



Universidade do Algarve

Departamento de Ciências Biomédicas e Medicina

**Cited2 in Mouse Embryonic Fibroblasts
Reprogramming**

André Filipe Baltazar Alves

Dissertação de Mestrado

Mestrado em Ciências Biomédicas

Trabalho orientado por:

**Professor Doutor José Bragança, Departamento Ciências Biomédicas e
Medicina, Universidade do Algarve, Faro, Portugal**

2014



Universidade do Algarve

Departamento de Ciências Biomédicas e Medicina

**Cited2 in Mouse Embryonic Fibroblasts
Reprogramming**

André Filipe Baltazar Alves

Dissertação de Mestrado

Mestrado em Ciências Biomédicas

Trabalho orientado por:

**Professor Doutor José Bragança, Departamento Ciências Biomédicas e
Medicina, Universidade do Algarve, Faro, Portugal**

2014

“Cited2 in Mouse Embryonic Fibroblasts Reprogramming”

Mestrado em Ciências Biomédicas

Declaração de autoria de trabalho

Declaro ser o autor deste trabalho, que é original e inédito. Autores e trabalhos consultados estão devidamente citados no texto e constam da listagem de referências incluída

André Filipe Baltazar Alves

Copyright: André Filipe Baltazar Alves

A Universidade do Algarve tem o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicitar este trabalho através de exemplares impressos e reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, de o divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Agradecimentos

Primeiramente gostaria de agradecer ao Professor Doutor José Bragança, que me proporcionou a possibilidade de trabalhar neste projecto, aos meus colegas de laboratório, Gisela Oliveiras, Ivette Pacheco, Ana Catarina Matias, Daniel Oliveira e á técnica pertencente ao Departamento de Ciências Biomédicas e Medicina Ana Luísa Santos, pela partilha de conhecimentos e por me terem ajudado durante a realização deste trabalho. O meu muito obrigado a todos!

Nada disto teria sido possível até hoje, sem o apoio incondicional da minha mãe, Maria da Anunciação Lopes Baltazar, que me inspira todos os dias, agradecendo ainda á minha irmã e ao meu avô:

Agradeço ainda a todos os meus amigos, e eles sabem quem são, que sempre la estiveram “para o que der e vier”.

I - Abstract

Differentiated cells can be reprogrammed to be pluripotent and return to transform into other cell types by inserting specific factors. However, the reprogramming of somatic cells in order to obtain induced pluripotent stem (iPS) has a time that is relatively long reprogramming, the reprogramming efficiency is still relatively low, some of the pluripotency factors used in this process are pro-oncogenes, and further there is the difficulty of overcoming senescence.

Through mouse embryonic fibroblast cells (MEF's) the goal is to reprogram with four transcription factors Yamanaka, Sox2, Nanog, Klf4 and c-Myc, adding as a transcription factor Cited2 and using these cells to the passages P2 and P4. The Cited2 is a transcriptional regulator of genes involved in many biological transcription chains, which is capable of inducing cell proliferation as mice or humans, is considered an "anti-senescent", has the ability to activate transcription of genes involved in pluripotency.

For this work have been created viral vectors, two retroviruses, one being Cited2 so as to be overexpressed in cells containing GFP coupled (KRK1), another GFP alone to serve as control (LZRS) and two lentivirus that allowed the insertion and activation of pluripotency transcription factors (TET-STENCCA and M2RTTA respectively). Will be analyzed morphologies of colonies obtained by reprogramming will be made qRT-PCR to the colonies in order to understand if expression factors pluripotency of embryonic stem cells (ESC), and through the formation of embryonic bodies (EB's) through the iPS obtained these are capable of giving rise to the three germ line, mesoderm, ectoderm and endoderm, this process will be performed by qRT-PCR.

After analyzing the results, it can be concluded that the Cited2 in MEF's P2 enables early appearance of aggregates of colonies in relation to the MEF's that have Cited2 exogenous, while in MEF's P4 Cited2 overexpressed, it is possible to overcome senescence and obtain iPS with values very similar to each other at the level of transcription factors of pluripotency (Nanog, Sox2, Oct4 and Rex1).

Keywords: Embryonic Stem Cells, Induced Pluripotent Stem Cells, Mouse Embryonic Fibroblast Cells, Cited2, Transcription Factors, Pluripotency Factors

II - Resumo

Células diferenciadas podem ser reprogramadas de modo a voltarem a ser pluripotentes e se transformarem em outros tipos de células através da inserção de factores específicos. No entanto a reprogramação de células somáticas de modo a se obter células estaminais pluripotentes induzidas (iPS), tem um tempo de reprogramação é relativamente longo, a eficiência da reprogramação ainda é relativamente baixa, alguns dos factores de pluripotencia que são usados para este processo são pro-oncogenes, e ainda existe a dificuldade de ultrapassar a senescência.

Através de células embrionárias fibroblásticas de ratinho (MEF's) o objectivo é reprogramar com os 4 factores de transcrição identificados como genes de pluripotencia, Sox2, Nanog, Klf4 e c-Myc, acrescentando o mais um factor de transcrição Cited2 e usando estas células nas passagens P2 e P4. O Cited 2 é um regulador de transcrição de genes envolvido em muitas cadeias de transcrição biológicas, sendo esta capaz de induzir a proliferação das células quer de ratinhos como de humanos, é considerado um “anti-senescente”, tem a capacidade de activar a transcrição dos genes envolvidos na pluripotencia.

Para este trabalho foram criados vectores virais, dois retrovírus, sendo um deles o Cited2 de modo a ser sobreexpresso nas células contendo GFP acoplada (KRK1), outro apenas com GFP que servirá de controlo (LZRS) e dois lentivírus que permitiram a inserção e activação da transcrição dos 4 factores de Yamanaka (respectivamente TET STENCCA e M2RTTA). Serão analisadas morfologias das colonias obtidas através da reprogramação, serão feitos qRT-PCR às colonias de modo a se perceber se expressão os factores de pluripotência das células estaminais embrionárias (ESC), e se através da formação de corpos embrionários (EB's) através das iPS obtidas estas são capazes de dar origem às três linhas germinativas, mesoderme, ectoderme e endoderme, este processo será realizado por qRT-PCR.

Após análise dos resultados obtidos, pode-se concluir, que o Cited2 nas MEF's P2 possibilita o aparecimento precoce dos agregados de colónias em relação às MEF's que não têm Cited2 exógeno, enquanto nas MEF's P4 com Cited2 sobreexpresso, consegue-se ultrapassar a senescência e obter-se iPS com valores bastante semelhantes entre si a nível da transcrição dos factores de pluripotencia (Nanog, Sox2, Oct4 e Rex1).

Palavras-chave: Células Estaminais Embrionárias, Células Estaminais Pluripotentes Induzidas, Células Embrionárias de Ratinho, Cited2, Factores de Transcrição, Factores de Pluripotencia

III – Índice de Abreviações

µl	Microlitro
ADN	Acido Desoxirribonucleico
ADNc	Acido Desoxirribonucleico complementar
DNase	Desoxirribonuclease
ARN	Acido Ribonucleico
Cited2	Proteína de ligação responsiva que interage com a proteína (CBP)/p300 através do acido glutâmico e aspártico da cadeia pesada 2
CP1	Plasmídeo contendo o factor de transcrição da proteína GFP,
CP1C2	Plasmídeo contendo o factor de transcrição do Cited2 e da proteína GFP,
DMEM	Meio Dulbecco's Modified Eagle
DMSO	Dimetilsulfóxido
EB	Corpos embrionários
EC	Células embrionárias
ESC	Células estaminais embrionárias
FGF	Factor de crescimento de fibroblasto
GFP	Proteína de fluorescência verde
iPS	Células estaminais pluripotentes induzidas
KRK1	Plasmídeo contendo factores virais de produção de retrovírus, tendo inserido o factor de transcrição do Cited2 e da proteína GFP
LZRS	Plasmídeo contendo factores virais de produção de retrovírus, tendo inserido o factor de transcrição da proteína GFP
M2RTTA	Plasmídeo com o factor de transcrição da proteína activadora do TET STENCCA

MEF	Células fibroblásticas embrionárias de ratinho
MEM	Meio essencial mínimo
mg	Miligrama
min	Minutos
ml	Militro
mm	Milímetro
ng	Nanograma
°C	Graus Celcius
P2	Passagem 2
P4	Passagem 4
PBS	Solução salina com fosfato
qRT-PCR	Reacção da cadeia de polimerase em tempo real quantitativa
s	Segundo
TET STENCCA	Plasmídeo contendo os 4 factores de transcrição de Yamanaka
UC-hMSC	Células estaminais mesenquimais humanas do cordão umbilical

IV – Índice de Imagens

		Página
Figura 1.1	Representação da pluripotência das células estaminais	14
Figura 1.2	Representação esquemática das diferenças das vias de sinalização que regulam a auto-renovação e pluripotência das células estaminais embrionárias humanas (hESC) e das de ratinho (mESC). As mESC são mantidas, principalmente sob o controlo de LIF e BMP sinalização, enquanto hESCs necessitam de Activina A e FGF para manter a auto-renovação a longo prazo e a pluripotência. Estas vias de sinalização em ambos os sistemas convergem para a activação da rede transcricional do núcleo que envolve Oct4, Sox2 e Nanog.	17
Figura 1.3	Modelo para a geração de células iPSC através da transdução viral de 4 genes. É proposto que c-Myc induz a imortalização celular e a abertura da cromatina, o Klf4 suprime a apoptose e senescência. Oct4 altera o destino da célula a partir de células tumorais para células pluripotentes e o Sox2 é também necessário para estabelecer a pluripotência	21
Figura 3.1	Figura 3.1 –MEF's em passagem P2 e P4- antes do processo de infecção. Em P2 tendo estas uma forma bem definida, com citoplasma arredondado, com capacidade mitótica viável, podendo se ver que em P4 as células já se encontram num estado de senescência, com mudanças no aspecto morfológico, alongamento do citoplasma	36
Figura 3.2	MEF's infectadas após 4 dias. As MEF's que têm Cited2 exógeno apresentam GFP (A,B) assim como as MEF's sem Cited2 exógeno (C,D), podendo ainda ser visualizado que o número de células infectadas se encontra relativamente semelhante entre as células com e sem sobreexpressão de Cited2	38
Figura 3.3	Ajuntamento de células formando foci de colónias com morfologia semelhante à das células estaminais embrionárias – A – Mefs sem Cited 2 exógeno, B – Mefs com Cited2 exógeno	39
Figura 3.4	Agregados celulares: A - Agregado celular contendo Cited2 exógeno com cerca de 13 dias, morfologia arredondada e bem defenida, B - a GFP começa a deixar de ser expressa no agregado celular, C - agregados de 13 dias sem	40

Cited2 exógeno, morfologia arredondada e bem defenida, D – a inibição da GFP começa a ser vsível.

- Figura 3.5 **Agregados celulares:** A - Agregado celular contendo Cited2 exógeno com cerca de 23 dias, morfologia arredondada e bem defenida, B - a GFP começa a deixar de ser expressa no agregado celular, C - agregados de 23 dias sem Cited2 exógeno, morfologia arredondada e bem defenida, D – a GFP começa a deixar de ser expressa no agregado celular 41
- Figura 3.6 **MEF's infectadas após 4 dias:** A e B MEF's com sobreexpressao do Cited2, C e D MEF's sem Cited2 exogeno 43
- Figura 3.7 **Agregados celulares nas MEFs com Cited 2:** A e B – Agregado celular com cerca de 10 dias com morfologia arredondada e bem defenida, em B pode-se visualizar que ainda mantem em todo o agregado intensa expressão de GFP. C e D agregado celular com 13 dias. C – a morfologia do agregado é arredondado e bem defenido, em que em D se nota que o sinal da GFP começa a diminuir no centro, indicador de que estas células estão a se reprograma 44
- Figura 3.8 **Agregados celulares das MEF's sem Cited2 exógeno:** A e B - Agregado celular com cerca de 10 dias com morfologia arredondada e bem defenida, B - visualiza-se que todo o agregado celular mantem intensa expressão de GFP. C e D são agregados de 23 dias, C - a morfologia arredondada não bem definida, D – a GFP começa a deixar de ser expressa no agregado celular. 45
- Figura 3.9 **Colonias de possíveis iPS de MEF'ssobreexpressando o Cited2:** A - possível colonia de iPS com uma semana após o processo de picagem; B- Colonia provável de iPS com duas semanas, após o processo de picagem 47
- Figura 3.10 **Agregados celulares de MEF's sem Cited2 exógeno.** A e B – antes do tratamento com FGF contem uma morfologia diferente das nossas colónias obtidas quer em P2 como em P4; C – depois do tratamento com FGF pode-se ver que a morfologia circular se encontra bem defenida 48
- Figura 3.11 **Corpos embrionarios obtidos com diferentes concentrações de celulas por gota.** A- 500 celulas por gota; B- 1000 celulas por gota ; C – 2000 celulas por gota; com soro inactivado 53

Figura 3.12	Corpos embrionários obtidos através de 1000 células/gota com soro não inativado. A- iPS com Cited 2 exógeno; B- iPS sem cited exógeno; 3º dia, encontram-se em placas de cultura revestidas com gelatina	53
Figura 3.13	Corpos embrionários ao 2º dia após sua formação. A – de iPS com Cited2 exógeno B – fluorescência da imagem A. C- de iPS sem Cited2 exógeno, D – fluorescência da célula apresentada em C	54
Figura 3.14	UC-MSC- antes do processo de de infecção. A- morfologia quando se encontram confluentes; B- Morfologia quando estas têm espaço na placa para se dividirem	57
Figura 3.15	UC-MSC infectadas com lentivírus. A,B – células com cited2 exógeno, podendo em B ver-se a GFP, C,D- sem cited2 exógeno, em D apresenta a GFP das células apresentadas em C	58
Figura 3.16	Agregado celular em UC-hMSC com sobreexpressão de Cited2	59

V – Índice de Gráficos

	Página	
Gráfico 3.1	A expressão de marcadores de pluripotência em colônias de MEF's P2. Níveis de transcrição de marcadores de pluripotência (Nanog, Oct4, Sox2, Rex1) foram detectados por qRT-PCR dois representativos de iPS sem cited2 exogeno (o PI2 e iPS3) e dois representantes reprogramadas iPS com expressão exógena Cited2 (iPS.CITED2.1 e iPS . CITED2.3). A expressão destes genes em MEF's P2 também foi representada. A expressão de cada marcador foi normalizado para a expressão GADPH. Para cada gene, os valores são expressos relativamente ao valor da sua expressão em MEFs P2.	50
Gráfico 3.2	A expressão de marcadores de pluripotência em colônias MEF's P4. Níveis de transcrição de marcadores de pluripotência (Nanog, Oct4, Sox2, Rex1) foram detectados por qRT-PCR quatro representativos de iPS sem cited2 exogeno (o iPS2, iPS3, iPS4 e iPS6) e tres representantes reprogramadas iPS com expressão exógena Cited2 (iPS.CITED2.1,iPS. CITED2.3e iPS. CITED2.4) picadas ao dia 23. A expressão destes genes em MEF's P4 e ESC também foi representada. A expressão de cada marcador foi normalizado para a expressão GADPH. Para cada gene, os valores são expressos relativamente ao valor da sua expressão em MEFs P4.	51
Gráfico 3.3	A expressão de marcadores de pluripotência em colónias de MEF's P4. Níveis de transcrição de marcadores de pluripotência (Nanog, Oct4, Sox2, Rex1, Tbx3, FGF5 e Nodal) foram detectados por qRT-PCR tres representativos de iPS sem cited2 exogeno (o PI2, iPS3 e iPS\$) e três representantes reprogramadas EpiSC sem expressão exógena Cited2 (EPIS2, EPIS3 e EPIS4).. A expressão de cada marcador foi normalizado para a expressão GADPH. Para cada gene, os valores são expressos relativamente ao valor da sua expressão em MEFs P4	52
Gráfico 3.4	A expressão de marcadores de diferenciação nos EB's. Níveis de transcrição de marcadores de diferenciação da camada germinativa da Mesoderme, A-Brachyury e B-Mesp1. A expressão de cada marcador foi normalizado para a expressão GADPH. Para cada gene, os valores são expressos relativamente ao valor da sua expressão em MEFs P4, tendo como momentos de análise o dia 0 antes do processo de diferenciação e dia 5 após o início do processo da reprogramação.	55

- Gráfico 3.5 **A expressão de marcadores de diferenciação nos EB's.** Níveis de transcrição de marcadores de diferenciação da camada germinativa da Endoderme A- FoxA2, B-AFP. A expressão de cada marcador foi normalizado para a expressão GADPH. Para cada gene, os valores são expressos relativamente ao valor da sua expressão em MEFs P4, tendo como momentos de análise o dia 0 antes do processo de diferenciação e dia 5 após o início do processo da reprogramação 56
- Gráfico 3.6 **A expressão de marcadores de diferenciação nos EB's.** Níveis de transcrição de marcadores de diferenciação da camada germinativa da Ectoderme A- Pax6, B- Nestin. A expressão de cada marcador foi normalizado para a expressão GADPH. Para cada gene, os valores são expressos relativamente ao valor da sua expressão em MEFs P4, tendo como momentos de análise o dia 0 antes do processo de diferenciação e dia 5 após o início do processo da reprogramação. 56

VI – Índice de Tabelas

	Página
Tabela 3.1	39

Número de agregados celulares gerados durante a reprogramação das MEF's na passagem P2 na ausência (iPS) ou presença (iPS.Cited2) exógena Cited2. O número de agregados celulares foram gerados a partir de três experiências independentes (I, II e III) foram contados sob o microscópio, durante o processo de reprogramação. "-" Representa o número desconhecido. (retirado do poster Matias A.C. et al, 2013)

VII – Índice de Conteúdos

	Página
I – Abstract	1
II – Resumo	2
III – Abreviaturas	4
IV - Índice de Figuras	6
V - Índice de Gráficos	9
VI - Índice de Tabela	11
VII- Índice de Conteúdos	12
CAPITULO 1 – Introdução	14
1.1 – Introdução ao Processo de Reprogramação e Objectivo do Estudo.....	18
1.2 – Limitações ao Processo de Reprogramação	21
1.3 - Cited2 e sua funcionalidade na rede de transcrição de genes de pluripotencia nas ESC	23
1.4 – Objectivos	25
CAPITUL 2 – Métodos	26
2.1 – Produção de células Fibroblasticas Embrionárias de ratinho (MEF's) Primarias.....	26
2.2-Produção de Particulas Virais	27
2.2.1 - Produção de retrovírus KRK1 e LZRS.....	27
2.2.2 - Produção de lentivírus M2RTTA e TET.....	28
2.2.3 - Produção de lentivírus CP1 e CP1C2.....	29
2.3 -Reprogramação das MEF's.....	30
2.4 - Picagem dos Agregados Celulares das MEF's.....	31
2.5- Reprogramação das células Estaminais Mesenquimais humanas do Cordão Umbilical (UC-hMSC).....	32
2.6 Inactivação das MEF's	32
2.7- Extração de ARN (kit RNeasy ARN isolation da Quanta Bioscience).....	33
2.8-Amplificação de ARN em ADNc (kit qScript cADN SuperMix....	34

2.9 qRT-PCR.....	34
2.10 - Formação de Corpos embrionários (EB).....	35
CAPÍTULO 3 – Resultados	36
3.1 -Reprogramação das MEF's.....	36
3.1.1 - Reprogramação das MEF's em P2.....	37
3.1.2 - Reprogramação das MEF's em P4.....	42
3.2 – Agregados Celulares: Expansão e sua morfologia após picagem	45
3.3 - qRT-PCR das iPS	48
3.3.1 – qRT-PCR das colônias de MEF's em P2.....	49
3.3.2 - qRT-PCR das colônias de iPS e EpiSC em MEF's em P4.....	50
3.4 - Corpos embrionários	52
3.5 - qRT-PCR dos EB's.....	54
3.6 - Reprogramação das UC-MSc	57
CAPITULO 4 – Discussão	60
CAPITULO 5 – Conclusão	64
VIII – Bibliografia	65

CAPITULO 1 - Introdução

“A descoberta das células estaminais humanas, veio abrir novos caminhos e depositou-se grandes expectativas que este tipo celular fosse a chave para o tratamento de doenças crónicas” (Thomson et al, 1998).

As células estaminais são células indiferenciadas, significa que não possuem a especialização funcional que caracteriza as células adultas de um organismo vivo, as células estaminais apresentam capacidade de poderem gerar os diversos tipos celulares que constituem um organismo.

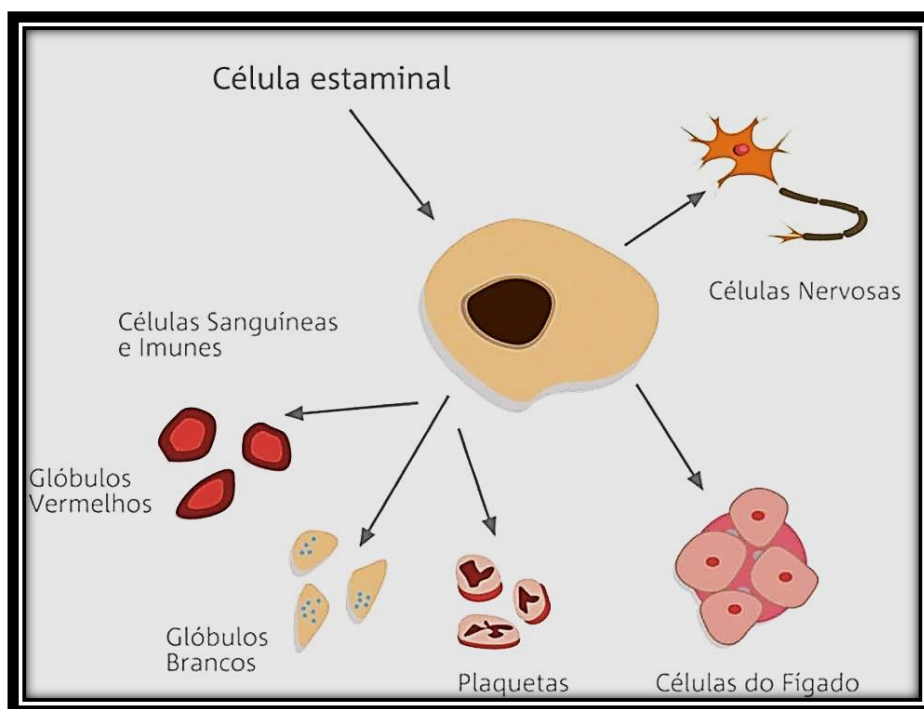


Figura 1.1 – Representação da pluripotência das células estaminais

As células estaminais multiplicam-se por um processo de divisão contínua, durante longos períodos de tempo, ou seja, indefinidamente

As células estaminais estão presentes em todos os estádios do desenvolvimento de um ser vivo mamífero, desde o embrião ao ser adulto. Como constituintes da massa interna do embrião, as células estaminais sofrem alterações biológicas e especificação funcionais que acompanham a evolução do embrião para um indivíduo adulto, e perdem progressivamente a sua capacidade de produzir novos tipos celulares, ou seja a sua pluripotência (fig. 1.1). Por esta razão, as células estaminais obtidas nas fases iniciais do desenvolvimento embrionário têm maior capacidade de diferenciação do que as

células estaminais adultas, visto poderem originar qualquer tipo de célula ou tecido do organismo adulto.

Estas características fazem das células estaminais objecto de intensas pesquisas, pois actualmente já podem ser utilizadas na terapia de mais de 60 doenças, no futuro poderão funcionar como células substitutas em tecidos lesionados ou doentes por degeneração, como nos casos de Alzheimer, Parkinson e doenças cardiovasculares em geral, ou ainda em células que o organismo deixa de produzir por alguma deficiência, como no caso da Diabetes.

Como referido em cima estas células poderão ser usadas para a cura de diversas doenças, actualmente as células estaminais são usadas em diversas aplicações clinicas e experimentais actualmente, regeneração do tecido ósseo, cartilagem, tendões, da medula espinal, músculo cardíaco e reconstrução da bexiga. Tendo como perspectivas futuras a reconstrução de órgãos na sua totalidade a inserção, inserção de neurónios cuja capacidade foi perdida ao longo do tempo devido a doenças degenerativas (Bajada S. etal 2008).

No entanto, a utilização das células estaminais embrionárias para esses fins, não é completamente uniforme, pois levantam alguns problemas durante a sua utilização, após a implantação muitas destas células sofrem apoptose, têm dificuldade na obtenção de vascularização o custo da manutenção destas culturas celulares é alto, e ainda preocupações morais e éticas que dificultam muitas vezes estudos, por exemplo a obtenção de células estaminais embrionárias humanas (hESC) implica a destruição de embriões humanos. O uso de hESCs na pesquisa médica tem atraído muita a atenção de muitos setores do público. Religioso, histórico, pontos culturais, médicos e outros de vista contribuíram para um discurso muito vigoroso e abrangente sobre o uso destas células. Alguns consideram a pesquisa com hESCs ser inerentemente imoral, porque acreditam que a vida começa com fertilização do óvulo, e a destruição de um embrião com o potencial de se transformar em um ser humano viável é pensado o mesmo que o infanticídio. Por esta razão, o governo federal americano restringiu severamente o acesso e o uso de hESCs em 2001. Estas restrições já foram amplamente derrubadas nos Estados Unidos da América pela administração do Presidente Obama. Por outro lado, os defensores dessa linha de pesquisa insistem em que os potenciais benefícios para a humanidade argumentando que hESCs são feitos de óvulo fertilizado indesejado que seria provavelmente destruído em qualquer evento. As células-tronco criadas por meio de

transferência nuclear compartilham as mesmas preocupações éticas. Além disso, porque estas células têm a potencial para gerar um embrião completo, mas também aumentar o ainda mais altamente carregada possibilidade de clonagem de seres humanos, apesar de que este procedimento pode ser usado para gerar células estaminais para fins terapêuticos, em países onde este tipo de clonagem é legal, como Austrália e Reino Unido, os embriõescriados devem ser destruídos no prazo de 14 dias. (Anne C. et al, 2009).

Mas esta não é a única preocupação na investigação neste tipo de células, existe ainda a possibilidade de que na utilização destas células em pacientes, para transplante, que o sistema auto-imune do paciente rejeite a implantação das células que serviriam para o seu tratamento (Arakiet al, 2003).

As ESC humanas (em inglês hESC) e as de ratinho (em inglês mESC) são ambas caracterizadas pela sua capacidade de proliferação por longos períodos de tempo em cultura, auto-renovação, e devido a possibilidade de produzirem células pertencentes às três camadas germinativas durante a sua diferenciação (pluripotência). As propriedades tanto das hESC como nas mESC (Valier et al 2009, Rossant, 2008) encontram-se sob o controlo de vias de sinalização que diferem entre as duas espécies, nas hESC é feita pela via de sinalização da activina A e FGF (Dinget et al, 2010), enquanto nas mESC este processo depende do controlo através da via de sinalização do LIF e BMP4. Em ambas as espécies estas vias de sinalização convergem para a activação de uma rede de factores de transcrição, tal como Oct4, Nanog e Sox2, com funções conservadas em ambos os sistemas que permite a auto-renovação das ESC numa forma não diferenciada (Schnerchet al., 2010) (Fig.1.2).

As discrepâncias observadas entre mESCs e hESCs nos seus requisitos de crescimento indiferenciado não podem ser contabilizadas apenas em diferenças entre as espécies, mas podem ser amplamente explicadas pelas diferentes origens de desenvolvimento destas células pluripotentes. Assim, as hESCs são derivadas, numa fase posterior das aquela onde são as mESCs, num ponto quando a diferenciação epiblasto é iniciada. É possível que a derivação das células estaminais pluripotentes a partir de células de ratinho seja facilitada pela implantação tardia (Hondo e Stewart, 2005) que existe nesta espécie, mas está ausente no embrião humano. Curiosamente, as células pluripotentes também podem ser obtidas a partir de ratinho e de rato pós-implantação de embriões mostrando semelhanças na expressão de genes de vias de sinalização padrão com hESCs e epiblasto (Brons et al., 2007). Para além de partilhar as vias de sinalização de auto-

renovação com hESCs, as células estaminais epiblasticas (em inglês EpiSCs) também apresentam características de cultura semelhantes, baixa capacidade clonal e a reduzida eficiência na formação de quimeras.

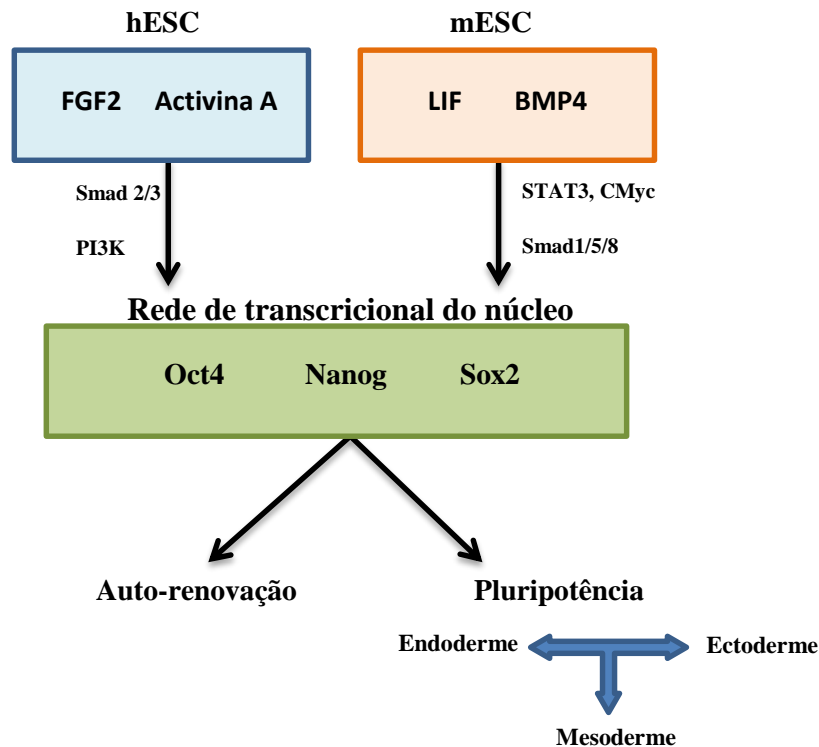


Figura 1.2 - Representação esquemática das diferenças das vias de sinalização que regulam a auto-renovação e pluripotência das células estaminais embrionárias humanas (hESC) e das de rato (mESC). As mESC são mantidas, principalmente sob o controle de LIF e BMP sinalização, enquanto hESCs necessitam de Activina A e FGF para manter a auto-renovação a longo prazo e a pluripotência. Estas vias de sinalização em ambos os sistemas convergem para a activação da rede transcricional do núcleo que envolve Oct4, Sox2 e Nanog.

Neste trabalho será abordada a produção de células estaminais pluripotentes induzidas (em inglês iPSC). Em 2006, o Professor Yamanaka e sua equipa de investigação conseguiram originar células pluripotentes a partir de células somáticas de rato, que foram nomeadas iPSC (*Takahashi and Yamanaka, 2006*). Em 2007, o mesmo grupo publicou resultados mostrando que as iPSC também podem ser obtidas a partir de células somáticas humanas (*Yamanaka, 2007*).

As iPSC's são assim um novo tipo de células estaminais pluripotentes que foram induzidas através da expressão forçada de 4 factores de transcrição (Sox2, Oct4, Klf4 e c-Myc) em células somáticas adultas, provocando de um modo artificial a reprogramação celular. Estas células são muito semelhantes às células estaminais embrionárias (em inglês ESC) equivalentes, com expressão similar de certos genes e proteínas, em

particular os factores de transcrição pilares da pluripotência tal como Oct4, Nanog e Sox2 e um tempo de duplicação comparável às ESC. As iPSC também são capazes de diferenciar *in vitro* em células derivadas das três camadas germinativas por a formação de corpos embrionários (em inglês EB), e de formar teratomas em animais imunodeficientes. As iPSC de ratinho podem contribuir formação de quimeras viáveis e férteis, e assim gerar na descendência destas quimeras ratinhos completamente originados das iPSC comprovando de forma absoluta a pluripotência destas células (Takahashi and Yamanaka, 2006).

1.1 – Introdução ao Processo de Reprogramação

De modo a se poder compreender melhor o processo de reprogramação, será explicado a função de cada um dos quatro factores de transcrição inseridos nas células somáticas para a produção de iPS pluripotentes: Oct4, Sox2, Klf4 e c-Myc.

Oct4 é um factor de transcrição conhecido por ter um papel fundamental na manutenção e auto-renovação das células pluripotentes. Sabe-se que o nível de expressão do Oct4 tem que ser muito bem controlado. De facto, foi demonstrado que a deleção do Oct4 gene em ESC resulta na diferenciação destas células em células semelhantes do trofoblasto e se a sua elevação de expressão um pouco mais do que o normal provoca a diferenciação em células da mesoderme e ectoderme (Niwa et al, 2000). Sendo assim Oct4 tem que ter uma regulação rigorosa nas células estaminais e este factor tem um papel crucial na manutenção da pluripotencia das ESC. Sabe-se ainda que Oct4 interage com Sox2 de modo a regularem outros genes importantes para manter as células não diferenciadas e inibir a expressão de genes que promovem a dieferenciação (Chew et al, 2005).

Sox2 desempenha um papel importante na manutenção da pluripotência das células ES, assim como o Oct4. A sub-regulação de Sox2 em linhas ESC de ratinho promove a diferenciação em trofectoderme, bem como outras linhagens, claramente demonstrando a importância de Sox2 para manter a pluripotência (Ivanova et al., 2006). Outro factor importante para manter as células pluripotentes, é o factor Nanog que frequentemente se encontra associado a Sox2 e Oct4 nos promotores e elementos de

regulação de muitos genes das células ESC (Boyer et al., 2005). Ademais, por formação de um heterodímero Sox2 e Oct4 regulam também a sua própria expressão (Chewetal.,2005), bem como a do gene Nanog (Kuroda, et al.2005)

O factor de transcrição c-Myc tem funções no crescimento celular, diferenciação e proliferação celulares. Também é um proto-oncogene que desempenha um papel significativo na maioria dos cancros humanos. C-Myc acelera o ciclo celular através da activação da transcrição de ciclina E, que promove a transição de G1 para a fase S (Hooker e Hurlin, 2006). C-Myc é um factor importante alvo a jusante de duas vias de sinalização distintas, cada um dos quais é conhecido por apoiar a manutenção de pluripotência em células estaminais embrionárias. Essas vias são a via activada por LIF (factor inibidor de leucemia) e mediata pelo factor de transcrição STAT3 (Cartwright et al., 2005) e a cascata de sinalização activada por Wnt (Satoetal., 2004). O LIF é necessário para a cultura de ESC de ratinho e a cascata de sinalização induzida por LIF resulta na activação e na translocação para o núcleo da STAT3. A activação da transcrição de c-Myc é uma das principais funções da proteína STAT3 activa, e ainda, de uma expressão da forma estável de c-Myc promovendo nas ESC auto-renovação na ausência de LIF. Assim, c-Myc está fortemente implicado na manutenção da pluripotência. A cascata de sinalização Wnt promove a auto-renovação de células estaminais embrionárias humanas e de ratinho, independentemente de LIF/STAT3 de sinalização (Sato et al., 2004). Para além dos seus papéis na manutenção da pluripotência, c-Myc possui outras funções, o que também pode ser responsável por sua importância na indução de pluripotência. Em primeiro lugar, existem cerca de 25 mil locais de ligação Myc no genoma, e c-Myc pode ligar em vários locais e recrutar complexos de histonas acetiladas (Knoepfler et al., 2006). Além disso, promovendo a progressão de G1 para a fase S, pode neutralizar o efeito anti-proliferativo de Klf4 (Yamanaka, 2007). Como c-Myc, o gene que codifica o factor de transcrição Klf4 é alvo da proteína STAT3 activa. A sobre-expressão de Klf4 inibe a diferenciação de ESC (Li et al., 2005), e Klf4 coopera com Oct4 e Sox2 para activar os promotores proximais de um reduzido número de genes alvo, incluindo Klf4 e Lefty1 (Nakatake et al., 2006). Uma característica interessante é que Klf4 pode actuar tanto como um supressor de tumor ou como um oncogene, está associado á supressão de tumores porque activa p21 que suprime a proliferação. No entanto, Klf4 inibe a expressão do factor p53, promovendo assim a proliferação celular (Rowlandet al., 2005). Assim, na ausência de p21, KLF4 alterna de um supressor de tumor para um oncogene. É também

digno de nota que a p53 actua como um regulador negativo da Nanog, que é um factor chave envolvido na manutenção da pluripotência (Lin et al., 2005). Sendo assim, como Klf4 inibe o p53 pode resultar indirectamente numa regulação de activação do Nanog.

Percebendo as características dos 4 factores de transcrição pode-se entender o modo como as células somáticas são reprogramadas. Após a expressão ectópica dos 4 factores de reprogramação Oct4, Sox2, Klf4 e c-Myc em células somáticas forma determinadas 3 fases essenciais de activação dos genes que levam à reprogramação das iPSC. Inicialmente uma primeira fase em que existe a activação de c-Myc e de Klf4, que permite à célula de obter a capacidade de auto-renovação, e abertura da cromatina para a activação de novos genes que anteriormente se encontravam silenciados. Mas só estes factores não são suficientes, pois se não for activada a via de sinalização de Oct4 as células terão tendência para uma proliferação descontrolada levando a tumores, visto que c-Myc e Klf4 são pró-oncogenes. Após activada a segunda fase, o Oct4, altera o caminho das células com tendências para se tornarem células tumorais, e passaram a expressar alguns dos genes que se encontram activos nas ESC, estas células terão uma morfologia semelhante à das ESC, mas como referenciado anteriormente a oscilação da expressão de Oct4 neste momento é muito provável, sendo assim estas células ainda não são pluripotentes, não tendo a capacidade para formar células das três linhas germinativas. Por fim teremos a terceira fase, o efeito de Sox2 e Klf4, que dirigem os factores de reprogramação para activar a expressão de genes responsáveis pela auto-renovação das ESC e permitindo assim que se formem iPSC com propriedades de pluripotência (Yamanaka, 2007) (fig. 1.3).

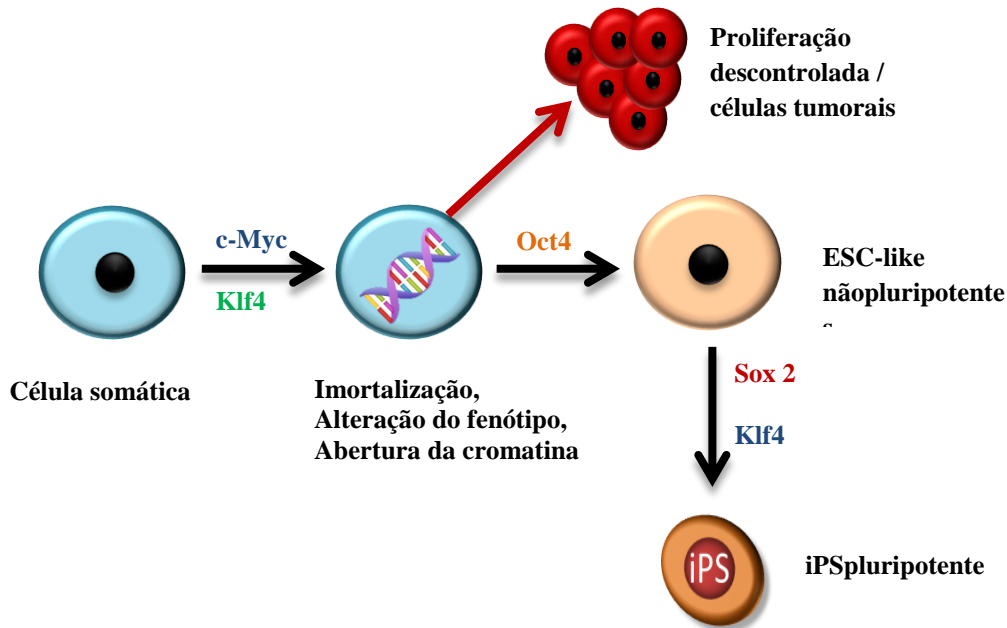


Figura 1.3 - Modelo para a geração de células iPS através da transdução viral de 4 genes. É proposto que c-Myc induz a imortalização celular e a abertura da cromatina, o Klf4 suprime a apoptose e senescência. Oct4 altera o destino da célula a partir de células tumorais para células pluripotentes e o Sox2 é também necessário para estabelecer a pluripotência

1.2 – Limitações ao Processo de Reprogramação

A capacidade para derivar células pluripotentes a partir de células somáticas pode cumprir a promessa das células estaminais ilimitadas para aplicações em biologia básica, desenvolvimento de medicamentos, ou a medicina regenerativa. Várias estratégias têm sido utilizadas para reprogramar células somáticas em células estaminais pluripotentes. Estes incluem a transferência nuclear (Wilmut et al., 1997), fusão celular com ESC (Ying et al., 2002), ou a expressão de fatores ligados à pluripotência celular como foi referido anteriormente (Yamanaka, 2006).

Atualmente, com base em iPSC as duas principais limitações para traduzir a reprogramação em aplicação clínica são rotineiramente entregar as células iPSC seguras e livres de vetor e seqüências transgênicas, e melhorar a eficiência de reprogramação.

A primeira questão está a ser tratada por meio alternativo de métodos para entregar os fatores de reprogramação, como transfecção transitória (Okita et al. 2008), Adenovírus (Stadtfeld et al. 2008), vectores episomais (Yu et al. 2009), ou proteínas recombinantes

(Zhou et al., 2009). Diferentes estratégias estão sob investigação para melhorar a eficiência da reprogramação (Feng et al., 2009).

A reprogramação é um processo progressivo, por exemplo, mediante a transdução retroviral, os genes específicos da linhagem são silenciados gradualmente e introduzindo marcadores embrionários é activado novamente, levando á indução de genes endógenos ligados à pluripotência (Brambrink et al., 2008). No entanto, este processo resulta em apenas uma pequena percentagem da população infectada de células pluripotentes, sugerindo que existem barreiras que podem limitar a eficiência de uma reprogramação bem-sucedida, uma das causas de uma reprogramação ineficiente é devido á senescência celular.

A senescência ocorre na fase G1 do ciclo celular impossibilitando a continuidade da proliferação celular, é induzida pelo esgotamento replicativo ou em resposta a alterações celulares, tais como danos no ADN, quimioterápicos, ou expressão aberrante de oncogenes. Esta detenção é implementada principalmente através da ativação de p53 e o aumento da regulação de inibidores de quinase dependente de ciclinas (CDK) tal como p16^{INK4a} e p21^{CIP1} (Collado et al., 2007). Além de ser uma simples observação *in vitro*, a senescência fisiológica desempenha relevantes papéis. Em particular, a senescência induzida por oncogene é amplamente observada entre lesões pré-malignas variadas e acredita-se ser de tumor - supressor. A senescência também limita a homeostasia dos tecidos normais através da regulação da auto-renovação das células estaminais, ou seja envelhecimento celular (Collado et al., 2007).

Outro factor causador da senescência é a activação de expressão dos genes do locus Ink4/Arf que compreende os genes que codificam CDKN2a-CDKN2B, três potentes supressores do tumor, também chamados p16 (INK4A), p19 (ARF) e p15 (Ink4b), as quais são expressos em células diferenciadas e regulados positivamente por sinais mitogénicos aberrantes. Em iPSC sabe-se que este locus é completamente silenciado, bem como em células ESC, retendo a capacidade de reactivação, após a diferenciação. As condições de cultura celular durante a reprogramação aumenta a expressão do locus Ink4/Arf, destacando ainda mais a importância de silenciar o locus para permitir proliferação e reprogramação. Com efeito, os três factores de transcrição (Sox2, Klf4, Oct4) em conjunto reprimem o locus Ink4/Arf logo após a sua expressão e concomitante com o aparecimento dos primeiros marcadores moleculares de 'stemness'. Inibição genética do locus Ink4/Arf tem um efeito positivo profundo na eficiência da geração de iPSC, aumentando tanto a cinética de reprogramação e o número

de colónias de iPSC emergentes. Além disso, o envelhecimento do organismo regula positivamente o locus Ink4/Arf e, conseqüentemente, a reprogramação é menos eficiente em células de organismos de idade. Podendo-se concluir que a inibição de Ink4/Arf locus pode melhorar significativamente a geração de iPSC. (Han Li et al, 2009)

Um gene que se tem mostrado capaz de melhorar o processo de reprogramação, é o Tbx3, tendo este a competência de melhoramento da competência da linha germinal de iPSC. Tbx3 é um membro da família de genes T-box. A família T-box de factores de transcrição desempenham um papel importante na regulação de processos de desenvolvimento precoce e na regulação da expressão genética redes envolvidas na especificação linhagem de células. Mutações homozigotas de Tbx3 são letais ao estadio embrionário o em ratinhos, sugerindo que Tbx3 é importante durante as primeiras fases do desenvolvimento embrionário. Nos seres humanos, as mutações heterozigotas do *TBX3* são suficientes para causar a síndrome de ulnar mamária caracterizada por defeitos no interior dos membros, apócrina e glândula mamária, semelhantes aos de modelos de ratinhos. Em adição ao seu papel na regulação do desenvolvimento embrionário e glândula mamária, Tbx3 foi identificada como um regulador chave da pluripotência e diferenciação de mESC. As mESC submetidas a um tratamento diferenciação induzida por ácido retinóico (AR), a expressão de *Tbx3* foi significativamente diminuída, juntamente com os reguladores de pluripotência Oct4 e *Nanog*. O Knockdown de *Tbx3* resulta na perda de pluripotência e diferenciação das mESC, sugerindo que Tbx3 é necessário para manter a auto-renovação. *TBX3* inibe ainda a expressão de *p14^{ARF}* e assim promover a proliferação e imortalização de fibroblastos de embrião de rato (Han et al., 2010).

Num estudo realizado em 2011 foi provado que a combinação de 6 factores, (sendo 4 deles os 4 factores de Yamanaka, e os outros dois, *Nanog* e *Lin28*) provou ser possível o melhoramento do processo de reprogramação e que é possível reprogramar células somáticas centenárias (Lapasset et al., 2011).

1.3 – Cited2 e sua funcionalidade na rede de transcrição de genes de pluripotencia nas ESC

O *CITED2* é um regulador de transcrição com uma cauda rica em ácido glutâmico e ácido aspártico (ED) que interage com CBP/p300, que se encontra expresso em todos

os vertebrados. Tem uma taxa de conservação elevada nos mamíferos com placenta, com cerca de 95% de identidade entre a proteína humana e a de ratinho por exemplo. Existem três regiões (CR1-3) que são conservadas entre os outros membros da família CITED, e também uma região que é única ao CITED2, que se chama região de Junção Rica em Serina-Glicina incomum em outras proteínas (em inglês SRJ, resíduos 161-199). A função da região CR2 (resíduos 215-270) é a ligação ao domínio CH1 dos co-activadores CBP e p300. A ligação de CITED2 ao domínio CH1 inibe por competição a interacção com o factor activado pela Hipoxia (HIF1) com complexo CBP/p300 (Zhan Yin et al 2002). CITED2 a função de co-activador de transcrição, recrutando o CBP/p300 através do factor de transcrição AP2 (em inglês TFAP2). As funções das regiões CR1, CR3 e SRJ são ainda desconhecidas, sendo que para SRJ foi indicada como hipótese, ser um “hotspot” mutacional com agrupamento de aminoácidos variantes nesta região, tendo sido previamente relatado em pacientes com doença cardíaca congénitas (em inglês CHD). Cited2 é essencial para o desenvolvimento normal do embrião de ratinho, sendo que os ratinhos knockout de Cited2 morrem no útero com malformações cardíacas e do arco aórtico, agenesia da glândula adrenal, exencefalia, crista neural defeituosa e defeitos de padronização esquerda-direita (Bamforth et al., 2001 e 2004). As malformações cardíacas em ratinhos sem Cited2 são diversas e incluem defeitos nos septos ao nível das aurículas e ventrículos, dupla via de saída do ventrículo direito, tronco arterial comum, tetralogia de Falot, transposição das grandes artérias, e interrompido e arco aórtico aberrantes (Bamforth et al, 2001).

Nas ESC a pluripotencia é controlada pelo ajuste de fatores de transcrição, a interação de co-factores de transcrição com fatores de transcrição, e modificações epigenéticas, Oct4, Klf4, Sox2 e c-Myc são fatores de transcrição cruciais na reprogramação de células somáticas e iPSC. p300 foi mapeado na cadeia de activação dos genes importantes para as ESC, tendo este uma interação nos genes alvo semelhante a de OCT4 por todo o genoma (Li et al, 2014). p300 desempenha um papel crucial na diferenciação ESC por modificações epigenéticas de histonas no promotor Nanog (Fang et al, 2014). Cited2 foi identificado por durante uma experiencia para e identificar genes activos em células estaminais embrionárias, concluindo-se que a sua expressão pode manter as mESC num estado indiferenciado, mesmo na ausência de LIF (Pritsker et al. 2006).

Cited2 é responsável pela perda de senescência, devido a este actuar na via de Ink4a/p19ARF, que permite que as células continuem a proliferar e não entrem em fase de senescência. (Kranc et al., 2003), é necessário para a proliferação de fibroblastos embrionários primários de ratinho em cultura. Os fibroblastos sem Cited2 param de se dividir prematuramente, exibindo uma morfologia típica de células senescentes, sendo assim o Cited2 é considerado um “anti-senescente”, tendo ainda a capacidade de activar a expressão de genes envolvidos na pluripotência (Sox2 e Klf4), podendo vir a ter um papel benéfico e possivelmente importante para a reprogramação das iPSC (Kranc et al., 2003).

1.4 – Objectivos

Na sequência de vários estudos, este tem como principal foco, desenvolver um método de reprogramação que seja capaz de aumentar a eficiência do processo de reprogramação, reduzir as diferenças de expressão gênica entre ECS e IPS e superar a senescência.

No âmbito deste trabalho, foi investigado a inserção do factor Cited2 de modo a analisar o seu potencial em gerar iPS de ratinho, em células MEF's, se Cited2 mais OSKM em fase P2, melhora a reprogramação tendo este a capacidade de manter mESC's sob um estado indiferenciado, e por ultimo se Cited2 mais OSKM em fase P4 atenua a senescência e reprograma as células.

CAPITULO 2 - Métodos

2.1 - Produção de células Fibroblásticas Embrionárias de ratinho (MEF's) Primarias

Consiste no processo de através de embriões de ratinhos se fazer a extracção de células Fibroblásticas Embrionarias de ratinho (MEF's).

Neste Processo é necessário, ter-se acesso a um biotério, que tenha ratinhos, neste caso são utilizados ratinhas C7Bl6 grávidas com um período de gestação de 14 dias, no máximo 15.

Após o animal vir do biotério sem vida, abre-se a ratinha grávida com um golpe na pele e, puxando verticalmente. Sendo retirado os embriões e colocados numa placa de cultura de 100 mm com PBS 1x.

São levados para uma câmara de fluxo laminar, onde lhes é retirado o saco vitelino, e individualmente colocados numa placa de seis poços com PBS 1x. Foram retirados os órgãos e a cabeça do embrião.

Após isso, foi aspirado o PBS 1x dos poços e lava-se novamente os embriões em PBS 1x, retirando-o de novo.

Adicionou-se 2 ml de tripsina para ajudar na separação das células que depois serão recolhidas, entretanto o embrião é cortado com um bisturi de modo a se obter pequenos pedaços de tecido para a tripsina actuar facilmente.

O conteúdo dos poços foi então transferido para um tubo de 15 ml através de uma pipeta de 1000 µl, sendo feita a resuspensão para ajudar a separação do tecido em células.

Os poços que continham os embriões foram lavados com 3 ml de tripsina e transferido o conteúdo, respectivamente para cada tubo de 15 ml. Foram deixados os tubos num banho a 37°C durante 30 minutos, sendo que a cada 10 minutos inverte-se o tubo para que esteja sempre homogeneizado.

Passados os 30 minutos, adicionou-se 10 ml de DMEM (L-glutamina 1,2 %, Penicilina Streptomicina 1,2%) com soro 10 % , fazendo-se a resuspensão do conteúdo varias vezes, de modo a que os pequenos agregados de células ainda existentes se desfaçam.

Deixaram-se os tubos em repouso durante 2 minutos e retirou-se de cada tubo aproximadamente 10 ml do sobrenadante para uma placa de cultura de 10 mm.

As placas são colocadas numa incubadora a 37°C cerca de 24 horas

Após esse período as células são tripsinizadas, contadas, armazenadas em vials de 2 ml com uma concentração de 1×10^6 de células/ml e congeladas em 1 ml de solução de congelamento (12% de DMSO, 48 % de DMEM , 40 % de soro inativado) a -80°C .

No dia seguinte á congelação as células são passadas para uma arca -150°C .

2.2 - Produção de Partículas Virais

Transfecção, processo de introdução intencional de ácido nucleicos nas células de modo a se criar um processo de produção de partículas virais, que serão usados para infecção de células.

2.2.1 - Produção de retrovírus KRK1 e LZRS

Para esta transfecção foram utilizadas 2 placas de cultura de 100 mm confluentes contendo células Phenix, para a produção de partículas virais (retrovírus) de Krk1 e LZRS.

Dia 1

Num tubo de 15 ml , colocou-se 2500 μl de DME(L-glutamina 1,2 % , Penicilina Streptomicina 1,2%) sem soro com 3,2 $\mu\text{l}/\text{ng}$ ADN de lipofectamina, tendo um tempo de incubação de 5 minutos. Este conteúdo foi dividido por dois tubos de 15 ml, que já continham 1250 μl de DMEM (L-glutamina 1,2 % , Penicilina Streptomicina 1,2%) sem soro com 10 ng de KRK1 e o outro 10 ng de LZRS, tendo um período de incubação de 20 minutos.

A cada uma das placas é adicionada, respectivamente o tubo contendo KRK1 e LZRS, tendo sido adicionado mais 2 ml de DMEM (L-glutamina 1,2 % , Penicilina Streptomicina 1,2%) sem soro.

As placas têm um período de incubação de cerca de quatro a seis horas, tendo sido adicionado no final do período de tempo referenciado 5 ml de DMEM (L-glutamina 1,2 % , Penicilina Streptomicina 1,2%) com soro 10 % .

Dia 2

Foi adicionado 2 µg/ml de piromicina para um total de 10ng/ml de modo a se poder seleccionar as células que continham as partículas virais que inseridas, tendo um tempo de incubação de vinte e quatro horas.

Dia 3

Foi retirado o meio da placa, e fez-se uma lavagem com PBS 1x e adicionado 5 ml de DMEM (L-glutamina 1,2 %, Penicilina Streptomicina 1,2%) com soro 10 % .

O meio é retirado passado vinte e quatro horas.

Dia 4

Foram armazenados os 5 ml de sobrenadante, que se encontravam nas placas de cultura, contendo as partículas virais produzidas, através de uma seringa de 10 ml e filtrados com um filtro de 0.45 mm ,para um tubo de 15 ml.

O processo do dia três e do dia quatro é repetido durante mais dois dias, sendo no final, tudo homogeneizado no mesmo tubo KRK1 e LZRS respectivamente, e guardado em frasco de congelamento de 2 ml num congelador -80°C.

2.2.2 - Produção de lentivirus M2RTTA e TET

Para este procedimento foram utilizadas duas placas de células 293T com uma confluência de setenta a oitenta por cento.

Dia 1

Num tubo de 15 ml , colocou-se 2500 µl de DMEM (L-glutamina 1,2 %, Penicilina Streptomicina 1,2%) sem soro com 3,2 µl/ng ADN de lipofectamina, tendo um tempo de incubação de 5 minutos. Entretanto foram se preparando outros dois cada um com 1250 µl de DMEM (L-glutamina 1,2 %, Penicilina Streptomicina 1,2%) sem soro com 2 ng de REV, 2 ng de RRE e 2ng pMD2.G, com a diferença que um dos tubos foi lhe adicionado 4 ng de M2RTTA e ao outro tubo 4 ng de TET.

A cada um destes tubos foi lhe adicionado metade do conteúdo do tubo que continha lipofectamina, tendo estado a incubar durante 20 minutos. E colocado o

conteúdo dos tubos, a cada placa de modo a produzir respectivamente cada um dos vectores virais, com uma adição 2 ml de DMEM (L-glutamina 1,2 %, Penicilina Streptomicina 1,2%) sem soro em cada placa.

As placas têm um período de incubação de cerca de quatro a seis horas, tendo sido adicionado no final do período de tempo referenciado 5 ml de DMEM (L-glutamina 1,2 %, Penicilina Streptomicina 1,2%) com 10% soro inactivado.

Dia 2

O meio foi retirado, fazendo-se uma lavagem da placa com PBS 1x.

Adicionou se 5 ml de DMEM (L-glutamina 1,2 %, Penicilina Streptomicina 1,2%) com 10% de soro inactivado para se armazenar o sobrenadante no dia seguinte

Dia 3

Foram armazenados os 5 ml de sobrenadante, que se encontravam nas placas de cultura, contendo as partículas virais produzidas, através de uma seringa de 10 ml e filtrados com um filtro de 0.45 mm ,para um tubo de 15 ml.

O processo do dia dois e do dia três é repetido durante mais dois dias, sendo no final, tudo homogeneizado no mesmo tubo M2RTTA e TET respectivamente, e guardado em frasco de congelamento de 2 ml num congelador -80°C.

2.2.3 - Produção de lentivírus CP1 e CP1C2

Para este procedimento foram utilizadas duas placas de células 293T com uma confluência de setenta a oitenta por cento.

Dia 1

Num tubo de 15 ml , colocou-se 2500 µl de DMEM (L-glutamina 1,2 %, Penicilina Streptomicina 1,2%) sem soro com 3,2 µl/ng ADN de lipofectamina, tendo um tempo de incubação de 5 minutos. Entretanto foram se preparando outros dois cada um com 1250 µl de DMEM (L-glutamina 1,2 %, Penicilina Streptomicina 1,2%) sem soro com 2 ng de REV, 2 ng de RRE e 2ng pMD2.G, com a diferença que um dos tubos foi lhe adicionado 4 ng de CP1 e ao outro tubo 4 ng de CP1C2.

A cada um destes tubos foi lhe adicionado metade do conteúdo do tubo que continha lipofectamina, tendo estado a incubar durante 20 minutos. E colocado o conteúdo dos tubos, a cada placa de modo a produzir respectivamente cada um dos vectores virais, com uma adição 2 ml de DMEM (L-glutamina 1,2 %, Penicilina Streptomicina 1,2%) sem soro em cada placa.

As placas têm um período de incubação de cerca de quatro a seis horas, tendo sido adicionado no final do período de tempo referenciado 5 ml de DMEM (L-glutamina 1,2 %, Penicilina Streptomicina 1,2%) com 10 % de soro inactivado.

Dia 2

O meio foi retirado, fazendo-se uma lavagem da placa com PBS 1x.

Adicionou se 5 ml de DMEM (L-glutamina 1,2 %, Penicilina Streptomicina 1,2%) com 10% de soro inactivado para se armazenar o sobrenadante no dia seguinte

Dia 3

Foram armazenados os 5 ml de sobrenadante, que se encontravam nas placas de cultura, contendo as partículas virais produzidas, através de uma seringa de 10 ml e filtrados com um filtro de 0.45 mm ,para um tubo de 15 ml.

O processo do dia dois e do dia três é repetido durante mais dois dias, sendo no final, tudo homogeneizado no mesmo tubo CP1 e CP1C2 respectivamente, e guardado em frasco de congelamento de 2 ml num congelador -80°C.

2.3 - Reprogramação das MEF's

Descongelou-se um vial de MEF's com aproximadamente 1×10^6 cél/ml para cada duas placas de cultura de 100 mm com 10ml de DMEM (L-glutamina 1,2 %, Penicilina Streptomicina 1,2%) com 10 % de soro inactivado.

Quando as placas chegam a uma confluência de cerca de 80%, foram infectadas, uma placa com 4 ml do retrovírus KRK1 e a outra placa com 4 ml do retrovírus LZRS, adicionando 2 µl de polybrene (0.8 mg/ml) a cada placa. Coloca-se na incubadora a 37°C durante 4 a 6 horas, e adiciona-se 7 ml de DMEM (L-glutamina 1,2 %, Penicilina Streptomicina 1,2%) com 10 % de soro inactivado mais 3,5 µl de polybrene (0.8mg/ml).

Passadas 24 horas o meio é retirado e feita a lavagem das placas com PBS 1x, adicionando-se 10 ml de DMEM (L-glutamina 1,2 %, Penicilina Streptomicina 1,2%) com 10 % de soro inativado, a cada uma.

Esperou-se 2 dias para se poder visualizar, através de microscopia a GFP. Lava-se com PBS 1x, e adicionou-se 1ml de tripsina 0,05% e colocou-se a 37°C durante 5min aproximadamente. Confirmou-se ao microscópio que as células estavam destacadas. Após os 5 min., adicionou-se 3ml de meio, DMEM (L-glutamina 1,2 %, Penicilina Streptomicina 1,2%) com 15% de soro inativado. Contou-se as células e plaqueou-se para placas de 6 poços 1×10^5 cél/ml.

No dia seguinte, lava-se com PBS 1x, e adicionou-se 1ml de vírus TET STEMCCA não purificado, 1ml de vírus M2rtTA não purificado e 1 µl de polybrene (0,8mg/ml) e incubou-se durante 6 horas, ao qual se adicionou- 2ml de meio DMEM (L-glutamina 1,2 %, Penicilina Streptomicina 1,2%) com 15 % de soro inativado, e 1 µl de polybrene (0,8mg/ml) e incubou-se.

No dia seguinte, aspirou-se o meio e lavou-se com PBS.

Adicionou-se 3ml de meio DMEM (L-glutamina 1,2 %, Penicilina Streptomicina 1,2%) com 15 % de soro inativado com LIF 1000 U/ml e Doxíciclina com uma concentração final de 1µg/ml.

Mudou-se o meio a cada 2-3 dias mantendo com doxíciclina durante 12 dias.

Após os 12 dias continuou-se a mudar o meio, mas sem doxíciclina.

Foi-se observando os agregados celulares e quando começarem a estar com contornos bem definidos e grandes, é feita a picagem de modo a se poder expandir esses agregados celulares.

2.4 - Picagem dos Agregados Celulares das MEF's

Foi retirado o meio das células e lavado com PBS 1x, mantendo estas em PBS 1x de modo a evitar morte celular. Este processo é todo feito numa câmara de fluxo laminar contendo uma lupa para se conseguir efectuar o processo.

Preparou-se uma placa de 96 poços com 50ml de tripsina em cada poço, conforme o numero de agregados celulares que forem para ser recolhidos.

Picaram-se os agregados com uma agulha de modo a se recortar à volta dos agregados celulares, as MEF's que estão a servir de suporte as mesmas.

Com uma ponta amarela retirou-se o agregado celular, colocando-o num poço de uma placa de 96 poços com tripsina, fez-se a ressuspensão de modo a se desfazer o agregado celular e transferiu-se o conteúdo todo do poço para uma placa de 6 poços que continham MEF's inactivadas para que sirvam de suporte as células recolhidas, para que estas se possam expandir nas melhores condições possíveis.

2.5- Reprogramação das células Estaminais Mesenquimais humanas do Cordão Umbilical (UC-hMSC)

Descongelou-se um vial de UC-hMSC com aproximadamente 1×10^6 cél/ml para cada duas placas de cultura de 100 mm com 10ml de MEM (Anfotericina B 1%, Penicilina Streptomicina 1%) com 10 % de soro.

Foi infectada uma placa com 4 ml do lentivírus CP1 e a outra placa com 4 ml do lentivirus CP1C2, quando as placas chegam a uma confluência de cerca de 80%, fazendo-se uma co-infecção com os lentivírus TET STEMCCA e M2RTTA, a ambas as placas foi adicionado ainda, 1ml de vírus TET STEMCCA não purificado, 1ml de vírus M2rtTA não purificado e 2.5 µl de polibrene (0,8 mg/ml) e incubou-se durante 6 horas numa incubadora a 37°C. Passado o tempo de incubação adicionou -se 4ml de meio MEM (Anfotericina B 1%, Penicilina Streptomicina 1%) com 15% de soro., e 2 µl de polybrene (0,8mg/ml).

Ao contrario das reprogramação nas MEF's aqui como fizemos uma co-infecção começa-se logo a adicionar doxiciclina 1µg/ml durante 12 dias.

As células são diariamente observadas para se poder ver como decorre a reprogramação nas células, e como progredi a fluorescência nas células.

2.6 - Inactivação das MEF's

Utilizaram-se 6 placas de cultura de 100mm com MEF'S, em passagem 5 (P5).

Tirou-se o meio. Lavou-se com PBS 1x.

Adicionou-se 10ml de DMEM (L-glutamina 1,2 %, Penicilina Streptomicina 1,2%) com 10% de soro inactivado.

Adicionou-se 50µl de mitomicina 0,5 mg/ml no centro da placa com meio.

Deixou-se a 37°C durante 1h30min.

Retirou-se o meio das 6 placas. Esse meio foi colocado numa garrafa de lixo tóxico só para mitomicina.

Lavou-se com PBS 1x. Este processo foi feito mais 2x. (à terceira lavagem já podemos aspirar normalmente)

Adicionou-se 1ml tripsina a cada placa (3min a 37°C)

Adicionou-se 3ml de DMEM (L-glutamina 1,2 %, Penicilina Streptomocina 1,2%) com soro inativado com uma pipeta, fez-se a ressuspensão.

Transferiu-se para um tubo, neste caso de 50ml (\approx 24ml)

Contou-se as células, e são colocadas em tubos de congelamento de 2 ml cerca de 1×10^6 cel/ml em 1 ml de solução de congelamento (12 % de DMSO, 48% de DMEM, 40% de soro inativado) e congeladas a -80°C.

No dia seguinte são passadas para um congelador de -150°C.

2.7- Extração de ARN (kit RNeasy ARN isolation da Quanta Bioscience)

Num microtubo de 1,5ml preparou-se 700 μ l de RLT + 8 μ l de B-mercaptoetanol (para duas amostras se for o caso, se forem mais amostras a solução terá de ser feita em maior quantidade).

Retirou-se o meio e lavou-se com PBS 1x e aspirou-se.

Adicionou-se 354 μ l da amostra preparada anteriormente a cada poço para ocorrer a lise celular. Homogeneizou-se a solução e as células de modo a ficar viscoso.

Adicionou-se 350 μ l de 75% etanol, homogeneizando.

Transferiu-se o líquido para uma coluna (\sim 700 μ l) e centrifugou-se 8000 G / 15 S, descartar o lixo.

Adicionou-se à coluna 700 μ l de RW1 8000 G / 15 S, descartando novamente.

Adicionou-se à coluna 500 μ l de RPE 8000 G / 2min, descartando o sub-nadante.

Colocou-se a coluna num tubo de recolha 1,5ml.

Adicionou-se 30 μ l de água mili-Q à coluna 3000 G / 1min. (repete-se este passo uma vez)

O tubo de recolha contendo 60 μ l de amostra de ARN é quantificado através do nanodrop (permite-nos saber a quantidade neste caso de ARN existente por cada microlitro (μ l)), e mantido num congelador -80°C.

2.8 - Amplificação de ARN em ADNc (kit qScript cADN SuperMix)

A amplificação é feita através de uma reacção em cadeia da polimerase (PCR), é uma tecnologia bioquímica em biologia molecular para amplificar um único ou algumas cópias de um segmento de ADN em várias ordens de grandeza (*Bartlett 2003*), no nosso caso utilizaremos para passar o ARN em ADNc.

Foi utilizado microtubos de 0.2 ml, adicionando 4 µl qScript cADN SuperMix (5x), 1 µg da amostra de ARN e adiciona-se água livre de DNase (água mili-Q) até se obter um volume de 20 µl, levou-se ao vortex durante 10s para homogeneizar.

Inserir-se os tubos no PCR com os seguintes tempos e temperaturas

- 5 min a 25°C
- 30 min a 42°C
- 5 min a 85°C

Deixar arrefecer até aos 4°C após o processo anterior, a solução depois foi diluída em 40µl de água Mili-Q e guardados os microtubos a -20°C.

2.9 - qRT-PCR

Reacção em cadeia da polimerase de transcrição reversa (RT-PCR) é uma de muitas variantes de reacção em cadeia da polimerase (PCR). O qRT-PCR é usado para detectar a expressão do gene quantitativamente através da criação de ADN complementar (ADNc) a partir de transcritos de ARN (*Freeman, 1999*).

Para cada uma dos marcadores que se pretende analisar (GADPH, Nanog, Sox2, Oct4, Rex1, Tbx3, Nodal, FGF5) fez-se uma mix, contendo supermix 2x, 10µM Primer FOR, 10µM Primer REV e água livre de nucleases (água Mili-Q).

Numa placa capilar de 96 poços coloca-se 1µl de amostra de ADNc e 19 µl da mix preparada para cada um dos genes.

O programa utilizado tem temperaturas e tempos estimados:

- 95°C durante 5 min
 - 95°C durante 1s
 - 65°C durante 35s
- } Durante 40 ciclos

2.10 - Formação de Corpos embrionários (EB)

Corpos embrionários (EB) são agregados tridimensionais das células estaminais pluripotentes. Com este processo de formação de EB's, pretende-se perceber se as células que obtemos como possíveis iPS, têm a capacidade de formar EB's e se expressão durante o período de diferenciação factores de transcrição das três camadas germinativas - ectoderme, mesoderme e endoderme (Yu, 2007).

As células foram colhidas por tripsinização e colocadas em placas de cultura de bactérias em meio sem LIF, em gotas de 20 µl contendo 1000 células . Após 2 dias, as células agregadas foram plaqueadas em placas de cultura de tecidos revestidas com gelatina e foram incubadas durante mais 4 dias. Os EB's foram recolhidos no dia 6 e feita a extracção de ARN e este amplificado para ADNc para a análise de qRT-PCR.

CAPÍTULO 3 - Resultados

3.1 - Reprogramação das MEF's

Os fibroblastos embrionários primários de ratinho (MEF – em inglês *Mouse Embryonic Fibroblast*) foram isolados de embriões de ratinho ao dia embrionário 13.5 (E13.5) e mantidos em cultura. A cultura ao longo do tempo, leva estas células a passar de uma fase de proliferação exponencial (aproximadamente entre as passagens P0 e P4), a uma fase de senescência por inibição da progressão do ciclo celular (aproximadamente entre as passagens P4 e P7), antes de imortalizarem e crescerem de novo de forma exponencial (Kamil et al, 2003). Os MEF senescentes, com um citoplasma largo, apresentam uma morfologia diferente das células em proliferação, com forma alongada e um citoplasma de pequeno tamanho (Figura 3.1). Os MEF em passagem P2 (fase de crescimento exponencial) ou P4 (fase antes da senescência) foram transduzidos com retrovirus expressando CITED2 e a GFP – em inglês *Green Fluorescent Protein* - (MEF/CITED2-GFP) ou com o retrovirus controle (MEF/GFP) que expressa somente a GFP, previamente descritos (Kamil et al, 2003).

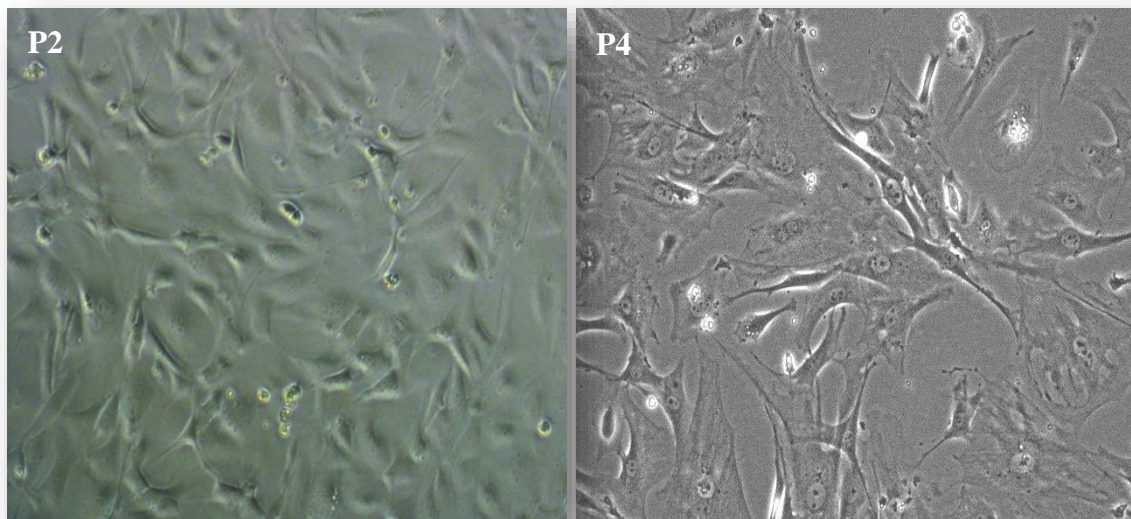


Figura 3.1 –MEF's em passagem P2 e P4- antes do processo de infecção. Em P2 tendo estas uma forma bem definida, com citoplasma arredondado, com capacidade mitótica viável, podendo se ver que em P4 as células já se encontram num estado de senescência, com mudanças no aspecto morfológico, alongamento do citoplasma

A sobre-expressão de CITED2 nos MEF foi determinada por microscopia de fluorescência (Figura 3.2 e 3.4). O grupo de investigação mostrou previamente por qRT-PCR e *western blotting*, que as células MEF/CITED2-GFP expressam cerca de 15 vezes mais CITED2 do que as células MEF/GFP controlo (dados não apresentados).

Dois dias após transdução com os retrovirus, as células MEF/CITED2-GFP ou MEF/GFP em P2 ou P4, foram super-infectados simultaneamente com as partículas lentivirais pHAGE-Tet-STEMCCA expressando os quatro factores de reprogramação (Oct4, Klf4, Sox2 e c-Myc) a partir de um só ARN mensageiro (Cesar A. Sommer et al, 2008), e M2rtTA expressando o transactivador tetraciclina. O transactivador tetraciclina é activado na presença de doxociclina e permite nestas condições a estimulação do promotor TetO/Mini CMV que controla a expressão dos factores de reprogramação no vector pHAGE-Tet-STEMCCA.

Para determinar os efeitos potenciais da sobre-expressão de CITED2 no processo de reprogramação, as células MEF/CITED2-GFP e as células controlo MEF/GFP, infectadas em passagens P2 e P4, foram cultivadas em condições de cultura para reprogramação de células somáticas em iPS que são as condições de cultura das células estaminais embrionárias de ratinho, nas quais a presença de LIF (Leukaemia Inhibitory Factor) é essencial (Yamanaka, 2006).

3.1.1 -Reprogramação dos MEF em P2

Após transdução dos MEF em passagem P2 com os retrovirus expressando GFP ou CITED2-GFP, a observação de expressão de GFP revelou que a eficiência de infecção não foi de 100% (Figura 3.2). Para certificar uma população homogénea de MEF que expressam CITED2-GFP ou GFP, as células foram isoladas por citometria de fluxo com

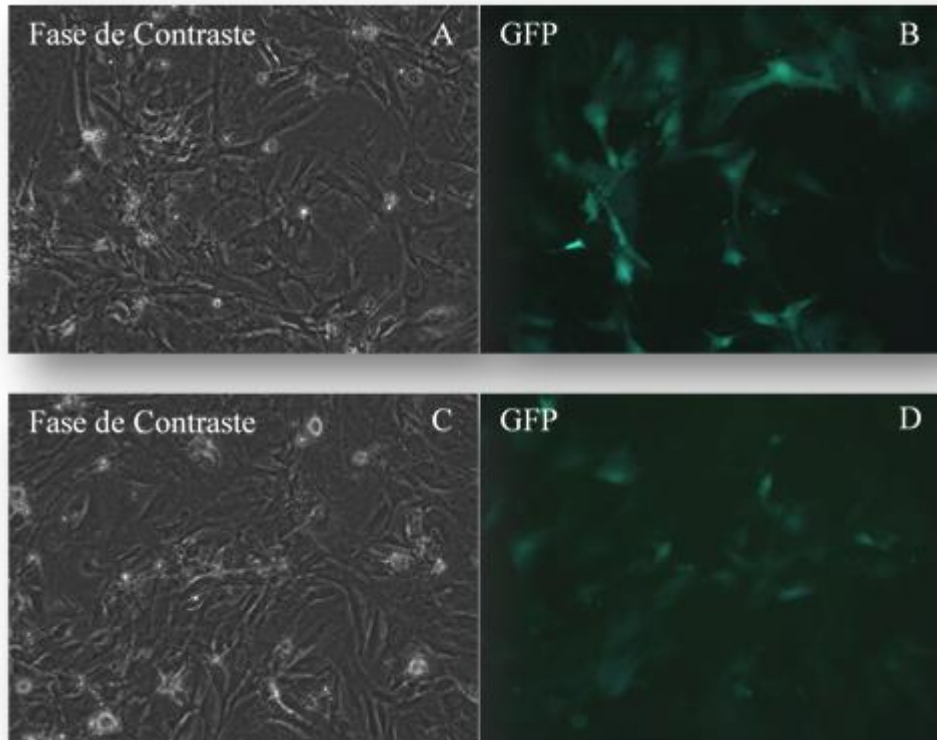


Figura 3.2 – MEF's infectadas após 4 dias. As MEF's que têm Cited2 exógeno apresentam GFP (A,B) assim como as MEF's sem Cited2 exógeno (C,D), podendo ainda ser visualizado que o número de células infectadas se encontra relativamente semelhante entre as células com e sem sobreexpressão de Cited2

base emissão de fluorescência devido à expressão de GFP, antes de serem super-infectadas pelas partículas lentivirais expressando os 4 factores de reprogramação. Um dia após a super-infecção, as condições de cultura destas células são modificadas para as condições de reprogramação, ou seja na presença de meio para ESC com suplemento de LIF. Inicia-se também o tratamento com doxicilina, com uma duração de 12 dias para activação da expressão dos genes Sox2, Oct4, Klf4 e c-Myc exógenos e iniciar a reprogramação.

Após uma semana de cultura nas condições de reprogramação, observou-se o ajuntamento de células formando foci de colónias com morfologia semelhante à das células estaminais embrionárias (Figura 3.3). Esta agregação celular é característica do processo de reprogramação, e é a partir de agregados deste tipo (pré-iPS) que serão originadas as futuras células pluripotentes induzidas, ou iPS. Para determinar se a sobreexpressão de CITED2 promove o aumento do número de colónias pré-iPS e iPS, foram contados os agregados ao longo do processo de reprogramação das MEF/CITED2-GFP e

MEF/GFP (Tabela 3.1). Os agregados celulares geram-se, inicialmente, em maior número nas células sobre-expressando CITED2 exógeno em relação às células controle. No entanto há medida que o tempo de reprogramação vai passando a quantidade de colónias de tipo pré-iPS ou iPS passa a ser relativamente semelhante entre os dois tipos de células, quer nas células que sobre-expressam o CITED2, quer nas células controle.

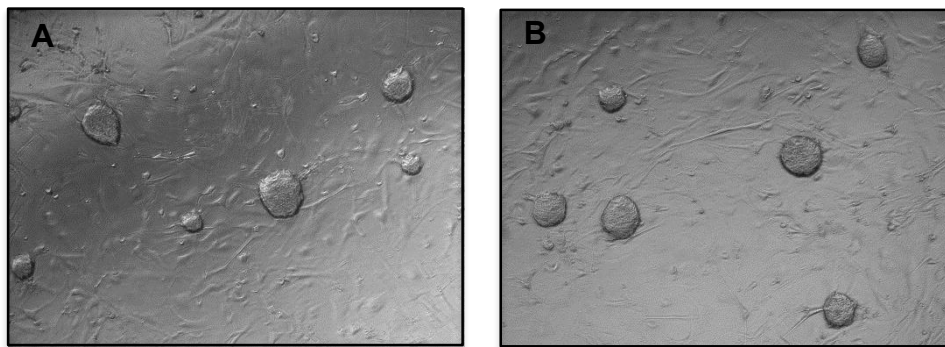


Figura 3.3 - Ajuntamento de células formando foci de colónias com morfologia semelhante à das células estaminais embrionárias – A – Mefs sem Cited 2 exógeno, B – Mefs com Cited2 exógeno

Experiment	Cells	DAY 6	DAY 10	DAY 18
I	iPS	7	-	-
	iPS.Cited2	24	-	-
II	iPS	-	30	18
	iPS.Cited2	-	44	19
III	iPS	6	11	27
	iPS.Cited2	13	16	25

Tabela 3.1 - Número de agregados celulares gerados durante a reprogramação das MEF's na passagem P2 na ausência (iPS) ou presença (iPS.Cited2) exógena Cited2. O número de agregados celulares foram gerados a partir de três experiências independentes (I, II e III) foram contados sob o microscópio, durante o processo de reprogramação. "-" Representa o número desconhecido. (retirado do poster Matias A.C. et al, 2013)

Após aproximadamente 10 dias de cultura em condições de reprogramação, observou-se o aparecimento de colónias com morfologia semelhante à das células estaminais embrionárias (Fig. 3.2). Não foi observada nenhuma diferença notável entre as colónias iPS.CITED2 obtidas a partir de MEF sobre-expressando CITED2 e as colónias iPS obtidas a partir das MEF controle. Observamos a inibição da expressão de GFP por repressão da expressão dos retrovirus (Fig. 3.4) que é um processo que ocorre na fase mais precoce de reprogramação.

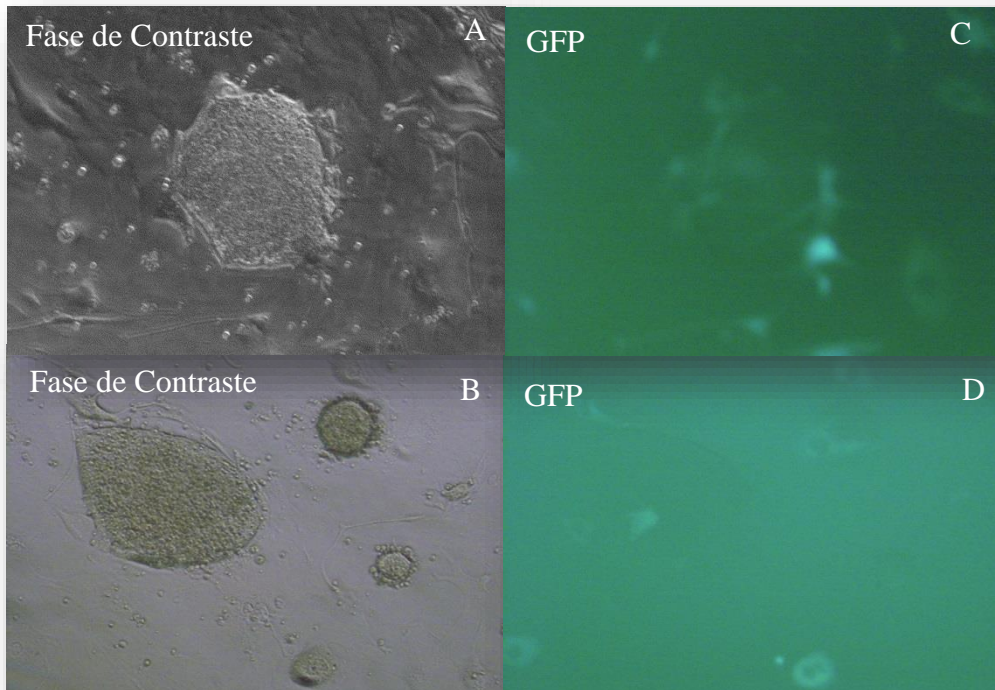


Figura 3.4 – Agregados celulares: A - Agregado celular contendo Cited2 exógeno com cerca de 13 dias, morfologia arredondada e bem defenida, B - a GFP começa a deixar de ser expressa no agregado celular, C - agregados de 13 dias sem Cited2 exógeno, morfologia arredondada e bem defenida, D – a inibição da GFP começa a ser vsível.

Em termos de morfologia, os agregados celulares formados a partir de células MEF/CITED2-GFP e MEF/GFP são semelhantes, sempre aparentando um aspecto arredondado comparável à morfologia de colónias de células estaminais embrionárias (Figura 3.3). Inicialmente, todos os agregados celulares originados a partir de MEF/CITED2-GFP e MEF/GFP expressavam GFP, mas na fase final de reprogramação, nas colónias que permaneciam, já não era detectada a fluorescência (Figura 3.5). O silenciamento da expressão de genes a partir de retrovirus integrados no genoma ao longo da reprogramação é também uma indicação que as células estão a tornar-se pluripotentes (Yamanaka, 2006).

Após quatro semanas de cultura em condições de reprogramação, duas colónias individuais de iPS potenciais, foram isoladas e cultivadas de forma independente em condições de células estaminais embrionárias sobre uma camada de MEF inactivadas por tratamento à mitomicina C. Estas colónias cresceram e foram expandidas durante varias semanas indicando que possuem assim a capacidade de auto-renovação. As iPS potenciais

reprogramadas a partir de MEF/CITED2-GFP, foram denominadas iPS.Cited2 e as iPS potenciais originadas a partir de células controlo MEF/GFP, foram chamadas apenas iPS.

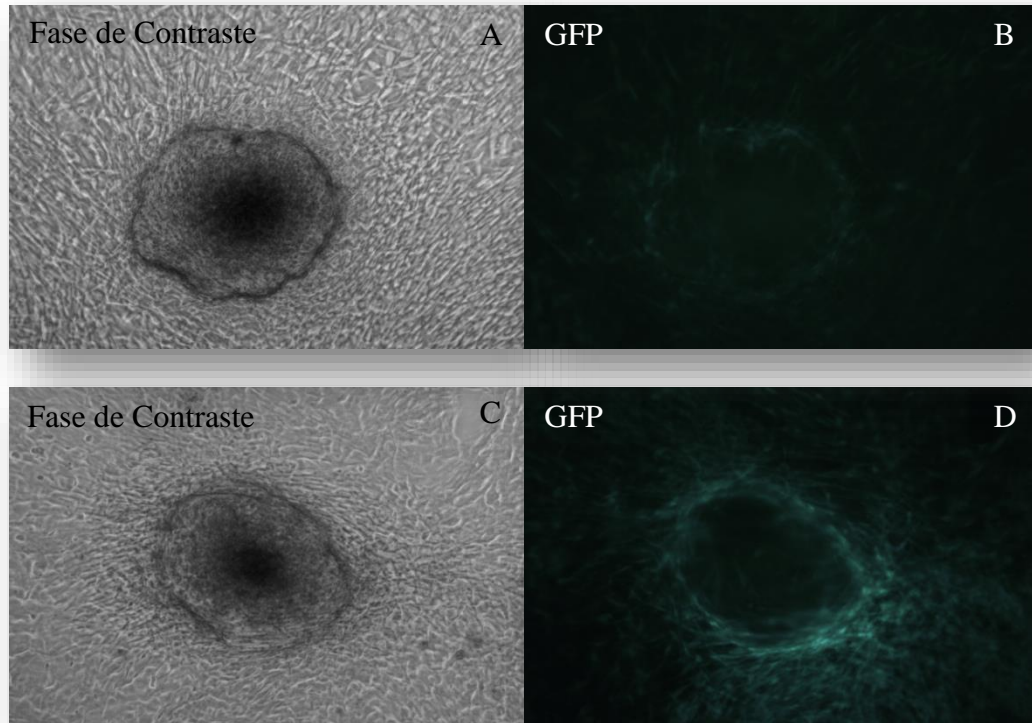


Figura 3.5 – Agregados celulares: A - Agregado celular contendo Cited2 exógeno com cerca de 23 dias, morfologia arredondada e bem defenida, B - a GFP começa a deixar de ser expressa no agregado celular, C - agregados de 23 dias sem Cited2 exógeno, morfologia arredondada e bem defenida, D – a GFP começa a deixar de ser expressa no agregado celular

A morfologia, o silenciamento dos genes expressos por retrovirus, e a auto-renovação das iPS.Cited2 e iPS controlo, são indicadores favoráveis do processo de reprogramação, no entanto para a caracterização completa destas iPS potenciais, é necessário avaliar a expressão de genes específicos da pluripotência, ou seja ver a expressão dos factores transcrição endógenos que confem a pluriptência, tal como Nanog, Oct4, Sox2 e Rex1. Para demonstrar o estado pluripotente destas células é ainda necessário mostrar a capacidade de diferenciação *in vitro* e *in vivo* das iPS potenciais, em células das três camadas germinativas.

Estes ensaios de caracterização, não foram realizados no seu completo, por causa de uma contaminação por micoplasma que surgiu e que nos obrigou a descartar estas células. No entanto, foi realizada uma qRT-PCR a partir de mRNA isolado de células

iPS.Cited2, iPS controlo e MEF em passagem para verificar a expressão de genes chave envolvidos na pluripotência das células estaminais embrionárias tal como Nanog, Oct4, Sox2 e Rex1 (Gráfico 3.1). Observou-se um aumento da expressão destes genes nos dois clones iPS.CITED2#1 e iPS.CITED2#6 em comparação com as MEF, sendo o nível de expressão comparáveis aos níveis de expressão das células estaminais embrionárias (resultados não apresentados). Nos clones iPS#2 e iPS#4 controlo, a expressão de mRNA de Nanog não foi detectada e expressão de Sox2 e sobretudo Oct4 foi muito abaixo do esperado. No entanto, a expressão de Rex1 nos clones iPS#2 e iPS#4 foi detectada em níveis comparáveis aos das iPS.CITED2#1 e iPS.CITED2#6. Estes resultados sugerem que a reprogramação a partir de MEF CITED2 sobre-expressando origina iPS potenciais de melhor qualidade e de modo mais robusto. As células iPS potenciais originadas a partir de MEF sem CITED2 exógeno, nas nossas condições, mostram que o processo é mais difícil e que as colónias são provavelmente formadas por células que não chegaram a uma reprogramação correcta.

Embora estes resultados mostrem um benefício de CITED2 exógeno na robustez da reprogramação, salientamos que estes resultados são preliminares e com apenas duas amostras de cada tipo de iPS. Será necessário confirmar estes resultados por outras reprogramações independentes, e confirmar o potencial de diferenciação destas células em futuros ensaios.

Não se pode obter muitos mais resultados das MEF's P2 reprogramadas, à excepção de um qRT-PCR que será exposto na secção 3.3.1, devido a que estas células apareceram com uma contaminação de Mycoplasma, após terem sido picados os agregados celulares e separados individualmente de modo a se proceder á sua expansão.

3.1.2 -Reprogramação das MEF's em P4

Após as células serem infectadas com os dois primeiros plasmídeos, um com que se tem a sobreexpressão do Cited2 com GFP, e o outro apenas contendo GFP que serviu como controlo da experiência, é preciso esperar um tempo de cerca de 2 dias, para o aparecimento da GFP nas células, mas no caso das MEF's em P4 isso não acontece, a GFP só começa a ser visível ao terceiro dia, mas só ao quarto dia é possível tanto em

MEF's contendo o plasmídeo com o factor de transcrição - Cited2 (Krk1), como o nosso plasmídeo controlo (LZRS), uma visualização perfeita e intensa da GFP, isto deve-se às MEF's em P4 estarem a entrar num ciclo de senescência, em que os processos de transcrição começam a ser mais lentos, porque os mecanismos celulares começam a sofrer alterações.

Mas como se pode visualizar na figura 3.6, tanto em MEF's com a sobreexpressão do cited 2, como no nosso controlo, a infecção parece ter corrido bem, observando-se uma expressão de GFP forte. Contudo nota-se que a expressão da GFP é mais visível

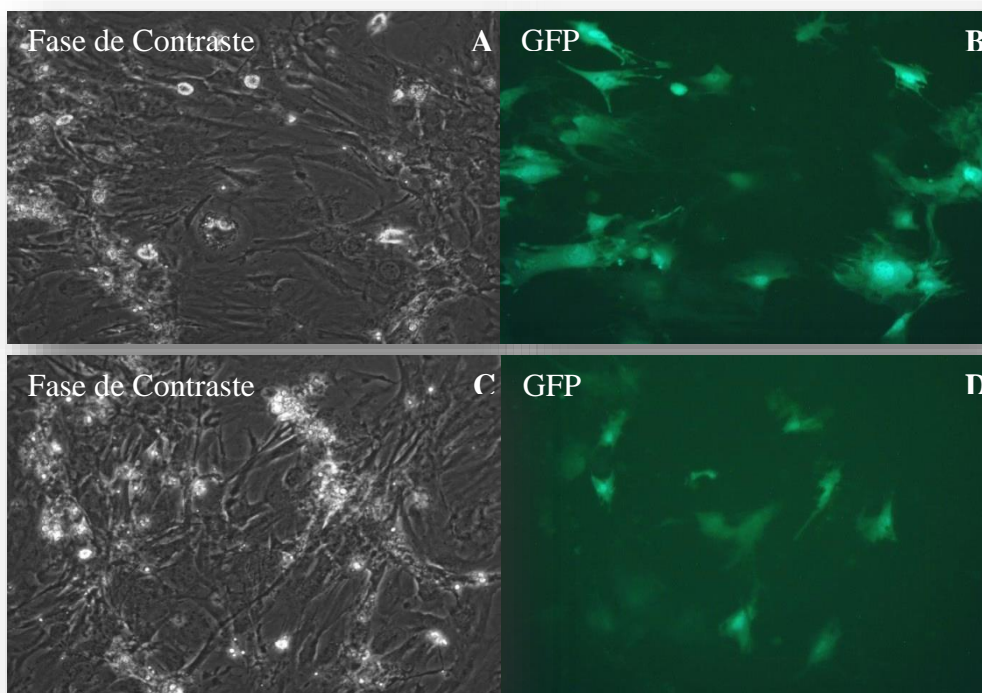


Figura 3.6- MEF's infectadas após 4 dias: A e B MEF's com sobreexpressão do Cited2, C e D MEF's sem Cited2 exogeno

nas MEF's que contêm Cited 2 exogeno, do que o nosso controlo, isto porque o Cited2 tem a função de induzir a proliferação das células (Kranz et al, 2003), o que faz com que as MEF's retardem a fase de senescência que estas estão a sofrer.

Após o período do aparecimento da GFP as nossas células foram infectadas através de um lentivírus que continha os quatro factores de Yamanaka, havendo um período de tratamento com doxiciclina que nos permite activar o mecanismo de transcrição deste plasmídeo (Capítulo 1 – Fig. 1.5). A partir do momento em que se começa a tratar as MEF's com doxiciclina (Capítulo 2 – secção 2.3) o processo de

reprogramação tem o seu início. Inicialmente estar-se-ia á espera que os agregados de células começassem a aparecer dentro de um período entre os 10-12 dias, a contar após a primeira aplicação de doxociclina nas MEF's, ou seja, no limiar do fim do tratamento de doxociclina (12 dias), no entanto não foi isso que se registou, começaram a se formar agregados celulares no dia 6 do processo de reprogramação tanto nas que tinham sobreexpressão do Cited2 como no nosso controlo (fig. 3.7 – A,B e 3.8 – A,B). Não tendo acontecido em todas as experiências realizadas, nas primeiras tentativas de reprogramação as células controlo tiveram dificuldade em formar agregados celulares, estes só começaram a ter tamanhos significativos ao dia 23 (fig. 3.8 - C), tendo alguns deles uma forma arredondada não muito definida, não se assemelhando muito a agregados celulares de iPS.

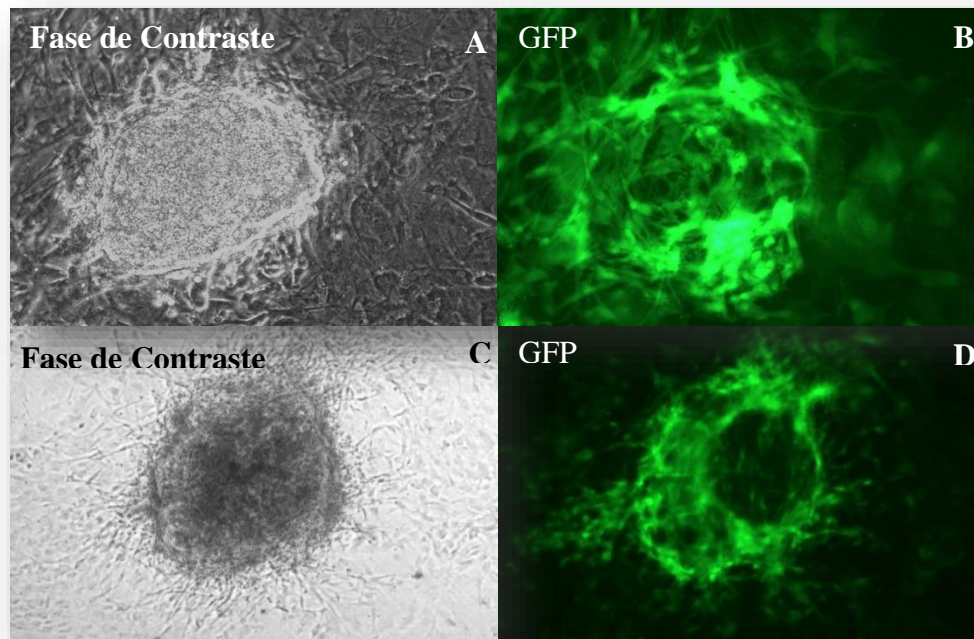


Figura 3.7 – Agregados celulares nas MEFs com Cited 2: A e B – Agregado celular com cerca de 10 dias com morfologia arredondada e bem defenida, em B pode-se visualizar que ainda mantem em todo o agregado intensa expressão de GFP. C e D agregado celular com 13 dias. C – a morfologia do agregado é arredondado e bem defenido, em que em D se nota que o sinal da GFP começa a diminuir no centro, indicador de que estas células estão a se reprograma

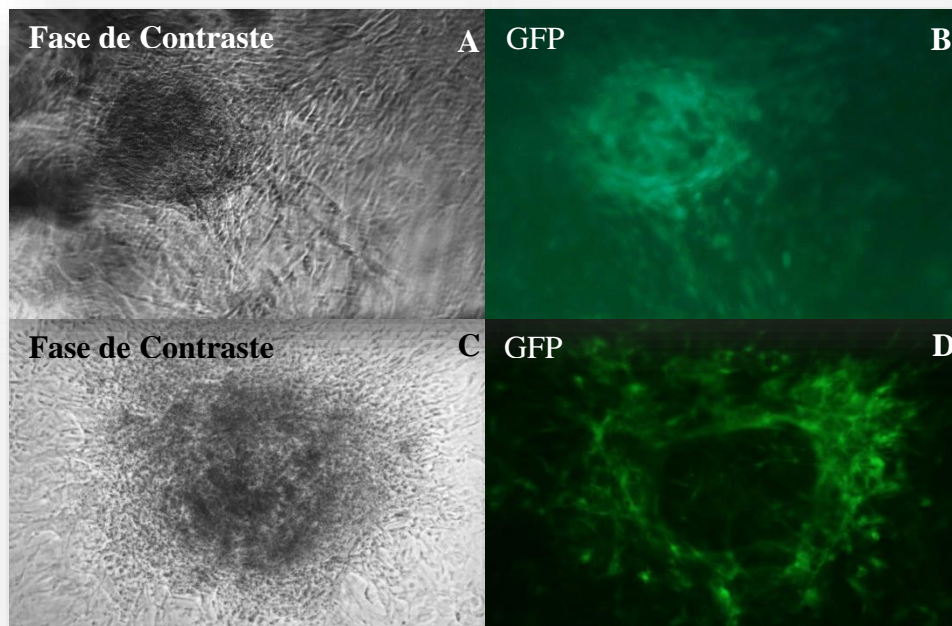


Figura 3.8 – Agregados celulares das MEF's sem Cited2 exógeno: A e B - Agregado celular com cerca de 10 dias com morfologia arredondada e bem definida, B - visualiza-se que todo o agregado celular mantém intensa expressão de GFP. C e D são agregados de 23 dias, C - a morfologia arredondada não bem definida, D – a GFP começa a deixar de ser expressa no agregado celular.

Este fenómeno pode ser devido a que reprogramar células em senescência apenas com os 4 factores – Sox2, Oct4, Klf4 e cMyc – seja não só um processo mais demorado, em termos do aparecimento de agregados como na apresentação da forma e tamanho dos mesmos. Isto porque, com o passar do tempo a GFP que se visualiza nestas células começa a desaparecer, em ambas, nas que sobreexpressão Cited2 e no nosso controlo. Levando a pensar que estas células controlo tenham á mesma sido reprogramadas, devido ao desaparecimento da GFP nos agregados, que é uma indicação de que as células começam a passar para uma nova fase, havendo o silenciamento do retrovírus, quando existe a transição de células somáticas neste caso para iPS, mas no controlo não se encontram completamente reprogramadas, ficando-se pelo meio do processo de reprogramação num estadio intermédio, ou pela forma que apresentam terem-se tornado Células Estaminais Epiblasticas (EPisC), que são células derivadas do blastocisto, de um estado mais avançado do blastocisto.

3.2 – Agregados Celulares: Expansão e sua morfologia após picagem

Alguns dos agregados celulares sofreram um processo de picagem (Capítulo 2 – secção 2.4) e transferidos para placas de cultura de tecidos de 6 poços, com uma camada de MEF's inactivadas que servirão de camada suporte para que as células dos agregados celulares que foram desfeitos proliferem. Este é um dos primeiros testes de análise que nos indicará se as células que obtemos têm capacidade de formar novos agregados celulares após serem desfeitos manter a sua capacidade de proliferação.

Os agregados celulares foram picados a diferentes dias consoante o aparecimento dos agregados celulares, nas várias experiências realizadas. Sendo assim as colónias foram picadas em dois tempos diferentes para ambos os casos. Ao dia 13 e ao dia 26, isto de maneira a tentar se provar que poderia ser possível obter agregados celulares mais cedo, e que estes agregados celulares teriam a potencialidade de progredir pra células iPS, mesmo não cumprindo o tempo estipulado numa reprogramação mais tradicional apenas com os 4 factores de yamanaka. Notando-se algumas diferenças entre MEF's controlo e as Mef's com o Cited2.

As células que obtemos das MEF's que tinham sobreexpressão de Cited2 após uma semana do processo de picagem começaram a formar novos agregados celulares (fig. 3.9 - A), com uma morfologia arredondada, tanto as que foram picadas no dia 13 como no dia 26. Após 2 semanas das células terem sido tripsinizadas varias vezes devido á sua confluência, começam a se poder chamar de colónias, devido a que se conseguirem expandir de forma bastante boa e conseguem manter essa expansão ao longo do tempo não perdendo a sua capacidade de proliferação, mantendo á mesma a forma redonda e bem definida característica de células iPS (fig. 3.9 – B)

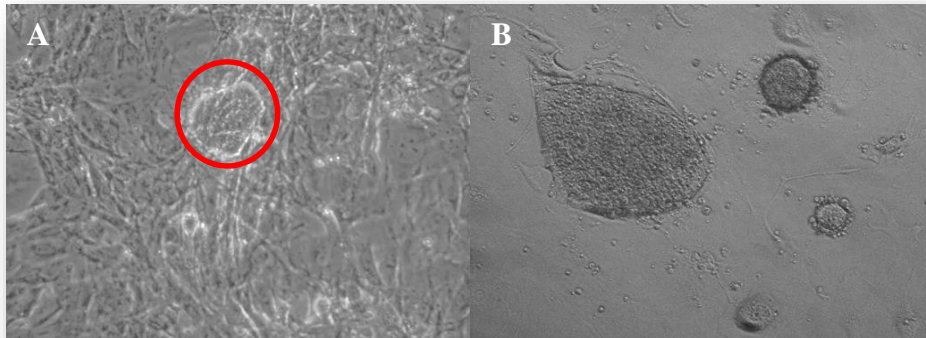


Figura 3.9 – Colonias de possíveis iPS de MEF'ssobreexpressando o Cited2: A - possível colonia de iPS com uma semana após o processo de picagem; B- Colonia provável de iPS com duas semanas, após o processo de picagem.

Nas MEF's de controlo, detectaram-se diferenças entre as experiencias, na experiencia em que a sua formação de agregados foi semelhante ao do dia 13 existiram certas dificuldades em alguns dos agregados celulares picados, principalmente os que começaram a surgir mais tarde, ao dia 23 como expliquei anteriormente (Capitulo 3 - secção 3.1). Ouve dificuldade em conseguir que estas células se proliferassem (fig. 3.10 – A, B), tendo que se aplicar um tratamento diferente a estas células, porque surgiram dúvidas se não poderiam ser agregados celulares de EpiSC, em vez de serem agregados celulares de iPS, visto que formavam agregados mas com alguma dificuldade. Para se tirar esta dúvida aplicou-se no meio que já continha LIF, mais um composto, factor de crescimento de fibroblastos (FGF). Este factor é principalmente utilizado em culturas para produzir EpiSC, sendo um factor dependente para a sua manutenção tanto para manter a sua proliferação e para que não haja diferenciação destas.

Após esse tratamento nos agregados celulares das MEF's controlo, durante duas semanas, foi possível aumentar a taxa de proliferação e obter agregados com formas mais arredondadas (fig. 3.10 C). Quando o tratamento terminou os agregados celulares já tinham uma aparência semelhante ás colonias das MEF's com sobreexpressão de Cited2 tanto picadas ao dia 26 como ao dia 13 e semelhantes também ás MEF's controlo que foram picadas ao dia 13.

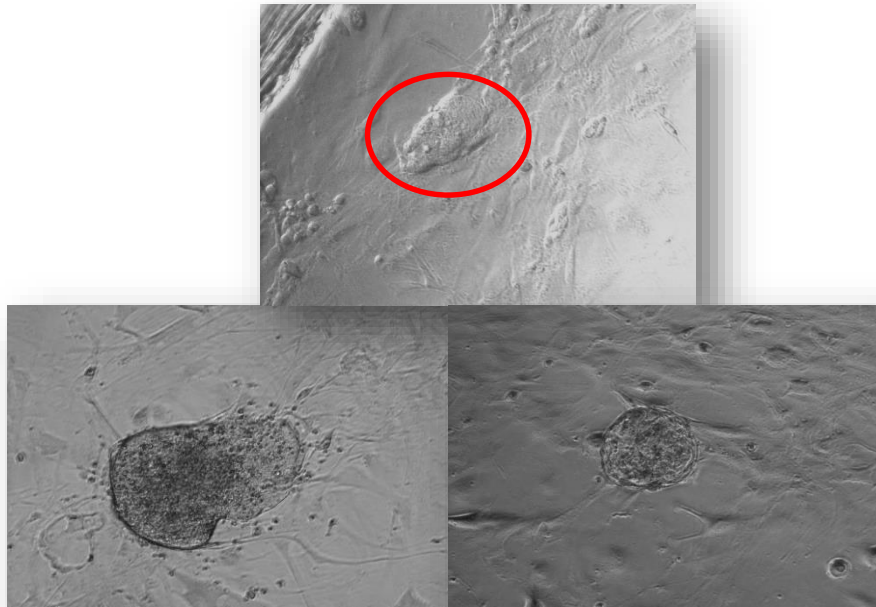


Figura 3.10 – Agregados celulares de MEF's sem Cited2 exógeno. A e B – antes do tratamento com FGF contem uma morfologia diferente das nossas colónias obtidas quer em P2 como em P4; C – depois do tratamento com FGF pode-se ver que a morfologia circular se encontra bem defenida.

3.3 -qRT-PCR

Por consequente, extracção de ARN das possíveis colónias das MEF's P2 e P4 e amplificação deste em ADNc, foi-se analisar através de RT-PCR a amplificação de marcadores de pluripotencia, Nanog, Sox2, Oct4 e Rex1 nas MEF's em P2 e nas MEF's P4 o Tbx3, o Nodal, o FGF5 e incluindo os anteriores marcadores, utilizando ainda o GADPH que servirá como normalizador, de modo a se determinar se existe alterações de expressão em relação às MEF's antes de estas terem sido sujeitas á reprogramação.

Com os dados obtidos através deste método poderemos chegar mais próximos se as nossas possíveis colonias poderão ser ou não iPS.

Antes de entrar no assunto propriamente dito, só puderam ser testadas algumas das colónias, não podendo apresentar muitas mais dados deste trabalho em termos de RT-PCR de todas as colonias que obtemos devido a que a maioria das nossas colónias terem sido contaminadas por *Mycoplasma*, e como se sabe este parasita que se encontra entre

um fungo e uma bactéria, é relativamente difícil de se eliminar, provocando alterações fisiológicas das células que infecta (Young L, 2010).

3.3.1 – qRT-PCR das colónias de MEF's em P2

Das colónias obtidas foram analisadas duas das MEF's controlo e duas das MEF's com sobreexpressão de Cited2 e comparados com as MEF's em P2 antes de se ter procedido ao processo de reprogramação. Foras feita então a quantificação dos níveis de expressão dos marcadores de pluripotencia de celulas iPS,

Podendo se ver no gráfico 3.1, as colónias iPS.Cited2.6 e as iPS.Cited2.1 demonstram ter níveis de expressão de Nanog, Sox2, Oct4 e Rex1. Apesar de entre estas duas colónias existem diferenças entre os seus níveis de expressão, de cerca de duas vezes mais para os marcadores Sox2, Oct4 e Rex1 e de 3 vezes mais para o marcador de Nanog. Mesmo assim podemos dizer que foi possível reprogramar porque todos os marcadores de pluripotência foram expressos.

Nas iPS sem Cited 2 exógeno, não parece existir expressão de Nanog e OCT4, contendo apenas expressão de Sox2 e Rex1, havendo ligeiras diferenças de expressão, no marcador para o Sox2 a iPS4 tem mais expressão que a iPS2, sendo ao contrario quando olhamos para o OCT4. Se comparar mos os valores entre as iPS controlo e as iPS com sobreexpressão de Cited2 os valores não são tão significativos o que dá uma visão de que o Cited2 de alguma forma consegue aumentar significativamente os valores deos marcadores de pluripotencia. Não havendo expressão de dois dos marcadores, não poderemos considerar que são realmente iPS, mesmo estas tendo uma boa proliferação e formarem colónias semelhantes a de iPS.

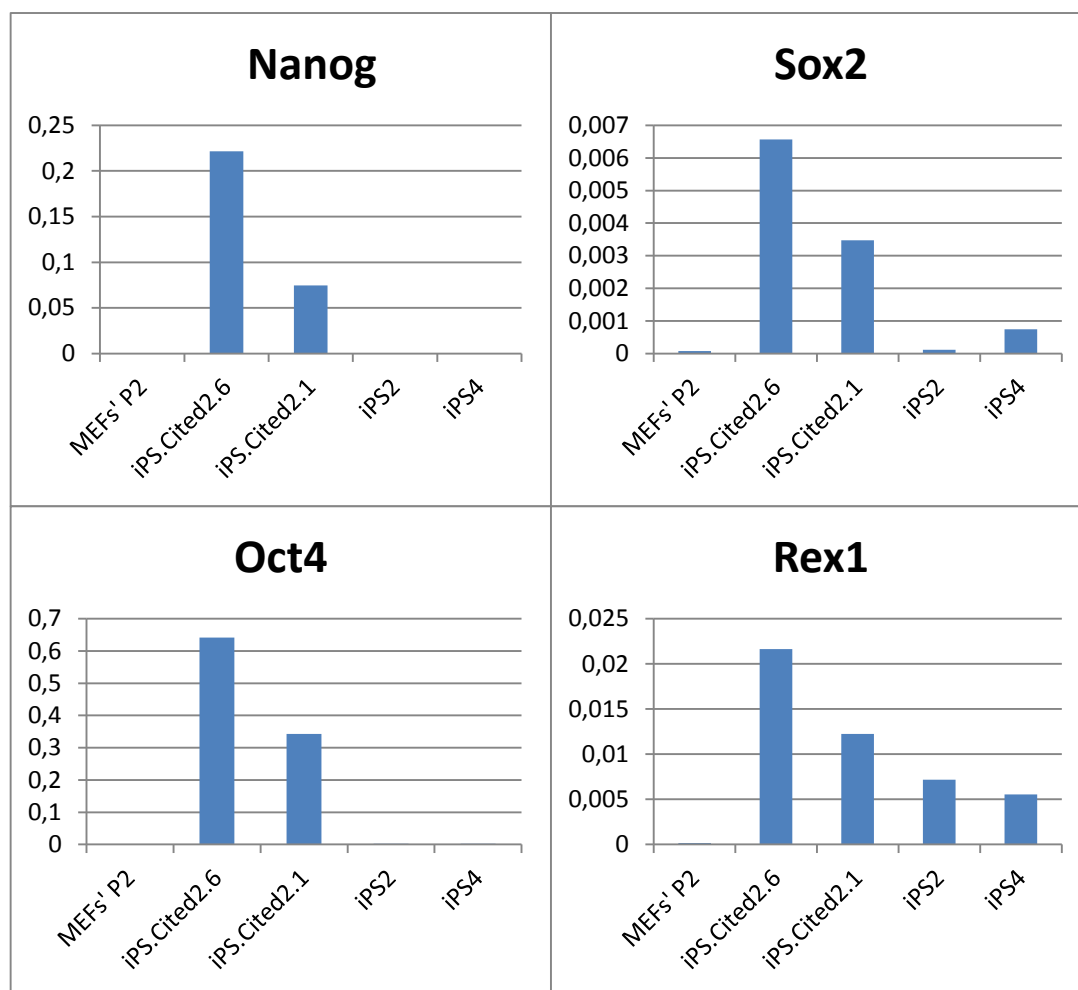


Grafico3.1 - A expressão de marcadores de pluripotência em colônias de MEF's P2. Níveis de transcrição de marcadores de pluripotência (Nanog, Oct4, Sox2, Rex1) foram detectados por qRT-PCR dois representantes de iPS sem cited2 exogeno (o iPS2 e iPS3) e dois representantes reprogramadas iPS com expressão exógena Cited2 (iPS.CITED2.1 e iPS . CITED2.3). A expressão destes genes em MEF's P2 também foi representada. A expressão de cada marcador foi normalizado para a expressão GAPDH. Para cada gene, os valores são expressos relativamente ao valor da sua expressão em MEFs P2.

3.4 - qRT-PCR das colônias de iPS e EpiSC em MEF's em P4

A expressão de cada gene foi feita individualmente para cada colônia de iPS produzidas em MEF's P4.

As iPS que contêm Cited 2 exógeno, expressão valores dos 4 genes de pluripotencia existentes em ESC como se ver no gráfico 3.1, tendo valores de expressão bastante semelhantes entre si, apesar de terem sido de terem-se formado 3 agregados celulares diferentes.

As iPS sem Cited2 exógeno, têm valores discrepantes de colônia para colônia. Tanto a iPS2 como a iPS4 não apresentam expressão em relação ao controlo, MEF's P4, do gene Sox2, podendo afirmar que possivelmente estas duas colônias não são

verdadeiras iPS. A iPS3 e iPS 6 demonstram terem todos os genes de pluripotencia sendo expressos e a valores bastante similares em relação tanto às ESC, como as colonias iPS.Cited2.

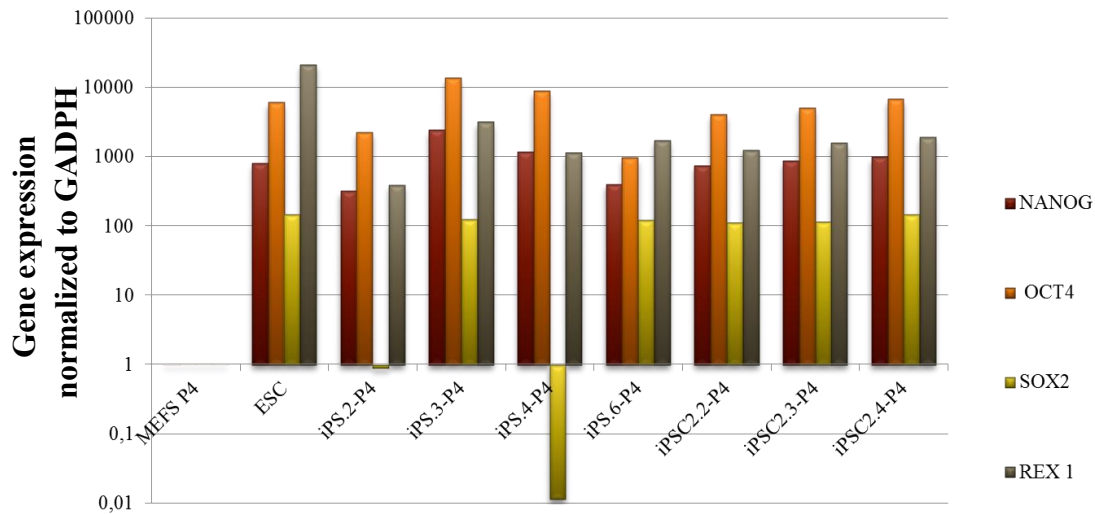


Gráfico3.2- A expressão de marcadores de pluripotência em colonias MEF's P4. Níveis de transcrição de marcadores de pluripotência (Nanog, Oct4, Sox2, Rex1) foram detectados por qRT-PCR quatro representativos de iPS sem cited2 exógeno (o iPS2, iPS3, iPS4 e iPS6) e tres representantes reprogramadas iPS com expressão exógena Cited2 (iPS.CITED2.1,iPS. CITED2.3e iPS. CITED2.4) picadas ao dia 23. A expressão destes genes em MEF's P4 e ESC também foi representada. A expressão de cada marcador foi normalizado para a expressão GADPH. Para cada gene, os valores são expressos relativamente ao valor da sua expressão em MEFs P4.

Em relação á comparação entre os níveis de expressão entre as iPS2,3 e 4 com as EPIS2,3, 4, que provem dos mesmos agregados celulares respectivamente só que as EPIS foram tradas com adição suplementar de FGF, foram testados os 4 genes de pluripotencia presentes em ESC e outros 3 genes que têm maiores níveis de expressão EpiSC – Tbx3, o Fgf5 e Nodal.

As EPIS apresentam valores que deviam de estar mais expressos que nas iPS, mas que se encontram mais baixos e em diferentes EPIS podemos ver que até não exprimem alguns dos factores de EpiSC (gráf. 3.3).

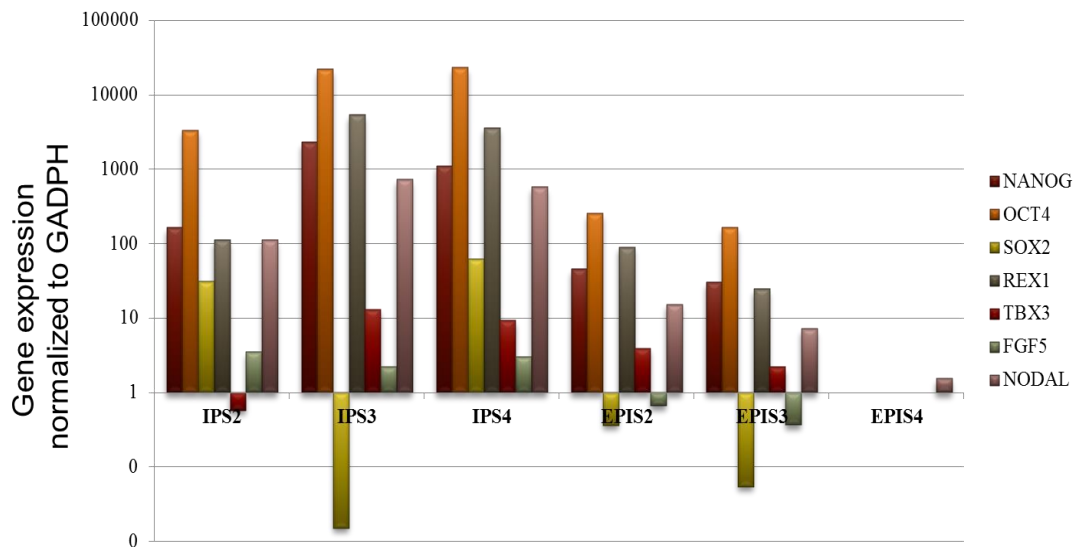


Gráfico 3.3 - A expressão de marcadores de pluripotência em colônias de MEF's P4. Níveis de transcrição de marcadores de pluripotência (Nanog, Oct4, Sox2, Rex1, Tbx3, FGF5 e Nodal) foram detectados por qRT-PCR tres representativos de iPS sem cited2 exogeno (o PI2, iPS3 e iPS\$) e três representantes reprogramadas EpiSC sem expressão exógena Cited2 (EPIS2, EPIS3 e EPIS4).. A expressão de cada marcador foi normalizado para a expressão GADPH. Para cada gene, os valores são expressos relativamente ao valor da sua expressão em MEFs P4

3.6 - Corpos embrionários

Os Corpos embrióides (EB's) são agregados tridimensionais das células estaminais pluripotentes tendo estes a capacidade de sofrer diferenciação celular e especificação ao longo das três linhagens germinativas - endoderme, ectoderme, mesoderme e -. que compreendem todos os tipos de células somáticas.

O processo de formação de EB's, explicito no Capítulo 2 – secção 2.10, foi feito para podermos compreender se as nossas iPS teriam a capacidade de formar estes agregados tridimensionais de células para consequente se poder analisar através de qRT-PCR se teriam marcadores das três camadas germinativas.

Enquanto se fazia este processo de criação de EB's através das nossas iPS existiram alguns contratempos, os corpos tridimensionais que inicialmente se conseguiram formar não eram esféricos, nem se conseguia obter agregados consistentes (fig. 3.11). A inicial ideia era que não se tinha colocado o número suficiente de células por gota, então testaram-se três condições: 500 células/gota (fig. 3.11 A, 1000

celulas/gota (fig. 3.11B) e 2000 celulas/gota (fig. 3.11 C), sem nenhuma destas condições dar resultados, o mais próximo que se chegou foi na condição de 1000 celulas/gota.

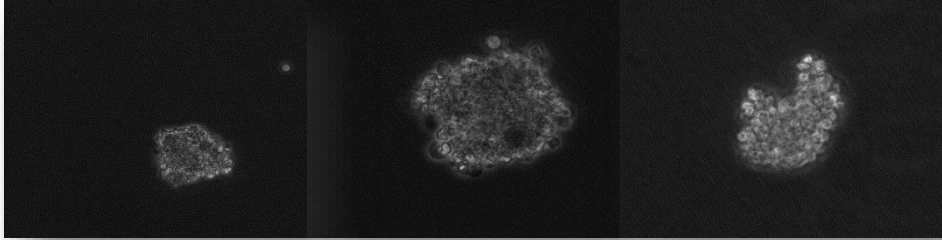


Figura 3.11 – Corpos embrionários obtidos com diferentes concentrações de células por gota. A- 500 células por gota; B- 1000 células por gota ; C – 2000 células por gota; com soro inativado.

Após se ter revisto o método de formação de EB's pensou-se que estava-se a utilizar o mesmo soro (inativado) que se usava para manter as iPS em cultura e sendo inativado, não teria a mesma capacidade de sustentar as células em cultura que teria um soro não inativado. Então decidiu-se utilizar soro sem estar inativado, ou seja, exactamente da mesma maneira que se faria se estivéssemos a tentar diferenciar células estaminais, e visto que a melhor condição que se obteve nas experiências anteriores referidas, fora a de 1000 células/gota, utilizar apenas essa condição e verificar se seria possível obter corpos tridimensionais perfeitos.

Após repetir-se o processo conseguiu-se obter tanto para as iPS sem Cited2 exógeno como para as iPS com Cited2 sobreexpresso, EB's perfeitos (fig.3.12)

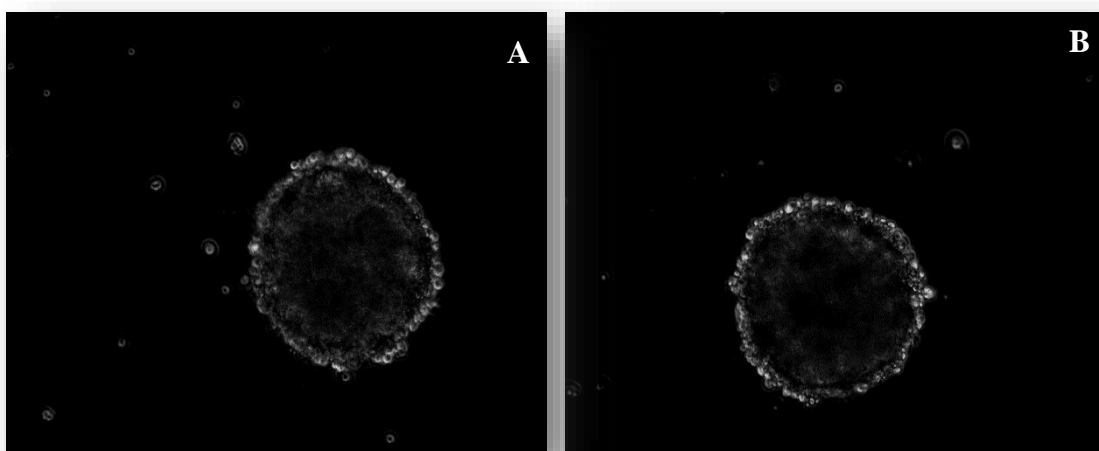


Figura 3.12– Corpos embrionários obtidos através de 1000 células/gota com soro não inativado. A- iPS com Cited 2 exógeno; B- iPS sem cited exógeno; 3º dia, encontram-se em placas de cultura revestidas com gelatina

Analisou-se ainda por microscopia os EB's, devendo-se a que se continham o plasmídeo inserido e mostravam fluorescência devido á GFP que se encontrava em ambos os plasmídeos, KRK1 e LZRS, antes de serem reprogramadas as MEF's, sendo ele um retrovírus, quando estes agregados celulares se começam a diferenciar ele é de novo activo podendo se ver GFP, quando são mudadas para placas com base de gelatina ao dia 2 (fig. 3.13).

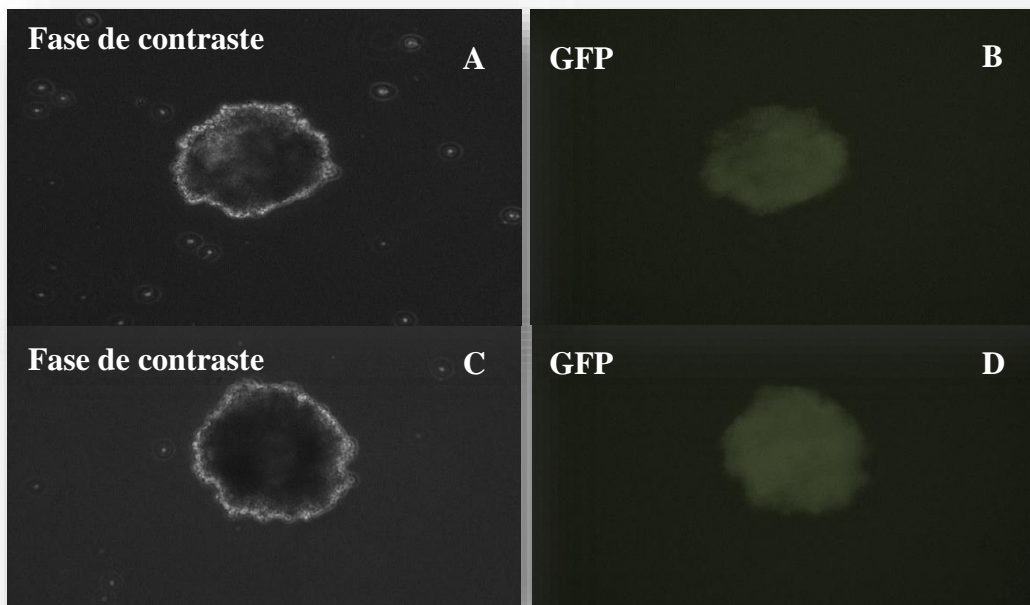


Figura 3.13 – Corpos embrionários ao 2º dia apos sua formação. A – de iPS com Cited2 exógeno B – fluorescência da imagem A. C- de iPS sem Cited2 exogeno. D – fluorescência da célula apresentada em C.

3.7 - qRT-PCR dos EB's

Foram usados marcadores de diferenciação correspondentes às três camadas germinativas: Mesoderme (Mesp1, Brachyury), Endoderme (FoxA2, AFP) e Ectoderme (Pax6, Nestin), e feitos os qRT-PCR para estes marcadores ao dia 0, antes da diferenciação e ao dia 5 de diferenciação das nossas células em questão.

A nível da camada germinativa da Mesoderme, no marcador Brachyuy ao dia 0, antes do início da diferenciação, os níveis de valores são quase zero, assim como em Mesp1, e ao dia 5 pode-se ver que as iPS e as iPSC.Cited2 apresentam valores significativos que nos indicam que estas células têm capacidade de originar a camada germinativa Mesoderme. (graf. 3.4)

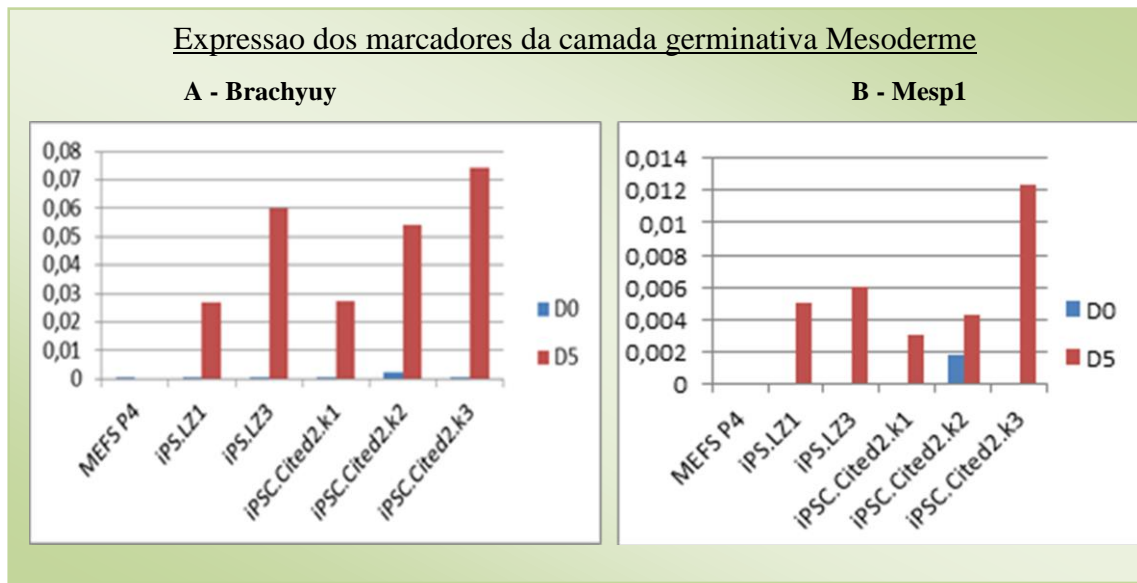


Grafico 3.4 - A expressão de marcadores de diferenciação nos EB's. Níveis de transcrição de marcadores de diferenciação da camada germinativa da Mesoderme, A-Brachyury e B-Mesp1. A expressão de cada marcador foi normalizado para a expressão GADPH. Para cada gene, os valores são expressos relativamente ao valor da sua expressão em MEFs P4, tendo como momentos de análise o dia 0 antes do processo de diferenciação e dia 5 após o início do processo da reprogramação.

Quando analisamos os valores dos marcadores da camada germinativa mesoderme, existe alguma expressão do marcador FoxA2 ao dia 0, o que nos pode indicar que existe a possibilidade de que estas células sem activarmos o processo de diferenciação já podem estar com um caminho de diferenciação para a Mesoderme, apesar de que na expressão do marcador AFP também para a mesoderme, não existe qualquer expressão ao dia 0 nas nossas iPS. Ao dia 5 os valores para FoxA2 são muito superiores, menos numa das células, iPS.Cited2.k2, em que parece que não exista diferença ao nível da expressão em relação com o dia 0. AFP ao dia 5 apresenta expressão mais elevada nas iPS.LZ1, iPS.LZ3 e iPSC.Cited2.k3. (graf.3.5).

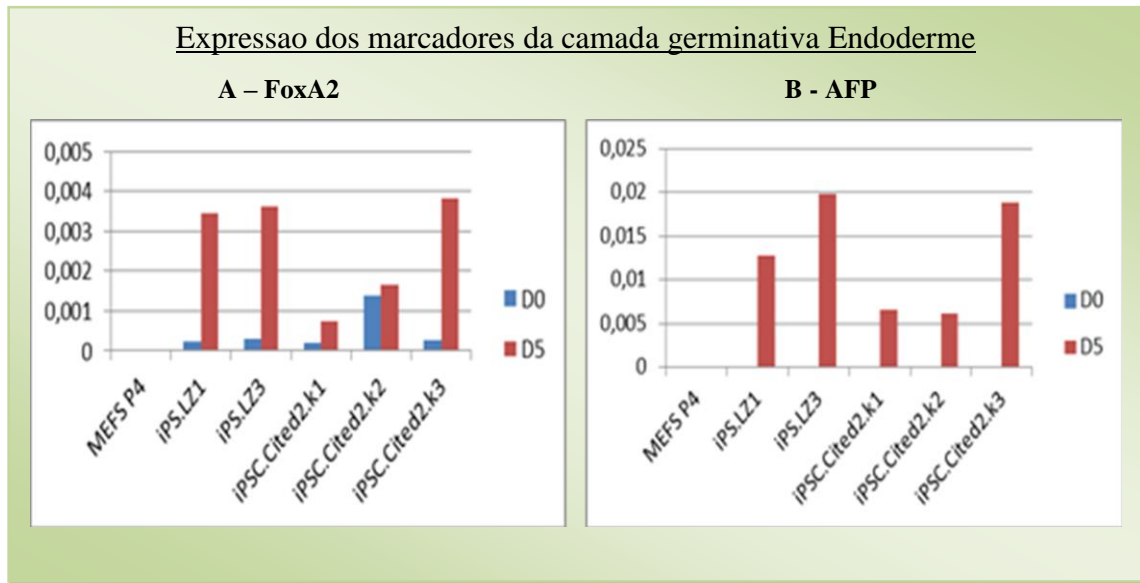


Grafico 3.5 - A expressão de marcadores de diferenciação nos EB's.Níveis de transcrição de marcadores de diferenciação da camada germinativa da Endoderme A-FoxA2, B-AFP. A expressão de cada marcador foi normalizado para a expressão GADPH. Para cada gene, os valores são expressos relativamente ao valor da sua expressão em MEFs P4, tendo como momentos de análise o dia 0 antes do processo de diferenciação e dia 5 após o início do processo da reprogramação.

Em relação á expressão dos marcadores da camada germinativa Ectoderme Nestin apresenta valores em todas as células, Mefs P4, iPS e iPSC.Cited2. podendo-se ver que apenas a iPSC.Cited2.K3 ao dia 5 apresentam valores mais elevados em relação as Mefs P4. (graf.3.6)

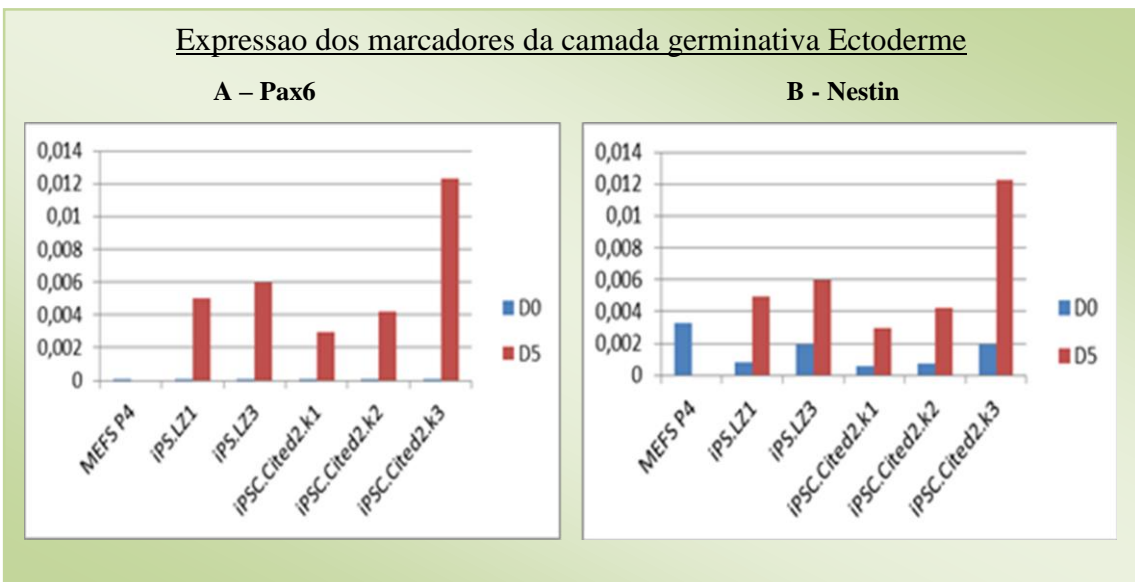


Grafico 3.6 - A expressão de marcadores de diferenciação nos EB's.Níveis de transcrição de marcadores de diferenciação da camada germinativa da Ectoderme A- Pax6, B- Nestin. A expressão de cada marcador foi normalizado para a expressão GADPH. Para cada gene, os valores são expressos relativamente ao valor da sua expressão em MEFs P4, tendo como momentos de análise o dia 0 antes do processo de diferenciação e dia 5 após o início do processo da reprogramação.

Analisando os resultados dos gráficos 3.4, 3.5 e 3.6 podemos concluir que ambas as colónias obtidas têm capacidade de dar origem às três camadas germinativas, mas

que obtemos uma colónia, que se destaca na expressão dos marcadores das três camadas com valores mais elevados, a iPSC.Cited2.k3, ou seja, estes resultados, apesar de nos indicar que fomos capazes de reprogramar as células de modo a terem capacidade de pluripotência, podemos ainda concluir que pelo menos uma das 3 colónias com sobre expressão de Cited2 tem valores elevados de expressão dos marcadores para as três camadas germinativas.

3.8 - Reprogramação das UC-MS

Na reprogramação das UC-MS, já não temos que ter cuidado com a senescência, estas células podem ser infectadas em qualquer passagem.

A morfologia destas células quando têm espaço para expandir é muito semelhante às MEF's (fig.3.14).

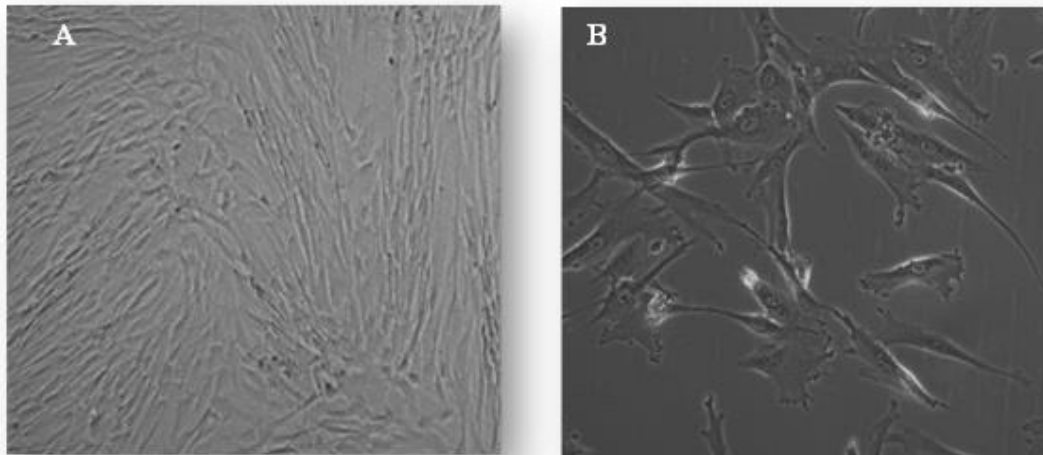


Figura 3.14 – UC-MS- antes do processo de de infecção. A- morfologia quando se encontram confluentes; B- Morfologia quando estas têm espaço na placa para se dividirem

Estas células devido a serem de origem humana, teve-se que produzir lentivírus devido que o risco de usar os retrovírus seria grande. Sendo assim produziram-se lentivírus para expressar Cited2 exógeno nas células e outro que não expressa-se mas que servisse de controlo - respectivamente CP1C2 e CP1 (Capítulo 2 – secção 2.2.3).

As células infectadas com os lentivirus 4F2A e pHAGE-Tet-STEMCCA foram simultaneamente infectadas com 50ul de lentivirus M2rtTA e estimuladas durante 10 dias

com doxociclina a uma concentração final de 1µg/ml. Nestas condições, a multiplicidade de infecção (m.o.i.) foi de 0.1 para os lentivirus 4F2A e pHAGE-E1Falpa-STEMCCA, ou seja que estatisticamente apenas 1 célula em 10 será infectada com estes lentivirus. A m.o.i foi de 1 para as células infectadas com os vírus derivados de pHAGE-Tet-STEMCCA.

Após infectadas com lentivírus, esperou-se 3 dias para se poder visualizar expressão de GFP, é de salientar que devido a terem sido infectadas com lentivírus, será menor tanto o número de células infectadas como a expressão de fluorescência (fig 3.15, B,D). Havendo mais expressão nas células com Cited2 sobreexpresso (fig.3.15 B)

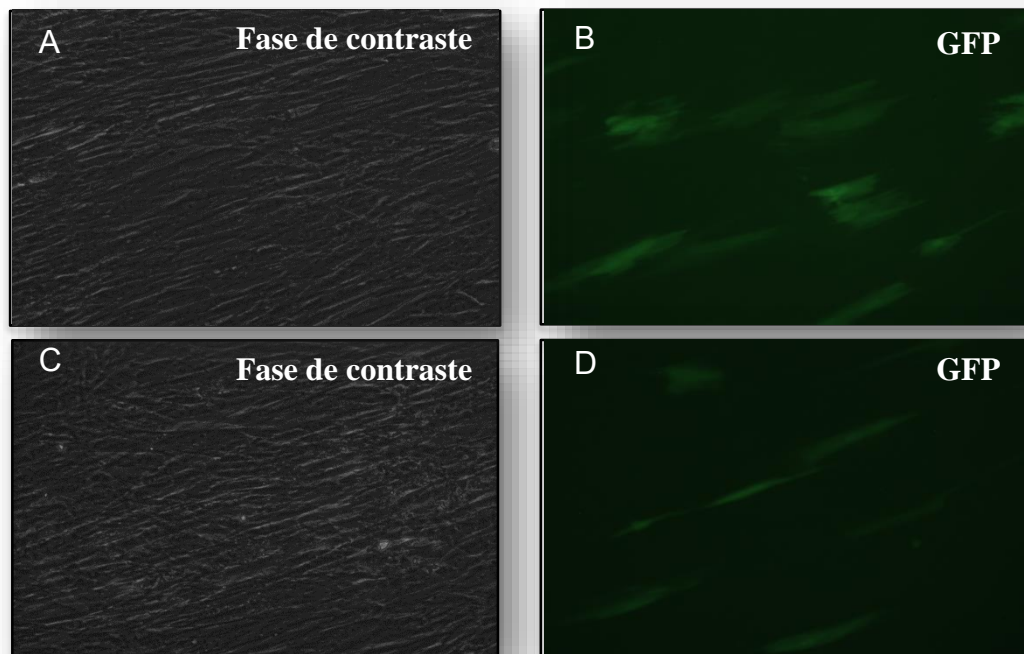


Figura 3.15 – UC-MSCs infectadas com lentivírus. A,B – células com cited2 exogeno, podendo em B ver-se a GFP, C,D- sem cited2 exogeno, em D apresenta a GFP das células apresentadas em C.

Ao sexto dia após a inserção dos 4 factores de Yamanaka e o início do tratamento com doxociclina, assim como tinha acontecido nas MEF's foi possível visualizar o aparecimento de agregados de colónias nas UC-hMSC com do Cited2 exógeno (fig. 3.16).

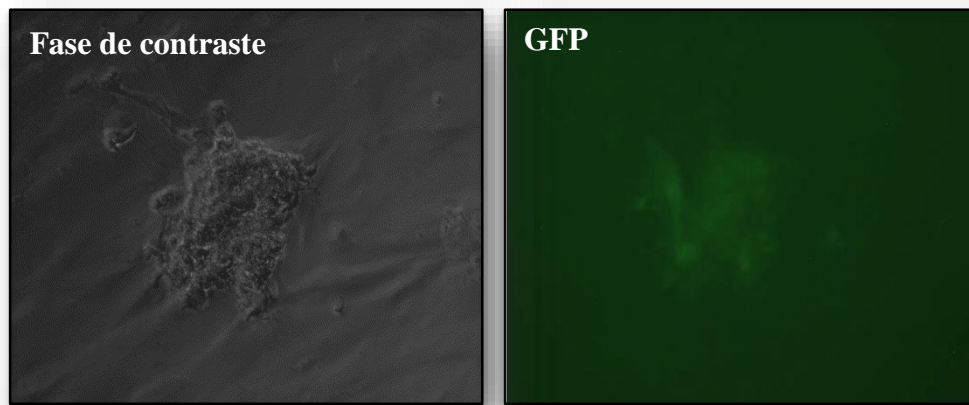


Figura 3.16 – Agregado celular em UC-hMSC com sobreexpressão de Cited2

CAPITULO 4 – Discussão

O processo de reprogramação de células somáticas em iPS ainda tem diversos problemas que necessitam de ser resolvidos, principalmente é ainda um processo demorado. (*O'Malley J, 2013*)

Com o Cited2 pretendia-se que este tivesse alguma alteração no processo de reprogramação das MEF's, principalmente sendo este um ativador da proliferação celular (*Tien ES, 2004*). Na tabela 3.1 é demonstrado essa capacidade de na reprogramação acelerar a formação dos agregados celulares, ao 6º dia pode-se ver que a quantidade de agregados é bastante mais elevada em relação as MEF's P2 sem Cited2 exógeno.

Nas MEF's P4, células que se encontram num estado de entrada em senescência, o Cited2, parece demonstrar diferenças entre MEF's com sobreexpressão de Cited2 e sem Cited2. Se visualizarmos a morfologia do tipo de colónias que se formam após serem picadas e passadas para placas de cultura com base de MEF's inativadas, estas têm não só mais dificuldade em proliferar e uma morfologia um pouco diferente das colónias tanto de MEF's em P2, com ou sem Cited2 exógeno, como nas MEF's P4 contendo Cited2 exógeno (Fig.3.8 e 3.9. Podendo se dever estas diferenças á senescência a que estas células se encontram ao estarem na passagem P4, *Kranc et al, em 2003*, provou que as MEF's quando se encontravam na entrada para a senescência, se tivessem expressão de Cited2, o seu estado de proliferação seria semelhante a passagens mais recentes (P1 ou P2), mas se não tivessem Cited2 o processo de proliferação começaria a ser mais lento e com uma baixa proliferação.

Pela observação da morfologia dos agregados celulares em MEF's P4 sem expressão de Cited2, propôs-se que seriam EpiSC (fig.3.8), conhecidas como células que se formam do Epiblasto, já com um grau de diferenciação um pouco mais avançado em relação ás iPS, sendo necessário para estas células se desenvolverem a adição de FGF no meio (*Brons,I.G., 2007*)

A observação morfológica dos agregados celulares não é suficiente para se demonstrar que estas, possam ser realmente iPS. Para tal é necessário ver o nível de expressão dos marcadores de pluripotência – Nanog, SOx2, Oct4 e Rex1 por qRT-PCR de modo a se perceber se estes estão presentes nas nossas células obtidas. *Boyer, LA em*

2005 sugeriu que em células estaminais embrionárias humanas, o Oct4, Sox2 e Nanog contribuem para a pluripotência e auto-renovação destas células. *Son M.Y., 2013*, propõe que as células estaminais humanas sem Rex1 perdem a sua capacidade de auto-renovação e potencial de diferenciação completa, especialmente o seu potencial na linhagem da mesoderme. Sabendo que são essenciais estar estes 4 factores presentes nas nossas iPS, analisou-se tanto as iPS com e Cited2 exógeno, tanto nas MEF's P2 como nem P4, através de qRT-PCR (graf. 3.1 e 3.2). Em MEF's P2 determinou-se que nas iPS.Cited2 existia transcrição dos 4 factores de pluripotencia (graf. 3.1), concluindo-se que se conseguiu reprogramar estas células mas em iPS não se obteve transcrição do Sox2, OCT4 e Nanog, mas não podemos determinar com certeza que não foi possível nas MEF's sem Cited sobreexpresso reprogramar para iPS, devido a não se ter podido testar mais colónias devido a uma infecção com *Mycoplasma*, que estas sofreram, assim como as colónias das MEF's P4. Nas iPS.Cited2 e nas iPS das MEF's P4 (graf. 3.2) consegui-se para ambos as colónias visualizar transcrição dos factores de pluripotência, principalmente nas colonias com Cited2 exógeno haver uma homogeneidade entre estas, e ter-se uma transcrição dos factores semelhante às ESC.

No gráfico 3.3 em que tentávamos perceber se teríamos em cultura EpiSC, observou-se que não teríamos como pensávamos essas células pois além de apresentarem expressão de Rex1, que deveria de se encontrar silenciada (*Brons, 2007*), os factores referentes a células Epiblasticas (Tbx3, Fgf5, Nodal), estavam bastante mais baixos comparados com as iPS provenientes dos respectivos agregados celulares. *Gotoh NN. em 2009 e Brons em 2007*, explicitam que o Fgf5 e Nodal são expressos em EpiSC sendo estes marcadores específicos para estas células, tendo que ter valores de expressão significativos.

Como ultimo teste para se entender a capacidade das iPS obtidas tanto sem e com Cited2 sobreexpresso em MEF's P4, era necessário perceber se estas células tinham a capacidade de formar EB's (e se estes teriam a capacidade de expressar factores das 3 linhagens germinativas. Tentou-se obter EB's testando varias concentrações de células por gota que formarias este corpos tridimensionais, 500 células/gota, 1.000 células/gota, 2.000 células/gota (fig. 3.11), e usar dois soros diferentes, um sem ser inactivado e outro inactivado que seria o soro que se usava no meio de cultura em que se encontravam as iPS obtidas. Foi possível determinar que a melhor concentração de células/gota seriam de

1.000, e que de formar a se conseguir formar EB's capazes e com uma morfologia perfeita, teria que se usar soro que não fosse inactivado (Fig. 3.12). *Otsuki em 2013 e Leitch em 2013* conseguiram EB's em cultura para diferenciação com excelentes qualidades usando 1.000 células/gotas.

Foi ainda determinado com mais certezas que as células obtidas inicialmente e que se diferenciaram em possíveis iPS, continham os plasmídeos que utilizamos para sobreexpressar o Cited2 e o plasmídeo que seria o nosso controlo, através da visualização de GFP nos EB's formados através das iPS com e sem Cited2 exógeno (fig.3.13).

Nos gráficos 3.4, 3.5, 3.6 foram apresentados os níveis expressão de marcadores de diferenciação nos EB's formados através das iPS das MEF's em P4. Utilizando para medir a quantidade de transcrição das três linhas celulares: Mesoderme – os genes *Brachyury* e *Mesp1*, Endoderme - os genes *Foxa2*, e *AFP* e para a Ectoderme – os genes *Pax6* e *Nestin*.

Das iPS.Cited2 podemos dividir em dois grupos em relação aos níveis de expressão, iPS.Cited2.2 e iPS.Cited2.3 em que a quantidade de expressão se encontra relativamente baixa, e iPS.cited2.4 em que os níveis de expressão se encontram relativamente acima aos das iPS sem Cited2 exógeno.

O uso de UC-hMSC para reprogramação em iPS, poderá ser bastante relevante no futuro. O aumento dos bancos de células com este tipo de células tem vindo a aumentar, podendo ser utilizadas futuramente para gerar linhas de células estaminais combinadas para um paciente em particular, diminuindo assim os casos de rejeição imunológica (*Jung Y, 2012*). Sendo assim o objectivo após conclusão do trabalho através de mais ensaios necessários, pretende-se averiguar, neste tipo de células se é possível adoptar o mesmo tipo de reprogramação que se realizou nas MEF's. Para isto e poder mos averiguar se o Cited2 teria alguma influência em células humanas, decidiu-se fazer um teste durante este projecto de reprogramação das UC-hMSC para iPS.

Para a reprogramação das UC-hMSC utilizou-se para sua infecção a nível de inserirmos nas células o plasmídeo com o factor de transcrição do Cited2 com GFP e o plasmídeo contendo apenas GFP, sendo este os mesmo usados na infecção das MEF's, mas devido a trabalhar-se com células humanas e não correr mos riscos usou-se como vector viral, lentivírus. Apesar de se notar que com o lentivírus a taxa de infecção celular diminuiu pode-se verificar o aparecimento de fluorescência, conferida pela proteína GFP

(fig.3.14). Após da inserção através dos nossos lentivírus utilizados nas MEF's para a transcrição dos 4 factores de Yamanaka, seis dias após a sua activação, através da doxíciclina pode-se ver o aparecimento de agregados celulares nas UC-hMSC com Cited2 exógeno com LIF em cultura (fig. 3.15). Ao oitavo dia ouve um exponencial aparecimento de agregados células m UC-hMSC com e sem Cted2 exógeno em meio contendo LIF e FGF, no entanto a nível de morfologia as C-hMSC com Cited2 sobreexpresso nas com LIF e com FGF tendo um aspecto arredondado definido e com uma quantidade de células superior, compondo o aglomerado celular (fig. 3.16).

Com este resultado podemos acreditar que o Cited2 poderá ser um factor de transcrição bastante importante para se poder acelerar o processo de produção de iPS em células humanas.

CAPITULO 5 – Conclusão

Com este estudo foi possível concluir que o Cited2 tem bastante importância no processo de reprogramação de células somáticas para iPS.

Durante a reprogramação das MEF's em P2, foi possível comprovar que nas células com Cited2 exógeno, o aparecimento do número de agregados celulares é maior que em células sem Cited2 exógeno nas primeiras duas semanas, igualando no fim o mesmo número para ambos os lados.

Em MEF's P4 com Cited2 sobreexpresso, existe um impulsionamento na “perda” de senescência, pois conseguimos facilmente obter agregados celulares bastante semelhantes às MEF's em P2, o que não se verifica no caso das MEF's P4 sem Cited2 exógeno. Ainda se conseguiu provar que nestas células em senescência parece que o Cited2 consegue promover uma estabilidade na transcrição dos marcadores de pluripotência entre as iPS analisadas, de tal modo que estas se encontram semelhantes à transcrição desses marcadores em ESC. Assim como pode-se visualizar apenas em uma das iPS mas parece ser um resultado bastante credível, quando formados os EB's e analisados os marcadores das 3 linhagens germinativas, esta iPS que fora formada em MEF's P4 com Cited2 exógeno, apresenta valores maiores em relação às iPS obtidas de MEF's P4 sem Cited2 sobreexpresso.

Em células humanas, neste caso as UC-hMSC pode-se visualizar que o Cited2 também tem a capacidade de promover o aparecimento antecipado de agregados celular.

Em suma o Cited2 tem uma maior valia na reprogramação, pois permite a obtenção em maior quantidade de agregados celulares no espaço mais curto de tempo, permite contornar o problema da senescência celular. E estabiliza as iPS de modo a que os agregados que se obtêm têm semelhantes níveis de transcrição de marcadores de pluripotência entre si.

VIII - Bibliografía

1. **Araki, R., Uda, M., Hoki, Y., Sunayama, M., Nakamura, M., Ando, S., Sugiura, M. Ideno, H., Shimada, A., Nifuji, A. et al.** (2013). Negligible immunogenicity of terminally differentiated cells derived from induced pluripotent or embryonic stem cells. *Nature* **494**, 100-104
2. **Bamforth SD, Bragança J, Eloranta JJ, Murdoch JN, Marques FI, Kranc KR, Farza H, Henderson DJ, Hurst HC, Bhattacharya S.**, 2001, Cardiac malformations, adrenal agenesis, neural crest defects and exencephaly in mice lacking *Cited2*, a new *Tfap2* co-activator, *Nat Genet.*
3. **Bamforth SD, Bragança J, Farthing CR, Schneider JE, Broadbent C, Michell AC, Clarke K, Neubauer S, Norris D, Brown NA, Anderson RH, Bhattacharya S.** , 2004, *Cited2* controls left-right patterning and heart development through a *Nodal-Pitx2c* pathway, *Nat Genet*
4. **Banito, A., Sheikh T. Rashid, S. T., Juan Carlos Acosta, J. C. et al** (2009). Senescence impairs successful reprogramming to pluripotent stem cells. *Genes Dev.* **23**, 2134-2139
5. **Bartlett, J. M. S.; Stirling, D.** (2003). A Short History of the Polymerase Chain Reaction. *PCR Protocols* **226**. pp. 3–6
6. **Boyer LA, Lee TI, Cole MF, Johnstone SE, Levine SS, Zucker JP, Guenther MG, Kumar RM, Murray HL, Jenner RG, Gifford DK, Melton DA, Jaenisch R, Young RA.** (2005) Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells, *Cell.* , **122**, 947-56
7. **Brons IG, Smithers LE, Trotter MW, Rugg-Gunn P, Sun B, Chuva de Sousa Lopes SM, Howlett SK, Clarkson A, Ahrlund-Richter L, Pedersen RA, Vallier L.** (2007) Derivation of pluripotent epiblast stem cells from mammalian embryos, *Nature.* **448**, 191-5
8. **Cheng D, Guo Y, Li Z, Liu Y, Gao X, Gao Y, Cheng X, Hu J, Wang H.** (2012) Porcine induced pluripotent stem cells require LIF and maintain their developmental potential in early stage of embryos, *PLoS One* **7** (12)
9. **Chou YT, Hsieh CH, Chiou SH, Hsu CF, Kao YR, Lee CC, Chung CH, Wang YH, Hsu HS, Pang ST, Shieh YS, Wu CW.** (2012) *CITED2* functions as a molecular switch of cytokine-induced proliferation and quiescence, *Cell Death Differ.* **19**(12):2015-28
10. **Collado M, Blasco MA, Serrano M.**, 2007, Cellular senescence in cancer and aging, *Cell.*, **130**(2):223-33.

11. **Fang F, Xu Y, Chew KK, Chen X, Ng HH, Matsudaira P.**, 2014, Coactivators p300 and CBP maintain the identity of mouse embryonic stem cells by mediating long-range chromatin structure, *Stem Cells*
12. **Freeman, W.M., Walker, S.J., Vrana, K.E.** (1999). Quantitative RT-PCR: pitfalls and potential. *BioTechniques* **26** (1): 112–22, 124–5.
13. **Gotoh N.** (2009), Control of stemness by fibroblast growth factor signaling in stem cells and cancer stem cells, *Curr Stem Cell Res Ther.*, **4**, 9-15
14. **Han J, Yuan P, Yang H, Zhang J, Soh BS, Li P, Lim SL, Cao S, Tay J, Orlov YL, Lufkin T, Ng HH, Tam WL, Lim B.**, 2010, Tbx3 improves the germ-line competency of induced pluripotent stem cells, *Nature*, 463(7284):1096-100
15. **Jung Y, Bauer G, Nolte JA** (2012) Concise review: Induced pluripotent stem cell-derived mesenchymal stem cells: progress toward safe clinical products, *Stem Cells*. **30**, 42-7
16. **Kranc KR, Bamforth SD, Bragança J, Norbury C, van Lohuizen M, Bhattacharya S.** (2003) Transcriptional coactivator Cited2 induces Bmi1 and Me118 and controls fibroblast proliferation via Ink4a/ARF, *Mol Cell Biol*. 2003 Nov;23(21):7658-66.
17. **Lapasset L, Milhavet O, Prieur A, Besnard E, Babled A, Ait-Hamou N, Leschik J, Pellestor F., Ramirez J.M., De Vos J, Lehmann S, Lemaitre J. M.** (2011) Rejuvenating senescent and centenarian human cells by reprogramming through the pluripotent state. *Genes & Dev*, **25**:2248-2253
18. **Leitch HG, Tang WW, Surani MA.** (2013) Primordial germ-cell development and epigenetic reprogramming in mammals, *Curr Top Dev Biol*. **104**, 149-87
19. **Li H, Collado M, Villasante A, Strati K, Ortega S, Cañamero M, Blasco MA, Serrano M**, 2009, The Ink4/Arf locus is a barrier for iPS cell reprogramming, *Nature*
20. **Li Q, Pan H, Guan L, Su D, Ma X.** (2012) CITED2 mutation links congenital heart defects to dysregulation of the cardiac gene VEGF and PITX2C expression, *Biochem Biophys Res Commun*. **423** (4):895-9
21. **Li Q, Hakimi P, Liu X, Yu WM, Ye F, Fujioka H, Raza S, Shankar E, Tang F, Dunwoodie SL, Danielpour D, Hoppel CL, Ramírez-Bergeron DL, Qu CK, Hanson RW, Yang YC.**, 2014, Cited2, a transcriptional modulator protein, regulates metabolism in murine embryonic stem cells *J Biol Chem*. 289(1):251-63
22. **Lu W, Guzman AR, Yang W, Chapa CJ, Shaw GM, Greene RM, Pisano MM, Lammer EJ, Finnell RH, Zhu H.** (2010) Genes encoding critical transcriptional activators for murine neural tube development and human spina bifida: a case-control study, *BMC Med Genet*.

23. **Matias, A.C., Alves, A., Santos, A.L., Oliveira, D.V., Fernandes, C., Bragança, J.** (2013) Improving Mouse Embryonic Fibroblasts Reprogramming, Poster in "8th International conference on stem cells for drug and regenerative medicine"
24. **O'Malley J, Skylaki S, Iwabuchi KA, Chantzoura E, Ruetz T, Johnsson A, Tomlinson SR, Linnarsson S, Kaji K.** (2013) High-resolution analysis with novel cell-surface markers identifies routes to iPS cells, *Nature*. **499**, 88-91
25. **Otsuki K, Imaizumi M, Nomoto Y, Nomoto M, Wada I, Miyake M, Omori K.** (2013) Effective embryoid body formation from induced pluripotent stem (iPS) cells for regeneration of respiratory epithelium, *Laryngoscope*.
26. **Pritsker M, Ford NR, Jenq HT, Lemischka IR.,** 2006, Genomewide gain-of-function genetic screen identifies functionally active genes in mouse embryonic stem cells, *Proc Natl Acad Sci U S A*.
27. **Son MY, Choi H, Han YM, Cho YS** (2013) Unveiling the critical role of REX1 in the regulation of human stem cell pluripotency, *Stem Cells*
28. **Takashi, K. and Yamanka, S.** (2006) Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* **126**, 663-676
29. **Takashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K. and Yamanka, S.** (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* **131**, 861-872
30. **Thomson, J.A, Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S. S. Waknitz, M.A., Swiergiel, J.J., Marshall, V.S. and Jones, J.M.** (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* **298**, 1145-1147
31. **Tiemann U, Sgodda M, Warlich E, Ballmaier M, Schöler HR, Schambach A, Cantz T.**(2011) Optimal reprogramming factor stoichiometry increases colony numbers and affects molecular characteristics of murine induced pluripotent stem cells, *Cytometry A*. **79**, 426-35
32. **Utikal, J., Polo, J.M., Stadtfeld, M., Maherali, N., Kulalert, W., Walsh, R.M., Khalil, A., Rheinwald, J.G., and Hochedlinger, K.** (2009) Immortalization eliminates a roadblock during cellular reprogramming into iPS cells, *Nature*, vol **460**
33. **Yamanaka, S** (2008) Pluripotency and nuclear reprogramming. *Phil. Trans. R. Soc. B* **363**, 2079-2087
34. **Yamanaka, S** (2009) A fresh look at iPS cells. *Cell* **137**, 13-17
35. **Yin Z, Haynie J, Yang X, Han B, Kiatchosakun S, Restivo J, Yuan S, Prabhakar NR, Herrup K, Conlon RA, Hoit BD, Watanabe M, Yang YC.,** 2002, The essential role of Cited2, a negative regulator for HIF-1alpha, in heart development and neurulation, *Proc Natl Acad Sci U S A*.

36. **Young L, Sung J, Stacey G, Masters JR.,** (2010) Detection of Mycoplasma in cell cultures, *Nat Protoc.* **5**, 929-34
37. **Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, Nie J, Jonsdottir GA, Ruotti V, Stewart R, Slukvin II, Thomson JA.,** (2007) Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells, *Science.* **318**