

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS DE
JABOTICABAL

EFEITOS DE DIFERENTES TENSÕES DE OXIGÊNIO NA
EFICIÊNCIA DA REPROGRAMAÇÃO E MANUTENÇÃO DE
CÉLULAS-TRONCO PLURIPOTENTES INDUZIDAS DE
EQUINO

Raquel Vasconcelos Guimarães de Castro
Mestre em Medicina Veterinária

2020

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS DE
JABOTICABAL

EFEITOS DE DIFERENTES TENSÕES DE OXIGÊNIO NA
EFICIÊNCIA DA REPROGRAMAÇÃO E MANUTENÇÃO DE
CÉLULAS-TRONCO PLURIPOTENTES INDUZIDAS DE
EQUINO

Raquel Vasconcelos Guimarães de Castro

Orientador: Prof. Dr. Joaquim Mansano Garcia

Coorientadora: Profa. Dra. Fabiana Fernandes Bressan

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária, área: Reprodução Animal

2020

C355e

Castro, Raquel Vasconcelos Guimarães de

Efeitos de diferentes tensões de oxigênio na eficiência da reprogramação e manutenção de células-tronco pluripotentes induzidas de equino / Raquel Vasconcelos Guimarães de Castro. -- Jaboticabal, 2020

102 p. : tabs., fotos

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal

Orientador: Joaquim Mansano Garcia

Coorientadora: Fabiana Fernandes Bressan

1. Células-tronco. 2. Hipóxia. 3. Cavalo. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: EFEITOS DE DIFERENTES TENSÕES DE OXIGÊNIO NA EFICIÊNCIA DA REPROGRAMAÇÃO E MANUTENÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO PLURIPOTENTES INDUZIDAS DE EQUINO

AUTORA: RAQUEL VASCONCELOS GUIMARÃES DE CASTRO

ORIENTADOR: JOAQUIM MANSANO GARCIA

COORIENTADORA: FABIANA FERNANDES BRESSAN

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em MEDICINA VETERINÁRIA, área: Reprodução Animal pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. FABIANA FERNANDES BRESSAN

Departamento de Medicina Veterinária-FZEA/USP / Pirassununga/SP

Fabiana F. Bressan Por videoconferencia

Prof. Dr. AUREO EVANGELISTA SANTANA

Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Fabiana F. Bressan Por videoconferencia

Profa. Dra. MIRELA TINUCCI COSTA

Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / FCAV - UNESP - Jaboticabal

Fabiana F. Bressan Por videoconferencia

Prof. Dr. FLÁVIO VIEIRA MEIRELLES

Departamento de Medicina Veterinária-FZEA/USP / Pirassununga/SP

Fabiana F. Bressan Por videoconferencia

Prof. Dr. LAWRENCE CHARLES SMITH

Faculté de Médecine Vétérinaire-Université de Montreal/UdeM / Montreal-Quebec/Canadá

Jaboticabal, 15 de julho de 2020

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

RAQUEL VASCONCELOS GUIMARÃES DE CASTRO – nascida no município de Barretos, SP, aos 3 dias do mês de setembro de 1988. Concluiu o curso colegial no “Colégio São Carlos”, na cidade de São Carlos, em dezembro de 2005. Ingressou em março de 2007 no curso de graduação em Medicina Veterinária da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, no município de Jaboticabal, SP; foi bolsista junto ao Projeto de Extensão Universitária “Montagem de esqueletos de animais domésticos e silvestres para estudo comparativo”, sob supervisão da professora Dra. Silvana M. Baraldi Artoni, no período de agosto de 2008 até dezembro de 2008. Concluiu, em dezembro de 2011, o curso superior em Medicina Veterinária. Trabalhou na empresa Bio-Biotecnologia Animal de março de 2012 a outubro de 2013. Ingressou, em março de 2014, no programa de Pós-Graduação, ao nível de Mestrado, sob orientação do Prof. Dr. Joaquim Mansano Garcia, no Programa de Medicina Veterinária, Área de Concentração: Reprodução Animal, na FCAV – UNESP de Jaboticabal, com bolsa de mestrado da CAPES, concluindo o mesmo em fevereiro de 2016. Ingressou, em março de 2016, no programa de Pós-Graduação, ao nível de doutorado, sob orientação do Prof. Dr. Joaquim Mansano Garcia, no Programa de Medicina Veterinária, Área de Concentração: Reprodução Animal, na FCAV – UNESP de Jaboticabal, com bolsa de doutorado da FAPESP (#2018/04009-6). Foi contemplada com uma bolsa para estágio em pesquisa pelo programa “Emerging Leaders in Americas”, concedida pelo “Department of Foreign Affairs, Trade and Development (DFATD), Canada”, na “Université de Montréal”, sob supervisão do professor Lawrence C. Smith, com duração de 6 meses, no período de janeiro de 2017 a julho de 2017.

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente a minha família. Aos meus pais Luiz e Ieda, que sempre me incentivaram e, desde cedo, estimularam meu gosto pelo saber e pelas descobertas. Muito obrigada por acreditarem em mim quando eu mesma não acreditei, e por sempre estarem ao meu lado. Aos meus irmãos Rodrigo e Guilherme, por me incentivarem, ensinarem, cuidarem e apoiarem, e a quem nunca faltaram palavras de incentivo. Agradeço também as minhas cunhadas Mariella e Francielle, e às sobrinhas Marina e Helena, por fazerem essa família ainda mais cheia de amor. Sem o suporte e amor de cada um de vocês a realização desse trabalho não teria sido possível.

Agradeço ao meu orientador, professor Joaquim Mansano Garcia, que me acompanhou desde os estágios de graduação. Agradeço muito por tudo o que aprendi com o senhor, foram ensinamentos que não são encontrados em livros, e dos quais sempre me lembrarei. Obrigada por todo o apoio e por permitir que eu desenvolvesse meu trabalho de forma livre. Muito obrigada por tantos anos de orientação.

Agradeço a minha coorientadora, professora Fabiana Fernandes Bressan que teve papel crucial no desenvolvimento desse trabalho. Muito obrigada por abrir as portas de seu laboratório para mim, por me acolher tão bem em Pirassununga, por toda a ajuda, todo o suporte, todas as conversas em tempos de crise e em tempos felizes. Agradeço muito pela oportunidade de trabalhar e integrar sua equipe, por tudo o que aprendi tanto tecnicamente quanto com relação à ciência e à pesquisa.

Agradeço à Universidade Estadual Paulista, especialmente à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal, minha casa acadêmica desde 2007, início de minha graduação em medicina veterinária, e da qual sou filha com muito orgulho. Agradeço especialmente aos professores do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal, meu orientador, professor Joaquim M. Garcia, e as professoras Lindsay Gimenes, Maricy A. Ferreira, e a todos os professores que de alguma forma fizeram parte dessa trajetória. Agradeço também aos funcionários Roberta Vantini e Edson Aguiar por todo o apoio, extremamente necessário para o bom andamento das atividades do departamento.

Agradeço a todos os professores do Laboratório de Morfofisiologia Molecular e Desenvolvimento (LMMD) da FMVZ/USP – Pirassununga: professor Flávio Vieira Meirelles, professor Felipe Perecin, professora Cláudia Leal, professora Fabiana Fernandes Bressan e professor Juliano Silveira por permitirem a utilização do laboratório e de todos os equipamentos e reagentes necessários para a realização desse trabalho, e por todo o apoio científico fornecido. Agradeço também a Cibele Prado, nossa querida técnica científica por toda a ajuda e disposição, sempre pronta a ajudar em tudo. Além deles, agradeço a todos os alunos de pós doutorado, doutorado, mestrado e iniciação científica por toda a ajuda científica, pelos momentos de descontração dentro e fora do laboratório e pela enorme ajuda na realização e interpretação de resultados das técnicas de laboratório que foram essenciais para desenvolver o trabalho, e para meu aprendizado.

Agradeço em especial aos pesquisadores do “LMMD iPSC”, Aline Souza, Laís Pessôa, Naira Pieri, Ramon Botigelli, Lucas M. Simões, Kaiana Recchia, Jéssica B. Cruz, Brendon W. Bessi, Gabriela Barbosa, Amanda S. Jorge, Addy S. A. Mejia e Luana S. Rosa. Agradeço imensamente pela forma que me acolheram quando cheguei ao laboratório, por toda a imensa ajuda nos experimentos, na rotina do laboratório e por toda a amizade, as conversas e a troca de experiências. O convívio, com todos vocês, é muito engrandecedor e sou muito grata por isso.

Agradeço à professora Renata Dória, da FZEA-USP, sua pós-graduanda Bianca Grizendi, e a todos os pós-graduandos de seu laboratório, pela colaboração e pela doação do material biológico necessário.

Agradeço ao Paulo Fantinato-Neto pela enorme ajuda na estatística e gráficos, e pela paciência em me explicar os dados e ajudar-me na interpretação dos mesmos.

Agradeço também aos professores Marcos Chiaratti, da UFSCar, e a professora Marcella Milazzotto, da UFABC, por tão gentilmente me responderem e-mails com dúvidas e me ajudarem a entender e determinar os experimentos para a realização do presente trabalho. O suporte de vocês foi muito importante.

Agradeço muito ao professor Lawrence Charles Smith pelo tempo que pude passar em seu laboratório, pela recepção em Saint Hyacinthe, pelos ensinamentos e

principalmente por todas as conversas sobre ciência, que foram essenciais no desenvolvimento do meu pensamento crítico científico.

Agradeço a Jacinthe Therrien, uma das pessoas mais especiais que conheci no Canadá, e que fez meu tempo de estada lá ainda mais agradável. Agradeço muito por toda a paciência em me explicar todas as técnicas do laboratório, e responder a todas as minhas dúvidas sempre com um lindo sorriso de alegria no rosto. Agradeço por todas as conversas, pela amizade e pelo imenso carinho.

Agradeço imensamente a todos os amigos que acompanharam minhas aflições, comemorações, angústias e participaram, de forma enormemente importante dessa jornada de 4 anos até o término desse doutorado. Cada sorriso, preocupação, cada conversa, cada vez que me escutaram, tudo isso tem um valor inestimável e me ajudou muito a conseguir superar cada desafio encontrado durante essa jornada.

Agradeço às agências de fomento que financiaram o presente trabalho: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo [Fapesp #2018/04009-6, #2015/26818-5, #2013/08135-2 (CEPID-CTC)]; e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Agradeço também ao “Department of Foreign Affairs, Trade and Development (DFATD), Canada”, que me concedeu uma bolsa de estudos pelo programa “Emerging Leaders in Americas”, através do qual foi possível realizar um estágio em pesquisa na “Université de Montréal”.

SUMÁRIO

Certificados Comissão de Ética.....	Erro! Indicador não definido.
RESUMO.....	v
ABSTRACT	vii
Lista de abreviaturas	vii
Lista de Tabelas	viii
Lista de Figuras.....	ix
CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	1
1. Introdução	1
2. Revisão de literatura.....	2
2.1. Células tronco pluripotentes induzidas	2
2.2. Influência do oxigênio no cultivo celular.....	4
2.3. Mudança no metabolismo energético celular durante a reprogramação á pluripotência	7
2.4. Importância do modelo equino.....	9
3. Hipótese	12
4. Objetivos	12
4.1. Objetivo Geral.....	12
4.2. Objetivos Específicos.....	133
CAPÍTULO 2 – AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA AO LONGO DA REPROGRAMAÇÃO DE FIBROBLASTOS EQUINOS EM DIFERENTES TENSÕES DE OXIGÊNIO.....	14
Resumo.....	14
1. Introdução	15
2. Material e métodos	17
2.1. Obtenção dos fibroblastos da pele.....	17
2.2. Produção de partículas lentivirais	18
2.3. Transdução viral	18
2.4. Avaliação da reprogramação à pluripotência.....	19
2.5. RT-qPCR	20
3. Resultados e Discussão	22
3.1. Reprogramação à pluripotência.....	22
3.2. Avaliação por RT-qPCR durante a reprogramação	23

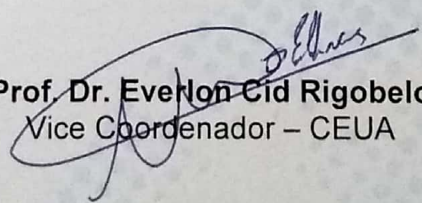
3.2.1.	Avaliação dos genes de pluripotência	23
3.2.2.	Expressão do vetor lentiviral.....	28
3.2.3.	Remodelamento mitocondrial	29
3.2.4.	Mudanças no metabolismo energético da célula.....	31
3.2.5.	Resposta celular à baixa tensão de oxigênio	32
4.	Conclusão	34
CAPÍTULO 3 – GERAÇÃO DE DIFERENTES PERFIS DE CÉLULAS TRONCO PLURIPOTENTES INDUZIDAS DE UM EQUINO IDOSO EM 20% E 5% DE OXIGÊNIO.....		36
	Resumo.....	36
1.	Introdução	37
2.	Material e Métodos	40
2.1.	Isolamento e cultivo de fibroblastos adultos.....	40
2.2.	Tempo de duplicação populacional.....	411
2.3.	Indução da reprogramação celular	41
2.4.	Caracterização das iPSC equinas (eiPSC).....	42
2.5.	Imunofluorescência para determinação da pluripotência das eiPSC e da diferenciação espontânea após a formação dos corpos embrióides	42
2.6.	RT-qPCR	43
2.7.	Ensaio de formação de corpos embrióides (EB) e diferenciação espontânea (SD) 46	
3.	Resultados e Discussão	46
3.1.	Análise da senescência celular.....	46
3.2.	O oxigênio gera diferentes perfis de eiPSC.....	48
3.3.	Análise da expressão gênica por RT-qPCR.....	56
3.4.	Análise dos fibroblastos	56
3.5.	Genes de pluripotência	57
3.6.	Metabolismo da glicose.....	599
3.7.	Fusão e fissão mitocondriais.....	611
3.8.	Análise da baixa tensão de oxigênio.....	61
3.9.	Formação dos corpos embrióides (CE) e diferenciação espontânea (DE)65	
4.	Conclusão	68
CAPÍTULO 4 – CONSIDERAÇÕES FINAIS.....		69
Referências		70

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado "**Efeitos de baixa tensão de oxigênio na eficiência da reprogramação e manutenção de células-tronco pluripotentes induzidas de equino**", protocolo nº 018464/17, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Joaquim Mansano Garcia, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP - CÂMPUS DE JABOTICABAL-SP, em reunião ordinária de 07 de dezembro de 2017.

Vigência do Projeto	01/01/2018 a 01/01/2020
Espécie / Linhagem	Equina; Camundongos Nude; Camundongos B6/C57
Nº de animais	3 Equinos adultos; 3 Camundongos Nude; 7 Camundongos B6/C57
Peso / Idade	Eq.: Indefinido; Ca Nude: 3-6 semanas; Ca. B6/C57: 3-5 meses
Sexo	Eq. Fêmeas; Ca. Nude: indefinido; Ca. B6/C57: 5 Fêmeas e 2 Machos
Origem	Eq: Haras Ponta Porã, Ponta Porã/MS; Ca: Biotério

Jaboticabal, 07 de dezembro de 2017.


Prof. Dr. Everton Cid Rigobelo
Vice Coordenador – CEUA

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação da cicatrização de feridas de pele em equinos com o uso de moxabustão", protocolada sob o CEUA nº 5153150218 (ID 000982), sob a responsabilidade de **Renata Gebara Sampaio Dória e equipe; Bianca Moutinho Grizendi** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo - FZEA/USP (CEUA/FZEA) na reunião de 01/08/2018.

We certify that the proposal "Evaluation of equine wound skin healing with the use of moxibustion", utilizing 8 Equines (males and females), protocol number CEUA 5153150218 (ID 000982), under the responsibility of **Renata Gebara Sampaio Dória and team; Bianca Moutinho Grizendi** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Animal Science and Food Engineering - (São Paulo University) (CEUA/FZEA) in the meeting of 08/01/2018.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa \(Acadêmica\)](#)

Vigência da Proposta: de [06/2018](#) a [10/2018](#) Área: [Biociência Animal](#)

Origem: [Setor de Equideocultura da Unidade Didática Clínico Hospitalar \(UDCH\)](#)

Espécie: [Equídeos](#) sexo: [Machos e Fêmeas](#) idade: [2 a 15 anos](#) N: [8](#)

Linhagem: [Sem raça definida](#) Peso: [300 a 400 kg](#)

Local do experimento: Unidade Didática Clínico Hospitalar- UDCH

Pirassununga, 20 de setembro de 2019



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



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

EFEITOS DE DIFERENTES TENSÕES DE OXIGÊNIO NA EFICIÊNCIA DA REPROGRAMAÇÃO E MANUTENÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO PLURIPOTENTES INDUZIDAS DE EQUINO

RESUMO – Células tronco pluripotentes induzidas (iPSC) são uma ferramenta promissora para o tratamento de doenças, seja através de seu uso na medicina regenerativa, com estudos clínicos *in vitro*, ou ainda em estudos na área básica para desvendar mecanismos fisiológicos e patológicos. No entanto, algumas limitações, como a idade avançada do doador, o estado de senescência celular ou até mesmo as condições da atmosfera gasosa utilizadas no cultivo *in vitro* podem diminuir a eficiência da reprogramação à pluripotência. Dessa forma, a presente tese teve como objetivo estudar os efeitos do oxigênio no cultivo de células iPSC de equino (eiPSC), sendo na reprogramação à pluripotência ou nas iPSC originadas. No capítulo 1 uma revisão de literatura foi realizada a fim de sustentar a hipótese e justificar o estudo. No capítulo 2, o efeito das diferentes tensões de oxigênio (tensão de oxigênio atmosférica – aproximadamente 20% O₂; tensão de oxigênio reduzida - 5% O₂; ou a mudanças da atmosfera gasosa de aproximadamente 20% O₂ para 5% O₂) foi estudado durante o processo de reprogramação celular à pluripotência. Para tanto, a eficiência de reprogramação em cada grupo foi considerada, e uma avaliação seriada, a cada 3 dias, da expressão de genes chave de pluripotência (*OCT4*, *SOX2*, *REX-1* e *NANOG*), genes relacionados ao metabolismo da glicose (*GAPDH*, e *PFKM*), genes relacionados aos processos de fusão e fissão mitocondriais (*MFN1* e *DNM1L*), e genes relacionados a resposta da célula à baixa tensão de oxigênio (*HIF1 α* , *HIF2 α* , e *VEGFA*), foram realizadas, através de uma análise descritiva. A eficiência de reprogramação encontrada foi maior para o grupo cultivado em baixo oxigênio (grupo B). A alta eficiência de reprogramação do grupo B teve aparente correlação com uma maior expressão de *OCT4* e *NANOG* e menor expressão de *MFN1*. Por outro lado, os resultados encontrados para o *GAPDH* sugeriram uma correlação negativa com a eficiência de reprogramação, e os genes *HIF1 α* e *HIF2 α* apresentaram expressão com menores valores no grupo B do que nos demais. Os resultados encontrados comprovam a hipótese de que a tensão de oxigênio influenciou na reprogramação das células eiPSC, já que observamos mudanças na expressão gênica entre os grupos ao longo da reprogramação. Além disso, a eficiência de formação de colônias eiPSC em baixo oxigênio foi maior que em alto oxigênio. No capítulo 3, eiPSC de um animal de mais de 20 anos de idade foram obtidas e o efeito das mesmas diferentes tensões de oxigênio propostas no capítulo 2 foi estudado nessas células. A reprogramação das células do animal idoso foi possível, como demonstrado pela coloração positiva para fosfatase alcalina; expressão endógena de mRNA de genes relacionados à pluripotência (*OCT4*, *SOX2*, *REX-1* e *NANOG*) em todas as colônias avaliadas; coloração positiva no ensaio de imunofluorescência para *OCT4* e *NANOG* (todos os grupos), *SOX2* (grupo 5% O₂ e 20% para 5% O₂) e *TRA-1-60*, *TRA-1-81* e *SSEA-1* (somente em 20% O₂), demonstrando diferenças entre os grupos; a formação de corpos embrióides; e diferenciação celular espontânea nas três camadas germinativas embrionárias mesoderme, endoderme e ectoderme. Diferenças na morfologia das colônias de eiPSC geradas foram observadas, sendo que as células do grupo

cultivado em 20% O₂ apresentaram maior similaridade com células “naïve” e as células dos grupos cultivados em 5% O₂ e 20% para 5% O₂ maior similaridade com a morfologia de células “primed”. Diferenças significativas foram também observadas na expressão dos genes *GAPDH*, *GLUT3*, *MFN1*, *HIF1α* e *HIF2α*, relacionados ao metabolismo da glicose, fissão mitocondrial, e hipóxia, respectivamente, após a reprogramação. Nossos resultados demonstram que a derivação de eiPSC não foi prejudicada pela idade avançada do animal. Além disso, esse estudo é o primeiro a comparar o cultivo de iPSC de equino em alto e baixo oxigênio e a demonstrar que o oxigênio influencia no processo de reprogramação nesses animais, como indicado pela geração de células pluripotentes com diferentes perfis; nas condições testadas, a tensão de oxigênio mais baixa foi responsável por uma maior eficiência de reprogramação, em acordo com o demonstrado no capítulo 2, mas não favoreceu a pluripotência das eiPSC.

Palavras-chave: hipóxia, metabolismo celular, pluripotência, reprogramação celular, senescência

EFFECTS OF DIFFERENT OXYGEN TENSIONS IN THE EFFICIENCY OF REPROGRAMMING AND MAINTENANCE OF EQUINE INDUCED PLURIPOTENT STEM CELLS

ABSTRACT – Induced pluripotent stem cells (iPSC) are a promising tool for treating diseases, through their use in regenerative medicine, clinical trials, and studies in the basic area for unveiling physiological and pathological mechanisms. However, there still are some barriers for the obtention of these cells by reprogramming them to pluripotency. Limiting factors for the reprogramming process may come from the cells itself, as the advanced cellular donor age, high passage number in culture and the cellular senescence state; or they can be due to the culture conditions *in vitro*, as the gas atmosphere in which the cells are being cultured. Thus, the present thesis has the objective of studying the oxygen effects in the iPSC culture, in reprogramming to pluripotency and in the maintenance of the equine iPSC (eiPSC) obtained. In chapter 1 a literature review was made to give support to the hypothesis and justify this work. In chapter 2, the effect of different oxygen tensions (atmospheric oxygen tension – 20% O₂ approximately; reduced oxygen tension – 5% O₂; or the change of gas atmosphere from 20% O₂ to 5% O₂) was studied during reprogramming to pluripotency process. Therefore, the reprogramming efficiency was determined, and a serial evaluation, each 3 days, of the expression of key pluripotency genes (*OCT4*, *SOX2*, *REX-1* and *NANOG*), genes related to cellular metabolism (*GAPDH* and *PFKM*), genes related to mitochondrial fusion and fission processes (*MFN1* and *DNM1L*), and genes related to cellular response to low oxygen tension (*HIF1 α* , *HIF2 α* , and *VEGFA*), were performed. The reprogramming efficiency was higher in group cultured in low oxygen tension (group B). The high reprogramming efficiency in group B correlates with higher expression of *OCT4* and *NANOG* in this group and lower expression of *MFN1*. On the other hand, *GAPDH* showed a negative correlation with the reprogramming efficiency and *HIF1 α* and *HIF2 α* genes presented a lower expression in group B compared to the other groups. Based on these results it is possible to confirm the hypothesis that the oxygen tension influenced reprogramming of eiPSC, and the efficiency of reprogramming in low oxygen is higher than in high oxygen. In chapter 3 we aimed to generate and maintain eiPSC derived from fibroblasts of a horse older than 20 years and to evaluate the effect of the same oxygen conditions, already proposed in chapter 2, on these cells. Reprogramming of the aged animal cells was possible, as shown by positive alkaline phosphatase staining; endogenous expression of mRNA of pluripotency-related genes (*OCT4*, *SOX2*, *REX-1* and *NANOG*) in all evaluated colonies; immunofluorescence positive staining for *OCT4* and *NANOG* (all groups), *SOX2* (groups 5% O₂ and 20%-to-5% O₂) and *TRA-1-60*, *TRA-1-81* and *SSEA-1* (only in 20% O₂), showing differences between the groups; the formation of embryoid bodies; and spontaneous cell differentiation in mesoderm, endoderm and ectoderm embryonic germ layers. The eiPSC colonies generated at 20% O₂ presented with a more naïve-like morphology, while groups cultured in 5% O₂ or 20% to 5% O₂ presented a more primed morphology. Significant differences were also observed in the expression of *GAPDH*, *GLUT3*, *MFN1*, *HIF1 α* and *HIF2 α* , genes related to glucose metabolism, mitochondrial fission, and hypoxia, respectively, after reprogramming. Moreover, fibroblasts of the old animal proliferated slowly, as detected by the population doubling time assay, and *TERT* expression was only increased after

reprogramming, suggesting the fibroblasts were senescent before reprogramming and a reversion of this state occurred. Our results show that the derivation of iPSC from an adult equine was not impaired by aging. Additionally, this study is the first to compare high- and low-oxygen cultures of equine iPSC and to demonstrate that oxygen influences the reprogramming process, as indicated by the generation of pluripotent cells with different profiles; under the tested conditions, the lower oxygen tension was responsible for a higher reprogramming efficiency rate, according to the results described in chapter 2, but did not favor the pluripotency of eiPSC.

Keywords: hypoxia, cellular metabolism, pluripotency, cellular reprogramming, senescence

Lista de abreviaturas

mRNA – RNA mensageiro

hESC – Células tronco embrionárias de humanos

mESC – Células tronco embrionárias de camundongo

iPSC – Células tronco pluripotentes induzidas

eiPSC – Células tronco pluripotentes induzidas de equino

RT-qPCR – Reação de transcrição reversa em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real

PDT – Tempo de duplicação populacional

CE – Corpos embrióides

DE – Diferenciação espontânea dos corpos embrióides

MEF – Monocamada de fibroblastos embrionários murinos

FA – Grupo de fibroblastos cultivados em alto oxigênio

FB – Grupo de fibroblastos cultivados em baixo oxigênio

PB – Passagem baixa (5)

PA – Passagem alta (16)

hOSKM – Combinação dos fatores de transcrição *OCT4*, *SOX2*, *KLF-4* e *C-MYC* humanos

AP – Fosfatase alcalina

OXPHOS – Fosforilação oxidativa

Lista de Tabelas

Capítulo 2

Tabela 1. Sequências dos primers desenhados, usados para as análises de pluripotência (OCT4, REX-1, SOX2 e NANOG); vetor viral (hOSKM); fissão e fusão mitocondriais (DNM1L e MFN1); hipóxia (HIF1 α , HIF2 α e VEGFA); metabolismo da glicose (PFKM e GAPDH); e genes de referência (HPRT1 e PPIA).....21

Capítulo 3

Tabela 1. Sequências dos primers desenhados, usados para as análises de pluripotência (OCT4, REX-1, SOX2 e NANOG); vetor viral (hOSKM); fissão e fusão mitocondriais (DNM1L e MFN1); hipóxia (HIF1 α , HIF2 α e VEGFA); metabolismo da glicose (PFKM, GLUT3 e GAPDH); senescência (TERT e CDKN2A); diferenciação em ectoderme (β III-tubulina), endoderme (α -fetoproteína - AFP) e mesoderme (BMP4); e genes de referência (HPRT1 e PPIA).....44

Tabela 2. Efeito da idade no tempo de duplicação populacional (PDT).....47

Tabela 3. Análise da expressão gênica comparando os grupos FA (fibroblastos cultivados em 20%O₂) e FB (fibroblastos cultivados em 5%O₂), antes da reprogramação celular, para avaliação do efeito do oxigênio no cultivo desses fibroblastos.....56

Tabela 4. Análise da expressão gênica, sem considerar o efeito do oxigênio, comparando fibroblastos com eiPSC em passagem baixa (PB - P16) e passagem alta (PA - P30).....58

Tabela 5. Análise da expressão gênica, sem considerar o efeito das passagens, comparando os três tratamentos de oxigênio eiPSC A (20% O₂), eiPSC AB (20% para 5% O₂) e eiPSC B (5% O₂).....60

Tabela 6. Análise da expressão gênica comparando eiPSC em passagem baixa (PB - P16) e passagem alta (PA - P30) dos grupos A (20% O₂) AB (20% para 5% O₂) e B (5% O₂) e fibroblastos em 20% O₂ (FA) e 5% O₂ (FB).....64

Lista de Figuras

Capítulo 2

Figura 1. Delineamento experimental demonstrando datas e coletas realizadas para o experimento, em cada dia..... 19

Figura 2. Gráfico representando a eficiência da formação das colônias eiPSC em 5%O₂ (B), 20% O₂ (A) e 20%-para-5% O₂ (AB).....22

Figura 3. Colônias formadas nos grupos A (A), B (B) e AB (C) e fosfatase alcalina realizada nas células do grupo B (D). Barras de escala: 100µm e 200µm.....23

Figura 4. Gráficos representando as mudanças da expressão dos genes de pluripotência (OCT4, SOX2, REX-1 e NANOG), fusão e fissão mitocondriais (DNM1L e MFN1), metabolismo de glicose (GAPDH e PFKM), baixa tensão de oxigênio (HIF1α, HIF2α e VEGFA) e do vetor viral (hOSKM).....25

Capítulo 3

Figura 1. Resultados da coloração por fosfatase alcalina e diferentes morfologias. A, B e C = Coloração por fosfatase alcalina em passagens 3 dos grupos A, AB e B, respectivamente; D, E e F = diferentes morfologias apresentadas pelas colônias dos grupos A, AB e B, respectivamente, em passagem 16; G, H e I = diferentes morfologias apresentadas pelas colônias dos grupos A, AB e B, respectivamente, em passagem 30. Barras de escala 200µm50

Figura 2. Resultados da imunofluorescência, positivos e negativos, para as eiPSC do grupo A em passagem 16 (acima) e 30 (abaixo). Em P16 as colônias de eiPSC estão positivas para OCT4 (vermelho), NANOG (verde), TRA-1-60 (vermelho) e TRA-1-81(vermelho) e negativas para SOX2 e SSEA-1. Em P30 as colônias passam a ser positivas também para SSEA-1 (vermelho). Barras de escala:100µm e 200µm.....53

Figura 3. Resultados da imunofluorescência, positivos e negativos, para as eiPSC do grupo AB em passagem 16 (acima) e 30 (abaixo). Em P16 as colônias de eiPSC estão positivas para OCT4 (vermelho), SOX2 (verde) e NANOG (verde) e negativas para TRA-1-60, TRA-1-81 e SSEA-1. Em P30 esse resultado não se altera. Barras de escala: 100µm, 200µm e 400µm.....54

Figura 4. Resultados da imunofluorescência, positivos e negativos, para as colônias de eiPSC do grupo B em passagem 16 (acima) e 30 (abaixo). Em P16 as colônias de eiPSC estão positivas para OCT4 (vermelho), SOX2 (verde) e NANOG (verde) e negativas para TRA-1-60, TRA-1-81 e SSEA-1. Em P30 esse resultado não se altera. Barras de escala: 100µm, 200µm e 400µm.....55

Figura 5. Formação dos corpos embrióides nos grupos A, AB e B, respectivamente (A, B e C). Barras de escala: 200µm.....65

Figura 6. Resultados de RT-PCR para os marcadores de ectoderme (BIII-Tubulina), endoderme (AFP) e mesoderme (BMP4) para os corpos embrióides (CE) e diferenciação espontânea (DE), eiPSC e fibroblastos. A = CE (esquerda) e DE (direita) grupo A; B = CE (esquerda) e DE (direita) grupo AB; C = CE (esquerda) e DE (direita) grupo B; D = eiPSC grupo A (esquerda), eiPSC grupo AB (direita); E = eiPSC grupo B; F = fibroblastos FA (esquerda) e FB (direita).....66

Figura 7. Resultados da imunofluorescência realizada nas células que sofreram diferenciação espontânea. A= grupo A; B= grupo AB; C= grupo B. Todos os grupos apresentaram-se positivos para os marcadores de mesoderme (vimentina), ectoderme (nestina e neurofilamento), e endoderme (Gata6). Barras de escala: 100µm.....67

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

1. Introdução

A descoberta de que é possível reprogramar células somáticas adultas tornando-as semelhantes às células-tronco embrionárias através da introdução de quatro fatores de transcrição (TAKAHASHI; YAMANAKA, 2006) foi um marco na ciência. Essas células foram denominadas células-tronco pluripotentes induzidas (iPSC – do inglês, “induced pluripotent stem cell”) e trouxeram inúmeras possibilidades para o uso de células-tronco pluripotentes.

Porém, as condições ideais para a reprogramação e cultivo dessas células ainda não foram completamente atingidas. Sabe-se que várias vias de sinalização que mantêm a pluripotência e inibem a diferenciação devem ser ativadas durante o processo de reprogramação (SUMER; LIU; VERMA, 2010). Além disso, as assinaturas epigenéticas das células somáticas, que podem se manifestar como obstáculos para a pluripotência, e ao mesmo tempo, uma vantagem para a diferenciação em uma linhagem específica (BRIX; ZHOU; LUO, 2015), devem sofrer alterações de forma a favorecerem a pluripotência celular. Outro acontecimento essencial à reprogramação à pluripotência é a mudança do metabolismo dessas células da via mitocondrial aeróbica para a via glicolítica como principal fonte de produção de energia da célula reprogramada (FOLMES et al., 2011).

Sabendo da importância do metabolismo celular envolvendo o oxigênio para o processo de reprogramação celular, é intuitivo pensar que a disponibilidade de oxigênio para a célula pode causar alterações no processo de reprogramação à pluripotência. Porém, mesmo sendo essa possibilidade reconhecida, normalmente os cultivos *in vitro* ocorrem em tensões de oxigênio semelhantes às do ar ambiente (de aproximadamente 21% de O₂), diferente da existente no ambiente uterino (3-5% O₂) (FORRISTAL et al., 2010) e em outros tecidos adultos (CSETE, 2005), o que pode levar a diferenciação celular (EZASHI; DAS; ROBERTS, 2005), e diminuição da expressão de fatores relacionados a pluripotência, como o *OCT4* (COVELLO et al., 2006) em células tronco embrionárias (mESC) de camundongo.

Sendo assim, a tensão de oxigênio semelhante à do ar ambiente pode não ser a melhor condição para o cultivo de células-tronco embrionárias e células iPSC, e para o processo de reprogramação em si. Alguns autores já demonstraram os efeitos positivos da redução da concentração de oxigênio, de 20% para 5%, na reprogramação à pluripotência, sendo que as células mantidas em tensões mais baixas apresentaram maior taxa de reprogramação em humanos e de camundongos (LIU et al., 2014; MATHIEU et al., 2014a; YOSHIDA et al., 2009a).

Porém, estudos sobre a influência da atmosfera de oxigênio no cultivo de células iPSC de equinos (eiPSC) ainda não foram desenvolvidos. Um único estudo realizou o cultivo de eiPSC em atmosfera de 5% de oxigênio (QUATTROCELLI et al., 2016), porém, nenhum teste relacionado à influência do oxigênio na reprogramação ou cultivo das eiPSC foi realizado. Tendo em vista a escassez de evidências que comprovem a melhor condição para o cultivo dessas células, principalmente na espécie equina, há necessidade de estudos que avaliem qual a melhor atmosfera de oxigênio a ser empregada nos cultivos *in vitro* para otimização dos protocolos de reprogramação e cultivo de eiPSC.

Além disso, sabendo que, em humanos, fatores como a idade do doador podem influenciar negativamente o processo de reprogramação (TROKOVIC et al., 2015), diferentes tensões de oxigênio foram também testadas em células de um animal idoso, a fim de estudar se o efeito do oxigênio na reprogramação à pluripotência poderia ser positivo para o aumento da eficiência de reprogramação de tais células.

Sendo assim, o objetivo da presente tese é analisar possíveis efeitos do cultivo em diferentes tensões de oxigênio em fibroblastos de pele de equinos adultos no processo de reprogramação e posterior cultivo das eiPSC, e comparar as linhagens obtidas, a fim de determinar a influência do oxigênio na capacidade de reprogramação e manutenção da pluripotência dessas células.

2. Revisão de literatura

2.1. Células tronco pluripotentes induzidas

As células tronco pluripotentes induzidas (iPSC) podem ser geradas a partir de qualquer tipo de célula (DOSS; SACHINIDIS, 2019; KOH; PIEDRAHITA, 2014) e sua

pluripotência lhes confere potencial para formar um indivíduo completo (BOLAND et al., 2009). Outras características importantes dessas células incluem sua capacidade de autorrenovação, o que as torna fonte inesgotável e com potencial para a terapia celular no tratamento de várias doenças (WHITWORTH; OVCHINNIKOV; WOLVETANG, 2012), possibilitando seu uso na medicina regenerativa; análise de doenças usando células geradas do próprio paciente; (EGASHIRA; YUASA; FUKUDA, 2013) e testes farmacológicos (ZEEVI-LEVIN; ITSKOVITZ-ELDOR; BINAH, 2012).

Sendo assim, as iPSC podem mimetizar de forma próxima as manifestações clínicas e, como podem ser geradas de forma espécie-específica, elas têm respostas biológicas mais confiáveis para estudos *in vitro*. Ademais, a reprogramação mimetiza a redefinição epigenética que ocorre durante a meiose e a fertilização, e que torna possível a geração de um indivíduo (embrião) a partir de gametas, duas células especializadas de dois indivíduos mais velhos. Portanto, a reprogramação pode também ser a chave para possíveis estratégias de rejuvenescimento e tratamento das doenças ligadas ao envelhecimento (MAHMOUDI; BRUNET, 2012; RANDO; CHANG, 2012).

No contexto clínico, estudos sobre o potencial terapêutico das iPSC já estão sendo realizados em humanos para doença de Parkinson, doenças cardíacas e degeneração macular (BARKER et al., 2017; CYRANOSKI, 2018; MANDAI et al., 2017). *In vitro*, as iPSC podem ser aplicadas no estudo de doenças através do isolamento de células do paciente que possui a doença, reprogramação dessas células à pluripotência e diferenciação no tipo celular específico que se deseja estudar, representando um bom modelo para estudo das patologias a nível celular. Além disso, para o estudo de um contexto tecido-específico, essas células podem ser cultivadas de modo a formarem organoides, estruturas multicelulares cultivadas em 3D que formam agregados derivados das células tronco que se diferenciaram e se reorganizaram com características similares às encontradas no tecido *in vivo*, e que representam de forma mais fidedigna o comportamento que essas células teriam *in vivo* (DUTTA; HEO; CLEVERS, 2017; ROWE; DALEY, 2019).

Além do potencial terapêutico, as iPSC podem também aprimorar o modo como novos fármacos são descobertos, validados e classificados quanto sua eficácia ou toxicidade pois um modelo confiável *in vitro* permite seleção mais eficiente de novos

compostos a serem desenvolvidos. O uso de iPSC para a determinação da toxicidade pode ser útil, também, para espécies em extinção, as quais muitas vezes não se tem conhecimento sobre a segurança e eficiência de um fármaco. A derivação de células iPSC de tais espécies e desenvolvimento de ensaios sobre o efeito dessas drogas *in vitro* seria de grande interesse para estes animais (CEBRIAN-SERRANO; STOUT; DINNYES, 2013).

É importante ressaltar ainda que o estado de pluripotência é uma fase transitória que ocorre durante o desenvolvimento embrionário, e que pode ser capturada *in vitro* sob condições artificiais específicas de cultivo (WU; YAMAUCHI; BELMONTE, 2016). Assim, diferentes estados de pluripotência, denominados “naïve” e “primed”, podem ser estabilizados *in vitro*, em células tronco embrionárias (ESCs) e células iPSC (NICHOLS; SMITH, 2009a), e esses estados são regulados por vários fatores como os fatores de transcrição e o metabolismo celular (SPERBER et al., 2015; WEINBERGER et al., 2016). Essas células, “naïve” e “primed”, divergem quanto ao seu isolamento, a partir de estágios diferentes do desenvolvimento embrionário, sendo que as células “naïve” são isoladas e cultivadas a partir de um estado anterior do desenvolvimento embrionário, refletindo o estágio do embrião pré-implantação, e dessa forma considera-se que possuem maior potencial de diferenciação do que as células “primed”, já em estágio de epiblasto embrionário (NICHOLS; SMITH, 2009a).

2.2. Influência do oxigênio no cultivo celular

Como rotina já estabelecida, os cultivos celulares são realizados em 5% de CO₂, sendo esse gás importante como tampão para o meio de cultivo celular, mimetizando as condições *in vivo* que ocorrem em animais adultos. Na incubadora, essa quantidade de CO₂ é misturada ao ar ambiente, que contém 21% de O₂, tornando as concentrações de oxigênio e nitrogênio aproximadamente 20% e 75%, respectivamente. Porém, essa tensão de O₂, ao contrário da tensão de CO₂, não corresponde à tensão normalmente encontrada *in vivo*. A média da porcentagem de O₂ encontrada nos tecidos adultos é de 3%, sendo, por exemplo, no cérebro entre 0,5% e 7%, na medula óssea entre 0% e 4%, no sangue arterial aproximadamente 12% e em tecidos mais irrigados, como o parênquima pulmonar, entre 4% e 14% (CSETE, 2005; IVANOVIC, 2009).

Estudos anteriores demonstram que a tensão de oxigênio influencia as duas características que definem as células-tronco: proliferação e autorrenovação. Em células hematopoiéticas humanas, por exemplo, a proliferação celular é negativamente afetada quando as células são mantidas em 20% de O₂, enquanto o cultivo em 2% de O₂ permite a proliferação celular por mais tempo, embora não tenha influência em sua velocidade de proliferação. Além disso, a expressão de *OCT4*, fator de transcrição importante para garantir a pluripotência da célula (NICHOLS et al., 1998) é maior nas células cultivadas em 2% de O₂, em comparação ao cultivo em 20% O₂, já que, segundo os autores, o *OCT4* é regulado pelo gene *HIF2α*, gene que por sua vez é pertencente a família de fatores de transcrição que regulam a hipóxia e o desenvolvimento embrionário (DUNWOODIE, 2009; GRAYSON et al., 2007; HAWKINS; SHARP; MCKAY, 2013).

Muitas das adaptações à hipóxia são mediadas por genes específicos através da ativação da família de fatores de transcrição do HIF (do inglês, “hypoxia inducible factor”). Os produtos dos genes responsivos à hipóxia promovem sobrevivência em uma baixa condição de oxigênio através do aumento da entrega de oxigênio a célula, pela alteração das vias metabólicas intracelulares (HAWKINS; SHARP; MCKAY, 2013). Assim, quando as condições de hipóxia ocorrem, o HIF ativa a transcrição de genes que, dependendo do contexto, podem estar envolvidos com o metabolismo energético, autofagia, inibição da tradução, eritropoiese e angiogênese (DUNWOODIE, 2009).

Esse sistema de regulação mediado pelo HIF não envolve somente a recuperação em hipóxia patológica. O desenvolvimento normal dos mamíferos ocorre em um ambiente com baixa tensão de oxigênio, e nesse caso o *HIF* ativa os genes que regulam eventos celulares. Assim, a hipóxia e o *HIF* são responsáveis pelos aspectos da morfogênese do desenvolvimento (DUNWOODIE, 2009). Alguns estudos corroboram com essa constatação: a exposição aguda e crônica de células-tronco embrionárias humanas (hESC) a 20% de O₂ induz uma mudança dramática na expressão global de genes, com aumento na expressão de genes associados a atividade mitocondrial e diminuição da expressão de genes associados à hipóxia, como o gene *HIF*, e também diminuição da utilização das vias da glicólise e gliconeogênese (LENGNER et al., 2010). Além disso, outro estudo demonstra que o

HIF1 α regula a função metabólica da célula na transição do estado “naïve” para o estado “primed”, estando esse gene mais expresso em células “primed” do que “naïve”, com conseqüente maior utilização da via glicolítica por essas células (ZHOU et al., 2012).

Mais evidências do papel da regulação do desenvolvimento pela hipóxia, e *HIF*, foram descritas em mESC, que foram expostas a hipóxia por apenas 24 horas e apresentam uma indução forte e persistente da diferenciação endodermal (PIMTON et al., 2015). Também, em células tronco embrionárias humanas (hESC) a regulação do *OCT4* pela hipóxia já foi verificada. Quando cultivadas em 20% de O₂, essas células apresentaram uma redução significativa da expressão tanto de *OCT4* quanto de *SOX2* e *NANOG*, em comparação ao cultivo em 5% de O₂. Em 20% de O₂ os autores relataram maior diferenciação espontânea das colônias de hESC, e essas células apresentavam proliferação muito diminuída quando comparadas com o cultivo em 5% de O₂. Além disso, uma redução significativa na expressão de *OCT4*, *SOX2* e *NANOG* foi verificada quando os genes para *HIF2 α* e *HIF3 α* foram silenciados, comprovando a relação entre os fatores de transcrição da família do *HIF* e os genes relacionados à pluripotência celular (FORRISTAL et al., 2010).

Pensando nas células iPSC, uma estratégia para aumentar a eficiência da reprogramação celular à pluripotência e obter células iPSC com perfis mais próximos ao de células completamente reprogramadas, é o controle da atmosfera de oxigênio na qual as células são cultivadas. Alguns estudos já demonstraram uma maior eficiência de reprogramação à pluripotência em tensões de oxigênio mais baixas (MATHIEU et al., 2013; SPERBER et al., 2015; YOSHIDA et al., 2009a). Em humanos, a eficiência da reprogramação foi aumentada por condições de oxigênio mais baixo, e essa condição foi capaz de reverter a diferenciação que ocorreu durante o cultivo de iPSC (MATHIEU et al., 2013; PARRINELLO et al., 2003).

Em 2009, Yoshida e colaboradores compararam a eficiência de reprogramação de células de camundongo e de humanos cultivadas em 21% O₂, 5% O₂ e 1% O₂ e verificaram que as células cultivadas com 5% de O₂ formaram mais colônias de células iPSC, um maior número delas era positivo para fosfatase alcalina, elas foram visualizadas mais precocemente, mantiveram a mesma morfologia das células cultivadas em normóxia e apresentaram maior taxa de proliferação celular. Ainda,

essas células demonstraram aumento na expressão de genes relacionados à mESC e diminuição da expressão de genes relacionados a fibroblastos embrionários de camundongo. Os autores também demonstraram que submeter as células à hipóxia por quatro dias, suplementá-las com ácido valpróico (inibidor de desacetilase da histona), ou associar ambos os tratamentos, levou ao aumento da porcentagem de células reprogramadas em 0,4%, 0,48% e 2,28% respectivamente, demonstrando uma sinergia entre o ácido valpróico e a hipóxia (YOSHIDA et al., 2009a).

Além do efeito na reprogramação, o efeito no cultivo das células iPSC a longo prazo (2 meses) em baixas tensões de oxigênio (2,5% e 5%) também foi demonstrado anteriormente em células iPSC humanas. Os autores demonstraram que células cultivadas em 2,5% e 5% de O₂ expressavam mais *NANOG* que as células mantidas em 20% de O₂, e menos 53BP1 e ATM fosforilado, duas proteínas relacionadas a reparos a danos no DNA o que, segundo os autores significa que o baixo oxigênio favorece a manutenção das células indiferenciadas, e diminui os danos ao DNA (GUO et al., 2013). Porém, embora muito bem estudada em humanos e camundongos (FOLMES et al., 2013; GUO et al., 2013; SPERBER et al., 2015; YOSHIDA et al., 2009b), a questão do cultivo de células iPSC em baixa atmosfera de oxigênio ainda não foi estudada na espécie equina, e possíveis diferenças podem ocorrer entre as espécies.

2.3. Mudança no metabolismo energético celular durante a reprogramação à pluripotência

Uma das características de células-tronco pluripotentes é que elas se dividem rapidamente, para dar suporte ao desenvolvimento embrionário. Quando o indivíduo adulto se forma, parte dessas células entra em um estado quiescente, passando longos períodos sem se dividirem. Levando em conta as diferenças nas taxas de proliferação celular nos diferentes estágios da vida, é intuitivo pensar que o metabolismo dessas células é também diferente.

Sabe-se que células pluripotentes, em alta proliferação, apresentam um metabolismo energético diferente de células completamente diferenciadas, em estado quiescente. Durante o desenvolvimento embrionário, as células do embrião passam por alterações na demanda e utilização de glicose e piruvato. Por exemplo, o lactato

é requerido do estágio de pré-implantação até o estágio de 4-8 células, ao passo que na fase de blastocisto há maior utilização de glicose (HOUGHTON et al., 1996). A via da fosforilação oxidativa (OXPHOS) por sua vez, é pouco utilizada em células embrionárias. De forma similar, as células tronco pluripotentes humanas e de camundongo produzem energia principalmente pela conversão enzimática de glicose em lactato, contrastando com células somáticas quiescentes do corpo que utilizam a via da fosforilação oxidativa, e com células em processo de diferenciação, que requerem o aumento da OXPHOS, como já foi demonstrado em células cardíacas (CHUNG et al., 2007; FOLMES et al., 2011; PANOPOULOS et al., 2012; PRIGIONE et al., 2010a; VARUM et al., 2011).

O fato de que as células pluripotentes, mesmo com suprimento adequado de oxigênio, tenham preferência pela utilização da via glicolítica, anaeróbica, é conhecido como efeito Warburg, e também já foi descrito em células de câncer (VANDER HEIDEN; CANTLEY; THOMPSON, 2009). Essa preferência da célula se justifica pelo fato de que, mesmo que o processo de fosforilação oxidativa gere mais ATP do que a glicólise (38 Mol de ATP por Mol de glicose, em contraposição a somente 2 Mol de ATP pela via glicolítica), a geração de ATP pela glicólise ocorre de forma mais rápida e, além disso, a degradação da glicose fornece subsídios importantes para a geração de componentes celulares essenciais, como nucleotídeos, amino ácidos e lipídios, que sustentam as necessidades de células pluripotentes em rápida proliferação. Além disso, a alta taxa de OXPHOS poderia levar a maior produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), potencialmente causando danos ao DNA nuclear e DNA mitocondrial, e levando a oxidação de lipídios e proteínas, o que comprometeria a viabilidade celular (DAHAN et al., 2019; DEBERARDINIS et al., 2008; NISHIMURA; FUKUDA; HISATAKE, 2019; VANDER HEIDEN; CANTLEY; THOMPSON, 2009; ZHANG et al., 2012).

É ainda interessante ressaltar que diferenças importantes entre células “naïve”, correspondentes a células em fase de embrião pré-implantação, e as células “primed”, que possuem maior semelhança com células de epiblasto embrionário (NICHOLS; SMITH, 2009a), já foram descritas na literatura. Células tronco embrionárias “naïve” de camundongo demonstraram menor atividade glicolítica do que células “primed” (derivadas do epiblasto embrionário - mEpiSCs), o que foi demonstrado por sua menor

taxa de acidificação extracelular, teste que indica a atividade glicolítica de uma célula. Sendo assim, as células “naïve” são consideradas bivalentes, por utilizarem também a via da fosforilação oxidativa, ao contrário das células “primed” (ZHOU et al., 2012).

A modulação da via glicolítica na reprogramação celular é, portanto, mais do que uma simples consequência, sendo na verdade relacionada como uma das causas da reprogramação celular à pluripotência. Um estudo descreveu, por exemplo, que a manipulação do metabolismo energético através da inibição da glicólise, ou do uso de reagentes que estimulam o metabolismo oxidativo, reduziram a eficiência da reprogramação, enquanto a suplementação de glicose no meio de cultivo favoreceu a obtenção de células iPSC (FOLMES et al., 2011).

Outra característica intimamente ligada ao metabolismo energético celular é o remodelamento das mitocôndrias. Em células de camundongos e humanos, as células iPSC apresentam poucas mitocôndrias e essas possuem uma morfologia mais arredondada e com poucas cristas mitocondriais, enquanto nas células diferenciadas as mitocôndrias aparecem em maior número, estão organizadas em uma rede de mitocôndrias e apresentam morfologia relacionada a organelas mais maduras: tubulares e ricas em cristas mitocondriais (FOLMES et al., 2011; VARUM et al., 2011).

Essas mudanças no número e na morfologia das mitocôndrias são reguladas pelos processos de dinâmica mitocondrial, que compreendem a fusão e a fissão. As mitocôndrias são altamente dinâmicas e tem a capacidade de se fundirem umas às outras (fusão) e de se dividirem rapidamente (fissão) (RASTOGI et al., 2019; SEO; YOON; DO, 2018). O processo de fissão mitocondrial é imprescindível para a reprogramação, sendo que a ineficiência na ocorrência desse processo leva ao bloqueio da reprogramação à pluripotência (PRIETO et al., 2016a).

2.4. Importância do modelo equino

A espécie equina desempenhou diversos papéis importantes ao longo da história, já tendo sido utilizada como importante meio de transporte, em campos de batalha, como animais de trabalho e, na sociedade moderna, nas atividades agropecuárias, esportes equestres, recreação e até mesmo como terapia (equoterapia). Devido a uma melhor nutrição, cargas de trabalho menos exaustivas e

avanços nos cuidados veterinários e em seu manejo, esses animais tendem a ter uma vida mais longa nos dias atuais (IRELAND et al., 2012b; MCGOWAN et al., 2010b).

Com a idade, alguns animais podem se tornar ainda mais valiosos devido ao seu temperamento reconhecido e suas longas carreiras como cavalos para eventos ou adestramento, ou pela sua bem reconhecida prole e atividade reprodutiva. Porém, o envelhecimento leva ao aparecimento de uma série de doenças e injúrias significativas. Estudos conduzidos em pacientes equinos geriátricos mostram a prevalência de doenças cardíacas, do trato gastrointestinal, problemas musculoesqueléticos e de trato respiratório e desordens oftalmológicas e de pele (BROSNAHAN; PARADIS, 2003; IRELAND et al., 2012a; MCGOWAN et al., 2010a; SAGE, 2002), problemas esses que muitas vezes não apresentam alternativas de tratamento eficaz.

Além das doenças relacionadas à idade, por serem animais frequentemente submetidos a atividades físicas intensas, injúrias em tendões e ligamentos, por exemplo, ocorrem frequentemente. No processo de cicatrização de tais lesões ocorre, porém, a formação de tecido fibroso, tecido esse com propriedades biomecânicas não ideais e que reduzem a performance atlética dos animais e, além disso, favorece a reincidências das injúrias (VOLK; THEORET, 2013). Além dessas, outras doenças ainda sem opções viáveis de tratamento incluem as doenças imunes como as uveítes e o lúpus eritematoso, as laminites e as grandes feridas. Todas essas doenças podem, de alguma forma, ser melhor estudadas e tratadas através da utilização de células tronco e, mais especificamente, células iPSC (DE SCHAUWER et al., 2013; DONADEU, 2014; DONADEU; ESTEVES, 2015; SMITH; MURPHY; SMITH, 2011).

Outro aspecto importante do desenvolvimento de estudos que visam o tratamento de algumas das doenças que acometem os equinos é o fato de que os resultados obtidos podem ser utilizados também para a espécie humana, já que esses animais são expostos a atividade física intensa e frequentemente apresentam injúrias no sistema musculoesquelético, como fraturas ósseas, injúrias musculares e osteoartrites em tendões, o que os torna um modelo ideal para os estudo de doenças correlacionadas que acometem seres humanos, permitindo testes de novos tratamentos e drogas e a transposição dos resultados sobre técnicas regenerativas

para os humanos (CONG et al., 2019; PESSÔA; BRESSAN; FREUDE, 2019; SMITH; GARVICAN; FORTIER, 2014).

Em equinos, a reprogramação celular foi primeiramente reportada em 2011, em fibroblastos fetais, através de um sistema utilizando piggy-Bac empregando *OCT4*, *SOX2*, *KLF4* e *C-MYC* (OSKM) murinos (NAGY et al., 2011). As células eram dependentes de LIF e bFGF e foram capazes de formar teratomas. Posteriormente, outros grupos reprogramaram à pluripotência fibroblastos de animais adultos, e células mesenquimais de tecido adiposo, cordão umbilical, sangue periférico e mesoangioblastos (BRETON et al., 2013; KHODADADI et al., 2012; LEE et al., 2016; MORO et al., 2018; PESSÔA et al., 2019; QUATTROCELLI et al., 2016; SHARMA et al., 2014; WHITWORTH et al., 2014).

A exceção de dois trabalhos (MORO et al., 2018; PESSÔA et al., 2019), nos quais os autores não realizaram o ensaio de formação de teratomas, todos os outros autores conseguiram gerar teratomas das células eiPSC. Os sistemas utilizados para a reprogramação foram em maioria virais, e nenhum trabalho até o momento conseguiu reprogramar células através de sistemas não integrativos. As reprogramações foram realizadas através de vetores *OCT4*, *SOX2*, *KLF-4* e *C-MYC* (OSKM) humanos ou murinos, a exceção de Khodadadi et al. (2012), que conseguiram reprogramar as células sem o uso de c-Myc.

Como destaques destes estudos, podemos citar: Lee et al. (2016) que realizaram ensaio *in vivo* com as células iPSC equinas obtidas (eiPSC), injetando-as em músculo de camundongo juntamente com uma substância miotóxica, e provaram que as eiPSC ajudaram na regeneração muscular desses animais; Sharma et al. (2014) conseguiram diferenciar as eiPSC em neurônios funcionais; Quattrocelli et al. (2016) levantaram questões interessantes a respeito da origem das células e seu potencial de reprogramação, sugerindo que as células somáticas carregam suas assinaturas epigenéticas mesmo após o processo de reprogramação; Whitworth et al. (2014) estudaram a inativação do X nas células eiPSC obtidas, e as vias de sinalização envolvidas nessa inativação; Moro et al. (2018) que realizaram a avaliação de alguns microRNAs e sua diferente expressão, encontrada nas células eiPSC, fibroblastos e nos corpos embrióides derivados das eiPSC; e Pessôa et al. (2019) que conseguiram reprogramar, além de fibroblastos adultos, células mesenquimais

provenientes de tecido adiposo e de cordão umbilical, e também realizaram uma análise dos microRNAs presentes nas eiPSC geradas das diferentes células mesenquimais.

Nenhum estudo foi anteriormente realizado na espécie equina comparando o cultivo de eiPSC em diferentes atmosferas de oxigênio. Somente um estudo utilizou 5% de O₂ no cultivo das eiPSC e das células mesenquimais precursoras das eiPSC (QUATTROCELLI et al., 2016), porém, como o objetivo do estudo não era avaliar as alterações causadas pelo oxigênio, nenhuma discussão ou comparação foi realizada pelos autores. Sabe-se que existem algumas diferenças entre a tolerância de fibroblastos humanos e murinos, às altas tensões de oxigênio, sendo as células humanas mais tolerantes ao alto oxigênio do que as células murinas (PARRINELLO et al., 2003). Isso ressalta o fato de existirem consideráveis diferenças entre as espécies, e a necessidade de mais estudos para elucidar as questões que concernem a espécie equina.

3. Hipótese

O cultivo em tensão mais baixa de oxigênio (5% O₂) favorece a reprogramação de células somáticas a um estado de pluripotência, contribui para a geração de células eiPSC com mais características relacionadas à pluripotência e influencia positivamente na manutenção da pluripotência nas células mantidas em cultivo *in vitro* por períodos prolongados, na espécie equina.

4. Objetivos

4.1. Objetivo Geral

- a. Estudar a influência de diferentes tensões de oxigênio (tensão atmosférica – 20%, ou tensão reduzida – 5%) na eficiência de reprogramação à pluripotência e na manutenção da pluripotência das células iPSC mantidas em cultivo, na espécie equina.

4.2. *Objetivos Específicos*

- a. Avaliar a capacidade de reprogramação celular e alterações na expressão gênica durante o processo de reprogramação à pluripotência em diferentes tensões de oxigênio.
 - i. Avaliar as colônias quanto a eficiência de reprogramação e coloração por fosfatase alcalina.
 - ii. Avaliar a mudança da expressão gênica ao longo da reprogramação celular.
- b. Avaliar a reprogramação à pluripotência de fibroblastos de um equino de 21 anos de idade em diferentes tensões de oxigênio (ar atmosférico – 20%, ou tensão reduzida – 5%).
 - i. Avaliar o estado de senescência dos fibroblastos e das células eiPSC obtidas.
 - ii. Caracterizar as células eiPSC obtidas através de marcação por fosfatase alcalina, testes de imunofluorescência, expressão de genes relacionados à pluripotência e formação de corpos embrióides.
 - iii. Comparar as células eiPSC obtidas em oxigênio atmosférico (20%) ou em tensão de oxigênio reduzida (5%) quanto à eficiência de reprogramação, morfologia das colônias eiPSC formadas, marcação para fosfatase alcalina, marcação na imunofluorescência, expressão gênica e potencial de diferenciação através da formação de corpos embrióides capazes de se diferenciarem em ectoderme, mesoderme e endoderme.

CAPÍTULO 2 – AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA AO LONGO DA REPROGRAMAÇÃO DE FIBROBLASTOS EQUINOS EM DIFERENTES TENSÕES DE OXIGÊNIO

Resumo

O processo de reprogramação celular à pluripotência sofre influências de fatores internos e externos à célula. Uma influência importante é exercida pela concentração de oxigênio no ambiente de cultivo, já que esse elemento tem importantes funções em diversos processos celulares. O objetivo desse estudo foi avaliar a influência do oxigênio durante a reprogramação à pluripotência de fibroblastos da pele em equinos. Os fibroblastos foram isolados de um macho de 3 anos de idade e imediatamente divididos em duas tensões de oxigênio, originando dois grupos: Grupo A, cultivado em 5% CO₂ em ar atmosférico (aproximadamente 20% O₂); e grupo B: 5% O₂, 5% CO₂ e 90% N₂. A geração das eiPSC foi realizada por transdução lentiviral utilizando as sequências de cDNA, de origem humana, para *OCT4*, *SOX2*, *KLF4* e *c-MYC*. Seis dias após a transdução um terceiro grupo foi criado, no qual as células que estavam sendo cultivadas em alto oxigênio foram passadas para o cultivo em baixo oxigênio (Grupo AB). Os grupos foram avaliados quanto a eficiência de reprogramação (razão entre o número de colônias eiPSC formadas e número de células colocadas em cultivo), morfologia das colônias formadas e marcação por fosfatase alcalina. Durante o processo de reprogramação avaliações seriadas foram realizadas por RT-qPCR, sendo elas: no dia da transdução viral (D0), e depois a cada 3 dias (D3, D6, D9, D12, D15 e D18), e os resultados são relatados aqui de forma descritiva, e não estatística. As primeiras colônias se formaram após 10 a 14 dias passados da transdução. A eficiência de reprogramação foi de 1,67% no grupo B, 0,08% no grupo A e 0,025% no grupo AB. As células apresentaram a morfologia esperada para eiPSC. O grupo B mostrou maior expressão de *OCT4*, *SOX2*, *REX-1* e *NANOG* do que o grupo A; menor expressão dos genes *GAPDH* e *PFKM*; menor expressão de *MFN1* e um aumento no *DNM1L* no dia 12. A expressão dos genes HIF1 α e HIF2 α foi diferente da esperada, sendo mais alta no grupo B do que no grupo A. Nas condições do presente estudo, foi demonstrado que a reprogramação à pluripotência de fibroblastos equinos pode ser modulada pela mudança na atmosfera de oxigênio.

Palavras-chave: hipóxia, metabolismo celular, pluripotência reprogramação celular, equinos

1. Introdução

Desde a descoberta, em 2006 (TAKAHASHI; YAMANAKA, 2006), de que células diferenciadas podem retornar a um estado pluripotente, semelhante ao de células tronco embrionárias, muitos estudos vêm sendo feitos para desvendar todos os mecanismos envolvidos nessa reativação da pluripotência pela célula, e aumentar a eficiência desse processo. Sabe-se que vários eventos devem ocorrer de forma seriada e coordenada para que a aquisição da pluripotência seja atingida com sucesso.

As células iPSC são semelhantes às células tronco embrionárias, possuindo as características de potencial de diferenciação e capacidade ilimitada de autorrenovação. Além disso, essas células compartilham tanto as características de perfil epigenético, como por exemplo a desmetilação dos genes promotores da pluripotência e a reativação do cromossomo X em células derivadas de fêmeas, quanto o perfil de expressão gênica, expressando os fatores de pluripotência *OCT4*, *SOX2* e *NANOG*, dentre outros, e marcadores de pluripotência de superfície celular como SSEA-1 (MAHERALI; HOCHEDLINGER, 2008).

A ativação dos fatores de transcrição na reprogramação leva a célula a sofrer uma série de alterações. Dentre elas, as alterações no metabolismo celular têm uma importância considerável. Sabe-se que as células somáticas utilizam primariamente a fosforilação oxidativa mitocondrial para suprir suas demandas energéticas, enquanto que as células pluripotentes, com taxa de proliferação bem mais alta, preferem utilizar a via glicolítica (KONDOH et al., 2007a; PRIGIONE et al., 2010b; VANDER HEIDEN; CANTLEY; THOMPSON, 2009).

De forma compatível a essa mudança no metabolismo energético, uma mudança na morfologia mitocondrial também é observada nessas células. As iPSC apresentam menos mitocôndrias do que a célula somática, com uma morfologia mais arredondada e com poucas cristas mitocondriais, compatível com mitocôndrias de baixa funcionalidade. Já as células somáticas possuem mitocôndrias mais funcionais, em maior número, organizadas em uma rede de mitocôndrias e com morfologia tubular e rica em cristas mitocondriais (FOLMES et al., 2011; VARUM et al., 2011). Essa mudança na morfologia das mitocôndrias acontece por meio da dinâmica mitocondrial, que consiste nos processos de fissão (ou fragmentação, onde a

mitocôndria se divide) e fusão (processo no qual as mitocôndrias se fundem, aumentando seu tamanho e função) (SCOTT; YOULE, 2016).

Tais alterações ao longo do processo de reprogramação sofrem influência da tensão de oxigênio, mediada pela família *HIF*. Quando colocadas em hipóxia, as células ativam o *HIF* na tentativa de manter a homeostase celular, através da alteração das vias metabólicas intracelulares, com a ativação da transcrição de genes envolvidos com o metabolismo energético, autofagia, inibição da tradução, eritropoiese e angiogênese (DUNWOODIE, 2009; HAWKINS; SHARP; MCKAY, 2013). Além disso, fatores de transcrição relacionados à pluripotência como o *REX-1* tem influência direta na ativação do *HIF* (SON et al., 2013a), e o *HIF*, por sua vez, está relacionado a regulação de *NANOG*, *OCT4* e *SOX2*, aumentando a expressão de tais genes (COVELLO et al., 2006; PETRUZZELLI et al., 2014). Portanto, o controle da atmosfera de oxigênio pode ser usado para favorecer a reprogramação, através da ativação dos genes relacionados à pluripotência e ao metabolismo de glicose.

Além disso, poucos estudos foram realizados na espécie equina para a obtenção de células eiPSC, e nenhum deles levou em conta a influência da tensão de oxigênio na reprogramação e manutenção dessas células em cultivo (revisado no Capítulo 1, item 2.4). Tendo em vista que consideráveis diferenças podem existir entre as espécies, é importante que estudos na espécie equina sejam realizados para melhorar a eficiência na obtenção, manutenção e posterior diferenciação dessas células para uma futura aplicação *in vivo*, ou estudos *in vitro*.

No presente capítulo, propõe-se a realização de um experimento no qual avaliações seriadas foram feitas a fim de avaliar a influência do oxigênio no processo de reprogramação celular, através da análise da taxa de eficiência de reprogramação celular e da expressão gênica dos genes relacionados a pluripotência (*OCT4*, *SOX2*, *REX-1* e *NANOG*), ao metabolismo da glicose (*GAPDH*, e *PFKM*), os processos de fusão e fissão mitocondriais (*MFN1* e *DNM1L*), e a resposta da célula à baixa tensão de oxigênio (*HIF1 α* , *HIF2 α* , e *VEGFA*).

2. Material e métodos

2.1. Obtenção dos fibroblastos da pele

Para todos os experimentos descritos na presente tese biópsias de pele e isolamento dos fibroblastos foram realizados, como descrito a seguir. As biópsias foram realizadas em um macho com 21 anos de idade (n=1) e três machos com idades entre 3 e 5 anos (n=3). Previamente à incisão para coleta da pele, os animais foram tranquilizados com detomidina (0,002mg/kg) e pontos de bloqueio local foram realizados com lidocaína, sendo utilizados em média 3ml por cada ponto de bloqueio, sem ultrapassar a dose tóxica de 7mg/kg. Após higienização da área, uma incisão circular de 2cm de diâmetro foi realizada na região metacarpofalângea dos dois membros torácicos de cada um dos animais e os fragmentos de pele retirados foram colocados em tubos de coleta com 25ml de DPBS (#14190250 Thermo Fisher) acrescidos de 2% de penicilina/estreptomicina (#15140122 Thermo Fisher) e mantidos a 4°C.

Após a coleta, as amostras de pele foram lavadas em DPBS e submetidas à digestão enzimática por colagenase IV (#C2674 Sigma-Aldrich) durante 3h em temperatura de 38,5°C. Os fibroblastos foram então divididos em garrafas de cultivo celular de 25cm² colocadas em incubadoras com 5% CO₂ em ar atmosférico (aproximadamente 20% de O₂ - fibroblastos em alta tensão de O₂ ou FA) ou em 5% O₂, 5% CO₂ e 90% N₂ (fibroblastos em baixa tensão de O₂ ou FB), ambos em 38,5°C. Para garantir a concentração ideal de oxigênio para os FB, uma incubadora HERA Cell VIOS 160i (Thermo Scientific) foi utilizada e as concentrações dos gases atmosféricos analisadas semanalmente com um "*Bacharach combustion test kit*", e fluido indicador *Fyrite* 0-21% e 0-60% O₂. Os fibroblastos foram cultivados em meio IMDM (#12200036 Thermo Fisher) contendo 10% de soro fetal bovino (#SH30071.03 HyClone), 0,1 mM de MEM aminoácidos não essenciais (#11140050 Thermo Fisher) e 1% penicilina/estreptomicina (#15070063 Thermo Fisher).

As linhagens celulares foram expandidas e, antes de atingirem a confluência, foram passadas e crio preservadas, sendo essa realizada com meio de cultivo de fibroblasto acrescido de 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) (#D4540, Sigma-Aldrich).

2.2. Produção de partículas lentivirais

Para a reprogramação à pluripotência, um vetor policistrônico lentiviral excisável comercial (STEMCCA, Millipore) foi utilizado. Primeiramente, a clonagem e expansão desse vetor e dos plasmídeos auxiliares necessários foi realizada. Para tanto, bactérias contendo os plasmídeos (hOSKM, VSVG, TAT, REV e Hgpm2), previamente conservadas em glicerol, foram cultivadas em meio LB (#L3022, Sigma-Aldrich) a 37°C e agitação constante em 250rpm. Após a expansão o meio LB foi centrifugado para formação do pellet de bactérias. Os plasmídeos foram extraídos através do kit EndoFree Plasmid Maxi Kit (Qiagen #12362), segundo instruções do fabricante. A produção viral foi então realizada utilizando Lipofectamina 3000 (#L3000015 Thermo Fisher). Para tanto, 5×10^6 células 293FT foram cultivadas em garrafas de 75 cm² no dia anterior a lipofecção, dia no qual apresentavam 90% de confluência. Foram utilizados 12 µg dos vetores hOSKM (contendo os fatores *OCT4*, *SOX2*, *KLF-4* e *c-MYC* humanos), 1,2 µg de cada vetor auxiliar (TAT, REV e Hgpm2), e 2,4 µg do vetor auxiliar de empacotamento VSVG. A lipofecção foi incubada por 6 horas, o meio de cultivo contendo as partículas virais foi recuperado das placas com 24, 48 e 72 horas, filtrado e conservado a 4°C até sua centrifugação em ultracentrífuga (Beckman Coulter) por 1h40min a 48960g no rotor SW28. Após a centrifugação, o sobrenadante foi dispensado e o pellet com as partículas virais foi mantido por 2 horas em geladeira. O pellet foi homogeneizado com o restante do sobrenadante que se manteve no tubo e o concentrado viral foi então imediatamente utilizado para transdução nos fibroblastos ou congelado em freezer a -150°C para posterior utilização.

2.3. Transdução viral

Para a reprogramação, os fibroblastos cultivados em alto O₂ (FA) e baixo O₂ (FB) de um macho de 3 anos de idade foram cultivados em placas de 6-poços (2×10^4 células por poço), sempre respeitando as tensões de oxigênio de cada grupo durante o processo. Durante o processo de reprogramação avaliações seriadas foram realizadas por RT-qPCR, sendo elas: no dia da transdução viral (D0), e depois a cada 3 dias (D3, D6, D9, D12, D15 e D18). No D0 o vetor lentiviral foi colocado nos fibroblastos para a transdução overnight na presença de 8 µg/ml de polibreno (brometo de hexadimetrina, #H9268 Sigma-Aldrich). As células foram suplementadas

com 0,5 mM de butirato de sódio (#B5887, Sigma-Aldrich) entre os dias 3 (D3) e 12 (D12) após a transdução viral. Após seis dias (D6), as células foram recuperadas, contadas, e $4,75 \times 10^4$ células por poço foram passadas para placas já contendo monocamada de fibroblastos embrionários fetais murinos (MEF) tratados com mitomicina C (#M4287 Sigma-Aldrich). Também no D6 o terceiro grupo foi criado: metade das placas de 6 poços do grupo A (20% O₂) foram passadas para baixo oxigênio (5% O₂) criando o grupo alto-para-baixo (AB). Sendo assim, os grupos A e AB originaram-se dos fibroblastos FA e o grupo B se originou dos fibroblastos FB. O delineamento experimental com análises e coletas, por dia, está representado na Figura 1. No dia 6, o meio de cultivo foi trocado por meio de cultivo de iPSC, consistindo de DMEM/F12 KO (#12660-012 Thermo Fisher) contendo 20% *knockout serum replacement* (#10828010 Thermo Fisher), 2 mM de GlutaMAX (#35050061 Thermo Fisher), 0,1 mM de MEM aminoácidos não essenciais (#11140050 Thermo Fisher), 0,1 mM 2-mercaptoethanol (#M6250 Sigma-Aldrich), 1% penicilina/estreptomicina (#15070063 Thermo Fisher) e 10 ng/ml bFGF (#100-18B, PeproTech). Em todas as etapas o respectivo meio de cultivo foi trocado a cada dois dias.

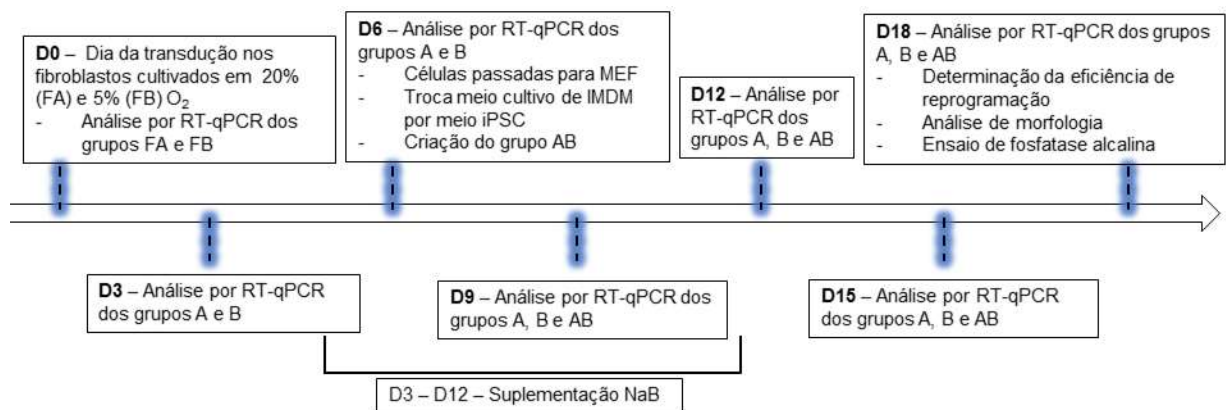


Figura 1. Delineamento experimental demonstrando datas e coletas realizadas para o experimento, em cada dia.

2.4. Avaliação da reprogramação à pluripotência

As células foram observadas diariamente até o aparecimento das primeiras colônias. As eiPSC foram primeiramente reconhecidas por sua morfologia típica. A

contagem do número de colônias foi feita a cada dois dias, à medida que elas se formavam, e a eficiência da reprogramação foi determinada para todos os grupos no dia 18, sendo calculada pela razão do número de colônias formadas (observadas pela morfologia típica de iPSC) pelo número de células inicialmente colocadas em cultivo. A coloração por fosfatase alcalina (AP) foi realizada com o kit “leukocyte alkaline phosphatase kit” (#86R, Sigma-Aldrich), segundo instruções do fabricante.

2.5. RT-qPCR

Os genes relacionados à pluripotência (*OCT4*, *SOX2*, *REX-1* e *NANOG*) metabolismo celular (*GAPDH* e *PFKM*), fusão e fissão mitocondriais (*MFN1* e *DNM1L*), baixa tensão de oxigênio (*HIF1 α* , *HIF2 α* , e *VEGFA*) e o vetor viral (hOSKM) foram avaliados durante a reprogramação, sendo coletado para tal avaliação um poço da placa de seis poços de cada um dos grupos (A, B e AB), submetidas ao processo de reprogramação. Os primers foram desenhados usando a ferramenta *Primer-BLAST*, sendo as sequências de referência acessadas pelo *GenBank* (ambos disponíveis online em www.ncbi.nlm.nih.gov). Os primers foram desenhados especificamente para a espécie equina, não amplificando genes de camundongo, presentes na monocamada (MEF), ou genes humanos (presentes no vetor viral). As sequências dos primers estão listadas na **Tabela 1**.

Para a realização do RT-qPCR, as células foram coletadas e congeladas, mergulhando-as em nitrogênio líquido. O mRNA foi extraído com TRIzol (#15596026, Thermo Fisher). Brevemente, o TRIzol foi adicionado às amostras e após 5 minutos clorofórmio foi adicionado e deixado por 3 minutos. As amostras foram centrifugadas a 15.000 g por 15 minutos a 4°C, e a fase translúcida foi separada e colocada em um novo tubo. O mesmo volume da fase translúcida foi adicionado, em isopropanol, e as amostras foram mantidas a -80°C por 2 horas. A amostra foi centrifugada e 1ml de etanol a 75% foi adicionado. Após centrifugação e secagem do pellet por evaporação, a quantificação do mRNA foi realizada através de um espectrofotômetro NanoDrop 2000/2000 (Thermo Scientific). O cDNA foi então sintetizado usando o kit “high-capacity reverse transcription kit” (#4368814 Thermo Fisher), de acordo com as instruções do fabricante.

Tabela 1. Sequências dos primers desenhados, usados para as análises de pluripotência (*OCT4*, *REX-1*, *SOX2* e *NANOG*); vetor viral (*hOSKM*); fissão e fusão mitocondriais (*DNM1L* e *MFN1*); hipóxia (*HIF1 α* , *HIF2 α* e *VEGFA*); metabolismo da glicose (*PFKM* e *GAPDH*); e genes de referência (*HPRT1* e *PPIA*).

Genes alvo	Primer Forward	Primer Reverse	Tamanho do produto	Referência NCBI
<i>OCT4</i>	AGAAGGACGTGGTACGA GTG	GTGCCAGGGGAAAGGATA CC	138	XM_00149010 8.6
<i>REX-1</i>	TGGAGGAATATCCAGCG TTGA	GCTTTCCCACATTCTGCAC ATA	213	XM_00148951 9.4
<i>SOX2</i>	ACAGCATGGAGAGAAAC CCG	GTGGACGGGATTGGTGTT CT	101	XM_02362336 1.1
<i>NANOG</i>	CTCGATTTGGGCAGTGG CTA	CGAGCCCTCTAGAATCCG TC	117	XM_02364309 3.1
<i>hOSKM</i>	AAGAGGACTTGTGCGG AAA	GGCATTAAAGCAGCGTAT CC	182	(SOMMER et al., 2009)
<i>DNM1L</i>	AGATGTGCCGGTTCCTG TAG	CTCTCTGTTACGGGCAG AC	50	XM_02364334 6.1
<i>MFN1</i>	GGCAAATGTGCCCTCT TGA	TCTGTACCCGGACTGTCC AC	57	XM_02362333 6.1
<i>HIF1α</i>	CACCAGAGCCTAACAGT CCC	AGTCCGTGTCCTGAGTGG AA	141	XM_02362785 7.1
<i>HIF2α</i>	GTTGTCAGGCATGGCAA GTC	TCAATTCGGGCAGCAGGT AA	65	XM_00560000 5.3
<i>VEGFA</i>	TGCGGATCAAACCTCAC CAA	GCCCACAGGGATTTTCTT GC	114	NM_00108182 1.1
<i>PFKM</i>	GCTCAGTGAGACAAGGA CCC	TTCCTGTCAATCGCACCCCT C	72	NM_00108192 2.2
<i>GAPDH</i>	GTTTGTGATGGGCGTGA ACC	ATCGCGCCACATCTTCCC	205	NM_00116385 6.1
<i>PPIA</i>	ATGTGTCAGGGTGGTGA CTTC	GGACCGGTGTGTTTCAGG AT	104	XM_00149694 3.5
<i>HPRT1</i>	GCTTCCTCTTCCTCAGA CGG	TACTAATCACGACACTG GGG	80	XM_02363446 4.1

A quantificação relativa dos transcritos foi realizada utilizando um aparelho 7500 Fast Real-Time PCR System, com PowerUP SYBR Green Master Mix (#A25777, Thermo Fisher). As reações foram realizadas a 95°C por 15 minutos e depois por 40 ciclos a 95°C por 15 segundos, 60°C por 5 segundos e 72°C por 2 minutos. A curva de “melting” foi analisada para determinar a especificidade da amplificação dos produtos, e todas as reações foram realizadas em duplicata. Os valores do “cycle threshold” (Ct) dos genes alvo foram normalizados pela média geométrica do valor do Ct dos genes de referência HPRT1 e PPIA, e sendo assim tornados relativos aos genes de referência, a expressão gênica em unidades arbitrárias foi calculada usando a equação $2^{-(\Delta CT)}$. Células de um animal, cultivadas em ar atmosférico

(aproximadamente 20% O₂), em baixo oxigênio (5% O₂), e células cultivadas inicialmente em 20% O₂ e passadas para 5% O₂ foram avaliadas. Os produtos do RT-qPCR foram sequenciados para garantir sua especificidade.

3. Resultados e Discussão

3.1. Reprogramação à pluripotência

As primeiras colônias de eiPSC apareceram nas placas 10, 11 e 14 dias após a transdução viral nos grupos B, A e AB, respectivamente. As células foram primeiramente identificadas por sua morfologia: colônias bem definidas e contendo células com uma alta proporção núcleo citoplasmática. Foi possível observar que as colônias formadas no grupo AB possuíam menor tamanho. No grupo B, as colônias formadas possuíam mais células (Figura 3), e suas bordas eram melhor definidas que no grupo A. Porém, as bordas das colônias de nenhum dos grupos eram perfeitamente definidas. A eficiência do processo de reprogramação foi de 1,67%, 0,08% e 0,025%, nos grupos B, A e AB, respectivamente (Figura 2). Anteriormente a maior eficiência da reprogramação em baixo oxigênio já foi demonstrada em células de humanos e camundongos, corroborando com os resultados encontrados no presente trabalho (YOSHIDA et al., 2009a).

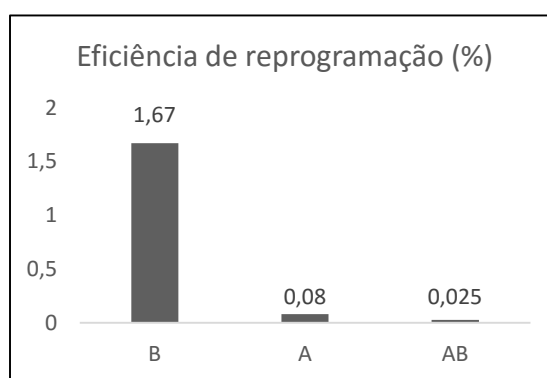


Figura 2. Gráfico representando a eficiência da formação das colônias eiPSC em 5%O₂ (B), 20% O₂ (A) e 20%-para-5% O₂ (AB).

As colônias do grupo B eram positivas para fosfatase alcalina em passagem 0 (P0), porém, devido à baixa eficiência de reprogramação, com poucas colônias

formadas nos grupos A e AB, o teste de fosfatase alcalina não foi realizado nesses grupos (Figura 3).

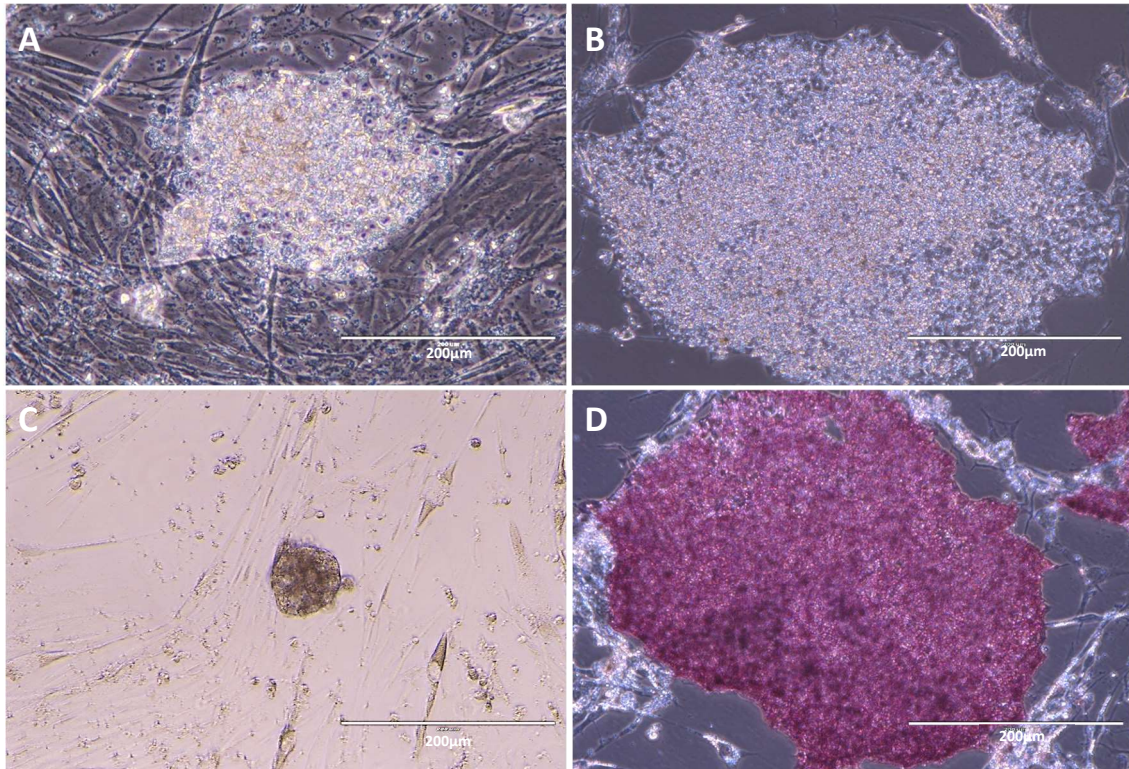


Figura 3. Colônias formadas nos grupos A (A), B (B) e AB (C) e fosfatase alcalina realizada nas células do grupo B (D). Barras de escala: 200µm.

3.2. Avaliação por RT-qPCR durante a reprogramação

3.2.1. Avaliação dos genes de pluripotência

As avaliações seriadas dos valores de expressão gênica ao longo da reprogramação celular demonstraram alterações nos valores de expressão dos genes relacionados à pluripotência, metabolismo de glicose, fusão e fissão mitocondriais e baixa tensão de oxigênio. É importante ressaltar que no presente capítulo as células de somente um animal foram avaliadas, não sendo possível realizar uma comparação estatística entre os grupos, e somente a comparação entre os valores brutos encontrados foi realizada, sendo essa uma avaliação descritiva, e não estatística, das mudanças na expressão gênica encontradas. Entendemos que estudos com mais animais são necessários para uma análise adequada da repetibilidade dos resultados encontrados, porém, devido a ocorrência de eventos indômitos ao longo do

desenvolvimento do presente experimento, a realização de tais análises foi impossibilitada. É importante ressaltar que o grupo AB foi criado somente no D6 e, portanto, sua primeira análise de RT-qPCR foi feita no D9. Porém, sabendo que o grupo AB saiu do grupo A, a análise do D6 do grupo A foi considerada para a discussão do grupo AB, ressaltando que os dias D6 (grupo A) para D9 (grupo AB) refletem a transição entre atmosfera gasosa, com alteração da concentração de oxigênio de 20% para 5% em D9. Os resultados da expressão gênica estão representados na Figura 4.

Para os genes de pluripotência, foi possível observar que no D0 (análise dos fibroblastos FA e FB, antes da transdução viral) as células não expressavam *OCT4*, *REX-1*, *SOX2* e *NANOG*. Os transcritos desses genes foram encontrados no D9, à exceção do *SOX2* que foi encontrado no D6. Após o início da expressão, houve aumento, pequeno ou acentuado, para todos os genes e todos os grupos, com diferenças entre genes e grupos, o que demonstra que as células responderam, em um momento inicial, à inserção viral e começaram a expressar genes endógenos de pluripotência nesse período. Porém, de modo geral, nos grupos A e AB essa expressão logo diminuiu sugerindo que as células não foram capazes de completar a reprogramação, o que foi refletido na menor formação de colônias eiPSC nesses grupos, e impossibilidade de manutenção dessas colônias após o repique manual para obtenção de linhagens clonais.

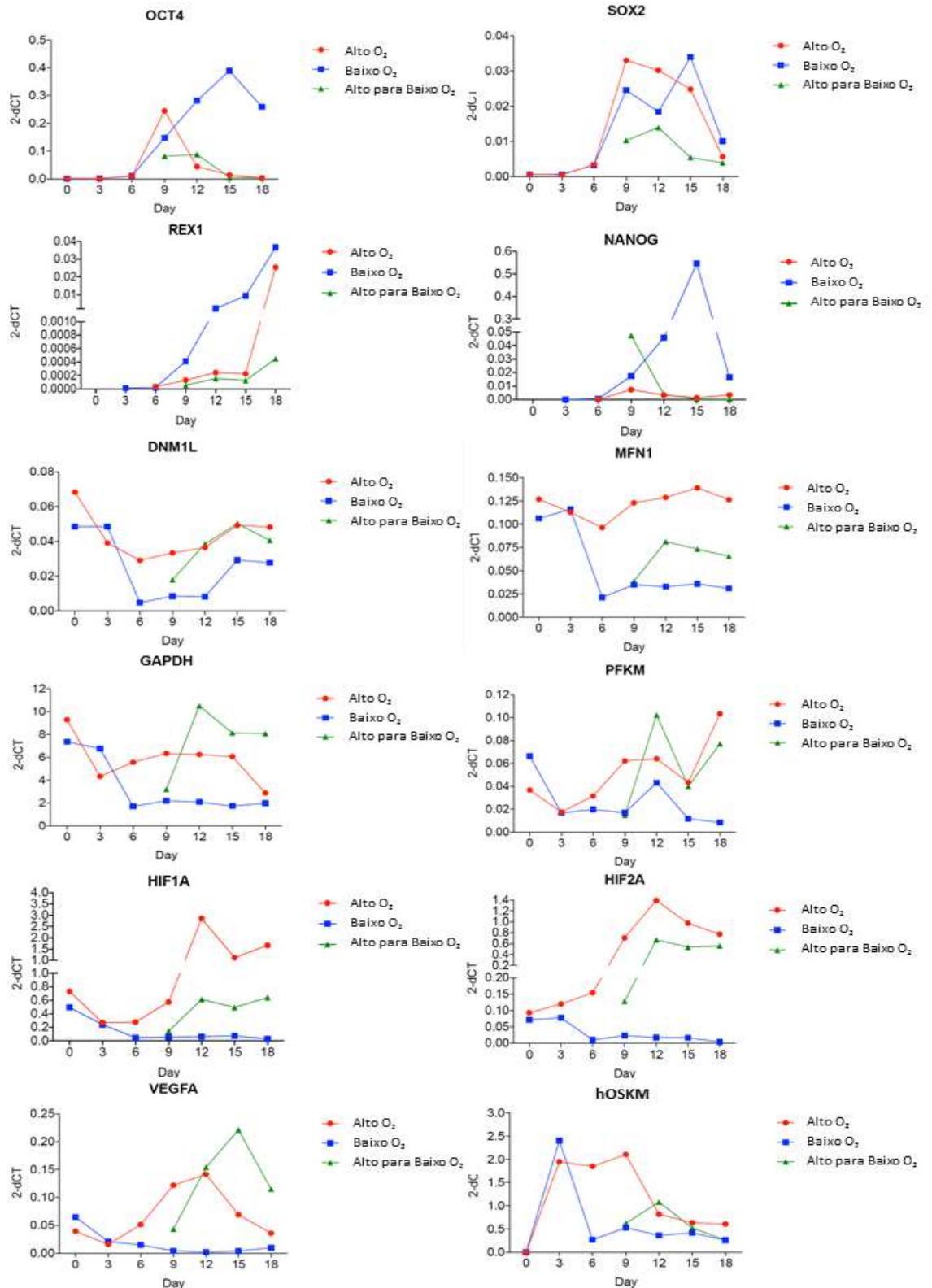


Figura 4. Gráficos representando as mudanças da expressão dos genes de pluripotência (*OCT4*, *SOX2*, *REX-1* e *NANOG*), fusão e fissão mitocondriais (*DNM1L* e *MFN1*), metabolismo de glicose (*GAPDH* e *PFKM*), baixa tensão de oxigênio (*HIF1 α* , *HIF2 α* e *VEGFA*) e do vetor viral (*hOSKM*).

A expressão do gene *OCT4* permaneceu próxima de zero até o D6, nos grupos A e B, apresentando aumento dos valores somente no D9, nos três grupos, sendo mais expresso no grupo A, seguido pelo grupo B e grupo AB. Após D9, houve uma queda dos valores de expressão desse gene nos grupos A e AB, mas não no grupo B (Figura 3). Estudos anteriores demonstram que o *OCT4* é expresso em células pluripotentes embrionárias e sua expressão diminui rapidamente com a diferenciação celular. Sabe-se, também, que a regulação da expressão do *OCT4* deve ocorrer de forma precisa, sendo que tanto a diminuição da expressão desse fator, quanto seu aumento excessivo levam a diferenciação celular (NICHOLS et al., 1998; NIWA; MIYAZAKI; SMITH, 2000; SHI; JIN, 2010). Em acordo com esses resultados, o grupo B, que manteve a expressão de *OCT4*, foi capaz de se reprogramar com maior sucesso, ao passo que os grupos A e AB apresentaram queda na expressão de *OCT4*, o que se demonstrou incompatível com a reprogramação celular completa. Sem a expressão adequada desse gene, portanto, as colônias não se sustentaram no cultivo.

Outra evidência da reprogramação incompleta das colônias dos grupos A e AB é a baixa expressão de *NANOG*, sendo no grupo A em todas as análises e no grupo AB a partir de D12. Esse fator de transcrição não é um dos quatro fatores de Yamanaka (TAKAHASHI; YAMANAKA, 2006), necessários para a indução da pluripotência, porém sua presença é indispensável para a manutenção da mesma. Células que não podem produzir *NANOG* iniciam o processo de reprogramação, mas não o completam (SILVA et al., 2009). É interessante notar que logo após a mudança da tensão de oxigênio (D6 para D9) houve um aumento da expressão de *NANOG* para o grupo AB, porém, esses valores aumentados não se mantiveram (Figura 3).

Já foi descrito na literatura que, em camundongos, a reprogramação ocorre de forma gradual, com ativação sequencial dos marcadores de pluripotência, sendo primeiramente ativada a fosfatase alcalina (dia 3), seguida pelo *SSEA-1* (dia 9), e finalmente *OCT4* e *NANOG* somente no dia 16 (BRAMBRINK et al., 2008). No presente trabalho observamos o aumento dos valores de *OCT4* e *NANOG*, já a partir do D6, o que pode ser devido a uma variação interespecíes, e nos grupos A e AB esse aumento não se manteve, sinalizando a reprogramação incompleta de tais grupos. No dia 18, é possível observar que houve uma diminuição geral dos valores de expressão dos genes relacionados à pluripotência no grupo B, o que indica que o momento da

passagem (retirada das células do poço de cultivo, divisão da colônia por métodos mecânicos ou enzimáticos e passagem dessas células a um novo poço) das colônias formadas em P0 (passagem 0) a novos poços de cultivo (P1 – passagem 1) é importante, sendo que se as colônias permanecerem por muito tempo sem serem passadas a uma nova placa de cultivo, elas podem se diferenciar.

O *SOX2* apresentou leve aumento em D6, e um grande aumento em D9 nos grupos A e B, e menor aumento no grupo AB. Depois disso, sua expressão teve queda gradual no grupo A e um leve aumento seguido de queda no grupo AB. O grupo B apresentou um aumento seguido de queda (Figura 3). É interessante notar que o grupo AB apresentou expressão bem mais baixa que os grupos A e B. Um estudo anterior descreveu que o *SOX2* pode ter baixa expressão em células pluripotentes induzidas, e a indução da pluripotência em células neurais sem o uso do *SOX2* se mostrou eficiente. Segundo os autores, isso pode ser devido ao fato de células neurais já expressarem naturalmente o *SOX2* (SILVA et al., 2008). Corroborando com essa hipótese, Polo e colaboradores já demonstraram que a origem da célula pode influenciar o perfil das iPSC geradas. Esses autores demonstraram que fibroblastos, células hematopoiéticas e células miogênicas dão origem à células iPSC com perfis epigenéticos e transcricionais distintos (POLO et al., 2010).

Estudos anteriores relatam a presença de *SOX2* em queratinócitos diferenciados, em equinos, e em populações de células obtidas da pele, em humanos (ESTEVES et al., 2014; LAGA et al., 2010). Porém, no presente estudo não foi encontrada expressão de *SOX2* nos fibroblastos de equino cultivado em alto ou baixo oxigênio. Outro estudo descreve que iPSC derivadas de fibroblastos de camundongo apresentaram aumento mais tardio de *SOX2* do que o encontrado no presente estudo (POLO et al., 2012). Portanto, é importante considerar que podem existir diferenças entre as espécies para o momento de início de expressão desse gene após a reprogramação à pluripotência.

O *REX-1* foi detectado a partir do D9 e sua expressão aumentou nas análises seguintes em todos os grupos, sendo um aumento pronunciado no grupo B, um aumento leve no grupo A até D15 e depois um aumento pronunciado nesse grupo, e leve aumento no grupo AB. A expressão desse gene era bem mais baixa nos grupos A e AB comparado ao grupo B, porém em D18 o grupo A apresentou um aumento

considerável (Figura 3). É interessante notar que o *REX-1* é encontrado em células eiPSC e células embrionárias de equino, mas não em célula mesenquimais e queratinócitos sendo, portanto, considerado um marcador mais específico de pluripotência, para a espécie equina, do que o *OCT4*, *NANOG* ou *SOX2* (ESTEVEES et al., 2014). Além disso, o *REX-1* tem influência, também, sobre o processo de fissão mitocondrial, favorecendo a reprogramação através da ativação da ciclina B, e consequentemente do complexo CDK1/Ciclina B, que leva à fosforilação de Drp1-S579 e à fragmentação mitocondrial (SON et al., 2013b).

3.2.2. Expressão do vetor lentiviral

É possível observar que o vetor lentiviral começou a ser expresso, e teve seu pico de expressão em D3. O grupo A manteve a expressão de hOSKM alta até D9 e depois apresentou uma diminuição acentuada, mantendo, porém, seus níveis de expressão mais altos do que o grupo B. O grupo AB apresentou queda acentuada considerando a passagem de alto oxigênio no D6 (análise do grupo A) para baixo oxigênio no D9 (análise do grupo AB)(Figura 3), sugerindo que o oxigênio exerceu influência nos valores de expressão do hOSKM para o grupo AB. Outro indicativo de que o oxigênio pode ter influenciado de alguma forma na expressão de hOSKM foi percebida na diminuição dos valores de hOSKM no grupo de B antes do grupo A, sendo esses valores mantidos baixos no grupo B a partir do D6. É interessante ressaltar que estudos anteriores descrevem que para a reprogramação completa ocorrer deve haver silenciamento dos vetores exógenos inseridos e início da expressão dos fatores de transcrição endógenos, relacionados à pluripotência (HOTTA; ELLIS, 2008).

É interessante observar que no D3 o vetor viral estava sendo expresso igualmente entre os grupos, porém, a partir do D6 a expressão desse vetor diminuiu no grupo B, o que pode indicar alguma influência da atmosfera de oxigênio no silenciamento dos genes exógenos. Ainda, em comparação com as análises feitas logo após a transdução viral, há uma diminuição da expressão do vetor viral em D6 no grupo B e em D12 nos grupos A e AB, indicando que há um silenciamento parcial dos genes exógenos após a reprogramação, o que é desejável para se obter células completamente reprogramadas.

A expressão do vetor lentiviral é motivo de algumas discussões, já que se considera que a reprogramação completa ocorre, dentre outras características, quando a célula passa a expressar os fatores de transcrição endógenos, e silencia os exógenos (HOTTA; ELLIS, 2008). Porém, na espécie equina, não houve nenhum relato de que as células continuaram a apresentar características de pluripotência mesmo após o silenciamento dos vetores exógenos. Isso é, inclusive, considerado como uma das explicações para o fato de não ter sido possível, até o momento, a reprogramação de células equinas através de sistemas não integrativos, já que tais sistemas não garantem a exposição constante da célula aos fatores de transcrição exógenos. Além disso, é importante considerar que para se ter maior segurança na aplicação de células eiPSC como um tratamento, essas células precisam silenciar o vetor viral antes da aplicação, ou esse vetor precisa ter sido removido (DONADEU, 2014; OKANO et al., 2013).

3.2.3. Remodelamento mitocondrial

Além da ativação de genes de pluripotência, a célula deve passar por várias outras alterações para a aquisição da pluripotência. Um aspecto importante desse remodelamento é a dinâmica mitocondrial, que consiste nos processos de fissão e fusão mitocondriais (PRIETO et al., 2020). Portanto, no presente trabalho avaliamos a expressão dos genes *DNM1L* (também denominado *DRP1*) e *MFN1*. O gene *DNM1L* se encontrava expresso nos fibroblastos dos grupos A e B (FA, análise do D0 do grupo A e FB, análise do D0 do grupo B), antes da reprogramação. O grupo A apresentou queda na expressão desse gene até D6, e depois aumento até D18. O grupo B apresentou queda pronunciada na expressão em D6, e depois a expressão manteve-se baixa até D12, quando aumentou novamente. Já o grupo AB apresentou queda da expressão de *DNM1L* no ponto de mudança da atmosfera de oxigênio, aumento do D9 ao D15 e leve queda de D15 a D18. A expressão desse gene se manteve mais alta no grupo A do que no grupo B em quase todas as análises, exceto pelo D3 (Figura 3).

O gene *DNM1L* está relacionado ao processo de fissão mitocondrial (SMIRNOVA et al., 1998), essencial ao processo de reprogramação (PRIETO et al., 2016a), porém, ao contrário do que se esperava, sua expressão estava baixa no grupo

B quando as primeiras colônias se formaram nesse grupo. Nos grupos A e AB, nos quais esse gene estava mais expresso do que no grupo B, houve baixa eficiência na formação de colônias. Embora um estudo tenha demonstrado que a proteína expressa pelo *DNM1L* seja dispensável para a reprogramação em camundongos (WANG et al., 2014), vários outros trabalhos demonstram que sua inibição é prejudicial à reprogramação, enquanto que sua ativação por fosforilação favorece a reprogramação (PRIETO et al., 2016b; SON et al., 2015, 2013b; VAZQUEZ-MARTIN et al., 2012).

No experimento realizado no capítulo 3 do presente trabalho, esse gene não apresentou mudanças significativas entre os grupos de eiPSC A, B e AB ou comparando os fibroblastos com as eiPSC. Embora o processo de fissão mitocondrial seja indispensável o processo de reprogramação, a expressão de *DNM1L* não se correlacionou à reprogramação à pluripotência durante o processo, como demonstrado no presente capítulo, e nem após a reprogramação, nas eiPSC, como demonstrado no capítulo 3, indicando que possivelmente outros genes ligados ao processo de fissão sejam mais atuantes na reprogramação, ou que, embora tenha ocorrido o processo de fissão, ele isoladamente não foi suficiente para garantir a reprogramação celular.

O outro processo mitocondrial importante é a fusão mitocondrial, no qual o gene *MFN1* tem importante papel. Esse gene encontrava-se expresso nos FA e FB. No grupo B houve uma queda pronunciada entre D3 e D6 e depois a expressão permaneceu baixa. No grupo A uma leve queda foi observada entre D0 e D6, depois um leve aumento ocorreu até o D15, e leve queda até D18. O *MFN1* apresentou expressão mais alta no grupo A do que no grupo B durante quase todo o tempo. O grupo AB apresentou queda na troca da atmosfera gasosa entre D6 e D9, depois leve aumento seguido de leve queda (Figura 3). O gene *MFN1* é responsável pelo processo de fusão mitocondrial, processo esse que pode impedir a reprogramação à pluripotência (SON et al., 2015; VAZQUEZ-MARTIN et al., 2012).

No capítulo 3 do presente trabalho, embora não tenham sido identificadas diferenças significativas entre as eiPSC dos grupos A, B e AB a expressão de *MFN1* estava mais baixa nas eiPSC do que nos fibroblastos antes da reprogramação, e a queda da expressão desse gene já foi correlacionada a maior eficiência no processo

de reprogramação (SON et al., 2015; VAZQUEZ-MARTIN et al., 2012). Da mesma forma, encontramos no presente capítulo, uma alta expressão de *MFN1* nas células do grupo A, que teve menor taxa de reprogramação, e provavelmente essa expressão teve influência negativa na reprogramação à pluripotência.

3.2.4. Mudanças no metabolismo energético da célula

Outro acontecimento importante para a reprogramação à pluripotência, é a mudança no metabolismo energético da célula (FOLMES et al., 2011; KONDOH et al., 2007b; SPERBER et al., 2015). Estudamos, portanto, os genes *PFKM*, uma fosfofrutoquinase atuante no segundo passo da glicólise (LI; GU; ZHOU, 2015), e o *GAPDH*, gene que age no sexto passo do processo de glicólise (NICHOLLS; LI; LIU, 2012). O gene *GAPDH* estava presente nos grupos FA e FB, com maiores valores em FA. Após D0, a expressão de *GAPDH* diminuiu em ambos os grupos, sendo, portanto, os valores de expressão nas células pluripotentes menor do que a expressão em fibroblastos. Contrariamente, um estudo anterior demonstrou que a atividade enzimática de *GAPDH* foi maior em mESC (células pluripotentes) do que em fibroblastos embrionários de camundongo (MEF) (KONDOH et al., 2007b).

Para o grupo A houve queda na expressão de *GAPDH* em D3, depois leve aumento e queda entre D15 e D18. O grupo B apresentou queda pronunciada entre D3 e D6 e depois se manteve baixo. O grupo AB apresentou queda quando colocado em baixo oxigênio, no D9, depois um aumento pronunciado e leve queda de D12 a D18 (Figura 3). Esse aumento acentuado encontrado após a mudança na atmosfera de oxigênio indica uma reação das células, com alteração da expressão de genes ligados ao metabolismo (*GAPDH* e *PFKM*). Em quase todas as análises o grupo A apresentou expressão mais alta que o grupo B, e o grupo AB apresentou expressão mais alta do que o grupo A. Esse resultado isoladamente demonstra uma aparente correlação negativa entre os maiores valores encontrados para *GAPDH* e a eficiência de reprogramação, sendo que o grupo com maior taxa de reprogramação apresentou menores valores de expressão de *GAPDH* e o grupo com menor taxa de reprogramação apresentou maiores valores de expressão de *GAPDH*.

No capítulo 3 do presente trabalho, pode-se observar que as eiPSC do grupo A apresentaram menor expressão de *GAPDH* do que as dos grupos B e AB, em oposição ao encontrado no presente capítulo. De forma similar, os grupos AB e B, que

apresentaram menor expressão de *GAPDH* tiveram maior eficiência de reprogramação que o grupo A. Porém, outros resultados encontrados no capítulo 3 demonstram que a maior eficiência da reprogramação não necessariamente se correlaciona com alta pluripotência das células obtidas.

O gene *PFKM* apresentou maiores valores de expressão no grupo B do que no grupo A, no D0. Ambos diminuíram esses valores até D3, depois o grupo A teve aumento nos valores de expressão com leve queda entre D12 e D15 e aumento entre D15 e D18, mantendo-se com expressão mais alta do que o grupo B. O grupo B manteve-se com expressão baixa, com pequeno pico em D12. O grupo AB apresentou leve queda após passagem para baixo oxigênio, um pico pronunciado em D12, queda no D15 e novo aumento no D18 (Figura 3). Ambos *PFKM* e *GAPDH* são genes relacionados ao processo de glicólise (LI; GU; ZHOU, 2015), e espera-se que com a queda da concentração de oxigênio e mudança do metabolismo celular de fosforilação oxidativa como principal fonte de obtenção de energia pela célula, para glicólise, um aumento na expressão dos genes relacionados à ativação da via glicolítica ocorra. Porém, isso não foi observado, o que pode ser atribuído ao fato de que mesmo com redução da quantidade de oxigênio, 5% de O₂ ainda é suficiente para a ocorrência do processo de respiração celular, sem maiores alterações, já que 5% O₂ é uma condição similar à encontrada *in vivo* em alguns tecidos (CSETE, 2005; IVANOVIC, 2009). No presente estudo a expressão de *PFKM* e *GAPDH* no grupo B foi mais baixa do que a do grupo A, porém não mais baixa que no grupo AB. O estudo de mais genes relacionados à ativação da via glicolítica seria necessário para elucidar a razão de tais observações.

3.2.5. Resposta celular à baixa tensão de oxigênio

Com a diminuição da tensão de oxigênio alguns mecanismos de compensação são ativados pela célula para a manutenção da homeostase, como por exemplo o aumento da produção de fatores de crescimento angiogênicos e a adaptação do metabolismo celular, com aumento da captura de glicose e do processo de glicólise (SEMENZA, 2001). Importantes mediadores dessas alterações em prol da homeostase celular são os fatores induzíveis por hipóxia (do inglês, “hypoxia-inducible factors” - *HIF*). Os *HIF* são heterodímeros formados por uma subunidade *HIF1-β* e três subunidades *HIF-α* (*HIF1α*, *HIF2α* e *HIF3α*) (WANG; SEMENZA, 1993).

No presente trabalho, averiguamos a expressão de *HIF1 α* e *HIF2 α* . O *HIF1 α* estava sendo mais expresso no grupo A que no grupo B no D0. Ambos os grupos apresentaram diminuição da expressão de *HIF1 α* até D6 e depois disso o grupo B permaneceu com expressão consideravelmente baixa desse gene, e o grupo A apresentou aumento progressivo com pico em D12, depois leve queda. O grupo AB apresentou expressão intermediária entre o grupo A e B (Figura 3). O *HIF2 α* estava presente em D0 em ambos os grupos. No grupo A foi possível observar um aumento progressivo na expressão de *HIF2 α* com pico em D12 seguido de leve queda. O grupo B apresentou diminuição da expressão de *HIF2 α* em D6 e depois a expressão desse gene se manteve consideravelmente baixa. O grupo AB acompanhou as variações do grupo A, embora com menores valores de expressão que ele (Figura 3).

Apesar de a família dos *HIF* ser responsável pela resposta das células à hipóxia, as células que sempre permaneceram em 5% de oxigênio não apresentaram maior expressão de nenhum dos *HIF* estudados. Porém, o grupo AB, embora tenha apresentado um leve aumento na expressão dos *HIF* logo após a mudança da atmosfera de oxigênio, ao contrário do grupo B, apresentou aumento da expressão dos *HIF* em 5% O₂. Isso sugere que a célula mantida por um período prolongado em oxigênio baixo se adapta, não necessitando mais das modulações realizadas pelo *HIF*. Além disso, não podemos descartar que existe uma regulação pós transcricional importante para o *HIF*, e a expressão do gene pode não refletir exatamente a ação das proteínas no local (WANG et al., 1995).

Além disso, sabe-se que o *HIF* tem um papel importante na manutenção da pluripotência e no processo de reprogramação celular. A regulação dos *HIF1 α* , *HIF2 α* e *HIF3 α* já foi demonstrada em hESC, sendo que uma baixa tensão de oxigênio é preferida para a manutenção de uma população de hESC altamente pluripotente e proliferativa. Segundo os autores quando o *HIF2 α* é silenciado, uma diminuição significativa na proliferação de hESC e na expressão proteica de *OCT4*, *SOX2* e *NANOG* ocorre (FORRISTAL et al., 2010). Outro estudo demonstra que o *HIF2 α* , se liga aos promotores proximais dos genes *OCT4*, *NANOG* e *SOX2*, em 5% de oxigênio, regulando diretamente esses fatores de transcrição e favorecendo sua expressão (PETRUZZELLI et al., 2014). Sendo assim, de forma contrária ao que seria esperado, os resultados encontrados no presente trabalho foram que a expressão dos genes

HIF no grupo A, que apresentou menor eficiência de reprogramação, foi mais alta que no grupo B, grupo com taxa de reprogramação bem mais alta.

O *VEGFA* é um gene relacionado a neovascularização, e responde à hipóxia, sendo regulado pelos *HIF* (SHWEIKI et al., 1992). Esse gene apresentou leve queda de expressão entre D0 a D3 nos grupos A e B. No grupo A isso se seguiu de um aumento progressivo com pico em D12, depois queda. O grupo B apresentou baixa expressão de *VEGFA* durante todo o período. O grupo AB apresentou aumento progressivo com pico em D15, sendo mais expresso do que no grupo A de D12 a D18 (Figura 3). De forma esperada, esse gene acompanhou as mudanças de expressão dos *HIF* em cada um dos grupos, a exceção do grupo AB, onde a mudança da tensão de oxigênio pareceu ter causado uma resposta de aumento do *VEGFA*.

É importante ressaltar que somente um animal foi avaliado e uma triplicata não foi realizada e, portanto, não foi possível realizar uma análise estatística dos dados obtidos. Porém, a análise de somente um animal é também importante, pois é sabido que diferenças entre animais ocorrem, e a análise de somente um animal possibilita excluir essas possíveis demais influências exercidas pela análise de diferentes indivíduos.

4. Conclusão

Considerando que as células avaliadas eram do mesmo animal, foram isoladas pelo mesmo processo e cultivadas com os mesmos meios de cultivo e procedimentos, a única diferença entre os grupos estudados era a atmosfera de oxigênio na qual foram cultivados. Nesse contexto, as análises descritivas realizadas sugerem aspectos importantes das mudanças na expressão gênica que ocorrem ao longo da reprogramação nas diferentes tensões de oxigênio, o que comprova a primeira parte da nossa hipótese, de que a tensão de oxigênio influencia no processo de reprogramação das células eiPSC.

Podemos verificar que a eficiência de formação de colônias eiPSC em baixo oxigênio, nas condições testadas, foi maior que em alto oxigênio. Além disso, uma correlação dos genes de pluripotência *OCT4* e *NANOG* com a eficiência no processo de reprogramação, sendo que a diminuição desses genes nos grupos A e AB foi

provavelmente a causa da não manutenção da pluripotência e da baixa eficiência de reprogramação desses grupos, parece existir. Para o gene *DNM1L*, relacionado a fissão mitocondrial, aparentemente não houve correlação da expressão com a eficiência de reprogramação. Por sua vez, uma diminuição da expressão de *MFN1*, gene responsável pelo processo de fusão mitocondrial, no grupo B, que teve maior eficiência de reprogramação, foi verificada. Por outro lado, o *GAPDH* mostrou aparente correlação negativa com a eficiência de reprogramação, e os genes *HIF* apresentaram efeito contrário ao esperado, em relação tanto a sua resposta à baixa tensão de oxigênio atmosférico quanto a sua importância para o processo de reprogramação celular.

Em conjunto, esses resultados sugerem que há uma regulação, pela atmosfera de oxigênio, de genes cruciais à reprogramação celular à pluripotência, e que esse é um fator que deve ser levado em conta nos procedimentos de reprogramação e cultivo de células eiPSC.

CAPÍTULO 3 – GERAÇÃO DE DIFERENTES PERFIS DE CÉLULAS TRONCO PLURIPOTENTES INDUZIDAS DE UM EQUINO IDOSO EM 20% E 5% DE OXIGÊNIO

Resumo

A reprogramação celular à pluripotência é influenciada por fatores celulares internos e externos, como condições de cultivo *in vitro* e o processo de envelhecimento. Células pluripotentes de animais adultos são importantes ferramentas não somente para a medicina regenerativa, mas também para as tecnologias reprodutivas. O objetivo do presente estudo foi gerar e manter células tronco pluripotentes induzidas de equino (eiPSC) a partir de fibroblastos de um equino de 21 anos de idade e avaliar o efeito de diferentes tensões de oxigênio (20% O₂, 5% O₂ ou fibroblastos cultivados em 20% O₂ e passados a 5% O₂ no dia 6 após a transdução viral - 20%-para-5% O₂) nessas células. A reprogramação das células foi possível, como demonstrado pela coloração positiva para fosfatase alcalina, expressão endógena de mRNA de genes relacionados à pluripotência *OCT4*, *SOX2*, *REX-1* e *NANOG*, em todas as colônias avaliadas, coloração positiva no ensaio de imunofluorescência para *OCT4* e *NANOG* (todos os grupos), *SOX2* (grupo 5% O₂ e 20%-para-5% O₂) e *TRA-1-60*, *TRA-1-81* e *SSEA-1* (somente em 20% O₂), demonstrando diferenças entre os grupos; a formação de corpos embrióides; e diferenciação celular espontânea nas três camadas germinativas embrionárias mesoderme, endoderme e ectoderme. Além das diferenças nos resultados de imunofluorescência, as colônias de eiPSC geradas em 20% O₂ apresentaram morfologia mais compacta com bordas mais bem definidas do que as colônias dos grupos cultivados em 5% O₂ e 20%-para-5% O₂. Diferenças significativas foram também observadas na expressão dos genes *GAPDH*, *GLUT3*, *MFN1*, *HIF1α* e *HIF2α*, relacionados ao metabolismo da glicose, fissão mitocondrial, e hipóxia, após a reprogramação. Além disso, uma possível reversão de um estado de senescência dos fibroblastos ocorreu após a reprogramação, como demonstrado pelo tempo de duplicação populacional e resultados da análise da expressão gênica de *TERT*. Nossos resultados demonstram que a derivação de eiPSC não foi prejudicada pela idade avançada do animal. Além disso, esse estudo é o primeiro a comparar o cultivo de eiPSC em alto e baixo oxigênio e a demonstrar que o oxigênio influencia no processo de reprogramação nesses animais, como indicado pela geração de células pluripotentes com diferentes perfis; nas condições testadas, a tensão de oxigênio mais baixa não favoreceu a pluripotência das eiPSC.

Palavras-chave: hipóxia, metabolismo celular, 5% O₂, reprogramação celular, senescência

1. Introdução

O envelhecimento é um processo natural e intrigante que leva a importantes mudanças no metabolismo celular e produção e utilização de energia e que pode causar, em nível celular, erosão de telômeros, danos ao genoma e disfunção mitocondrial (KUILMAN et al., 2010; WILEY et al., 2016). Essas alterações são críticas para o aparecimento de várias doenças relacionadas à idade, como câncer, disfunção cardiovascular, doenças neurodegenerativas e desordens metabólicas. Um estudo anterior demonstra que mutações nos genes responsáveis por retardar o envelhecimento são também associados ao adiamento de doenças relacionadas à idade (KENYON, 2010), o que deixa claro a importância de estudar esse processo natural. Não obstante, os mecanismos que levam ao envelhecimento não são completamente entendidos ainda, e uma melhor compreensão dessa condição é essencial para descrever e tratar as desordens que surgem com o envelhecimento.

Uma espécie de interesse para o estudo do envelhecimento é a equina, visto que esses animais, geralmente, atingem uma idade avançada. Com o envelhecimento, injúrias e doenças significativas aparecem nesses animais, como doenças cardíacas e do trato gastrointestinal, problemas relacionados ao sistema musculoesquelético e ao trato respiratório, desordens de pele e oftalmológicas, dentre outras (BROSNAHAN; PARADIS, 2003; IRELAND et al., 2012a; MCGOWAN et al., 2010a; SAGE, 2002). Portanto, estudos em equinos idosos são importantes para melhorar a qualidade de vida e longevidade desses animais.

Além disso, estudos em células tronco e terapias celulares regenerativas em animais e companhia contribuíram em grande parte com os avanços em biologia básica e aplicações clínicas em humanos (VOLK; THEORET, 2013). Por exemplo, equinos são constantemente expostos a atividades físicas intensas e frequentemente apresentam injúrias musculoesqueléticas, como fraturas ósseas e osteoartrites afetando tendões, o que os tornam modelos ideais para o estudo de doenças humanas correlacionadas, permitindo testes de novos tratamentos e fármacos e transpondo técnicas regenerativas aos humanos (CONG et al., 2019; PESSÔA; BRESSAN; FREUDE, 2019; SMITH; GARVICAN; FORTIER, 2014).

Considerando a importância de alternativas terapêuticas para o estudo e tratamento das doenças relacionadas à idade, as células tronco pluripotentes induzidas (iPSC) são uma alternativa promissora. Ao contrário de células de cultivo primário como cardiomiócitos e células neuronais, que possuem capacidade limitada de proliferação *in vitro*, que são obtidas através de procedimentos invasivos e usualmente não são do paciente que irá receber o tratamento, as iPSC são uma fonte ilimitada de todos os tipos de células, e possuem grande capacidade de diferenciação, e podem ser reprogramadas através de qualquer tipo de célula e, ainda, serem mantidas em cultivo por longos períodos (DOSS; SACHINIDIS, 2019; KOH; PIEDRAHITA, 2014).

Pelo fato de as iPSC poderem ser derivadas do paciente que precisa de tratamento, rejeições imunes durante a aplicação, e problemas éticos ligados ao uso de células tronco embrionárias são evitados (MAHMOUDI; BRUNET, 2012). Além disso, as iPSC podem mimetizar de forma mais fidedigna as manifestações clínicas e, pelo fato de serem geradas de forma espécie-específica, fornecem respostas biológicas mais confiáveis em estudos conduzidos *in vitro*. Essas características fazem das iPSC uma boa escolha para estudos *in vitro* e aplicações *in vivo* como possíveis tratamentos.

É importante enfatizar que o estado de pluripotência é uma fase transitória nos embriões *in vivo*, que pode ser induzida *in vitro* em condições artificiais de cultivo (WU; YAMAUCHI; BELMONTE, 2016). Diferentes estados de pluripotência, ambos em células tronco embrionárias (ESC) e iPSC, chamados “naïve” e “primed”, podem ser obtidos (NICHOLS; SMITH, 2009b), e esses estados são regulados por vários fatores, incluindo fatores de transcrição e fatores envolvidos no metabolismo celular (SPERBER et al., 2015; WEINBERGER et al., 2016). Ademais, embora esses dois estados tenham sido bem caracterizados em células de humanos e de camundongos, mais estudos são necessários para caracterizá-lo em animais de companhia.

No entanto, considerando o uso das iPSC para tratamentos de desordens que surgem com a idade avançada, é importante ressaltar que fatores como senescência celular, idade avançada do doador das células e um alto número de passagens em cultivo *in vitro* são prejudiciais à reprogramação em fibroblastos humanos e murinos (MAHMOUDI et al., 2019; TROKOVIC et al., 2015; UTIKAL et al., 2009), o que reforça

a necessidade de estratégias para contornar essas limitações. Nesse sentido, um método possível para melhorar a eficiência da reprogramação envolve o controle da tensão de oxigênio no cultivo celular. Alguns estudos em células humanas e de camundongo já demonstraram uma melhora na geração de iPSC em condições de tensão de oxigênio mais baixa (MATHIEU et al., 2013; PARRINELLO et al., 2003; SPERBER et al., 2015; UTIKAL et al., 2009; YOSHIDA et al., 2009a).

Essa estratégia se baseia no fato de que as iPSC e ESC, células altamente proliferativas, tem um metabolismo energético diferente quando comparadas a células diferenciadas quiescentes, visto que elas preferem utilizar a via glicolítica para a produção de energia, ao invés da fosforilação oxidativa (OXPHOS) (DEBERARDINIS et al., 2008; WU; OCAMPO; BELMONTE, 2016), e a indução da mudança no metabolismo pode melhorar a reprogramação. Essa preferência da célula é explicada pelo fato de que a glicólise gera ATP de forma mais rápida do que a OXPHOS, e além disso, a degradação da glicose fornece importantes suprimentos para a geração de componentes celulares essenciais, como nucleotídeos, amino ácidos e lipídios, que sustentam as necessidades de células altamente proliferativas (DEBERARDINIS et al., 2008; NISHIMURA; FUKUDA; HISATAKE, 2019; VANDER HEIDEN; CANTLEY; THOMPSON, 2009).

Na espécie equina, relativamente poucos estudos demonstraram a obtenção de iPSC, e nenhum deles considerou os efeitos da tensão de oxigênio. Somente um estudo foi encontrado na literatura utilizando 5% O₂ para o cultivo de mesoangioblastos e células mesenquimais de sangue periférico e sua reprogramação em eiPSC (QUATTROCELLI et al., 2016), porém, nenhuma comparação com células cultivadas em 20% O₂ foi feita. Sendo assim, estudos levando em conta uma atmosfera controlada de oxigênio são necessários para elucidar a influência do nível de oxigênio na espécie equina. Além disso, nenhuma tentativa foi feita no sentido de gerar eiPSC de equinos idosos.

No presente estudo nosso objetivo foi reprogramar fibroblastos de pele de um equino de 21 anos de idade e estudar os possíveis efeitos do oxigênio considerando alta tensão (grupo A – 20% O₂), baixa tensão (grupo B – 5% O₂) e tensão reduzida de níveis alto para baixo (grupo AB – 20%-para-5% O₂), durante a reprogramação e cultivo *in vitro*.

2. Material e Métodos

Todos os procedimentos foram submetidos e aprovados pelo Comitê de Ética no uso de animais da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (Universidade de São Paulo - CEUA/FZEA, nº 5153150218) e também pelo Comitê de Ética no uso de animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (Universidade Estadual Paulista – Campus de Jaboticabal – CEUA/FCAV nº 018464/17).

2.1. Isolamento e cultivo de fibroblastos adultos

Para a aquisição dos fibroblastos, um fragmento de pele de aproximadamente 20cm de diâmetro foi coletado da região metacarpofalângea dorsal lateral de um cavalo macho de 21 anos de idade e de três cavalos machos com idades entre 3 e 5 anos de idade. As células dos animais jovens não foram reprogramadas, servindo apenas como comparação no ensaio de duplicação populacional para determinar a velocidade de proliferação celular dos animais jovens, comparado ao animal idoso. Os fragmentos de pele de todos os animais foram levados ao laboratório e os fibroblastos foram recuperados após digestão em colagenase IV (1 mg/ml, #C2674 Sigma-Aldrich) por 3 horas. Os fibroblastos foram então divididos e colocados em cultivo em 5% CO₂ em ar atmosférico (fibroblastos em alta tensão de O₂ ou FA) ou em 5% O₂, 5% CO₂ e 90% N₂ (fibroblastos em baixa tensão de O₂ ou FB), ambos em 38.5°C. Para garantir a concentração ideal de oxigênio para os FB, uma incubadora HERA Cell VIOS 160i (Thermo Scientific) foi utilizada e as concentrações dos gases atmosféricos analisadas semanalmente com um “*Bacharach combustion test kit*”, e fluido indicador *Fyrite* 0-21% e 0-60% O₂. Os fibroblastos foram cultivados em meio IMDM (#12200036 Thermo Fisher) contendo 10% de soro fetal bovino (#SH30071.03 HyClone), 0,1 mM de MEM aminoácidos não essenciais (#11140050 Thermo Fisher) e 1% penicilina/estreptomicina (#15070063 Thermo Fisher). Antes de atingirem a confluência de 90%, as células foram passadas e congeladas.

2.2. Tempo de duplicação populacional

Para a determinação do tempo de duplicação populacional (PDT), os FA e FB de três diferentes cavalos jovens (3 a 5 anos de idade) e aqueles do cavalo de mais de 20 anos de idade foram todos cultivados em triplicata em placas de 6 poços em uma concentração de 3×10^4 células por poço e mantidos em cultivo nas respectivas condições de oxigênio por 48 horas. As células foram então ressuspensas com TrypLE Express (#12604021 Thermo Fisher Scientific), contadas e recolocadas em cultivo na concentração de 3×10^4 células por poço. Esse procedimento foi repetido por 5 passagens. Para calcular o PDT, a seguinte equação foi aplicada, de acordo com Gruber et al, (2012): $PDT = (T - T_0) \log 2 / (\log N - \log N_0)$, onde PDT= tempo de duplicação populacional; (T -T₀) = tempo entre as contagens (horas); N₀ = número de células em cultivo no início; e N = número de células contadas. Para a análise estatística, os dados foram analisados através do software “SAS University Edition”, e o teste Shapiro–Wilk foi realizado para testar a distribuição normal dos dados. Os resultados foram submetidos a análise de variância seguidos pelo teste de Bonferroni para comparar os diferentes grupos experimentais. A significância considerada foi de 1% para todas as análises.

2.3. Indução da reprogramação celular

A reprogramação celular *in vitro* foi realizada nas células do animal de 21 anos de idade, como descrito anteriormente por Pessôa et al., 2019, com pequenas alterações. Brevemente, um vetor policistrônico lentiviral excisável (STEMCCA, Millipore) contendo as sequências humanas para *OCT4*, *SOX2*, *KLF4*, e *c-MYC* (hOSKM) foi utilizado. A produção do vetor lentiviral foi realizada pela lipofecção (Lipofectamina 3000 #L3000015, Life Technologies) de 6×10^6 células 293FT com 12 µg do vetor hOSKM, 1,2 µg dos vetores auxiliares TAT, REV e Hgpm2 e 2,4 µg de VSVG por 6 horas. O meio de cultivo foi coletado depois de 24, 48 e 72 horas, filtrado, ultra centrifugado a 48960g por 1 hora e 40 minutos e utilizado para a transdução.

Os fibroblastos FA e FB do animal idoso foram colocados em placas de 6-poços (2×10^4 células por poço), sempre respeitando as tensões de oxigênio de cada grupo durante o processo. O vetor lentiviral hOSKM foi colocado nos fibroblastos para a transdução overnight na presença de 8 µg/ml de polibreno (brometo de hexadimetrina,

#H9268 Sigma-Aldrich). Uma suplementação com 0,5 mM de butirato de sódio (#B5887, Sigma-Aldrich) foi feita do dia 3 ao dia 12 após a transdução viral. Após seis dias, as células foram recuperadas e colocadas em cultivo ($4,75 \times 10^4$ células por poço) em monocamada de fibroblastos embrionários fetais murinos (MEFs) tratados com mitomicina C (#M4287 Sigma-Aldrich). No dia 6, um terceiro grupo foi criado: metade das células do grupo A (20% O₂) foram passadas para baixo oxigênio (5% O₂) criando o grupo alto-para-baixo (AB). Sendo assim, os grupos A e AB originaram-se dos fibroblastos FA e o grupo B se originou dos fibroblastos FB. No dia 6, o meio de cultivo foi trocado por meio de cultivo de eiPSC, consistindo de DMEM/F12 KO (#12660-012 Thermo Fisher) contendo 20% *knockout serum replacement* (#10828010 Thermo Fisher), 2 mM de GlutaMAX (#35050061 Thermo Fisher), 0,1 mM de MEM aminoácidos não essenciais (#11140050 Thermo Fisher), 0,1 mM 2-mercaptoethanol (#M6250 Sigma-Aldrich), 1% penicilina/estreptomicina (#15070063 Thermo Fisher) e 10 ng/ml bFGF (#100-18B, PeproTech).

2.4. Caracterização das iPSC equinas (eiPSC)

As células foram observadas diariamente até o aparecimento das primeiras colônias. As eiPSC foram primeiramente reconhecidas pela morfologia e, uma vez que as colônias de eiPSC se formara, a eficiência a reprogramação foi calculada pela razão do número de colônias formadas (observadas pela morfologia típica de iPSC) pelo número de células colocadas em cultivo. A coloração por fosfatase alcalina (AP) foi realizada com o kit "leukocyte alkaline phosphatase kit" (#86R, Sigma-Aldrich), segundo instruções do fabricante. Três colônias positivas para fosfatase alcalina foram mantidas em cultivo e coletas para RT-qPCR foram realizadas em passagens inicial (PB – passagem 5) e passagem tardia (PA – passagem 16). Uma colônia de cada grupo foi selecionada para o ensaio de imunofluorescência nas passagens 16 (P16) e 30 (P30), e para formação dos corpos embrióides em P30.

2.5. Imunofluorescência para determinação da pluripotência das eiPSC e da diferenciação espontânea após a formação dos corpos embrióides

As eiPSC de cada grupo em P16 e P30 foram cultivadas em placas de 24-poços e posteriormente fixadas com paraformaldeído 4% durante 10 minutos. Os

seguintes anticorpos primários foram utilizados: anti-OCT4 (1:100 #sc8628, Santa Cruz), anti-NANOG (1:100 #ab21624, Abcam), anti-SOX2 (1:500 #ab97959, Abcam), anti-TRA-1-60 (1:50 #mab4360, Millipore), anti-TRA-1-81 (1:50 #mab4381, Millipore) e SSEA-1 (1:50 #mab4301, Millipore). Para a identificação da diferenciação nas três camadas germinativas embrionárias, após a diferenciação espontânea, os seguintes anticorpos primários foram utilizados: anti-nestina (#ABD69 Merck), anti-neurofilamento (#N41142 Merck), anti-vimentina (#NB500-316 Novus Biologicals) e anti-Gata6 (#ab175349 Abcam).

As células utilizadas para a detecção dos marcadores nucleares OCT4, SOX2, NANOG, e GATA6 foram primeiro permeabilizadas com Triton X-100 por 20 minutos e lavadas 3 vezes com 0,05% de Tween 20 em PBS. Para o bloqueio dos marcadores OCT4, SOX2, SSEA-1, nestina, neurofilamento, vimentina e GATA6, as células foram tratadas com 1% albumina sérica bovina (#A2153, Sigma-Aldrich) por 1 hora. O bloqueio dos marcadores NANOG, TRA1-60 e TRA1-81, foi realizado com 10% de soro de cabra (#G9023 Sigma-Aldrich) por 30 minutos. Os anticorpos primários foram diluídos nas respectivas soluções de bloqueio e incubados overnight a 4°C. No dia seguinte, os anticorpos secundários (1:500 #A21044, #A11058, #A11034 e #A11008, Thermo Fisher) foram adicionados e incubados por 1 hora. O núcleo celular foi então corado com Hoechst (#33342, Thermo Fisher). Como controle negativo, o anticorpo primário foi suprimido das reações, para cada um dos anticorpos utilizados. As células foram visualizadas e documentadas por microscopia de fluorescência utilizando um EVOS M5000 “Imaging System”, Life Technologies.

2.6. RT-qPCR

Os genes relacionados à pluripotência (*OCT4*, *SOX2*, *REX-1* e *NANOG*) metabolismo celular (*GAPDH*, *PFKM* e *GLUT3*), fusão e fissão mitocondriais (*MFN1* e *DNM1L*), baixa tensão de oxigênio (*HIF1 α* , *HIF2 α* , e *VEGFA*) e senescência celular (*TERT* e *CDKN2A*) foram avaliados nas células do animal idoso, sendo avaliadas três colônias em passagens baixas (PB – P5), e passagens altas (PA – P16) de cada grupo (A, AB e B) e em três diferentes cultivos de fibroblastos do mesmo animal em alto O₂ (FA) e baixo O₂ (FB). Os primers foram desenhados usando *Primer-BLAST*, e as

sequências referências foram acessadas pelo *GenBank* (ambos disponíveis online em www.ncbi.nlm.nih.gov). As sequências dos primers estão listadas na Tabela 1.

Tabela 1. Sequências dos primers desenhados, usados para as análises de pluripotência (*OCT4*, *REX-1*, *SOX2* e *NANOG*); vetor viral (*hOSKM*); fissão e fusão mitocondriais (*DNM1L* e *MFN1*); hipóxia (*HIF1 α* , *HIF2 α* e *VEGFA*); metabolismo da glicose (*PFKM*, *GLUT3* e *GAPDH*); senescência (*TERT* e *CDKN2A*); diferenciação em ectoderme (*β III-tubulina*), endoderme (*α -fetoproteína - AFP*) e mesoderme (*BMP4*); e genes de referência (*HPRT1* e *PPIA*).

Genes alvo	Primer Forward	Primer Reverse	Tamanho do produto	Referência NCBI
<i>OCT4</i>	AGAAGGACGTGGTACGA GTG	GTGCCAGGGGAAAGGAT ACC	138	XM_001490108.6
<i>REX-1</i>	TGGAGGAATATCCAGCG TTGA	GCTTTCCCACATTCTGCA CATA	213	XM_001489519.4
<i>SOX2</i>	ACAGCATGGAGAGAAAC CCG	GTGGACGGGATTGGTGT TCT	101	XM_023623361.1
<i>NANOG</i>	CTCGATTTGGGCAGTGG CTA	CGAGCCCTCTAGAATCC GTC	117	XM_023643093.1
<i>hOSKM</i>	AAGAGGACTTGTGCGG AAA	GGCATTAAAGCAGCGTAT CC	182	(SOMMER et al., 2009)
<i>DNM1L</i>	AGATGTGCCGGTTCCTG TAG	CTCTCTGTTCCACGGGCA GAC	50	XM_023643346.1
<i>MFN1</i>	GGCAAATGTGCCCTCT TGA	TCTGTACCCGGACTGTCC AC	57	XM_023623336.1
<i>HIF1α</i>	CACCAGAGCCTAACAGT CCC	AGTCCGTGTCCTGAGTG GAA	141	XM_023627857.1
<i>HIF2α</i>	GTTGTCAGGCATGGCAA GTC	TCAATTCGGGCAGCAGG TAA	65	XM_005600005.3
<i>VEGFA</i>	TGCGGATCAAACCTCAC CAA	GCCACAGGGATTTTCTT GC	114	NM_001081821.1
<i>PFKM</i>	GCTCAGTGAGACAAGGA CCC	TTCCTGTCAATCGCACCC TC	72	NM_001081922.2
<i>GLUT3</i>	CCGTCCCCTGAGGTGT TAC	ATTGAATTGCGCCTGCCA AA	126	XM_023643091.1
<i>GAPDH</i>	GTTTGTGATGGGCGTGA ACC	ATCGCGCCACATCTTCCC CG	205	NM_001163856.1
<i>TERT</i>	CTGAGGGACGCTGTTGT CAT	ACTGGACATAGGACTTGC CG	127	XM_023625881.1
<i>CDKN2A</i>	GGAGTTGCCCGGTATC TG	ATCACTTAACGTCTGCGG GG	127	XM_023627432.1
<i>βIII-Tubulina</i>	AGCCATGTAGCCACTGA CAC	TGGGTAGACTCACATCG GGT	123	XM_023637577.1
<i>α-fetoproteína</i>	AGCAAGTGGCTGGCCTT ATT	CATGGCCTCCTGTTGGC ATA	112	NM_001081952.1
<i>BMP4</i>	CGCTTCTTTCCCTGATG GGAT	ATGGCTCCATAGGTCCT GC	150	NM_001163970.1
<i>PPIA</i>	ATGTGTCAGGGTGGTGA CTTC	GGACCGGTGTGTTTCAG GAT	104	XM_001496943.5
<i>HPRT1</i>	GCTTCTTCTCCTCAGAC GG	TCACTAATCAGCACTG GGG	80	XM_023634464.1

Para a realização do RT-qPCR, as células foram coletadas e congeladas, mergulhando-as em nitrogênio líquido. O mRNA foi extraído com TRIzol (#15596026, Thermo Fisher). Brevemente, o TRIzol foi adicionado às amostras e após 5 minutos clorofórmio foi adicionado e deixado por 3 minutos. As amostras foram centrifugadas a 15.000 G por 15 minutos a 4°C, e a fase translúcida foi separada e colocada em um novo tubo. O mesmo volume da fase translúcida foi adicionado, em isopropanol, e as amostras foram mantidas a -80°C por 2 horas. A amostra foi centrifugada e 1ml de etanol a 75% foi adicionado. Após centrifugação e secagem do pellet por evaporação, a quantificação do mRNA foi realizada através de um espectrofotômetro NanoDrop 2000/2000 (Thermo Scientific). O cDNA foi então sintetizado usando o kit “high-capacity reverse transcription kit” (#4368814 Thermo Fisher), de acordo com as instruções do fabricante.

A quantificação relativa dos transcritos foi realizada utilizando um aparelho 7500 Fast Real-Time PCR System, com PowerUP SYBR Green Master Mix (#A25777, Thermo Fisher). As reações foram realizadas a 95°C por 15 minutos e depois por 40 ciclos a 95°C por 15 segundos, 60°C por 5 segundos e 72°C por 2 minutos. A curva de “melting” foi analisada para determinar a especificidade da amplificação dos produtos, e todas as reações foram realizadas em duplicata. Os valores do “cycle threshold” (Ct) dos genes alvo foram normalizados pela média do valor do Ct dos genes de referência HPRT1 e PPIA e, a expressão gênica então calculada pela equação $2^{(-\Delta CT)}$. Três diferentes linhagens de cada grupo (A, AB e B) em passagem baixa (PB) e alta (PA), bem como três fibroblastos cultivados em condições atmosféricas de alto oxigênio (20% O₂) e três cultivados em baixo oxigênio (5% O₂) foram avaliados. Os produtos do RT-qPCR foram sequenciados para garantir sua especificidade.

Para a análise estatística, todos os dados foram testados para determinar sua distribuição normal usando um teste Shapiro-Wilk e transformados ($[\log_{10}(X)]$, $[(X)^2]$, $[(X)^3]$ ou $[1/(X)]$) quando necessário. Depois, os dados foram testados por análise de variância (ANOVA), e quando uma diferença significativa foi encontrada, as medias foram comparadas usando teste de Tukey. Os efeitos foram considerados significativos quando $P < 0.05$.

A análise de RT-qPCR foi realizada em três colônias de cada grupo e três amostras dos grupos FA e FB, e os resultados foram avaliados de quatro formas diferentes: comparação entre fibroblastos (FA × FB) (Tabela 3), comparação entre fibroblastos e eiPSC em passagens altas e baixas (fibroblastos × eiPSC PB × eiPSC PA), (Tabela 4), efeito do oxigênio entre os grupos (eiPSC A × eiPSC AB × eiPSC B) e, finalmente, todos os grupos juntos (eiPSC PB B × eiPSC PB A × eiPSC PB AB × eiPSC PA B × eiPSC PA A × eiPSC PA AB × FB × FA).

2.7. Ensaio de formação de corpos embriões (EB) e diferenciação espontânea (SD)

Para a formação dos corpos embriões eiPSC em P30 foram colocadas em placas de 6 poços cobertas com agarose a 0,6% em meio eiPSC sem bFGF. Os corpos embriões formados foram em parte coletados para análise por RT-PCR e cultivadas em meio IMDM suplementado com 10% de soro fetal bovino por 15 dias para a diferenciação espontânea. As células foram então cultivadas para análise por imunofluorescência e novamente coletadas para RT-PCR.

3. Resultados e Discussão

3.1. Análise da senescência celular

Para investigar se os fibroblastos do animal idoso estavam passando pelo processo de senescência, o tempo de duplicação populacional (PDT) e análises de RT-qPCR para detectar a expressão dos genes *TERT* e *CDKN2A*, genes que codificam um componente da enzima telomerase e da proteína p16, respectivamente, foram realizados para o animal idoso. Os resultados mostraram um PDT significativamente mais alto ($p=0,0001$) nas células do animal idoso ($n=1$) comparado com as células dos animais jovens ($n=3$), indicando que as células dos animais mais jovens proliferavam mais rápido do que a do animal idoso. Não foram encontradas diferenças significativas para os cultivos realizados nas diferentes tensões de oxigênio (dados não inseridos na tabela 2). No entanto, vale mencionar que o desvio padrão da análise das células do animal mais velho era maior que o dos animais mais novos (Tabela 2). Nenhum estudo anterior foi encontrado a respeito da influência idade na

proliferação celular em equinos. Em humanos, resultados controversos foram publicados na literatura, alguns reportando uma influência da idade na proliferação celular (BAXTER et al., 2004; ZHOU et al., 2008) e outros não (FOSSETT et al., 2012; SCHARSTUHL et al., 2007).

Tabela 2. Efeito da idade no tempo de duplicação populacional (PDT)

	N	R	Média	DP	EPM	
Jovens	3	25	24,0598682	4,9050917	0,9810183	B
Idoso	1	10	45,3293396	26,3544309	8,3340028	A

P<0,0001

N= número de animais R= número de repetições; DP=Desvio padrão; EPM=Erro padrão da média.

Os transcritos de *TERT* e *CDKN2A* foram quantificados (Tabela 4). Os fibroblastos não apresentaram expressão de *TERT*, mas esse gene estava sendo expresso em todos os grupos de eiPSC (Tabela 6), o que demonstra a ativação da telomerase nas células após a reprogramação. Estudos anteriores demonstraram a ocorrência de encurtamento dos telômeros com a idade, tanto *in vivo* quanto *in vitro*, e esse processo é associado à diminuição da proliferação celular e aumento da senescência celular (ALLSOPP et al., 1995; DOJOSUBROTO et al., 2003; KUILMAN et al., 2010). Além disso, células iPSC apresentam maior alongamento dos telômeros do que células somáticas (MARION et al., 2009). Esses resultados anteriores estão de acordo com a ativação da telomerase observada nas eiPSC no presente estudo, e embora o tamanho dos telômeros das células não tenha sido medido, a menor taxa de proliferação encontrada nas células do animal idoso pode estar relacionado com a ausência de expressão de telomerase.

Como a senescência leva ao aumento da expressão dos inibidores de ciclinas quinases dependentes p21 e p16 (CAMPISI; D'ADDA DI FAGAGNA, 2007) e pelo fato de o *CDKN2A* ser o gene que codifica a p16, esse gene também foi estudado para avaliar a senescência celular. Embora nenhuma diferença significativa tenha sido encontrada entre os grupos para esse gene, o *CDKN2A* não foi encontrado expresso no grupo B em passagens baixas nem altas, e nem no grupo AB em passagem baixa, e foi encontrado expresso em quantidade mais baixa nas eiPSC do que nos fibroblastos. Também foi verificado que as células de passagens alta e baixa do grupo

A demonstraram maior expressão de *CDKN2A*, o que pode ter sido causado pela elevação da expressão de p16 causada pelo oxigênio, tendo em vista que a influência do oxigênio na expressão de p16 já foi demonstrada anteriormente (PARK et al., 2017; SENO et al., 2018). No entanto, mais estudos são necessários para confirmar essa observação.

A p16 está envolvida na parada do ciclo celular através da regulação de CDK4/6 (ZHAO et al., 2016) e encontra-se pouco expressa em células com ciclo celular ativo. Sendo assim, como a quantidade de *CDKN2A* encontrada foi muito baixa nas nossas amostras, o erro padrão é muito alto comparado com o nível de expressão desse gene nessas células, e uma técnica mais acurada que o RT-qPCR, como a avaliação da quantidade de proteínas, deve ser empregada para testar a expressão desse gene nessas células. No entanto, qualquer resultado associado a falta de expressão de *TERT* e/ou a baixa taxa de proliferação dos fibroblastos indica que essas células estão se encaminhando para um estado de senescência e a reprogramação à pluripotência pode ter revertido esse caminho.

Considerando os resultados encontrados para os tempos de duplicação populacional entre condições de alto e baixo oxigênio, não foram demonstradas diferenças significativas entre os grupos FA e FB ($p=0,957$), nem entre os animais jovens, nem entre jovens e idoso. Resultados de um estudo anterior em fibroblastos da derme de equinos demonstraram um aumento significativo na proliferação de células cultivadas em 1% de O_2 comparado àquelas cultivadas em oxigênio atmosférico (DESCHENE et al., 2012), porém, esse efeito não foi observado na condição de 5% O_2 testada no presente estudo.

3.2. O oxigênio gera diferentes perfis de *eiPSC*

Após a reprogramação dos fibroblastos do animal idoso, as células foram observadas diariamente, e as primeiras colônias apareceram em 16 dias após a transdução viral, não havendo diferença perceptível entre os grupos. A eficiência da reprogramação foi mais alta no grupo AB (0,086%), seguida pelo grupo B (0,075%) e grupo A (0,059%), demonstrando uma maior eficiência para os grupos cultivados em baixo oxigênio quando comparado com o grupo de alto oxigênio. Estudos anteriores reportaram maior eficiência de reprogramação de células humanas e de camundongo

quando cultivadas em 5% O₂ comparado com aquelas cultivadas em 20% O₂ (MATHIEU et al., 2014b; YOSHIDA et al., 2009a). No entanto, é importante considerar outras características das colônias obtidas, e não somente a eficiência de reprogramação, tendo em vista que, como demonstrado no presente estudo, uma maior eficiência não necessariamente corresponde a colônias com células mais pluripotentes.

A coloração por fosfatase alcalina foi realizada em passagem 3, e as colônias de todos os grupos tiveram marcação positiva (Figura 1 - A, B e C). Nessas passagens iniciais já foi possível perceber diferenças na morfologia das colônias entre os três grupos, com os grupos AB e B apresentando colônias de morfologia mais plana e células menos compactas, e o grupo A apresentando colônias em forma de domo, com células bem compactas e bordas bem definidas (Figura 1). Essas características se mantiveram ao longo do tempo, sendo também observadas nas passagens 16 e 30. As células dos três grupos foram cultivadas até passagem 36-40 e mantiveram sua morfologia típica. Nenhum resultado anterior foi encontrado para a espécie equina com relação às diferentes morfologias observadas nas diferentes tensões de oxigênio, mas resultados contrários foram encontrados em células tronco embrionárias humanas (hESC) (EZASHI; DAS; ROBERTS, 2005; FORRISTAL et al., 2010; MATHIEU et al., 2013), que apresentaram morfologia mais compacta e com bordas mais bem definidas quando cultivadas em 5% de O₂ e não em 20% O₂. Além disso, a tensão de oxigênio mais baixa foi capaz de atenuar o processo de diferenciação nas células hESC, em contraste com os resultados encontrados no presente estudo, no qual as colônias formadas e cultivadas em 20% de O₂ apresentaram morfologia mais compacta com aspecto 3D e bordas das colônias mais bem definidas.

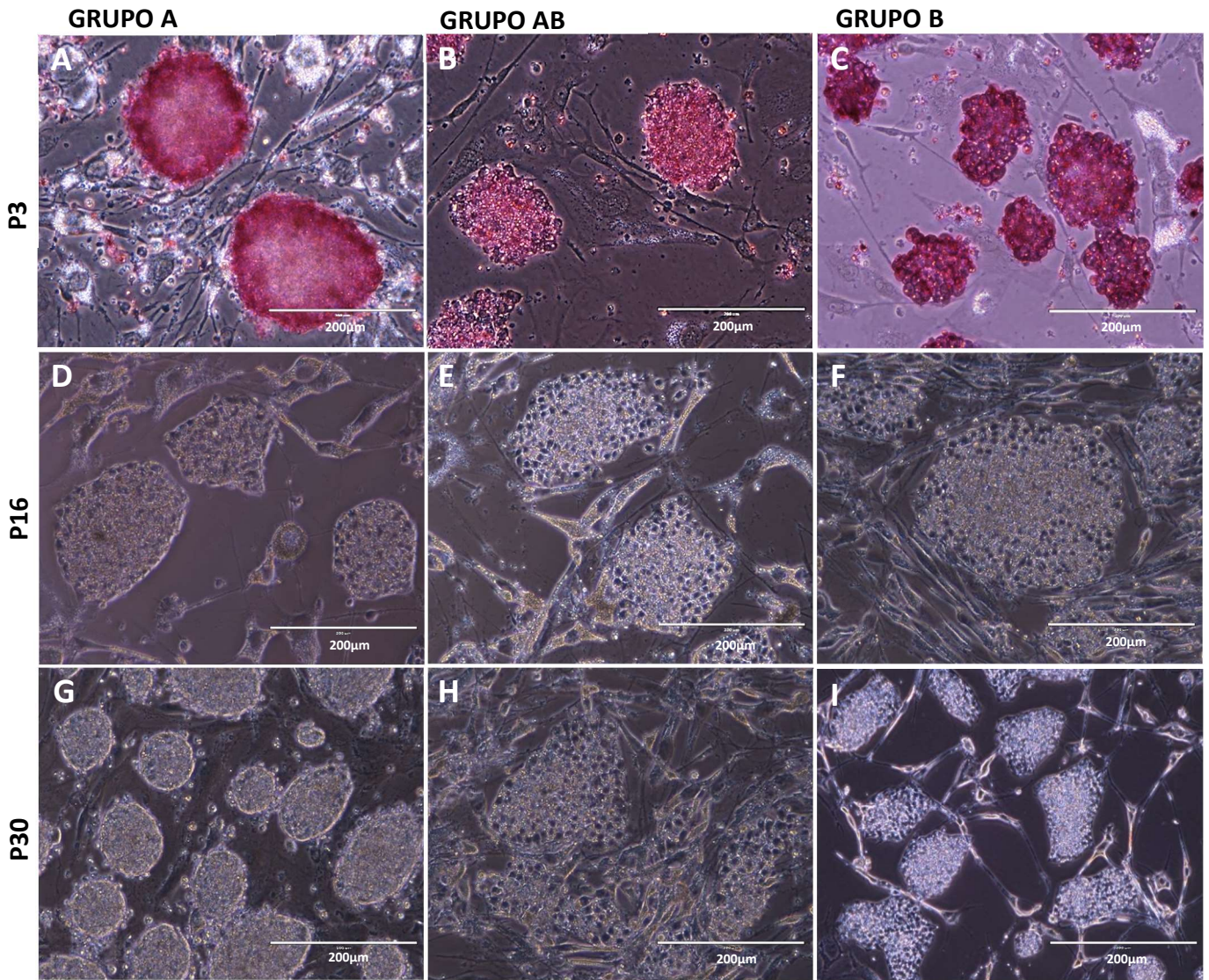


Figura 1. Resultados da coloração por fosfatase alcalina e diferentes morfologias. A, B e C = Coloração por fosfatase alcalina em passagens 3 dos grupos A, AB e B, respectivamente; D, E e F = diferentes morfologias apresentadas pelas colônias dos grupos A, AB e B, respectivamente, em passagem 16; G, H e I = diferentes morfologias apresentadas pelas colônias dos grupos A, AB e B, respectivamente, em passagem 30. Barras de escala 200µm.

Outra diferença importante entre os grupos ficou evidente com os resultados obtidos nos ensaios de imunofluorescência. O teste de imunofluorescência foi realizado em uma colônia de cada grupo em passagens 16 e 30 (Figuras 2, 3 e 4), e os resultados revelaram diferentes padrões de expressão de proteínas entre as colônias cultivadas nas diferentes tensões de oxigênio. Em passagem 16, as colônias eiPSC do grupo A apresentaram marcação para mais marcadores de pluripotência do que o apresentado pelos grupos AB e B, sendo positiva para OCT4, NANOG, TRA-1-60 e TRA-1-81 e negativa para SOX2 e SSEA-1 (Figura 2). As eiPSC dos grupos AB

e B eram positivas para OCT4, SOX2, e NANOG e negativas para TRA-1-60, TRA-1-81, e SSEA-1 (Figuras 3 e 4).

Em passagem 30, as células do grupo A eram positivas para OCT4, NANOG, TRA-1-60, TRA-1-81 e SSEA-1 e negativas para SOX2 (Figura 2). Os grupos AB e B não alteraram seu perfil de expressão em P30, comparado com P16 (Figuras 3 e 4). Esses resultados demonstram que o grupo A formou colônias mais pluripotentes do que os grupos AB ou B. Como os anticorpos utilizados nesse estudo não eram equino-específicos, é possível que exista expressão das proteínas OCT4 e SOX2 de origem exógena; no entanto, as proteínas de membrana TRA-1-60, TRA-1-81 e SSEA-1 e a proteína nuclear NANOG não se encontram presentes no vetor viral utilizado, e sua expressão é equino-específica. O fato de as células do grupo A expressarem OCT4 mas não SOX2 indica que o vetor viral possivelmente não estava produzindo suas proteínas (OCT4, SOX2, KLF4, ou c-Myc), as células equinas estavam produzindo OCT4, e a proteína SOX2 não estava sendo produzida, ou estava sendo produzida em quantidade reduzida, não sendo, portanto, detectável. Resultados anteriores (FORRISTAL et al., 2010), em contraste com os do presente estudo, não encontraram diferenças entre a expressão de POU5F1 (OCT4), SOX2, TRA-1-60 e TRA-1-81 em cultivos de hESC em 5% e 20% de O₂.

Combinando os resultados encontrados na morfologia celular e nos ensaios de imunofluorescência, é possível concluir que o ambiente de baixa tensão de oxigênio não melhorou a pluripotência das nossas eiPSC, tendo em vista que as células cultivadas em alto oxigênio apresentaram algumas características de células “naïve”, enquanto as células cultivadas em baixa tensão de oxigênio apresentaram um perfil mais “primed” (WU; YAMAUCHI; BELMONTE, 2016). Um estudo anterior demonstrou diferenças significativas entre os estados “naïve” de células tronco embrionárias de camundongo (mESC) e “primed”, de células tronco de epiblasto de camundongos (EpiSC) e células tronco embrionárias humanas (hESC) (ZHOU et al., 2012). Os autores demonstraram que as células “primed” preferencialmente ativam o metabolismo glicolítico e apresentam função mitocondrial diminuída comparada com as células “naïve”. Por outro lado, um aumento da fosforilação oxidativa (OXPHOS) em células “naïve”, comparado com células “primed” já foi previamente reportado (CARBOGNIN et al., 2016); esses autores demonstraram que, embora ambas as

células nos estados de pluripotência “primed” e “naïve” tenham preferência pela utilização do metabolismo de glicólise para produzir energia, as células “naïve” também sofrem OXPHOS e, conseqüentemente, mostram menor atividade glicolítica do que é demonstrado pelas células “primed” (WU; OCAMPO; BELMONTE, 2016). Esses estudos demonstram uma regulação precisa do metabolismo em células “primed” e “naïve” e ressaltam a importância de mais estudos na área, principalmente estudos considerando diferentes espécies.

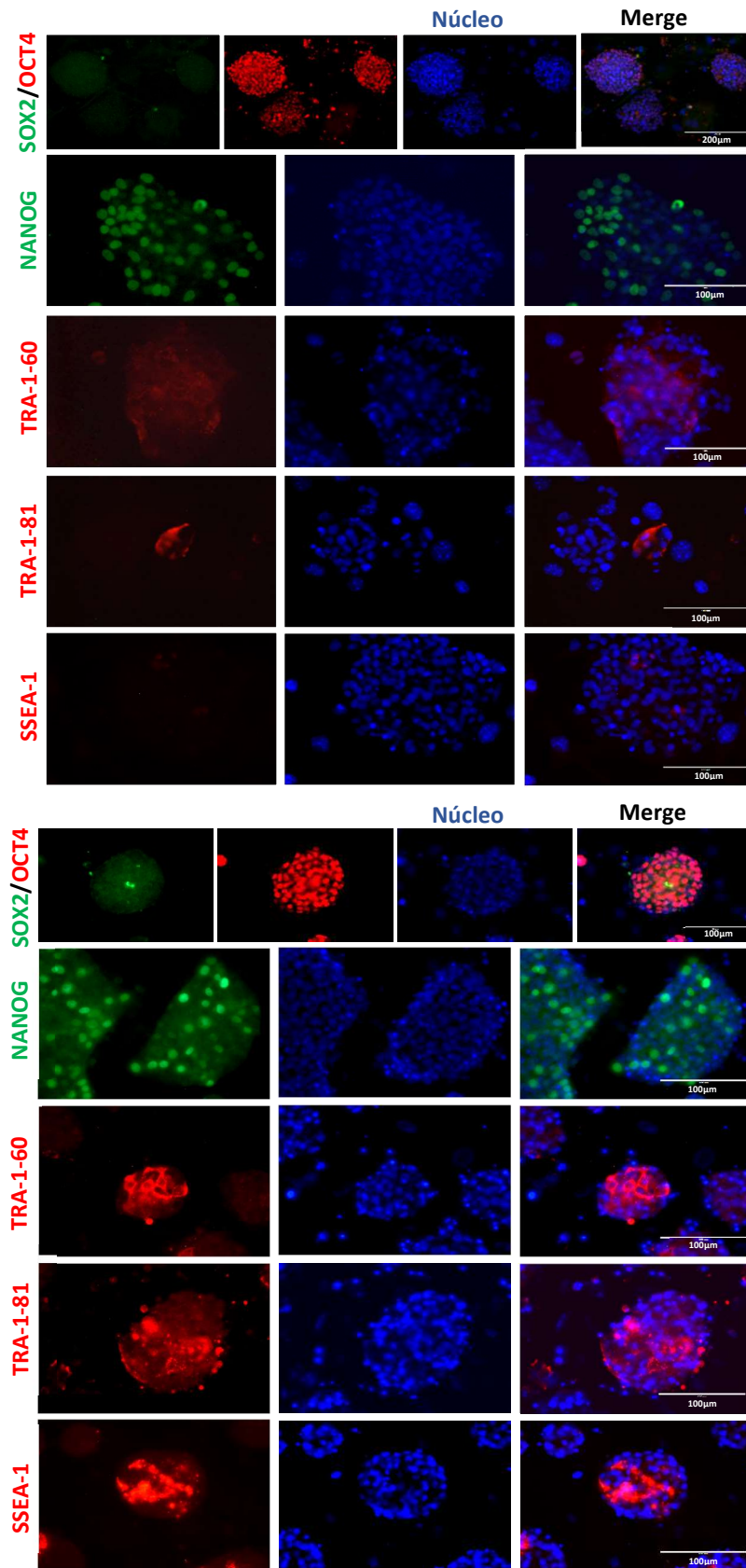


Figura 2. Resultados da imunofluorescência, positivos e negativos, para as eiPSC do grupo A em passagem 16 (acima) e 30 (abaixo). Em P16 as colônias de eiPSC estão positivas para OCT4 (vermelho), NANOG (verde), TRA-1-60 (vermelho) e TRA-1-81(vermelho) e negativas para SOX2 e SSEA-1. Em P30 as colônias passam a ser positivas também para SSEA-1 (vermelho). Barras de escala:100µm e 200µm.

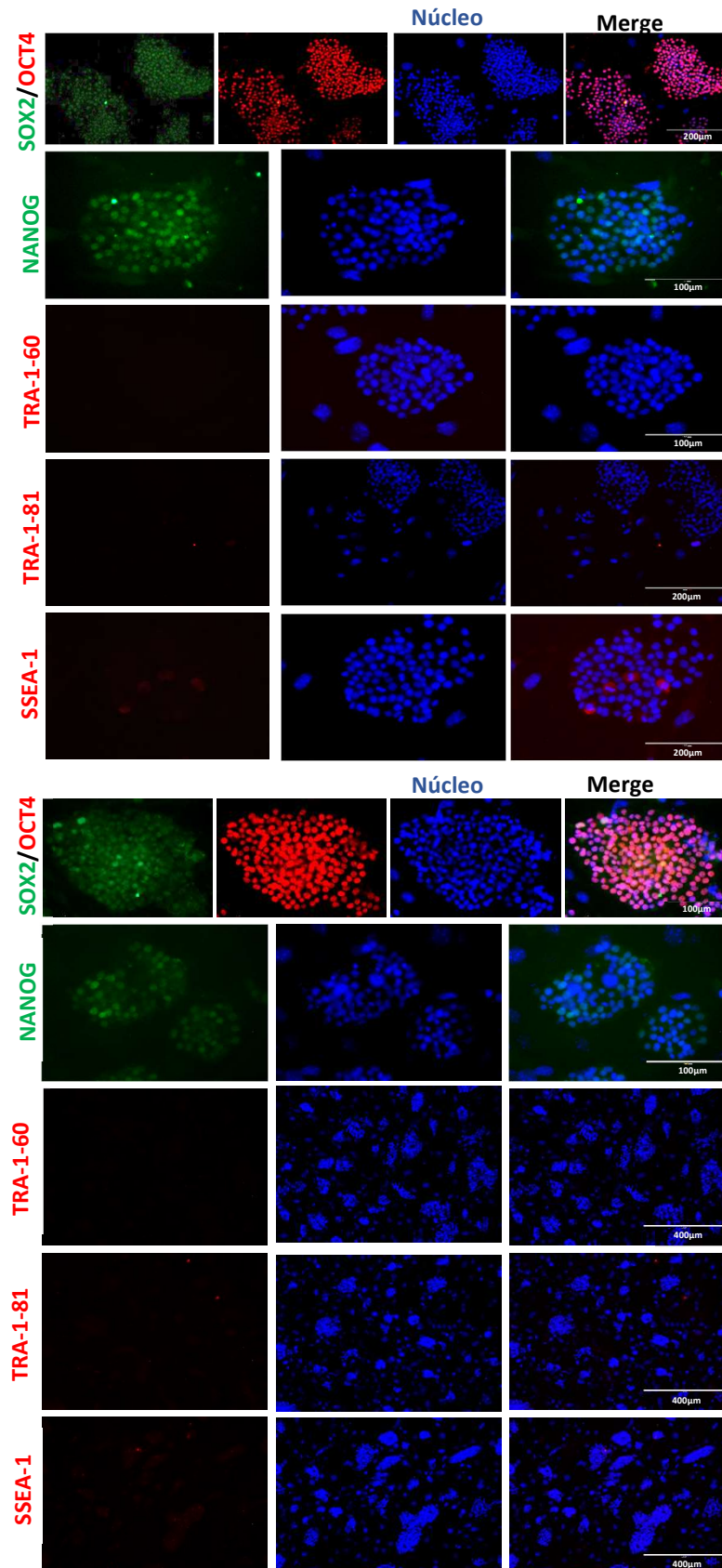


Figura 3. Resultados da imunofluorescência, positivos e negativos, para as iPSC do grupo AB em passagem 16 (acima) e 30 (abaixo). Em P16 as colônias de iPSC estão positivas para OCT4 (vermelho), SOX2 (verde) e NANOG (verde) e negativas para TRA-1-60, TRA-1-81 e SSEA-1. Em P30 esse resultado não se altera. Barras de escala: 100µm, 200µm e 400µm.

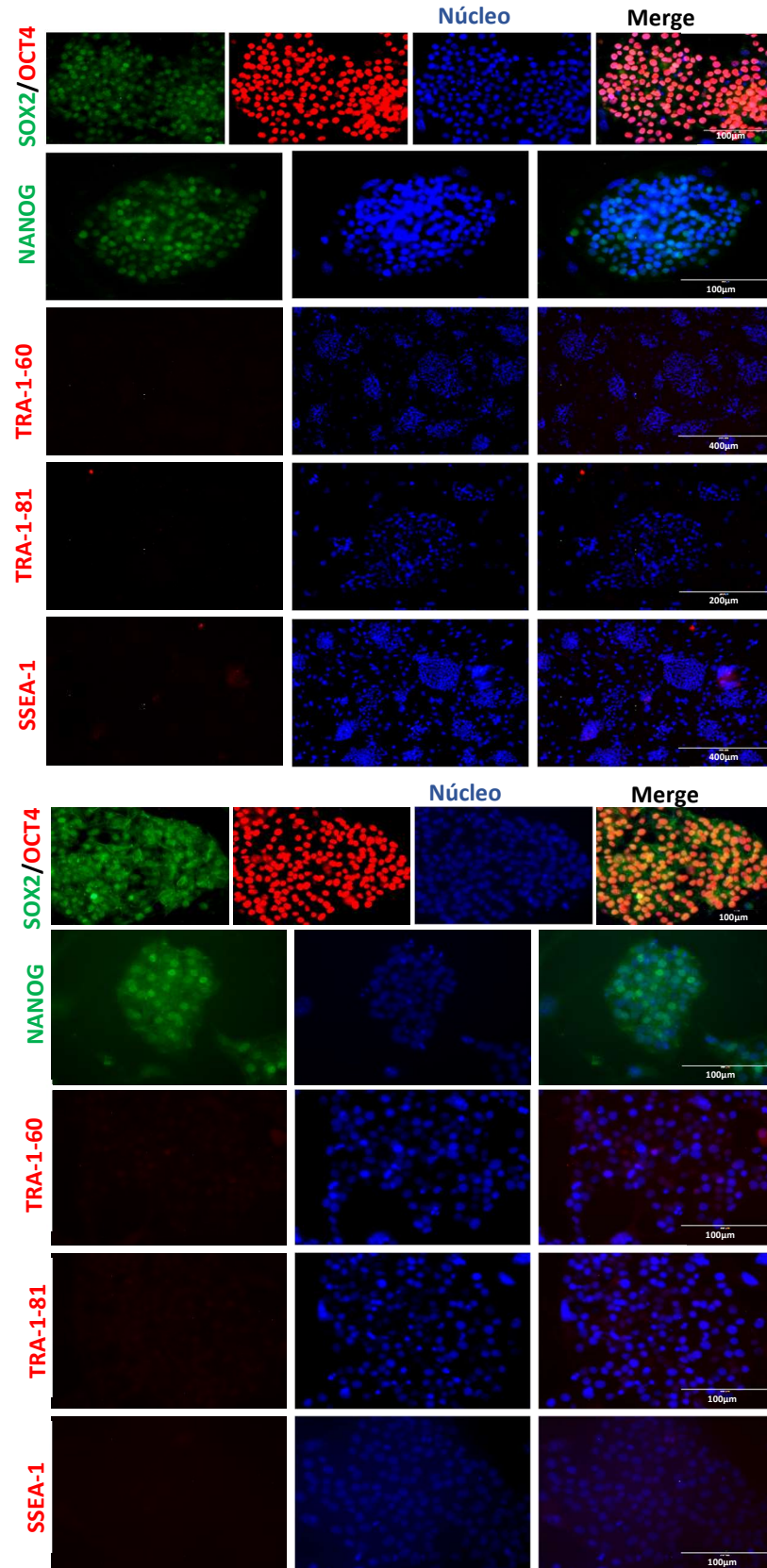


Figura 4. Resultados da imunofluorescência, positivos e negativos, para as iPSC do grupo B em passagem 16 (acima) e 30 (abaixo). Em P16 as colônias de iPSC estão positivas para OCT4 (vermelho), SOX2 (verde) e NANOG (verde) e negativas para TRA-1-60, TRA-1-81 e SSEA-1. Em P30 esse resultado não se altera. Barras de escala: 100µm, 200µm e 400µm.

3.3. Análise da expressão gênica por RT-qPCR

3.4. Análise dos fibroblastos

O efeito da tensão de oxigênio durante o cultivo *in vitro* foi primeiramente analisado nos fibroblastos para determinar possíveis efeitos das diferentes tensões de oxigênio nessas células antes da reprogramação. O grupo FB apresentou uma variância (dispersão) maior de acordo com os resultados da análise, exceto na expressão de *CDKN2A*. Os genes *REX-1*, *NANOG*, *SOX2*, *TERT* e *hOSKM* não estavam sendo expressos nos fibroblastos. No entanto foi possível observar que a expressão de *GAPDH* estava aumentada no grupo FA comparado com o grupo FB (Tabela 3), o que pode indicar que os FA estavam com a via glicolítica mais ativa do que os FB.

Tabela 3. Análise da expressão gênica comparando os grupos FA (fibroblastos cultivados em 20%O₂) e FB (fibroblastos cultivados em 5%O₂), antes da reprogramação celular, para avaliação do efeito do oxigênio no cultivo desses fibroblastos.

Função do gene	Gene	FA (20% O ₂)	FB (5% O ₂)
Pluripotência	<i>OCT4</i>	0,0058 ± 0,0026	0,0040 ± 0,0034
	<i>GAPDH</i>	5,3366 ± 1,0268 ^A	3,5014 ± 0,3737 ^B
Metabolismo da glicose	<i>GLUT3</i>	0,4469 ± 0,1227	0,3971 ± 0,3196
	<i>PFKM</i>	0,0621 ± 0,0376	0,0728 ± 0,0750
	<i>MFN1</i>	0,1037 ± 0,0714	0,0638 ± 0,0765
Fusão e fissão mitocondriais	<i>DNM1L</i>	0,0281 ± 0,0170	0,0348 ± 0,0213
	<i>HIF1A</i>	2,5586 ± 1,5762	1,5153 ± 1,5758
Baixa tensão de O ₂	<i>HIF2A</i>	0,1062 ± 0,0453	0,1053 ± 0,1126
	<i>VEGFA</i>	0,1807 ± 0,0238	0,1057 ± 0,0935
	<i>CDKN2A</i>	0,0072 ± 0,0114	0,0140 ± 0,0213

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

É importante considerar que, além do papel do *GAPDH* na glicólise, várias outras funções importantes são atribuídas a esse gene, funções essas revisadas em vários artigos (NICHOLLS; LI; LIU, 2012; RAMZAN et al., 2013; TRISTAN et al., 2011). O *GAPDH* é inibido pelo estresse oxidativo (RALSER et al., 2009), o que pode levar a envelhecimento celular e apoptose (NICHOLLS; LI; LIU, 2012). No presente estudo, uma maior expressão desse gene nos fibroblastos cultivados em alto O₂ comparado

com os fibroblastos cultivados em baixo O₂ foi verificada, o que pode indicar que mesmo que os fibroblastos estejam sendo cultivados em uma condição de oxigênio bem acima do fisiológico, essas células não sofrem estresse oxidativo, possivelmente pela ativação de mecanismos compensatórios. No entanto o GAPDH pode estar sendo regulado de várias formas nos fibroblastos e durante a reprogramação à pluripotência.

3.5. Genes de pluripotência

Após a reprogramação, todas as eiPSC apresentaram expressão endógena dos genes relacionados à pluripotência. Os resultados da comparação dos fibroblastos com as eiPSC em passagens alta ou baixa (Tabela 4) mostram que a expressão de *OCT4* ($p=0,0030$), *SOX2* ($p<0,0001$), *REX-1* ($p<0,0001$) e *NANOG* ($p=0,053$) foi significativamente mais alta nas eiPSC do que nos fibroblastos. As eiPSC também demonstraram aumento da expressão do vetor viral (*hOSKM* $p=0,0008$), e os fibroblastos não expressavam *SOX2*, *REX-1*, *NANOG*, *TERT* e nem *hOSKM*.

Alguns estudos anteriores demonstram expressão aumentada de genes relacionados a pluripotência em iPSC e ESC de camundongos e humanos, quando cultivadas em atmosfera de baixa tensão de oxigênio (FORRISTAL et al., 2010; YOSHIDA et al., 2009a). Esses estudos encontraram diminuição da expressão de *POU5F1* (*OCT4*), *SOX2* e *NANOG* em células cultivadas em 20% O₂ comparado com células cultivadas em 5% O₂. Nossos resultados, pelo contrário, não demonstraram nenhuma diferença significativa na expressão de *NANOG* e *SOX2* entre os grupos 5%, 20% e 20%-para-5% e, para o *OCT4*, uma diminuição na expressão em células de passagem alta do grupo A, comparado com as células de passagem alta do grupo AB foi observada (Tabela 6). Esse mesmo padrão de expressão foi observado no vetor viral (*hOSKM*), o que pode indicar que a expressão endógena do *OCT4* está sendo regulada pela fonte exógena de *OCT4*.

Tabela 4. Análise da expressão gênica comparando fibroblastos com eiPSC em passagem baixa (PB - P16) e passagem alta (PA - P30).

Função do gene	Gene	Fibroblastos	PB eiPSC	PA eiPSC
Pluripotência	<i>OCT4</i>	0,0058 ± 0,0022 ^B	0,5177 ± 0,1428 ^A	0,4808 ± 0,1357 ^A
	<i>REX-1</i>	3,5300x10 ⁻⁵ ± 6,0880x10 ⁻⁵ ^C	0,0312 ± 0,0092 ^B	0,0415 ± 0,0033 ^A
	<i>NANOG</i>	2,6235x10 ⁻⁵ ± 3,4150x10 ⁻⁵ ^B	0,6406 ± 0,2650 ^A	0,4128 ± 0,2800 ^A
	<i>SOX2</i>	6,5922x10 ⁻⁵ ± 4,6632x10 ⁻⁵ ^B	0,0040 ± 0,0032 ^A	0,0074 ± 0,0115 ^A
Vetor viral	<i>hOSKM</i>	5,7930x10 ⁻⁶ ± 1,3059x10 ⁻⁵ ^B	0,6790 ± 0,2864 ^A	0,5837 ± 0,2929 ^A
Metabolismo da glicose	<i>GAPDH</i>	4,4190 ± 1,2198 ^A	1,0521 ± 0,1494 ^B	1,1898 ± 0,6966 ^B
	<i>GLUT3</i>	0,4220 ± 0,2182 ^A	0,1768 ± 0,0543 ^B	0,1478 ± 0,0548 ^B
	<i>PFKM</i>	0,0674 ± 0,0534	0,0636 ± 0,0221	0,0686 ± 0,0162
Fusão e fissão mitocondriais	<i>MFN1</i>	0,0837 ± 0,0697 ^A	0,0191 ± 0,0059 ^B	0,0232 ± 0,0100 ^B
	<i>DNM1L</i>	0,0274 ± 0,0164	0,0165 ± 0,0095	0,0192 ± 0,0155
Baixa tensão de O ₂	<i>HIF1A</i>	2,0370 ± 1,5210 ^A	0,1366 ± 0,0122 ^B	0,1047 ± 0,0665 ^B
	<i>HIF2A</i>	0,1057 ± 0,0768 ^A	0,0043 ± 0,0092 ^B	0,0047 ± 0,0038 ^{AB}
	<i>VEGFA</i>	0,1432 ± 0,0735 ^A	0,0298 ± 0,0203 ^B	0,0337 ± 0,0243 ^B
Senescência celular	<i>TERT</i>	9,8464x10 ⁻⁶ ± 2,4119x10 ⁻⁵ ^B	0,0077 ± 0,0049 ^A	0,0076 ± 0,0043 ^A
	<i>CDKN2A</i>	0,0106 ± 0,0157	0,0013 ± 0,0017	8,4083x10 ⁻⁴ ± 0,0011

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

É interessante notar que o *REX-1* demonstrou um efeito da passagem, com maior expressão em células de passagens altas do que em passagens baixas, nos grupos A e B. O *REX-1* é um fator de transcrição com papel importante na manutenção da morfologia típica de iPSC em células humanas, induzindo um aumento na expressão de marcadores de pluripotência e diminuição da expressão de marcadores de diferenciação, influenciando no potencial de formação de EB e teratomas, com uma influência marcada nas linhagens mesodermiais, e além disso, ele tem um papel importante no metabolismo celular, sendo que sua deleção causa aumento no consumo de oxigênio, indicando uma maior atividade de fosforilação oxidativa (OXPHOS), diminuição da expressão de genes glicolíticos e diminuição da produção de lactato, indicando redução da glicólise (SON et al., 2013a). Sendo assim, o aumento da expressão desse gene verificado em células de passagens altas dos grupos A e B, comparado com sua expressão em células de passagem baixa no presente estudo pode indicar aumento na pluripotência das eiPSC ao longo do tempo.

3.6. Metabolismo da glicose

Como a regulação da via glicolítica é considerada de alta importância para a formação de células iPSC (FOLMES et al., 2011), o *PFKM*, uma fosfofrutoquinase crítica para o segundo passo da glicólise, responsável por catalisar a conversão de frutose 6-fosfato e ATP em frutose 1,6-bifosfato, e difosfato de adenosina (ADP) (LI; GU; ZHOU, 2015), o *GAPDH*, um gene que age no sexto passo do processo de glicólise, responsável por catalisar gliceraldeído 3-fosfato em 1,3-bisfosfoglicerato na presença de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD^+) e fosfato inorgânico (Pi) (NICHOLLS; LI; LIU, 2012), e o *GLUT3*, gene que codifica uma proteína de membrana crucial para o transporte de glicose para a célula (CHRISTENSEN; CALDER; HOUGHTON, 2015), foram avaliados no presente estudo.

A expressão de *PFKM* não foi diferente entre os grupos de eiPSC ou entre as eiPSC e os fibroblastos. Por outro lado, as eiPSC apresentaram expressão diminuída de *GAPDH* ($p=0,0002$) e *GLUT3* ($p<0,0001$) comparado com os fibroblastos (Tabela 4). Essa diminuição, porém, não era esperada, já que há uma mudança na produção de energia da célula que passa a priorizar a glicólise em detrimento da fosforilação oxidativa durante o processo de reprogramação à pluripotência (FOLMES et al., 2013; ZHANG et al., 2012) e, com uma maior demanda energética por ATP das células em proliferação, era esperado que a via glicolítica estivesse mais ativa e o transporte de glicose para a célula deveria aumentar. É possível que outros genes, além dos avaliados, estejam envolvidos na captação de glicose e metabolismo celular.

Além disso, a análise da influência do oxigênio nos grupos A, AB e B mostrou expressão significativamente diminuída de *GAPDH* ($p=0,0491$) e *GLUT3* ($p<0,0034$) no grupo A comparado aos grupos B e AB (Tabela 5). Nenhuma diferença significativa foi encontrada para a expressão de *PFKM*. Os resultados sugerem que, após a reprogramação, as células cultivadas em alto oxigênio usam menos a via glicolítica do que as cultivadas em baixo oxigênio. Essa diminuição na expressão de *GLUT3* nas células em 5% de O_2 comparado com as células em 20% O_2 já foi previamente reportada em hESC (CHRISTENSEN; CALDER; HOUGHTON, 2015). Ademais, o silenciamento do *GLUT3* em hESC leva a uma diminuição da captação de glicose e na produção de lactato, juntamente com uma diminuição correlacionada no *OCT4* (CHRISTENSEN; CALDER; HOUGHTON, 2015), fazendo uma ponte entre o

transporte de glicose e a pluripotência. No presente estudo, uma diminuição da expressão de *GLUT3* foi observada após a reprogramação, mas o aumento dessa expressão foi observado em células cultivadas em condições de baixo oxigênio comparado com a condição de alta tensão. Juntos, esses resultados sugerem uma modulação do metabolismo celular da glicose, com um aumento na captação de glicose e glicólise em tensão de oxigênio mais baixa.

Tabela 5. Análise da expressão gênica comparando os três tratamentos de oxigênio eiPSC A (20% O₂), eiPSC AB (20% para 5% O₂) e eiPSC B (5% O₂).

Função do gene	Gene	eiPSC A	eiPSC AB	eiPSC B
Genes de pluripotência	<i>OCT4</i>	0,4489 ± 0,1634	0,5403 ± 0,1200	0,5085 ± 0,1306
	<i>REX-1</i>	0,0343 ± 0,0087	0,0392 ± 0,0080	0,0353 ± 0,0099
	<i>NANOG</i>	0,4372 ± 0,3314	0,6029 ± 0,1749	0,5399 ± 0,3568
	<i>SOX2</i>	0,0057 ± 0,0052	0,0026 ± 0,0024	0,0090 ± 0,0135
Vetor viral	<i>hOSKM</i>	0,4782 ± 0,2513	0,7910 ± 0,2852	0,6249 ± 0,2709
Metabolismo da glicose	<i>GAPDH</i>	0,8743 ± 0,1456 ^B	1,1355 ± 0,1485 ^A	1,3439 ± 0,7480 ^A
	<i>GLUT3</i>	0,1101 ± 0,0339 ^B	0,1994 ± 0,0392 ^A	0,1833 ± 0,0446 ^A
	<i>PFKM</i>	0,0780 ± 0,0172	0,0653 ± 0,0183	0,0550 ± 0,0166
Fusão e fissão mitocondriais	<i>MFN1</i>	0,0216 ± 0,0064	0,0189 ± 0,0036	0,0222 ± 0,0124
	<i>DNM1L</i>	0,0137 ± 0,0035	0,0180 ± 0,0107	0,0218 ± 0,0192
Baixa tensão de O ₂	<i>HIF1A</i>	0,1299 ± 0,0449	0,1294 ± 0,0582	0,1027 ± 0,0473
	<i>HIF2A</i>	0,0030 ± 0,0037	0,0068 ± 0,0109	0,0038 ± 0,0042
	<i>VEGFA</i>	0,0151 ± 0,0107	0,0379 ± 0,0190	0,0422 ± 0,0251
Senescência celular	<i>TERT</i>	0,0061 ± 0,0065	0,0093 ± 0,0026	0,0076 ± 0,0037
	<i>CDKN2A</i>	0,0018 ± 0,0021	8,2483x10 ⁻⁴ ± 3,3674x10 ⁻⁴	6,0723x10 ⁻⁴ ± 8,8168x10 ⁻⁴

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

Curiosamente, como não há diferença significativa na expressão de *PFKM*, gene responsável pelos passos iniciais da glicólise, mas há uma diminuição significativa na expressão de *GAPDH* no grupo A comparado com os grupos AB e B, é possível que o *GAPDH* esteja regulando outras funções importantes além de sua função na regulação da via glicolítica. Infelizmente, o *GAPDH* foi considerado como um gene de referência por um período muito longo, e nenhum estudo demonstrando seu papel nas iPSC foi encontrado.

3.7. Fusão e fissão mitocondriais

Os processos mitocondriais de fusão e fissão são importantes para garantir o número e forma dessa organela nas células, sendo a fissão o processo de divisão da mitocôndria e fusão o processo oposto. O equilíbrio na ocorrência desses dois processos regula a morfologia e conseqüentemente a função da mitocôndria nas células (CHEN; HSU; WEI, 2012; SCOTT; YOULE, 2016). O processo de fissão é essencial para a reprogramação (PRIETO et al., 2016a), e um estudo anterior já demonstrou um aumento na expressão do gene de fissão *DNM1* e diminuição na expressão dos genes *MFN1/2* e *CHCHD3*, responsáveis pela fusão, durante a reprogramação (SON et al., 2015). Esses autores demonstraram também que os genes de fissão *DNM1L (DRP1)*, *FIS1* e *MFF* permaneceram inalterados após a reprogramação. Concordando com esse resultado, no presente trabalho o *DNM1L (DRP1)* foi avaliado e nenhuma diferença significativa foi encontrada entre os grupos ou entre os fibroblastos e as eiPSC. No entanto, outros importantes genes relacionados à fissão, como *DNM1*, *MiD51*, *MFF* e *GDAP1*, não foram avaliados pelo presente estudo.

As eiPSC apresentaram expressão diminuída de *MFN1* ($p=0,0004$) quando comparado com a expressão dos fibroblastos (Tabela 4), demonstrando, como esperado, uma redução na expressão desse gene depois da reprogramação. Um estudo anterior demonstrou que a supressão de *MFN1/2* influenciou na transição metabólica com diminuição da expressão de genes relacionados à OXPHOS e aumento dos relacionados à glicólise e aumento dos metabólitos da glicólise, com impacto conseqüente na eficiência da reprogramação (SON et al., 2015).

3.8. Análise da baixa tensão de oxigênio

Considerando a baixa tensão de oxigênio, a expressão de *HIF1 α* , *HIF2 α* , e *VEGFA* foi avaliada. Após a reprogramação, as eiPSC em passagens alta ou baixa apresentaram diminuição significativa de *HIF1 α* ($p=0,0004$) e *VEGFA* ($p=0,0004$) comparado com a expressão nos fibroblastos. O *HIF2 α* estava significativamente diminuído somente nas eiPSC de passagem baixa comparado com sua quantidade em fibroblastos ($p=0,0045$) (Tabela 4). Comparando os grupos em diferentes tensões de oxigênio, nenhuma diferença significativa foi observada para a expressão de

HIF1 α , *HIF2 α* ou *VEGFA* (Tabela 5). Na comparação entre todos os grupos (Tabela 6), nenhuma diferença significativa foi observada para *HIF1 α* . As e iPSC do grupo B em baixa passagem não expressavam *HIF2 α* , e nesse grupo, é possível observar um aumento significativo de *HIF2 α* em células de passagem alta comparado com a expressão encontrada em células de passagem baixa. Os grupos A e AB não demonstraram diferença na expressão de *HIF2 α* entre as células de passagem alta e baixa. Comparado aos fibroblastos, somente células de passagem baixa, dos grupos B e A tiveram uma diminuição significativa de *HIF2 α* . O *VEGFA* apresentou diminuição significativa após a reprogramação, estando mais alto nos FA do que nos grupos A e AB em passagem alta ou baixa; no entanto, essa tendência não foi observada para as células cultivadas em baixo oxigênio, tendo em vista que a expressão de *VEGFA* nos FB não estava aumentada comparada com a expressão no grupo B em passagem alta ou baixa.

Os *HIF1 α* e *HIF2 α* são genes importantes para a reprogramação, já que a expressão deles sofre aumento durante esse processo em ambas condições de alto e baixo oxigênio. A reprogramação é bloqueada quando há “knockdown” do gene do *HIF2 α* , já que a falta desse gene influencia negativamente a mudança metabólica, e por outro lado a estabilização prolongada do *HIF2 α* também é responsável por bloquear a reprogramação (MATHIEU et al., 2014b). Esses resultados anteriores mostram que além do já esperado papel do *HIF* no controle dos genes relacionados à adaptação à hipóxia, esse fator de transcrição tem um papel igualmente importante no processo de reprogramação.

Um estudo anterior demonstrou que a resposta a longo prazo à mudanças na tensão de oxigênio foi regulada pelo *HIF2 α* , e não pelo *HIF1 α* (FORRISTAL et al., 2010), o que demonstra que esses genes não estão sendo expressos o tempo todo em células em baixa tensão de oxigênio. Isso pode ser a explicação para o fato de que nenhuma diferença foi encontrada para os genes *HIF1 α* e *HIF2 α* sob a influência das diferentes condições de oxigênio, já que as células possivelmente já estavam metabolicamente estáveis após permanecerem na condição de oxigênio mais baixa por um longo período, e como uma diferença significativa foi encontrada para esses genes após a reprogramação, seu papel principal foi mais relacionado à reprogramação à pluripotência do que na resposta das células à condição de 5% O₂.

Outra possível explicação sugere que esses fatores tem uma ação regulatória complexa que depende de várias proteínas, como a prolil hidroxilase (WANG et al., 1995), que levam a degradação em menos de 5 minutos em 21% de O₂ (POUYSSÉGUR; DAYAN; MAZURE, 2006); portanto, a análise da expressão de mRNA pode não ser suficiente para detectar as mudanças na expressão desses genes, e métodos além deste são necessários para um diagnóstico mais fidedigno de seu papel na reprogramação e cultivo de iPSC em baixa tensão de oxigênio.

Como os genes *HIF* são relacionados à mudança do metabolismo que ocorre na reprogramação, espera-se que eles influenciariam as células nos estados “naïve” e “primed”, já que é sabido que esses estados são metabolicamente diferentes (WU; OCAMPO; BELMONTE, 2016). De fato, um estudo anterior demonstrou essa influência, havendo um aumento da expressão de marcadores de células “naïve” e uma diminuição da expressão dos marcadores de células “primed” nas hESC com “knockout” para *HIF1α* (SPERBER et al., 2015). Esses resultados sugerem que o ambiente de hipóxia favorece o estado “primed” de células iPSC. Mais ainda, outro estudo demonstra que o *HIF1α* induz mudanças metabólicas e morfológicas em mESC, conferindo a elas um estado “primed”, e esse fator também estava aumentado em células “primed”, causando aumento do metabolismo de glicólise nessas células mais do que nas células “naïve” (ZHOU et al., 2012). Embora não tenha sido encontrada diferença significativa para o *HIF1α* nas células dos diferentes tratamentos de oxigênio no presente estudo, nós encontramos diferenças na morfologia e marcadores de imunofluorescência entre as colônias dos diferentes grupos, sendo que as células cultivadas em baixo oxigênio apresentavam morfologia mais “primed”. Esses resultados sugerem que, mesmo não tendo sido observadas diferenças na expressão de *HIF1α*, uma regulação pós-transcricional pode ter causado a expressão de características mais “primed” nas colônias dos grupos AB e B.

Tabela 6. Análise da expressão gênica comparando eiPSC em passagem baixa (PB - P16) e passagem alta (PA – P30) dos grupos A (20% O₂) AB (20% para 5% O₂) e B (5% O₂) e fibroblastos em 20% O₂ (FA) e 5% O₂ (FB).

Função do gene	Gene	eiPSC PB B	eiPSC PB A	eiPSC PB AB	eiPSC PA B	eiPSC PA A	eiPSC PA AB	FB	FA
Genes de pluripotência	<i>OCT4</i>	0,5716 ± 0,1485 ^{AB}	0,5175 ± 0,1913 ^{AB}	0,4640 ± 0,1193 ^{ABC}	0,4454 ± 0,0931 ^{ABC}	0,3802 ± 0,1265 ^{BCD}	0,6167 ± 0,0652 ^A	0,0057 ± 0,0023 ^{CD}	0,0058 ± 0,0027 ^D
	<i>REX-1</i>	0,0280 ± 0,0086 ^{BC}	0,0294 ± 0,0108 ^{BC}	0,0363 ± 0,0094 ^{AB}	0,0425 ± 0,0039 ^A	0,0392 ± 0,0007 ^{AB}	0,0436 ± 0,0040 ^A	4,9401x10 ⁻⁵ ± 8,5565x10 ⁻⁵ ^C	2,1200x10 ⁻⁵ ± 3,6720x10 ⁻⁵ ^C
	<i>NANOG</i>	0,7612 ± 0,3182 ^A	0,6178 ± 0,3671 ^A	0,5427 ± 0,0889 ^A	0,3186 ± 0,2646 ^{AB}	0,2567 ± 0,2050 ^{AB}	0,6630 ± 0,2402 ^A	2,1790x10 ⁻⁵ ± 3,7741x10 ⁻⁵ ^B	3,0680x10 ⁻⁵ ± 3,7841x10 ⁻⁵ ^B
	<i>SOX2</i>	0,0033 ± 0,0012 ^A	0,0048 ± 0,0056 ^A	0,0040 ± 0,0026 ^A	0,0146 ± 0,0190 ^A	0,0065 ± 0,0057 ^A	0,0012 ± 0,0010 ^A	6,9551x10 ⁻⁵ ± 6,0135x10 ⁻⁵ ^B	6,2293x10 ⁻⁵ ± 4,2198x10 ⁻⁵ ^B
Vetor viral	<i>hOSKM</i>	0,7126 ± 0,3740 ^{AB}	0,6121 ± 0,2926 ^{AB}	0,7122 ± 0,3040 ^{AB}	0,5371 ± 0,1428 ^{AB}	0,3443 ± 0,1358 ^{BC}	0,8698 ± 0,3039 ^A	7,9334x10 ⁻⁷ ± 1,3741x10 ⁻⁶ ^C	1,0793x10 ⁻⁵ ± 1,8694x10 ⁻⁵ ^C
Metabolismo da glicose	<i>GAPDH</i>	1,0985 ± 0,0623 ^B	0,9256 ± 0,1607 ^{BC}	1,1321 ± 0,1507 ^B	1,5894 ± 1,1018 ^B	0,8230 ± 0,1389 ^C	1,1407 ± 0,2066 ^B	3,5014 ± 0,3737 ^A	5,3366 ± 1,0268 ^A
	<i>GLUT3</i>	0,1965 ± 0,0494 ^{BC}	0,1290 ± 0,0258 ^C	0,2049 ± 0,0590 ^{BC}	0,1635 ± 0,0421 ^{BC}	0,0913 ± 0,0338 ^C	0,1939 ± 0,0164 ^{BC}	0,3971 ± 0,3196 ^{AB}	0,4469 ± 0,1227 ^A
	<i>PFKM</i>	0,0638 ± 0,0059	0,0823 ± 0,0238	0,0597 ± 0,0036	0,0463 ± 0,0207	0,0738 ± 0,0111	0,0709 ± 0,0270	0,0728 ± 0,0750	0,0621 ± 0,0376
Fusão e fissão mitocondriais	<i>MFN1</i>	0,0160 ± 0,0013	0,0226 ± 0,0099	0,0185 ± 0,0022	0,0283 ± 0,0164	0,0206 ± 0,0004	0,0196 ± 0,0064	0,0638 ± 0,0765	0,1037 ± 0,0714
	<i>DNM1L</i>	0,0286 ± 0,0270	0,0143 ± 0,0047	0,0146 ± 0,0029	0,0149 ± 0,0074	0,0130 ± 0,0026	0,0215 ± 0,0156	0,0265 ± 0,0223	0,0281 ± 0,0170
Baixa tensão de O ₂	<i>HIF1A</i>	0,1450 ± 0,0040	0,1250 ± 0,0055	0,1396 ± 0,0150	0,0604 ± 0,0145	0,1347 ± 0,0703	0,1191 ± 0,0890	1,5153 ± 1,5758	2,5586 ± 1,5762
	<i>HIF2A</i>	9,1975x10 ⁻⁴ ± 2,3422x10 ⁻⁴ ^C	0,0013 ± 0,0010 ^{BC}	0,0106 ± 0,0157 ^A	0,0067 ± 0,0044 ^A	0,0047 ± 0,0049 ^{AB}	0,0029 ± 0,0016 ^A	0,1053 ± 0,1126 ^A	0,1062 ± 0,0453 ^A
	<i>VEGFA</i>	0,0294 ± 0,0163 ^{BC}	0,0165 ± 0,0165 ^C	0,0435 ± 0,0238 ^{BC}	0,0551 ± 0,0286 ^{ABC}	0,0137 ± 0,0034 ^C	0,0322 ± 0,0156 ^{BC}	0,1057 ± 0,0935 ^{AB}	0,1807 ± 0,0238 ^A
Senescência celular	<i>TERT</i>	0,0058 ± 0,0021 ^{AB}	0,0085 ± 0,0092 ^A	0,0088 ± 0,0011 ^A	0,0093 ± 0,0045 ^A	0,0037 ± 0,0022 ^{AB}	0,0097 ± 0,0039 ^A	1,9693x10 ⁻⁵ ± 3,4109x10 ⁻⁵ ^B	0,0000 ± 0,0000 ^B
	<i>CDKN2A</i>	7,7639x10 ⁻⁴ ± 0,0012	0,0014 ± 0,0016	3,9345x10 ⁻⁴ ± 3,6537x10 ⁻⁴ ^C	4,3806x10 ⁻⁴ ± 5,5601x10 ⁻⁴ ^C	0,0023 ± 0,0028	0,0010 ± 0,0011	0,0140 ± 0,0213	0,0072 ± 0,0114

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

3.9. Formação dos corpos embrióides (CE) e diferenciação espontânea (DE)

As eiPSC dos grupos A, B e AB foram capazes de formar corpos embrióides em 5-7 dias de cultivo (Figura 5). Os resultados das análises de RT-PCR realizados com os CE e depois da DE demonstraram que os três grupos expressavam β III-tubulina, um marcador de ectoderme, e “bone morphogenetic protein” 4 (BMP4), um marcador de mesoderme, tanto nos CE quanto DE. O grupo B apresentou marcação para endoderme através de α -fetoproteína (AFP) somente após a DE; no entanto, esse marcador estava positivo nos CE e após a DE nos outros grupos (Figura 6). É possível que, como as células estavam em diferenciação, elas estavam produzindo um alto número de transcritos, e houve um efeito diluição na quantidade de transcritos de AFP produzidos, fazendo esses transcritos difíceis de detectar.

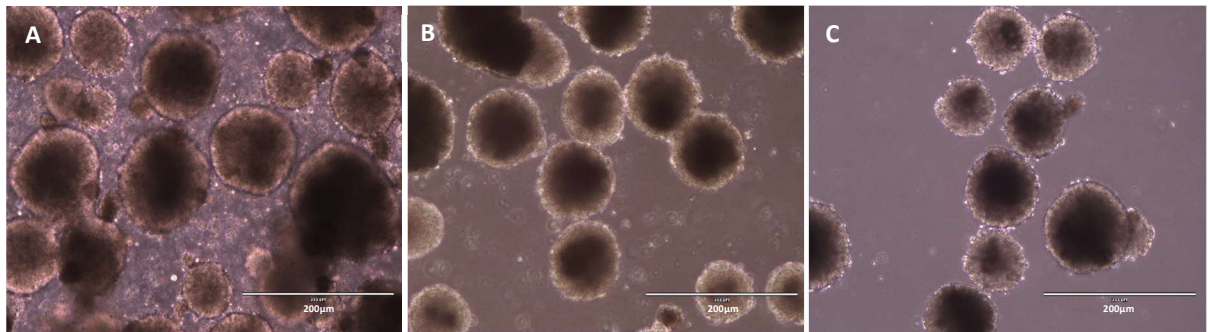


Figura 5. Formação dos corpos embrióides nos grupos A, AB e B, respectivamente (A, B e C). Barras de escala: 200 μ m

Após a coleta para RT-PCR, os CE foram colocados em placas de cultivo para que a diferenciação espontânea pudesse ocorrer. Após uma semana, as células diferenciadas foram semeadas para os ensaios de imunofluorescência. Os resultados desses ensaios demonstraram que as células dos grupos A, AB e B foram capazes de se diferenciar em células da ectoderme, mesoderme e endoderme, como demonstrado pela coloração positiva para os marcadores de ectoderme neurofilamento e nestina, marcador de mesoderme vimentina e marcador de endoderme GATA6 (Figura 7).

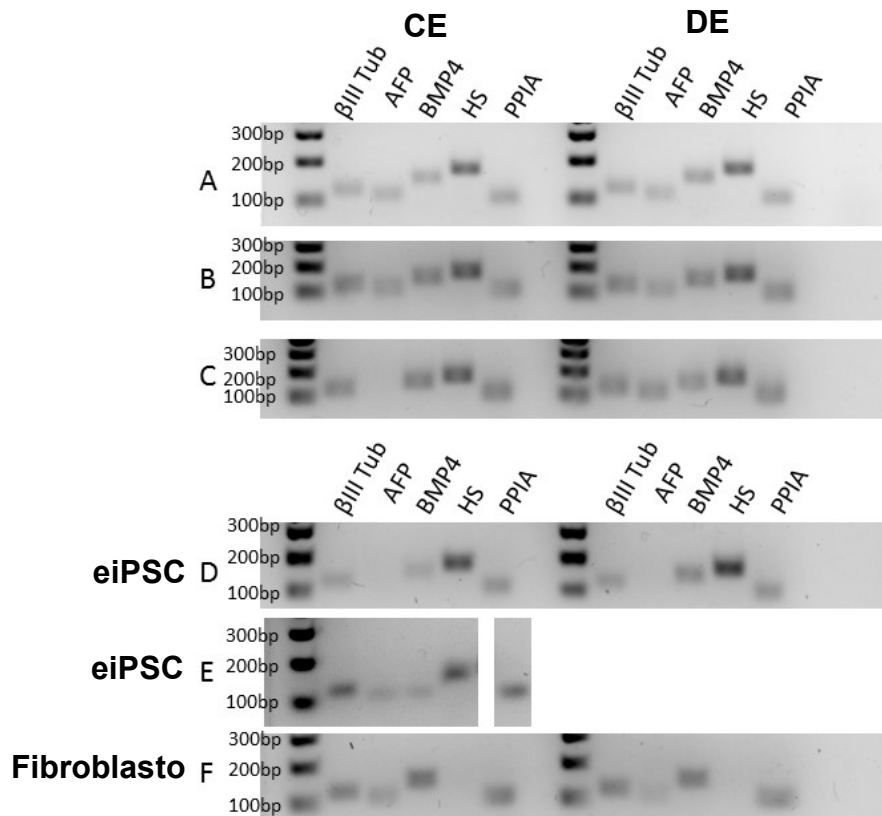


Figura 6. Resultados de RT-PCR para os marcadores de ectoderme (β III-Tubulina), endoderme (AFP) e mesoderme (BMP4) para os corpos embrióides (CE) e diferenciação espontânea (DE), eiPSC e fibroblastos. A = CE (esquerda) e DE (direita) grupo A; B = CE (esquerda) e DE (direita) grupo AB; C = CE (esquerda) e DE (direita) grupo B; D = eiPSC grupo A (esquerda), eiPSC grupo AB (direita); E = eiPSC grupo B; F = fibroblastos FA (esquerda) e FB (direita).

Para o controle, o RT-PCR para a expressão dos marcadores β III-tubulina, AFP e BMP4 foi verificada nos fibroblastos dos quais os CE foram derivados. Os fibroblastos demonstraram expressão de todos os três marcadores. As eiPSC eram positivas para β III-tubulina e BMP4 em todos os grupos e para AFP somente no grupo B. O vetor viral ainda estava sendo expresso mesmo após a diferenciação em CE. O fato de as eiPSC serem positivas para alguns marcadores de diferenciação mostra um silenciamento incompleto de alguns genes relacionados a diferenciação após a reprogramação. Somente o grupo B expressava o marcador de endoderme AFP, sugerindo que o cultivo das eiPSC em baixo oxigênio por um longo período pode influenciar a capacidade dessas células de silenciar o gene de endoderme. De acordo com esse resultado, um estudo anterior indica que o cultivo em baixo oxigênio favorece a diferenciação em direção a linhagem endodérmica (PIMTON et al., 2015).

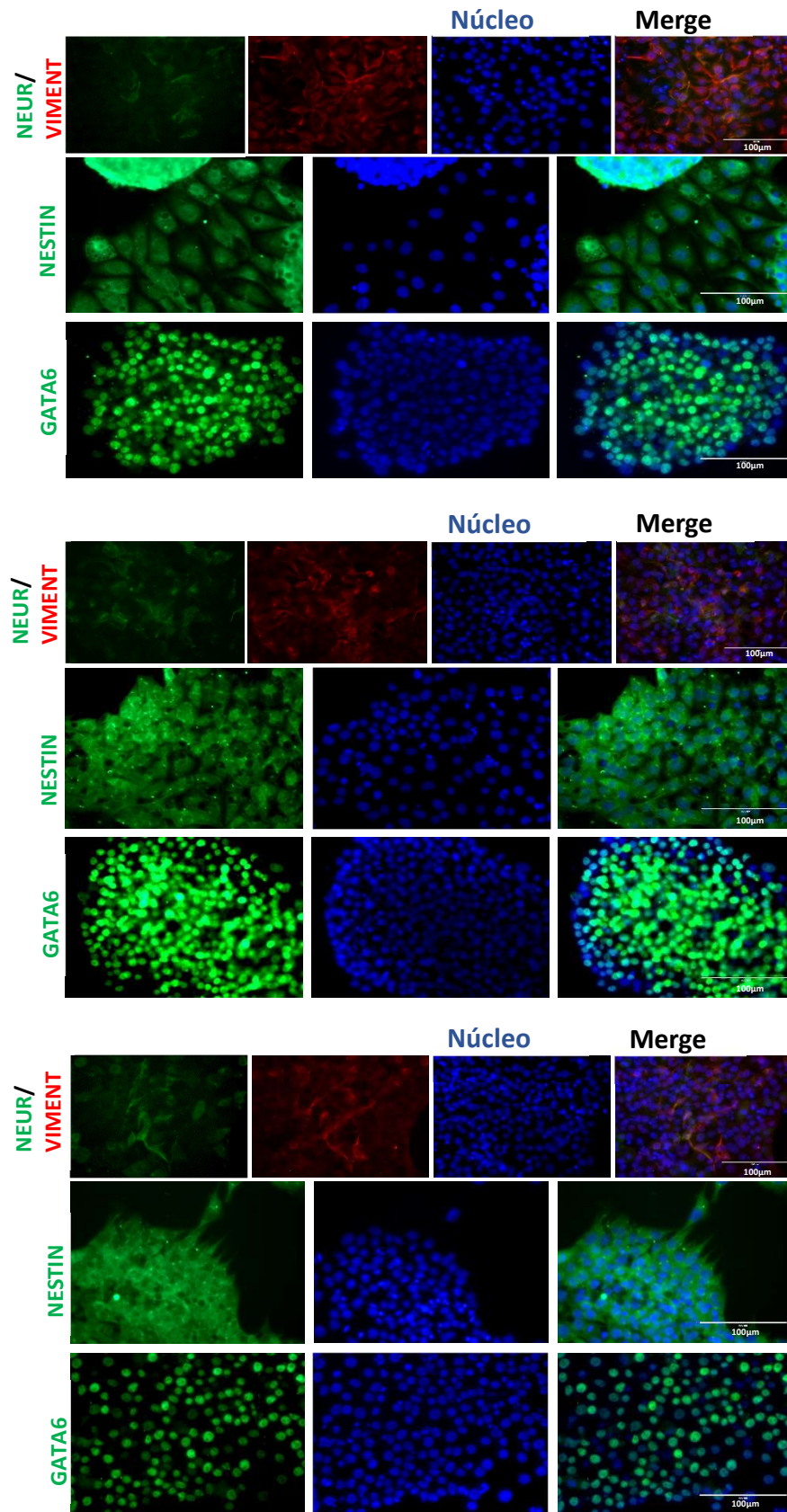


Figura 7. Resultados da imunofluorescência realizada nas células que sofreram diferenciação espontânea. A= grupo A; B= grupo AB; C= grupo B. Todos os grupos apresentaram-se positivos para os marcadores de mesoderme (vimentina), ectoderme (nestina e neurofilamento), e endoderme (Gata6). Barras de escala: 100µm.

Esses resultados dão suporte à suposição de que a alteração da atmosfera de oxigênio leva à formação de diferentes perfis de eiPSC, e essas diferenças podem ser utilizadas para orientar o processo de diferenciação das células antes de uma possível aplicação clínica ou para seu uso em estudos *in vitro*. Ademais, considerando os estudos em diferentes atmosferas de oxigênio, é importante que se determinem os critérios que definem os cultivos em alto e baixo oxigênio para cada tipo de célula, considerando as notórias diferenças entre as diferentes espécies.

4. Conclusão

O presente estudo obteve sucesso em reprogramar à pluripotência fibroblastos de um animal de 21 anos de idade. As eiPSC geradas eram positivas para fosfatase alcalina, para OCT4 e NANOG, nos ensaios de imunofluorescência, além de demonstraram expressão endógena dos genes relacionados à pluripotência *OCT4*, *SOX2*, *REX-1*, e *NANOG* e terem sido capazes de formar corpos embrióides e de se diferenciarem espontaneamente, gerando células das três camadas germinativas embrionárias: endoderme, ectoderme e mesoderme. Ademais, o tempo de duplicação populacional e os resultados de expressão gênica para *TERT* e *CDKN2A* sugerem que, após a reprogramação, as eiPSC reverteram o estado de senescência dos fibroblastos.

Diferenças importantes foram observadas entre as eiPSC formadas nas diferentes tensões de oxigênio. Os resultados de morfologia e imunofluorescência e expressão gênica sugerem que diferentes perfis de eiPSC foram adquiridos em cada ambiente. Esses resultados são inéditos para equinos, e demonstram que o cultivo em baixa tensão de oxigênio não pareceu favorecer a pluripotência de células dessa espécie. No entanto, é importante ressaltar que a tensão de oxigênio influenciou na formação de diferentes perfis de eiPSC.

CAPÍTULO 4 – CONSIDERAÇÕES FINAIS

As células tronco pluripotentes induzidas apresentam grande potencial para as terapias regenerativas e para estudos *in vitro*. Porém, alguns aspectos do processo de reprogramação celular ainda não foram completamente elucidados, especialmente no que concerne as espécies domésticas. Nos últimos anos, algumas pesquisas vêm esclarecendo o papel do metabolismo celular na reprogramação à pluripotência, atribuindo a ele uma característica de causa, mais do que consequência, da ocorrência da reprogramação celular. Nesse contexto, o oxigênio representa um elemento importante, já que é envolvido diretamente no metabolismo energético da célula. Sendo assim, a disponibilidade de oxigênio para as células em processo de reprogramação e para as células pluripotentes deve ser considerada como um fator de importância nos cultivos celulares.

Muitos estudos sobre as alterações do metabolismo na aquisição da pluripotência têm sido realizados na espécie humana e em camundongos, porém, estudos sobre a influência da atmosfera de oxigênio no cultivo de células iPSC de equinos (eiPSC) ainda não foram desenvolvidos. Dessa forma, a hipótese de que o cultivo em tensão mais baixa de oxigênio (5% O₂) favorece a reprogramação de células somáticas a um estado de pluripotência, contribui para a geração de células eiPSC com mais características relacionadas à pluripotência e influencia positivamente na manutenção da pluripotência nas células mantidas em cultivo *in vitro* por períodos prolongados, na espécie equina, foi testada na presente tese.

Os resultados encontrados a partir dos experimentos realizados nos levam a concluir que houve mudanças na expressão gênica ao longo da reprogramação à pluripotência nas diferentes tensões de oxigênio, comprovando que a tensão de oxigênio influencia no processo de reprogramação das células eiPSC. A eficiência de formação de colônias eiPSC em baixo oxigênio, nas condições testadas, foi maior que em alto oxigênio, comprovando a primeira parte da nossa hipótese. Porém, os resultados das análises de morfologia das colônias de eiPSC formadas, da imunofluorescência e da expressão gênica das células eiPSC sugerem que diferentes perfis de eiPSC foram formados em cada atmosfera de oxigênio, sendo que as células formadas e mantidas em atmosfera de 20% de oxigênio apresentaram mais

características de pluripotência do que as células cultivadas em 5% de oxigênio, o que refuta a segunda parte da nossa hipótese.

Esses resultados são inéditos para a espécie equina, e demonstram que o cultivo em baixa tensão de oxigênio foi favorável a obtenção de um maior número de colônias eiPS, mas não pareceu favorecer a pluripotência das eiPSC obtidas nessa espécie. As importantes modulações nos genes relacionados a pluripotência, fusão mitocondrial, metabolismo da glicose e regulação dos fatores de transcrição HIF, que controlam a resposta da célula a hipóxia, encontradas, sugerem que houve um papel importante da atmosfera de oxigênio na geração desses diferentes perfis de eiPSC. Esses resultados sugerem que há uma regulação, pela atmosfera de oxigênio, de genes cruciais à reprogramação celular à pluripotência, e que esse é um fator que deve ser levado em conta nos procedimentos de reprogramação e cultivo de células eiPSC.

Referências

ALLSOPP, R. C. et al. **Telomere Shortening Is Associated with Cell Division in Vitro and in Vivo** *Experimental Cell Research*, 1995.

BARKER, R. A. et al. Human Trials of Stem Cell-Derived Dopamine Neurons for Parkinson's Disease: Dawn of a New Era. **Cell Stem Cell**, v. 21, n. 5, p. 569–573, 2017.

BAXTER, M. A. et al. Study of Telomere Length Reveals Rapid Aging of Human Marrow Stromal Cells following In Vitro Expansion. **Stem Cells**, v. 22, n. 5, p. 675–682, 1 set. 2004.

BOLAND, M. J. et al. Adult mice generated from induced pluripotent stem cells. **Nature**, v. 461, n. 7260, p. 91–94, 2009.

BRAMBRINK, T. et al. Sequential Expression of Pluripotency Markers during Direct Reprogramming of Mouse Somatic Cells. **Cell Stem Cell**, v. 2, n. 2, p. 151–159, 2008.

BRETON, A. et al. Derivation and Characterization of Induced Pluripotent Stem Cells

from Equine Fibroblasts. **Stem Cells and Development**, v. 22, n. 4, p. 611–621, 15 fev. 2013.

BRIX, J.; ZHOU, Y.; LUO, Y. The Epigenetic Reprogramming Roadmap in Generation of iPSCs from Somatic Cells. **Journal of Genetics and Genomics**, v. 42, n. 12, p. 661–670, 2015.

BROSNAHAN, M. M.; PARADIS, M. R. Demographic and clinical characteristics of geriatric horses: 467 Cases (1989-1999). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 223, n. 1, p. 93–98, 2003.

CAMPISI, J.; D'ADDA DI FAGAGNA, F. Cellular senescence: When bad things happen to good cells. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 8, n. 9, p. 729–740, 2007.

CARBOGNIN, E. et al. Stat3 promotes mitochondrial transcription and oxidative respiration during maintenance and induction of naive pluripotency. **The EMBO Journal**, v. 35, n. 6, p. 618–634, 2016.

CEBRIAN-SERRANO, A.; STOUT, T.; DINNYES, A. Veterinary applications of induced pluripotent stem cells: regenerative medicine and models for disease? **Veterinary journal (London, England : 1997)**, v. 198, n. 1, p. 34–42, 2013.

CHEN, C.-T.; HSU, S.-H.; WEI, Y.-H. Mitochondrial bioenergetic function and metabolic plasticity in stem cell differentiation and cellular reprogramming. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1820, n. 5, p. 571–576, maio 2012.

CHRISTENSEN, D. R.; CALDER, P. C.; HOUGHTON, F. D. GLUT3 and PKM2 regulate OCT4 expression and support the hypoxic culture of human embryonic stem cells. **Scientific Reports**, v. 5, n. July, p. 1–14, 2015.

CHUNG, S. et al. Mitochondrial oxidative metabolism is required for the cardiac differentiation of stem cells. **Nature Clinical Practice Cardiovascular Medicine**, v. 4, n. SUPPL. 1, 2007.

CONG, X. et al. Large Animal Models for the Clinical Application of Human Induced Pluripotent Stem Cells. **Stem Cells and Development**, v. 28, n. 19, p. 1288–1298, 1 out. 2019.

COVELLO, K. L. et al. HIF-2 regulates Oct-4: effects of hypoxia on stem cell function, embryonic development, and tumor growth. **Genes & Development**, v. 20, n. 5, p. 557–570, 1 mar. 2006.

CSETE, M. Oxygen in the cultivation of stem cells. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1049, p. 1–8, 2005.

CYRANOSKI, D. 'Reprogrammed' stem cells approved to mend human hearts for the first time. **Nature**, v. 557, n. 7707, p. 619–620, 29 maio 2018.

DAHAN, P. et al. Metabolism in pluripotency: Both driver and passenger? **Journal of Biological Chemistry**, v. 294, n. 14, p. 5420–5429, 2019.

DE SCHAUWER, C. et al. Mesenchymal stem cell therapy in horses: Useful beyond orthopedic injuries? **Veterinary Quarterly**, v. 33, n. 4, p. 234–241, 2013.

DEBERARDINIS, R. J. et al. The Biology of Cancer: Metabolic Reprogramming Fuels Cell Growth and Proliferation. **Cell Metabolism**, v. 7, n. 1, p. 11–20, jan. 2008.

DESCHENE, K. et al. Hypoxia regulates the expression of extracellular matrix associated proteins in equine dermal fibroblasts via HIF1. **Journal of Dermatological Science**, v. 65, n. 1, p. 12–18, 2012.

DJOJOSUBROTO, M. W. et al. Telomeres and telomerase in aging, regeneration and cancer. **Molecules and Cells**, v. 15, n. 2, p. 164–175, 2003.

DONADEU, F. X. Equine induced pluripotent stem cells or how to turn skin cells into neurons: Horse tissues a la carte? **Equine Veterinary Journal**, v. 46, n. 5, p. 534–537, 2014.

DONADEU, F. X.; ESTEVES, C. L. Prospects and Challenges of Induced Pluripotent Stem Cells in Equine Health. **Frontiers in veterinary science**, v. 2, n. November, p. 59, 2015.

DOSS, M. X.; SACHINIDIS, A. Current Challenges of iPSC-Based Disease Modeling and Therapeutic Implications. **Cells**, v. 8, n. 5, p. 403, 2019.

DUNWOODIE, S. L. The Role of Hypoxia in Development of the Mammalian Embryo. **Developmental Cell**, v. 17, n. 6, p. 755–773, 2009.

DUTTA, D.; HEO, I.; CLEVERS, H. Disease Modeling in Stem Cell-Derived 3D

Organoid Systems. **Trends in Molecular Medicine**, v. 23, n. 5, p. 393–410, maio 2017.

EGASHIRA, T.; YUASA, S.; FUKUDA, K. Stem Cell Research for Regenerative Medicine / Personalized Medicine Novel Insights into Disease Modeling Using Induced Pluripotent Stem Cells. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 36, n. 2, p. 182–188, 2013.

ESTEVEZ, C. L. et al. Expression of putative markers of pluripotency in equine embryonic and adult tissues. **Veterinary Journal**, v. 202, n. 3, p. 533–535, 2014.

EZASHI, T.; DAS, P.; ROBERTS, R. M. Low O₂ tensions and the prevention of differentiation of hES cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 13, p. 4783–8, 2005.

FOLMES, C. D. et al. Metabolome and metaboproteome remodeling in nuclear reprogramming. **Cell Cycle**, v. 12, n. 15, p. 2355–2365, 28 ago. 2013.

FOLMES, C. D. L. et al. Somatic Oxidative Bioenergetics Transitions into Pluripotency-Dependent Glycolysis to Facilitate Nuclear Reprogramming. **Cell Metabolism**, v. 14, n. 2, p. 264–271, ago. 2011.

FORRISTAL, C. E. et al. Hypoxia inducible factors regulate pluripotency and proliferation in human embryonic stem cells cultured at reduced oxygen tensions. **Reproduction**, v. 139, n. 1, p. 85–97, 2010.

FOSSETT, E. et al. Effect of age and gender on cell proliferation and cell surface characterization of synovial fat pad derived mesenchymal stem cells. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 30, n. 7, p. 1013–1018, 2012.

GRAYSON, W. L. et al. Hypoxia enhances proliferation and tissue formation of human mesenchymal stem cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 358, n. 3, p. 948–953, 2007.

GRUBER, H. E. et al. Human adipose-derived mesenchymal stem cells: Serial passaging, doubling time and cell senescence. **Biotechnic and Histochemistry**, v. 87, n. 4, p. 303–311, 2012.

GUO, C. W. et al. Culture under low physiological oxygen conditions improves the stemness and quality of induced pluripotent stem cells. **Journal of Cellular**

Physiology, v. 228, n. 11, p. 2159–2166, 2013.

HAWKINS, K. E.; SHARP, T. V; MCKAY, T. R. The role of hypoxia in stem cell potency and differentiation. **Regenerative medicine**, v. 8, p. 771–82, 2013.

HOTTA, A.; ELLIS, J. Retroviral vector silencing during iPS cell induction: An epigenetic beacon that signals distinct pluripotent states. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 105, n. 4, p. 940–948, 1 nov. 2008.

HOUGHTON, F. D. et al. Oxygen consumption and energy metabolism of the early mouse embryo. **Molecular Reproduction and Development**, v. 44, n. 4, p. 476–485, 1996.

IRELAND, J. L. et al. Disease prevalence in geriatric horses in the United Kingdom: Veterinary clinical assessment of 200 cases. **Equine Veterinary Journal**, v. 44, n. 1, p. 101–106, 2012a.

IRELAND, J. L. et al. A survey of health care and disease in geriatric horses aged 30years or older. **The Veterinary Journal**, v. 192, n. 1, p. 57–64, abr. 2012b.

IVANOVIC, Z. Hypoxia or in situ normoxia: The stem cell paradigm. **Journal of Cellular Physiology**, v. 219, n. 2, p. 271–275, 2009.

KENYON, C. J. The genetics of ageing. **Nature**, v. 464, n. 7288, p. 504–512, 2010.

KHODADADI, K. et al. Induction of pluripotency in adult equine fibroblasts without c-MYC. **Stem Cells International**, v. 2012, 2012.

KOH, S.; PIEDRAHITA, J. A. From “ES-like” cells to induced pluripotent stem cells: A historical perspective in domestic animals. **Theriogenology**, v. 81, n. 1, p. 103–111, 2014.

KONDOH, H. et al. Protection from oxidative stress by enhanced glycolysis; a possible mechanism of cellular immortalization. **Histology and Histopathology**, v. 22, n. 1–3, p. 85–90, 2007a.

KONDOH, H. et al. A high glycolytic flux supports the proliferative potential of murine embryonic stem cells. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 9, n. 3, p. 293–299, 2007b.

KUILMAN, T. et al. The essence of senescence. **Genes & Development**, v. 24, n.

22, p. 2463–2479, 15 nov. 2010.

LAGA, A. C. et al. Expression of the embryonic stem cell transcription factor SOX2 in human skin: Relevance to melanocyte and merkel cell biology. **American Journal of Pathology**, v. 176, n. 2, p. 903–913, 2010.

LEE, E. et al. Generation of Equine-Induced Pluripotent Stem Cells and Analysis of Their Therapeutic Potential for Muscle Injuries. **Cell Transplantation**, v. 25, p. 2003–2016, 2016.

LENGNER, C. J. et al. Derivation of pre-X inactivation human embryonic stem cells under physiological oxygen concentrations. **Cell**, v. 141, n. 5, p. 872–883, 2010.

LI, X. B.; GU, J. D.; ZHOU, Q. H. Review of aerobic glycolysis and its key enzymes - new targets for lung cancer therapy. **Thoracic Cancer**, v. 6, n. 1, p. 17–24, 2015.

LIU, S.-P. et al. Mouse-Induced Pluripotent Stem Cells Generated Under Hypoxic Conditions in the Absence of Viral Infection and Oncogenic Factors and Used for Ischemic Stroke Therapy. **Stem cells and development**, v. 23, n. 2, p. 1–34, 2014.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402–408, dez. 2001.

MAHERALI, N.; HOCHEDLINGER, K. Guidelines and Techniques for the Generation of Induced Pluripotent Stem Cells. **Cell Stem Cell**, v. 3, n. 6, p. 595–605, 2008.

MAHMOUDI, S. et al. **Heterogeneity in old fibroblasts is linked to variability in reprogramming and wound healing.** [s.l.] Springer US, 2019. v. 574

MAHMOUDI, S.; BRUNET, A. Aging and reprogramming: a two-way street. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 24, n. 6, p. 744–756, dez. 2012.

MANDAI, M. et al. Autologous induced stem-cell-derived retinal cells for macular degeneration. **New England Journal of Medicine**, v. 376, n. 11, p. 1038–1046, 2017.

MARION, R. M. et al. Telomeres Acquire Embryonic Stem Cell Characteristics in Induced Pluripotent Stem Cells. **Cell Stem Cell**, v. 4, n. 2, p. 141–154, 2009.

MATHIEU, J. et al. Hypoxia induces re-entry of committed cells into pluripotency.

STEM CELLS, v. 31, n. 9, p. 1737–1748, set. 2013.

MATHIEU, J. et al. Hypoxia-Inducible Factors Have Distinct and Stage-Specific Roles during Reprogramming of Human Cells to Pluripotency. **Cell Stem Cell**, v. 14, n. 5, p. 592–605, maio 2014a.

MATHIEU, J. et al. Hypoxia-Inducible Factors Have Distinct and Stage-Specific Roles during Reprogramming of Human Cells to Pluripotency. **Cell Stem Cell**, v. 14, n. 5, p. 592–605, maio 2014b.

MCGOWAN, T. et al. A survey of aged horses in Queensland, Australia. Part 2: clinical signs and owners' perceptions of health and welfare. **Australian Veterinary Journal**, v. 88, n. 12, p. 465–471, dez. 2010a.

MCGOWAN, T. W. et al. A survey of aged horses in Queensland, Australia. Part 1: Management and preventive health care. **Australian Veterinary Journal**, v. 88, n. 11, p. 420–427, 2010b.

MORO, L. N. et al. MicroRNA characterization in equine induced pluripotent stem cells. **PLoS ONE**, v. 13, n. 12, p. 1–17, 2018.

NAGY, K. et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from equine fibroblasts. **Stem Cell Reviews and Reports**, v. 7, n. 3, p. 546–546, 2011.

NICHOLLS, C.; LI, H.; LIU, J. P. GAPDH: A common enzyme with uncommon functions. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 39, n. 8, p. 674–679, 2012.

NICHOLS, J. et al. Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. **Cell**, v. 95, n. 3, p. 379–391, 1998.

NICHOLS, J.; SMITH, A. **Naive and Primed Pluripotent States** **Cell Stem Cell**, 2009a.

NICHOLS, J.; SMITH, A. Naive and Primed Pluripotent States. **Cell Stem Cell**, v. 4, n. 6, p. 487–492, jun. 2009b.

NISHIMURA, K.; FUKUDA, A.; HISATAKE, K. Mechanisms of the Metabolic Shift during Somatic Cell Reprogramming. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 9, p. 2254, 7 maio 2019.

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

OKANO, H. et al. Steps toward safe cell therapy using induced pluripotent stem cells. **Circulation Research**, v. 112, n. 3, p. 523–533, 2013.

PANOPOULOS, A. D. et al. The metabolome of induced pluripotent stem cells reveals metabolic changes occurring in somatic cell reprogramming. **Cell Research**, v. 22, n. 1, p. 168–177, 2012.

PARK, Y. H. et al. Peroxiredoxin I participates in the protection of reactive oxygen species-mediated cellular senescence. **BMB Reports**, v. 50, n. 10, p. 528–533, 2017.

PARRINELLO, S. et al. Oxygen sensitivity severely limits the replicative lifespan of murine fibroblasts. **Nature Cell Biology**, v. 5, n. 8, p. 741–747, 13 ago. 2003.

PESSÔA, L. V. DE F. et al. Generation and miRNA Characterization of Equine Induced Pluripotent Stem Cells Derived from Fetal and Adult Multipotent Tissues. **Stem Cells International**, v. 2019, p. 1–15, 2 maio 2019.

PESSÔA, L. V. DE F.; BRESSAN, F. F.; FREUDE, K. K. Induced pluripotent stem cells throughout the animal kingdom: Availability and applications. **World Journal of Stem Cells**, v. 11, n. 8, p. 491–505, 26 ago. 2019.

PETRUZZELLI, R. et al. HIF-2 α regulates NANOG expression in human embryonic stem cells following hypoxia and reoxygenation through the interaction with an oct-sox cis regulatory element. **PLoS ONE**, v. 9, n. 10, p. 1–11, 2014.

PIMTON, P. et al. Hypoxia enhances differentiation of mouse embryonic stem cells into definitive endoderm and distal lung cells. **Stem cells and development**, v. 24, n. 5, p. 663–76, 2015.

POLO, J. M. et al. Cell type of origin influences the molecular and functional properties of mouse induced pluripotent stem cells. **Nature Biotechnology**, v. 28, n. 8, p. 848–855, 19 ago. 2010.

POLO, J. M. et al. A molecular roadmap of reprogramming somatic cells into iPS

cells. **Cell**, v. 151, n. 7, p. 1617–1632, 2012.

POUYSSÉGUR, J.; DAYAN, F.; MAZURE, N. M. Hypoxia signalling in cancer and approaches to enforce tumour regression. **Nature**, v. 441, n. 7092, p. 437–443, 2006.

PRIETO, J. et al. Dysfunctional mitochondrial fission impairs cell reprogramming. **Cell Cycle**, v. 15, n. 23, p. 3240–3250, 2016a.

PRIETO, J. et al. Early ERK1/2 activation promotes DRP1-dependent mitochondrial fission necessary for cell reprogramming. **Nature Communications**, v. 7, p. 1–13, 2016b.

PRIETO, J. et al. Mitochondrial dynamics and metabolism in induced pluripotency. **Experimental Gerontology**, v. 133, p. 110870, 2020.

PRIGIONE, A. et al. The senescence-related mitochondrial/oxidative stress pathway is repressed in human induced pluripotent stem cells. **Stem Cells**, v. 28, n. 4, p. 721–733, 2010a.

PRIGIONE, A. et al. The senescence-related mitochondrial/oxidative stress pathway is repressed in human induced pluripotent stem cells. **Stem Cells**, v. 28, n. 4, p. 721–733, 2010b.

QUATTROCELLI, M. et al. Equine-Induced Pluripotent Stem Cells Retain Lineage Commitment Toward Myogenic and Chondrogenic Fates. **Stem Cell Reports**, v. 6, n. 1, p. 55–63, jan. 2016.

RALSER, M. et al. Metabolic reconfiguration precedes transcriptional regulation in the antioxidant response. **Nature Biotechnology**, v. 27, n. 7, p. 604–605, 2009.

RAMZAN, R. et al. GAPDH: The missing link between glycolysis and mitochondrial oxidative phosphorylation? **Biochemical Society Transactions**, v. 41, n. 5, p. 1294–1297, 2013.

RANDO, T. A.; CHANG, H. Y. Aging, Rejuvenation, and Epigenetic Reprogramming: Resetting the Aging Clock. **Cell**, v. 148, n. 1–2, p. 46–57, jan. 2012.

RASTOGI, A. et al. Remodeling of mitochondrial morphology and function: an emerging hallmark of cellular reprogramming. **Cell Stress**, v. 3, n. 6, p. 181–194,

2019.

ROWE, R. G.; DALEY, G. Q. Induced pluripotent stem cells in disease modelling and drug discovery. **Nature Reviews Genetics**, v. 20, n. 7, p. 377–388, 2019.

SAGE, A. M. Cardiac disease in the geriatric horse. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v. 18, n. 3, p. 575–589, dez. 2002.

SCHARSTUHL, A. et al. Chondrogenic Potential of Human Adult Mesenchymal Stem Cells Is Independent of Age or Osteoarthritis Etiology. **Stem Cells**, v. 25, n. 12, p. 3244–3251, 2007.

SCOTT, I.; YOULE, R. J. Mitochondrial fission and fusion. v. 118, n. 24, p. 6072–6078, 2016.

SEMENZA, G. L. Hypoxia-inducible factor 1: Oxygen homeostasis and disease pathophysiology. **Trends in Molecular Medicine**, v. 7, n. 8, p. 345–350, 2001.

SENO, K. et al. Oxygen concentration modulates cellular senescence and autophagy in human trophoblast cells. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 79, n. 6, p. 1–10, 2018.

SEO, B. J.; YOON, S. H.; DO, J. T. Mitochondrial dynamics in stem cells and differentiation. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 12, 2018.

SHARMA, R. et al. Generation of functional neurons from feeder-free, keratinocyte-derived equine induced pluripotent stem cells. **Stem cells and development**, v. 23, n. 13, p. 1524–34, 2014.

SHI, G.; JIN, Y. Role of Oct4 in maintaining and regaining stem cell pluripotency. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 1, n. 5, p. 39, dez. 2010.

SHWEIKI, D. et al. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. **Nature**, v. 359, n. 6398, p. 843–845, out. 1992.

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

SILVA, J. et al. Nanog Is the Gateway to the Pluripotent Ground State. **Cell**, v. 138, n. 4, p. 722–737, 2009.

SMIRNOVA, E. et al. A human dynamin-related protein controls the distribution of mitochondria. **Journal of Cell Biology**, v. 143, n. 2, p. 351–358, 1998.

SMITH, O. E.; MURPHY, B. D.; SMITH, L. C. Derivation and Potential Applications of Pluripotent Stem Cells for Regenerative Medicine in Horses. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 39, n. 1, p. s273–s283, 2011.

SMITH, R. K. W.; GARVICAN, E. R.; FORTIER, L. A. The current “state of play” of regenerative medicine in horses: What the horse can tell the human. **Regenerative Medicine**, v. 9, n. 5, p. 673–685, 2014.

SOMMER, C. A. et al. Induced pluripotent stem cell generation using a single lentiviral stem cell cassette. **Stem cells (Dayton, Ohio)**, v. 27, n. 3, p. 543–9, 2009.

SON, M. J. et al. Mitofusins deficiency elicits mitochondrial metabolic reprogramming to pluripotency. **Cell Death and Differentiation**, v. 22, n. 12, p. 1957–1969, 2015.

SON, M. Y. et al. Unveiling the critical role of REX1 in the regulation of human stem cell pluripotency. **Stem Cells**, v. 31, n. 11, p. 2374–2387, 2013a.

SON, M. Y. et al. Unveiling the critical role of REX1 in the regulation of human stem cell pluripotency. **Stem Cells**, v. 31, n. 11, p. 2374–2387, 2013b.

SPERBER, H. et al. The metabolome regulates the epigenetic landscape during naive-to-primed human embryonic stem cell transition. **Nature Cell Biology**, v. 17, n. 12, p. 1523–1535, 16 dez. 2015.

SUMER, H.; LIU, J.; VERMA, P. J. The use of signalling pathway inhibitors and chromatin modifiers for enhancing pluripotency. **Theriogenology**, v. 74, n. 4, p. 525–533, 2010.

TAKAHASHI, K.; YAMANAKA, S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. **Cell**, v. 126, n. 4, p. 663–676, 2006.

TRISTAN, C. et al. The diverse functions of GAPDH: Views from different subcellular compartments. **Cellular Signalling**, v. 23, n. 2, p. 317–323, fev. 2011.

TROKOVIC, R. et al. Combined negative effect of donor age and time in culture on the reprogramming efficiency into induced pluripotent stem cells. **Stem Cell**

Research, v. 15, n. 1, p. 254–262, jul. 2015.

UTIKAL, J. et al. Immortalization eliminates a roadblock during cellular reprogramming into iPS cells. **Nature**, v. 460, n. 7259, p. 1145–1148, 9 ago. 2009.

VANDER HEIDEN, M. G.; CANTLEY, L. C.; THOMPSON, C. B. Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation. **Science**, v. 324, n. 5930, p. 1029–1033, 22 maio 2009.

VARUM, S. et al. Energy metabolism in human pluripotent stem cells and their differentiated counterparts. **PLoS ONE**, v. 6, n. 6, 2011.

VAZQUEZ-MARTIN, A. et al. Mitochondrial fusion by pharmacological manipulation impedes somatic cell reprogramming to pluripotency: New insight into the role of mitophagy in cell stemness. **Aging**, v. 4, n. 6, p. 393–401, 2012.

VOLK, S. W.; THEORET, C. Translating stem cell therapies: The role of companion animals in regenerative medicine. **Wound Repair and Regeneration**, v. 21, n. 3, p. 382–394, 2013.

WANG, G. L. et al. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 92, n. 12, p. 5510–5514, 1995.

WANG, G. L.; SEMENZA, G. L. Characterization of hypoxia-inducible factor 1 and regulation of DNA binding activity by hypoxia. **Journal of Biological Chemistry**, v. 268, n. 29, p. 21513–21518, 1993.

WANG, L. et al. Drp1 is dispensable for mitochondria biogenesis in induction to pluripotency but required for differentiation of embryonic stem cells. **Stem Cells and Development**, v. 23, n. 20, p. 2422–2434, 2014.

WEINBERGER, L. et al. Dynamic stem cell states: Naive to primed pluripotency in rodents and humans. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 17, n. 3, p. 155–169, 2016.

WHITWORTH, D. J. et al. Generation and Characterization of Leukemia Inhibitory Factor-Dependent Equine Induced Pluripotent Stem Cells from Adult Dermal

- Fibroblasts. **Stem Cells and Development**, v. 23, n. 13, p. 1515–1523, jul. 2014.
- WHITWORTH, D. J.; OVCHINNIKOV, D. A.; WOLVETANG, E. J. Generation and characterization of LIF-dependent canine induced pluripotent stem cells from adult dermal fibroblasts. **Stem cells and development**, v. 21, n. 12, p. 2288–97, 2012.
- WILEY, C. D. et al. Mitochondrial dysfunction induces senescence with a distinct secretory phenotype. **Cell Metabolism**, v. 23, n. 2, p. 303–314, 2016.
- WU, J.; OCAMPO, A.; BELMONTE, J. C. I. Cellular Metabolism and Induced Pluripotency. **Cell**, v. 166, n. 6, p. 1371–1385, 2016.
- WU, J.; YAMAUCHI, T.; BELMONTE, J. C. I. An overview of mammalian pluripotency. **Development (Cambridge)**, v. 143, n. 10, p. 1644–1648, 2016.
- YOSHIDA, Y. et al. Hypoxia Enhances the Generation of Induced Pluripotent Stem Cells. **Cell Stem Cell**, v. 5, n. 3, p. 237–241, 2009a.
- YOSHIDA, Y. et al. Hypoxia Enhances the Generation of Induced Pluripotent Stem Cells. **Cell Stem Cell**, v. 5, n. 3, p. 237–241, 2009b.
- ZEEVI-LEVIN, N.; ITSKOVITZ-ELDOR, J.; BINAH, O. Cardiomyocytes derived from human pluripotent stem cells for drug screening. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 134, n. 2, p. 180–188, 2012.
- ZHANG, J. et al. Metabolic Regulation in Pluripotent Stem Cells during Reprogramming and Self-Renewal. **Cell Stem Cell**, v. 11, n. 5, p. 589–595, nov. 2012.
- ZHAO, R. et al. Implications of Genetic and Epigenetic Alterations of CDKN2A (p16INK4a) in Cancer. **EBioMedicine**, v. 8, n. 127, p. 30–39, 2016.
- ZHOU, S. et al. Age-related intrinsic changes in human bone-marrow-derived mesenchymal stem cells and their differentiation to osteoblasts. **Aging Cell**, v. 7, n. 3, p. 335–343, 2008.
- ZHOU, W. et al. HIF1 α induced switch from bivalent to exclusively glycolytic metabolism during ESC-to-EpiSC/hESC transition. **EMBO Journal**, v. 31, n. 9, p. 2103–2116, 2012.