



Modelling aging in vitro using stem cells-derived cells

Tese de Mestrado em Ciências Biomédicas – Mecanismos de Doenças

Pedro Miguel Canada de Sousa

Modelling aging in vitro using stem cells-derived cells

Tese de Mestrado em Ciências Biomédicas – Mecanismos de Doenças

Pedro Miguel Canada de Sousa

Orientador:

Professor Doutor José Bragança

Coorientador:

Professor Doutor Clévio Nóbrega

Faro, 2022

"O importante é não deixar de questionar. A curiosidade tem a sua própria razão de existir. Não podemos deixar de nos maravilharmos ao contemplar os mistérios da eternidade, da vida, da estrutura maravilhosa da realidade."

Albert Einstein

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Ciências Biomédicas –
Mecanismos de Doenças pela Universidade do Algarve

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

Copyright © 2022 Pedro Miguel Canada de Sousa. Todos os direitos reservados.

A Universidade do Algarve tem o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar este trabalho através de exemplares impressos 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 objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Resumo

O progresso científico e médico tem vindo a permitir ao ser humano viver para além da esperança média de vida. Com os novos conhecimentos, vão sendo desenvolvidos novos tratamentos e medicamentos que permitem à humanidade viver por mais anos – o aumento de estudos de doenças permitem curar ou retardar os efeitos destas mesmas doenças.

No entanto, daí advêm consequências, mais precisamente doenças relacionadas com a idade. Ainda que os seres humanos vivam mais anos, esta longevidade está associada, na maior parte dos casos, a uma má qualidade de vida e de saúde. As diferenças no processo do envelhecimento e as suas implicações no corpo humano podem ser o resultado de fatores genéticos, epigenéticos e ambientais, que terão impacto a nível celular, tais como senescência celular, alterações epigenéticas, perda da proteostase, desregulamentação na deteção de nutrientes, disfunção mitocondrial, instabilidade genómica, instabilidade nos telómeros, exaustão das células estaminais e alteração na comunicação intercelular.

Para futuramente estudar os mecanismos relacionados com a idade e para entender melhor os benefícios dos fatores anti-envelhecimento, foram estabelecidas, no ambiente do trabalho de Mestrado, *Induced Pluripotent Stem (iPS) Cells*, que são células com propriedades de células estaminais embrionárias. Assim as células iPS têm a capacidade de diferenciação em qualquer tecido/célula adulta e servir como modelo celular *in vitro* para estudar o envelhecimento celular.

Neste projeto, propôs-se a reprogramação de células somáticas recolhidas de doadores com a Síndrome da Progeria Hutchison-Gilford (HGPS) para obter células iPS. O processo de reprogramação conduz as células somáticas a desdiferenciar até um estado de pluripotência, tal como as Células Estaminais Embrionárias humanas.

Assim, podemos ter um modelo de Células iPS que tiveram origem em células de doentes com Progeria, para serem depois utilizadas para outras experiências, tal como a diferenciação em cardiomiócitos ou neurónios, por exemplo. Nesse

processo poderá ser visível como esta patologia afeta estas células específicas com o tempo, podendo também ser uma forma de observar como um tratamento poderia atrasar o processo de senescência, característico desta patologia.

Palavras-Chave: Síndrome da Progeria Hutchison-Gilford (HGPS), Células Estaminais Pluripotentes Induzidas, Células Estaminais Embrionárias, envelhecimento, reprogramação.

Abstract

Scientific and medical progress has allowed human beings to live beyond average life expectancy. With new knowledge, new treatments and medicine are being developed that allow mankind to live for more years – the increase in illnesses related studies allow to heal or delay the effects of those same illnesses.

However, that causes consequences, in particular diseases related to aging. Despite human beings living longer, this longevity is, in most cases, associated with a bad quality of life and health. Differences in the process of aging and its implications in the human body can be the result of genetic, epigenetic and environmental factors, that will have an impact at the cellular level, such as cellular senescence, epigenetic changes, loss of proteostasis, deregulation of nutrient sensing, mitochondrial dysfunction, genomic instability, telomere attrition, stem cell exhaustion and altered intercellular communication.

To further study age-related mechanisms and to better understand the benefits of anti-aging factors, Induced Pluripotent Stem (iPS) Cells were established, in the context of the Master degree work, which are cells with embryonic stem properties. Thus, the iPS cells have the capacity for differentiation in any tissue/adult cell and serve as in vitro cellular model to study aging.

In this project, it was proposed the reprogramming of somatic cells collected from donors with The Hutchison-Gilford Progeria Syndrome (HGPS) to obtain iPS cells. The reprogramming process takes somatic cells to dedifferentiate until a state of pluripotency, such as human Embryonic Stem (ES) Cells.

Thus, we can have a model of iPS cells that was originated in cells from patients with Progeria, to be used for other experiments, such as differentiation in cardiomyocytes or neurons, for example. In this process it can be visible how this pathology affects these specific cells over time and may also be a way of observing how a treatment could delay the senescence process, characteristic of this pathology.

Keywords/Palavras-chave: Hutchison-Gilford Progeria Syndrome (HGPS), Induced Pluripotent Stem (iPS) Cells, Embryonic Stem (ES) Cells, aging, reprogramming.

Índice

Resumo.....	v
Abstract.....	vii
Índice de Figuras.....	xi
Lista de Abreviaturas.....	xv
1. Introdução	1
1.1. Síndrome da Progeria Hutchinson-Gilford.....	1
1.2. O envelope nuclear	4
1.3. As lamínas nucleares	6
1.4. Processamento da pré-lamina A para formar a lamina A corretamente processada	11
1.5. Defeitos no processamento da pré-lamina A na Progeria.....	13
1.6. Papel da Lamina A/C na Organização da Cromatina e na Expressão Genética	16
1.7. As laminopatias e mutações associadas	19
1.8. Manutenção de pluripotência na reprogramação de iPS.....	24
1.9. Manutenção da cultura de células iPS em <i>feeder</i> e em <i>feeder free</i>	28
1.10. Alterações celulares fisiológicas do envelhecimento	31
1.11. Células iPS da linha HGPS como modelo do envelhecimento	34
1.12. Uso na clínica das células iPS	37
1.13. Objetivo do trabalho de investigação.....	40
2. Materiais e métodos	41
2.1. Cultura de fibroblastos de Progeria	41
2.2. Cultura de fibroblastos de <i>feeder</i> (antes do dia 7).....	42
2.3. Início do processo de transdução de fibroblastos com HGPS (dia -2 até dia 6)	43
2.4. Inativação dos fibroblastos HFF com mitomicina C (antes do dia 7)	44
2.5. Preparação para passagem de fibroblastos com HGPS transduzidos para <i>feeder</i> em HFF (dia 7).....	45
2.6. Preparação para passagem de fibroblastos com HGPS transduzidos para <i>feeder</i> em MEF (dia 7).....	47
2.7. Preparação para passagem de fibroblastos com HGPS transduzidos para <i>feeder free</i> (dia 7)	49
2.8. Manutenção e passagem das colónias de fibroblastos (após dia 8)	50
2.9. Passagem das colónias de fibroblastos de HGPS das placas em <i>feeder</i> para placas em <i>feeder free</i>	51

2.10. Diferenciação das linhas celulares iPS dos clones 7 e 9 em <i>Embryoid Bodies</i> (<i>corpos embrióides</i>).....	52
2.11. Imunocitoquímica.....	53
2.12. Detecção da fosfatase alcalina	55
2.13. Extração de RNA e realização da RT-PCR.....	56
3. Resultados	57
3.1. Cultura de fibroblastos de Progeria	57
3.2. Início do procedimento de transdução de fibroblastos com HGPS (dia -2).....	60
3.3. Transdução de fibroblastos com HGPS (dia 0)	61
3.4. Transdução de fibroblastos com HGPS (após dia 1).....	62
3.5. Cultura de fibroblastos MEF de <i>feeder</i>	65
3.6. Preparação para passagem de fibroblastos com HGPS transduzidos para <i>feeder</i> MEF (dia 7).....	66
3.7. Preparação para passagem de fibroblastos com HGPS transduzidos para <i>feeder free</i> (dia 7)	69
3.8. Cultura de fibroblastos de Progeria	71
3.9. Cultura de fibroblastos HFF de <i>feeder</i>	73
3.10. Início do processo de transdução de fibroblastos HGPS	75
3.11. Preparação para passagem de fibroblastos com HGPS transduzidos para <i>feeder</i> de HFF (dia 7).....	79
3.12. Preparação para passagem de fibroblastos com HGPS transduzidos para <i>feeder free</i> (dia 7)	80
3.13. Manutenção e passagem das colónias de fibroblastos (após dia 9)	81
3.14. Passagem de colónias de clones de células iPS.....	83
3.15. Passagem das colónias de fibroblastos com HGPS das placas em <i>feeder</i> para placas em <i>feeder free</i>	86
3.16. Imunofluorescência para marcadores de pluripotência.....	88
3.17. Imunofluorescência da diferenciação de C7 em EB	89
3.18. Detecção da Fosfatase alcalina no clone 7 e no clone 9	90
3.19. RT-PCR	91
3.20. Diferenciação das linhas celulares iPS dos clones 7 e 9 em EBs	93
4. Discussão	96
5. Perspetivas futuras	101
5. Bibliografia.....	103

Índice de Figuras

Capítulo 1 – Introdução

Figura 1.2.1. Representação do envelope nuclear, lamina, e algumas proteínas associadas.....	5
Figura 1.3.1. Posição da lamina nuclear e a sua interação com outras estruturas das células.....	7
Figura 1.3.2. Organização estrutural do filamento da proteína lamina A/C.....	8
Figura 1.4.1. Processamento da pré-lamina A.....	12
Figura 1.5.1. Biogênese da lamina A em células normais e o insucesso em gerar a lamina A corretamente processada na doença HGPS.....	13
Figura 1.5.2. Diferença entre o <i>splicing</i> da proteína lamina A normal e mutante.....	14
Figura 1.6.1. Componentes citoplasmáticos e nucleares envolvidos na mecanotransdução e nas suas relações.....	17
Figura 1.6.2. Reorganização da cromatina resultando na mudança do perfil de expressão genética de uma célula durante a diferenciação celular.....	18
Figura 1.7.1. Representação de estruturas da lamina A e lamina C com regiões com mutações.....	21
Figura 1.8.1. Esquema da reprogramação nuclear.....	24
Figura 1.8.2. Estabelecimento de pluripotência que ocorre nos núcleos de células somáticas.....	26
Figura 1.9.1. Tratamentos para inativar células feeder.....	29
Figura 1.9.2. Cultura de ESCs ou iPSC em placas com <i>feeder</i> de MEF e em placas em <i>feeder free</i> com geltrex.....	30
Capítulo 2 – Materiais e métodos	
Figura 2.12.1. Conjunto de primers utilizados na RT-PCR.....	54

Capítulo 3 – Resultados

Figura 3.1.1. Fibroblastos de HGPS congelados, antes da transdução.....	55
Figura 3.1.2. Cultura de fibroblastos de HGPS antes da transdução num frasco T25.....	56
Figura 3.1.3. Cultura de fibroblastos de HGPS antes da transdução e respetiva imagem ao microscópio das células.....	56
Figura 3.1.4. Cultura de fibroblastos de HGPS antes da transdução num frasco T25	57
Figura 3.1.5. Cultura de fibroblastos de HGPS antes da transdução e respetiva imagem ao microscópio das células.....	57
Figura 3.2.1. Cultura de fibroblastos de HGPS no dia -2 da transdução.....	58
Figura 3.4.1. Cultura de fibroblastos de HGPS no dia 1 da transdução.....	60
Figura 3.4.2. Cultura de fibroblastos de HGPS ao dia 1 da transdução e respetiva imagem ao microscópio das células.....	61
Figura 3.4.3. Cultura de fibroblastos de HGPS ao dia 3 da transdução e respetiva imagem ao microscópio das células.....	61
Figura 3.4.4. Cultura de fibroblastos de HGPS ao dia 4 da transdução e respetiva imagem ao microscópio das células.....	62
Figura 3.4.5. Cultura de fibroblastos de HGPS ao dia 5 da transdução e respetiva imagem ao microscópio das células.....	62
Figura 3.5.1. Cultura de fibroblastos de MEF dentro de uma placa de cultura.....	63
Figura 3.6.1. Cultura de fibroblastos de HGPS no dia 7 da transdução em <i>feeder</i> MEF.....	64
Figura 3.6.2. Cultura de fibroblastos de HGPS no dia 10 da transdução em <i>feeder</i> MEF.....	64
Figura 3.6.3. Cultura de fibroblastos de HGPS no dia 13 da transdução em <i>feeder</i> MEF.....	65
Figura 3.6.4. Cultura de fibroblastos de HGPS no dia 21 da transdução em <i>feeder</i> MEF.....	65

Figura 3.7.1. Cultura de fibroblastos de HGPS no dia 7 da transdução em <i>feeder free</i>	67
Figura 3.7.2. Cultura de fibroblastos de HGPS no dia 10 da transdução em <i>feeder free</i>	67
Figura 3.8.1. Cultura de fibroblastos de HGPS antes da transdução num frasco T75.....	69
Figura 3.8.2. Cultura de fibroblastos de HGPS antes da transdução e respetiva imagem ao microscópio das células.....	70
Figura 3.9.1. Fibroblastos de HFF para uso em cultura.....	71
Figura 3.9.2. Cultura de fibroblastos de HFF dentro de um frasco T25.....	71
Figura 3.9.3. Cultura de fibroblastos de HFF e respetiva imagem ao microscópio das células.....	72
Figura 3.10.1. Cultura de fibroblastos de HGPS no dia -2 da transdução.....	73
Figura 3.10.2. Cultura de fibroblastos de HGPS no dia -1 da transdução.....	73
Figura 3.10.3. Cultura de fibroblastos de HGPS no dia 1 da transdução.....	74
Figura 3.10.4. Cultura de fibroblastos de HGPS ao dia 2 da transdução.....	74
Figura 3.10.5. Cultura de fibroblastos.....	75
de HGPS ao dia 4 da transdução.....	75
Figura 3.10.6. Cultura de fibroblastos de HGPS ao dia 5 da transdução.....	76
Figura 3.10.7. Cultura de fibroblastos de HGPS ao dia 6 da transdução.....	77
Figura 3.11.1. Cultura de fibroblastos de HGPS no dia 15 da transdução em <i>feeder</i>	77
Figura 3.11.2. Cultura de fibroblastos de HGPS no dia 15 da transdução em <i>feeder</i> e respetiva imagem ao microscópio das células.....	78
Figura 3.12.1. Cultura de fibroblastos de HGPS no dia 15 da transdução em <i>feeder free</i>	78
Figura 3.12.2. Cultura de fibroblastos de HGPS no dia 15 da transdução em <i>feeder free</i> e a imagem ao microscópio das células.....	79

Figura 3.13.1. Cultura de fibroblastos de HGPS no dia 25 da transdução em <i>feeder</i> ..	80
Figura 3.13.2. Cultura de fibroblastos de HGPS no dia 35 da transdução em <i>feeder</i>	80
Figura 3.13.3. Cultura de fibroblastos de HGPS no dia 40 da transdução em <i>feeder</i>	81
Figura 3.14.1 Colônias de HGPS em <i>feeder</i> após a transdução.....	81
Figura 3.14.2. Colônias de HGPS em <i>feeder</i> após a transdução.....	82
Figura 3.14.3. Colônias de HGPS em <i>feeder</i> após a transdução.....	83
Figura 3.15.1. Fibroblastos iPS do clone 7 e 9 em feeder free.....	84
Figura 3.15.2. Fibroblastos iPS do clone 9 em <i>feeder free</i>	85
Figura 3.16.1. Imunofluorescência para marcadores de pluripotência do clone 7 e 9.....	86
Figura 3.17.1. Imunofluorescência da diferenciação de C7 em EB.....	87
Figura 3.18.1. Detecção da Fosfatase alcalina no clone 7 e no clone 9.....	88
Figura 3.19.1. RT-PCR das células iPS do clone 7 e 9 na passagem 12	89
Figura 3.19.2. RT-PCR das células iPS do clone 7 e 9 na passagem 33.....	90
Figura 3.20.1. Diferenciação das linhas celulares iPS dos clones 7 em EBs.....	91
Figura 3.20.2. Diferenciação das linhas celulares iPS do clone 9 em EBs.....	92
Figura 3.20.3. Diferenciação das linhas celulares iPS dos clones 7 e 9 em EBs no final do protocolo.....	93
Figura 3.20.4. Diferenciação das linhas celulares iPS do clone 9 em EBs no final do protocolo.....	93

Lista de Abreviaturas

ADN - Ácido Desoxirribonucleico

BFGF - *Basic Fibroblast Growth Factor*

bp - *base pairs*

BSA - *Bovine Serum Albumin*

C7 - Clone 7

C9 - Clone 9

cDNA - *complementary Deoxyribonucleic Acid*

EBs - *Embryoid Bodies*

EDMD - *Distrofia Muscular Emery Dreifuss*

EN - envelope nuclear

ES - *Embryonic Stem Cell*

FPLD - *Dunnigan-type Familial Partial Lipodystrophy*

HFF - *Human Foreskin Fibroblasts*

HGPS - *Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome*

iPS - *Induced Pluripotent Stem Cells*

LAD - Domínio Lamina Associados

LMNA – lamina A

MAD - *Mandibuloacral Dysplasia*

MEF – *Mouse Embryonic Fibroblasts*

MNE - Membrana Nuclear Externa

MNI - Membrana Nuclear Interna

mRNA - RNA mensageiro

NEAA - *Non-Essential Amino Acids*

NLS - Sinal de Localização Nuclear

PBS - *Phosphate Buffered Saline*

PFA – Paraformaldeído

PVA - *Polyvinyl Acetate*

RE - Retículo Endoplasmático

RNA - *Ribonucleic Acid*

1. Introdução

1.1. Síndrome da Progeria Hutchinson-Gilford

A Síndrome da Progeria Hutchison-Gilford foi descrita pela primeira vez na literatura em 1886 por Hutchinson como um caso de "ausência congênita do cabelo e das suas estruturas", sendo que Gilford introduziu o termo Progeria para designar esta patologia. A síndrome da Progeria Hutchinson-Gilford (HGPS) é uma condição genética extremamente rara caracterizada por uma aparência de envelhecimento acelerado em crianças. A palavra Progeria é derivada da palavra grega “*progeros*” que significa "prematuramente velho". A patologia de HGPS é uma patologia genética extremamente rara e fatal que tem origem na infância e que possui características marcantes que se assemelham ao envelhecimento prematuro. (Agarwal, Sitaraman, Mehta e Panse, 2010).

Embora a degeneração senil ocorra, muitas características do envelhecimento como presbiacusia (perda de audição natural), presbiopia (perda de visão ao perto), catarata (perda de transparência do cristalino), *arcus senilis* (acumulação de gordura na córnea do olho, em forma de arco branco) e osteoartrite não se evidenciam nesta doença. Por esta razão, esta síndrome só pode representar certas partes do processo de envelhecimento (Agarwal, Sitaraman, Mehta e Panse, 2010).

A HGPS é uma doença genética muito rara (afetando 1 em 20.000.000 de nascimentos), na qual todas as características relacionadas com o envelhecimento são exibidas numa fase precoce, exceto cancro e doenças neurodegenerativas. Pelo menos 90% de todos os casos de HGPS são causados por uma substituição de pares de base única no exão 11 do gene lamina A (Kang, Yoon e Park, 2018).

A HGPS é causada por uma mutação dominante no gene codificando a lamina A (gene *LMNA*). Os caucasianos representam 97% dos casos reportados. A patologia de HGPS tem uma ligeira predominância masculina, sendo que a proporção homem-mulher é de 1,5:1. O diagnóstico clínico da patologia de HGPS baseia-se no reconhecimento das características e na exclusão de outras síndromes de

Progeria. As crianças com Progeria geralmente têm uma aparência física normal nos primeiros anos de vida. Com aproximadamente um a dois anos de idade, as crianças afetadas desenvolvem um atraso de crescimento severo, resultando numa baixa estatura, peso abaixo da média e atraso no fecho da fontanela anterior. Estas crianças desenvolvem uma aparência facial caracterizada por um rosto desproporcionalmente pequeno em comparação com a cabeça, malformação e aglomeração dentária, nariz de bico, olhos proeminentes, cianose nasolabial e perda de pelos do couro cabeludo, sobrancelhas e pestanas, e predisposição para outras patologias tais como tipicamente ligadas ao envelhecimento em pessoas sem HGPS: aterosclerose, doenças cardiovasculares e acidente vascular cerebral (Chandravanshi, Rawat, Dwivedi e Choudhary, 2011).

As crianças com a doença de HGPS apresentam uma aparência normal durante alguns meses após o nascimento, mas depois desenvolvem falhas no desenvolvimento, perda de gordura subcutânea, veias proeminentes do couro cabeludo, articulações rígidas e alterações da pele. As crianças afetadas acabam por desenvolver múltiplas anomalias esqueléticas, incluindo micrognatia (mandíbula menor do que o normal), osteoporose e lesões osteolíticas da clavícula. A morte geralmente ocorre devido a doença vascular oclusiva (Young, Meta, Yang e Fong, 2006).

Em 2001, Sarkar e Shinton descreveram que a síndrome de Hutchinson-Gilford Progeria é uma doença rara e hereditária em que os pacientes apresentam sintomas de envelhecimento prematuro, incluindo um acentuado atraso no crescimento, perda de gordura subcutânea, alopecia, densidade óssea reduzida e fraco desenvolvimento muscular. A idade média de morte em HGPS é de 12 a 15 anos, geralmente devido à aterosclerose grave que pode resultar em enfarte ou derrame do miocárdio.

Os indivíduos com HGPS não mostram qualquer aumento na suscetibilidade para o desenvolvimento de tumores, na formação de cataratas ou na degeneração cognitiva, características frequentemente associadas ao envelhecimento normal. A HGPS é, portanto, referida como uma síndrome de progeróide segmental, uma vez

que apresenta apenas algumas características dos processos normais de envelhecimento (Burke e Stewart, 2006).

De acordo com Burtner e Kennedy (2010), este tipo de progeria humana grave, a síndrome da progeria de Hutchinson-Gilford, combina alterações moleculares que também estão relacionadas com o envelhecimento normal, tais como a instabilidade do genoma, a perda do telómero, a senescência prematura e a homeostase defeituosa das células estaminais no desenvolvimento da doença. Estas observações, juntamente com estudos genéticos de longevidade, conduzem a uma hipótese de que as síndromes da progeria aceleram um subconjunto das mudanças patológicas que em conjunto condicionam o processo normal do envelhecimento.

As propriedades senescentes da doença HGPS estão visíveis nas células do indivíduo, bem como nos fibroblastos HPGS que adquirem uma senescência prematura em cultura celular. Além disso, a expressão exógena da progerina em células de cultura é suficiente para induzir algumas das características progeróides observadas nos fibroblastos HGPS, tais como a morfologia nuclear anormal e a proliferação reduzida, bem como a expressão de marcadores de senescência celular prematura (Burtner e Kennedy, 2010).

1.2. O envelope nuclear

De acordo com Burke e Stewart (2006), o núcleo das células eucarióticas é geralmente o organelo celular mais proeminente. O núcleo contém o material genético que determina a identidade e as funções da célula dentro do organismo. O núcleo não é, no entanto, simplesmente um recipiente amorfo para o ADN. Há uma organização no núcleo e um arranjo tridimensional do ADN no núcleo que é importante para a sua função. Estudos recentes revelaram que o núcleo contém ainda muitas estruturas subnucleares distintas cujas funções estão apenas agora a começar a serem estudadas. Além disso, os cromossomas não são distribuídos aleatoriamente dentro do núcleo, mas existem em territórios discretos. Estes territórios são de extrema importância porque a atividade de alguns genes, sejam silenciosos ou expressos, parece estar correlacionada com a sua localização dentro do núcleo.

Recentemente foi demonstrado que a arquitetura do núcleo tem uma organização funcional e que uma falha nesta pode resultar em doenças. Um dos compartimentos arquitetónicos do núcleo é o envelope nuclear (EN) e a lâmina subjacente. O EN é a barreira que separa os cromossomas e outras estruturas subnucleares do citoplasma e, como tal, regula a passagem de macromoléculas entre os compartimentos nucleares e citoplasmáticos. O EN tem outras funções diferentes que incluem organizar o genoma em genes que transitam desde um estado silencioso para um estado ativo, regulando caminhos de sinalização e assim desempenhando um papel central na organização do citoesqueleto (Burke e Stewart, 2006).

O EN que encerra o conteúdo nuclear é uma estrutura de dupla membrana constituída por uma Membrana Nuclear Interna (MNI) e uma Membrana Nuclear Externa (MNE). As duas membranas são contíguas, ligadas na periferia de cada complexo de poros nucleares, tornando a dupla membrana num sistema contínuo. A MNE é também contígua com o Retículo Endoplasmático (RE), fazendo com que o espaço perinuclear entre o MNI e o MNE seja uma extensão do lúmen do RE. O

EN funciona como uma barreira seletiva que controla o tráfego de macromoléculas, incluindo proteínas e *Ribonucleic Acid* (RNA), entre o núcleo e o citoplasma (Macara, 2001; Burke e Stewart, 2006).

Segundo Burke e Stewart (2006) e Hutchison (2002), o transporte de macromoléculas ocorre através de Complexos de Poros Nucleares (CPNs) que são espaçados de forma relativamente uniforme através do envelope nuclear. Subjacente ao MNI está uma rede de proteínas de filamento intermédio que formam a lâmina nuclear, a qual se encontra ligada ao MNI através de interações com proteínas integrais da membrana.

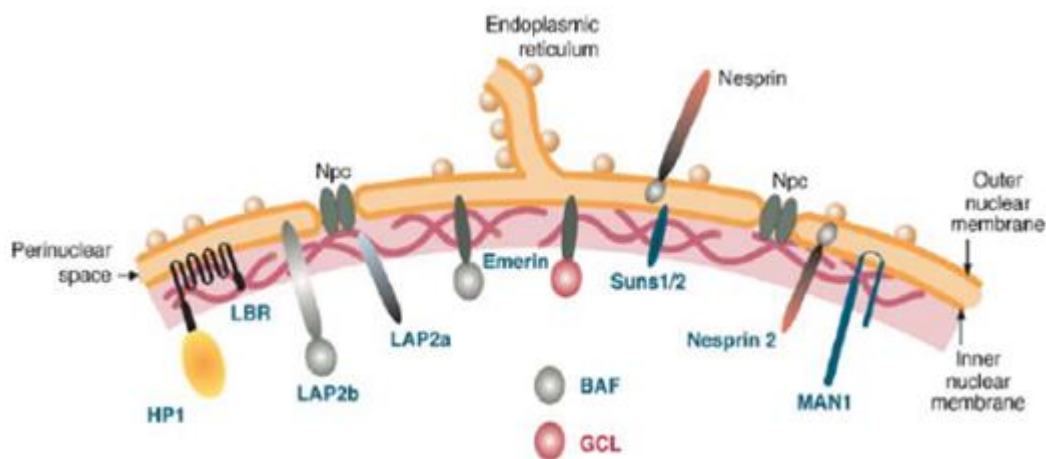


Figura 1.2.1. Representação do envelope nuclear, lamina, e algumas proteínas associadas – O EN consiste nas membranas nucleares interiores e exteriores contíguas (MNI e MNE, respetivamente), que estão ligadas onde os complexos de poros nucleares atravessam as duas membranas. No EN e na lamina observam-se algumas das proteínas associadas ao EN. Subjacente à membrana nuclear interior é a lamina de 20-50-nm de espessura, que é principalmente composta pelas laminas. Existem várias proteínas que estão associadas ao MNE, MNI e à lamina, algumas das quais são fatores de transcrição (Burke e Stewart, 2006).

1.3. As laminas nucleares

De acordo com Fong, *et al.* (2006), a base molecular para a síntese da lamina A e da lamina C a partir de um único gene foi inicialmente definida em 1993 pelo laboratório de Howard Worman na Universidade de Columbia. Desde essa descoberta, as mutações no gene *LMNA* têm sido relacionadas com um variado número de doenças genéticas humanas, como por exemplo, distrofia muscular, cardiomiopatia, progeria e neuropatia, suscitando um interesse considerável no estudo da lamina nuclear.

A lâmina nuclear nos mamíferos tem geralmente 20 a 50 nm de espessura, embora possa ser significativamente maior nos núcleos de certos tecidos, tais como as células sinoviais (revestem as articulações) e o músculo da língua. A lâmina nuclear suporta estruturalmente o EN e determina, em grande parte, a forma global do núcleo interfásico. Também fornece um local de ancoragem para CPNs e associa-se à cromatina direta e indiretamente, em virtude de interações com proteínas do EN (Burke e Stewart, 2006).

A lâmina nuclear é composta principalmente por proteínas como as laminas, que nos vertebrados se enquadram em duas categorias: as laminas do tipo A e as laminas do tipo B. As laminas do tipo A e B são proteínas de filamento intermédio do tipo V que são encontradas exclusivamente no núcleo, que em associação com as proteínas da membrana nuclear interna, formam uma malha rígida sob a membrana nuclear interior, denominada lamina nuclear. As laminas do tipo A surgem através de uma transcrição única da lamina codificada no gene *LMNA* (Burke e Stewart, 2006; Malashicheva e Perepelina, 2021).

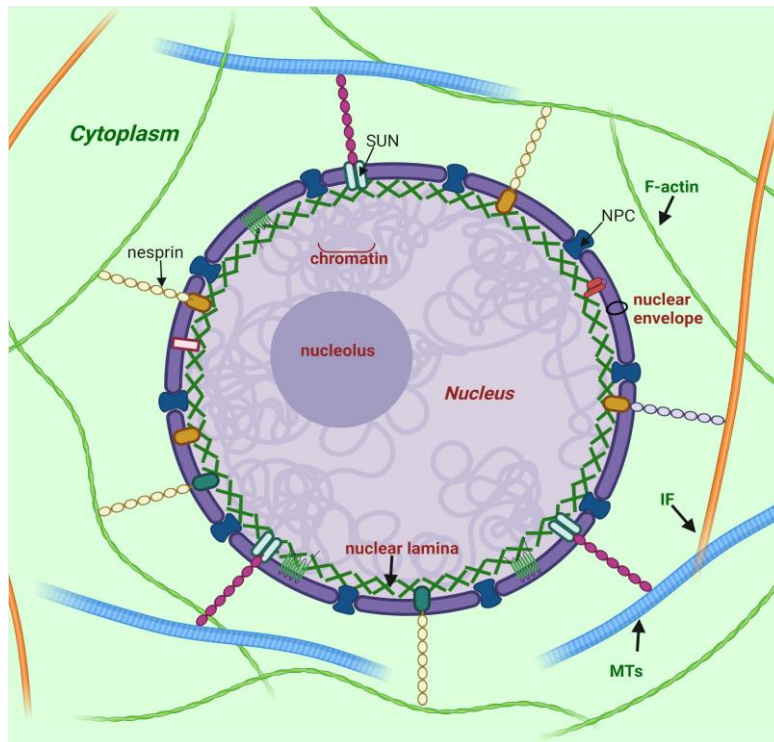


Figura 1.3.1. Posição da lamina nuclear e a sua interação com outras estruturas das células – A lamina nuclear é uma malha rígida composta pelas laminas do tipo A e localizadas entre o envelope nuclear e a cromatina. as laminas nucleares interagem com um grande número de proteínas do envelopes nucleares. Para além disso, as laminas nucleares podem interagir com o citoesqueleto através de proteínas, como por exemplo, filamentos de actina, F-actina; microtúbulos, MTs; e filamentos intermédios, IF (Malashicheva e Perepelina, 2021).

As laminas A, C, B1 e B2 são proteínas do filamento intermédio e as principais proteínas estruturais da lamina nuclear, uma malha composta por inúmeros filamentos sob a membrana nuclear interna. Cada um dos filamentos das laminas contem três domínios estruturais: um domínio de cabeça globular curto com uma parte aminoterminal, um domínio central α -helicoidal e um longo domínio de cauda globular com uma parte terminal de carbonos. As proteínas da lamina dimerizam para formar homodímeros paralelos enrolados em formato de bobinas de filamentos, que em seguida, se associam entre eles no formato de cabeça-a-cauda para formar protofilamentos que interagem lateralmente para formar filamentos de ordem superior. Por outro lado, não é conhecido se as laminas do tipo A (laminas

A e C) formam heterodímeros uns com os outros ou com as laminas do tipo B, as laminas B1 e B2 (Young, Meta, Yang e Fong, 2006; Malashicheva e Perepelina 2021).

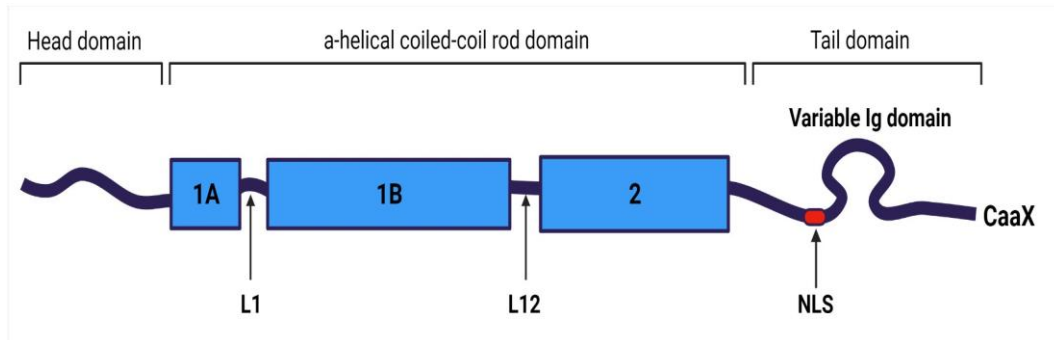


Figura 1.3.2. Organização estrutural do filamento da proteína lamina A/C – A Lamina A/C é um filamento intermédio e contém um domínio central de bobina enrolada dividido em 1A, 1B, e dois subdomínios ligados através de L1 e L12; um domínio de cabeça; e um domínio de cauda contendo o sinal de localização nuclear (NLS). Este domínio de cauda refere-se ao domínio Ig variável e ao terminal de carbonos CaaX (excluído na lamina C). Como legenda, C é cisteína, a é aminoácido alifático e X pode ser qualquer aminoácido (Malashicheva e Perepelina, 2021).

As laminas do tipo A são componentes essenciais do núcleo que desempenham uma multiplicidade de funções celulares vitais, desde a estabilização da forma do núcleo até ao envolvimento em processos mais complexos como a proliferação celular, a migração, a sinalização, a transdução e diferenciação celular (Gruenbaum e Foisner, 2015).

Segundo Malashicheva e Perepelina (2021), as proteínas lamina-ligantes estão divididas em três grupos gerais: 1) proteínas que fornecem suporte mecânico do núcleo interagindo com elementos subnucleares, cromatina e MNI; 2) proteínas que pertencem aos componentes de transmissão da sinalização de processos vitais da regulação celular, tais como a diferenciação celular, homeostase; 3) proteínas que regulam a expressão de genes e a organização da cromatina.

Enquanto as laminas do tipo B são expressas em geral em todas as células, as laminas do tipo A são expressas apenas em células diferenciadas, o que

aparentemente determina as funções específicas deste tipo de lamina nas células. Além disso, o nível de expressão da lamina A/C varia em diferentes tecidos (Malashicheva e Perepelina, 2021).

De acordo com Fong, et al. (2006), as laminas A e C são proteínas que são originadas por um *splicing* alternativo do gene *LMNA*. Elas interagem com uma série de proteínas na heterocromatina, incluindo fatores de transcrição e ligam-se às proteínas da membrana dentro da membrana nuclear interna.

Segundo Malashicheva e Perepelina (2021), a principal unidade estrutural dos filamentos lamina A/C é um dímero enrolado e é formado como resultado da interação de dois domínios centrais de ligação de proteínas de lamina. Estes dímeros são ligados cabeça-a-cauda e formam protofilamentos, que podem ser combinados em várias configurações para formar filamentos de 10 nm de lamina. Nos mamíferos, a maioria das laminas podem interagir umas com as outras. No entanto, algumas evidências sugerem que a força da ligação entre diferentes laminas pode variar e que as laminas do tipo A e B polimerizam predominantemente em homopolímeros separados.

O gene da lamina A/C contém 12 exões e conforme o *splicing* alternativo dentro do exão 10, originam-se dois mRNAs diferentes. Assim um mRNA codifica para a pré-lamina A e outro mRNA codifica para a lamina C, obtendo-se duas proteínas semelhantes, mas distintas a nível da funcionalidade (Lin e Worman, 1993).

Segundo Fong, et al. (2006), a lamina A e a lamina C são proteínas que atuam como componentes estruturais-chave da lamina nuclear, definida como uma malha intermédia de filamento situada por baixo da membrana nuclear interna. As laminas A e C são idênticas com um total de 566 aminoácidos, mas contêm diferentes domínios carboxiterminais. A lamina C (572 aminoácidos) contém 6 aminoácidos únicos no seu domínio carboxiterminal. Por outro lado, a lamina A (646 aminoácidos) é gerada a partir de uma proteína precursora, a pré-lamina A, por um conjunto de 4 etapas de processamento pós-translacionais.

A pré-lamina A (a proteína precursora da lamina A corretamente processada) e a lamina C são duas proteínas formadas pelo *splicing* alternativo do mesmo gene *LMNA*. A pré-lamina A e a lamina C são idênticas nos seus primeiros 566 aminoácidos divergindo no terminal C. A pré-lamina A contém 98 aminoácidos únicos no seu terminal C, incluindo um motivo CAAX que desencadeia a farnesilação proteica. Em oposição, a proteína lamina C contém seis aminoácidos únicos no seu terminal C, não tem um motivo CAAX e não é farnesilado (Young, Meta, Yang e Fong, 2006).

De acordo com Fong, *et al.* (2006), a investigação e a determinação para se saber se a proteína lamina A é verdadeiramente essencial para as células de mamíferos é extremamente importante, pela simples razão de que várias doenças humanas, como a progeria ou a cardiomiopatia, são causadas por defeitos genéticos que afetam a pré-lamina A e a lamina A, mas que não afetam a lamina C.

A maioria das mutações parecem surgir geneticamente e predominantemente da parte do progenitor masculino e de idade avançada. À lamina mutante do tipo A foi provisoriamente atribuída a designação de progerina (Burke e Stewart, 2006).

1.4. Processamento da pré-lamina A para formar a lamina A corretamente processada

De acordo com Young, Meta, Yang e Fong (2006), a maquinaria enzimática para converter a pré-lamina A na lamina A corretamente processada é tão eficiente que a pré-lamina A é virtualmente indetetável em células saudáveis. No entanto, todo o processamento pode ser bloqueado com um inibidor de farnesiltransferase proteico. Na ausência de farnesilação, nenhuma das etapas de processamento subsequentes ocorre, e acumula-se nas células a proteína pré-lamina A não farnesilada. A enzima ZMPSTE24 é necessária para o quarto e último passo de processamento, que consiste na formação final e da libertação da lamina A corretamente processada da pré-lamina A farnesilada. Se houver uma ausência da ZMPSTE24, não se gera a lamina A corretamente processada e acumula-se a pré-lamina A farnesilada nas células.

A pré-lamina A termina com um grupo de domínio CAAX (-CSIM) e passa por quatro etapas de processamento. Na primeira fase, uma enzima citosólica, a proteína farnesiltransferase (FTase) adiciona um grupo farnesil (um lípido farnesil de 15 carbonos) ao grupo tiol da cisteína terminal C. Na segunda etapa, ocorre a primeira clivagem, ou seja, os últimos três resíduos de aminoácidos da proteína (isto é, o AAX) são clivados *através* da metaloprotease de zinco Zmpste24 (FACE1) ou pelo RAS *converting enzim* 1, ou por ambos. Na terceira fase, a recém exposta farnesilcisteína (cisteína terminal C) é carboxilmetilada pela Isoprenylcysteine Carboxyl Methyltransferase, uma prenilproteína específica metiltransferase do retículo endoplasmático. No último e quarto passo do processamento, ocorre a segunda clivagem, isto é, a enzima ZMPSTE24 corta os últimos 15 aminoácidos terminal C da lamina A, removendo assim a cisteína carboxifarnesilada e metilada, sendo posteriormente degradada, libertando a lamina A corretamente processada (Young, Meta, Yang e Fong, 2006; Malashicheva e Perepelina, 2021).

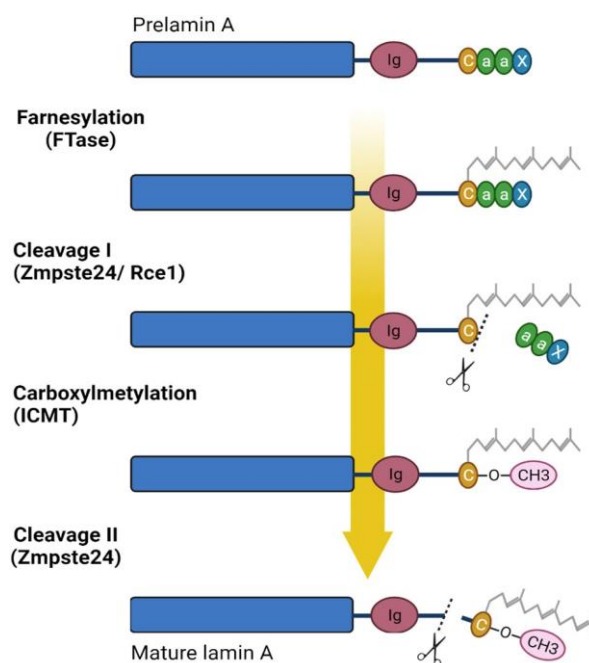


Figura 1.4.1. Processamento da pré-lamina A – A pré-lamina A passa por quatro passos para se tornar na lamina A corretamente processada: 1) farnesilação da cisteína pertencente à CaaX box, pela enzima farnesiltransferase (FTase), 2) a primeira clivagem de aaX pelo zincoprotease Zmpste24 (FACE1) ou pelo RAS *converting* enzima 1, 3) carboxilmetilação da cisteína farnesilada através proteína isoprenilcisteína metiltransferase carboxilo metiltransferase e finalmente 4) a segunda clivagem dos 15 aminoácidos terminais, incluindo a cisteína farnesilada e carboxilizada pelo ZMPSTE24 (Malashicheva e Perepelina, 2021).

Segundo Young, Meta, Yang e Fong (2006), não foi ainda estabelecido qual destas duas enzimas desempenha o papel predominante para a pré-lamina A. A enzima ZMPSTE24 de mamífero pode funcionar como um CAAX endoprotease em levedura e em outros tipos de células eucarióticas. Na levedura, bem como em mamíferos, a sequência do motivo CAAX influencia a especificidade do substrato para duas endoproteases diferentes.

1.5. Defeitos no processamento da pré-lamina A na Progeria

Alguns estudos realizados ao longo dos últimos anos estabeleceram que várias síndromes progeróides em humanos são causadas por defeitos genéticos que interferem com o processamento da proteína pré-lamina A farnesilada para a sua forma final, lamina A corretamente processada (Young, Meta, Yang e Fong, 2006).

Constata-se que a maioria dos casos de HGPS está associada a um defeito de *splicing* no exão 11 do no gene *LMNA*. Isto surge devido a uma nova substituição na base única que origina uma transição C para T na posição 1824 da sequência de codificação que resulta num polimorfismo no codão 608 dentro do exão 11 (G608G). A mutação G608G introduz um novo local de *splicing* na sequência do gene da lamina A, que é ativado e resulta numa eliminação de 150 *base pairs* (bp) no RNA mensageiro (mRNA) e uma eliminação de 50 aminoácidos na proteína lamina A sem afetar a proteína lamina C, pois o seu processamento faz-se de forma independente uma da outra (Burke e Stewart, 2006).

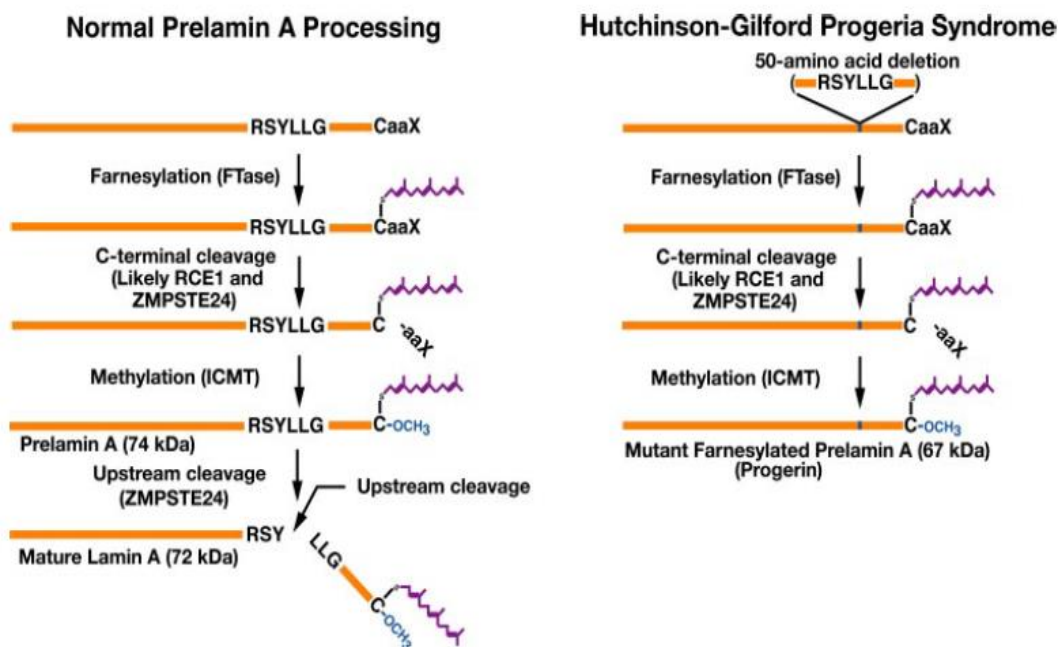


Figura 1.5.1. Biogénese da lamina A em células normais e o insucesso em gerar a lamina A corretamente processada na doença HGPS – À esquerda da imagem tem-se o normal processamento da pré-lamina A com o produto final da proteína lamina A corretamente

processada. Se houver uma falha na clivagem da ZMPSTE24, o passo final do processamento da lamina A não ocorre, resultando numa acumulação da proteína lamina A mutante farnesilada. Na HGPS, uma deleção de 50 aminoácidos na pré-lamina A (aminoácidos 607-656) remove o local para a segunda clivagem endoproteolítica. Consequentemente, não se forma a lamina A corretamente processada e acumula-se nas células uma proteína lamina A mutante farnesilada, também chamada de progerina (Young, Meta, Yang e Fong, 2006).

A proteína lamina A mutante é mais curta e não é corretamente processada, resultando numa proteína denominada progerina. A lamina A é normalmente sintetizada como uma molécula precursora, a pré-lamina A. Na terminação C existe uma parte, a CAA-*box*, que está sujeita a um processo de farnesilação. Depois disso, ocorre uma clivagem proteolítica interna, removendo os últimos 18 aminoácidos codificadores, para gerar a proteína lamina A corretamente processada. As mutações do codão 11 que ocorrem na mutação da doença da HGPS e o consequente *splicing* anormal produzem uma pré-lamina A que ainda mantém a CAA-*box*, mas que tem falta do local para clivagem endoproteolítica (Eriksson, *et al.*, 2003).

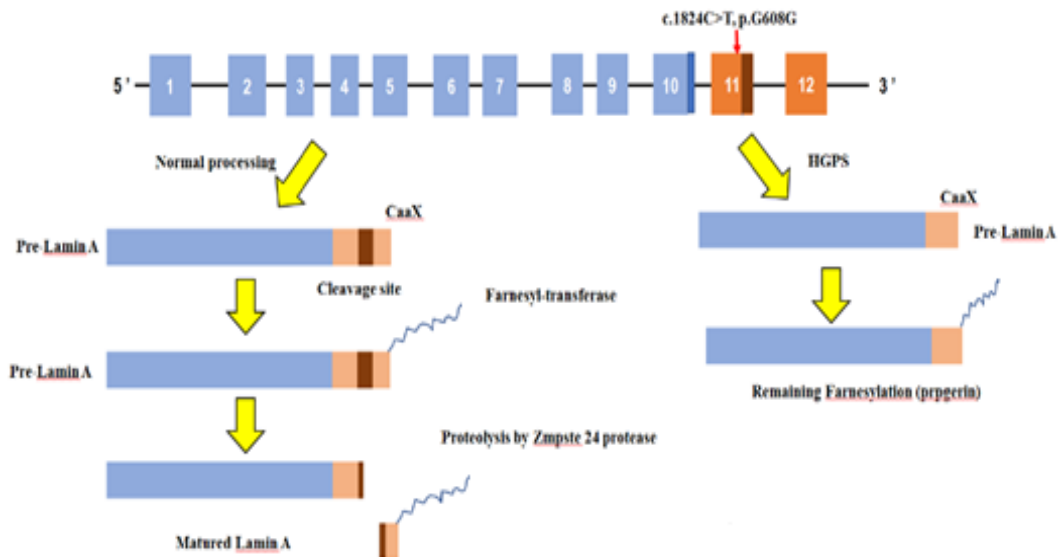


Figura 1.5.2. Diferença entre o *splicing* da proteína lamina A normal e mutante – na figura é visível a sequência normal da lamina A e a sequência mutante da lamina A, no exão 11. Esta mutação causa a maturação anormal desta proteína que origina um *splicing* alternativo e a proteína lamina A mutante, chamada de progerina (Kang, Yoon e Park, 2018).

A acumulação de progerina dentro da lamina nuclear também é detetada na população de envelhecimento normal (fisiológico), demonstrando que a formação deste novo local de *splicing* da lamina A pode igualmente ocorrer na população em geral. Assim, tem-se pensado que a acumulação da progerina contribui para a patologia do envelhecimento, levando à utilização de linhas celulares derivadas de pessoas com a patologia HGPS como um modelo geral para o envelhecimento. A nível molecular, os fibroblastos de um paciente com HGPS referido num estudo demonstram alterações na arquitetura nuclear, bem como na ativação da resposta aos danos de Ácido Desoxirribonucleico (ADN), na perda de herança epigenética marcada pela redução de heterocromatina periférica, na expressão genética alterada e também aparecimento da senescência celular prematura (Chen, *et al.*, 2017).

A progerina é direcionada para a margem da membrana nuclear, onde interrompe a integridade da lamina nuclear, causando núcleos anormalmente disformes (Young, Meta, Yang e Fong, 2006).

1.6. Papel da Lamina A/C na Organização da Cromatina e na Expressão Genética

O ADN genómico no núcleo eucariota está organizado em cromossomas, cada um dos quais ocupa uma determinada área, denominada como territórios dos cromossomas. No que se refere à atividade transcricional, a cromatina é dividida em eucromatina, que inclui a maioria dos genes ativamente expressos, e a heterocromatina, incluindo genes transcricionalmente inativos. A heterocromatina ocupa maioritariamente a periferia nuclear, enquanto a eucromatina está localizada na parte interior do núcleo. Além disso, a heterocromatina é subdividida em heterocromatina constitutiva, localizada nas regiões pericentroméricas e subtaloméricas dos cromossomas, e na heterocromatina facultativa (Malashicheva e Perepelina, 2021).

A heterocromatina está associada à lamina A/C que forma a lamina nuclear, enquanto a eucromatina que domina no interior nuclear está ligada a um número pequeno de laminas A/C do plasma do núcleo. As laminas do tipo A são consideradas relevantes para regular o estado repressivo dos genes incluídos na heterocromatina facultativa. Esta organização tridimensional da cromatina contribui para a regulação da expressão genética e manutenção do silenciamento de genes da heterocromatina. O processo de diferenciação é considerado como mecanossensitivo e o destino celular pode ser determinado pelo tipo e força física dos estímulos externos (Malashicheva e Perepelina, 2021).

O modelo atual proposto para explicar o processo de diferenciação pode ser o seguinte. Durante a diferenciação celular, as laminas do tipo A obtêm informações sobre o microambiente em mudança de células próximas e da matriz extracelular através do citoesqueleto. Isto leva a uma malha reorganizada e a estruturas de cromatina, ou pode impulsionar mudanças conformacionais em proteínas nucleares, tais como fatores de transcrição e componentes das vias de sinalização. É possível que estas conversões da organização dentro do núcleo, conduzem à translocação dos segmentos de cromatina para longe ou para perto da lamina, resultando na

ativação/repressão de genes relacionados com a diferenciação (Malashicheva e Perepelina, 2021).

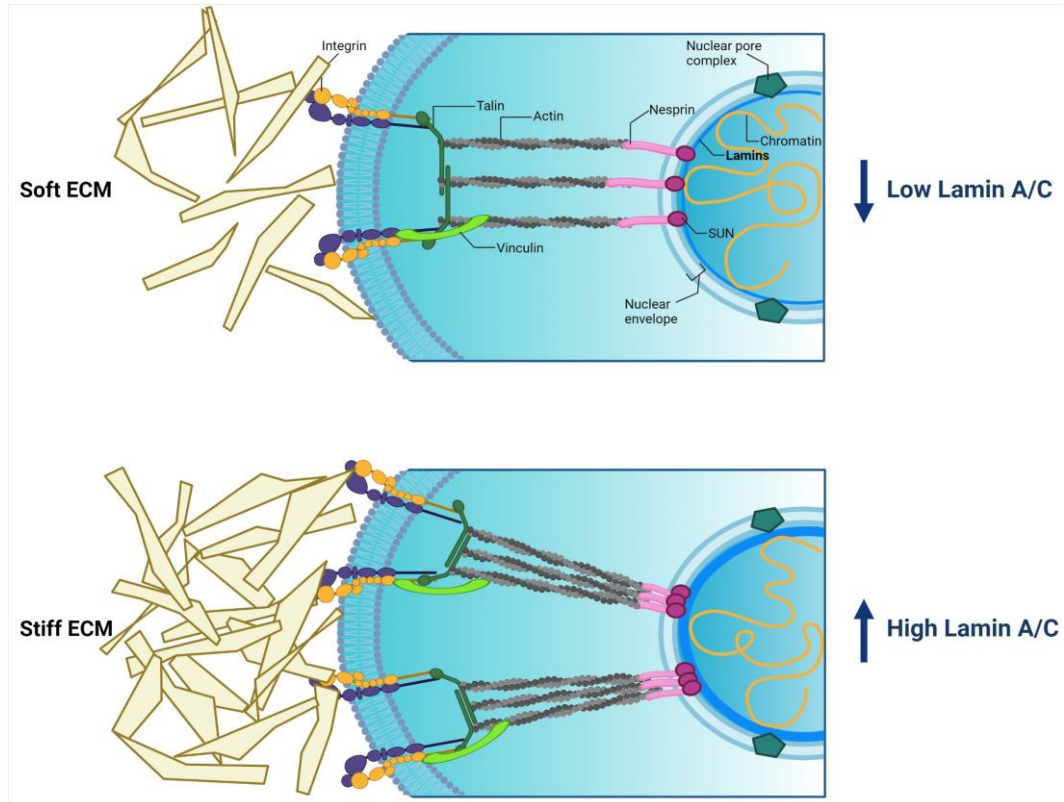


Figura 1.6.1. Componentes citoplasmáticos e nucleares envolvidos na mecanotransdução e nas suas relações. – Estímulos externos provenientes da matriz extracelular passam para integrinas da membrana citoplasmática. Em seguida, o sinal transmite através de proteínas de adesão focal (talina, a-actina, vinculina) para a actina. A actina liga-se diretamente com o complexo de proteínas, incluindo as lamina, resultando na transmissão do sinal para o núcleo. A força dos estímulos externos afeta a produção de lamina A/C, impulsionando assim a rigidez do núcleo e protegendo o genoma (Malashicheva e Perepelina, 2021).

A lamina A/C tem um papel particular na parte da organização da cromatina e da regulação da expressão genética durante a diferenciação, originando a escolha do destino da célula e resultando num tipo particular de célula. Durante a diferenciação celular, ocorre a deslocalização espacial de regiões genómicas para perto ou para longe da lamina. Assim sendo, os genes não relevantes para a diferenciação interagem com a lamina e tornam-se silenciosos. Ao mesmo tempo, os genes não ligados à lamina estão disponíveis para a sua expressão, facilitando o

desenvolvimento dessa célula em uma determinada célula específica (Bitman-Lotan e Orian, 2021).

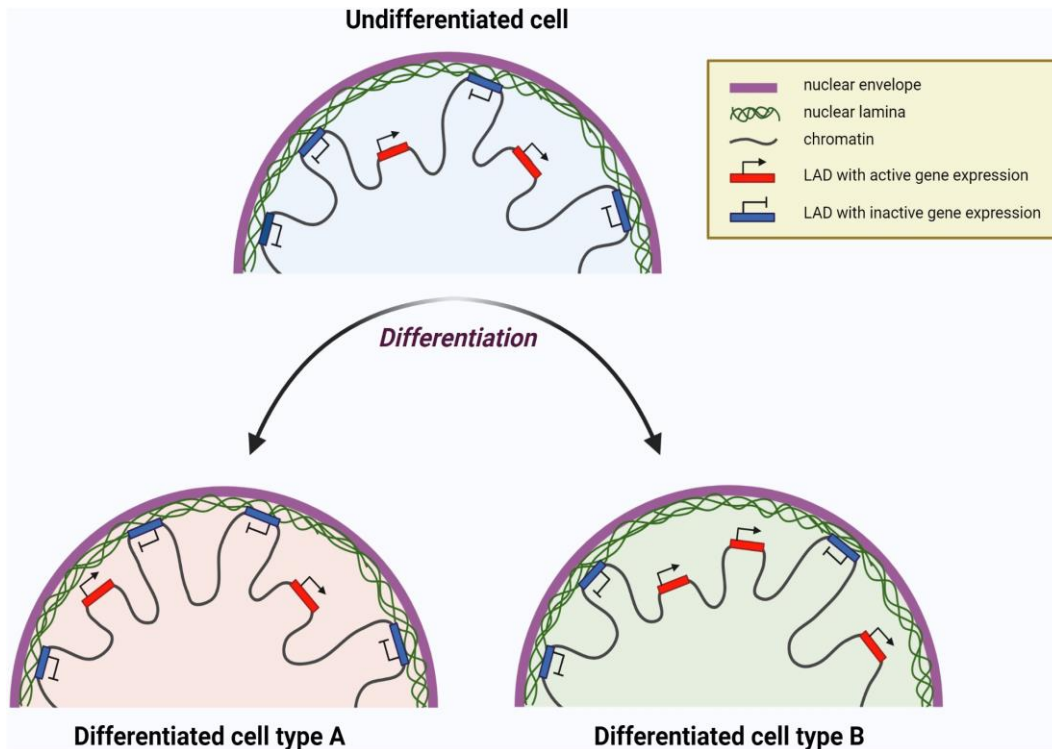


Figura 1.6.2. Reorganização da cromatina resultando na mudança do perfil de expressão genética de uma célula durante a diferenciação celular – O domínio lamina associados (LADs) ligados à lamina nuclear são transcricionalmente inativos, enquanto os LADs não ligados à lamina estão disponíveis para transcrição. O conjunto de LADs é único para certas células diferenciadas e diferente de células indiferenciadas. Aqui são apresentados dois tipos de células hipotéticas diferenciadas, identificadas como Células Diferenciadas tipo A e Tipo B, com diferentes LADs com genes transcricionalmente ativos, representados a vermelho, e genes transcricionalmente inativos, representados a azul (Malashicheva e Perepelina, 2021).

1.7. As laminopatias e mutações associadas

Nos últimos 20 anos, descobriu-se que a maioria das laminopatias são causadas por mutações no gene *LMNA*, que codifica a lamina A/C. Até à data, foram descritas mais de 15 doenças diferentes, associadas a 498 mutações no gene *LMNA*. As laminopatias são caracterizadas por um diversificado número de fenótipos clínicos, em que um tipo de tecido é mais frequentemente afetado, principalmente de origem mesenquimal, por exemplo, lipodistrofia (danos no tecido adiposo), displasia mandibuloacral (danos no tecido ósseo), cardiomiopatia e distrofia muscular (coração e músculos esqueléticos). Existem alguns grupos de laminopatias em que diferentes tecidos são afetados, resultando em fenótipos sobrepostos (Rankin e Ellard, 2006).

As mutações nas laminas podem ser classificadas em três grupos que causam variadas e diversas doenças. O maior grupo são as mutações autossômicas dominantes que causam substituições de aminoácidos em todo o gene *LMNA* e que resultam em laminopatias musculares estriadas. Dentro deste grupo de mutações é esperado que ocorram efeitos como a perturbação na montagem das laminas e/ou na sua incorporação na lamina. Por sua vez, isto perturba o papel de fortalecimento mecânico da lamina, bem como certas vias de sinalização chave que são ativadas para ajudar a proteger as células do stress mecanicamente induzido. O segundo grupo de mutações está restrito a alguns codões de pontos específicos, que quando mutados não parecem ter quaisquer consequências estruturais importantes nas proteínas da lamina ou na sua montagem (Burke e Stewart, 2006).

O último grupo de mutações é aquele que altera significativamente a estrutura da proteína de lamina do tipo A, quer introduzindo uma eliminação significativa, truncando toda a proteína, ou impedindo o processamento pós-tradução. A variante mais comum é o defeito de *splicing* que resulta em HGPS. Há apenas um caso relatado de um indivíduo sem lâminas do tipo A devido à introdução prematura de um codão *stop*, o que resultou na letalidade gestacional tardia (van Engelen,

Muchir, Hutchison, van der Kooi, Bonne e Lammens, 2005; Burke e Stewart, 2006).

Segundo Kang, Yoon e Park (2018), outra classificação sugere que as várias laminopatias possam ser divididas em duas grandes categorias: laminopatias primárias, que são induzidas por mutações na lamina A e as laminopatias secundárias que são causadas por mutações na lamina B (lamina B1 e lamina B2), proteínas de processamento da pré-lamina A (como Zmpste24) ou proteínas de ligação das laminas (como a emerina).

As mutações no gene *LMNA* localizado antes, ou seja, a montante, do sinal de localização nuclear (NLS) afetam o domínio central preservado que é necessário na formação e manutenção da integridade do citoesqueleto nuclear, enquanto as mutações localizadas depois, ou seja a jusante, interagem mais restritamente com os fatores de cromatina e transcrição (Cattin, Muchir e Bonne, 2013).

Uma vez que o primeiro grupo de mutações está principalmente associado a um grande grupo de distrofias musculares e cardiomiopatias, os cientistas sugeriram que as causas destas doenças são, em primeiro lugar, um insucesso durante a formação da estrutura da lamina e os defeitos mecânicos associados. O segundo grupo de mutações pertence a outros tipos de laminopatias, em particular, às síndromes progeróides tais como a *Dunnigan-type Familial Partial Lipodystrophy* (FPLD) e *Mandibuloacral Dysplasia* (MAD), e está associado a perturbações na interação e regulação de importantes vias de sinalização na célula (Cattin, Muchir e Bonne, 2013).

A HGPS é o fenótipo mais grave que surge de mutações no gene *LMNA*. A forma mutante da lamina A, a progerina, compreende cerca de 40% da quantidade total de proteína da lamina A (Reddel e Weiss, 2004).

A *Dunnigan-type Familial Partial Lipodystrophy* é uma desordem dominante autossômica caracterizada pela perda de tecido adiposo hipodérmico nos membros e tronco após a puberdade e excesso de deposição de gordura na região da cabeça,

pescoço, bem como em áreas intra-abdominal e intratorácica, sendo este fenótipo menos pronunciado nos homens. Um total de 90% das mutações no gene *LMNA* desta síndrome são mutações pontuais localizadas no exão 8, que codifica a porção terminal de carboxilo das laminas A e C. Quase todas as mutações encontram-se no codão 482 (Boguslavsky, Stewart e Worman, 2006; Rankin e Ellard, 2006).

A *Mandibuloacral Dysplasia* é uma doença recessiva autossômica rara caracterizada por anomalias e atraso no crescimento ósseo pós-natal, juntamente com anormalidades esqueléticas típicas. Assim, verificam-se a hipoplasia da mandíbula e clavículas, encerramento atrasado das suturas cranianas, contraturas articulares, pigmentação da pele manchada e perda de gordura subcutânea das extremidades com acumulação de gordura no pescoço e tronco em alguns. Pode haver alopecia subtotal nos homens, perda prematura de dentes e resistência à insulina com hipertrigliceridemia. A doença de MAD ocorre devido a mutações no gene *LMNA* pontuais associadas a substituições de aminoácidos. A displasia mandibuloacral também pode ser causada por mutações na protease ZMPSTE24, envolvidas no processamento da pré-lamina A até à lamina A/C (Agarwal et al., 2003; Rankin e Ellard, 2006).

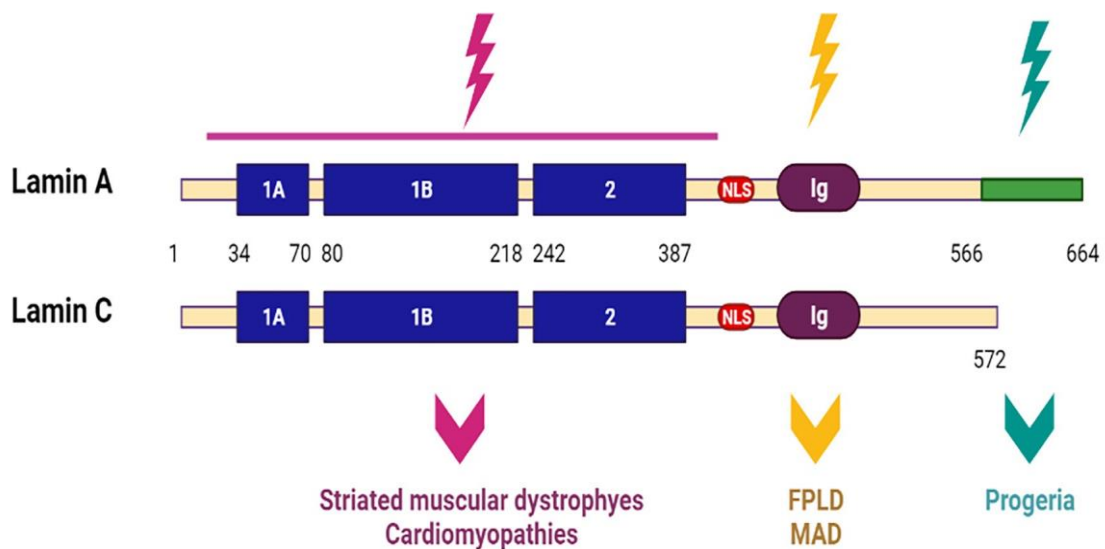


Figura 1.7.1. Representação de estruturas da lamina A e lamina C com regiões com mutações – As mutações no gene *LMNA* a montante do sinal de localização nuclear (NLS) afetam o domínio do núcleo conservado, resultando em distrofias musculares estriadas e

cardiomiopatias. Mutações no gene *LMNA* localizadas a jusante de NLS conduzem a síndromes progeróides, como a FPLD e a MAD (Malashicheva e Perepelina, 2021).

Muitos tipos de mutações da lamina A estão relacionadas com a distrofia muscular. A Distrofia Muscular Emery Dreifuss (EDMD), descrita pela primeira vez em 1955, caracteriza-se pela manifestação de contraturas, fraqueza muscular e envolvimento cardíaco, e pode afetar 1 em cada 100 mil pessoas. Este fenótipo exhibe heterogeneidade de locus e pode ser causado por mutações no gene *STA*, que codifica a emerina, uma proteína da membrana nuclear interna com a qual as laminas interagem, bem como por mutações no gene *LMNA*. Num paciente do sexo masculino, a apresentação clínica da patologia associada ao cromossoma X (também designado EDMD1) pode ser indistinguível da forma dominante autossômica (designada EDMD2). Em pacientes do sexo feminino, raramente ocorre algum tipo de fraqueza muscular, mas pode manifestar-se bloqueio cardíaco. A EDMD2 apresenta-se tipicamente durante a infância (3-8 anos) e as crianças geralmente têm dificuldade em andar ou correr, embora os sintomas possam começar em qualquer idade. A EDMD afeta principalmente os músculos esqueléticos e é detetada desde a adolescência. A presença de escoliose pode ser uma possível consequência e pode exigir tratamento cirúrgico. Noutros pacientes pode ser possível observar uma insuficiência respiratória significativa. Uma das características da EDMD é a presença de um desgaste lento e progressivo dos músculos esqueléticos ao nível dos ombros e nos músculos distais das pernas (Kang, Yoon e Park, 2018; Rankin e Ellard, 2006).

A Dermopatia restritiva causa um fenótipo como a hiperqueratose da epiderme, o estreitamento da derme e a redução severa da elasticidade das fibras, que resultam numa pele esticada e rígida. Ocorre a hipoplasia pulmonar e o atraso no crescimento intrauterino, e pode haver parto prematuro, geralmente por volta das 31 semanas de gestação. A morte ocorre frequentemente nas primeiras horas ou dias, embora tenha sido descrita a possibilidade de sobrevivência aos 4 meses. Outras características clínicas características incluem erosão cutânea, veias superficiais proeminentes, boca pequena com aparência beliscada do nariz e, em comum com HGPS, pestanas e sobrancelhas pouco presentes ou ausentes. Há anomalias esqueléticas com

defeitos de mineralização do crânio, clavículas displásicas e contrações articulares (Rankin e Ellard, 2006).

As laminopatias são um grupo complexo de distúrbios ao nível de vários sistemas. É evidente que muitos dos fenótipos não podem ser considerados como algo único e distinto, mas sim um conjunto de uma sobreposição de fenótipos. Assim, alguns indivíduos e famílias têm características de várias laminopatias diferentes e algumas mutações causam manifestações diversas em diferentes indivíduos (Rankin e Ellard, 2006).

1.8. Manutenção de pluripotência na reprogramação de iPS

A pluripotência descreve a capacidade de uma célula dar origem a todas as células de um embrião e de células adultas, nos quais existem fatores de transcrição e processos epigenéticos que desempenham um papel importante na manutenção da pluripotência celular (Niwa, 2007).

Takahashi e Yamanaka (2006), demonstraram que é possível obter células estaminais pluripotentes induzidas a partir de fibroblastos embrionários ou de células adultas, forçando a expressão de quatro fatores (OCT3/4, SOX2, c-MYC e KLF4) nos fibroblastos, numa condição de cultura celular que permite manter células estaminais embrionárias (ES) em pluripotência e não diferenciadas. As células ES têm a sua origem na massa celular interna/botão embrionário dos blastocistos dos mamíferos e possuem propriedades como: proliferar indefinidamente, manter a pluripotência e a capacidade de se diferenciar em células das três camadas germinativas.

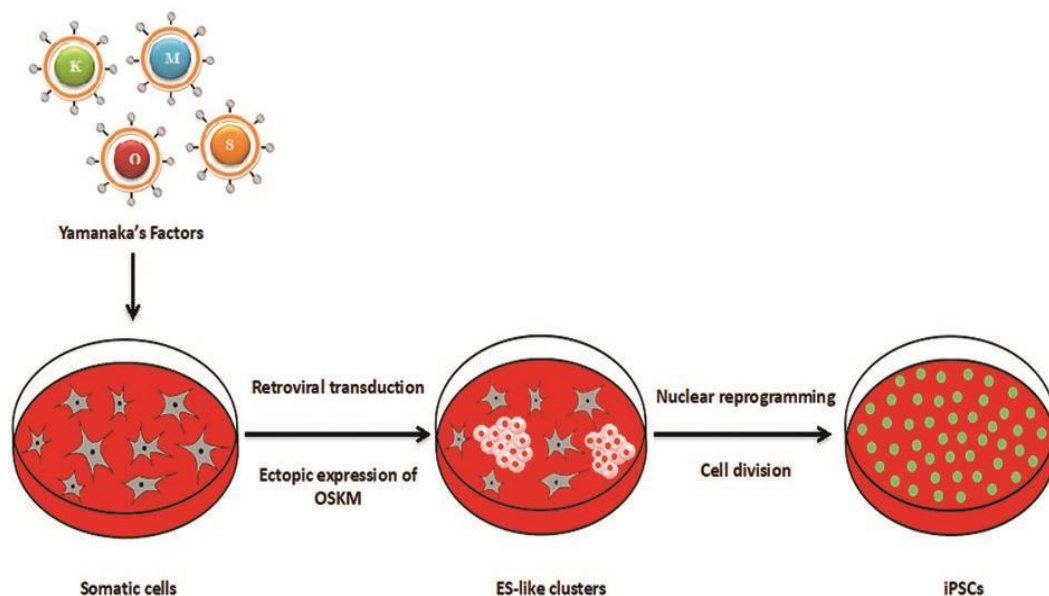


Figura 1.8.1. Esquema da reprogramação nuclear – Expressão ectópica de quatro fatores de transcrição associados à pluripotência (Oct4, Sox2, Klf4 e c-Myc), que inverte o estado celular unipotente em num estado de pluripotência (Al Abbar, Ngai, Nograles, Alhaji e Abdullah, 2020).

Estes quatro fatores são considerados essenciais para estabelecer a pluripotência em células somáticas da seguinte forma. Em primeiro lugar, o c-Myc promove a replicação do ADN, relaxando assim a estrutura da cromatina, que permite ao Oct3/4 aceder aos seus genes-alvo. O Sox2 e Klf4 também cooperam com Oct3/4 para ativar genes-alvo que codificam fatores de transcrição que estabelecem a rede de fatores de transcrição pluripotente e que, juntamente com Oct3/4, Sox2 e Klf4, resultam na ativação dos processos epigenéticos que estabelecem o epigenoma pluripotente. O Klf4 tem uma forte interação com Oct4 e Sox2 para ativar um grupo de fatores de transcrição, tais como Nanog, Klf2, entre outros, e reguladores de vias de sinalização, como Smad1 e Stat3. Estes genes de fatores de transcrição ajudam na pluripotência, e as vias de sinalização proporcionam estabilidade durante a expressão de genes pluripotentes. As células iPS têm um perfil de expressão genética global semelhante ao das células ES do rato (Niwa, 2007 ; Al Abbar, Ngai, Nograles, Alhaji e Abdullah, 2020).

Dentro destes quatro fatores, foi demonstrado que alguns destes fatores de transcrição são fundamentais na manutenção da pluripotência: OCT3/4, SOX2 e NANOG. Foi descoberto que o OCT3/4 e o SOX2 são essenciais para a obtenção de células iPS e que existe a possibilidade de se poder dispensar o NANOG para esse processo. Além disso, o c-MYC e o KLF4 foram considerados como fatores essenciais e relacionados com a tumorigénese e não poderiam ser substituídos por outros oncogenes, como por exemplo o E-RAS. Após a transdução dos fatores de reprogramação nas células somáticas, apenas uma pequena porção de células expressam os quatro fatores e podem assim tornar-se células iPS, existindo algumas explicações para a possibilidade de um baixo sucesso da derivação celular em iPS. Uma destas explicações pode ser a de que a quantidade dos quatro fatores necessários para a geração de células pluripotentes pode ter níveis específicos em intervalos estreitos. Sem os quatro fatores a existirem ao mesmo tempo e nas quantidades certas, não se consegue ter sucesso em gerar células pluripotentes. Consequentemente, apenas uma pequena fração de células que expressa todos os

quatro fatores nos níveis certos é que pode adquirir propriedades semelhantes a células ES (Takahashi e Yamanaka, 2006).

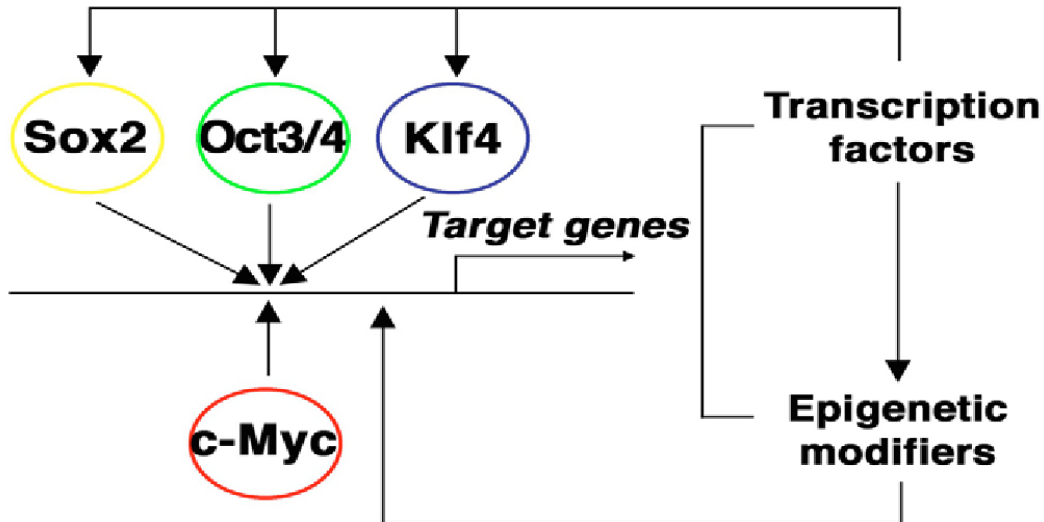


Figura 1.8.2. Estabelecimento de pluripotência que ocorre nos núcleos de células somáticas – Estes quatro fatores de transcrição, Oct3/4, Sox2, Klf4 e c-Myc, foram considerados suficientes para estabelecer a pluripotência nos núcleos de fibroblastos (Niwa, 2007).

Segundo Chen, *et al.* (2017), grande parte da compreensão das características moleculares e celulares da linha celular da HGPS deriva das análises de células, como os fibroblastos dérmicos do paciente, ou da sobreexpressão da progerina em células humanas geneticamente normais. No entanto, a função celular e a expressão epigenética dos fibroblastos são completamente diferentes de outras células, como por exemplo das células vasculares que se podem tornar ateroscleróticas e assim serem responsáveis por doenças cardiovasculares e cerebrovasculares fatais ou dos condrócitos que se deterioram e levam à osteoartrite em pacientes com HGPS.

A pluripotência é mantida durante a autorrenovação celular ES através da prevenção da diferenciação e da promoção da proliferação. De facto, as células ES podem autorrenovar-se continuamente durante anos se forem cultivadas em condições que impeçam a sua diferenciação. Para manter a autorrenovação estável das células ES, os mecanismos que impedem a sua diferenciação e promovem a autorrenovação devem ser transmitidos às células filha. Assim, os níveis de

expressão dos genes envolvidos nestes mecanismos precisam de ser mantidos de forma ativa (Niwa, 2007).

O Klf4 tem o papel de funcionar como um oncogene, mas a sobreexpressão de Klf4 em células ES de rato reduz a capacidade de diferenciação de EBs. O Klf4 também pode ligar-se aos promotores proximais de genes-alvo de Oct3/4, e ajudar a ativar o Oct3/4 e o Sox2 (Niwa, 2007).

O Sox2 ocupa uma posição importante na manutenção da rede de fatores de transcrição pluripotente. O Sox2 consegue cooperar com o Oct3/4 na ativação de genes-alvo oct3/4. Os embriões sem o gene Sox2 morrem imediatamente após a implantação, e a diminuição de Sox2 em células ES do rato induz a diferenciação em várias linhagens (Niwa, 2007).

A proteína Nanog também pode reverter a diferenciação da mesoderme reprimindo a *brachyury*, que codifica o fator de transcrição Tbox específico da mesoderme T. Este fator ativa diretamente a expressão de *nanog*, indicando que o *feedback* negativo está envolvido no equilíbrio entre a autorrenovação e a diferenciação mesodérmica. Assim, Nanog pode bloquear a diferenciação endodérmica primitiva da endoderme, a diferenciação neuronal e a diferenciação mesodérmica, dependendo das diferentes condições de cultura. Ainda assim, Nanog pode não ser muito necessário para estabelecer pluripotência em células iPS, porque a sua expressão endógena nem sempre é ativada em células estaminais pluripotentes, estabelecidas por estes quatro fatores, suportando a hipótese de que a função de Nanog na manutenção da pluripotência é dependente do contexto (Niwa, 2007).

1.9. Manutenção da cultura de células iPS em *feeder* e em *feeder free*

De acordo com Llames, García-Pérez, Meana, Larcher e del Río (2015), as células *feeder* geralmente consistem em células com propriedades de aderência à placa de cultura, mitoticamente inativas, mas viáveis e bioativas. Estas células são usadas como um substrato para regular o meio em que outras células são cultivadas. Muitas vezes, as células *feeder* são irradiadas ou tratadas de outra forma para que não proliferem. Enquanto vários tipos de células são completamente dependentes do contacto físico com as células *feeder* para sobrevivência e expansão, algumas outras células que estiveram em cultura juntamente com células *feeder*, podem ser cultivadas sem *feeder*, desde que as placas de cultura sejam revestidas com proteínas da matriz extracelular, como o geltrex.

As células *feeder* têm de fornecer um ou vários sinais e libertar fatores de crescimento para os meios de cultura para proporcionar a expansão das células-alvo cultivadas, mas têm de ser impedidas de crescer excessivamente na cultura. Outras funções das células *feeder* em cultura são promover a desintoxicação do meio cultural, a sintetização de proteínas da matriz extracelular necessárias para controlar o crescimento das células cultivadas e agir como um substrato para a fixação das células de estudo (Llames, García-Pérez, Meana, Larcher e del Río, 2015).

Para evitar a divisão das células *feeder*, a irradiação ou o uso de Mitomicina continuam a ser os métodos mais utilizados. A escolha do tratamento entre estes dois métodos é muitas vezes relacionada pela disponibilidade de equipamentos, porque a mitomicina está mais disponível e de baixo custo e a irradiação é dispendiosa e demorada. Estes métodos são considerados equivalentes, uma vez que ambos os tratamentos inibem a replicação do ADN, mas fazem-no de maneiras diferentes. A mitomicina é capaz de manter as células nas fases G1, S e G2 do ciclo celular enquanto as células permanecem vitais. É um agente químico e terapêutico que evita a separação do ADN em cadeia dupla durante a replicação celular, formando ligações cruzadas covalentes entre as cadeiras de nucleótidos opostos do

ADN, enquanto o RNA e a síntese proteica continuam Llames, García-Pérez, Meana, Larcher e del Río (2015).



Figura 1.9.1. Tratamentos para inativar células feeder – Após a cultura de células *feeder*, realiza-se o tratamento para inativar as mesmas. Depois pode-se continuar a cultura das células com interesse ao estudo, por cima das células *feeder* (Llames, García-Pérez, Meana, Larcher e del Río, 2015).

Um problema relacionado com a cultura de células estaminais pluripotentes é manter as culturas pluripotentes numa condição indiferenciada e proliferativa sem causar alterações cromossômicas. Para ultrapassar este obstáculo, as iPSCs obtidas são geralmente mantidas em culturas de *Mouse Embryonic Fibroblasts* (MEF) conhecidos como células *feeder* que segregam vários fatores de proteínas desconhecidos, que fornecem um microambiente ideal para que as iPSCs se mantenham num estado de pluripotência. Para a cultura ESC, utiliza-se geralmente os MEF num meio de soro fetal bovino. No entanto, a exposição das iPSCs às células MEF de *feeder* e às suas proteínas animais suplementares, pode apresentar um risco de xenocontaminação. Posteriormente, o geltrex tem sido bastante utilizado como uma das estratégias nas culturas celulares em *feeder free*, para manter as ESCs em cultura a longo prazo, nas passagens celulares e em diferenciação celular (Al Abbar, Ngai, Nograles, Alhaji e Abdullah, 2020).

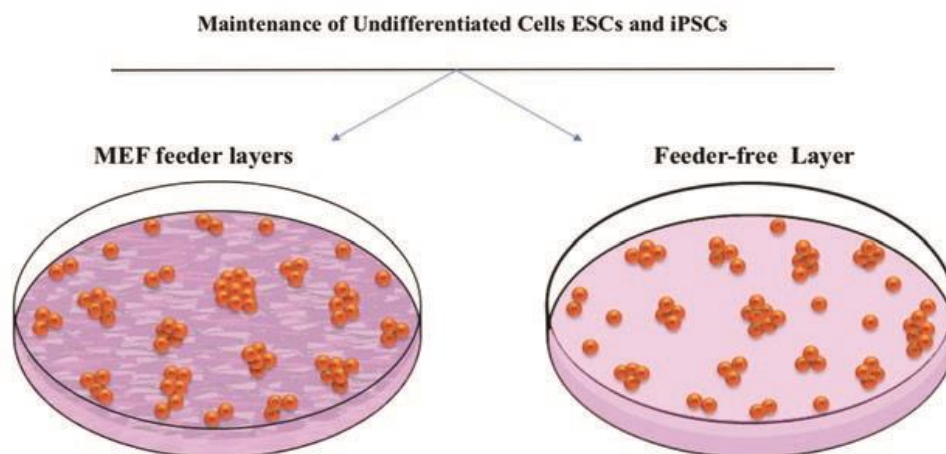


Figura 1.9.2. Cultura de ESCs ou iPSC em placas com *feeder* de MEF e em placas em *feeder free* com geltrex – Os MEF inativados são muito usados como *feeder* em culturas de células pluripotentes, que mantêm a pluripotência em cultura. Para culturas a longo prazo, utiliza-se o geltrex em placas, um sistema *feeder free* com gelatina nas placas (Al Abbar, Ngai, Nograles, Alhaji e Abdullah, 2020).

As células da camada de *feeder* são bastante utilizadas e a sua origem não é uma questão importante quando a cultura tem um propósito *in vitro*. No entanto, quando se está a considerar a utilização clínica, para além da eficácia, devem ser tidas em conta as condições de segurança (Llames, García-Pérez, Meana, Larcher e del Río, 2015).

1.10. Alterações celulares fisiológicas do envelhecimento

A idade avançada em humanos é considerada o maior fator de risco para uma série de doenças, incluindo síndromes neurodegenerativas, cardiovasculares, metabólicas e neoplásicas, levantando a possibilidade de que as abordagens de tratamento direcionadas ao envelhecimento atrasarão o aparecimento de muitas causas de morbidade nos idosos. Esta abordagem requer uma compreensão dos eventos moleculares que condicionam para um declínio fisiológico e condicionam para o envelhecimento do organismo (Burtner e Kennedy, 2010).

Segundo Bitman-Lotan e Orian (2021), o envelhecimento está totalmente ligado à perda de identidade celular e está associado a doenças relacionadas com a idade, incluindo o aumento da suscetibilidade à infecção. É caracterizado por um vasto número de alterações celulares, incluindo a sinalização incorreta, disfunção mitocondrial, e redefinição de redes metabólicas com efeitos tanto no tecido como ao nível do organismo. No núcleo, o envelhecimento está associado a alterações no epigenoma, à função dos poros nucleares e à reorganização em larga escala do núcleo que afeta as lamínas nucleares e os organelos intranucleares. Transcricionalmente, reflete-se na expressão reduzida dos programas específicos das células, na perda de silenciamento e no aumento do ruído transcricional. Por exemplo, o mapeamento em todo o genoma estabeleceu que as regiões abertas de cromatina que estão ativas na divisão de células jovens, tornam-se cada vez mais fechadas após o envelhecimento, enquanto as regiões de heterocromatina compacta tornam-se mais acessíveis. Estas alterações devem-se provavelmente a um declínio na atividade e aos níveis de supervisores de identidade, levando ao envelhecimento da cromatina que é mais homogênea.

A regulação da identidade celular pelas lamínas também é conservada em humanos. A capacidade das células de se dividir *in vitro* é limitada por um processo de envelhecimento celular chamado senescência replicativa. A sensibilidade replicativa está associada a alterações na organização da cromatina, à paragem do ciclo celular e ao aumento da atividade metabólica (Bitman-Lotan e Orian, 2021).

Já em 1950, os danos oxidativos começaram a ser relacionados como um agente causal no processo de envelhecimento. Os radicais de oxigênio são criados durante o processo de respiração, provêm de fontes externas e têm o potencial de danificar quase todos os constituintes celulares, incluindo proteínas, lipídios e ácidos nucleicos. Os danos em todas estas moléculas aumentam com a idade e podem contribuir para o envelhecimento do organismo. As células têm inúmeros mecanismos para se desintoxicar destes agentes, e vários estudos têm sido realizados para aumentar ou reduzir a atividade destes mecanismos de defesa para medir os efeitos no envelhecimento (Burtner e Kennedy, 2010).

Surgiram outras teorias diferentes ao longo do tempo entre os cientistas para explicar o processo fisiológico do envelhecimento. Muitos descrevem a acumulação de danos celulares como causa, e não excluem a hipótese relacionada com os danos oxidativos. Por exemplo, as células isoladas do envelhecimento dos indivíduos acumularam danos nucleares de DNA, proteínas dobradas e um aumento de deleções mitocondriais de DNA que são mais frequentes. Todos estes eventos foram pesquisados para impulsionar aspectos gerais e específicos que ajudem a explicar o processo de envelhecimento normal (Burtner e Kennedy, 2010).

Vários modelos diferentes podem estar parcialmente corretos. Diferentes tipos de danos podem acumular-se a taxas diferentes em indivíduos de uma população. Quando estes diferentes agentes prejudiciais atingem um patamar de toxicidade, podem começar a surgir problemas ligados ao processo de envelhecimento. Os seres humanos e outros seres vivos não morrem do envelhecimento, em vez disso, adoecem e morrem devido a doenças que surgem provocadas pelo envelhecimento. Por exemplo, o aumento dos danos nucleares do DNA pode estar subjacente ao aumento da incidência de cancro. Uma explicação para a diferença de danos é que alguns tipos de danos podem ter pouco impacto no envelhecimento em indivíduos saudáveis, mas são altamente prejudiciais em indivíduos pouco saudáveis. Também a obesidade e a doença metabólica podem aumentar tanto as taxas de acumulação de radicais oxidativos como a sua capacidade de causar danos (Burtner e Kennedy, 2010).

Por um lado, para se estudar a longevidade humana podem ser realizados estudos com o objetivo de se observar a senescência celular em cultura. Por outro lado, as células senescentes também podem ser vistas *in vivo*, em que o *stress* celular pode conduzir para um rápido aparecimento de um fenótipo senescente (Burtner e Kennedy, 2010).

Em contraste com os idosos, os indivíduos com HGPS não estão predispostos a uma maior incidência de neoplasia, possivelmente porque a morte devido a doença aterosclerótica grave não permite o seu aparecimento num momento futuro. No envelhecimento fisiológico, o encurtamento dos telômeros ocorre à medida que as células se aproximam da senescência replicativa. A perda de DNA telomérico, que ocorre em resultado do envelhecimento *in vitro* e *in vivo*, inicia uma resposta de verificação de danos do DNA (Burtner e Kennedy, 2010).

1.11. Células iPS da linha HGPS como modelo do envelhecimento

Segundo Chen, *et al.* (2017), foi demonstrado em estudos anteriores que as células iPS da linha HGPS conseguem reverter para um estado pluripotente normal – pois não existe a utilização da proteína lamina A mutante nas células iPS, não influenciando o funcionamento normal das células iPS – e são capazes de diferenciar-se numa linhagem afetada que reflete o fenótipo da doença. As células iPS fornecem uma fonte de células praticamente ilimitada, que podem então ser diferenciadas em células específicas para estudar aspetos particulares do tecido conforme a progressão da doença.

Outros estudos descobriram os mecanismos subjacentes à herança epigenética alterada na Progeria e no envelhecimento. Os dados obtidos destes estudos mostraram que com a acumulação de progerina, os fibroblastos com HGPS apresentam vários defeitos celulares, incluindo núcleos dismórficos aumento dos danos no ADN expressão alterada de várias proteínas nucleares e alterações na expressão da cromatina (Eriksson, *et al.*, 2003; Chen, *et al.*, 2017).

De acordo com Matrone, Thandavarayan, Walther, Meng, Mojiri e Cooke (2019), o envelhecimento prematuro observado em pacientes com a Progeria está associado a uma mutação no gene *LMNA*. Esta mutação resulta na geração de uma proteína lamina A anormal que se acumula no envelope nuclear e causa um núcleo dismórfico, com a desorganização da lâmina nuclear e da heterocromatina. Assim, os pacientes com HGPS apresentam um envelhecimento prematuro associado a doenças coronárias e vasculares que causam particularmente a morte no início da adolescência.

Como descrito em Olive, *et al.* (2010), as lesões relacionadas com a HGPS são sobretudo fibróticas e parecem refletir o espectro de lesões causadas por ateromas, que estão presentes com o avanço do envelhecimento. Embora existam semelhanças a nível de doenças cardíacas e vasculares entre a HGPS e o envelhecimento, como o bloqueio severo dos vasos, há também a falta de fatores de risco clássicos na HGPS, como os níveis elevados de colesterol. Excluindo estes fatores de risco, o

estudo da HGPS pode proporcionar uma oportunidade para descobrir novos elementos que influenciam as doenças vasculares no envelhecimento. Está demonstrado também que existe um componente que ocorre durante o processo normal de envelhecimento, que é a progerina, estando presente nas artérias coronárias dos indivíduos que pertencem ao grupo de envelhecimento natural com ausência da doença HGPS e que tende a aumentar com o avanço da idade.

Segundo Skoczyńska, Budzisz, Dana e Rotsztejn (2015), a progerina afeta a organização dos cromossomas através da alteração da distribuição e do nível de heterocromatina, assim como provoca um encurtamento nos telómeros. Esta expressão desta proteína provoca alterações na função e na forma do núcleo em células com a síndrome de Progeria, mas também em células com ausência desta patologia e que sejam saudáveis. Assim o nível de expressão da lamina A mais curta em células sem a doença está relacionada com o envelhecimento. As mudanças que aparecem no núcleo celular dos idosos são semelhantes às de pessoas com HGPS, dentro das quais se referem mais frequentemente os danos no ADN, a modificação das histonas e a deslocação de proteínas para o núcleo. Foi descoberto que a progerina se pode acumular na pele, língua, tórax, coração, fígado, rim, estômago, bexiga, pâncreas, baço, tiroide, tecido adiposo, artérias, ossos e músculos esqueléticos.

As células estaminais pluripotentes induzidas oferecem uma abordagem experimental para explorar os mecanismos moleculares associados à Progeria de uma forma específica em vários tecidos. Além disso, a maioria dos estudos da Progeria utilizando fibroblastos dérmicos do paciente foram realizados com base no pressuposto de que a acumulação de progerina conduz diretamente a danos de ADN e perda de heterocromatina. Quando se faz o processo de reprogramação da expressão da progerina e se revertem as células HGPS para um estado pluripotente com uma situação epigenética embrionária, as células iPS provenientes de fibroblastos com a doença de HGPS têm a capacidade de permitir uma modelização e análise longitudinal da progressão da doença da Progeria. Assim, permite o estudo desde o início da expressão de progerina, nos primeiros anos de vida, até ao

aparecimento de defeitos nucleares a que estas células podem estar sujeitas com o avanço da idade (Chen, *et al.*, 2017; Takahashi, Tanabe, Ohnuki, Narita, Ichisaka, Tomoda e Yamanaka, 2007).

As espécies reativas de oxigénio acumulam-se a uma taxa mais elevada nos fibroblastos HGPS, que é uma característica interessante e que é partilhada com os fibroblastos normalmente envelhecidos. Isto pode contribuir para o aumento dos níveis de danos em DNA e pode estar na base de defeitos de proliferação ou senescência precoce associados às células HGPS (Burtner e Kennedy, 2010).

1.12. Uso na clínica das células iPS

Para além do estudo de doenças e da descoberta de fármacos, um dos maiores potenciais das iPSCs está na terapia de substituição celular e genética para muitas doenças genéticas e degenerativas. Neste caso, as células somáticas de um paciente com uma determinada doença seriam isoladas e cultivadas em laboratório. As células seriam tratadas com o processo de substituição do gene causador da doença por um gene saudável, e depois seriam reprogramadas para iPSCs através de transferência de genes virais ou não virais. As iPSCs geneticamente modificadas serão posteriormente diferenciadas no subtipo celular afetado, necessário para o paciente. As células seriam depois implantadas no paciente. Esta abordagem de transplante autólogo pode prevenir complicações graves, tais como doenças de rejeição do enxerto de células vindas de um hospedeiro, que ocorrem geralmente após o transplante heterólogo (Al Abbar, Ngai, Nogales, Alhaji e Abdullah, 2020).

A geração de células pluripotentes diretamente das próprias células somáticas dos pacientes é uma forma de contornar algumas questões éticas. Por outras palavras, existem questões éticas relacionadas com a utilização de embriões humanos para derivação de células ES (Takahashi e Yamanaka, 2006).

O transplante de tecidos ou células para uso na clínica pode ser de dois tipos: transplante autólogo ou transplante alogénico. O transplante autólogo usa as células do próprio paciente que as recebe e o transplante alogénico utiliza as células de um dador que é diferente do indivíduo que as vai receber (Takahashi e Yamanaka, 2006).

O transplante alogénico pode resultar no problema da rejeição do tecido após o transplante em pacientes, sendo por isso benéfico o recurso ao uso de células do próprio paciente para obter células pluripotentes induzidas e assim realizar a terapia mais adequada a esse caso clínico (Takahashi e Yamanaka, 2006).

Assim, poder-se-ia recolher células do próprio paciente, reprogramá-las para obter células iPS e posteriormente criar células e tecidos para uso autólogo, que apresenta

melhores probabilidades de aceitação por parte do corpo do paciente, pois serão idênticas. Além disso, a obtenção de células iPS é uma fonte celular com potencial de diferenciação ilimitado que permite outras investigações para novas possíveis terapias (Chen, *et al.* (2017).

Os células humanas de iPSCs são uma perspectiva promissora para a terapia celular de um grande número de doenças para as quais não existem atualmente tratamento que elimine a doença definitivamente ou terapias eficazes, tais como no caso de doenças neurodegenerativas do sistema nervoso central, enfarte do miocárdio, diabetes *mellitus*, e doenças do fígado (hepatites), pulmão e rim. Dado que as iPSCs podem ser produzidas a partir de células do próprio paciente, podem ser utilizados em transplantes autólogos, evitando complicações de rejeição pelo sistema imunológico (Moradi, Mahdizadeh, Šarić, Kim, Harati, Shamsavarani, Greber e Moore, 2019).

Desde o primeiro transplante autólogo em humanos de células derivadas de iPSC em 2014, tem havido um crescimento recente nos esforços para introduzir terapias baseadas em iPSC autólogos para a clínica. As células iPSC epiteliais do epitélio pigmentar da retina foram as primeiras células obtidas em iPSC a serem transplantadas em humanos, realizado em 2014 no Japão. Este transplante foi realizado para tratar a degeneração macular relacionada à idade, uma doença crônica caracterizada pela degeneração de células do epitélio pigmentar da retina e a principal causa de perda de visão entre indivíduos com mais de 60 anos (Madrid, Sumen, Aivio, Saklayen, 2021).

Houve três principais razões pelas quais as células do epitélio pigmentar da retina foram o primeiro transplante com utilização de iPSC. Em primeiro lugar, o olho é relativamente fácil para obter exames médicos e imagens e é de fácil acesso cirurgicamente. Em segundo lugar, as células do epitélio pigmentar da retina foram o primeiro tipo de célula ocular a serem diferenciadas através de iPSCs, em 2009. Por último, em experiências cirúrgicas anteriores ficou demonstrado que funcionou o uso de células autólogas para terapia clínica no tratamento da doença degeneração macular relacionada à idade (Madrid, Sumen, Aivio, Saklayen, 2021).

A segunda terapia celular autóloga com uso de células obtidas de células iPSC transplantadas num ser humano consistiu em células progenitoras do cérebro médio derivadas de iPSC, transplantadas no cérebro de um homem de 69 anos com um historial de 10 anos da doença de Parkinson. Esta é uma doença neurodegenerativa progressiva que afeta cerca de 7 a 10 milhões de pacientes em todo o mundo. A degeneração dos neurónios dopaminérgicos leva a sintomas motores como tremores e lentidão de movimentos musculares (Madrid, Sumen, Aivio, Saklayen, 2021).

O terceiro transplante autólogo em humanos de células derivadas de iPSC foi um estudo de um único paciente. O paciente sofria de anemia aplásica, uma doença rara caracterizada em parte por trombocitopenia (baixa contagem de plaquetas). A transfusão alogénica de plaquetas de doadores de sangue é o tratamento padrão para a trombocitopenia (Madrid, Sumen, Aivio, Saklayen, 2021).

1.13. Objetivo do trabalho de investigação

Como objetivo deste trabalho, foi proposto obter células iPS que serviriam para ser um modelo de células com características do envelhecimento fisiológico a partir de fibroblastos com Progeria. O procedimento teve início com a realização da transdução de fibroblastos com progeria com o objetivo de se obter células iPS. Estas células deverão adquirir características em cultura específicas, gerar colónias e manter o seu estado de pluripotência, para mais tarde poderem ser utilizadas em outras investigações.

Na cultura de fibroblastos de progeria usados para a transdução, tem-se o objetivo de realizar com *feeder* em MEF, com *feeder* em HFF e em *feeder free* de geltrex, para se saber qual o método que melhor funcionava, bem como obter a cultura de células iPS em *feeder free* em geltrex, sem ter os fibroblastos que serviam de *feeder* na cultura celular, quer sejam os MEF ou os HFF.

Depois de obter várias colónias de células iPS, denominados por clones a partir das mesmas células transduzidas, foi ainda realizado a caracterização de células iPS da pertencentes à linha celular de fibroblastos com HGPS, que teriam sido retirados de uma paciente com Progeria.

A caracterização deverá determinar se as células iPS contêm características de pluripotência, tais como marcadores de pluripotência, possibilidade de diferenciação em diferentes tipos celulares, capacidade de autorrenovação e de manter a pluripotência com as sucessivas passagem em cultura celular.

A caracterização das células iPS tem como objetivo saber se é possível realizar a reprogramação de células de fibroblastos com Progeria para futuramente utilizar em outros estudos, tendo assim um modelo de células do envelhecimento que podem ser semelhantes a células do envelhecimento fisiológico.

2. Materiais e métodos

Os fibroblastos de Progeria foram isolados de uma pessoa do sexo feminino, com 14 anos, segundo Coriell Institute for Medical Research (2021), e foram utilizados neste estudo como base celular para obter células iPS da linha celular HGPS, cuja referência é a GM01972. Os fibroblastos adquiridos já se encontravam na passagem 11 e utilizou-se para a transdução o método livre de transgenes do Kit do *CytoTune-iPSC 2.0 Sendai Reprogramming*, que é composto por três preparações de vetores: 1) KOS composto por Klf4, OCT3/4 e SOX2; 2) c-Myc; 3) e o Klf4. O protocolo utilizado é também do *CytoTune-iPSC 2.0 Sendai Reprogramming*, descrito em *Reprogram Fibroblast – Feeder Dependent* e em *Reprogram Fibroblast – Feeder Free*.

2.1. Cultura de fibroblastos de Progeria

O procedimento de cultura celular teve o seu início com a descongelação e a passagem dos fibroblastos de Progeria de uma paciente para um frasco T75 com o meio de fibroblastos (DMEM 1X, Glutamax, 10% FBS, 1% NEAA (*Non-Essential Amino Acids*), 1% Penicilina/Estreptomicina e 50 μ M *B-Mercaptoethanol*), que se encontravam em passagem 16.

O meio de cultura destes fibroblastos com HGPS foi mudado a cada dois dias e a sua passagem foi realizada posteriormente para outro frasco T75 quando atingissem quase a confluência quase total do frasco T75. Para realizar a passagem, primeiro aspirou-se o meio existente, lavou-se com PBS e usou-se a tripsina para destacar os fibroblastos do frasco T75. Em seguida, passou-se para outro frasco T75 e colocou-se o meio de cultura para fibroblastos (DMEM 1X, Glutamax, 10% FBS, 1% NEAA (*Non-Essential Amino Acids*), 1% Penicilina/Estreptomicina e 50 μ M *B-Mercaptoethanol*).

2.2. Cultura de fibroblastos de *feeder* (antes do dia 7)

Também se descongelou e cultivou os fibroblastos *feeders*, os *Human Foreskin Fibroblasts* (HFF), que se encontravam em passagem 9, para um frasco T25. Na cultura destes fibroblastos HFF, deve-se colocar também o meio de fibroblastos (DMEM 1X, Glutamax, 10% FBS, 1% NEAA (*Non-Essential Amino Acids*), 1% Penicilina/Estreptomicina e 50 μ M *B-Mercaptoethanol*). A troca deste meio é realizada de dois em dois dias.

Fez-se a passagem destes fibroblastos HFF para um novo frasco T25 quando atingissem quase a confluência total do frasco T25. Pode-se realizar a passagem para dois frascos T75, pois assim consegue-se obter mais fibroblastos para fazer a inativação com mitomicina C.

Com estes fibroblastos HFF inativados, realiza-se a cultura celular destes em placas de 6 poços, que servirão de *feeder* para os fibroblastos transduzidos com HGPS.

2.3. Início do processo de transdução de fibroblastos com HGPS (dia -2 até dia 6)

Dois dias antes da transdução (dia -2), foram plaqueados os fibroblastos da linha HGPS em dois poços de uma placa de 6 poços (com 100.000 e 125.000 células por poço), o que aumentou a passagem celular de 16 para a passagem 17.

Ao dia 0, fez-se a transdução usando o Kit do *CytoTune-iPSC 2.0 Sendai Reprogramming* composto por três preparações de vetores: KOS (Klf4, OCT3/4 e SOX2), c-Myc e o Klf4. Cada poço levou 1 mililitro de meio de fibroblastos (DMEM 1X, Glutamax, 10% FBS, 1% NEAA (*Non-Essential Amino Acids*), 1% Penicilina/Estreptomicina e 50 μ M *B-Mercaptoethanol*), mais os vetores (17 μ l KOS, 17 μ l c-Myc e 10 μ l de Klf4).

Até ao dia 6, este meio de cultura deve ser alterado diariamente. Deixou-se os fibroblastos nos poços com o meio de fibroblastos (DMEM 1X, Glutamax, 10% FBS, 1% NEAA (*Non-Essential Amino Acids*), 1% Penicilina/Estreptomicina e 50 μ M *B-Mercaptoethanol*).

2.4. Inativação dos fibroblastos HFF com mitomicina C (antes do dia 7)

Antes do dia 7, os HFF inativados foram plaqueados em dois poços da placa de 6 poços (cada com 300.000 células por poço) com coating de geltrex.

A inativação de fibroblastos HFF com mitomicina C é um procedimento necessário para o uso na reprogramação de fibroblastos com HGPS, uma vez que os fibroblastos HFF servirão como *feeder* para os fibroblastos HGPS, permitindo às células de fibroblastos com doença de HGPS aderirem melhor ao poço da placa e obterem nutrientes para a sua sobrevivência. Os fibroblastos HFF deverão estar confluentes dentro de um frasco com o tamanho adequado (T75 ou outro) para que se tenha a quantidade para plaquear vários poços de uma placa.

Começou-se por retirar o meio dos fibroblastos e lavar com *Phosphate Buffered Saline* (PBS). Depois, preparou-se uma mistura de meio de fibroblastos (DMEM 1X, Glutamax) não suplementado com mitomicina C (1mg/ml) e colocou-se no frasco, deixando 3 horas a atuar dentro da incubadora. Até este ponto, as luzes devem estar apagadas, pois a mitomicina C é sensível à luz.

Depois de passarem 3 horas a inativar dentro da incubadora, retirou-se a mitomicina C, lavou-se com PBS e usou-se a tripsina para destacar os fibroblastos da placa para que fossem plaqueadas 300 mil células, por poço, para uma nova placa de 6 poços. Esta placa estava previamente revestida com geltrex. Para se saber a quantidade de células a plaquear, deve-se fazer a contagem numa câmara de *Newbauer*.

Estas células são mantidas em meio de fibroblastos (suplementado) até à passagem dos HGPS transduzidos para junto destes, em que o meio é trocado para meio iPS + BFGF. Este meio de cultura é usado nas células de fibroblastos com HGPS transduzidas que permite a manutenção das células em células iPS sem que diferenciem.

2.5. Preparação para passagem de fibroblastos com HGPS transduzidos para *feeder* em HFF (dia 7)

Antes da passagem dos fibroblastos com HGPS transduzidos para junto dos fibroblastos MEF, é importante realizar a cultura celular dos fibroblastos HFF antes, o qual deve ser realizado ao dia 5 ou ao dia 6, desde o início da transdução dos fibroblastos com HGPS. No caso desta experiência, realizamos a cultura dos fibroblastos HFF para um frasco T25 antes do dia 0 da transdução dos fibroblastos com HGPS.

Para iniciar a cultura celular de fibroblastos HFF, descongelou-se os fibroblastos HFF, colocando dentro de água quente num suporte, sem deixar descongelar totalmente e aproximadamente durante 1 minuto.

Quando estiver quase líquido, passou-se os fibroblastos HFF descongelados para um falcon de 15 ml, que contem 4ml de meio de fibroblastos (DMEM 1X, Glutamax, 10% FBS, 1% NEAA (*Non-Essential Amino Acids*), 1% Penicilina/Estreptomicina e 50 μ M *B-Mercaptoethanol*).

Fez-se a centrifugação a 800rpm e durante 4 minutos do falcon de 15ml, que contem o meio de cultura de fibroblastos e as células de fibroblastos HFF.

Aspirou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o pellet celular em 2ml de meio de fibroblastos (DMEM 1X, Glutamax, 10% FBS, 1% NEAA (*Non-Essential Amino Acids*), 1% Penicilina/Estreptomicina e 50 μ M *B-Mercaptoethanol*).

Estas células são mantidas em meio de fibroblastos (DMEM 1X, Glutamax, 10% FBS, 1% NEAA (*Non-Essential Amino Acids*), 1% Penicilina/Estreptomicina e 50 μ M *B-Mercaptoethanol*) até à passagem dos fibroblastos HGPS para os fibroblastos HFF *feeder*, que ocorre ao dia 7.

Assim ao dia 7, foi feita a passagem dos fibroblastos HFF para 2 poços de uma placa de 6 poços. Depois passou-se os fibroblastos com HGPS transduzidos para a placa de 6 poços com *feeder* HFF, para o poço 2 que continha 300 μ l de suspensão

celular e para o poço 5 com 700µl da suspensão celular de fibroblastos com HGPS, com o meio de cultura de fibroblastos.

Ao dia 8, o meio de cultura é trocado para meio de cultura para células iPS (30,62 ml de KO DMEM, 8 ml de KO serum, 400µl de Glutamax, 400µl de NEAA (*Non-Essential Amino Acids*), 400µl de Penicilina/Estreptomicina e 184µl de *B-Mercaptoethanol*).

Este meio de cultura é usado nas células de fibroblastos com HGPS transduzidas que permite a manutenção das células em células iPS sem que diferenciem.

2.6. Preparação para passagem de fibroblastos com HGPS transduzidos para *feeder* em MEF (dia 7)

Para a preparação da passagem dos fibroblastos com HGPS transduzidos para junto dos fibroblastos MEF, é necessário primeiro realizar a cultura celular dos fibroblastos MEF.

Este procedimento pode ser realizado ao dia 5 ou ao dia 6, desde o início da transdução dos fibroblastos com HGPS.

Para começar a cultura celular de fibroblastos MEF, primeiro é necessário fazer o *coating* da placa de cultura de 100mm de diâmetro, com 4ml de gelatina Cascade Biologics Attachment factor 1X (Gibco). A gelatina deve cobrir todo o fundo da placa e ficar bem espalhada. Depois, a placa de 100mm com *coating* de gelatina deve ficar cerca de duas horas à temperatura ambiente.

Após o tempo descrito, descongelou-se os fibroblastos MEF, colocando dentro de água quente num suporte, sem deixar descongelar totalmente e aproximadamente durante 1 minuto.

Quando estiver quase líquido, passou-se para um falcon de 15 ml, que contem 4ml de meio de fibroblastos (DMEM 1X, Glutamax, 10% FBS, 1% NEAA (*Non-Essential Amino Acids*), 1% Penicilina/Estreptomicina e 50 μ M *B-Mercaptoethanol*).

Fez-se a centrifugação a 800rpm e durante 5 minutos do falcon de 15ml, que contem o meio de cultura de fibroblastos e as células de fibroblastos MEF.

Aspirou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o pellet celular em 3ml de meio de fibroblastos (DMEM 1X, Glutamax, 10% FBS, 1% NEAA (*Non-Essential Amino Acids*), 1% Penicilina/Estreptomicina e 50 μ M *B-Mercaptoethanol*).

Realizou-se a contagem celular na camara de Newbauer para depois se passar 1 milhao e 500 mil células de fibroblastos MEF para a placa de cultura. Aspirou-se a

gelatina que estava dentro da placa de cultura, depois de terem passado duas horas, e depois passou-se os fibroblastos.

Estas células são mantidas em meio de fibroblastos (DMEM 1X, Glutamax, 10% FBS, 1% NEAA (*Non-Essential Amino Acids*), 1% Penicilina/Estreptomicina e 50 μ M *B-Mercaptoethanol*) até ao dia depois da passagem dos HGPS transduzidos para a placa que contem o *feeder* MEF, que ocorreu ao dia 7.

Ao dia 8, o meio de cultura é trocado para meio de cultura para células iPS (30,62 ml de KO DMEM, 8 ml de KO serum, 400 μ l de Glutamax, 400 μ l de NEAA (*Non-Essential Amino Acids*), 400 μ l de Penicilina/Estreptomicina e 184 μ l de *B-Mercaptoethanol*), com adição de 2 μ l de BFGF.

Este meio de cultura é usado nas células de fibroblastos com HGPS transduzidas que permite a manutenção das células em células iPS sem que diferenciem.

2.7. Preparação para passagem de fibroblastos com HGPS transduzidos para *feeder free* (dia 7)

Ao dia 7, o outro poço da placa de HGPS transduzidos foi transferido para uma placa de geltrex (*feeder free*) e estas células foram então cultivadas em meio mTeSR.

Antes de se fazer o revestimento das placas com geltrex, foi necessário preparar a mistura de geltrex com DMEM:F12 na proporção 1:100, misturar bem e colocar a devida quantidade por placa. Antes de se usar, deixou-se a placa 1 hora à temperatura ambiente.

Depois, aspira-se o restante líquido que fica na placa de cultura que foi coberta com geltrex, para se passar os fibroblastos HGPS transduzidos para esta. O meio de cultura utilizado na placa é o meio de fibroblastos (DMEM 1X, Glutamax, 10% FBS, 1% NEAA (*Non-Essential Amino Acids*), 1% Penicilina/Estreptomicina e 50 μ M *B-Mercaptoethanol*).

Ao dia 8, trocou-se o meio que estava nesta placa *feeder free*, para o meio de cultura mTeSR (StemCell).

2.8. Manutenção e passagem das colónias de fibroblastos (após dia 8)

No dia 8, o meio de cultura usado nas células HGPS transduzidas foi substituído de meio de fibroblastos para o meio utilizado na cultura de células iPS, com adição de *Basic Fibroblast Growth Factor* (BFGF). Aos poucos e com o avanço dos dias transitou-se do meio iPS para o meio mTeSR, o qual deve ser trocado todos os dias.

Desde o dia 9 em diante, sempre que se justificou a passagem das colónias, ela teve de ser realizada para novas placas contendo HFF inativados e cultivados numa base de geltrex, que serviria de *feeder* para as colónias.

A passagem das colónias foi manual, ou seja, sem uso de agentes de dissociação celular (tal como a tripsina), picando as colónias que apresentavam melhor forma e tamanho para novas placas de 6 poços, conforme o poço atingia a confluência e com o crescimento das colónias.

O processo de picar colónias consiste em usar a ponta que se usa na micropipeta para se fazer a fragmentação da colónia em vários pedaços mais pequenos. Depois aspira-se estes pedaços pequenos de várias colónias fragmentadas e passa-se para uma nova placa. Cada pedaço pequeno desta colónia fragmentada irá gerar uma nova colónia.

Também é importante realizar durante a cultura de colónias iPS, a limpeza das mesmas sempre que se verifique importante. Ao microscópio, é possível ver algumas zonas mais densas no centro da colónia. Estas zonas podem conter células iPS que já estejam a começar a diferenciar e por isso devem ser removidas antes da passagem da colónia. O procedimento é realizado com a agulha de uma seringa, destacando mecanicamente algumas zonas mais densas do fundo da placa. Essas células ficam em suspensão no meio de cultura e depois são aspiradas do poço da placa de cultura. Seguidamente, a colónia é picada e passada para uma nova placa.

2.9. Passagem das colônias de fibroblastos de HGPS das placas em *feeder* para placas em *feeder free*

Após a cultura e manutenção dos fibroblastos com HGPS nos respectivos clones 7 e 9 na placa, possibilitou-se o crescimento de colônias que deve ser cuidada diariamente com a troca do meio de cultura. Deve-se realizar a passagem destas colônias quando o poço atingisse quase a confluência total para outra placa nova, mantendo sempre num poço revestido de fibroblastos de HFF, ou seja, mantidos em *feeder*.

Mais tarde, após várias semanas de cultura das colônias, pode-se realizar a passagem desde um poço em *feeder* para um poço em *feeder free*. Para tal, utilizou-se o trypLE para realizar a passagem de cada poço individual dos clones 7 e 9 para placas em *feeder free*, revestidas em geltrex.

O trypLE é uma enzima que serve para dissociar as células aderidas ao plástico das placas, permitindo a sua passagem para outras placas. Estas células iPS da linha celular HGPS que estavam nestas placas, tiveram de ser mantidas em meio mTeSR e passadas conforme atingiam a confluência para novas placas.

2.10. Diferenciação das linhas celulares iPS dos clones 7 e 9 em *Embryoid Bodies* (corpos embrióides)

Foi necessário ter confluência do clone 7 (C7) e do clone 9 (C9) em placas de 35mm para começar este processo. Preparou-se a placa de 12 poços de *low attachment* com *cover slips* (Corning®) e *coating* em geltrex para mais tarde se poder observar ao microscópio e fez-se este processo em triplicado para o clone 7 e para o clone 9.

Foi utilizado o *Polyvinyl Acetate* (PVA) com 0,4% de concentração final (40mg de PVA diluídos em 10ml de mTeSR, num falcon de 50ml) e *rock inhibitor* (2 µl no poço que contém o *mix* de 2ml de meio mTeSR + 0,4% de PVA) para ajudar as células a aderirem ao poço em *cover slips*.

O PVA pode ajudar no processo de diferenciação das células iPS, fazendo agregados celulares com potencial para diferenciar, ajudando, no entanto, na aderência das células ao *cover slip*. Para a passagem das células da placa de 35mm para os poços da placa de 12 usou-se o *scraper* e a micropipeta de 1000µl.

O meio de cultura foi mudado de dois em dois dias, o qual é composto por 77% de KO DMEM, 20% de KSR, 1% de Glutamax, 1% de NEAA, 1% de Penicilina/Estreptomicina e 50uM de 2-ME.

Após passarem 5 semanas de cultura de células em meio de cultura de diferenciação, para esta placa com o triplicado do clone 7 e do clone 9, e após 7 semanas para um poço único do clone 9 de uma outra placa anterior, foi realizada a imunocitoquímica, a qual se descreverá em seguida.

Mais tarde, foi possível realizar a imunofluorescência para a obtenção das imagens com recurso ao microscópio de fluorescência Axioimager Z2 (Zeiss).

2.11. Imunocitoquímica

Foi realizada a cultura de células em placas de 12 poços (VWR® *Tissue Culture Plates*) com lamelas de vidro revestidas com geltrex (mistura de geltrex com DMEM:F12 na proporção 1:100).

As células do poço foram lavadas com PBS (1X) para depois serem fixadas com Paraformaldeído (PFA) 4%, durante 15 minutos, à temperatura ambiente.

As células fixadas foram lavadas três vezes com PBS, durante 5 minutos, por cada lavagem e em seguida colocadas em solução de bloqueio (PBS-*Triton* em que se adicionou 2% de *Bovine Serum Albumin* (BSA)) durante 1 hora, à temperatura ambiente.

Foi removida a solução de bloqueio e as células foram incubadas durante 1 hora à temperatura ambiente com o anticorpo primário para os marcadores de pluripotência: *Rabbit-NANOG* (1:400), *Rabbit-SOX2* (1:400), *Rabbit-OCT4* (1:400) e *Mouse-SSEA4* (1:100), diluídos na solução de bloqueio.

Num outro ensaio, para a diferenciação das iPS em EB, as células foram incubadas durante 1 hora, à temperatura ambiente, utilizando os anticorpos primários para os marcadores de diferenciação *Rabbit-αFP* (1:100), *Mouse-αSMA* (1:200) e *Mouse-TUJ1* (1:200), diluídos na solução de bloqueio.

Após a incubação, as amostras foram lavadas 3 vezes, durante 5 minutos, com PBS-*Triton* à temperatura ambiente e incubadas com os anticorpos secundários durante 1 hora, à temperatura ambiente.

Foram utilizados os anticorpos secundários *Rabbit-594* (1:500) e *Mouse-488* (1:500) para o procedimento com os marcadores de pluripotência.

Foram utilizados os anticorpos secundários, tais como *goat* anticorpo *Mouse-488* (1:500) e *goat* anticorpo *Rabbit-488* (1:500), no ensaio da diferenciação de iPS em EB.

Após 3 lavagens, durante 5 minutos, à temperatura ambiente com PBS-*Triton*, foram montadas lâminas (*microscope slides, Lab Box*) com o meio de montagem *Fluoromount-G (Thermo Fisher Scientific)* que continham DAPI, para o ensaio com os marcadores de pluripotência e para o ensaio com os marcadores da diferenciação. Posteriormente foram analisadas num microscópio de fluorescência Axioimager Z2 (Zeiss).

2.12. Detecção da fosfatase alcalina

Foi realizado o protocolo para deteção da fosfatase alcalina utilizando *Alkaline Phosphatase Staining Kit II (Stemgent)* tanto para o clone 7 como para o clone 9 da linha celular HGPS.

Foi realizada a cultura de células iPS da linha celular HGPS em placas de 12 poços (VWR® *Tissue Culture Plates*) com lamelas de vidro revestidas com geltrex (mistura de geltrex com DMEM:F12 na proporção 1:100).

Após alguns dias, foram lavadas com PBS (1X) para depois serem fixadas com Fix Solution (disponível no kit), durante 5 minutos, à temperatura ambiente.

As células fixadas foram lavadas uma vez com PBS-Triton (1X) e depois foi adicionada a solução AP substrate, incubando, durante 15 minutos, à temperatura ambiente, sem presença de luz.

Depois da incubação, foi removida a solução, as células foram lavadas duas vezes com PBS (1X) e foram montadas as lâminas (*microscope slides, Lab Box*) com o meio de montagem *Fluoromount-G (Thermo Fisher Scientific)* que continha DAPI.

A expressão de fosfatase alcalina resultou numa coloração vermelha ou roxa, enquanto a falta de expressão de fosfatase alcalina resultou em ausência de coloração.

2.13. Extração de RNA e realização da RT-PCR

Foi realizada uma RT-PCR para as linhas celulares de iPS do clone 7 e do clone 9 dos HGPS para detecção de SEV (sendai Vírus), KOS, KLF e c-Myc, na passagem 12 e posteriormente na passagem 33.

Extraíu-se o RNA das células de iPS do clone 7 e 9 usando o kit Nzytech. Para obter o *complementary Deoxyribonucleic Acid* (cDNA) foi utilizado 1 µg do RNA total, usando o kit NZY First-Strand cDNA Synthesis (nzytech). Ocorreu a reação da RT-PCR e foram vistos os resultados num gel de agarose a 2%.

Os primers utilizados estão representados na figura abaixo.

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

Figura 2.12.1. Conjunto de *primers* utilizados na RT-PCR – Foram utilizados os *primers* na RT-PCR para as linhas celulares de iPS do clone 7 e do clone 9 dos HGPS para detecção de SEV (sendai Vírus), KOS, KLF e c-Myc

3. Resultados

3.1. Cultura de fibroblastos de Progeria

Foi feito no primeiro semestre a transdução de fibroblastos HGPS, cuja referência é a GM01972, que se encontravam na passagem 14, para células iPS. Fez-se a descongelação e a passagem dos fibroblastos de Progeria para um frasco T25 com o meio de fibroblastos (DMEM 1X, Glutamax, 10% FBS, 1% NEAA (*Non-Essential Amino Acids*), 1% Penicilina/Estreptomicina e 50 μ M *B-Mercaptoethanol*), que se encontravam em passagem 14. Foi primeiramente neste caso usados os MEF obtidos de compra da marca ThermoFisher. Realizámos a transdução com o *Kit* do *CytoTune-iPSC 2.0 Sendai Reprogramming* e posteriormente a cultura em *feeder* com os MEF e em cultura sem *feeder*.

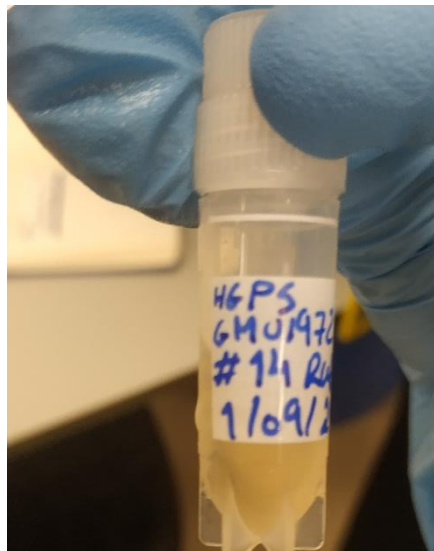


Figura 3.1.1. Fibroblastos de HGPS congelados, antes da transdução – Fibroblastos de HGPS antes da transdução, em passagem 14.



Figura 3.1.2. Cultura de fibroblastos de HGPS antes da transdução num frasco T25 – Cultura de fibroblastos de HGPS antes da transdução para um frasco T25, em passagem 14.

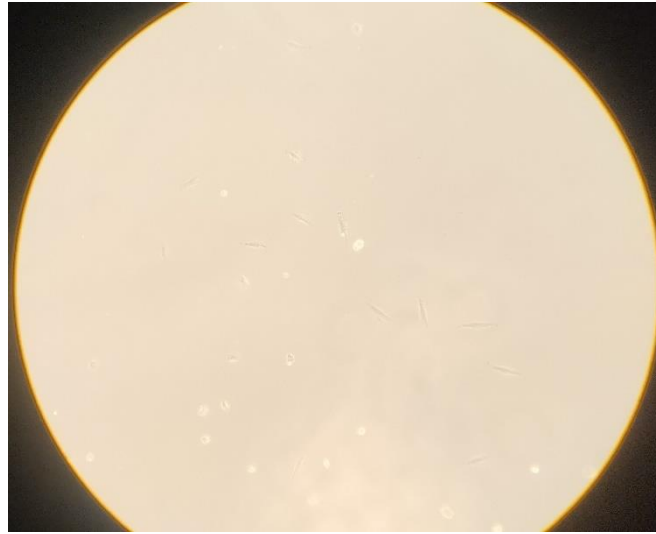


Figura 3.1.3. Cultura de fibroblastos de HGPS antes da transdução e respetiva imagem ao microscópio das células – Cultura de fibroblastos de HGPS antes da transdução dentro de um frasco T25, em passagem 14. Encontra-se uma imagem ao microscópio Invertido Binocular para Cultura Primo Vert (Zeiss) dos fibroblastos de Progeria, com objetiva 10x de ampliação.

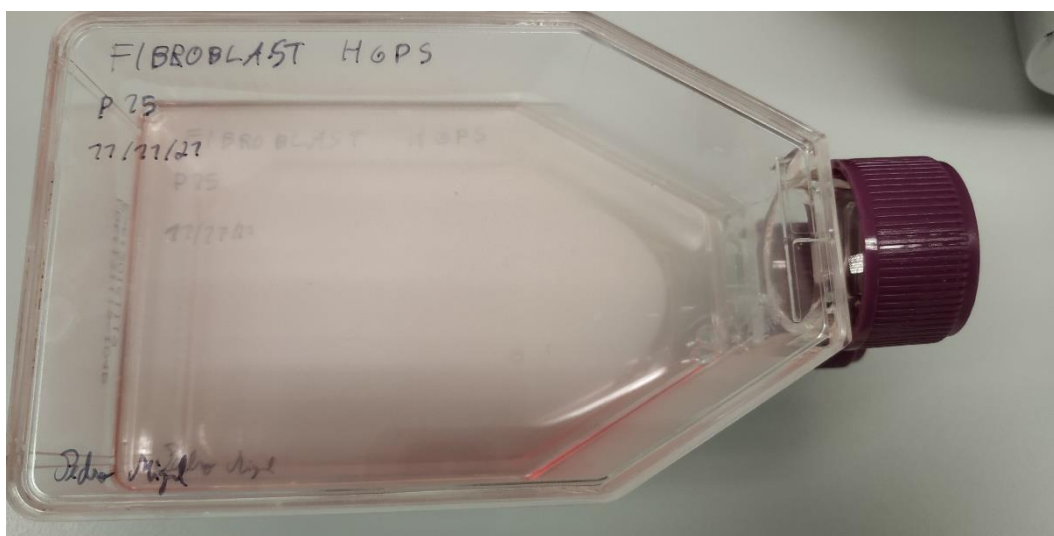


Figura 3.1.4. Cultura de fibroblastos de HGPS antes da transdução num frasco T25 – Cultura de fibroblastos de HGPS antes da transdução para um frasco T25, depois da passagem 14 para passagem 15.

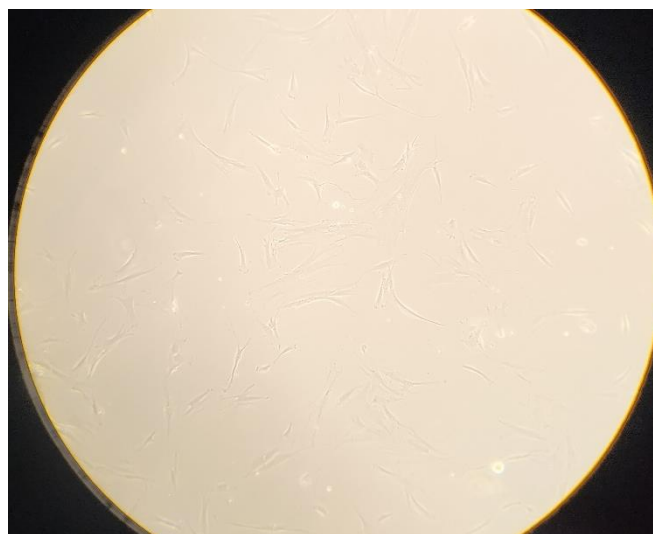


Figura 3.1.5. Cultura de fibroblastos de HGPS antes da transdução e respetiva imagem ao microscópio das células – Cultura de fibroblastos de HGPS antes da transdução dentro de um frasco T25, depois da passagem 14 para passagem 15. Encontra-se uma imagem ao microscópio Invertido Binocular para Cultura Primo Vert (Zeiss) dos fibroblastos de Progeria, com objetiva 10x de ampliação.

3.2. Início do procedimento de transdução de fibroblastos com HGPS (dia -2)

Dois dias antes da transdução (dia -2), foram plaqueados os fibroblastos da linha HGPS em três poços de uma placa de 6 poços (com 250.000 células por poço), com 2 ml de meio de fibroblastos (DMEM 1X, Glutamax, 10% FBS, 1% NEAA (*Non-Essential Amino Acids*), 1% Penicilina/Estreptomicina e 50 μ M *B-Mercaptoethanol*).

Foi realizada a sua contagem celular numa câmara de Newbauer, para obter 250.000 células por poço da placa de 6 poços. Estes fibroblastos com HGPS encontram-se na passagem 16.

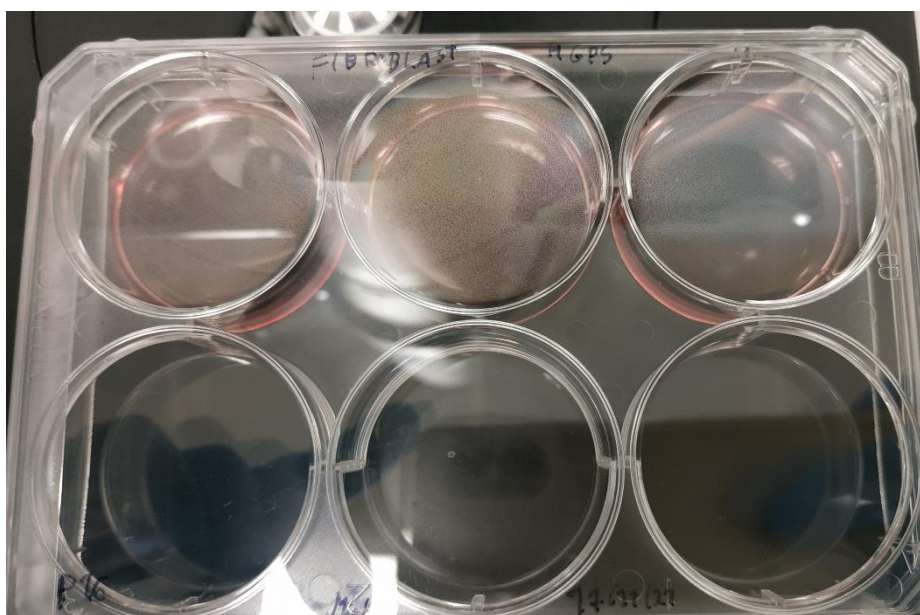


Figura 3.2.1. Cultura de fibroblastos de HGPS no dia -2 da transdução – Na imagem estão representados os fibroblastos de HGPS ao dia -2 da transdução, em cultura dentro de uma placa de 6 poços, em passagem 16.

3.3. Transdução de fibroblastos com HGPS (dia 0)

Ao dia 0, fez-se a transdução dos fibroblastos com HGPS que estavam em passagem 16. Usou-se o Kit do *CytoTune-iPSC 2.0 Sendai Reprogramming* composto por três preparações de vetores: KOS (Klf4, OCT3/4 e SOX2), c-Myc e o Klf4.

Foi feito em dois poços da placa de 6 poços o procedimento. Assim, pôs-se 1 mililitro de meio de fibroblastos (DMEM 1X, Glutamax, 10% FBS, 1% NEAA (*Non-Essential Amino Acids*), 1% Penicilina/Estreptomicina e 50 μ M *B-Mercaptoethanol*), mais os vetores (17 μ l KOS, 17 μ l c-Myc e 10 μ l de Klf4, por poço da placa de 6 poços) para um cálculo de 250 mil células de fibroblastos com HGPS.

O terceiro poço da placa de 6 poços, foi usado para se realizar a contagem celular de quantos fibroblastos com HGPS é que existiam dentro do poço, para usar esse número como base para a transdução dos outros dois poços.

Assim, por inferência, se esse poço tem um número de fibroblastos, os outros dois poços também terão, podendo calcular-se a quantidade necessária de vírus a utilizar para a transdução.

3.4. Transdução de fibroblastos com HGPS (após dia 1)

No dia 1 da transdução dos fibroblastos com HGPS, mudou-se o meio de cultura, colocando 2 ml dentro do poço 2 e 2ml do poço 3, da placa de 6 poços. Deve-se trocar o meio todos os dias com o meio de fibroblastos (DMEM 1X, Glutamax, 10% FBS, 1% NEAA (*Non-Essential Amino Acids*), 1% Penicilina/Estreptomicina e 50 μ M *B-Mercaptoethanol*).

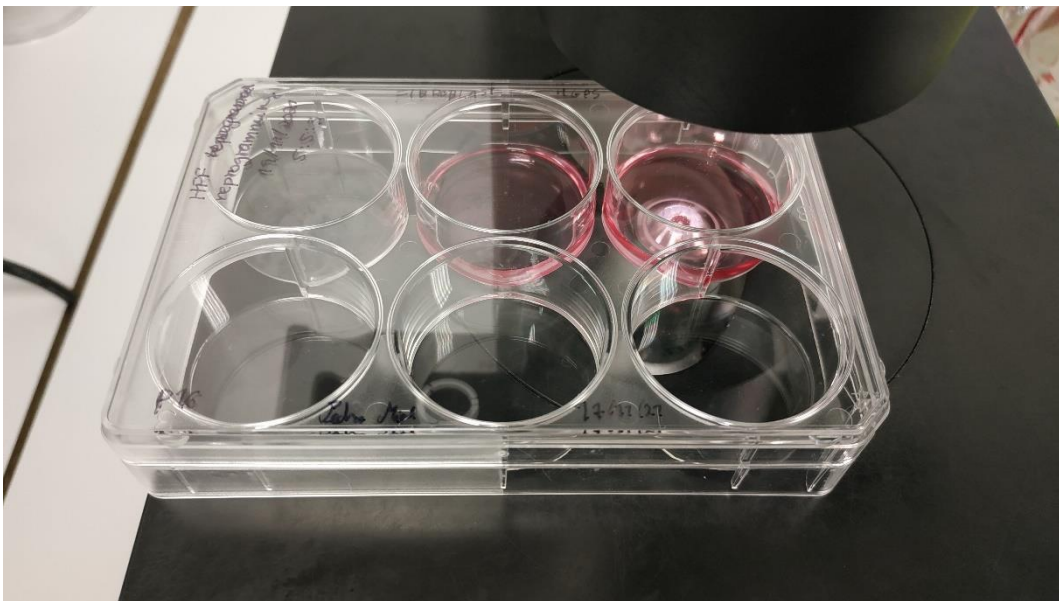


Figura 3.4.1. Cultura de fibroblastos de HGPS no dia 1 da transdução – Na imagem estão representados os fibroblastos de HGPS ao dia 1 da transdução, em cultura dentro de uma placa de 6 poços, em passagem 16.

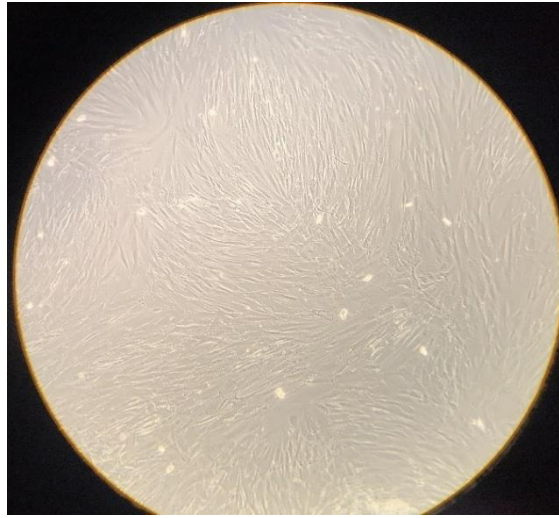


Figura 3.4.2. Cultura de fibroblastos de HGPS ao dia 1 da transdução e respetiva imagem ao microscópio das células – Cultura de fibroblastos de HGPS ao dia 1 da transdução no poço da placa de 6 poços, em passagem 16. Encontra-se uma imagem ao microscópio Invertido Binocular para Cultura Primo Vert (Zeiss) dos fibroblastos de Progeria, com objetiva 10x de ampliação.

As células de fibroblastos com HGPS que tinham sido transduzidas, continuaram a crescer e apresentaram zonas mais aglomeradas, comum após a transdução.

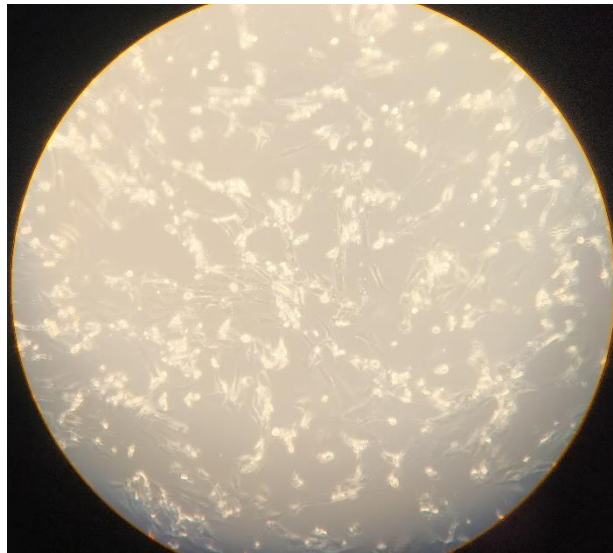


Figura 3.4.3. Cultura de fibroblastos de HGPS ao dia 3 da transdução e respetiva imagem ao microscópio das células – Cultura de fibroblastos de HGPS ao dia 3 da transdução no poço da placa de 6 poços, em passagem 16. Encontra-se uma imagem ao microscópio Invertido Binocular para Cultura Primo Vert (Zeiss) dos fibroblastos de Progeria, com objetiva 10x de ampliação.

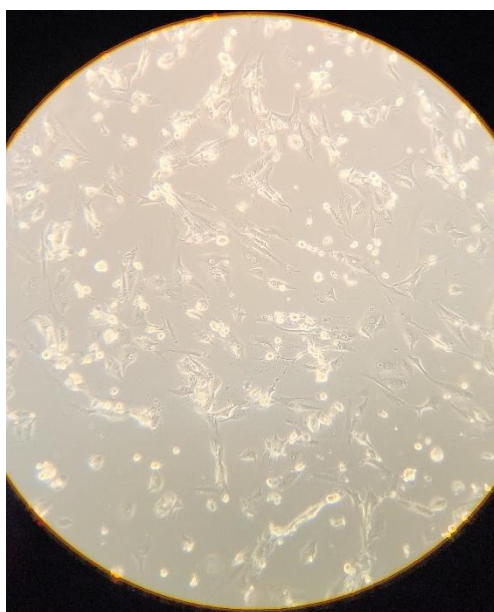


Figura 3.4.4. Cultura de fibroblastos de HGPS ao dia 4 da transdução e respetiva imagem ao microscópio das células – Cultura de fibroblastos de HGPS ao dia 4 da transdução no poço da placa de 6 poços, em passagem 16. Encontra-se uma imagem ao microscópio Invertido Binocular para Cultura Primo Vert (Zeiss) dos fibroblastos de Progeria, com objetiva 10x de ampliação



Figura 3.4.5. Cultura de fibroblastos de HGPS ao dia 5 da transdução e respetiva imagem ao microscópio das células – Cultura de fibroblastos de HGPS ao dia 5 da transdução no poço da placa de 6 poços, em passagem 16. Encontra-se uma imagem ao microscópio Invertido Binocular para Cultura Primo Vert (Zeiss) dos fibroblastos de Progeria, com objetiva 10x de ampliação

3.5. Cultura de fibroblastos MEF de *feeder*

No dia 5 ou dia 6 da transdução dos fibroblastos com HGPS, deve-se realizar a cultura de placas de cultura de MEF. Estes fibroblastos irão servir como *feeder* para os fibroblastos transduzidos com HGPS, que irão ser colocados por cima das células MEF.

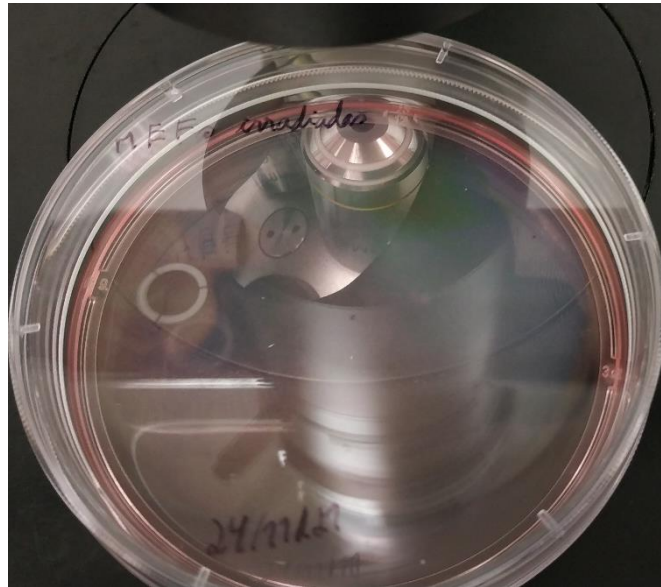


Figura 3.5.1. Cultura de fibroblastos de MEF dentro de uma placa de cultura – Cultura de fibroblastos de MEF para uma placa de cultura com meio de fibroblastos (DMEM 1X, Glutamax, 10% FBS, 1% NEAA (Non-Essential Amino Acids), 1% Penicilina/Estreptomicina e 50 μ M B-Mercaptoethanol).

3.6. Preparação para passagem de fibroblastos com HGPS transduzidos para *feeder* MEF (dia 7)

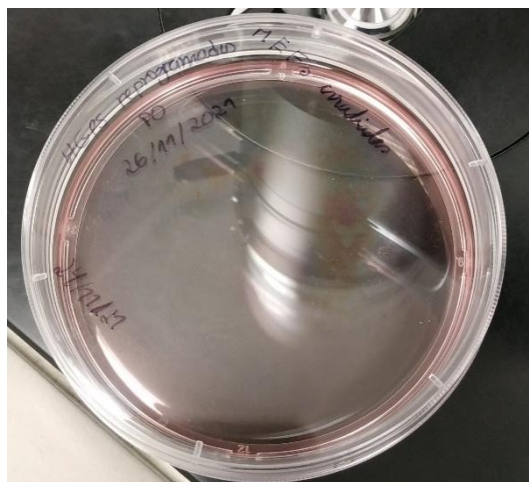


Figura 3.6.1. Cultura de fibroblastos de HGPS no dia 7 da transdução em *feeder* MEF – Na imagem estão representados os fibroblastos de HGPS no dia 7 da transdução em *feeder*, numa placa de cultura.

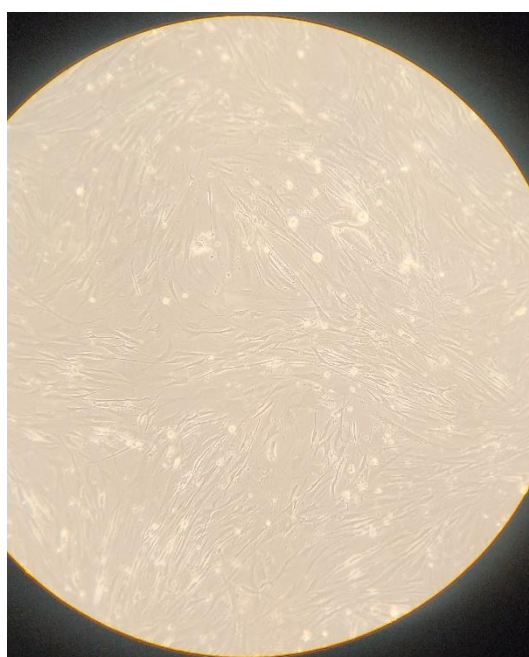


Figura 3.6.2. Cultura de fibroblastos de HGPS no dia 10 da transdução em *feeder* MEF – Na imagem estão representados os fibroblastos de HGPS no dia 10 da transdução em *feeder*, numa placa de cultura. Encontra-se uma imagem ao microscópio Invertido Binocular para Cultura Primo Vert (Zeiss) dos fibroblastos de Progeria, com objetiva 10x de ampliação.

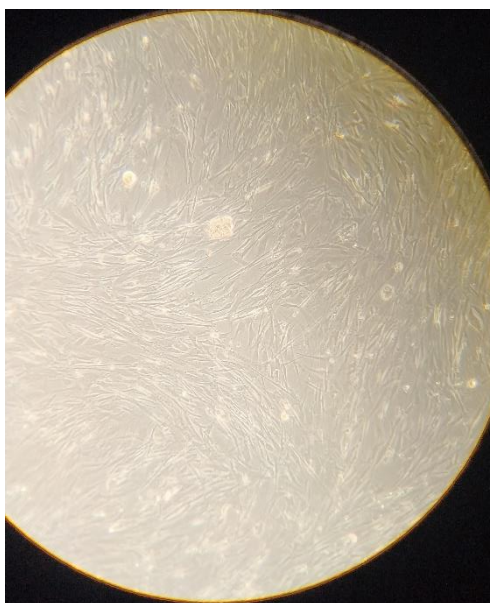


Figura 3.6.3. Cultura de fibroblastos de HGPS no dia 13 da transdução em *feeder* MEF – Na imagem estão representados os fibroblastos de HGPS no dia 13 da transdução em *feeder*, numa placa de cultura. Encontra-se uma imagem ao microscópio Invertido Binocular para Cultura Primo Vert (Zeiss) dos fibroblastos de Progeria, com objetiva 10x de ampliação.



Figura 3.6.4. Cultura de fibroblastos de HGPS no dia 21 da transdução em *feeder* MEF – Na imagem estão representados os fibroblastos de HGPS no dia 21 da transdução em *feeder*, numa placa de cultura. Encontra-se uma imagem ao microscópio Invertido Binocular para Cultura Primo Vert (Zeiss) dos fibroblastos de Progeria, com objetiva 10x de ampliação.

Durante a manutenção destas células transduzidas em cultura *feeder* em MEF, percebeu-se que não estavam a formar colónias e não ficavam confluentes, o que poderia indicar o início da senescência celular ou o pouco sucesso do processo de obtenção de células pluripotentes.

Uma das razões que pode explicar a falta de sucesso para a transdução e a posterior senescência celular dos fibroblastos é a idade dos mesmos, que já se encontravam numa passagem 16.

Outra explicação pode ter sido a cultura em *feeder* de MEF, talvez não foi promissor para o sucesso de obtenção de células pluripotentes a partir de fibroblastos com HGPS.

O processo de transdução foi repetido no segundo semestre, com algumas alterações. Foram usados como células *feeder* os HFF inativados em vez das células MEF. Também se usou placas mais pequenas para haver maior contacto celular, o que pode trazer mais sucesso à obtenção de células pluripotentes.

3.7. Preparação para passagem de fibroblastos com HGPS transduzidos para *feeder free* (dia 7)

Os fibroblastos com HGPS transduzidos foram transferidos para uma placa de geltrex (*feeder free*) e estas células foram então cultivadas.

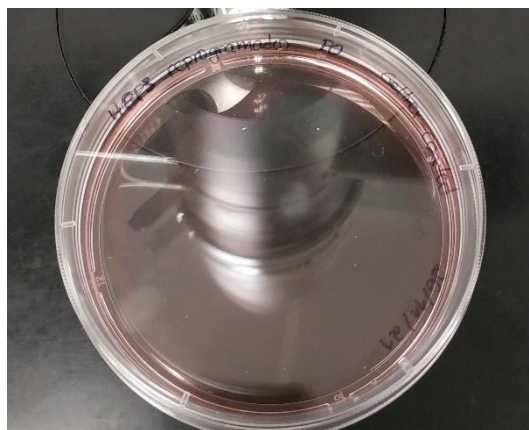


Figura 3.7.1. Cultura de fibroblastos de HGPS no dia 7 da transdução em *feeder free* – Na imagem estão representados os fibroblastos de HGPS no dia 7 da transdução em *feeder free*, numa placa de cultura.



Figura 3.7.2. Cultura de fibroblastos de HGPS no dia 10 da transdução em *feeder free* – Na imagem estão representados os fibroblastos de HGPS no dia 10 da transdução em *feeder free*, numa placa de cultura. Encontra-se uma imagem ao microscópio Invertido Binocular para Cultura Primo Vert (Zeiss) dos fibroblastos de Progeria, com objetiva 10x de ampliação.

Também o procedimento de cultura de células transduzidas em *feeder free* não resultou no sucesso para obter células iPS a partir de fibroblastos com HGPS.

Foi utilizado o geltrex para cobrir o fundo da placa de cultura e assim foi repetido no segundo semestre no procedimento em *feeder*. No entanto as placas que foram utilizadas depois, no segundo semestre, foram mais pequenas em comparação com este procedimento, aumentando o contacto entre as células, podendo ser benéfico para a transdução e obtenção de células iPS.

3.8. Cultura de fibroblastos de Progeria

Como no procedimento do primeiro semestre não se conseguiu obter células iPS a partir de fibroblastos com HGPS, numa cultura com feeder de fibroblastos MEF, repetiu-se no segundo semestre uma nova tentativa.

Assim, repetiu-se o procedimento, mas com algumas alterações. Os fibroblastos com HGPS que iriam ser transduzidos foram outros, os quais se encontravam na passagem 11, da paciente descrita na secção 2.

O procedimento de cultura celular teve o seu início com a descongelação e a passagem dos fibroblastos de Progeria para um frasco T75 com o meio de fibroblastos (DMEM 1X, Glutamax, 10% FBS, 1% NEAA (*Non-Essential Amino Acids*), 1% Penicilina/Estreptomicina e 50 μ M *B-Mercaptoethanol*), que se encontravam em passagem 16.



Figura 3.8.1. Cultura de fibroblastos de HGPS antes da transdução num frasco T75 – Cultura de fibroblastos de HGPS antes da transdução para um frasco T75, em passagem 16.

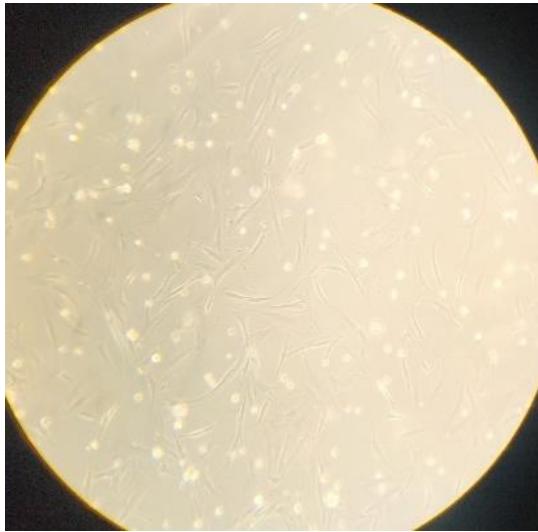


Figura 3.8.2. Cultura de fibroblastos de HGPS antes da transdução e respetiva imagem ao microscópio das células – Cultura de fibroblastos de HGPS antes da transdução dentro de um frasco T75, em passagem 16. Encontra-se uma imagem ao microscópio Invertido Binocular para Cultura Primo Vert (Zeiss) dos fibroblastos de Progeria, com objetiva 10x de ampliação.

3.9. Cultura de fibroblastos HFF de *feeder*

Os fibroblastos que iam servir de feeder foram os HFF, os quais se descongelaram e se cultivaram em frascos T75 ou outro suficiente para obter o número necessário para cobrir os poços da placa. Estes encontravam-se em passagem 9, ficando em cultura num frasco T25, com o meio de fibroblastos (DMEM 1X, Glutamax, 10% FBS, 1% NEAA (*Non-Essential Amino Acids*), 1% Penicilina/Estreptomicina e 50 μ M *B-Mercaptoethanol*).

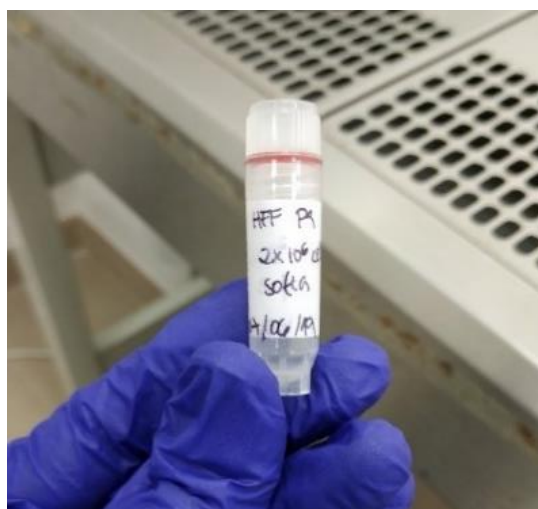


Figura 3.9.1. Fibroblastos de HFF para uso em cultura - Fibroblastos de HFF congelados que vão ser passados para um frasco T25, em passagem 9.

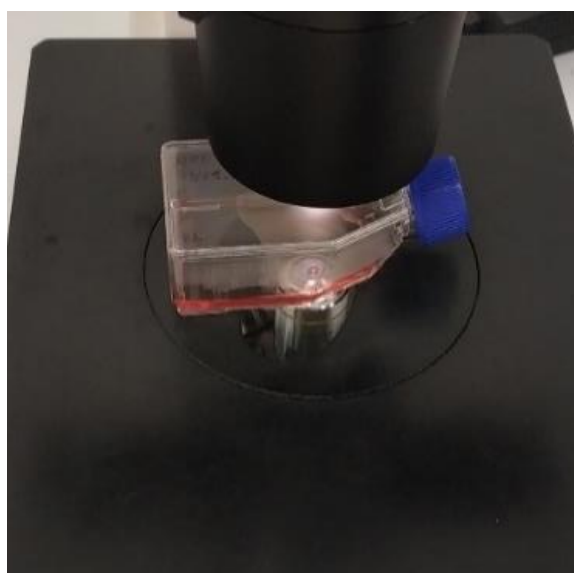


Figura 3.9.2. Cultura de fibroblastos de HFF dentro de um frasco T25 – Cultura de fibroblastos de HFF para um frasco T25, em passagem 9.



Figura 3.9.3. Cultura de fibroblastos de HFF e respetiva imagem ao microscópio das células – Cultura de fibroblastos de HFF em passagem 9, sendo esta uma imagem ao microscópio Invertido Binocular para Cultura Primo Vert (Zeiss) dos fibroblastos, com objetiva 10x de ampliação.

3.10. Início do processo de transdução de fibroblastos HGPS

Dois dias antes da transdução (dia -2), foram plaqueados os fibroblastos da linha HGPS em dois poços de uma placa de 6 poços (com 100.000 e 125.000 células por poço), com 2 ml de meio de fibroblastos (DMEM 1X, Glutamax, 10% FBS, 1% NEAA (Non-Essential Amino Acids), 1% Penicilina/Estreptomicina e 50 μ M B-Mercaptoethanol).

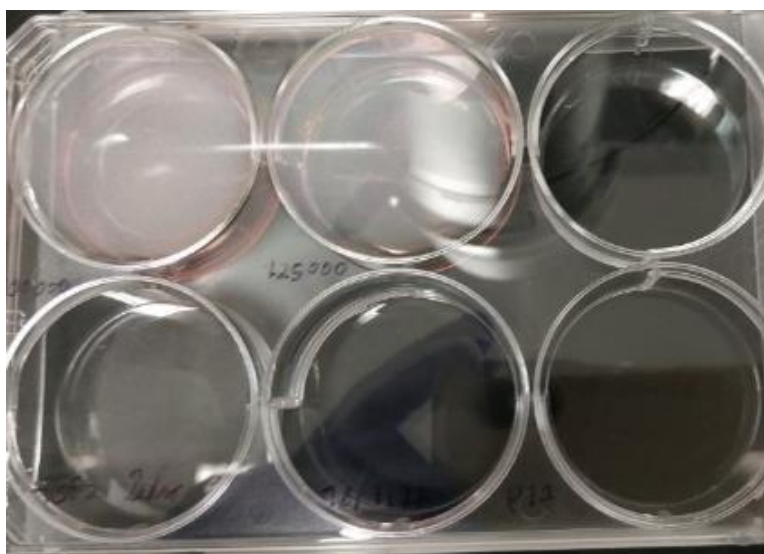


Figura 3.10.1. Cultura de fibroblastos de HGPS no dia -2 da transdução – Na imagem estão representados os fibroblastos de HGPS ao dia -2 da transdução, em cultura dentro de uma placa de 6 poços (18 de janeiro 2022), em passagem 17.

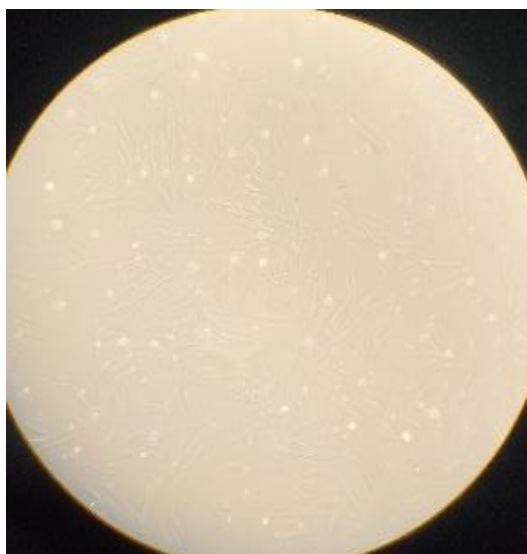


Figura 3.10.2. Cultura de fibroblastos de HGPS no dia -1 da transdução – Na imagem encontram-se os fibroblastos de HGPS ao microscópio Invertido Binocular para Cultura Primo Vert (Zeiss), com objetiva 10x de ampliação, ao dia -1 da transdução.



Figura 3.10.3. Cultura de fibroblastos de HGPS no dia 1 da transdução – Na imagem estão representados os fibroblastos de HGPS ao dia 1 da transdução (21 de janeiro 2022).

Em seguida, continuou-se a trocar o meio diariamente até ao dia 6, e a alteração da forma das células de fibroblastos com HGPS após a transdução ao dia 0 pode ser visível pelas imagens seguintes.

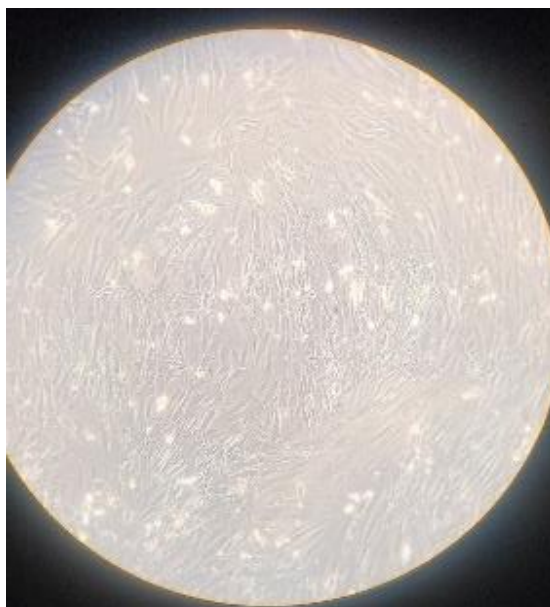


Figura 3.10.4. Cultura de fibroblastos de HGPS ao dia 2 da transdução – Na imagem estão representados os fibroblastos de HGPS ao dia 2, da transdução, no poço 2 da placa de 6 poços observados no microscópio Invertido Binocular para Cultura Primo Vert (Zeiss), com objetiva 10x de ampliação.

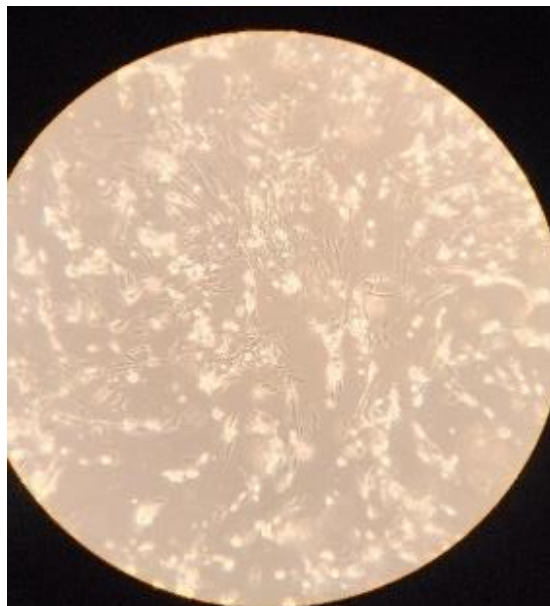


Figura 3.10.5. Cultura de fibroblastos de HGPS ao dia 4 da transdução – Na imagem estão representados os fibroblastos de HGPS ao dia 4, da transdução, no poço 2 da placa de 6 poços observados no microscópio Invertido Binocular para Cultura Primo Vert (Zeiss), com objetiva 10x de ampliação.

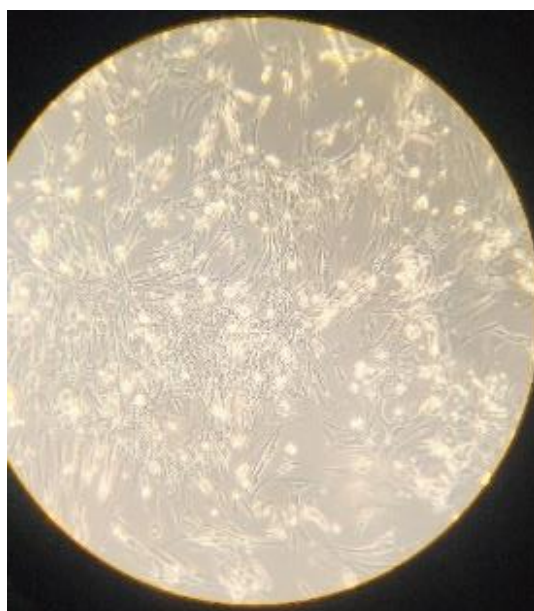


Figura 3.10.6. Cultura de fibroblastos de HGPS ao dia 5 da transdução – Na imagem estão representados os fibroblastos de HGPS ao dia 5, da transdução, no poço 2 da placa de 6 poços observados no microscópio Invertido Binocular para Cultura Primo Vert (Zeiss), com objetiva 10x de ampliação.

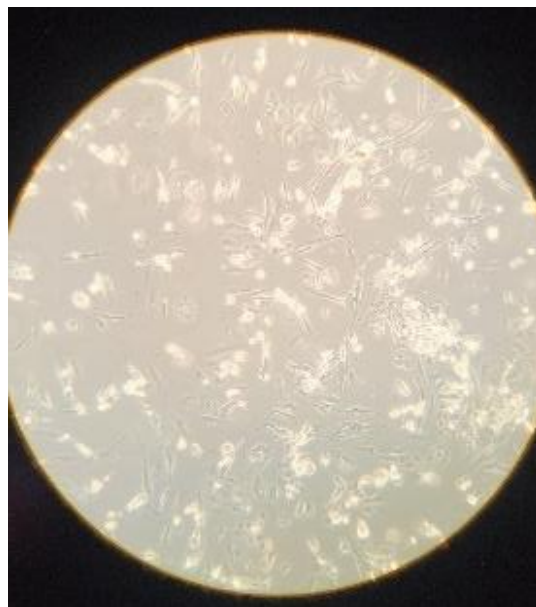


Figura 3.10.7. Cultura de fibroblastos de HGPS ao dia 6 da transdução – Na imagem estão representados os fibroblastos de HGPS ao dia 6, da transdução, no poço 2 da placa de 6 poços observados no microscópio Invertido Binocular para Cultura Primo Vert (Zeiss), com objetiva 10x de ampliação.

3.11. Preparação para passagem de fibroblastos com HGPS transduzidos para *feeder* de HFF (dia 7)

Por cima dos HFF inativados com mitomicina, adicionaram-se os fibroblastos com HGPS que tinham sido transduzidos com o *Kit* do *CytoTune-iPSC 2.0 Sendai Reprogramming*. Também se realizou o procedimento sem *feeder*.

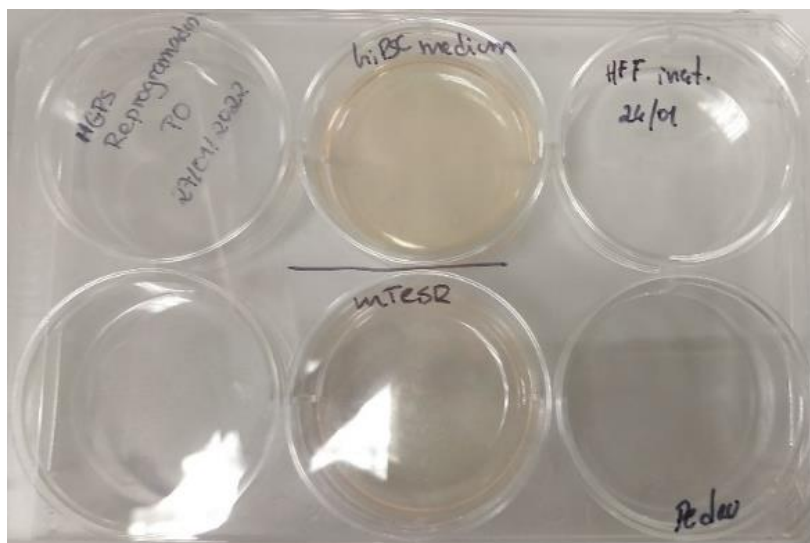


Figura 3.11.1. Cultura de fibroblastos de HGPS no dia 15 da transdução em *feeder* – Na imagem estão representados os fibroblastos de HGPS no dia 15 da transdução em *feeder*, num poço de uma placa de 6 poços.



Figura 3.11.2. Cultura de fibroblastos de HGPS no dia 15 da transdução em *feeder* e respetiva imagem ao microscópio das células – Na imagem estão representados os fibroblastos de HGPS no dia 15 da transdução em *feeder* e a sua visualização ao microscópio Invertido Binocular para Cultura Primo Vert (Zeiss), com objetiva 10x de ampliação.

3.12. Preparação para passagem de fibroblastos com HGPS transduzidos para *feeder free* (dia 7)

HGPS transduzidos foi transferido para uma placa de geltrex (*feeder free*) e estas células foram então cultivadas em meio mTeSR.

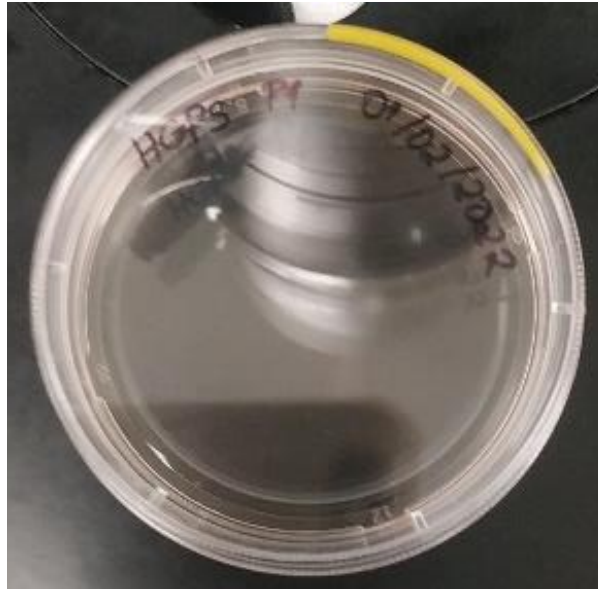


Figura 3.12.1. Cultura de fibroblastos de HGPS no dia 15 da transdução em *feeder free* – Estão representados os fibroblastos de HGPS no dia 15 da transdução em *feeder free*.

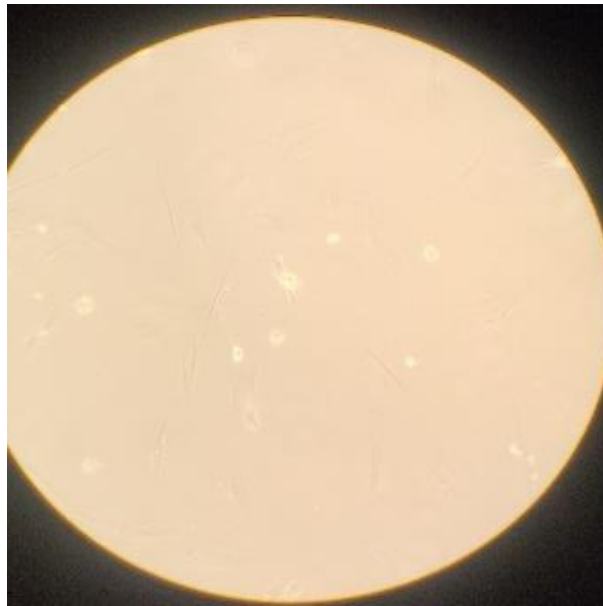


Figura 3.12.2. Cultura de fibroblastos de HGPS no dia 15 da transdução em *feeder free* e a imagem ao microscópio das células – Na imagem estão representados os fibroblastos de HGPS no dia 15 da transdução em *feeder free* e a sua visualização ao microscópio Invertido Binocular para Cultura Primo Vert (Zeiss), com objetiva 10x de ampliação.

3.13. Manutenção e passagem das colónias de fibroblastos (após dia 9)

Após o dia 9, os fibroblastos transduzidos foram crescendo em colónias.

Sempre que as colónias ficassem muito grandes, atingindo quase a confluência total do poço da placa, elas tinham que ser passadas para novas placas contendo o *feeder* de fibroblastos de HFF inativados, numa base de geltrex.

Com estes fibroblastos com HGPS na passagem 11 e com os fibroblastos HFF como *feeder*, obteve-se sucesso na transdução, permitindo crescer colónias.

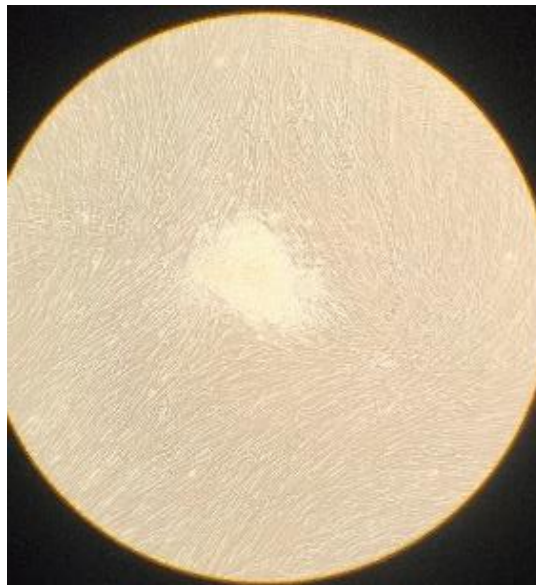


Figura 3.13.1. Cultura de fibroblastos de HGPS no dia 25 da transdução em *feeder* – Na imagem estão representados os fibroblastos de HGPS no dia 25 da transdução em *feeder*, numa visualização ao microscópio Invertido Binocular para Cultura Primo Vert (Zeiss), com objetiva 10x de ampliação.

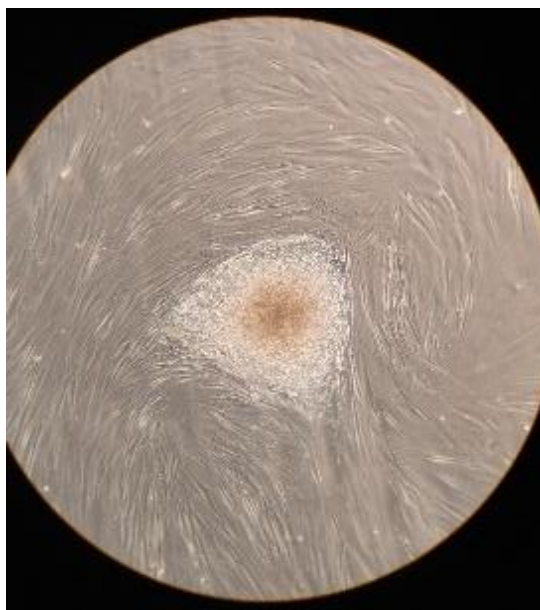


Figura 3.13.2. Cultura de fibroblastos de HGPS no dia 35 da transdução em *feeder* – Na imagem estão representados os fibroblastos de HGPS no dia 35 da transdução em *feeder*, numa visualização ao microscópio Invertido Binocular para Cultura Primo Vert (Zeiss), com objetiva 10x de ampliação.

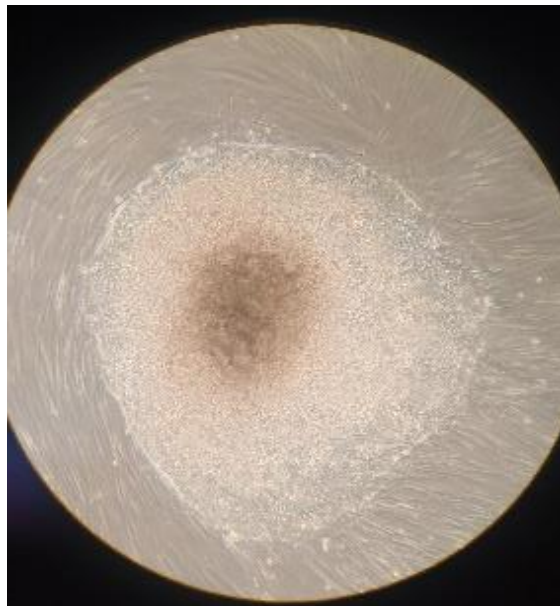


Figura 3.13.3. Cultura de fibroblastos de HGPS no dia 40 da transdução em *feeder* – Na imagem estão representados os fibroblastos de HGPS no dia 40 da transdução em *feeder*, numa visualização ao microscópio Invertido Binocular para Cultura Primo Vert (Zeiss), com objetiva 10x de ampliação.

3.14. Passagem de colónias de clones de células iPS

A passagem das colónias foi manual, ou seja, sem uso de agentes de dissociação celular (tal como a tripsina).

Deve-se picar as colónias que apresentassem melhor forma e tamanho para novas placas de 6 poços, conforme o poço atingia a confluência e com o crescimento das colónias. Não se deve deixar as colónias crescer muito senão elas podem diferenciar.

Deve-se observar na lupa, conforme se observa na imagem em baixo, as colónias e escolher as melhores colónias que desejamos passar para uma nova placa de cultura.

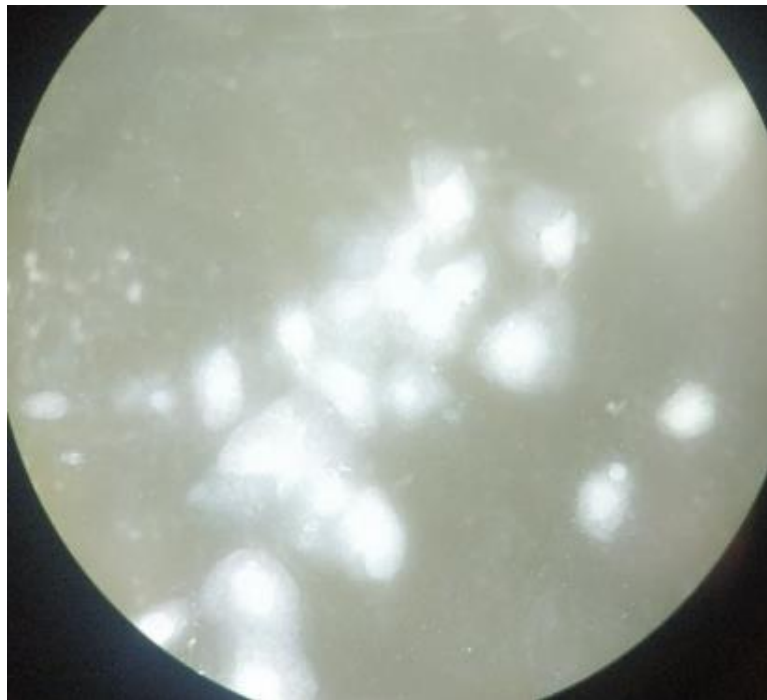


Figura 3.14.1 Colónias de HGPS em *feeder* após a transdução – Na imagem à esquerda estão representadas as colónias de HGPS no dia 25 de fevereiro após o procedimento de transdução em *feeder* vistas à lupa stemi 508 (Zeiss),

Pode ver-se na imagem à lupa, uma colónia dividida em diversos pedaços mais pequenos, ideal para a passagem para um novo poço de uma nova placa.



Figura 3.14.2. Colónias de HGPS em *feeder* após a transdução – Na imagem ao centro no dia 7 de março vistas à lupa stemi 508 (Zeiss), em que a colónia ia ser passada e por isso fez-se a fragmentação da colónia em vários pedaços mais pequenos.

O número de colónias para a passagem pode variar, mas dentro de 7 colónias já estará suficiente, por poço. O tamanho das colónias pode influenciar a escolha, bem como o tamanho do poço.

Caso se observe algumas zonas dentro da colónia com maior densidade, seja no centro ou na periferia da colónia, deve-se realizar a limpeza da mesma. A zona de maior densidade pode conter células a diferenciar, sendo que é prejudicial à nossa cultura de células pluripotentes e por isso devemos fazer uma limpeza.

A limpeza das colónias realiza-se com a agulha de uma seringa, destacando mecanicamente os agregados de células mais densos dentro das colónias. Depois essas células são removidas e passamos a restante colónia.

Na imagem abaixo, podemos observar a colónia de células iPS transduzidas de fibroblastos de HGPS. No centro da colónia o aspeto é diferente pois foi realizada a limpeza da mesma com uma agulha de uma seringa. O centro da colónia apresentava maior densidade e possivelmente algumas células a diferenciar, o que não é benéfico para a cultura de células iPS e por isso tiveram de ser removidas.

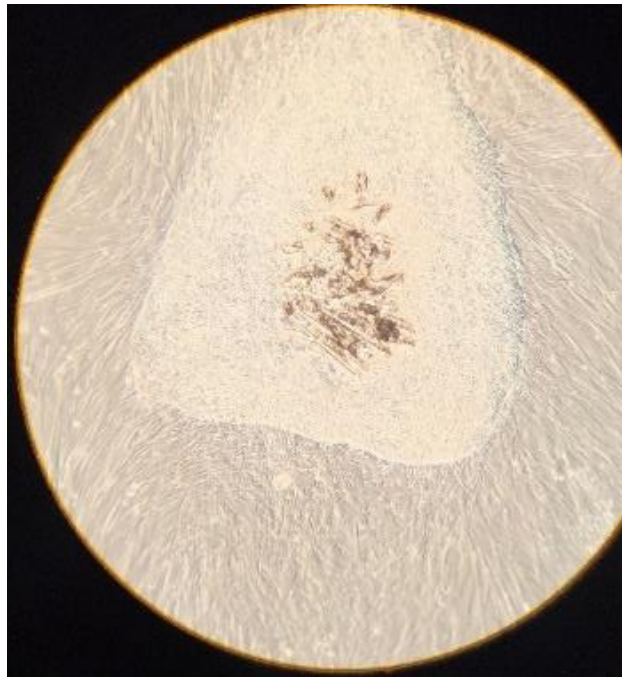


Figura 3.14.3. Colónias de HGPS em *feeder* após a transdução – Na imagem temos uma visualização ao microscópio Invertido Binocular para Cultura Primo Vert (Zeiss), com objetiva 10x de ampliação, em que a colónia foi limpa com a ponta de uma agulha de uma seringa.

3.15. Passagem das colónias de fibroblastos com HGPS das placas em *feeder* para placas em *feeder free*

Mais tarde, após várias semanas de cultura das colónias, pode-se realizar a passagem desde um poço em *feeder* para um poço em *feeder free*. Deste modo, realizou-se a cultura de vários clones do fibroblastos com HGPS em iPS e depois fez-se a caracterização de dois deles, o clone 7 e o clone 9, para permitir que se tivesse um modelo iPS originado a partir de células de fibroblastos com HGPS.

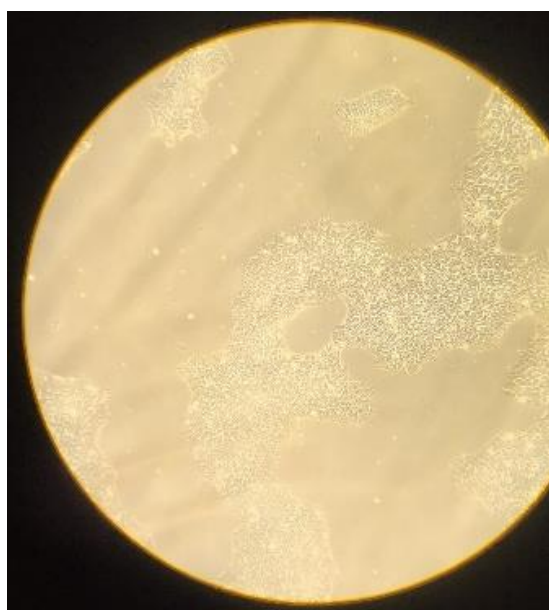


Figura 3.15.1. Fibroblastos iPS do clone 7 e 9 em *feeder free* – Na imagem estão representados os fibroblastos iPS do clone 7 gerados a partir de células HGPS em *feeder free*. A placa encontrava-se em passagem 9, que foi realizada a dia 15 de abril de 2022, vista no microscópio Invertido Binocular para Cultura Primo Vert (Zeiss), com objetiva 10x de ampliação.

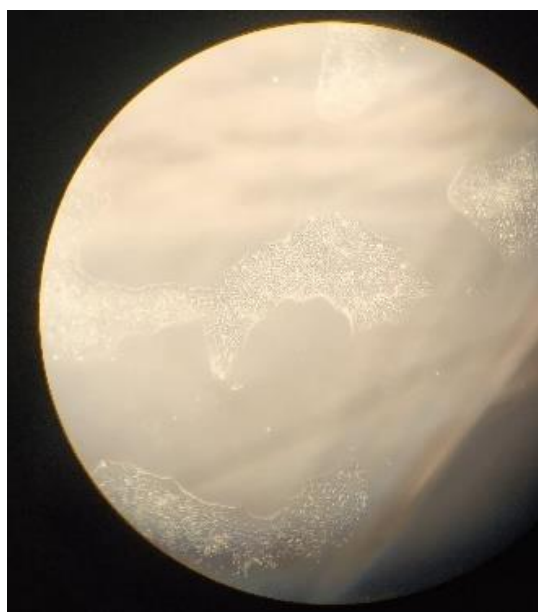


Figura 3.15.2. Fibroblastos iPS do clone 9 em *feeder free* – Na imagem estão os fibroblastos iPS do clone 9 obtidos a partir de células HGPS em *feeder free*. A placa encontrava-se em passagem 9, que foi realizada a dia 15 de abril de 2022, vistas no microscópio Invertido Binocular para Cultura Primo Vert (Zeiss), com objetiva 10x de ampliação.

3.16. Imunofluorescência para marcadores de pluripotência

Na seguinte figura, podemos observar o procedimento da imunofluorescência que foi feita na linha celular HGPS das células iPS do clone 7 e clone 9 que foram analisadas num microscópio de fluorescência Axioimager Z2 (Zeiss).

Os quatro marcadores da pluripotência, OCT4, SOX2, NANOG e SSEA4, foram visíveis nas células iPS para os dois clones, 7 e 9.

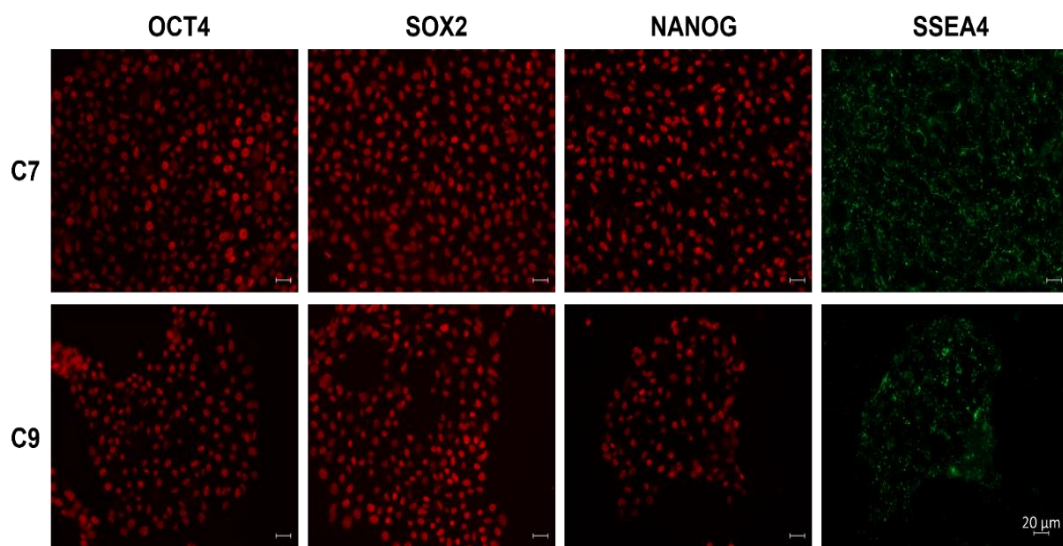


Figura 3.16.1. Imunofluorescência para marcadores de pluripotência do clone 7 e 9 – Caracterização de células pluripotentes induzidas da linha HGPS do clone 7 e 9, de um paciente com Progeria. Imunofluorescência para os marcadores de pluripotência OCT4, SOX2, NANOG e SSEA4, positivo para todos em ambos os clones. As imagens estão a *scale bar* 20µm.

3.17. Imunofluorescência da diferenciação de C7 em EB

A seguinte figura mostra o procedimento da imunofluorescência que foi feita na linha celular HGPS das células iPS do clone 7 e que foram analisadas num microscópio de fluorescência Axioimager Z2 (Zeiss), após a realização da imunocitoquímica às 5 semanas do procedimento de diferenciação das iPS em corpos embrioides.

Os quatro marcadores da diferenciação de C7 em EB da endoderme (α FP), mesoderme (α SMA) e ectoderme (TUJ1), foram positivos nas células iPS do clone 7. Os núcleos estão representados nas imagens a azul (DAPI).

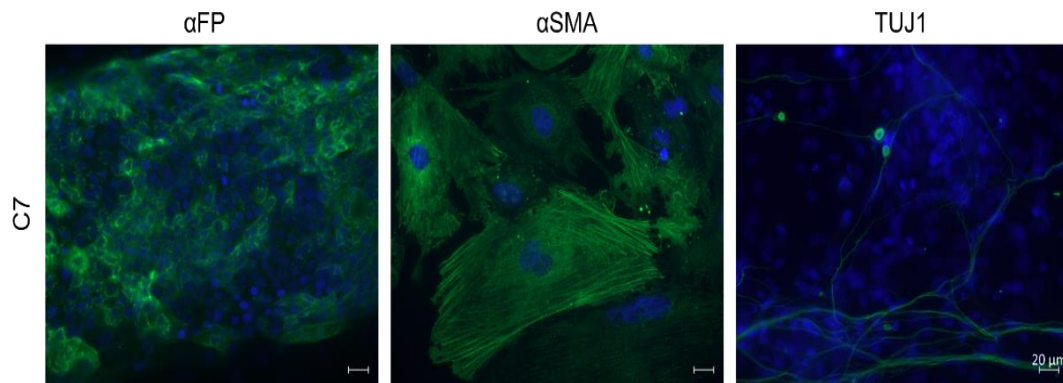


Figura 3.17.1. Imunofluorescência da diferenciação de C7 em EB – Caracterização de células pluripotentes induzidas da linha HGPS do clone 7, de uma paciente com Progeria. Imunofluorescência da diferenciação de C7 em EB (às cinco semanas) da endoderme (α FP), mesoderme (α SMA) e ectoderme (TUJ1), foram positivos nas células iPS do clone 7. Os núcleos estão representados a azul (DAPI). As imagens estão a *scale bar* 20 μ m.

3.18. Detecção da Fosfatase alcalina no clone 7 e no clone 9

Como se pode observar na figura seguinte, existe marcação da fosfatase alcalina a roxo nas células iPS do clone 7 e do clone 9 da linha celular HGPS, sendo este um indicador de pluripotência.

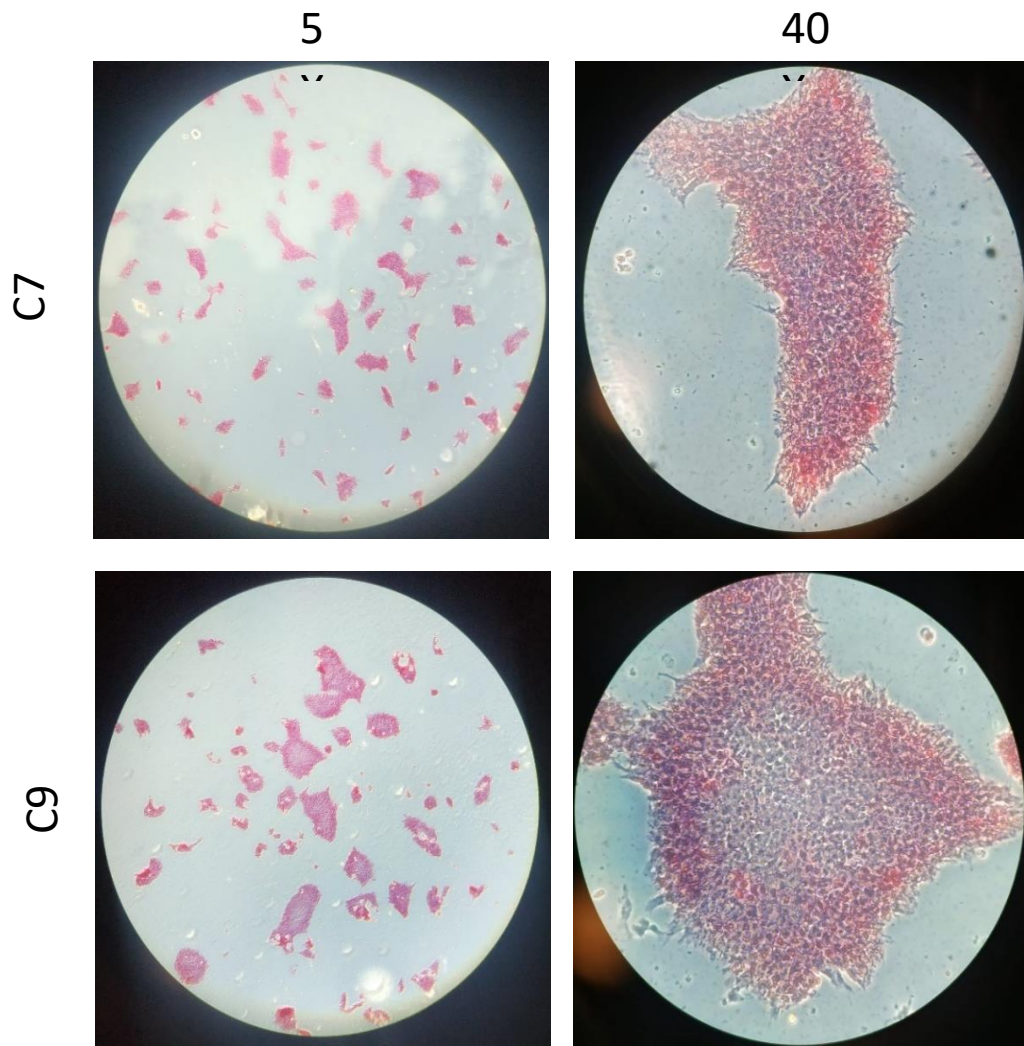


Figura 3.18.1. Detecção da Fosfatase alcalina no clone 7 e no clone 9 – Caracterização de células pluripotentes induzidas da linha HGPS do clone 7 e clone 9, de um paciente com Progeria. Marcação positiva da fosfatase alcalina para o clone 7 e clone 9, visível na marcação a roxo nas células presentes nas lamelas dos duplicados para cada clone, sendo um indicador de que estas células destes dois clones diferentes se encontram em pluripotência. Imagens visualizadas ao microscópio Invertido Axio Vert.A1 (Zeiss), com objetiva 5x e 40x de ampliação

3.19. RT-PCR

A seguinte figura demonstra a existência de vírus Sendai nas células iPS da linha celular HGPS do clone 7 e no seu controlo positivo, sendo que no clone 9 as células iPS da linha celular HGPS encontravam-se livres de vírus Sendai.

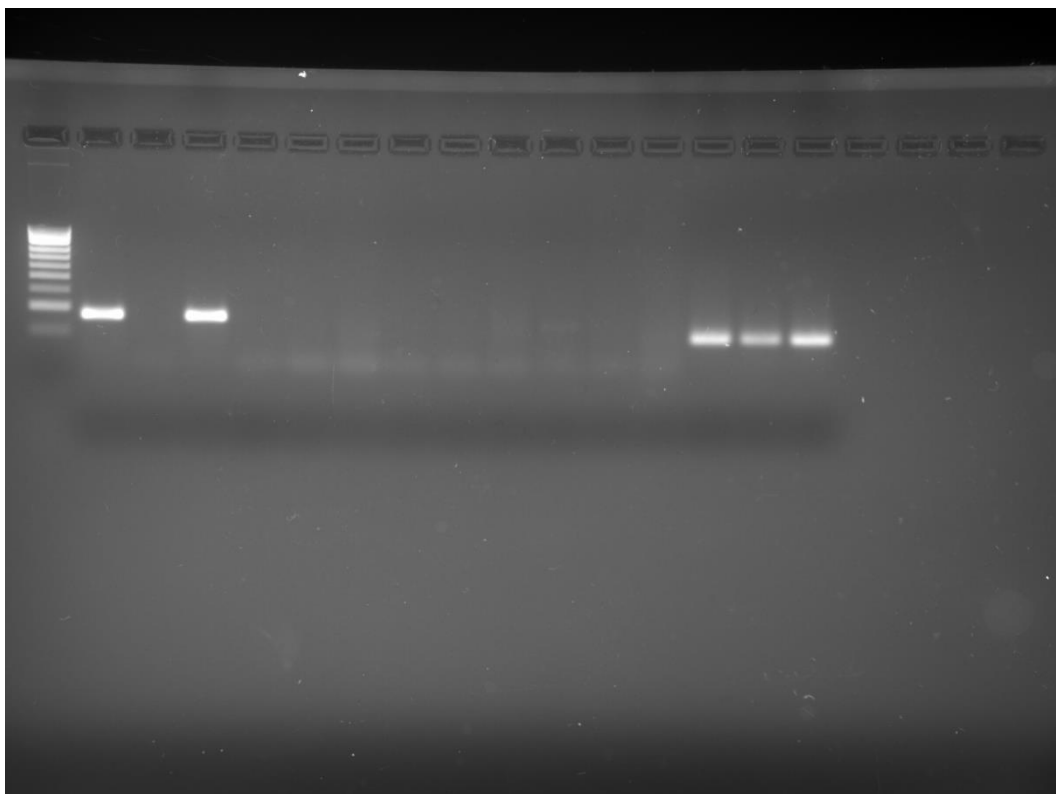


Figura 3.19.1. RT-PCR das células iPS do clone 7 e 9 na passagem 12 – Caracterização de células pluripotentes induzidas da linha HGPS do clone 7 e 9, de um paciente com Progeria. Em passagem 12, o clone 7 continha vírus Sendai e o seu controlo positivo também, enquanto o clone 9 não continha vírus Sendai. Por ordem da esquerda para a direita, no gel, temos: SEV (clone 7, 9 e controlo positivo), c-Myc (clone 7, 9 e controlo positivo), KOS (clone 7, 9 e controlo positivo), Klf4 (clone 7, 9 e controlo positivo) e GADPH (clone 7, 9 e controlo positivo). Imagem obtida com *Molecular Imager ChemiDoc XRS+*.

Noutro resultado, na passagem 33, houve também a presença de SEV no clone 7, bem como para o controlo positivo, mas não está presente o vírus de Sendai para o clone 9. O KOS não apareceu no teste no C7, C9 e controlo positivo. O c-Myc apareceu no C7 e controlo positivo, mas não apareceu no C9. O Klf4 está presente no C7, C9 e no controlo positivo.

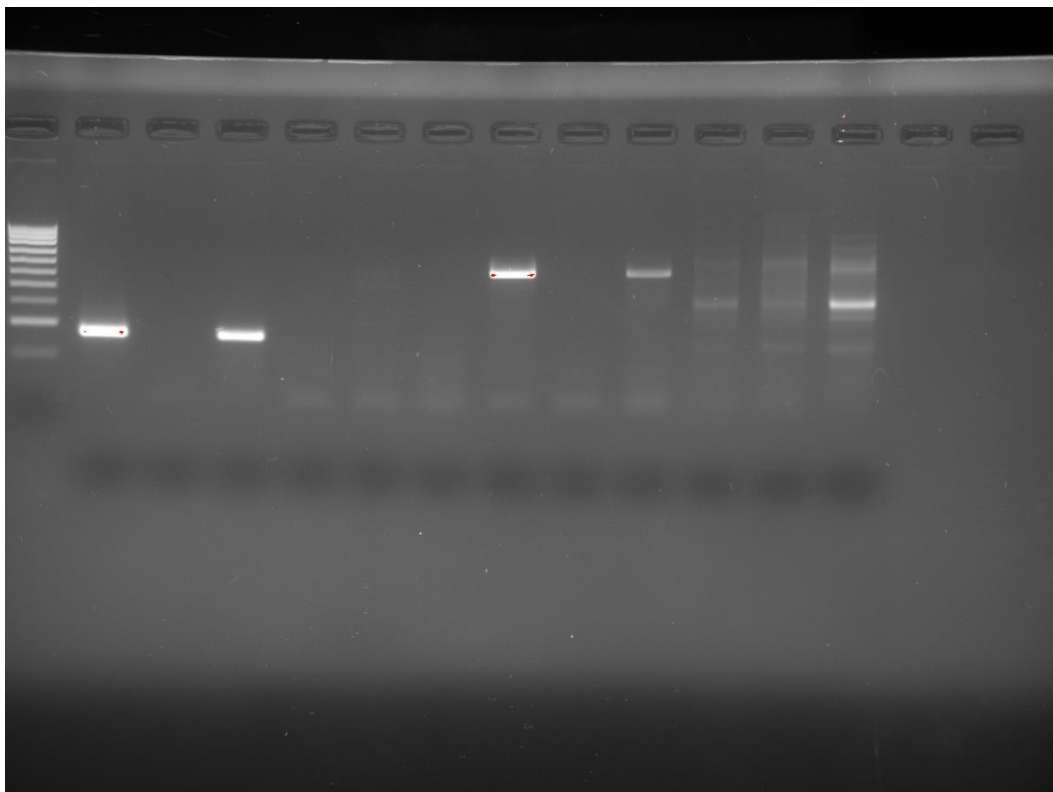


Figura 3.19.2. RT-PCR das células iPS do clone 7 e 9 na passagem 33 – Caracterização de células pluripotentes induzidas da linha HGPS do clone 7 e 9, de um paciente com Progeria. Na passagem 33, o C7 continha vírus Sendai e o seu controlo positivo também, enquanto o C9 não continha vírus Sendai. O KOS não apareceu no teste no C7, C9 e controlo positivo. O c-Myc apareceu no C7 e controlo positivo, mas não apareceu no C9. O Klf4 está presente no C7, C9 e no controlo positivo. Por ordem da esquerda para a direita, no gel, temos: SEV (clone 7, 9 e controlo positivo), KOS (clone 7, 9 e controlo positivo), c-Myc (clone 7, 9 e controlo positivo), Klf4 (clone 7, 9 e controlo positivo). Imagem obtida com *Molecular Imager ChemiDoc XRS+*.

3.20. Diferenciação das linhas celulares iPS dos clones 7 e 9 em EBs

Nas duas imagens abaixo, observa-se um resultado diferente obtido quando se iniciou o procedimento de diferenciação de iPS de C7 e C9 em *Embryoid Bodies* (EBs). O clone 7 formou agregados de células em fibras, enquanto no clone 9 as células juntaram-se em formações do tipo esfera.

Este resultado foi obtido em todos os triplicados de cada clone e também no mesmo procedimento de diferenciação em EBs, mas realizado anteriormente em outra placa com os mesmos clones.

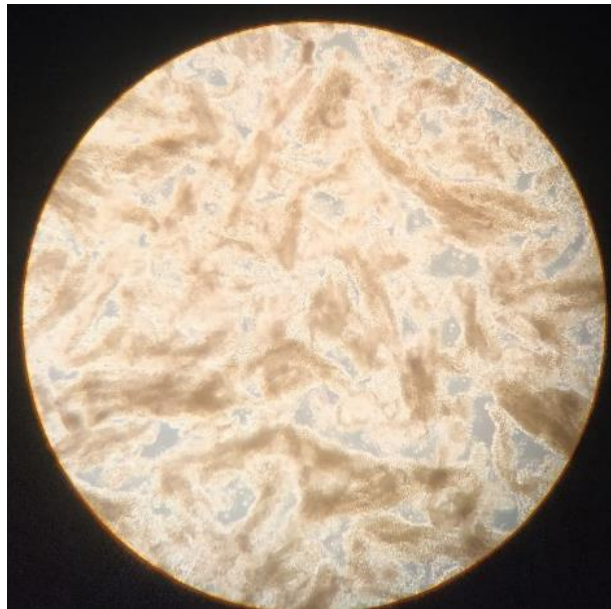


Figura 3.20.1. Diferenciação das linhas celulares iPS dos clones 7 em EBs – Nesta imagem observa-se o procedimento de diferenciação de iPS de C7 em EBs. Na imagem estão representados os agregados celulares do clone 7. Imagens obtidas ao microscópio Invertido Binocular para Cultura Primo Vert (Zeiss), com objetiva 10x de ampliação.

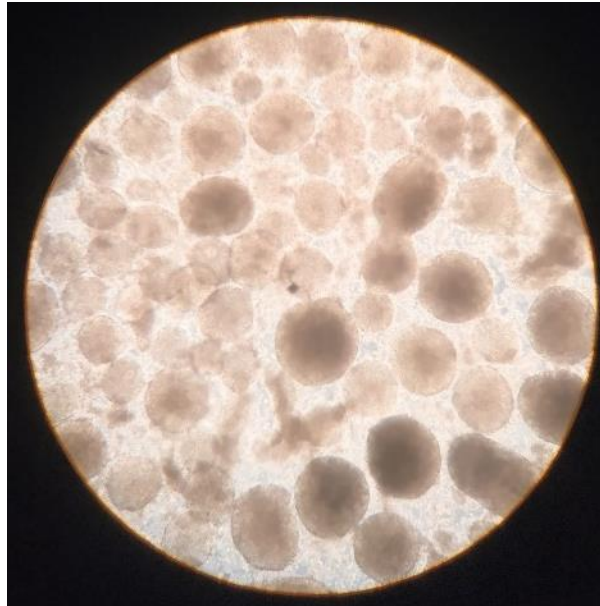


Figura 3.20.2. Diferenciação das linhas celulares iPS do clone 9 em EBs – Nestas imagem observa-se o procedimento de diferenciação de iPS de C9 em EBs. Na imagem à direita está representadas as esferas de células que foram originadas no clone 9. Imagens obtidas ao microscópio Invertido Binocular para Cultura Primo Vert (Zeiss), com objetiva 10x de ampliação.

Nas imagens abaixo, encontra-se a placa usada para diferenciação de EBs dos clones 7 e 9. Apenas foi mantido um poço do clone 9, pois nos outros poços os EBs não resistiram com o tempo e perderam aderência ao poço que estava revestido com *cover slip*.

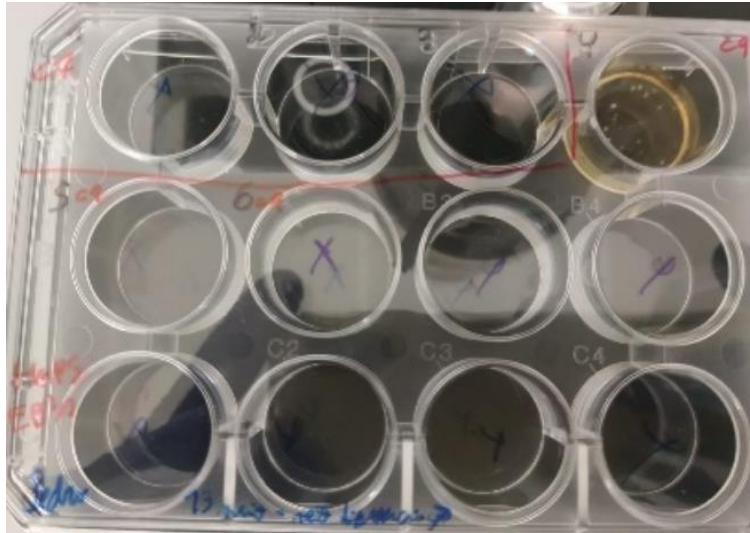


Figura 3.20.3. Diferenciação das linhas celulares iPS dos clones 7 e 9 em EBs no final do protocolo – Nesta placa de 12 poços foi realizado o procedimento de diferenciação de iPS de C7 e C9 em EBs. Na imagem encontra-se a placa para diferenciação de EBs apenas com o poço C9



Figura 3.20.4. Diferenciação das linhas celulares iPS do clone 9 em EBs no final do protocolo – Na imagem apresenta-se um dos EBs desse poço do clone 9, visualizada com o microscópio Invertido Binocular para Cultura Primo Vert (Zeiss), com objetiva 10x de ampliação.

4. Discussão

As mutações no gene *LMNA* são responsáveis por mais de dez doenças distintas. A HGPS é a mais conhecida destas laminopatias, em que a forma mais comum de HGPS se caracteriza pela produção da lâmina mutante A, designada por progerina. É um facto aceite que os efeitos patológicos da progerina são provocados pela sua rutura da integridade estrutural e funcional na lâmina nuclear. As autópsias feitas a pacientes com HGPS em estudos anteriores indicaram que a morte está associada à aterosclerose prematura e que pode ser acompanhada por perda muscular suave vascular (Zhang, *et al.*, 2010).

Existe uma heterogeneidade nos fenótipos, mesmo entre membros de uma única família que apresentam a mesma mutação no gene *LMNA* em patologias diferentes da HGPS, o que indica que estas condições representam um espectro de doenças que podem ter uma base comum subjacente, em que o resultado é influenciado por modificadores genéticos ou fatores ambientais (Brodsky, Muntoni, Miodic, Sinagra, Sewry e Mestroni, 2000).

De acordo com Skoczyńska, Budzisz, Dana e Rotsztein (2015), a progerina é um dos biomarcadores que é usado em estudos sobre o envelhecimento natural. Esta proteína é expressa como uma forma mutante no gene *LMNA*. A progerina, por ser uma forma mutante, causa muitos defeitos na região do envelope nuclear da célula, influencia o nível de espécies reativas de oxigénio e de enzimas antioxidantes, diminui a atividade dos proteossomas, provoca alterações epigenéticas e ainda causa problemas com a regulação na replicação e na transcrição. Como consequência, pode levar à disfunção celular, à apoptose e resultar na senescência precoce do organismo. Foram realizados muitos estudos para entender o mecanismo de processos de envelhecimento que ocorrem naturalmente, os quais podem ser semelhantes aos mecanismos presentes na Síndrome da Progeria Hutchinson-Gilford. Esta Síndrome é referida como uma doença geneticamente condicionada, pois acelera o envelhecimento e leva à morte do indivíduo com cerca de 15 anos de vida.

Segundo Matrone, Thandavarayan, Walther, Meng, Mojiri e Cooke (2019), a senescência pode ser induzida por um número elevado de estímulos que causam danos permanentes na sinalização do ADN e induzem o fenótipo das células senescentes, que podem incluir a expressão reduzida de marcadores endoteliais em células endoteliais de HGPS. De certa forma, a progerina parece afetar a ativação da via de resposta aos danos de ADN e a desregulação desta via pode ser responsável pelo desenvolvimento da patologia cardiovascular em doentes com HGPS.

Vários estudos relataram a produção de células iPS a partir das células dos pacientes com HGPS e demonstraram com sucesso que a diferenciação destas células iPS em células musculares, células estaminais mesenquimais ou em fibroblastos, repetiam as alterações associadas com o aumento de idade observadas na HGPS, tais como a senescência prematura. Dois dos estudos informaram que não foram obtidas colónias de células iPS a partir de culturas de fibroblastos com HGPS em passagens mais altas. Um dos estudos também relatou que a eficiência de reprogramação dos fibroblastos com HGPS era 4 vezes inferior do que na reprogramação em fibroblastos de controlo parental em passagens mais novas (Hayashi, 2017).

Especificamente relatando os resultados obtidos no estudo feito durante o estágio, mais precisamente o estudo do segundo semestre, após a cultura celular e a reprogramação de células HGPS em iPS, foi realizada neste projeto, a imunocitoquímica para os quatro marcadores da pluripotência, OCT4, SOX2, NANOG e SSEA4, na linha celular HGPS das células iPS do clone 7 e clone 9. Em seguida, realizou-se a imunofluorescência e obtiveram-se os resultados analisados num microscópio de fluorescência Axioimager Z2 (Zeiss). Como demonstra a Figura 3.16.1. foram visíveis nas células iPS para os clones 7 e 9 os quatro marcadores da pluripotência.

Nas células iPS do clone 7 e do clone 9 da linha celular HGPS obtidas ao longo deste projeto, foi realizado o protocolo para deteção da fosfatase alcalina utilizando *Alkaline Phosphatase Staining Kit II (Stemgent)*. Assim é visível na Figura 3.18.1. a marcação a roxo nas células presentes nas lamelas dos duplicados para o clone 7

e 9. Isto revela que as células iPS transduzidas da linha celular HGPS se encontram em pluripotência.

Nas células iPS do clone 7 e 9 da linha celular HGPS que estavam em cultura em passagem 12, extraiu-se o RNA, obteve-se o cDNA e posteriormente realizou-se a reação da RT-PCR num gel de agarose a 2% para que se pudesse observar os resultados. Como demonstra a Figura 3.20.1., foi visível a presença de vírus Sendai nas células iPS da linha celular HGPS do C7 e no seu controlo positivo, sendo que no C9 as células iPS da linha celular HGPS não apresentavam vírus Sendai. Na Figura 3.20.1. não está representado a presença de KOS, KLF e c-Myc, enquanto na Figura 3.16.1. na imunocitoquímica das iPS do clone 7 e do clone 9 é visível a existência do OCT4 e do SOX2, dois constituintes do KOS, bem como outros marcadores da pluripotência. Isto indica que, embora os marcadores de pluripotência não estivessem presentes na RT-PCR, talvez devido a algum erro na realização da mesma, eles estão presentes noutra procedimento, indicando que estas células se encontram num estado de pluripotência.

Fez-se outra RT-PCR, na passagem 33, a qual mostrou também a presença de SEV no clone 7, bem como para o controlo positivo, mas não está presente o vírus de Sendai para o clone 9. O KOS não apareceu no teste no C7, C9 e controlo positivo. O c-Myc apareceu no C7 e controlo positivo, mas não apareceu no C9. O Klf4 está presente no C7, C9 e no controlo positivo.

Neste projeto foi realizado o procedimento da diferenciação de iPS das células de fibroblastos com HGPS para os clones 7 e 9. Foi repetido duas vezes, pois não estava a ser atingido o resultado pretendido com as células, pois estas não aderiram ao poço em ambos os clones. Ainda assim, na repetição do procedimento conseguiu-se que as células diferenciasses em EBs, aderindo à *cover slip* do poço da placa. Foi visível um resultado nas duas repetições deste procedimento e em todos os triplicados das células do clone 7 que formaram fibras e demoraram mais tempo a aderir à *cover slip* (Figura 3.21.1.) do que as células do clone 9, as quais formaram esferas e tiveram mais facilidade em aderir à *cover slip* (Figura 3.21.2.). Este resultado foi obtido num estágio inicial, durante a cultura celular dos EBs.

Entre a terceira e a quarta semana, as células do clone 7 começaram a demonstrar uma maior aderência à *cover slip* dos triplicados destes poços na placa. Por outro lado, as células do clone 9 que estavam a formar EBs começaram a soltar-se aos poucos da *cover slip* presente no triplicado destes poços na placa.

Foi realizada a imunocitoquímica para os triplicados dos EBs do clone 7 e do clone 9, que estavam há quatro semanas em cultura, e também de um poço do clone 9 com a diferenciação em EBs de uma placa com cinco semanas, aproximadamente. Nos resultados, só foi possível observar os marcadores da pluripotência nos triplicados dos EBs do clone 7, pois para o clone 9 houve falta de adesão à *cover slip*, não possibilitando uma boa montagem da lâmina nem a sua visualização na imunofluorescência.

Como resultado da diferenciação *in vitro* através da formação de corpos embrioides, as células do clone 7 da linha celular HGPS conseguiram representar cada uma das três camadas germinativas representadas na Figura 3.17.1., ilustradas pela expressão de marcadores da endoderme (α FP), mesoderme (α SMA) e ectoderme (TUJ1), que são marcadores da diferenciação como descrito em Chen, *et al.* (2017).

Os resultados obtidos tiveram como objetivo caracterizar as células iPS que foram obtidas através da transdução de fibroblastos com HGPS. Assim, foi possível ver se as células obtidas durante a cultura celular estavam com os marcadores de pluripotência e se se conseguiam diferenciar em outras linhas celulares, *in vitro*, o que indica que possuem pluripotência.

Conclui-se então que, no final do estágio, os objetivos acima descritos foram atingidos. Foi possível fazer a cultura das células de fibroblastos com HGPS para as transduzir e obter células iPS, com capacidade para manifestar um estado pluripotente. Foi ainda atingido o objetivo de fazer a caracterização das células, vendo-se que estavam num estado pluripotente, com os devidos marcadores de pluripotência, e as mesmas conseguiram-se diferenciar em outros tipos celulares, verificando-se deste modo que estavam de facto pluripotentes. Para além disso, sendo que no primeiro procedimento do primeiro semestre não foi possível alcançar

sucesso no mesmo – pois as células de fibroblastos com HGPS não formaram colónias nem atingiram a pluripotência, chegando a um estado de senescência, devido ao facto de as células dos fibroblastos com HGPS serem mais velhas, numa cultura celular em *feeder* de MEF e em *feeder free* com geltrex –, o que sucedeu no procedimento do segundo semestre foi uma alteração neste primeiro procedimento.

Assim sendo, no segundo semestre, adquiriram-se outros fibroblastos com HGPS, o que poderá ter tido uma boa influência nos resultados deste segundo procedimento. Ainda assim, estes fibroblastos quando foram transduzidos encontravam-se em passagem 17, uma passagem acima do que os fibroblastos anteriores que quando foram transduzidos, no primeiro semestre, estavam em passagem 16. Realizou-se a cultura celular em *feeder* de fibroblastos HFF inativados, pois o que poderá ter causado o insucesso no primeiro procedimento pode ter sido o facto de as células estarem em *feeder* de fibroblastos MEF, até as células iPS transduzidas a partir de fibroblastos com HGPS formarem colónias e manterem o estado constante de pluripotência. Estes dois pontos foram atingidos e as células não entraram em senescência e, posteriormente, passaram-se as colónias da cultura celular em *feeder* para uma cultura celular em *feeder free*. Como este passo também foi bem sucedido, conseguiu-se então caracterizar as células iPS dos clones 7 e 9, mostrando que continham características semelhantes a outras células iPS, como por exemplo, a capacidade de diferenciação em outros tipos celulares e a presença de marcadores de pluripotência.

5. Perspetivas futuras

Neste projeto, fez-se a reprogramação de células somáticas recolhidas de dadores com a Síndrome da Progeria Hutchison-Gilford para obter células iPS. Realizou-se a cultura de células e conseguiu-se obter células pluripotentes, capazes de se diferenciar em outras células. Foram depois caracterizadas com testes específicos para se saber se continham características das células pluripotentes.

Para complementar este estudo dever-se-ia realizar a diferenciação direcionada das células de iPS obtidas através de fibroblastos transduzidos com HGPS, em células cardíacas e neuronais, seguida da caracterização das mesmas células diferenciadas obtidas em cultura celular.

Com este modelo de células iPS, podemos ter um modelo de células que contêm características semelhantes às células do envelhecimento fisiológico, pertencentes a indivíduos adultos de meia-idade e de idade avançada.

Assim, poder-se-ia reprogramar células do envelhecimento fisiológico para obter células iPS e depois diferenciar em células específicas, realizando a mesma diferenciação nas células de modelo de envelhecimento provenientes de fibroblastos de progeria. Depois da caracterização dos dois tipos de células, poderíamos saber como se comportam as células iPS de fibroblastos com HGPS quando submetidas à diferenciação, pois possuem a mutação pertencente à doença. Dever-se-ia comparar com as células do envelhecimento fisiológico para obter conclusões.

Para além da diferenciação dirigida, poder-se-ia realizar outros procedimentos nas células iPS de progeria e nas células iPS de envelhecimento fisiológico. A experiência seria envelhecer ambas as células com agentes específicos e depois observar como são as suas características, com o objetivo de saber se serão um bom modelo de envelhecimento ou não.

Com as células envelhecidas a partir de células iPS do modelo do envelhecimento e das células do envelhecimento fisiológico, poder-se-ia submeter as células a

reagentes que pudessem atrasar o envelhecimento a fim de saber como se comportam as células envelhecidas de progeria em relação às células do envelhecimento fisiológico.

Consoante os resultados fossem promissores do tratamento do envelhecimento em células HGPS, poder-se-ia realizar outros procedimentos. Assim, no futuro, poder-se-ia realizar ensaios *in vivo* em ratinhos com os mesmos reagentes de envelhecimento e de tratamento do envelhecimento a fim de apurar algum tratamento do envelhecimento. Realizava-se primeiro em ratinhos envelhecidos e depois em ratinhos que tivessem a doença de progeria. Seria um bom ensaio para tentar descobrir algum tratamento para as pessoas com a HGPS.

5. Bibliografia

Agarwal, A. K., Fryns, J. P., Auchus, R. J. & Garg, A. (2003). Zinc metalloproteinase, ZMPSTE24, is mutated in mandibuloacral dysplasia. *Human Molecular Genetics*, 12(16), 1995-2001.

Agarwal, U. S., Sitaraman, S., Mehta, S. & Panse, G. (2010). Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Indian Journal of Dermatology, Venereology & Leprology*, 76(5), 591-595.

Al Abbar, A., Ngai, S. C., Nograles, N., Alhaji, S. Y. & Abdullah, S. (2020). Induced Pluripotent Stem Cells: Reprogramming Platforms and Applications in Cell Replacement Therapy. *Bioresearch Open Access*, 9(1), 121-136.

Bitman-Lotan, E & Orián, A. (2021). Nuclear organization and regulation of the differentiated state. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 78(7), 3141-3158.

Boguslavsky, R. L., Stewart, C. L. & Worman, H. J. (2006). Nuclear lamin A inhibits adipocyte differentiation: implications for Dunnigan-type familial partial lipodystrophy. *Human Molecular Genetics*, 15(4), 653-663.

Brodsky, G. L., Muntoni, F., Miodic, S., Sinagra, G., Sewry, C. & Mestroni, L. (2000). Lamin A/C gene mutation associated with dilated cardiomyopathy with variable skeletal muscle involvement. *Circulation*, 101(5), 473-476.

Burke, B. & Stewart, C. L. (2006). The Laminopathies: The Functional Architecture of the Nucleus and Its Contribution to Disease. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 7(1), 369-405.

Burtner, C. R. & Kennedy, B. K. (2010). Progeria syndromes and ageing: what is the connection?. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 11(8), 567-578.

Cattin, M. E., Muchir, A. & Bonne, G. (2013). 'State-of-the-heart' of cardiac laminopathies. *Current Opinion in Cardiology*, 28(3):297-304.

Chandravanshi, S. L., Rawat, A. K., Dwivedi, P. C. & Choudhary, P. (2011). Ocular manifestations in the Hutchinson-Gilford Progeria syndrome. *Indian Journal of Ophthalmology*, 59(6), 509-512.

Chen, Z., Chang, W. Y., Etheridge, A., Strickfaden, H., Jin Z., Palidwor, G., Cho, J. H., Wang, K., Kwon, S. Y., Doré, C., Raymond, A., Hotta, A., Ellis, J., Kandel, R. A., Dilworth, F. J., Perkins, T. J., Hendzel, M. J., Galas, D. J. & Stanford, W. L. (2017). Reprogramming progeria fibroblasts re-establishes a normal epigenetic landscape. *Aging Cell*, 16(4), 870-887.

Coriell Institute for Medical Research (2021). *GM01972 – Fibroblast*. Consultado em 30 de julho de 2022. Disponível em https://www.coriell.org/0/Sections/Search/Sample_Detail.aspx?Ref=GM01972&Product=CC

Eriksson, M., Brown, W. T., Gordon, L. B., Glynn, M. W., Singer, J., Scott, L., Erdos, M. R., Robbins, C. M., Moses, T. Y., Berglund, P., Dutra, A., Pak, E., Durkin, S., Csoka, A. B., Boehnke, M., Glover, T. W. & Collins, F. S. (2003). Recurrent de novo point mutations in lamin A cause Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Nature*, 423(6937), 293-298.

Fong, L. G., Ng, J. K., Lammerding, J., Vickers, T. A., Meta, M., Coté, N., Gavino, B., Qiao, X., Chang, S. Y., Young, S. R., Yang S. H., Stewart, C. L., Lee, R. T., Bennett, C. F., Bergo, M. O. & Young, S. G. (2006). Prelamin A and lamin A appear to be dispensable in the nuclear lamina. *The Journal of Clinical Investigation*. 116(3), 743-752.

Gruenbaum, Y & Foisner, R. (2015). Lamins: Nuclear Intermediate Filament Proteins with Fundamental Functions in Nuclear Mechanics and Genome Regulation. *Annual Review of Biochemistry*, 84(1), 131–164.

Hayashi, Y., (2017). Human Mutations Affecting Reprogramming into Induced Pluripotent Stem Cells. *AIMS Cell and Tissue Engineering*, 1(1), 31-46.

Hutchison, C. J. (2002). Lamins: building blocks or regulators of gene expression?. *Nature Reviews, Molecular Cell Biology*, 3(11), 848-858.

Kang, S. M., Yoon, M. H & Park, B. J. (2018). Laminopathies; Mutations on single gene and various human genetic diseases. *BMB Reports*, 51(7), 327-337.

Lin F, Worman HJ. 1993. Structural organization of the human gene encoding nuclear lamin A and nuclear lamin C. *The journal of biological chemistry*. 268 (22), 16321–16326. Macara, I. G. (2001). Transport into and out of the nucleus. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 65(4), 570-594.

Llames, S., García-Pérez, E., Meana, Á., Larcher, F. & del Río, M. (2015). Feeder Layer Cell Actions and Applications. *Tissue Engineering Part B: Reviews*, 21(4), 345-353.

Madrid, M., Sumen, C., Aivio, S. & Saklayan, N. (2021). Autologous Induced Pluripotent Stem Cell-Based Cell Therapies: Promise, Progress, and Challenges. *Current Protocols*, 1(3), 1-25.

Malashicheva, A & Perepelina, K. (2021). Diversity of Nuclear Lamin A/C Action as a Key to Tissue-Specific Regulation of Cellular Identity in Health and Disease. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9(761469), 1-18.

Matrone, G., Thandavarayan, R. A., Walther, B. K., Meng, S., Mojiri, A. & Cooke, J. P. (2019). Dysfunction of iPSC-derived endothelial cells in human Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Cell Cycle*, 18(19), 2495-2508.

Moradi, S., Mahdizadeh, H., Šarić, T., Kim, J., Harati, J., Shamsavarani, H., Greber, B. & Moore, J. B. (2019). Research and therapy with induced pluripotent stem cells (iPSCs): social, legal, and ethical considerations. *Stem Cell Research & Therapy*, 10(341), 1-13.

Niwa, H. (2007). How is pluripotency determined and maintained? *Development*, 134(4), 635-646.

Olive, M., Harten, I., Mitchell, R., Beers, J. K., Djabali, K., Cao, K., Erdos, M. R., Blair, C., Funke, B., Smoot, L., Gerhard-Herman, M., Machan, J. T., Kutys, R., Virmani, R., Collins, F. S., Wight, T. N., Nabel, E. G. & Gordon, L. B. (2010). Cardiovascular Pathology in Hutchinson-Gilford Progeria: Correlation With the Vascular Pathology of Aging. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 30(11), 2301–2309.

Rankin, J. & Ellard, S. (2007). The laminopathies: a clinical review. *Clinical Genetics*, 70(4), 261-274.

Reddel, C. J. & Weiss, A. S. (2004). Lamin A expression levels are unperturbed at the normal and mutant alleles but display partial splice site selection in Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Journal of Medical Genetics*, 41(9), 715–717.

Sarkar, P. K. & Shinton, R. A. (2001). Hutchinson-Guilford progeria syndrome. *Postgraduate Medical Journal*, 77(907), 312–317.

Skoczyńska, A., Budzisz, E., Dana, A. & Rotsztein, H. (2015). New look at the role of progerin in skin aging. *Prz Menopauzalny*, 14(1),53-58.

Takahashi, K. & Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 126(4), 663-676.

Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K. & Yamanaka, S. (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*, 131(5), 861-872.

van Engelen, B. G. M., Muchir, A., Hutchison, C. J., van der Kooi, A. J., Bonne, G., & Lammens, M. (2005). The lethal phenotype of a homozygous nonsense mutation in the lamin A/C gene. *Neurology*, 64(2), 374–376.

Young, S. G., Meta, M., Yang, S. H. & Fong, L. G. (2006). Prelamin A farnesylation and progeroid syndromes. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(52), 39741-39745.

Zhang, J., Lian, Q., Zhu, G., Zhou, F., Sui, L., Tan, C., Mutalif, R. A., Navasankari, R., Zhang, Y., Tse, H. F., Stewart, C. L. & Colman, A. (2010). A human iPSC model of Hutchinson Gilford Progeria reveals vascular smooth muscle and mesenchymal stem cell defects. *Cell Stem Cell*, 8(1), 31-45.