12), 1647-1649, 2012.
- KERR, C. L.; GEARHART, J. D.; ELLIOTT, A. M.; DONOVAN, P. J. Embryonic germ cells: when germ cells become stem cells. *Semin. Reprod. Med.* 24, 304–313, 2006.
- KIM, A.; PYYKKO, I. Size matters: versatile use of PiggyBac transposons as a genetic manipulation tool. *Molecular and cellular biochemistry* 354(1-2): 301-309, 2011.
- KIM, B.M.; THEIR, M.C.; OH, S.; SHERWOOD, R.; KANELLOPOULOU, C.; EDENHOFER, F.; CHOI, M.Y. MicroRNAs Are Indispensable for Reprogramming Mouse Embryonic Fibroblasts into Induced Stem Cell-Like Cells. *PLoS One*, 7(6), e39239, 2012.
- KIM, J.B.; ZAEHRES, H.; WU, G.; GENTILE, L.; KO, K.; SEBASTIANO, V.; ARAÚZOBRAVO, M.J.; RUAU, D.; HAN, D.W.; ZENKE, M. & SCHÖLER, H.R. Pluripotent stem cells induced from adult neural stem cells by reprogramming with two factors. *Nature*, 454: p. 646-50, 2008.
- KOCH, T.G.; HEERKENS, T.; THOMSEN, P.D.; BETTS, D.H. Isolation of mesenchymal stem cells from equine umbilical cord blood. *BMC Biotechnol*, 30;7:26, 2007.
- KU, S.; SORAGNI, E.; CAMPAU, E.; THOMAS, E.A.; ALTUN, G.; LAURENT, L.C.; LORING, J.F.; NAPIERALA, M.; GOTTESFELD, J.M. Friedreich's ataxia induced pluripotent stem cells model intergenerational GAA-TTC triplet repeat instability. *Cell Stem Cell*, 7: p. 631-7, 2010.
- KURODA, T.; TADA, M.; KUBOTA, H.; KIMURA, H.; HATANO, S.; SUEMORI, H.; NAKATSUJI, N.; TADA, T. Octamer and Sox elements are required for transcriptional cis regulation of Nanog gene expression. *Mol Cell Biol*, 25: p. 2475-85, 2005.
- KWON, H.S.; OH, H.J.; LEE, D.H.; KIM, D.E; KANG, S.K.; LEE, B.C. 285 generation of canine induced pluripotent stem cells from canine fetal fibroblast and adult fibroblast of cloned dog. *Reprod Fertil Dev*. 25(1):290, 2012.
- LEE, K.S.; NAH, J.J.; LEE, B.C.; LEE, H.T.; LEE, H.S.; SO, B.J.; CHA, S.H. Maintenance and characterization of multipotent mesenchymal stem cells isolated from canine umbilical cord matrix by collagenase digestion. *Res Vet Sci*, 94(1):144-51, 2013.
- LEWITZKY, M.; YAMANAKA, S. 2007. Reprogramming somatic cells towards pluripotency by defined factors. *Curr Opin Biotechnol*, 18: p. 467-73, 2007.
- LI, M.A.; PETTITT, S.J.; ECKERT, S.; NING, Z.; RICE, S.; CADIÑANOS, J.; YUSA, K.; CONTE, N.; BRADLEY, A. The piggyBac transposon displays local and distant reintegration preferences and can cause mutations at noncanonical integration sites. *Mol Cell Biol*. 33(7):1317-30, 2013.
- LIMA-NETO, J.F.; FERNANDES, C.B.; ALVARENGA, M.A.; GOLIM, M.A.; LANDIM-ALVARENGA, F.C. Viability and cell cycle analysis of equine fibroblasts cultured in vitro. *Cell Tissue Bank*. 11(3):261-8, 2010.
- LIU, G.H.; BARKHO, B.Z.; RUIZ, S.; DIEP, D.; QU, J.; YANG, S.L; PANOPOULOS, A.D.; SUZUKI, K.; KURIAN, L.; WALSH, C.; THOMPSON, J.; BOUE, S.; FUNG, H.L.; SANCHO-MARTINEZ, I.; ZHANG, K.; YATES, J.; IZPISUA-BELMONTE, J.C. Recapitulation of premature ageing with iPSCs from Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Nature*, 472: p. 221-5, 2011.
- LIU, S.V. iPS cells: a more critical review. *Stem Cells Dev*. V.17(3), p.391-7. Review. 2008.

LOWRY, W.; RICHTER, L.; YACHECHKO, R.; PYLE, A.; TCHIEU, J.; SRIDHARAN, R.; CLARK, A. & PLATH, K. Generation of human induced pluripotent stem cells from dermal fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105: p. 2883-8, 2008.

MAHERALI, N. et al. Directly reprogrammed fibroblasts show global epigenetic remodeling and widespread tissue contribution. *Cell Stem Cell [S.I.]*, v. 1, n. 1, p. 55-70, 2007.

MARCHETTO, M.C.; CARROMEU, C.; ACAB, A.; YU, D.; YEO, G.W.; MU, Y.; CHEN, G.; GAGE, F.H.; MUOTRI, A.R. A model for neural development and treatment of Rett syndrome using human induced pluripotent stem cells. *Cell*, 143: p. 527-39, 2010.

MARTIN, G. R. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A [S.I.]*, v. 78, n. 12, p. 7634-8, 1981.

MATSUDA, T.; NAKAMURA, T.; NAKAO, K.; ARAI, T.; KATSUKI, M.; HEIKE, T.; YOKOTA, T. STAT 3 activation is sufficient to maintain an undifferentiated state of mouse embryonic stem cells. *European Molecular Biology Organization Journal*, v. 18, p. 4261-4269, 1999.

MERMER, B.; COLB, M.; KRONTIRIS, T.G. A family of short, interspersed repeats is associated with tandemly repetitive DNA in the human genome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 84(10):3320–3324, 1987.

NAGY, K.; SUNG, H.K.; ZHANG, P.; LAFLAMME, S.; VINCENT, P.; AGHA-MOHAMMADI, S.; WOLTJEN, K.; MONETTI, C.; MICHAEL, I.P.; SMITH, L.C.; NAGY, A. Induced pluripotent stem cell lines derived from equine fibroblasts. *Stem Cell Rev*, 8(2):546, 2012.

NAKAGAWA, M.; KOYANAGI, M.; TANABE, K.; TAKAHASHI, K.; ICHISAKA, T.; AOI, T.; OKITA, K.; MOCHIDUKI, Y.; TAKIZAWA, N. & YAMANAKA, S. Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nat Biotechnol.*, 26: p. 101-6, 2008.

NGUYEN, H.N.; BYERS, B.; CORD, B.; SHCHEGLOVITOV, A.; BYRNE, J.; GUJAR, P.; KEE, K.; SCHULE, B.; DOLMETSCH, R.E.; LANGSTON, W.; PALMER, T.D.; PERA, R.R. LRRK2 mutant iPSC-derived neurons demonstrate increased susceptibility to oxidative stress. *Cell Stem Cell*, 8: p. 267-80, 2011.

NIWA, H., MIYAZAKI, J., AND SMITH, A.G.. Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nature Genetics*. 24, 372–376, 2000.

OKITA, K.; ICHISAKA, T. & YAMANAKA, S. 2007. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature*, 448: p. 313-7, 2007.

OKITA, K.; NAKAGAWA, M.; HYENJONG, H.; ICHISAKA, T. & YAMANAKA, S. Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors. *Science*, 322: p.949-53, 2008.

PANOPOULOS, A.D.; RUIZ, S.; YI, F.; HERRERÍAS, A.; BATCHELDER, E.M.; IZPISUA BELMONTE, J.C. Rapid and highly efficient generation of induced pluripotent stem cells from human umbilical vein endothelial cells. *PLoS One*. 6(5):e19743, 2011.

PANT, D.; KEEFER, C.L. Expression of pluripotency-related genes during bovine inner cell mass explant culture. *Cloning Stem Cells*. 2009 Sep;11(3):355-65.

PARIS, D.B.; STOUT, T.A. Equine embryos and embryonic stem cells: defining reliable markers of pluripotency. *Theriogenology*. 74:516–524, 2010.

PARK, I.H.; ARORA, N.; HUO, H.; MAHERALI, N.; AHFELDT, T.; SHIMAMURA, A.; LENSCH, M.W.; COWAN, C.; HOCHEDLINGER, K. & DALEY, G.Q. Disease-Specific Induced Pluripotent Stem Cells. *Cell*, 134 (5): p. 877-86, 2008.

PATEL, M.; YANG, S. Advances in reprogramming somatic cells to induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Rev.* 6(3): 367–380, 2010.

PEDERSEN, R.A. Feeding hungry stem cells. *Nature*, v. 20, p. 882-883, 2002.

PICANÇO-CASTRO, V.; RUSSO-CARBOLANTE, E.M.S.; REIS, L.C.J.; FRAGA, A.M.; DE MAGALHÃES, D.A.R.; ORELLANA, M.D.; PANEPUCCI, R.A.; PEREIRA, L.V. & COVAS, D.T. Pluripotent Reprogramming of Fibroblasts by Lentiviral-mediated Insertion of SOX2, C-MYC, and TCL-1A. *Stem Cells And Development*, 20: p. 169-80, 2011.

PFAFFL, M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.*1;29(9):e45, 2001.

POLO, J. M. et al. A molecular roadmap of reprogramming somatic cells into iPS cells. *Cell [S.I.]*, v. 151, n. 7, p. 1617-32, 2012.

RAIS, Y., A.; ZVIRAN, et al. Deterministic direct reprogramming of somatic cells to pluripotency. *Nature*, 502, 65–70, 2013.

RASHID, S.T.; CORBINEAU, S.; HANNAN, N.; MRCINIAK, S.J.; MIRANDA, E.; ALEXANDER, G.; HUANG-DORAN, I.; GRIFFIN, J.; AHRLUND-RICHTER, L.; SKEPPER, J.; SEMPLE, R.; WEBER, A.; LOMAS, D.A.; VALLIER, L. Modeling inherited metabolic disorders of the liver using human induced pluripotent stem cells. *J Clin Invest*, 120: p. 3127-36, 2010.

REN, J.; PAK, Y.; HE, L.; QIAN, L.; GU, Y.; LI, H.; RAO, L.; LIAO, J.; CUI, C.; XU, X.; ZHOU, J.; RI, H.; XIAO, L. Generation of hircine-induced pluripotent stem cells by somatic cell reprogramming. *Cell Res.* 21(5): 849–853, 2011.

ROBERTS, R.M.; TELUGU, B.P.; EZASHI, T. Induced pluripotent stem cells from swine (*Sus scrofa*): why they may prove to be important. *Cell Cycle*. 1;8(19):3078-81, 2009.

RODDA, D.; CHEW, J.; LIM, L.; LOH, Y.; WANG, B.; NG, H.; ROBSON, P. 2005. Transcriptional regulation of nanog by OCT3/4 and SOX2. *J Biol Chem*, 280: p. 24731-7.

SAITO, S.; UGAI, H.; SAWAI, K.; YAMAMOTO, Y. Isolation of embryonic stem like cells from equine blastocysts and their differentiation in vitro. *FEEBS Letters*, v.531, p. 389-396, 2002.

SAITO, S.; YOKOYAMA, K.; TAMAGAWA, T; ISHIWATA, I. Derivation and induction of the differentiation of animal ES cells as well as human pluripotent stem cells derived from fetal membrane. *Hum Cell*. 18(3):135 - 141, 2005.

SANCHO-MARTINEZ I, B. J. Surf the waves of reprogramming. *Nature [S.I.]*, v. 493, n. 17, p. 310, 2013.

SCHEPER, W. & COPRAY, S. The molecular mechanism of induced pluripotency: a two-stage switch. *Stem Cell Rev*, 5: p. 204-23, 2009.

SHI, Y.; DESPONTS, C.; DO, J.; HAHM, H.; SCHÖLER, H. & DING, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic fibroblasts by Oct3/4 and Klf4 with small molecule compounds. *Cell Stem Cell*, 3: p. 568-74, 2008.

SIDHU, K. S.; TUCH, B. E. Derivation of three clones from human embryonic stem cell lines by FACS sorting and their characterization. *Stem Cells Dev.*;15(1):61-9, 2006.

SOLDNER, F.; HOCKEMEYER, D.; BEARD, C.; GAO, Q.; BELL, G.W.; COOK, E.G.; HARGUS, G.; BLAK, A.; COOPER, O.; MITALIPOVA, M.; ISACSON, O.; JAENISCH, R. Parkinson's disease patient-derived induced pluripotent stem cells free of viral reprogramming factors. *Cell*, 136(5): p. 964-977, 2009.

SOMMER, C. A. et al. Induced pluripotent stem cell generation using a single lentiviral stem cell cassette. *Stem Cells* [S.I.], 27(3), p. 543-9, 2009.

SOMMER, C.A.; SOMMER, A.G.; LONGMIRE, T.A.; CHRISTODOULOU, C.; THOMAS, D.D.; GOSTISSA, M.; ALT, F.W.; MURPHY, G.J.; KOTTON, D.N.; MOSTOSLAVSKY, G. Excision of Reprogramming Transgenes Improves the Differentiation Potential of iPS Cells Generated with a Single Excisable Vector. *Stem Cells*. 28(1): 64–74, 2010.

SUGITA, S.; IWASAKI, Y.; MAKABE, K.; KAMAO, H.; MANDAI, M.; SHIINA, T.; OGASAWARA, K.; HIRAMI, Y.; KURIMOTO, Y.; TAKAHASHI, M. Successful Transplantation of Retinal Pigment Epithelial Cells from MHC Homozygote iPSCs in MHC-Matched Models. *Stem Cell Reports*. 2016, 11;7(4):635-648.

TAKAHASHI, K.; TANABE, K.; OHNUKI, M.; NARITA, M.; ICHISAKA, T. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*. 131, 861–872, 2007.

TAKAHASHI, K.; YAMANAKA, S. Induced pluripotent stem cells in medicine and biology. *Development* (Cambridge, England) 140(12): 2457-2461, 2013.

TAKAHASHI, K.; YAMANAKA, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 126 (4), 663–676, 2006.

THOMSON, J. A. et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* [S.I.], v. 282, n. 5391, p. 1145-7, 1998.

TURKSEN, K. "End of inevitability: programming and reprogramming." *Stem cell reviews* 9(4): 385-387, 2013.

VIERBUCHEN, T.; WERNIG, M. Molecular roadblocks for cellular reprogramming. *Molecular cell* 47(6): 827-838, 2012.

VRANA, K.E.; HIPPI, J.D.; GOSS, A.M.; MCCOOL, B.A.; RIDDLE, D.R.; WALKER, S.J.; WETTSTEIN, P.J.; STUDER, L.P.; TABAR, V.; CUNNIFF, K.; CHAPMAN, K.; VILNER, L.; WEST, M.D.; GRANT, K.A.; CIBELLI, J.B. Nonhuman primate parthenogenetic stem cells. *13;101(2):693*, 2003.

WANG, L.; DUAN, E.; SUNG, L.Y.; JEONG, B.S.; YANG, X.; TIAN, X.C. Generation and characterization of pluripotent stem cells from cloned bovine embryos. *Biol Reprod*. 73(1):149-55, 2005.

WANG, W.; LIN, C.; LU, D. et al. Chromosomal transposition of PiggyBac in mouse embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105(27):9290–9295, 2008.

WANG, Y.; MAH, N.; PRIGIONE, A.; WOLFRUM, K.; ANDRADE-NAVARRO, M. & ADJAYE, J. A transcriptional roadmap to the induction of pluripotency in somatic cells. *Stem Cell Rev.*, 6: p. 282-96, 2010.

WATT, F. M.; HOGAN, B. L. Out of Eden: stem cells and their niches. *Science* [S.I.], v. 287, n. 5457, p. 1427-30, 2000.

WERNIG, M. et al. In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. *Nature* [S.I.], v. 448, n. 7151, p. 318-24, 2007.

WERNIG, M.; ZHAO, J.P.; PRUSZAK, J.; HEDLOND, E.; FU, D.; SOLDNER, F.; BROCCOLI, V.; CONSTANTINE-PATON, M.; ISACSON, O.; JAENISCH, R. Neurons derived from reprogrammed fibroblasts functionally integrate into the fetal brain and improve symptoms of rats with Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(15):p. 5856-61, 2008.

WILMUT, I. et al. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* [S.I.], v. 385, n. 6619, p. 810-3, 1997.

WOLTJEN, K.; MICHAEL, I.P.; MOHSENI, P.; DESAI, R.; MILEIKOVSKY, M.; HÄMÄLÄINEN, R.; COWLING, R.; WANG, W.; LIU, P.; GERTSENSTEIN, M.; KAJI, K.; SUNG, H.K.; NAGY, A. PiggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Nature*. 458(7239):766-70, 2009.

XU, D.; ALIPIO, Z.; FINK, L.M.; ADCOCK, D.M.; YANG, J.; WARD, D.C.; MA, Y. Phenotypic correction of murine hemophilia A using an iPS cell-based therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(3): p. 808-13, 2009.

YAMANAKA, S. Pluripotency and nuclear reprogramming. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 363(1500): p. 2079-87, 2008.

YAZAWA, M.; HSUEH, B.; JIA, X.; PASCA, A.M.; BERNSTEIN, J.A.; HALLMAYER, J.; DOLMETSCH, R.E. Using induced pluripotent stem cells to investigate cardiac phenotypes in Timothy syndrome. *Nature*, 471: p. 230-4, 2011.

YU, J.; VODYANIK, M.A.; SMUGA-OTTO, K.; ANTOSIEWICZ-BOURGET, J.; FRANE, J.L. et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 318: 1917–1920, 2007,

ZAGO, M.A.; COVAS, D.T. Células-Tronco: a nova fronteira da medicina. Ed. Atheneu, p. 03-34, 2006.

ZAGO, M.A. 2006. Células-tronco: origens e propriedades. In: COVAS, D.T. & ZAGO, M.A. (eds.) Células-tronco: a nova fronteira da medicina. 1ª ed. São Paulo: Editora Atheneu.

ZHANG, H.T.; FAN, J.; CAI, Y.Q.; ZHAO, S.J.; XUE, S.; LIN, J.H.; JIANG, X.D.; XU, R.X. Human Wharton's jelly cells can be induced to differentiate into growth factor-secreting oligodendrocyte progenitor-like cells. *Differentiation*, 79(1):15-20, 2010.

ZHANG, J.; LIAN, Q.; ZHU, G.; ZHOU, F.; SUI, L.; TAN, C.; MUTALIF, R.A.; NAVASANKARI, R.; ZHANG, Y.; TSE, H.F.; STEWART, C.L.; COLMAN, A. A human iPSC model of Hutchinson Gilford Progeria reveals vascular smooth muscle and mesenchymal stem cell defects. *Cell Stem Cell*, 8: p. 31-45, 2011.

ZHAO, X.Y.; Li, W.; LV, Z.; LIU, L.; TONG, M.; HAI, T.; HAO, J.; GUO, C.L.; MA, Q.W.; WANG, L.; ZENG, F.; ZHOU, Q. . iPS cells produce viable mice through tetraploid complementation. *Nature*, 461(7260): p. 86-90, 2009.

ZHENG, C.; YANG, S.; GUO, Z.; LIAO, W.; ZHANG, L.; YANG, R.; HAN, Z. C. Human multipotent mesenchymal stromal cells from fetal lung expressing pluripotent markers and differentiating into cell types of three germ layers. *Cell Transplant.*, 18: p. 1093-1109, 2009.