

Universidade do Algarve

Estabelecimento de modelos celulares de Síndrome de Down: uma nova ferramenta para o estudo do desenvolvimento neuronal

Monografia final de curso

Licenciatura em Ciências Biomédicas

Igor Vairinho Ventura, 70941

Orientado por: Professora Inês Araújo e Professora Sónia Simão

ABC-RI

Julho de 2023

Universidade do Algarve

**Estabelecimento de modelos celulares de
Síndrome de Down: uma nova
ferramenta para o estudo do
desenvolvimento neuronal**

Monografia final de curso

Licenciatura em Ciências Biomédicas

Igor Vairinho Ventura, 70941

Orientado por: Professora Inês Araújo e Professora Sónia Simão

ABC-RI

Julho de 2023

Índice

Resumo.....	III
Lista de Figuras e Tabelas	1
1 Introdução.....	1
1.1 Descrição da síndrome de Down.....	1
1.2 Genes presentes no cromossoma 21	2
1.3 Detecção e diagnóstico	3
1.4 Fenótipo da DS.....	4
1.5 Mecanismo do atraso do desenvolvimento cognitivo.....	5
1.6 Mecanismo de ação do Sulfureto de Hidrogénio	5
1.7 Modelos utilizados no estudo da DS.....	6
1.8 Células estaminais humanas pluripotentes induzidas	7
1.9 Estabelecimento e caracterização de linhas estaminais pluripotentes induzidas	8
1.10 Objetivo.....	9
2 Materiais e métodos.....	9
2.1 Cultura Celular de fibroblastos	9
2.2 Reprogramação de fibroblastos.....	10
2.3 Caracterização de linhas de iPSCs.....	10
2.3.1 Imunocitoquímica.....	10
2.3.2 Atividade da Fosfatase Alcalina.....	11
2.3.3 Citometria de fluxo.....	12
2.3.4 Análise de cariótipo	12
2.3.5 Detecção viral por PCR.....	13
2.3.6 Formação de Corpos embrióides.....	13
3 Resultados e Discussão	14
3.1 Linha T21 (AG06922) expressa marcadores de indiferenciação	14
3.2 Coloração para fosfatase alcalina	16
3.3 Detecção viral da Linha AG06922.....	16
3.4 Formação de EBs Linha AG06922.....	18
4 Discussão.....	19
5 Conclusão.....	21
Bibliografia.....	22

Resumo

A síndrome de Down (DS) é comumente causada pela trissomia do cromossoma 21, e caracteriza-se por deficit cognitivo, alterações na morfologia craniofacial e várias comorbilidades. Desequilíbrios na sinalização neurogénica durante períodos críticos da neurogénese são capazes de afetar a proliferação, migração e diferenciação das células estaminais neuronais, causando microcefalia e perturbação do desenvolvimento cerebral, responsáveis pelo deficit cognitivo. Assim, é de extrema importância compreender como o desenvolvimento cerebral é afetado na DS. Para tal, é necessário desenvolver ferramentas celulares que nos permitam estudar em detalhe o neurodesenvolvimento em células humanas. Deste modo, neste projeto pretendeu-se estabelecer e caracterizar linhas de células estaminais pluripotentes induzidas (iPSCs) obtidas a partir de fibroblastos da pele de pacientes com trissomia 21 (AG06922) reprogramadas com os factores de transcrição de Yamanaka. Para a caracterização da linha, foram utilizados os critérios propostos pela Sociedade internacional de investigação em células estaminais (ISSCR). Dentro dos quais inclui imunocitoquímica, citometria de fluxo, análise da fosfatase alcalina, deteção viral por PCR, capacidade de diferenciação nas 3 camadas germinativas, entre outros. Com a realização deste trabalho foi possível estabelecer com sucesso a linha iPSC proveniente de um paciente com DS. Esta ferramenta celular irá permitir de futuro estudar a diferenciação neuronal e avaliar vias de sinalização que possam estar alteradas nesta patologia

Lista de Figuras e Tabelas

Figura 1: Sintomas e manifestações da DS.....	5
Figura 2: Locais onde o H ₂ S atua.....	6
Figura 3: Caracterização da linha de iPSCs AG06922, Imunofluorescência	14
Figura 4: Caracterização da linha de iPSCs AG06922, Citometria de fluxo.....	15
Figura 5: Caracterização da linha de iPSCs AG06922. Fosfatase alcalina.....	16
Figura 6: Reação de PCR da linha AG06922 para detecção viral.....	17
Figura 7: Caracterização de EBs pela linha de iPSCs AG06922, Imunofluorescência.....	19
Tabela 1: Alguns dos genes presentes no cromossoma 21.....	3
Tabela 2: Detalhes sobre as células utilizadas neste trabalho.....	9
Tabela 3 : Vetores e fatores utilizados na reprogramação de fibroblastos.	10
Tabela 4: Anticorpos utilizados para Imunocitoquímica e Citometria de fluxo.....	11
Tabela 5: Primers utilizados na reação de PCR para detecção viral.....	13

1 Introdução

1.1 Descrição da síndrome de Down

A síndrome de down (DS) é caracterizada pela aneuploidia do cromossoma 21 e é das aneuploidias autossômicas compatíveis com a vida a mais comum. Afeta aproximadamente 1 em cada 732 crianças, sendo os fatores de risco desconhecidos. Sabe-se que a idade da mãe tem um papel muito importante, visto que a probabilidade de um filho ter DS quando a mãe tem mais de 35 anos é bastante elevada. No entanto, a maior parte das mães dos indivíduos com DS apresentam idade inferior, visto que há mais partos nessas idades (Antonarakis et al., 2020; Sherman et al., 2007).

A DS pode ser classificada de várias maneiras, dependendo do tipo de aneuploidia. As diferentes classificações de DS apresentam sintomas e comportamentos semelhantes, tornando muito difícil diferenciar sem recorrer a uma análise cromossômica (Facts about Down Syndrome | CDC, 2023.):

- **Trissomia 21 (T21)** ou trissomia completa: existem 3 cópias completas do cromossoma 21. Este tipo de trissomia é causada por um erro na meiose chamado “*nondisjunction*”, que acontece durante a formação dos gametas, havendo uma falha na separação dos cromossomas num dos gametas e afeta 95% dos doentes com DS;
- **Translocação:** uma parte extra ou todo o cromossoma 21 está ligado ou “translocado” num cromossoma diferente, normalmente o cromossoma 14, mantendo o número total de cromossomas (46). Apresenta características semelhantes à DS completa, no entanto o mecanismo que causa este tipo de DS ainda não está totalmente compreendido, mas sabe-se que afeta cerca de 3% dos doentes com DS;
- **Síndrome de Down em mosaico:** há duas ou mais linhagens celulares geneticamente distintas, todas oriundas do mesmo zigoto, onde os doentes possuem células euplóides e células trissómicas devido a um ou mais erros na segregação dos cromossomas, que podem ocorrer apenas na mitose ou na meiose e na mitose em simultâneo, em que uma das células fica com 46 cromossomas e outra com 47, possuindo um cromossoma 21 extra. Estudos indicam que este tipo de DS tem menos características da doença em comparação com outros estudos e afeta cerca de 2% dos doentes com DS (About Down Syndrome | National Down Syndrome Society (NDSS), 2023.; Bornstein et al., 2010; Papavassiliou et al., 2023.).

1.2 Genes presentes no cromossoma 21

O cromossoma 21 contém pelo menos 300 genes mas só cerca de 100 é que estão sobre-expressos na DS (Çağlayan, 2016). Alguns destes genes ao serem silenciados não são compatíveis com a vida, no entanto ao serem triplicados podem gerar problemas graves no desenvolvimento, originando os fenótipos de DS. Alguns desses genes estão listados na Tabela 1 com as respectivas doenças a que estão associados.

Tabela 1 - Alguns dos genes presentes no cromossoma 21 com a respetiva abreviatura, nome por extenso, GenBank ID e funções associadas (Gardiner & Costa, 2006).

Chr 21 Gene	GenBank ID	Descrição	Função
<i>APP</i>	351	Precursor amilóide	Doença de Alzheimer e endossomas anormais
<i>BACE2</i>	25825	Aspartyl protease	Clivagem da APP
<i>CBS</i>	875	Cystathionine beta synthase	Transformação da homocisteína em cistationina
<i>GRIK1</i>	2897	Subunidade recetora de glutamato (kainate)	Alvo de edição por pre-mRNA
<i>OLIG1</i>	116488	Fator de transcrição de oligodendrócitos	Neurogénese
<i>OLIG2</i>	10215	Fator de transcrição de oligodendrócitos	Neurogénese
<i>SOD1</i>	6647	Superoxide dismutase	Produção de H ₂ O ₂
<i>SYNJ1</i>	8867	Fosfoinositol fosfatase	Endocitose

1.3 Deteção e diagnóstico

A deteção de T21 inclui vários métodos de rastreio que permitem avaliar a probabilidade da mãe ter um filho com DS. Estes métodos são seguros para a mãe e para o feto e consistem numa combinação de análise de várias substâncias presentes no sangue da mãe. Podem também ser utilizados ultrassons onde se observa a quantidade de fluido atrás do pescoço do bebé e, caso haja excesso de fluido, pode ser indicativo de um problema genético. Os métodos de diagnóstico são feitos após um rastreio positivo e consistem em Amostragem de vilosidades coriônicas (CVS) que examina o material da placenta, Amniocentese que examina o líquido amniótico e Amostra percutânea de sangue umbilical (PUBS) que examina sangue do cordão umbilical. Todos estes testes procuram alterações nos cromossomas que possibilitem o diagnóstico da DS (Rafii et al., 2019).

1.4 Fenótipo da DS

Há diversos fenótipos neurológicos associados com a DS, como déficite intelectual, apneia de sono, convulsões, epilepsia, problemas comportamentais e demência (Rafii et al., 2019). Há ainda um conjunto de outras características associadas como doenças cardiovasculares, problemas musculoesqueléticos, leucemias, outras neoplasias, baixa estatura, maior probabilidade de desenvolver hipotireoidismo, doenças autoimunes, perda de audição e visão, entre outros (Fig1) (Antonarakis et al., 2020).

Em aspetos relacionados com o desenvolvimento cerebral, sabe-se que há alterações na estrutura do córtex e hipocampo de pacientes com DS, estas alterações ocorrem durante a neurogênese e resultam em microcefalia (menor tamanho do crânio), braquicefalia (achatamento da parte de trás do crânio), com volumes desproporcionalmente menores nas áreas frontais, temporais e cerebello, densidade neuronal reduzida, atrofia dendrítica, quando comparado com indivíduos saudáveis (Çağlayan, 2016; Lott & Dierssen, 2010). Sabe-se também que as capacidades proliferativas das células de doentes com DS estão reduzidas e têm mais suscetibilidade apoptótica. No giro dentado do hipocampo nota-se um aumento na percentagem de células com fenótipo de astrócito e menor percentagem de células com fenótipo de neurónio. Em modelos animais da doença como os *Mus musculus* Ts65Dn os precursores na zona ventricular apresentam um ciclo celular mais lento durante a mitose, o que resulta em atrasos no desenvolvimento do cérebro (Çağlayan, 2016).

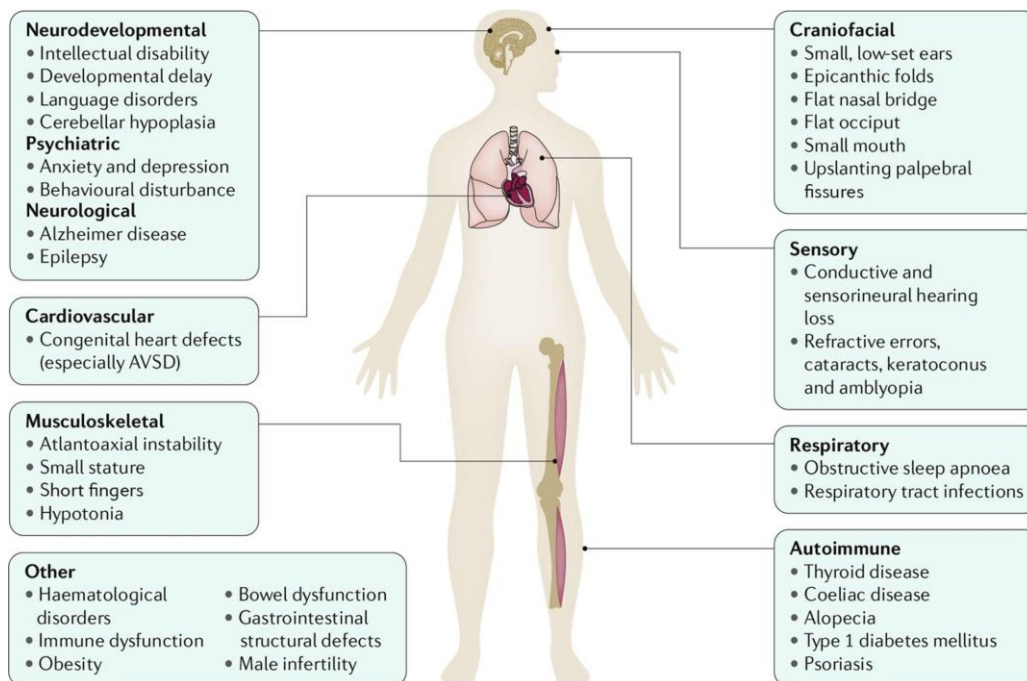


Fig.1 . Sintomas e manifestações da DS, retirado de Antonarakis et al., 2020.

1.5 Mecanismo do atraso do desenvolvimento cognitivo

Apesar do atraso cognitivo presente em doentes com DS, sabe-se que esse atraso é linear nos primeiros anos de vida. Uma das teorias avançadas que pretende explicar este fenómeno relaciona-se com a produção em excesso de um composto, o sulfureto de hidrogénio (H₂S) (P. P. Kamoun, 2019).

Até ao momento ainda não há tratamento disponível para a DS, no entanto há serviços que são oferecidos que ajudam no desenvolvimento da criança, como terapia da fala, fisioterapia, e terapia ocupacional (About Down Syndrome | National Down Syndrome Society (NDSS), 2023.; P. P. Kamoun, 2019).

1.6 Mecanismo de ação do Sulfureto de Hidrogénio

O H₂S é produzido no organismo pelas enzimas *cystathionine beta synthase* (CBS), juntamente com a *cystathionine γ-lyase* (CSE) e a *3-mercaptopyruvate sulfurtransferase* (MPST) (Werge et al., 2021). O gene que codifica para a CBS está localizado no cromossoma 21, triplicado em doentes com DS. Esta enzima catalisa o primeiro passo da via da transsulfuração, que envolve a transformação da homocisteína em cistationina que depois é hidrolisada pela *cystathionase* (CST) (P. Kamoun, 2001; Marechal et al., 2019). Há evidências de que o excesso de CBS é suficiente para induzir fenótipos cognitivos em modelos animais de DS (P. Kamoun, 2019). Sabe-se que o H₂S inibe a anidrase carbónica humana que está localizada principalmente nas células da glia, especificamente nos oligodendrócitos e ainda nos neurónios do hipocampo e células de Purkinje, o que causa danos no sistema nervoso central (SNC). Foram medidos os níveis de serotonina e de noradrenalina no córtex e no cerebelo quando foram feitos testes em que se administrava H₂S nos ratos e observou-se um aumento de ambas as moléculas em ambas as regiões, o que se sabe que altera o desenvolvimento dos neurónios como a sua divisão, migração, morfogénese e formação de sinapses, levando assim a problemas cognitivos, de memória e de outras funções. Sabe-se também que o H₂S em concentrações fisiológicas pode atuar como um relaxante do músculo liso, à semelhança do Óxido Nítrico (NO), ou ainda como um neuromodulador, induzindo *Long term potentiation* (LTP), pelo aumento da atividade do recetor NMDA, então em doentes com DS, havendo uma hiperprodução de H₂S, há uma disfunção muscular (hipotonia) e do cérebro (atraso mental) (P. Kamoun, 2001).

Fora do cérebro sabe-se que o H₂S tem várias funções como representado na figura 2, como a regulação do tónus vascular, inflamação, transcrição e angiogénese, protege as células do stress

oxidativo e promove a cura de úlceras e é importante para a integridade da mitocôndria, para o stress oxidativo, para a resposta inflamatória, para a permeabilidade da barreira hematoencefálica e para a circulação sanguínea no cérebro (Kimura, 2014).

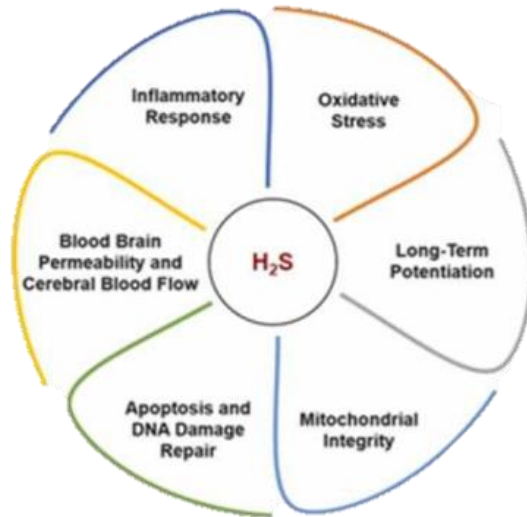


Fig. 2 . Alguns dos efeitos do H₂S ao nível celular (adaptado de R. Gupta et al., 2022)

1.7 Modelos utilizados no estudo da DS

Para o estudo da DS podem ser usados modelos animais, mas também culturas de células estaminais pluripotentes induzidas (iPSCs) descritas abaixo. Atualmente há mais de 30 modelos de murganhos que permitem estudar a DS. Estes modelos têm várias vantagens como a capacidade de testar novos fármacos diretamente num organismo ou observar a evolução da doença, no entanto todos eles apresentam diversas desvantagens. Nomeadamente, estes modelos apresentam baixa homologia com o cromossoma 21 humano (Hsa21) e por isso é difícil de replicar a DS nos murganhos (Herault et al., 2017). O modelo animal mais utilizado para o estudo da DS é o Ts65Dn e é trissômico para 125 ortólogos codificadores de proteínas humanas, mas apenas 90 deles são ortólogos Hsa21 e não possui trissomia para ~75 ortólogos do Hsa21. Os outros modelos já criados não têm sucesso na reprodução, nem são trissômicos para todos os ortólogos do cromossoma 21, não sendo por isso considerados modelos de DS completos (M. Gupta et al., 2016). Os modelos animais que já existem não mimetizam na totalidade a patologia, pelo que é de extrema importância a criação de modelos mais semelhantes, como linhas celulares humanas, que permitam estudar melhor a doença e os efeitos do H₂S.

1.8 Células estaminais humanas pluripotentes induzidas

A utilização de células estaminais humanas pluripotentes induzidas (iPSCs) permite colmatar os problemas de semelhança, visto que sendo células humanas, são geneticamente iguais a todas as outras células do corpo. Estas células apresentam vantagens uma vez que a sua utilização reduz a experimentação animal, reduz o custo, permite uma melhor caracterização das variáveis, é feito num ambiente controlado, o que facilita o estudo de vias moleculares, como o H₂S e têm uma melhor organização celular. Este tipo de células têm características específicas, como a capacidade de autorrenovação e pluripotência, então podem diferenciar-se em diversos tipos de células das 3 camadas germinativas. Ao possibilitar a formação de organóides, estas mimetizam melhor a morfologia dos órgãos em humanos. O seu modo de obtenção pode variar desde células do sangue, células da pele, células da urina ou células do cordão umbilical, sendo estes métodos de obtenção algo problemáticos eticamente devido aos processos de extração invasivos. O método mais comum é reprogramar fibroblastos da pele, e já há diversos estudos que utilizam linhas de iPSCs para estudar problemas associados à DS, como por exemplo defeitos do septo ventricular, em que foi utilizada uma linha de iPSCs derivada de amostras de urina (Cao et al., 2018). O uso da reprogramação celular veio a facilitar a obtenção de iPSCs, pois com a descoberta de fatores de indiferenciação é possível partir de células diferenciadas de várias partes do corpo, como fibroblastos e indiferenciá-las, induzindo a pluripotência, esses fatores são conhecidos como fatores de Yamanaka, que incluem os genes Oct4, Sox2, c-Myc e Klf4 (Takahashi & Yamanaka, 2006). O **OCT4** (*octamer-binding transcription factor 4*) tem diversas isoformas e é um importante fator de transcrição na embriogénese e uma regulação fina dos seus níveis é fundamental para a manutenção do estado indiferenciado, uma vez que alta ou baixa expressão resulta em diferenciação celular. O **Klf4** (*Krüppel-like factor 4*) codifica uma proteína “*zinc finger*” e está localizado exclusivamente no núcleo de diversas células, como células epiteliais do trato intestinal, pele, timo, células endoteliais vasculares, bexiga, pulmão, testículo, córnea, cardiomiócitos, linfócitos e é importante para o desenvolvimento, diferenciação e manutenção da homeostase dos tecidos normais. Este gene regula também a diferenciação das células pluripotentes para endoderme, uma vez que a ausência de expressão aumenta a diferenciação em direção à endoderme definitiva, promove a autorrenovação de células estaminais embrionárias pela ativação dos genes de pluripotência, como NANOG, OCT4 e SOX2 e tem um papel importante na resposta ao dano no DNA, pois evita a progressão do ciclo celular quando há danos não reparados. O **SOX2** (*SRY-related high mobility group box*) é um fator de transcrição importante no desenvolvimento embrionário, pois ele regula a

segregação da camada de células interna (ICM) e da trofoectoderme, está também envolvido na manutenção de ESCs, pois regula a transição de G0/G1 para a fase S do ciclo celular. O **C-MYC** é um fator de transcrição que atua amplificando a expressão de genes ativos e é um potente proto-oncogene, como tal é muito regulado tanto transcricional como pós-transcricionalmente e é muito importante em diversos processos celulares, como proliferação celular, diferenciação, apoptose, metabolismo, angiogênese, correção de dano no DNA e aumenta a eficiência da reprogramação celular, no entanto aumenta a capacidade tumorigênica das iPSCs.

O **NANOG**, apesar de não fazer parte dos fatores de Yamanaka, é um gene responsável por manter a capacidade de autorrenovação de células embrionárias e consegue ligar-se ao seu promotor e regular a sua própria transcrição, positivamente, cooperando com OCT4 e SOX2. Este gene atua ainda como repressor de genes que promovem a diferenciação (Villodre, 2016).

1.9 Estabelecimento e caracterização de linhas estaminais pluripotentes induzidas

A reprogramação de iPSCs deve ser feita através de vetores virais não integrativos, como o Sendai virus ou o adenovírus, que após várias passagens (cerca de 10 no caso do Sendai virus) deixam de possuir carga viral. Para confirmar a ausência de carga viral devem ser feitos testes de *viral clearance*, como PCR quantitativo. Para autenticar uma linha celular há diversos métodos de acordo com as *guidelines* estabelecidas pela Sociedade internacional de investigação em células estaminais (ISSCR), desde análise de *Single nucleotide polymorphisms* (SNP), *short tandem repeats* (STR), *whole genome sequencing* (WGS). Para confirmar a pluripotência das células podem ser feitos ensaios em que as células têm de ser capazes de se diferenciar nas 3 camadas germinativas, o que pode ser confirmado por marcadores de diferenciação, como o TUBB-3 (ectoderme), o AFP (endoderme) e o ASM (mesoderme), após a formação de corpos embrióides (EBs). As células reprogramadas devem ainda expressar certos genes característicos de indiferenciação celular, como os fatores de Yamanaka ou outros marcadores, como a alta expressão da fosfatase alcalina (AP), característico de células indiferenciadas ou tumorais. A AP desfosforila nucleótidos, proteínas e alcalóides, quando em condições alcalinas (Detection of AP Using the Alkaline Phosphatase Staining Kit II Overview, 2023.), o SSEA-4 (*stage-specific embryonic antigen-4*) que é um epítipo de um glicolípido membranar expresso em células pluripotentes, ou o NANOG que é um fator de transcrição

muito comum para manter a pluripotência. A expressão destes fatores pode ser avaliada através de imunocitoquímica e/ou citometria de fluxo (ISSCR, 2023).

1.10 Objetivo

Neste trabalho pretende-se estabelecer e caracterizar uma linha celular de iPSCs derivada de fibroblastos de indivíduos com DS, criando assim uma ferramenta para o estudo da neurogênese bem como para o estudo de diferentes moléculas que possam contribuir para alterar a sinalização celular nestes indivíduos. A reprogramação das células foi realizada com vírus não integrativos, o vírus Sendai, e a caracterização foi feita com base nas *guidelines* descritas pela ISSCR.

2 Materiais e métodos

2.1 Cultura Celular de fibroblastos

Neste trabalho foram utilizadas duas linhas de fibroblastos (Tabela 2) que foram comercialmente obtidas do biobanco Coriel Institute. A linha euploide (GM01652) teve origem em fibroblastos da pele do braço de um indivíduo do sexo feminino de 11 anos saudável (colhida em 2013) e a linha trissômica (AG06922) tem origem nos fibroblastos da pele do tórax/abdômen de um indivíduo do sexo masculino com trissomia 21 com 2 anos (post-mortem, colhida em 1983). As linhas de fibroblastos foram cultivadas e mantidas em meio de cultura completo (DMEM High Glucose (Cytiva), 10% FBS (Soro bovino fetal), 1% NEAA (aminoácidos não essenciais), 1% P/S/A (Penicilina, streptomina e anfotericina), 1% Glutamax, 1x β -Mercaptoethanol, 10 μ M de Y-27632 (Stemcell)) durante 7 dias em placas de 12 poços (SPL) numa incubadora a 37°C com 5% CO₂, sendo o meio de cultura renovado a cada 3 dias até atingir 90% de confluência.

Tabela 2 – Detalhes sobre a origem das células utilizadas neste trabalho.

Nome da linha	T21	SEXO	IDADE (em anos)	Data da colheita	Local de remoção
GM01652	NÃO	F	11	2013	Fibroblastos da pele do braço
AG06922	SIM	M	2	1983 (post mortem)	Fibroblastos da pele do tórax/abdômen

2.2 Reprogramação de fibroblastos

As linhas celulares euploide e trissômica foram reprogramadas utilizando os vetores contendo os fatores da tabela 3 do Kit CytoTune™ - iPS 2.0 Sendai Reprogramming Kit (Invitrogen) e seguindo as instruções do fabricante. Após 15 dias da transdução viral, foram isolados e mantidos em crescimento, vários clones de cada linha. Esta parte do trabalho foi desenvolvida previamente no laboratório pela Rafaela Agostinho antes do início desta monografia. Para cada linha foi escolhido apenas um clone para caracterização, com base na morfologia e crescimento.

Tabela 3 – Vetores e fatores utilizados na reprogramação de fibroblastos.

Vetor Sendai (SeV)	Fator
CytoTune™ 2.0 KOS	Human Klf4, Human Oct3/4, Human Sox2
CytoTune™ 2.0 hc-Myc	Human c-Myc
CytoTune™ 2.0 hKlf4	Human Klf4

2.3 Caracterização de linhas de iPSCs

Para verificar a pluripotência das linhas celulares, foram utilizadas as *guidelines* descritas segundo a Sociedade internacional de investigação em células estaminais (ISSCR, 2023) e após a passagem 10 foram realizados os ensaios de caracterização e autenticação das linhas nomeadamente imunocitoquímica, citometria de fluxo, análise da fosfatase alcalina, cariotipagem, detecção viral por PCR e formação de EBs, os quais se descrevem a seguir.

2.3.1 Imunocitoquímica

As células foram cultivadas em lamelas de vidro (com 16mm de diâmetro) revestidas com Geltrex (Gibco) e contidas em placas de 12 poços (SPL). Após chegar a cerca de 80% de confluência, estas foram lavadas em Tampão fosfato-salino 1x (PBS1X) e fixadas em paraformaldeído (PFA) 4% durante 15 minutos. Foi utilizada uma solução de bloqueio 2% BSA (Albumina de soro bovino)(Nzytech) / 0,2% Triton-X100/ PBS 1X por 1h a temperatura ambiente, de seguida foram incubadas durante 1h com o anticorpo primário (Tabela 4). As células foram lavadas 3x com a solução de bloqueio e foram incubadas novamente 1h com o

anticorpo secundário (Tabela 4), lavadas outras 3x e incubadas durante 10 min com o corante de DNA Hoechst 33342 (Enzo) (1:1000). No final deste protocolo as lamelas foram retiradas da placa de 12 poços, montadas com meio de montagem Dako em lâminas de microscopia e seladas com verniz. As lâminas foram deixadas a secar ao ar durante 24h e protegidas da luz. Posteriormente as amostras foram analisadas no microscópio de fluorescência Axiomager Z2 (Carl Zeiss) com uma ampliação de 20x.

Tabela 4 – Anticorpos primários e secundários utilizados para a realização de Imunocitoquímica e Citometria de fluxo, para avaliação da sua pluripotência e diferenciação.

	Anticorpo Primário	Anticorpo Secundário
Marcadores de Pluripotência (Imunocitoquímica)	Rabbit anti-Oct4 (1:400) Cell Signaling Technology Cat #2840	Goat Anti-Rabbit (1:500)
	Rabbit anti-NANOG (1:400) Cell Signaling Technology Cat #4903	
	Rabbit anti-SOX2 (1:400) Cell Signaling Technology Cat #3579	
	Mouse anti-SSEA-4 (1:200) BD Biosciences Cat# 560,073	Goat Anti-Mouse (1:500)
Marcadores de Pluripotência (Citometria de Fluxo)	Rabbit anti-Oct4 (1:400) Cell Signaling Technology Cat #2840	Goat Anti-Rabbit (1:1000)
	Rabbit anti-NANOG (1:400) Cell Signaling Technology Cat #4903	
	Rabbit anti-SOX2 (1:400) Cell Signaling Technology Cat #3579	
	Mouse TRA-1-60 (1:100) BioLegend Cat #330609	Goat Anti-Mouse (1:1000)
Marcadores de Diferenciação (Imunocitoquímica)	Mouse anti-TUJ1 (1:500) BioLegend Cat #801213	Goat Anti-Mouse (1:200)
	Mouse anti-ASM (1:500) Sigma-Aldrich Cat #A5228	
	Rabbit anti-AFP (1:100) Dako Cat #A0008	Goat Anti-Rabbit (1:200)

2.3.2 Atividade da Fosfatase Alcalina

As células foram cultivadas em lamelas de vidro (com 16mm de diâmetro) revestidas com Geltrex (Gibco) e contidas em placas de 12 poços (SPL). Após chegar a cerca de 80% de

confluência, a atividade da fosfatase alcalina foi avaliada com o kit Alkaline Phosphatase Staining Kit II (Stemgent, MA).

As células foram lavadas com PBST 1x (PBS 1x e Tween 20 a 0,05%) e fixadas durante 3min com 1ml de fixador. De seguida foram lavadas com 2ml de PBST e foram incubadas durante 10 min com a solução substrato (contém as soluções A, B e C do kit) num local escuro. Seguidamente foram feitas mais 2 lavagens com PBS 1x e foi observada a coloração através do microscópio de fluorescência Axiomager Z2 (Carl Zeiss) com uma ampliação de 20x, em contraste de fase (Bright field).

2.3.3 Citometria de fluxo

As células foram lavadas com PBS 1x e destacadas utilizando tryple (Gibco). De seguida foram colocadas num tubo de 2ml, centrifugadas (300g por 5 min a 4°C) e após a centrifugação descartou-se o sobrenadante e colocou-se 1ml de PBS / 3% FBS (soro bovino fetal) frio. As células foram novamente centrifugadas a 300g por 5 min a 4°C e descartou-se novamente o sobrenadante. As células foram ressuspensas e fixadas em 200µl de paraformaldeído 0,5% por 20 min a temperatura ambiente, e adicionou-se 1ml de PBS1x/0,5% BSA/0,1% Triton-X100 sendo novamente centrifugadas e ressuspendidas nesta mesma solução. Realizou-se uma nova centrifugação e depois de ser removido o sobrenadante, as células foram incubadas 1h em gelo com o anticorpo primário (Tabela 4) em 100µl da solução de PBS1x/0,5% BSA/0,1% Triton-X100.

Após 2 lavagens, as células foram incubadas por 1h no escuro, em gelo, com o anticorpo secundário (Tabela 4) em 100µl da solução PBS1x/0,5% BSA/0,1% Triton-X100. Por fim as células foram lavadas mais 2 vezes e o pellet foi ressuspendido em 500µl de PBS1X e analisadas no citometro FACScalibur. Os resultados obtidos foram analisados pelo software CytExpert 2.0.

2.3.4 Análise de cariótipo

Para avaliar o cariótipo das células previamente cultivadas em lamelas de vidro (com 16mm de diâmetro) revestidas com Geltrex (Gibco) e contidas em placas de 12 poços (SPL), estas foram incubadas 1h com colcemid (0,1µg/ml) (Gibco) de modo a interromper o ciclo celular em metafase. De seguida as células foram destacadas com Accutase (Gibco) por 5 min e recolhidas

para um microtubo. Após uma centrifugação de 15 min a 13000 rpm foi retirado o sobrenadante e colocada uma solução hipotônica de KCl 0,075M e 3 gotas da solução fixadora de metanol e ácido acético glacial (3:1). Centrifugou-se novamente, retirou-se o sobrenadante e colocou-se os 10ml da solução fixadora. Repetiu-se este processo mais 2 vezes até ficar com o pellet branco e a solução translúcida. A solução obtida foi enviada para a empresa Genomed para a análise do cariótipo.

2.3.5 Deteção viral por PCR

Foi necessário fazer extração de RNA usando o NZY Total RNA Isolation kit (Nzytech), de seguida obteve-se o respetivo cDNA com o NZY First-Strand cDNA Synthesis Kit (Nzytech) e através de RT-PCR verificou-se se havia presença de DNA viral.

Após extrair o RNA total de cerca de 5×10^6 iPSCs e fazer a transcrição reversa, o PCR foi feito utilizando 1 µg de cDNA e as temperaturas de desnaturação, *annealing* e enlongação foram 95°C, 55°C e 72°C respetivamente durante 35 ciclos, utilizando os primers presentes na Tabela 5 e a Green Master Mix (Nzytech I) que já contém a Taq, os dNTPs e o magnésio. Os produtos da reação foram aplicados num gel 2% agarose e a eletroforese decorreu a 100 Volts durante 40 min e as imagens dos géis foram adquiridas no sistema de deteção ibright (thermoFisher).

Tabela 5 - Primers utilizados na reação de PCR para deteção viral.

Alvo	Primers	Tamanho do produto
SeV	Forward: GGA TCA CTA GGT GAT ATC GAG C Reverse: ACC AGA CAA GAG TTT AAG AGA TAT GTA TC	181pb
KOS	Forward: ATG CAC CGC TAC GAC GTG AGC GC Reverse: ACC TTG ACA ATC CTG ATG TGG	528 pb
Klf4	Forward: TTC CTG CAT GCC AGA GGA GCC C Reverse: AAT GTA TCG AAG GTG CTC AA	410 pb
c-Myc	Forward: TAA CTG ACT AGC AGG CTT GTC G Reverse: TCC ACA TAC AGT CCT GGA TGA TGA TG	532 pb

2.3.6 Formação de Corpos embrióides

Para formar os EBs do inglês *Embryonic Bodies*, colocou-se as iPSCs em Acetato de polivinila (PVA) (0,4% PVA + mTeSR + 10 µM de Y-27632 (Stemcell)) em placas *ultra low attachment*

(Corning) e após 48h foram colocados numa placa de 12 poços (SPL) com lamelas revestidas com Geltrex (Gibco) durante 15 a 20 dias, mudando-se o meio periodicamente. Após a formação dos EBs realizou-se imunocitoquímica com o mesmo protocolo descrito no ponto 2.4, para verificar se as células tinham formado as 3 camadas germinativas, utilizando os anticorpos presentes na tabela 4.

3 Resultados e Discussão

3.1 Linha T21 (AG06922) expressa marcadores de indiferenciação

Após a reprogramação das células foi verificada a sua pluripotência usando para isso vários ensaios de acordo com o descrito para o efeito pela ISSCR, a começar pela imunocitoquímica com os marcadores NANOG, Sox2 e SSEA-4 na linha AG06922 (Fig. 3).

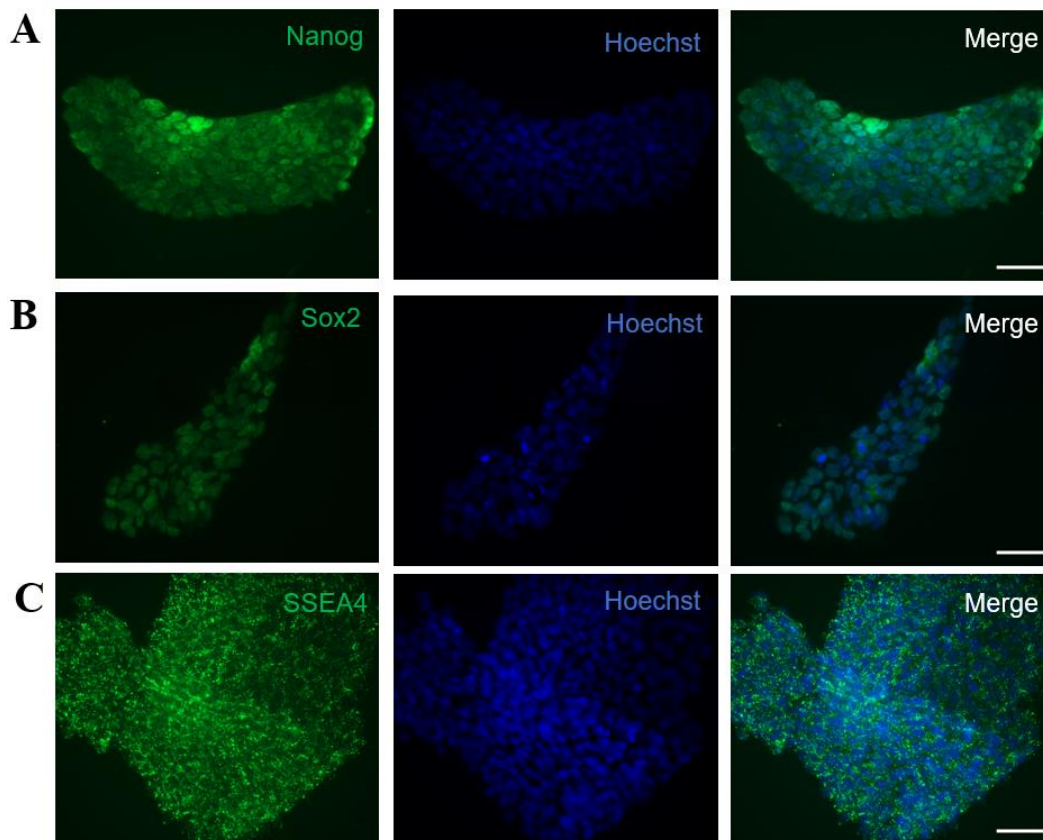


Fig. 3. Caracterização da linha de iPSCs T21 (AG06922). Imunofluorescência para marcadores de indiferenciação celular (verde) Nanog (A), Sox2 (B), SSEA-4 (C) e núcleos corados com Hoechst (azul). Os painéis mais à direita representam a sobreposição do marcador de indiferenciação com os núcleos das células. As barras de escala representam 50µm.

Como se pode observar na figura 3, as células AG06922 apresentam uma coloração verde, o que indica a presença de marcador específico de indiferenciação (nanog, sox2 e SSEA-4), pois todos eles são proteínas específicas de células indiferenciadas e a coloração azul representa o Hoechst, que cora o DNA dos núcleos das células. Ou seja, havendo marcação específica para estes marcadores, significa que as células foram reprogramadas com sucesso, sendo por isso pluripotentes.

Seguidamente fez-se uma citometria de fluxo (Fig. 4) para quantificar o número de células que expressava cada um dos fatores Nanog, Sox2 e Tra-1-60.

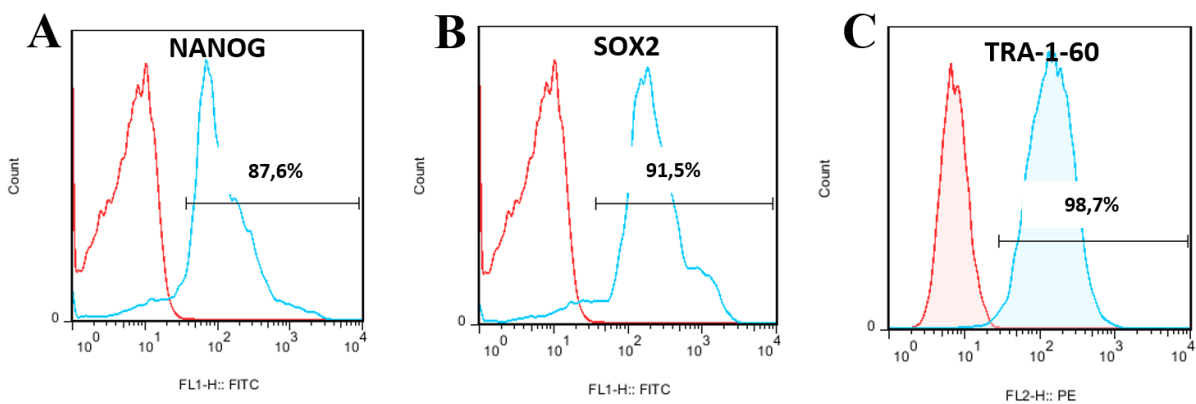


Fig. 4. Caracterização da linha de iPSCs T21 (AG06922) por citometria de fluxo com Nanog (A), Sox2 (B) e Tra-1-60 (C). A análise da citometria de fluxo mostra que 87,6% das iPSCs tem o marcador Nanog (azul); 91,5% tem o marcador Sox2 (azul) e 98,7% tem o marcador Tra-1-60 (azul). O grupo controlo (vermelho) foi utilizado como comparação para cada um dos outros marcadores.

O resultado da citometria de fluxo (Fig.4) indica que há expressão dos marcadores NANOG, Sox2 e TRA-1-60, em mais de 85% nas células da linha AG06922. Uma vez que estes são marcadores de indiferenciação, estes resultados indicam que as células foram reprogramadas com sucesso em iPSCs.

3.2 Coloração para fosfatase alcalina

Procedeu-se à verificação da expressão da fosfatase alcalina, que é um indicador de pluripotência e os resultados obtidos encontram-se na figura 5.

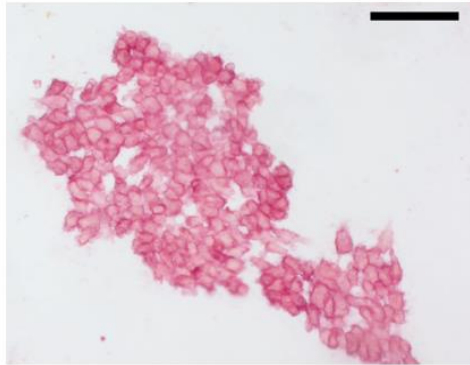


Fig. 5. Caracterização da linha de iPSCs AG06922 através da presença de fosfatase alcalina. Coloração positiva para fosfatase alcalina (rosa). A barra de escala representa 100 μ m.

A imagem da figura 5 representa uma colónia de células AG06922 marcada para fosfatase alcalina, que é mais um marcador de indiferenciação. Como se pode observar pela figura 5, as células apresentam uma tonalidade rosa, o que é indicativo da presença de fosfatase alcalina. Deste modo, este resultado em conjunto com a imunocitoquímica e a citometria das figuras 3 e 4, indicam que as células da linha AG06922 são pluripotentes. Assim, de seguida avaliou-se a presença dos vetores virais nestas células.

3.3 Deteção viral da Linha AG06922

Os vírus Sendai geralmente são eliminados da cultura após a reprogramação e para verificar a ausência de vetor viral, foram realizados vários RT-PCR (figura 6). A figura 6 mostra que não havia presença de marcadores virais na linha AG06922, e o controlo foi assegurado pelo marcador C-Myc, GAPDH e ainda outro controlo em que apenas foi utilizado água em vez de cDNA.

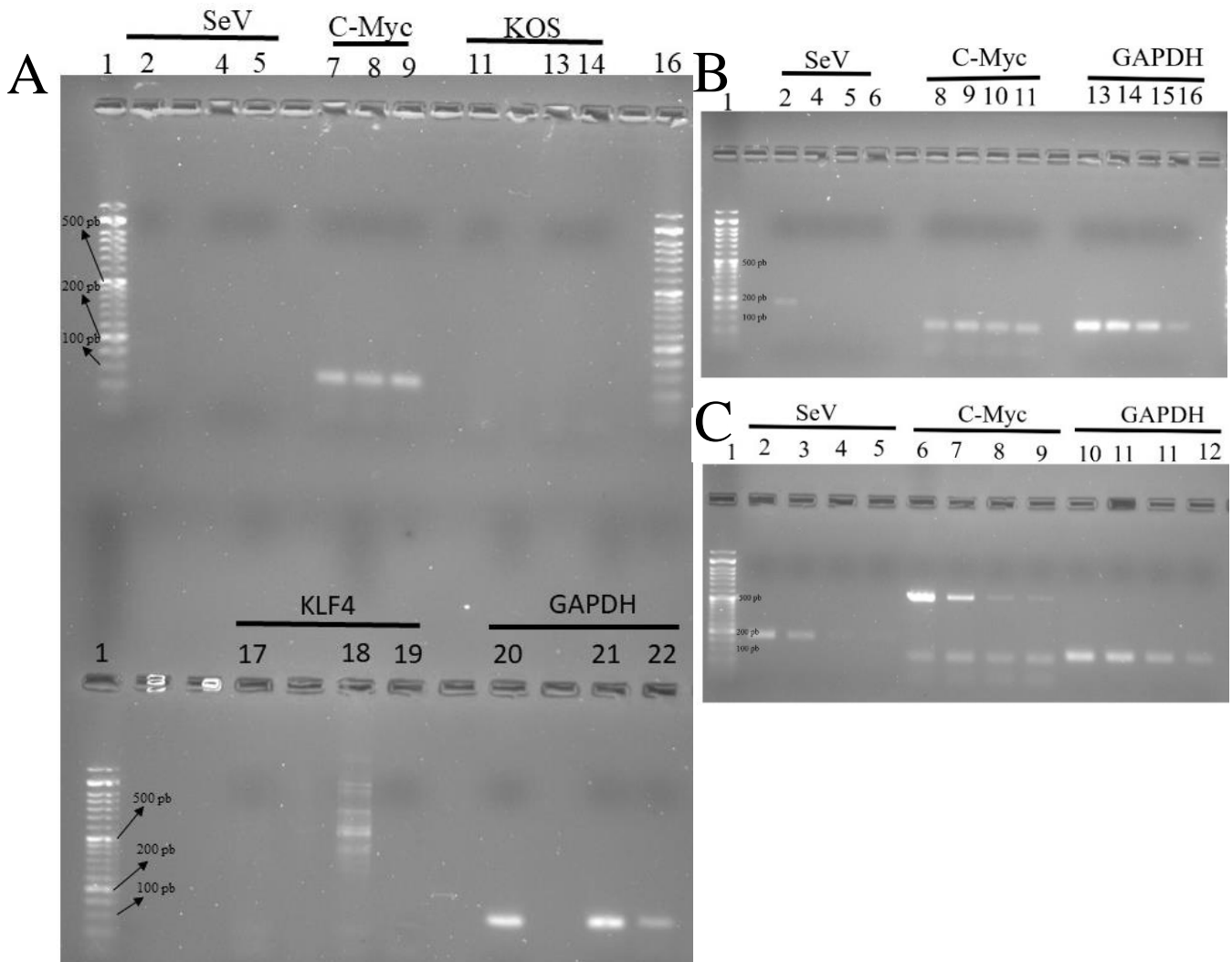


Fig. 6. Reação de PCR da linha AG06922 para deteção viral num gel 2% agarose. (A) 1 e 15 – Marcador; 2, 7, 11, 17, 20 – CT positivo (IPS cells P0); 4, 8, 13, 18, 21 - C3P11 (Linha AG06922); 5, 9, 14, 19, 22 – Branco. (B) 1 – Marcador; 3,8,13 – CT positivo (C3P0 (Linha AG06922)) – cDNA sem diluição; 4,9,14 – CT positivo (C3P0 (Linha AG06922)) – cDNA diluído 1:10; 5,10,15 – CT positivo (C3P0 (Linha AG06922)) – cDNA diluído 1:100; 6,11,16 – CT positivo (C3P0 (Linha AG06922)) – cDNA diluído 1:1000. (C) 1 – Marcador; 2,6,10 – CT positivo (Linha 4 previamente estudada) – cDNA sem diluição; 3,7,11 – CT positivo (Linha 4 previamente estudada) – cDNA diluído 1:10; 4,8,12 – CT positivo (Linha 4 previamente estudada) – cDNA diluído 1:100; 5,9,13 – CT positivo (Linha 4 previamente estudada) – cDNA diluído 1:1000.

No gel da figura 6A não se observa presença de controlos positivos para o vetor viral. Isto pode ter sido devido ao facto de que o RNA extraído possa corresponder à camada *feeder* ou a colónias que já tenham gerado muitas células, que já possam estar livres de vetor viral. Este resultado mostra que o controlo positivo utilizado não está funcional. Para contornar este problema, deve ser feita uma extração de RNA logo das primeiras colónias para garantir que há

presença de vetor viral e usar esta amostra como controlo positivo. As bandas que aparecem no C-Myc do gel A não são de facto C-Myc, visto que têm um menor tamanho do que seria esperado (estão mais abaixo). Foi ainda feito um PCR nas mesmas condições apenas com água em vez de cDNA e apareceu a marcação c-Myc, o que provavelmente indica uma contaminação da água utilizada. Assim decidiu-se repetir o PCR trocando a água em que já não aparecia esta marcação.

Repetiu-se os PCRs, desta vez para testar os controlos positivos, em que no gel da figura 6B tem-se controlos da linha a testar (AG06922) e no gel da figura 6C controlos de uma linha previamente estudada que se sabe ser um controlo positivo funcional. O gel da figura 6B revela que no poço 2 há uma ligeira marcação para SeV, o que indica que há presença de vetor viral e não dá para ver a marcação controlo de C-Myc. No gel da figura 6C, por outro lado, há claramente um controlo positivo final, sendo até possível ver a intensidade das bandas a diminuir consoante se aumenta a diluição, tanto no SeV, como no C-Myc.

Estes testes devem então ser repetidos, utilizando os controlos do gel da figura 6C, podendo assim confirmar a ausência de vetor viral na linha AG06922. Apesar deste controlo não ser suficiente para validar a ausência de vetor viral, visto que as células apresentavam morfologia, e expressão de Sox2, Nanog, SSEA-4 e TRA-1-60, decidiu-se continuar o trabalho e verificar a capacidade de formar EBs, gerando as 3 camadas germinativas.

3.4 Formação de EBs Linha AG06922

Foi realizada uma imunocitoquímica com um marcador para cada uma das 3 camadas germinativas, para a endoderme utilizou-se a Alfafetoproteína (AFP), para a mesoderme utilizou-se o anticorpo alfa do músculo liso (α ASM) e para a ectoderme utilizou-se a Beta tubulina III (TUJ1) e obteve-se os resultados da figura 7.

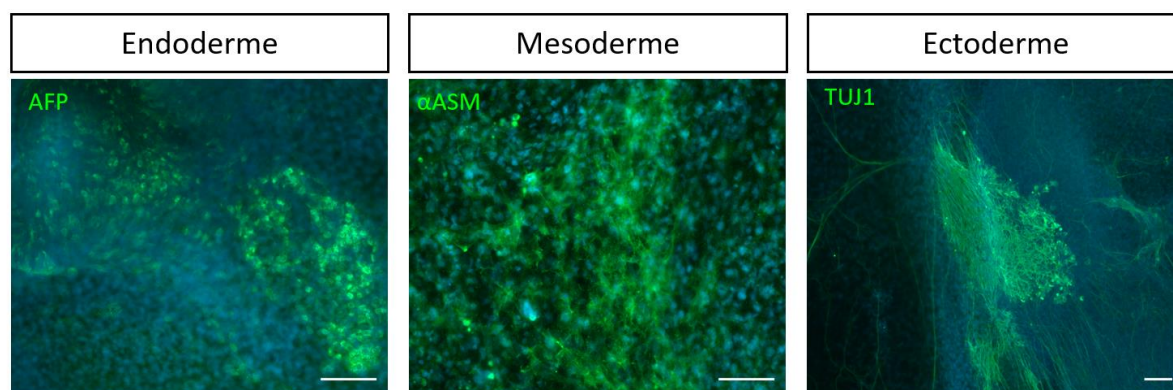


Fig. 7. Caracterização de EBs pela linha de iPSCs AG06922. Imunocitoquímica para marcadores de endoderme (AFP), de mesoderme (α ASM) e ectoderme (TUJ1). As barras de escala representam 50 μ m.

A linha AG06922 foi capaz de gerar EBs e a imunocitoquímica mostra que estes foram capazes de gerar as 3 camadas germinativas, como se pode ver na figura 7.

O conjunto de resultados mostra a formação de colónias com morfologia associada à de célula estaminal, marcação para fosfatase alcalina positiva, expressão de marcadores de pluripotência avaliada por imunocitoquímica e citometria de fluxo. Adicionalmente o teste de viral clearance foi feito e foi demonstrado ausência de vetor viral, pelo que com base nas observações demonstradas acima, pode-se confirmar que as células analisadas da linha AG06922 são pluripotentes. Ficam a faltar apresentar outros resultados, nomeadamente a análise do cariótipo, que não ficaram prontos até à elaboração deste relatório.

4 Discussão

Neste trabalho foi possível reprogramar uma linha celular com origem em fibroblastos numa linha de iPSCs que apresenta características típicas de pluripotência para utilizar como ferramenta para estudar vários aspetos relacionados com a diferenciação neuronal na síndrome de Down.

A utilização de linhas celulares para o estudo de doenças é um recurso cada vez mais utilizado, inclusive já houve trabalhos que estudaram a DS recorrendo a linhas de iPSCs com origem em fibroblastos (Park et al., 2008). No entanto, pretende-se num futuro obter as células através de métodos menos invasivos, como células da mucosa bucal, dos dentes de leite ou células da

urina. No presente grupo de investigação já se tentou anteriormente fazer a reprogramação com células mononucleadas do sangue (PBMC), no entanto surgiram alguns contratemplos que impediram a reprogramação com sucesso, possivelmente pelo facto de ao serem células trissómicas, haver diferenças nas proteínas ou na sinalização. Deste modo, decidiu-se utilizar uma linha celular comercial, para averiguar se o processo de reprogramação seria mais bem sucedido.

Uma vez que este trabalho faz parte de um projeto em que se pretende ter uma amostra clinicamente bem caracterizada e com informação de perfil cognitivo para poder relacionar com outros parâmetros relacionados com o metabolismo de H₂S, o próximo passo será utilizar PBMC dos doentes para tentar novamente reprogramá-las.

Os mesmos testes descritos acima foram feitos na linha GM01652, funcionando como um controlo para esta experiência. A linha GM01652 não apresentou os resultados desejados na imunocitoquímica dos marcadores de indiferenciação. Os marcadores nucleares (Oct4, NANOG e Sox2) não apresentavam fluorescência específica. Isto pode ter sido devido a uma má permeabilização no interior da célula, visto que a marcação do SSEA-4 (membranar) estava presente e era específica, pode ainda ter sido devido à qualidade/ validade do anticorpo, pelo que terão de ser repetidos os testes utilizando anticorpos secundários diferentes ou alterando o método /protocolo de permeabilização.

Sendo a linha considerada pluripotente, pode seguir-se para a próxima fase, que será a diferenciação das células na linhagem neural para que se possa estudar os efeitos do H₂S na neurogénese. Estas linhas celulares são bons modelos para o estudo deste gasotransmissor, pois permitem a introdução direta do mesmo, sem necessitar de processos demasiado complexos, como cirurgia estereotáxica no caso dos modelos animais e permite de um modo mais simples alterar os níveis de expressão da CBS, regulando a quantidade de H₂S sintetizado pelas células.

Esta linha seria ainda uma boa ferramenta para o estudo de outros genes do cromossoma 21, como o gene da proteína precursora amilóide (APP), que é um dos responsáveis pela doença de Alzheimer que se sabe ter um maior risco de aparecer precocemente em doentes com DS (Wiseman et al., 2015).

5 Conclusão

Com base em todos os testes executados, podemos concluir que as células reprogramadas da linha AG06922 têm capacidade de se diferenciar nas 3 camadas germinativas, por isso podemos dizer que são pluripotentes. Seguidamente este trabalho pode ser continuado, fazendo a diferenciação das células pluripotentes em neurónios ou células da glia. Esta ferramenta irá permitir o estudo de diversos processos, dentre eles o efeito do H₂S na DS e deste modo avaliar a participação deste gasotransmissor na formação de novos neurónios.

Caso se verifique que o H₂S contribui para desregulação da sinalização celular, poderá fazer-se uma inibição da CBS ou usar um quelante que remova o H₂S em excesso na célula, nos primeiros meses de vida seriam boas opções para o estudo de possíveis terapias para a DS, o que pode ser o próximo passo para aplicar esta linha celular.

Bibliografia

- About Down Syndrome | National Down Syndrome Society (NDSS)*. (sem data). Obtido 7 de Junho de 2023, de <https://ndss.org/about>
- Antonarakis, S. E., Skotko, B. G., Rafii, M. S., Strydom, A., Pape, S. E., Bianchi, D. W., Sherman, S. L., & Reeves, R. H. (2020). Down syndrome. *Nature reviews. Disease primers*, 6(1), 9. <https://doi.org/10.1038/S41572-019-0143-7>
- Bornstein, E., Lenchner, E., Donnenfeld, A., Jodicke, C., Keeler, S. M., Kapp, S., & Divon, M. Y. (2010). Complete trisomy 21 vs translocation Down syndrome: a comparison of modes of ascertainment. *Am J Obstet Gynecol*, 203, 391–392. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2010.06.019>
- Çağlayan, E. S. (2016). Generation of improved human cerebral organoids from single copy DYRK1A knockout induced pluripotent stem cells in trisomy 21: hypothetical solutions for neurodevelopmental models and therapeutic alternatives in down syndrome. *Cell biology international*, 40(12), 1256–1270. <https://doi.org/10.1002/CBIN.10694>
- Cao, Y., Xu, J., Wen, J., Ma, X., Liu, F., Li, Y., Chen, W., Sun, L., Wu, Y., Li, S., Li, J., & Huang, G. (2018). Generation of a Urine-Derived Ips Cell Line from a Patient with a Ventricular Septal Defect and Heart Failure and the Robust Differentiation of These Cells to Cardiomyocytes via Small Molecules. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 50(2), 473–488. <https://doi.org/10.1159/000494167/>
- Detection of AP using the Alkaline Phosphatase Staining Kit II Overview*. (sem data). Obtido 30 de Maio de 2023, de www.reprocell.com
- Facts about Down Syndrome | CDC*. (sem data). Obtido 25 de Maio de 2023, de <https://www.cdc.gov/ncbddd/birthdefects/downsyndrome.html>
- Gardiner, K., & Costa, A. C. S. (2006). The Proteins of Human Chromosome 21. *American Journal of Medical Genetics. Part C, Seminars in Medical Genetics*, 142C(3), 196. <https://doi.org/10.1002/AJMG.C.30098>
- Gupta, M., Dhanasekaran, A. R., & Gardiner, K. J. (2016). Mouse models of Down syndrome: gene content and consequences. *Mammalian genome : official journal of the International Mammalian Genome Society*, 27(11–12), 538–555. <https://doi.org/10.1007/S00335-016-9661-8>
- Gupta, R., Sahu, M., Tripathi, R., Ambasta, R. K., & Kumar, P. (2022). Protein S-sulfhydration: Unraveling the prospective of hydrogen sulfide in the brain, vasculature and neurological manifestations. *Ageing Research Reviews*, 76, 101579. <https://doi.org/10.1016/J.ARR.2022.101579>
- Herault, Y., Delabar, J. M., Fisher, E. M. C., Tybulewicz, V. L. J., Yu, E., & Brault, V. (2017). Rodent models in Down syndrome research: impact and future opportunities. *Disease Models & Mechanisms*, 10(10), 1165. <https://doi.org/10.1242/DMM.029728>
- ISSCR. (2023). *Standards for Human Stem Cell Use in Research*. www.isscr.org
- Kamoun, P. (2001). Mental retardation in Down syndrome: a hydrogen sulfide hypothesis. *Medical hypotheses*, 57(3), 389–392. <https://doi.org/10.1054/MEHY.2001.1377>
- Kamoun, P. P. (2019). Mental retardation in Down syndrome: Two ways to treat. *Medical hypotheses*, 131. <https://doi.org/10.1016/J.MEHY.2019.109289>
- Kimura, H. (2014). *Production and Physiological Effects of Hydrogen Sulfide*. <https://doi.org/10.1089/ars.2013.5309>

- Lott, I. T., & Dierssen, M. (2010). Cognitive deficits and associated neurological complications in individuals with Down's syndrome. *The Lancet. Neurology*, 9(6), 623–633. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(10\)70112-5](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(10)70112-5)
- Marechal, D., Brault, V., Leon, A., Martin, D., Pereira, P. L., Loaëc, N., Birling, M. C., Friocourt, G., Blondel, M., & Herault, Y. (2019). Cbs overdosage is necessary and sufficient to induce cognitive phenotypes in mouse models of Down syndrome and interacts genetically with Dyrk1a. *Human Molecular Genetics*, 28(9), 1561–1577. <https://doi.org/10.1093/HMG/DDY447>
- Papavassiliou, P., Charalsawadi, C., Rafferty, K., & Jackson-Cook, C. (sem data). *Mosaicism for Trisomy 21: A Review INTRODUCTION AND HISTORY OF DOWN SYNDROME*. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.36861>
- Park, I.-H., Arora, N., Huo, H., Maherali, N., Ahfeldt, T., Shimamura, A., Lensch, M. W., Cowan, C., Hochedlinger, K., & Daley, G. Q. (2008). Disease-specific induced pluripotent stem cells. *Cell*, 134(5), 877–886. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.07.041>
- Rafii, M. S., Kleschevnikov, A. M., Sawa, M., & Mobley, W. C. (2019). Down syndrome. *Handbook of clinical neurology*, 167, 321–336. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804766-8.00017-0>
- Sherman, S. L., Allen, E. G., Bean, L. H., & Freeman, S. B. (2007). Epidemiology of Down syndrome. *Mental retardation and developmental disabilities research reviews*, 13(3), 221–227. <https://doi.org/10.1002/MRDD.20157>
- Takahashi, K., & Yamanaka, S. (2006). Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell*, 126(4), 663–676. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.024>
- Villodre, E. S. (2016). *Importância dos fatores de Yamanaka e NANOG na resposta ao tratamento com cisplatina ou etoposídeo em células de terato carcinoma P19*. <https://lume.ufrgs.br/handle/10183/159087>
- Werge, M. P., McCann, A., Galsgaard, E. D., Holst, D., Bugge, A., Wewer Albrechtsen, N. J., & Gluud, L. L. (2021). The Role of the Transsulfuration Pathway in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Journal of Clinical Medicine* 2021, Vol. 10, Page 1081, 10(5), 1081. <https://doi.org/10.3390/JCM10051081>
- Wiseman, F. K., Al-Janabi, T., Hardy, J., Karmiloff-Smith, A., Nizetic, D., Tybulewicz, V. L. J., Fisher, E. M. C., & Strydom, A. (2015). A genetic cause of Alzheimer disease: mechanistic insights from Down syndrome. *Nature Reviews Neuroscience* 2015 16:9, 16(9), 564–574. <https://doi.org/10.1038/nrn3983>