

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Potencial de Transfecção e Indução de Células Pluripotentes a Partir de  
Células-Tronco Mesenquimais Murinas

Tiago Pires Dalberto

Tese submetida ao Programa de Pós-  
Graduação em Genética e Biologia  
Molecular da UFRGS como requisito  
parcial para a obtenção do grau de  
Doutor.

Orientadora Profa Dra Nance Beyer Nardi

Co-orientador Prof Dr Guido Lenz

Porto Alegre

Junho, 2012

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Imunogenética do Departamento de Genética e no Laboratório de Sinalização e Plasticidade Celular do Departamento de Biofísica, ambos pertencentes ao Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Financiamento: CNPq, CAPES e FAPERGS

Esta tese é dedicada as minhas duas iPSC (meus avós Olavo e Zola), que mostraram que valores como dedicação e caráter são suficientes para definir a rota certa indiferentemente dos estímulos externos.

## **Agradecimentos**

Inicialmente agradeço aos meus orientadores, Dra Nance Nardi e Guido Lenz pela oportunidade de conhecer um pouquinho do fantástico mundo das células-tronco. Nance, em nenhum outro lugar depositaram em mim a confiança que tu depositaste e, por isso, te agradeço muitíssimo; além de ser um grande exemplo que seguirei. Guido, sempre que a apatia e o desespero tomaram conta de mim tu foste o incentivador, o animador; e, sem isso, nunca teríamos os resultados que temos, nem a criação desta linha de pesquisa tão promissora no nosso estado. Além disso, pelo grande esforço para ser contemplado com a minha bolsa de pós-doutorado que será implementada em breve. Não conheço palavras pra expressar a minha gratidão!

Aos meus grandes exemplos de vida, meus avós Olavo e Zola que foram sempre o meu porto seguro. Com certeza esta tese também é e tem muito de vocês!

Aos 10 anos de laboratório de imunogenética e as diferentes gerações de pesquisadores com os quais pude conviver e a tudo que aprendi. É muito difícil citar o nome de todos, mas impossível não citar alguns: Andres, um dos mais completos pesquisadores que já conheci; Mel; Flavinha; Ed;Paula e seu mal humor até agradável; Daniel Garcia um grande parceiro; Pedro e sua tranquilidade inabalável; Fernanda Rabaioli, colega desde o mestrado e suas “tiradas” sempre no momento oportuno; Francis e sua irreverência inconfundível, Pietra e a sua originalidade; Tiago Veit; o “pelotão de imunoinformática (Gustavo, Meg, Dinler, Maurício, Samuel)...

À turma da sala de cultivo celular que fazia até o mais exaustivo e produtivo dia parecer diversão. Patrícia Sesterheim, pela honra de ter dividido a bancada contigo, e saber que até a eternidade eu posso contar com a tua amizade, carinho e apoio irrestritos. Márcia, pelo teu carinho e amizade igualmente irrestritos e por dizer sempre o que precisa ser dito independentemente da situação. Elvira e a sua paciência e parceria sempre presentes.

Às minhas duas orientadas que eu provavelmente desorientei um pouco e com as quais eu certamente aprendi muito. Priscila Machado, pela tua confiança contagiante, tua alegria generalizada, carinho e amizade gigantescos. Raquel, pela tua dedicação absoluta (até mesmo depois de ter sido deslocada para outros projetos e após o início do teu mestrado), além da tua amizade e apoio incondicional. Tenho muito orgulho de vocês e de ter participado da vida científica de vocês!

À Priscila Vianna, pela ajuda fundamental no final do doutorado, pelas incursões ao vitinho e saber que posso contar contigo sempre!

Aos meus novos colegas do laboratório de plasticidade e sinalização celular pelo ótimo ambiente e por me fazerem sentir em casa desde o primeiro dia de trabalho. Principalmente ao meu grande amigo José Vargas, por ser sempre um grande parceiro (desde projetos científicos mirabolantes até uma visita ao Dublin pub).

Aos membros do Laboratório Nacional de Células-Tronco Embrionárias do Rio de Janeiro (LaNCE) por terem me recebido e se disponibilizarem durante o meu estágio. Especialmente ao Yury e a Bia por todo o compromisso, paciência e dedicação ao serem meus tutores durante este período; a Bruna por ter me orientado a distância e sem a qual esta tese não teria sido concluída; ao Dr Stevens Rehen por disponibilizar o uso do laboratório, seder material além de disponibilizar seu curto tempo e conhecimento gigantesco.

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, que não é nota 7 na capes por acaso. Por todo o aprendizado durante o mestrado e doutorado com professores de excelência. Em especial ao Coordenador Administrativo, Elmo Cardoso, que atualmente cumpre sozinho todas as funções do cargo, além de sempre ajudar e orientar os alunos em todos os momentos. E não poderia esquecer, do Dr Claiton Bao, meu primeiro orientador no depto de Genética, um grande exemplo de orientador, pesquisador e professor.

Aos membros da banca por disponibilizarem o tempo de leitura da tese e pela compreensão da nossa necessidade de rapidez. Ao Dr Lindolfo

Meirelles, por ter sido sempre um grande exemplo de foco nos objetivos e minúcia metodológica. Ao Dr Diego Bonatto pela nova parceria científica. Ao Dr José Arthur por mais de 10 anos de exemplo, incentivo, amizade, e sempre dar a liberdade para pensar e debater todo e qualquer tema; aqui também não tenho palavras para agradecer todo este aprendizado.

À minha companheira canina (Panda) que não se cansa de ler artigos, redigir artigo, dissertação, tese e projetos e que trouxe um novo universo pra dentro da minha vida. Neste universo não posso deixar de mencionar todas as grandes amizades que nasceram e continuam sendo nutridas a partir do “cachorródromo da redenção”. Sendo assim, obrigado pela parceria de final de tarde e final de semana: Maria Fernanda, Matheus, Ivana, Karen, Cris, Christiano, Esther, Simone, Tiagos, Vini, Fred, entre muitos outros e seus respectivos cães...

À família Henz que me acolheu de forma tão carinhosa. A Carla Louise por toda a compreensão e companheirismo nas etapas finais desta tese.

## Sumário

1) Introdução.....	18
1.1) Células-Tronco .....	18
1.1.1) Células-Tronco Embrionárias .....	18
1.1.2) Células-Tronco do Adulto.....	19
1.1.2.1) Células-Tronco Mesenquimais.....	20
1.2) Transferência Gênica .....	22
1.3) Células-Tronco Pluripotentes Induzidas.....	27
1.3.1) Rotas e Fatores Envolvidos na Reprogramação Celular .....	29
1.3.2) Eficiência do Processo de Reprogramação.....	33
1.3.3) Diferenças entre as iPSC.....	37
1.3.3) Biossegurança .....	37
1.3.4) Utilização das iPSC .....	38
2) Objetivos.....	40
3) Materiais e Métodos .....	41
3.1) Cultivo Celular .....	41
3.1.1) Isolamento de MSC .....	41
3.1.2) Condições de Cultivo Celular.....	42
3.2) Diferenciação <i>in vitro</i> das MSC.....	43
3.3) Imunofenotipagem das MSC.....	43
3.4) Produção de Vetores Retrovirais.....	43
3.5) Transfecção com o Vetor pEGFP-N1 .....	44
3.6) Quantificação da Expressão Gênica.....	44
3.7) Geração de iPSC .....	46
3.8) Detecção da Atividade de Fosfatase Alcalina .....	46
3.9) Análise Estatística.....	46
4) Resultados .....	47
4.1) Isolamento e Caracterização das MSC Isoladas.....	47
4.2) Transfecção .....	51
4.3) Quantificação da Expressão dos Fatores de Pluripotência em MSC.....	55

4.4) <i>Geração de iPSC</i> .....	57
5) <i>Discussão</i> .....	70
5.1) <i>Conclusões e Perspectivas</i> .....	74
Anexo: Mesenchymal stem cell as a platform for gene therapy protocols .....	93



## Lista de Abreviaturas

- ADSC – *adipose derived stem cell* (célula-tronco derivada de tecido adiposo)
- CD – *cluster of differentiation* (agrupamento de diferenciação)
- CDC – *centers of disease control and prevention* (centros de controle e prevenção de doenças - órgão norte-americano responsável pelo controle e prevenção de doenças).
- cDNA – DNA complementar
- CHO – *chinese hamster ovary cell* (linhagem celular de ovário de hamster chinês)
- c-Myc - *myelocytomatosis oncogene* (oncogene da mielocitomatose)
- COBEA – colégio brasileiro de experimentação animal
- DMEM – meio eagle modificado por Dulbecco
- DMEM/F12 - meio eagle modificado por dulbecco suprido com nutriente F12
- dNTPs – desorribonucleotídeo trifosfatado
- EB – *embryonic body* (corpo embrióide)
- EGFP – *enhanced Green fluorescent protein* (protein verde fluorescente aprimorada)
- ESC – *embryonic stem cell* (célula-tronco embrionária)
- FGF – *fibroblast growth factor* (fator de crescimento de fibroblasto)
- GAG – poliproteína de retrovírus
- Gapdh – gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
- HEK293T – *human embryonic kidney 293T* (linhagem celular de rim embrionário humano 293T)
- hESC – *human embryonic stem cell* (célula-tronco embrionária humana)
- HLA-DR – *human leukocyte antigen class II cell surface receptor* (receptor de superfície celular de antígeno leucocitário humano de classe II)
- hTERT – *human telomerase reverse transcriptase* (transcriptase reversa de telomerase humana)
- IMR90 – linhagem de fibroblasto humano IMR90
- Ink4a/Arf – Inibidor A de ciclina-dependente de quinase
- iPSC – *induced pluripotent stem cell* (célula-tronco pluripotente induzida)

Klf4 – fator similar a kruppel 4  
LIF – *Leukemia inhibitory factor* (fator de inibição de leucemia)  
Lin28 – proteína de ligação à RNA lin28  
MEF – *murine embryonic fibroblast* (fibroblasto embrionário murino)  
meMSC – célula-tronco mesenquimal derivada de medula espinhal  
mESC – *murine embryonic stem cell* (célula-tronco embrionária murina)  
miRNA – microRNA  
MMLV – *moloney murine leukemia virus* (virus da leucemia murina de moloney)  
MOI – *multiplicity of infection* (multiplicidade de infecção)  
moMSC – célula-tronco mesenquimal derivada de medula óssea  
mRNA – RNA mensageiro  
MSC – *mesenchymal stem cell* (célula-tronco mesenquimal)  
Nanog – gene regulador nanog  
Oct4 – *octamer-binding protein 4* (proteína de ligação octâmera 4)  
P21 – proteína1 de interação com CDK  
P53 – proteína de tumor p53  
PBS – *phosphate buffered saline* (solução salina tamponada com fosfato)  
PE – *phycoeritrin* (ficoeritrina)  
PEI – polietilenoimina  
PI – *propidium iodide* (Iodeto de propídeo)  
pMSC – célula-tronco mesenquimal derivada de pulmão  
POL – transcriptase reversa de retrovírus  
rMSC – célula-tronco mesenquimal derivada de rim  
SCA-1 – *stem cell antigen 1* (antígeno 1 de célula-tronco)  
Sox2 - *sex determining region Y-box 2* (região determinante de sexo em Y – localização 2)  
SV40 – *large antigen of simian virus 40* (antígeno grande do vírus de símios 40)  
Tcl-1 $\alpha$  - *T-cell leukemia/lymphoma 1A* (leucemia/linfoma de célula T)  
VSV-G – glicoproteína G do vírus da estomatite vesicular  
YA – *Yamanaka's factors* (fatores de Yamanaka)  
 $\beta$ -Act – beta actina

## Lista de Figuras

Figura 1. Representação esquemática da reprogramação celular utilizando os YA e algumas das características mais marcantes do cultivo das células até o surgimento das colônias iPSC (Modificado a partir da revisão de Plath and Lowry, 2011).....	28
Figura 2. Representação esquemática dos modelos propostos por Hanna et al. (2009).....	31
Figura 3. Cultivo de MSC. Fase inicial (P0) e cultivo estabelecido (a partir de P2). Aumento de 100x.....	48
Figura 4. Diferenças morfológicas em meMSC ao decorrer do cultivo celular. Aumento de 100x .....	49
Figura 5. Fotomicrografias de moMSC diferenciadas em osteócitos e adipócitos após a coloração. Aumento de 100x. ....	50
Figura 6. Imunofenotipagem de rMSC, pMSC, moMSC, cMSC e ADSC .....	49
Figura 7. Imunofenotipagem de meMSC .....	49
Figura 8. Padronização das condições de transfecção com lipofectamine 2000. A. Porcentagem de células positivas para EGFP e para Iodeto de Propídeo (PI). * $p < 0,05$ ; ** $p < 0,001$ . B. Exemplos de células transfectadas. Aumento de 100x. ....	52
Figura 9. Eficiência de transfecção de pEGFP-N1 com Lipofectamine 2000 e viabilidade após o tratamento de diferentes MSC nos estágios de cultivo estado. A. cMSC, moMSC, rMSC e pMSC em estágio inicial de cultivo (até P7). B. ADSC, cMSC, meMSC, moMSC. rMSC e pMSC em estágio intermediário de cultivo (de P8 a P12). C. ADSC, cMSC, moMSC, rMSC e pMSC em estágio tardio de cultivo (a partir de P13). D. pMSC nos três estágios de cultivo. * $P < 0,05$ .....	54
Figura 10. Expressão relativa dos fatores de pluripotência em diferentes MSC ao decorrer do cultivo celular. ....	56
Figura 11. Mudanças morfológicas após a transdução com YAs. A. Esquema com principais modificações ocorridas com o passar do tempo. B. Exemplos	

das mudanças morfológicas nas células após a transdução. Aumento de 100x .....	58
Figura 12. Exemplos de colônias iPSC isoladas. Aumento de 100x. ....	59
Figura 13. Esquema com principais modificações ocorridas nas moMSC após os diferentes tratamentos, juntamente com exemplos das mudanças morfológicas nas células após a transdução. A. Uma transdução e substituição do meio HDMEM por meio mESC no dia 3. B. Duas transduções e substituição do meio HDMEM por meio mESC no dia 3. C. Uma transdução e substituição do meio HDMEM por meio mESC no dia 5. D. Duas transduções e substituição do meio HDMEM por meio mESC no dia 5. Aumento de 100x .....	59
Figura 14. Detecção da atividade da Enzima Fosfatase Alcalina nas colônias iPSC. Imagens com e sem contraste de fase. Aumento de 100x.....	61
Figura 15. Reprogramação utilizando placas cobertas por 0,2% de gelatina. A. Esquema com principais modificações ocorridas com o passar do tempo. B. Exemplos das mudanças morfológicas nas células após a transdução. Aumento de 100x .....	62
Figura 16. Reprogramação utilizando rMSC e pMSC em placas cobertas por 0,2% de gelatina. A. Esquema com principais modificações ocorridas com o passar do tempo. B. Exemplos das mudanças morfológicas nas células após a transdução. Aumento de 100x.....	64

## Lista de Tabelas

Tabela 1. Exemplos de transferência gênica em MSC com diferentes vetores	25
Tabela 2. Diferentes tipos de vetores, eficiência de reprogramação e tipos celulares utilizados para reprogramação.....	34
Tabela 3. Sequência dos oligonucleotídeos utilizados neste trabalho. ....	45
Tabela 4. Número de colônias <i>iPSC</i> positivas para fosfatase alcalina em cada tratamento .....	61
Tabela 5. Número de Colônias <i>iPSC</i> .....	63
Tabela 6. Número de colônias <i>iPSC</i> após a reprogramação de MSC de diferentes origens.....	70

## Resumo

As células-tronco mesenquimais (MSC) são caracterizadas pelo seu potencial de diferenciação em células de origem mesenquimal como adipócitos, condrócitos e osteócitos; ação parácrina; capacidade imunorregulatória e tropismo por regiões lesionadas e câncer. Estas células já foram isoladas de diferentes órgãos e tecidos e apresentam características bastante similares, mas não idênticas: fato que ressalta a importância da realização de estudos comparativos para determinar a real equivalência das MSC de diferentes origens.

Os principais objetivos deste trabalho foram analisar o potencial de transferência gênica mediado por lipofectamine 2000, detectar e quantificar a expressão dos fatores de pluripotência Oct4, Klf4, Sox2, c-Myc, Lin28, Tcl-1 $\alpha$ , Nanog e comparar a eficiência de reprogramação celular em MSC murinas provenientes de medula óssea (moMSC), tecido adiposo (ADSC), rim (rMSC), pulmão (pMSC), veia cava (cMSC) e medula espinhal (meMSC). Estas células também foram classificadas com relação ao tempo de cultivo, sendo subdivididas em: Cultivo Inicial (até passagem 7), Cultivo Intermediário (da passagem 8 a 12) e Cultivo Tardio (a partir da passagem 13).

No que se refere à transfecção usando lipofectamine 2000, foi observada maior eficiência em pMSC e rMSC quando comparadas a cMSC, todas em passagem tardia.

Neste trabalho é mostrada a expressão de Klf4, Sox2, Lin28 e c-Myc em MSC murinas isoladas de pulmão, rim, tecido adiposo e medula espinhal. Lin28 foi detectado apenas no estágio inicial do cultivo de pMSC e ADSC e intermediário de rMSC. Enquanto que nas meMSC, Lin28 e Sox2 parecem diminuir com o tempo de cultivo chegando a zero no cultivo tardio. Não foi detectada a expressão de Oct4, Nanog ou Tcl-1 $\alpha$ .

Um dado muito expressivo é a reprogramação de moMSC apenas com OCT4 e SOX2 quando é utilizado o co-cultivo com fibroblastos embrionários

murinos (MEF). Aqui também pode ser visto que existe uma relação direta entre eficiência de geração de iPSC e o tempo de substituição das condições de cultivo nos dois tempos testados. Quando o co-cultivo em MEF é substituído por placas recobertas por gelatina e meio mESC induzido, não é observada a reprogramação apenas com dois fatores, sendo obrigatória a adição de c-MYC ou KLF4. pMSC apresentou maior número de iPSC quando comparado aos demais, seguida de moMSC e rMSC. Não detectamos reprogramação em ADSC. Outra variação observada foi que as moMSC reprogramam mais rapidamente (dia 8), sendo seguidas pelas pMSC (dia 10) e pelas rMSC (dia 16).

O potencial de utilização das MSC na terapia gênica *ex vivo* e na reprogramação celular é variável e possivelmente está associado ao local de onde estas células são isoladas, além do estágio de cultivo. Ainda assim, muitos estudos ainda precisam ser realizados para estipular de forma exata a colaboração que cada MSC pode oferecer para o uso clínico.

## Abstract

The Mesenchymal Stem Cells (MSC) are characterized by their potential to differentiate into cells of mesenchymal origin such as adipocytes, chondrocytes and osteocytes; paracrine action; immunoregulatory capacity and tropism for injured regions and cancer. These cells have been isolated from different tissues and organs and exhibit similar characteristics, but are not identical: a fact that highlights the importance of comparative studies to determine the real equivalence of MSC from different sources.

The objectives of this study were to analyze the potential of gene transfer mediated by Lipofectamine 2000; detect and quantify the expression of pluripotency factors Oct4, Klf4, Sox2, c-Myc, Lin28, Tcl-1 $\alpha$ , Nanog and compare the efficiency of reprogramming in murine MSC isolated from bone marrow (moMSC), adipose tissue (ADSC), kidney (rMSC), lung (PMSC), vena cava (cMSC) and spinal cord (meMSC). These cells were classified according to time of cultivation, subdivided in: Recent Cultivation (up to passage 7), Cultivation Intermediate (passage 8 to 12) and Late Cultivation (from passage 13).

Regarding transfection using Lipofectamine 2000, higher efficiency was achieved in PMSC and rMSC compared to cMSC, all in late passage.

In this work we show the expression of Klf4, Sox2, c-Myc and Lin28 in MSC isolated from murine lung, kidney, adipose tissue and spinal cord. Lin28 was detected only in the early stage of cultivation in pMSC and ADSC and intermediate cultivation in rMSC. In meMSC, the expression of Lin28 and Sox2 appears to decrease with time not being detected in late cultivation. We did not detect the expression of Oct4, Nanog or Tcl-1 $\alpha$  in any sample studied.

A very important finding was the reprogramming of moMSC with only OCT4 and SOX2 when it was co-culture on murine embryonic fibroblasts (MEF). In this study was detected a direct relationship between efficiency of iPSC generation and the time of replacement of culture conditions, considering the times tested; 3 or 5 days post transduction. When the co-cultivation on MEF



was replaced by plates coated with gelatin and induced medium is not observed with only two reprogramming factors, being required the addition of KLF4 or c-MYC. Comparing the efficiency of reprogramming between MSC, pMSC showed higher number of iPSC when compared to the others, followed by moMSC and rMSC. There was not detected cell reprogramming in ADSC. Another variation observed was in the reprogramming time. The moMSC reprogram faster (8 days), being followed by the pMSC (day 10) and the rMSC (day 16).

The potential use of MSC in ex vivo gene therapy and cellular reprogramming is variable and may be associated with the location from which these cells are isolated, beyond the stage of cultivation. However, further studies are necessary to accurately stipulate the clinical use for each MSC.

## 1) Introdução

### 1.1) Células-Tronco

As células-tronco são caracterizadas por se autorenovarem mantendo-se indiferenciadas até que fatores adequados estimulem a sua diferenciação em um tipo celular especializado (Watt and Hogan, 2000). A capacidade de originar células especializadas, ou potencial de diferenciação, é particular de cada célula-tronco.

Estas células são classificadas quanto ao local de onde são isoladas. Quando isoladas de células embrionárias da massa interna do blastocisto são chamadas de células-tronco embrionárias (ESC – *embryonic stem cells*) (Thomson et al., 1998). Já quando isoladas de um indivíduo após o nascimento, são chamadas de células-tronco pós-natal ou do adulto (da Silva Meirelles et al., 2006).

#### 1.1.1) Células-Tronco Embrionárias

As células-tronco embrionárias são aquelas que originam todos os tecidos e órgãos de um indivíduo, logo possuem capacidade de diferenciação total, sendo consideradas pluripotentes. O primeiro isolamento de ESC foi realizado em 1981 por dois grupos diferentes que usaram como modelo camundongos (Evans and Kaufman, 1981; Martin, 1981). A primeira linhagem de ESC humana foi estabelecida em 1998 (Thompson et al., 1998).

Desde os primeiros isolamentos, um grande esforço vem sendo empregado para se caracterizar e entender de maneira ampla os mecanismos de manutenção de pluripotência e diferenciação, assim como a manutenção *in vitro* das ESC. Entre os avanços mais importantes estão o co-cultivo com uma camada de células alimentadoras constituída de fibroblastos embrionários de camundongo (MEF – *murine embryonic fibroblast*) e a adição de fatores de crescimento como LIF, nas ESC murinas e FGF2 nas humanas (revisado por Hoffman and Carpenter, 2005).

A diferenciação em células dos três folhetos germinativos é observada *in vitro* pela formação de uma estrutura esférica chamada de corpo embrióide (EB) ou, *in vivo*, pela formação de teratomas em camundongos

imunodeficientes. Outra maneira de se certificar da pluripotência é a criação de quimeras (revisado por Hoffman and Carpenter, 2005; Takahashi and Yamanaka, 2006).

O uso terapêutico destas células é dificultado por três fatores igualmente importantes: 1) o isolamento destas células requer obrigatoriamente a destruição do embrião, gerando uma série de discussões éticas (Takahashi et al., 2007); 2) apesar do grande esforço dos pesquisadores, pouco se sabe a respeito da manutenção *in vitro* destas células; 3) outra questão diz respeito à segurança uma vez que as ESC originam teratomas quando aplicadas em camundongos imunodeficientes (revisado por Hoffman and Carpenter, 2005).

#### 1.1.2) Células-Tronco do Adulto

Um indivíduo adulto apresenta a necessidade de reposição das células que vão sendo perdidas com o passar dos anos ou por injúrias. Esta demanda é suprida por uma pequena parcela de células indiferenciadas, as células-tronco do adulto.

As células-tronco do adulto já foram isoladas de diferentes tecidos e são uma alternativa bastante interessante ao uso das ESC. Embora ainda seja muito controverso o potencial de diferenciação dessas células, estudos recentes apontam para um aumento do potencial das células de adultos em relação ao inicialmente considerado (revisado por Baer and Geiger, 2012). Acreditava-se que o potencial de diferenciação destas células fosse restrito apenas a poucos tipos celulares, geralmente aqueles do tecido de onde foram isoladas, sendo também chamadas de células-tronco tecido-específicas. Na literatura são encontrados diversos tipos de células-tronco do adulto descritas, como: células-tronco hematopoiéticas, células-tronco epiteliais, células-tronco neurais e células-tronco mesenquimais (MSC – *mesenchymal stem cells*) (Meirelles and Nardi, 2003; Tumber et al., 2004; Ergen and Goodell, 2009; Gera et al., 2010).

Diversos trabalhos mostram que algumas células-tronco do adulto podem não só dar origem a células de tecidos diferentes dos quais são isoladas, mas também a células de origem embrionária diferente (revisado por

Krabbe et al., 2005). Entre as células-tronco estudadas as MSC são aquelas que apresentam maior plasticidade (revisado por Baer and Geiger, 2012).

#### 1.1.2.1) Células-Tronco Mesenquimais

As células-tronco mesenquimais foram inicialmente localizadas na medula óssea e descritas como células de estroma com função de dar suporte à hematopoiese, realizada pelas células-tronco hematopoiéticas (revisado por Caplan, 2009). A primeira descrição das MSC foi realizada por Friedenstein et al. (1970), nomeando-as como células progenitoras de fibroblastos ou unidades formadoras de colônias de fibroblastos. Pittenger et al. (1999) descreveram uma população de células isoladas a partir de aspirado de medula óssea humana com capacidade de aderir ao plástico e de diferenciar-se em osteoblasto, condrócito e adipócito em condições apropriadas de cultivo. Após o uso de marcadores de superfície os autores observaram a presença de CD105, CD73 e ausência de CD14, CD34 e CD45.

Apesar de muitos estudos sobre a biologia básica destas células ainda não foi possível estipular um marcador para caracterizá-las, sendo assim, a Sociedade Internacional de Terapia Celular publicou critérios mínimos para a definição de MSC humanas (hMSC). Inicialmente as células têm que se manter aderidas ao plástico onde são cultivadas em condições padrão. Outro pré-requisito é a presença dos marcadores de superfície: CD105, CD73 e CD90; e ausência de CD11b, CD14, CD19, CD34, CD45, CD79a e HLA-DR. Além disso, precisam ter a capacidade de diferenciação em osteoblasto, adipócito e condrócito (Dominici et al., 2006).

Diferentemente do que se acreditava, as MSC não estão restritas à medula óssea, pois estudos mostram que podem ser isoladas de outros tecidos e órgãos, como: gordura, polpa dentária, cérebro, coração, pulmão, fígado, rins, cordão umbilical (da Silva Meirelles et al., 2006; Yalvac et al., 2009). Mesmo apresentando os requisitos mínimos para serem classificadas como MSC, células isoladas de diferentes tecidos apresentam uma série de variações em algumas características *in vitro*, como: cinética de cultura,

marcadores de superfície e capacidade de migração e diferenciação (da Silva Meirelles et al., 2006; Noël et al., 2008; Li et al., 2009).

O mecanismo de reparo por diferenciação nas células do tecido lesado tem sido extensivamente estudado e se baseia no grande potencial de diferenciação apresentada pelas MSC tanto *in vitro* como *in vivo*. Estas células não estão restritas apenas a diferenciação em linhagens celulares oriundas da mesoderme, pois podem se diferenciar em células especializadas da endoderme e ectoderme (Brohlin et al., 2009; revisado por Baer and Geiger, 2012). Brohlin et al. (2009) detectaram a presença de marcadores característicos de células de Schwann em MSC humanas após a exposição a uma mistura de fatores de diferenciação apropriados.

O outro mecanismo que também é amplamente discutido baseia-se na secreção de fatores de crescimento e outras moléculas sinalizadores, pelas MSC, criando um contexto favorável para a regeneração do tecido ou facilitando a atuação das células-tronco do próprio tecido sobre a lesão (Tögel et al., 2007; Liu et al., 2008).

Além disso, as MSC possuem outras características que tornam seu uso bastante atrativo na terapia celular. Uma delas é o direcionamento intrínseco à lesão e ao câncer, dispensando a aplicação local (revisado por Spaeth et al., 2008). A outra é a capacidade de modular o sistema imunológico, fazendo com que não seja obrigatório um transplante autólogo (revisado por Ozawa et al., 2008; Chiesa et al., 2011).

O uso terapêutico das MSC vem sendo testado em diferentes abordagens e para distintas patologias. Em uma grande fração dos estudos, modelos de doenças tratados com MSC apresentam melhora significativa quando comparados com o controle contendo apenas o veículo, mas este potencial parece ser limitado em muitos casos (Liu et al., 2008; Hao et al., 2009). Uma alternativa bastante promissora é o uso da transferência gênica visando uma diferenciação mais robusta, compensação por alguma alteração na expressão gênica após manipulação *in vitro*, super-expressão de fatores de crescimento ou moléculas de sinalização, ou aumento da sobrevivência das células

em condições adversas (Aslan et al., 2006; Hoffmann et al., 2006; Cheng et al., 2008; Liu et al., 2008; revisado por Dalberto et al., 2010).

### *1.2) Transferência Gênica*

A transferência gênica é mediada por um vetor que transportará o gene de interesse (chamado de transgene) até o alvo, que pode ser um tipo celular, órgão ou tecido (revisado por Dalberto et al., 2010; revisado por Rios et al., 2011). Muitos grupos de pesquisa estão avaliando diferentes tipos de vetores virais e não virais para melhorar a eficiência e a estabilidade da transferência gênica (revisado por Helledie et al., 2008; Ricks et al., 2008; revisado por Dropulic et al., 2011; revisado por Khare et al., 2011; revisado por Kotin, 2011).

Os vetores não virais são aqueles que demonstram maior segurança, pois geram pouca ou nenhuma resposta imunológica, além de apresentarem fácil manipulação e produção. Em contrapartida, possuem menor eficiência que os vetores virais e falta de direcionamento. Estes vetores não se integram ao genoma da célula hospedeira, fazendo com que o transgene seja expresso por um curto período de tempo (revisado por Dalberto et al., 2010; revisado por Jafari et al., 2012).

Uma forma de aumentar a eficiência destes vetores consiste no estudo de formas de administração. Os métodos de administração podem ser divididos em físicos e químicos (revisado por Jafari et al., 2012).

Os métodos físicos baseiam-se na entrada do vetor na célula alvo a partir de processos mecânicos ou elétricos. As metodologias variam bastante, mas se baseiam geralmente nas seguintes abordagens: injeção direta do DNA na célula alvo (microinjeção); abertura de poros nas células causados pela pressão criada a partir de uma injeção contendo grande quantidade de solução salina na corrente sanguínea, nessa solução está presente o vetor diluído (injeção hidrodinâmica); no bombardeamento do vetor complexado com microesferas de ouro ou tungstênio, aceleradas por um gás carreador, nas células alvo (biobalística) ou pela criação de poros na célula alvo após a aplicação de pulsos elétricos alternados, de alta voltagem (eletroporação) (revisado por revisado por Lv et al., 2006; revisado por Jafari et al., 2012).

Os métodos químicos empregam materiais sintéticos de carga positiva (catiônicos) que se complexam espontaneamente com o DNA, que possui carga negativa. O objetivo desta abordagem é diminuir a força de repulsão entre o DNA e o domínio extracelular das proteínas de membrana, que também possuem carga total negativa. Estes métodos apresentam baixo custo, fácil manipulação e produção. Os materiais sintéticos são divididos em lipídeos catiônicos e polímeros catiônicos (revisado por Lv et al., 2006).

Os sistemas virais geralmente possuem maior eficiência na entrada das células, quando comparados com sistemas não-virais. Apresentam também a capacidade de direcionamento a tipos celulares específicos. Os sistemas virais mais estudados são aqueles baseados nos retrovírus (incluindo os lentivírus), os adenovírus e os vírus adeno-associados.

Estes sistemas são classificados de acordo com a capacidade de integração do transgene no genoma da célula transduzida. Aqueles que apresentam esta característica, retrovírus e vírus adeno-associado, são chamados de vetores de integração; já aqueles que não a apresentam, como os adenovírus, são chamados de vetores transientes ou episomais.

Os vetores adenovirais apresentam a maior capacidade para acomodar um transgene com tamanho superior a 8 kb sem comprometer a sua eficiência. Entre as vantagens oferecidas por este sistema, podem ser citadas a fácil produção, a habilidade de transduzirem células quiescentes e a capacidade de se expressarem por longo período. Entretanto, estes vírus podem induzir forte resposta imunológica celular contra as células transduzidas e humoral contra o capsídeo do vírus (revisado por Khare et al., 2011).

Os vetores adeno-associados são parvovírus humanos, não patogênicos, que naturalmente requerem um vírus auxiliar o qual contém todos os genes necessários para mediar sua replicação. Mas apresentam a menor capacidade de acomodação de transgene entre os sistemas virais, 5 kb; difícil manipulação e produção (Locke et al., 2011).

Os vetores retrovirais são subdivididos entre aqueles produzidos a partir de representantes da subfamília *Oncovirinae*, chamados de vetores onco-retrovirais ou retrovirais, e aqueles produzidos a partir de representantes da

subfamília *Lentivirinae*, chamados de vetores lentivirais. Todos os representantes deste grupo apresentam transferência gênica eficiente, expressão estável do transgene por longo período de tempo e fácil manipulação. Os lentivírus mostram maior versatilidade, pois, diferentemente dos onco-retrovírus, possuem maquinaria enzimática que permite a transdução de células quiescentes, mostrando-se assim vetores mais atrativos (revisado por Dropulic et al., 2011; revisado por Rios et al., 2011).

A modificação genética das MSC já mostra resultados bastante promissores em nível pré-clínico para tratamento de diferentes patologias em diversas áreas como oncologia, cardiologia, doenças metabólicas, ortopedia. (Zachos et al., 2007; Ren et al., 2008; Cheng et al., 2008; Meyerrose et al., 2008). Mesmo encorajadores, estes resultados iniciais ainda apontam que uma série de fatores deve ser padronizada para que haja uma maior concordância, já que o uso de vetores com as mesmas características apresentam diferentes eficiências (McMahon et al., 2008; Ricks et al., 2008). Alguns exemplos podem ser encontrados na tabela 1.



Tabela 1. Exemplos de transferência gênica em MSC com diferentes vetores

Vetor	Célula	Organismo	Tratamento	Eficiência*	Referência
Não Viral	moMSC <sup>#</sup>	Humano	Eletroporação com diferentes vetores	48 - 88%	Haleem-Smith et al. (2005)
	moMSC <sup>#</sup>	Humano	Nucleofecção	51 a 88%	Aslan te al. ( 2006)
	moMSC <sup>#</sup>	Humano	Eletroporação	30%	Helledie et al. (2008)
	moMSC <sup>#</sup>	Humano	Fugene	5%	Helledie et al. (2008)
	moMSC <sup>#</sup>	Humano	Lipofectin	5%	Helledie et al.(2008)
	moMSC <sup>#</sup>	Humano	Lipofectamine 2000	15%	Helledie et al. (2008)
	moMSC <sup>#</sup>	Humano	Lipofectamine 2000	2 a 20%	Madeira et al. (2010)
	ADSC <sup>€</sup>	Humano	Lipofectamine 2000	6%	Locke et al. (2011)
	moMSC <sup>#</sup>	Humano	Lipofectamine 2000, passagem 5 e 7	5 e 15%	Yang et al. (2010)
	ADSC <sup>€</sup>	Humano	Lipofectamine 2000, passagem 4 e 6	6 e 10%	Yang et al. (2010)
	moMSC <sup>#</sup>	Rato	Lipofectamine 2000	15%	Chen et al. (2011)
	moMSC <sup>#</sup>	Rato	Diferentes apresentações de PEI	2 a 20%	Chen et al. (2011)
	ADSC <sup>€</sup>	Humano	Diferentes polimero biodegradável em	10 a 39%	Yang et al. (2010)
	moMSC <sup>#</sup>	Humano	Diferentes polimero biodegradável em	10 a 22%	Yang et al. (2010)
	Retrovirus	moMSC <sup>#</sup>	Porco	Diferentes MOI <sup>§</sup> ; Duas rodadas de transdução	75%
moMSC <sup>#</sup>		Humano	Uma a seis rodadas de transdução	40 a 70%	Helmrich et al. (2012)
ADSC <sup>€</sup>		Humano	Uma a seis rodadas de transdução	30 a 65%	Helmrich et al. (2012)

	moMSC <sup>#</sup>	Camundongo		90%	Noiseux et al. (2006)
	moMSC <sup>#</sup>	Camundongo	Quatro rodadas de transdução	70%	Niyibizi et al. (2004)
Lentivírus	moMSC <sup>#</sup>	Camundongo	Muitas variáveis testadas	9,4 a 88,4%	Ricks et al. (2008)
Vírus Adeno-Associado	moMSC <sup>#</sup>	Porco	MOI <sup>§</sup> 100 <sup>§</sup>	70,25%	Bosch et al. (2006)
	moMSC <sup>#</sup>	Coelho	MOI <sup>§</sup> 10 a 10000 <sup>§</sup>	0 a 80%	Palmer et al. (2005)
	moMSC <sup>#</sup>	Humano	MOI <sup>§</sup> 1 a 10000 <sup>§</sup>	1 a 65%	Stender et al. (2007)
	ADSC <sup>€</sup>	Humano	Diferentes sorotipos de vetor	3 a 61%	Locke et al. (2011)
	moMSC <sup>#</sup>	Camundongo	Diferentes vetores	2 a 80%	Li et al. (2010)
	moMSC <sup>#</sup>	Humano	Diferentes quantidades de vetor	55 a 92%	Cucchiari et al, (2011)
Adenovírus	moMSC <sup>#</sup>	Rato	Dois vetores e MOI <sup>§</sup> 100 - 30000	0 a 100%	Tsuda et al. (2003)
	laMSC <sup>α</sup>	humano	Diferentes quantidades de vetor	próximo a 100%	Grisafi et al. (2008)

---

\* Eficiência aproximada, mostrando a amplitude entre os tratamentos

<sup>#</sup>MSC isolada a partir de medula óssea

<sup>€</sup>MSC isolada a partir de tecido adiposo

<sup>α</sup>MSC isolada a partir de líquido amniótico

<sup>§</sup> Multiplicidade de infecção (*Multiplicity of infection*)

Dentro deste contexto diferentes grupos de pesquisa vêm dando ênfase à padronização da transferência gênica para as MSC. Entre os diversos trabalhos publicados podem-se notar duas abordagens: 1) a maximização da eficiência de um vetor desde a produção até a transferência gênica (Ricks et al., 2008) e; 2) a comparação entre a eficiência de diferentes vetores em diferentes condições de administração (Gheisari et al., 2008; McMahon et al., 2008; Yalvac et al., 2009).

Além do grande potencial como plataforma de terapia gênica *ex vivo*, as MSC também chamam atenção para uma nova abordagem de estudo de pluripotência através da indução de células-tronco pluripotentes.

### *1.3) Células-Tronco Pluripotentes Induzidas*

As células-tronco pluripotentes induzidas (iPSC, induced pluripotent stem cell) foram produzidas pela primeira vez por Takahashi and Yamanaka (2006) a partir da transdução de 24 diferentes fatores de transcrição. O mesmo estudo elegeu os 4 fatores murinos necessários para modificar o fenótipo dos fibroblastos de camundongo testados em células com características bastante próximas as ESC. Estes fatores foram Oct4, Sox2, c-Myc e Klf4, e ficaram conhecidos como fatores de Yamanaka (YA, Yamanaka's factors). As iPSC apresentaram características inicialmente restritas às ESC como: capacidade de formar corpos embrióides em cultura, diferenciação em células especializadas originárias dos três folhetos embrionários, originar teratoma quando injetadas em camundongos imunodeficientes.

Outro fato que comprova de maneira decisiva a pluripotência das iPSC é a capacidade de formação de quimeras e a formação de camundongos viáveis (Takahashi and Yamanaka, 2006; Boland et al., 2009). Este trabalho pioneiro deu origem à "Era da Reprogramação Celular". Na Figura 1 pode-se ver uma ilustração com as principais alterações nas células após a administração dos fatores de reprogramação.

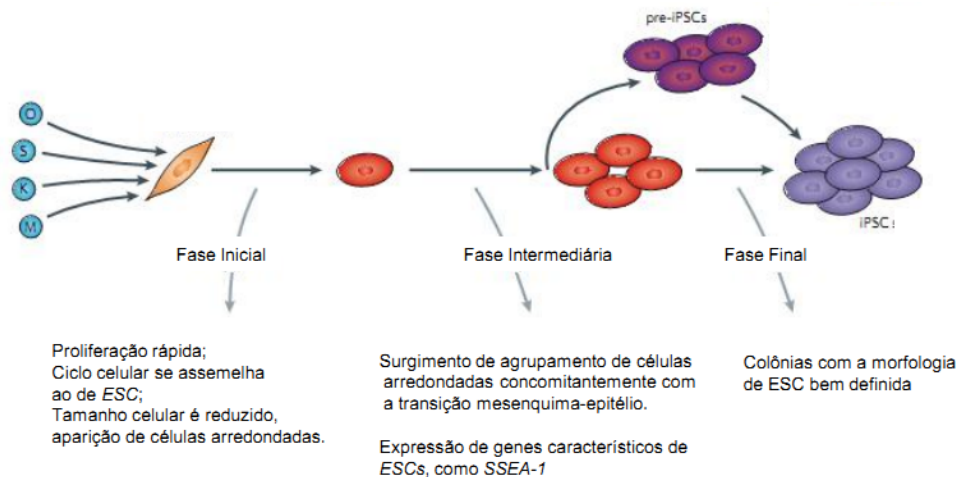


Figura 1. Representação esquemática da reprogramação celular utilizando os YA e algumas das características mais marcantes do cultivo das células até o surgimento das colônias iPSC (Modificado a partir da revisão de Plath and Lowry, 2011).

No ano seguinte, Takahashi et al. (2007) produziram iPSC a partir de fibroblastos humanos, utilizando os mesmos 4 fatores do trabalho anterior, mas de origem humana (Takahashi and Yamanaka, 2006). Paralelamente, Yu et al. (2007) produziram iPSC a partir de diferentes fibroblastos humanos utilizando como fatores de reprogramação OCT4, SOX2, NANOG e LIN28.

A geração de iPSC já é uma metodologia consolidada mas os mecanismos que levam à reprogramação ainda não são compreendidos em sua totalidade.

Além da reprogramação celular, existe outro mecanismo que aumenta o potencial de diferenciação em células diferenciadas, a transdiferenciação. Neste processo uma célula diferenciada gera outro tipo celular também diferenciado sem a formação de intermediários pluripotentes (revisado por Jopling et al., 2011). Este fenômeno já foi observado *in vivo* na regeneração das células de lente realizada pelas células epiteliais pigmentadas da íris (revisado por Jopling et al., 2011) e *in vitro* na transdiferenciação de células pancreáticas acinares em hepatócitos e fibroblastos que originaram neurônios (Son et al., 2011; Swenson et al., 2011).

### 1.3.1) Rotas e Fatores Envolvidos na Reprogramação Celular

Até o momento, diversos estudos mostram que uma complexa interação entre fatores genéticos, epigenéticos, transdução de sinais e fatores citoplasmáticos e extracelulares é responsável pela geração de iPSC (revisado por Hanna et al., 2010; Han and Son, 2011).

Uma rota metabólica muito importante associada ao sucesso de reprogramação é aquela regida pela p53. Esta rota é extremamente importante para a homeostase celular, pois regula mecanismos como proliferação, senescência e apoptose (Kawamura et al., 2009).

Li et al. (2009b) mostraram que MEF transduzidas com os fatores de reprogramação Oct4, Sox2, e Klf4 apresentam redução na expressão dos genes do locus Ink4a/Arf, ligados a indução de senescência. Quando Ink4a/Arf é silenciado há um aumento considerável na geração de iPSC. Os experimentos foram replicados em queratinócitos de camunongo e fibroblastos humanos da linhagem IMR90. Os resultados se mantiveram mostrando que o mecanismo é o mesmo em diferentes tipos celulares ou espécies. Kawamura et al. (2009) observaram maior eficiência na reprogramação quando p53 e p21 são silenciados. Marión et al. (2009) observaram que p53 impede a reprogramação de células com danos no DNA ou telômeros curtos, auxiliando na manutenção da integridade genômica das *iPSC*.

Utikal et al. (2009) mostraram que o tempo de cultivo diminui a eficiência de reprogramação em MEF. Neste trabalho o aumento da reprogramação também é associado ao silenciamento do gene Ink4a/Arf. Os autores sugerem que células com alta proliferação seriam mais receptíveis ao processo de reprogramação. Esta sugestão é corroborada por Ruiz et al. (2010), que mostram que a alta taxa proliferativa também é necessária para a manutenção da pluripotência em hESC.

O estudo da manutenção da pluripotência em células-tronco embrionárias vem mostrando outras rotas envolvidas na reprogramação. Uma rota bastante promissora é aquela regulada por microRNAs (miRNA). Os miRNA são responsáveis por reprimir a expressão gênica pela degradação do mRNA (revisado por Mallanna et al., 2010; revisado por Subramanyam and

Blelloch, 2011).

A administração de alguns membros dos miRNA responsáveis pela regulação do ciclo celular de ESC – em especial miRNA-294, em camundongo – juntamente com Oct4, Sox2 e Klf4 foi suficiente para aumentar a eficiência da geração de iPSC a partir de MEF. Este efeito não foi observado quando c-Myc foi utilizado junto aos demais YA (Judson et al., 2009). Os miRNA-302b e miRNA-372 aumentaram a eficiência de reprogramação em fibroblastos humanos transduzidos, independente da administração ou não de c-MYC, mostrando que este mecanismo é bastante conservado (Subramanyam et al., 2010).

Hanna et al. (2009) propuseram 4 modelos para reprogramação levando em conta o tempo de latência até o surgimento de iPSC e o potencial das células para serem reprogramadas (Figura 2).

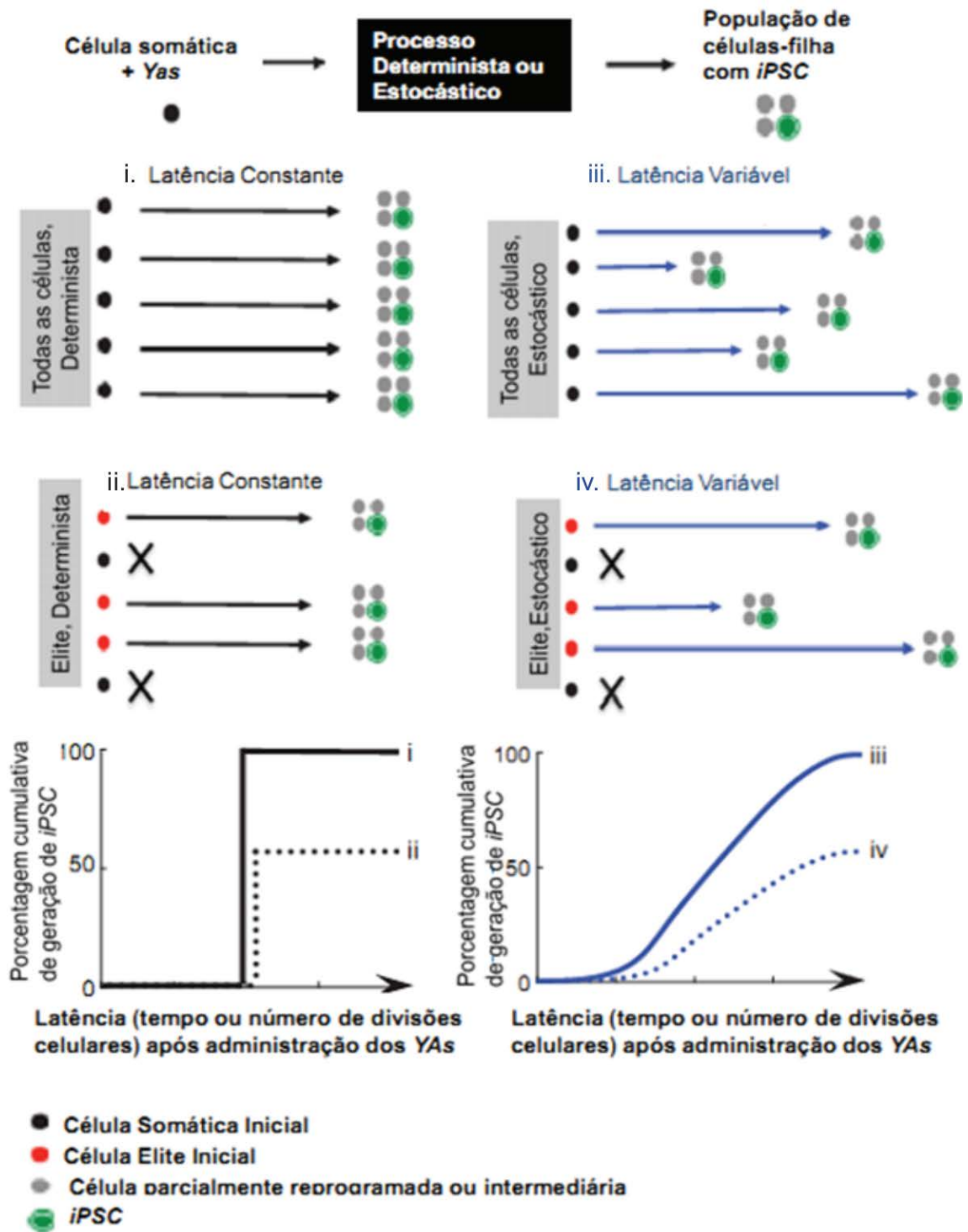


Figura 2. Representação esquemática dos modelos propostos por Hanna et al. (2009).

O primeiro parâmetro era determinar se todas as células teriam condições de gerar iPSC ou se esta capacidade era restrita a uma fração, chamada de “elite”. O segundo era determinar se a latência era constante, mostrando que o processo é determinístico, ou variável, mostrando que é estocástico. Sendo assim, os modelos propostos foram: 1) Todas células/Determinístico; 2) Elite/Determinístico; 3) Todas células/Estocástico; 4) Elite/Estocástico. Para determinar o modelo foi usado um sistema chamado de reprogramação secundária onde são usadas células de camundongos quiméricos gerados a partir de iPSC reprogramadas por vetor lentiviral controlado por doxaciclina. Este sistema garante a homogeneidade das células usadas. Os dados gerados mostraram que a reprogramação é um processo estocástico e com latência variável.

Grande parte dos estudos envolvendo reprogramação utiliza quantidades iguais de cada vetor. Papapetrou et al. (2009) testaram diferentes proporções de vetores lentivirais expressando os YA e notaram que o efeito é variável. A maior expressão de Oct4 gera mais iPSC, enquanto que a maior expressão de cada um dos demais fatores tem efeito negativo. Complementando estes dados, Tiemann et al. (2011) mostraram que uma alta expressão de Oct4 ou Oct4 mais c-Myc aumenta o número de iPSC completamente reprogramadas.

O tempo de expressão dos fatores fornecidos pelos vetores também é muito importante e mostrou ser um limiar na reprogramação de MEF. Resultados usando um vetor com expressão induzível mostraram que os fatores devem ser expressos por 12 a 16 dias, caso contrário as células voltam a apresentar morfologia parecida com a de MEF (Brambrink et al., 2008).

Um evento extremamente importante para que a reprogramação ocorra é a mudança no padrão de transcrição fazendo com que os genes indutores e de manutenção da pluripotência sejam expressos e aqueles ligados a célula original sejam silenciados. Esta mudança é acompanhada por uma drástica reorganização da cromatina. Uma característica importante é que este evento também é responsável pelo silenciamento dos transgenes quando administrados por vetor retroviral ou lentiviral (revisado por Gonzalez et al.,



2011). Papapetrou et al. (2009) mostraram que o silenciamento dos YA não é específico e que expressões residuais destes não diminui a capacidade de diferenciação das iPSC.

A reprogramação nem sempre dá origem a colônias com equivalência total a ESC: uma porção das células geradas não apresenta silenciamento dos YA e não diferencia em células características dos três folhetos embrionários. Estas células são consideradas parcialmente reprogramadas e denominadas *iPSC-like* (semelhantes a iPSC). Evidências indicam que o remodelamento epigenético das *iPSC-like* é parcial, pois quando tratadas com 5'-azacetidina, um inibidor de metilação de DNA, elas originam iPSC (revisado por Hotta and Ellis, 2008; Ang et al., 2011).

### *1.3.2) Eficiência do Processo de Reprogramação*

Uma das questões mais estudadas tange à eficiência do processo de indução de células pluripotentes. Na maioria dos casos o número de colônias de iPSC geradas é muito baixo não passando de 0,1% nas primeiras publicações (Takahashi and Yamanaka, 2006). Diferentes abordagens têm sido testadas para aumentar a eficiência como: inclusão de fatores de reprogramação adicionais; otimização das condições de cultivo e reprogramação; administração de moléculas facilitadoras; utilização de diferentes tipos celulares; melhorias nos vetores (Tabela 2).

Tabela 2. Diferentes tipos de vetores, eficiência de reprogramação e tipos celulares utilizados para reprogramação.

	Vetores Integração			Excisáveis	
	Retrovírus	Lentivírus	Lentivirus Induzível	Lentivírus Excisáveis	Transposon
Eficiência	0,01% - 0,5%	0,01% - 1%*	0,01% - 1%*	0,01% - 1%*	0,1%
Prós	Alta eficiência	Alta eficiência	Alta eficiência; Expressão controlada	Alta eficiência; Vetor é removido do genoma	Alta eficiência; Vetor é removido do genoma
Contras	Integração; Silenciamento incompleto	Integração; Silenciamento incompleto	Integração; Utiliza um ativador de transcrição	Monitoramento da excisão é bastante trabalhoso; Sítios de integração (loxP) são mantidos no genoma	Monitoramento da excisão é bastante trabalhoso
Células Reprogramadas	Fibroblastos, ADSC Hepatócitos, Amniócitos, Astrócitos, Queratinócitos Células B, Células-tronco Neurais, Células de Endométrio, MSC	Fibroblastos, ADSC MSC, Células-Tronco de Polpa Dentária Células Progenitoras Hematopoiéticas	Fibroblastos Hepatócitos	fibroblastos	fibroblastos
Referências	Takahashi and Yamanaka. (2006); Aoki et al., (2010); Liu et al, (2010); Anchan et al.( 2011); Ruiz et al. (2010); Wada et al. (2010); Do et al. (2009); Park et al.(2010); Niibe et al.( 2010); Sancho-Bru et al., (2010)	Lee and Studer. (2009); Sun et al. ( 2011); Papapetrou et al.( 2009); Yan et al.(2009); Broxmeyer et al.( 2011)	Brambrink et al. ( 2008)	Papapetrou et al. (2009)	Yusa et al.( 2009)  Medvedev et al.(2010)

Vetores não Integrativos		Sem utilização de DNA		
Plasmídeos 0,001%	Adenovirus 0,001%	Proteínas Recombinante 0,001%	Extrato de mESC 0,001%	mRNA modificado 1%
Sem integração	Sem integração	Sem integração	Sem integração	Sem integração Alta eficiência
Baixa eficiência	Baixa eficiência	Baixa eficiência	Baixa eficiência	Aplicações repedidas
fibroblastos, ADSC, células B, células- tronco neuronais	fibroblastos	fibroblastos	fibroblastos	fibroblasto
Huang et al. (2011) Nirsinh et al.( 2011) Choi et al. (2011)	Zhou and Freed, 2009	Kim et al.( 2009a)	Cho et al.( 2010)	Warren et al, (2010)

\* Vetores policistrônicos contendo os 4 fatores

O uso dos fatores utilizados por Takahashi and Yamanaka (2006) e Yu et al. (2007) simultaneamente aumentou em cerca de dez vezes a eficiência da reprogramação de fibroblasto de prepúcio humano (Liao et al., 2008). Park et al. (2008) reprogramaram diferentes linhagens de fibroblastos humanos e células-tronco mesenquimais utilizando os YA simultaneamente com a subunidade catalítica da telomerase humana, hTERT e o antígeno T do SV40.

O tratamento com pequenas moléculas envolvidas na modificação de histonas tem se mostrado muito efetivo. A molécula mais utilizada é o ácido valpróico mesmo tendo mostrado variação na eficiência. A vitamina C, a 5'-azacetidina e o butirato de sódio também são utilizados (Huangfu et al., 2008a; Esteban et al., 2010 ; Liang et al., 2010).

Outro fator que continua a ser explorado é a busca pelo tipo celular ideal para a reprogramação. As diferentes linhagens de fibroblastos são as mais utilizadas, mas já foi descrita a produção de iPSC a partir de diferentes tipos celulares como: células progenitoras de tecido dentário, células progenitoras sanguíneas, células-tronco neurais, células de músculo liso cardíaco, MSC, amniócitos, entre outras (Yan et al., 2009; Niibe et al., 2010; Anchan et al., 2011; Broxmeyer et al., 2011; Narsinh et al., 2011).

A utilização de diferentes tipos celulares mostrou que existe uma diferença significativa na geração de iPSC dependendo do tipo celular usado e que o uso dos 4 YA não é obrigatório (Eminli et al., 2008; Huangfu et al., 2008b; Giorgetti et al., 2009; Kim et al., 2009b; Aoki et al., 2010; Ho et al., 2010; Ruiz et al., 2010; Wang et al., 2012). Este fato pode ser explicado pelo perfil de expressão gênica das células utilizadas, pois estas podem apresentar a expressão de um ou mais fatores indutores de pluripotência (Byrne et al., 2009; Kim et al., 2009; Aoki et al., 2010). As MSC são privilegiadas neste aspecto, pois já existem relatos da expressão de Nanog, Oct4, Klf4, c-Myc e Sox2 nestas células (Liu et al., 2009; Tat et al., 2010; Sugii et al., 2011).

O estágio de diferenciação das células também influencia a taxa de reprogramação. Usando o sistema de geração de iPSC secundário, foi constatado que células-tronco hematopoiéticas, assim como progenitores

hematopoiéticos, geram mais iPSC que células diferenciadas (Eminli et al., 2009). Kleger et al. (2012) demonstraram que células progenitoras de fígado geram mais iPSC que hepatócitos.

Células-tronco neurais humanas podem ser reprogramadas com Oct4 e Klf4 ou somente Oct4. A eficiência da reprogramação é de 0,006 e 0,004%, quando se utilizam os dois fatores ou somente Oct4, respectivamente (Kim et al., 2009).

### *1.3.3) Diferenças entre as iPSC*

Diversos estudos vêm caracterizando as iPSC com relação à metilação de promotores, transcriptoma e potencial de diferenciação. Uma série de diferenças, principalmente no padrão de expressão gênica e diferenciação, já foram encontradas.

Polo et al. (2010) compararam diferentes parâmetros em iPSC murinas geradas a partir de fibroblastos, células B do timo, granulócitos originados de medula óssea e precursores de músculo esquelético através do sistema de geração de iPSC secundário. Quando as diferentes iPSC foram analisadas em passagens iniciais apresentaram variação no padrão de metilação e transcrição gênica assim como uma tendência a se diferenciar em células da mesma origem.

A continuidade da expressão dos genes característicos da célula doadora também é observada em iPSC humanas. As iPSC originadas a partir de fibroblasto fetal apresentaram o transcriptoma mais próximo a ESC, seguidas pelas geradas a partir de ADSC e fibroblasto neonatal, respectivamente. Aquelas geradas a partir de queratinócitos mostraram um transcriptoma mais próximo à célula doadora (Ghosh et al., 2010).

### *1.3.3) Biossegurança*

O primeiro protocolo de reprogramação utilizou vetores retrovirais para mediar a transferência gênica. Como estes vetores têm como característica a integração no genoma da célula hospedeira existe o risco de efeitos deletérios devido a possível mutagênese insercional. Também é importante ressaltar que

dois dos YA (c-Myc e Klf4) são oncogenes bem estabelecidos, enquanto que para Sox2 e Oct4 existem evidências de uma participação menos importante no processo de carcinogênese, tendo estes sido propostos como oncogenes transitórios (Lenz, 2010). Sendo assim, é de suma importância evitar a expressão destes fatores após a reprogramação.

O primeiro relato de regulação dos transgenes foi a utilização de vetores lentivirais regulados por doxíciclina (Brambrink et al., 2008). Na ausência do indutor foi constatado o silenciamento total dos transgenes.

Diversos protocolos de reprogramação vêm sendo testada com o objetivo de evitar a modificação genética permanente e estão sumarizados na Tabela 2.

O refinamento do vetor que fornece os fatores de transcrição vem sendo amplamente estudado. Apesar da maior eficiência dos vetores retrovirais e lentivirais, diversos sistemas que evitam modificações permanentes no genoma da célula alvo já foram descritos (Tabela 2).

O primeiro sistema descrito foi o de vetores lentivirais excisáveis, através do sistema cre/lox. Neste relato foram utilizados fibroblastos de pacientes com Parkinson. Após o tratamento não foi detectada a presença do vetor no genoma das iPSC produzidas (Soldner et al., 2009).

Outra questão muito importante envolvendo teratogênese é que as iPSC podem gerar teratomas quando administradas *in vivo*. Esta característica é variável, e um dos fatores preponderantes é a célula utilizada para a reprogramação. Em iPSC originadas de fibroblastos e hepatócitos adultos de camundongo mostram uma grande tendência na formação destes tumores, já iPSC originadas de fibroblastos embrionários e células do epitélio estomacal apresentam a mesma tendência de células-tronco embrionárias, considerada baixa (Miura et al., 2009).

#### 1.3.4) Utilização das iPSC

A aplicação da tecnologia oriunda da reprogramação celular começou a ser estudada para a medicina regenerativa em 2008, quando foi publicado um trabalho onde células de pacientes com diferentes doenças geraram iPSC que

apresentaram pluripotência e potencial de diferenciação compatível com o de iPSC de indivíduos normais (Park et al., 2008).

O próximo passo é a diferenciação das iPSC no tipo afetado pela doença devido aos riscos do tratamento direto com células pluripotentes. A primeira publicação com este objetivo foi de Dimos et al. (2008), onde iPSC de pacientes com esclerose lateral amiotrófica deram origem a neurônios motores.

A diferenciação em um tipo celular específico nem sempre é fácil; mas, graças ao grande esforço empregado, atualmente as iPSC já foram diferenciadas em células produtoras de insulina, hepatócitos, queratinócitos, melanócitos, progenitores de músculo esquelético, cardiomiócitos, oligodendrócitos, neurônios (Alipio et al., 2010; Iwamuro et al.; 2010; Mizuno et al.; 2010; Itoh et al., 2011; Ohta, 2011; Potta et al., 2011; Czepiel, 2011; Kitazawa and Shimizu, 2011).

No passo seguinte, as células diferenciadas originadas de iPSC são transplantadas em modelos animais. Quando células produtoras de insulina foram administradas a dois modelos de diabetes houve uma considerável diminuição na glicemia (Alipio, 2010). Resultados positivos também foram encontrados quando progenitores de oligodendrócitos foram administrados a um modelo de desmielinização em quiasma óptico (Pouya et al., 2011).

Outra contribuição extremamente importante da reprogramação de células de pacientes foi a possibilidade de gerar as células afetadas por diferentes doenças e assim poder estudar melhor os seus mecanismos – chamada de modelagem de doença – e, em alguns casos, testes de medicamentos. Este novo modelo de pesquisa apresenta como vantagem a possibilidade de estudar doenças complexas que dificilmente são mimetizadas em modelos animais (revisado por Hankowski et al., 2011).

A última aplicação a ser citada nesta tese diz respeito à biologia da conservação. A reprogramação celular é uma técnica altamente conservada no reino animal e já foi utilizada para gerar iPSC de espécies ameaçadas de extinção como rinoceronte branco do nordeste, *Ceratotherium simum cottoni*; e o mandril, *Mandrillus leucophaeus* (Ben-Nun et al., 2011).

## 2) Objetivos

Tendo em vista a dificuldade em padronizar protocolos de transferência gênica para as MSC, um dos principais objetivos do nosso grupo de pesquisa é o estudo de técnicas que favoreçam o uso destas células em terapia celular e gênica. Deste modo, o objetivo geral deste trabalho é o estudo do potencial de transferência gênica em MSC isoladas a partir de diferentes tecidos de camundongos e a capacidade de produção de iPSC a partir destas células.

Para isso, são propostos os seguintes objetivos específicos:

1) Análise da transfecção por Lipofectamine 2000 de MSC isoladas de diferentes tecidos murinos e em diferentes passagens, utilizando-se vetor plasmidial contendo o gene da proteína verde fluorescente aprimorada (EGFP – *enhanced green fluorescent protein*), com mensuração da eficiência das transfecções através de citometria de fluxo.

2) Detecção e quantificação da expressão dos genes dos fatores de transcrição candidatos a indução de iPSC (Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc, Lin28, Tcl-1 $\alpha$  e Nanog) nas MSC isoladas de tecidos com origem embrionária diferente.

3) Transdução das MSC com vetores contendo diferentes genes humanos: OCT4, SOX2, KLF4 e c-MYC; assim como diferentes combinações destes genes.

5) Análise das colônias de iPSC formadas quanto à morfologia e atividade da enzima fosfatase alcalina.



### **3) Materiais e Métodos**

#### *3.1) Cultivo Celular*

As MSC foram isoladas de diferentes órgãos e tecidos de camundongos adultos (entre 12 a 24 semanas) da linhagem C57Bl/6. Os animais foram mantidos em condições padronizadas no biotério do laboratório de Imunogenética da UFRGS. Todos os procedimentos foram realizados dentro dos princípios éticos desta instituição e regulamentados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) tendo como CEP/UFRGS com o nº 2004285.

##### *3.1.1) Isolamento de MSC*

Inicialmente as MSC foram isoladas de órgãos ou tecidos originados dos três folhetos embrionários (medula óssea, gordura, pulmão, medula espinhal, rim e veia cava), fazendo uso das técnicas já estabelecidas no laboratório de Imunogenética do Departamento de Genética desta Universidade por da Silva Meirelles et al. (2006), com algumas modificações.

Resumidamente, uma fração dos tecidos ou órgãos foi coletada e incubadas com solução de 1 mg/mL de Colagenase tipo I (Invitrogen, São Paulo, SP, Brasil) por 45 minutos a 37 °C, exceto a medula óssea que dispensa este tratamento. Logo em seguida, as amostras foram centrifugadas e o sobrenadante foi dispensado. A fração sedimentada foi ressuspendida em meio de cultivo e semeada em poços de placa de 6 poços. Após 24 h, o meio de cultivo foi trocado, para que as células não aderidas ou resquícios do tecido fossem descartados.

Ao longo do cultivo foram realizadas novas trocas de 48 a 72 h. Sempre que as células ocupavam 80% ou mais da superfície do poço (confluência de 80% ou mais) elas foram ressuspensas com o auxílio de tripsina (Invitrogen) e uma fração era descartada. O restante era semeado novamente. Este tratamento foi chamado de passagem. Após o primeiro tratamento com tripsina as células foram consideradas em passagem 1 (P1).

As MSC foram divididas em três categorias de acordo com o estágio de cultivo: estágio inicial (até a passagem 7), estágio intermediário (passagem 8 até passagem 12) e estágio tardio (a partir da passagem 13).

### *3.1.2) Condições de Cultivo Celular*

Depois de estabelecidas, as MSC foram mantidas em meio HDMEM que foi constituído de: DMEM de baixa glicose (Invitrogen) complementado com 10% de soro fetal bovino (Cultilab, São Paulo, SP, Brasil), 1% de solução de antibiótico (Invitrogen) e 2,5 g/L de HEPES (Sigma, Saint Louis, MO, EUA). As culturas estabelecidas foram designadas de acordo com o local de onde foram isoladas: moMSC (medula óssea), ADSC (Adipose derived stem cell, gordura), pMSC (pulmão), meMSC (medula espinhal) e rMSC (rim) e cMSC (veia cava).

As células HEK293T e MEF foram mantidas em meio DMEM de alta glicose (Invitrogen) complementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de solução de antibiótico (Invitrogen).

As iPSC foram mantidas em co-cultivo em uma camada de células alimentadora constituída de MEF inativados após incubação de 3 h com 10 µg/mL de mitomicina C (Sigma) a 37 °C, ou sob placas de cultivo recobertas por 0,2% gelatina (Sigma). O meio de cultivo denominado meio mESC, constituído de: DMEM/F12 (Invitrogen) suprido de meio condicionado de células de ovário de hamster chinês (CHO) geneticamente modificadas com vetor expressando LIF na proporção de 1:500 (generosamente doadas pelo Dr Stevens Rehen, LaNCE, UFRJ), 1% de aminoácidos não essenciais (Invitrogen), 55 µM de β-Mercaptoetanol e 15% de KnockOut™ serum replacement (Invitrogen) e 1% de solução de antibiótico (Invitrogen). Quando necessário, foi utilizado meio mESC condicionado por MEF. Para produzir este meio, MEF foram cultivadas em meio mESC por 24h. Posteriormente este meio foi coletado e filtrado a 22 µm e congelado a -80 °C ou utilizado imediatamente. Antes da utilização, este meio foi suprido com mais meio condicionado de CHO expressando LIF na proporção de 1:500, como mencionado acima.

### *3.2) Diferenciação in vitro das MSC*

A diferenciação osteogênica e adipogênica das células foi realizada através de cultura em meio indutor, segundo Meirelles and Nardi (2003). Controles pareados foram mantidos em meio não indutor. A diferenciação osteogênica foi analisada pela deposição de cálcio, através da coloração com Alizarin Red S (Nuclear, São Paulo, SP, Brasil). A diferenciação adipogênica foi analisada pela coloração dos depósitos lipídicos situados nas células utilizando uma solução de Oil Red O (Sigma).

### *3.3) Imunofenotipagem das MSC*

As MSC foram ressuspensas e lavadas com PBS (tampão fostafo). Posteriormente foram incubadas com anticorpos para SCA1, CD11b, CD29, CD44, CD45, CD48d, CD49e e CD90.2 conjugados com ficoeritrina (PE) ou isotiocianato de fluoresceína (FITC). Posteriormente foram analisadas por citometria de fluxo com o aparelho FACScalibur (Becton Dickinson, San Diego, CA, EUA) e o software CellQuest. No mínimo 5.000 eventos foram coletados.

### *3.4) Produção de Vetores Retrovirais*

Todos os procedimentos com vetores retrovirais foram realizados em sala específica de biossegurança nível II, com procedimentos e manipulação realizados em nível III. O Laboratório de Imunogenética e o Laboratório de Sinalização e Plasticidade Celular foram adaptados para cumprir as exigências de segurança do nível II, de acordo com literatura especializada (CDC, 1999).

Partículas dos vetores retrovirais foram geradas por transfecção transiente de DNA plasmidial em células HEK293T semeadas no dia anterior a transfecção, em uma densidade de  $2,8 \times 10^6$  células por frasco de cultivo celular com superfície de  $25 \text{ cm}^2$ . A transfecção com os três plasmídeos foi realizada respectivamente na proporção de 1:1:2 de plasmídeo de empacotamento de retrovírus (expressando Gag/Pol), plasmídeo expressando a proteína G do envelope do Vírus da Estomatite Vesicular (VSV-G) e plasmídeo de vetor, codificando um dos fatores de indução de iPSC (OCT4,

SOX2, KLF4 e c-MYC), gentilmente cedidos pelo Dr Martin Bonamino (Instituto Nacional do Câncer – INCa).

O meio de cultura foi trocado 16 horas após a transfecção e o sobrenadante foi coletado após 48, 60 e 72 horas. A seguir, todos os sobrenadantes foram filtrados em filtro 0,45 µm (Millipore, São Paulo, SP, Brasil) e o estoque viral (filtrado) foi mantido congelado a -70°C e titulado pelo método de diluições sucessivas, ou usado imediatamente após a filtração.

### 3.5) *Transfecção com o Vetor pEGFP-N1*

Para a padronização das condições ideais  $1,5 \times 10^4$  MSC foram semeadas por poço em placas de 24 poços. No dia seguinte foi realizada a transfecção. As quantidades de pEGFP-N1 utilizadas foram 1 µg, 2 µg e 5 µg; e as proporções de lipofectamine 2000 (µg do vetor: µL de lipofectamine 2000) foram 1:2, 1:3 e 1:5. Após 48 h, as células foram resuspendidas em PBS e incubadas com 5 µg/mL iodeto de propídeo (PI) por 10 minutos a temperatura ambiente, para quantificar a viabilidade. Imediatamente foram submetidas a citometria de fluxo FACScalibur (Becton Dickinson) e analisadas com o auxílio do software *FlowJo*.

Após a padronização, as MSC de diferentes origens e em diferentes estágio do cultivo foram transfectadas nas condições ideais.

### 3.6) *Quantificação da Expressão Gênica*

A quantificação da expressão dos genes de pluripotência foi realizada pela técnica de qRT-PCR em tempo real. Inicialmente foi extraído mRNA das MSC em diferentes passagens com Trizol e posteriormente foi quantificado por espectrofotometria utilizando o *Nanodrop ND1000* (Thermo Scientific Inc., Wilmington, DE, EUA). A partir de 2 µg de mRNA foi sintetizado cDNA, utilizando a enzima MMLV (Invitrogen). O cDNA sintetizado foi diluído na proporção de 1:30 e, posteriormente, foi utilizado para técnica de qRT-PCR em tempo real relativo segundo Veiro Nora *et al.* (2011), no aparelho *StepOnePLus* (Applied Biosystems, Foster City, California, EUA).

Resumidamente, a reação foi constituída de 10 µL de amostra diluída 1:300, 100 nM de cada *primer*, 0,1 mM de dNTPs, 1x solução tampão para PCR (Invitrogen), 0,25 U Platinum Taq DNA Polimerase (Invitrogen), 3 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,1 X Sybr Green I (Invitrogen) e o volume final foi de 20 µL. As condições de amplificação foram: 95 °C por 5 minutos seguidos de 40 ciclos (95 °C por 15 segundos, 60 °C por 15 segundos e 72 °C por 35 segundos), posteriormente foi realizada a curva de dissociação para averiguar a existência de amplificações diferentes da esperada.

O cálculo da expressão foi realizado pelo método de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . As amostras que apresentaram diferença maior de 40% nas expressões de  $\beta$ -Act e Gapdh foram excluídas.

A tabela 3 mostra os oligonucleotídeos utilizados neste trabalho.

Tabela 3. Sequência dos oligonucleotídeos utilizados neste trabalho.

Gene		Sequencia sentido 5' - 3'	Utilização
Oct4	Oligonucleotídeo Direto	GGCTCACCTGGGCGTTCTCT	qRT-PCR
	Oligonucleotídeo Reverso	CATGGTCTCCAGACTCCACCTCAC	qRT-PCR
Sox2	Oligonucleotídeo Direto	TCAAGGCAGAGAAGAGAGTGTTCG	qRT-PCR
	Oligonucleotídeo Reverso	GCCGCCGCGATTGTTGTGAT	qRT-PCR
c-Myc	Oligonucleotídeo Direto	GCCAGCCCTGAGCCCCTAGT	qRT-PCR
	Oligonucleotídeo Reverso	CGGCGTAGTTGTGCTGGTGAGT	qRT-PCR
Klf4	Oligonucleotídeo Direto	TGCCAGAGGAGCCCAAGCCA	qRT-PCR
	Oligonucleotídeo Reverso	TTCCACCCACAGCCGTCCCA	qRT-PCR
Nanog	Oligonucleotídeo Direto	TGAAGTGCAAGCGGTGGCAGA	qRT-PCR
	Oligonucleotídeo Reverso	GGTCCAGGTCTGGCTGCTCCA	qRT-PCR
Lin28	Oligonucleotídeo Direto	ACTCCCAGGAGCAGGGCGAGGTTA	qRT-PCR
	Oligonucleotídeo Reverso	ATCCCATTGGCCCAGAAAGGGC	qRT-PCR
Tcl-1 $\alpha$	Oligonucleotídeo Direto	AGCTGGTGCCTTACGAGCTGC	qRT-PCR
	Oligonucleotídeo Reverso	TGCAGGACCGGGTCTGGGTT	qRT-PCR
Gapdh	Oligonucleotídeo Direto	AAAATGGTGAAGGTCGGTGT	qRT-PCR
	Oligonucleotídeo Reverso	GTTAGTGGGGTCTCGTCCT	qRT-PCR
$\beta$ -Act <sup>1</sup>	Oligonucleotídeo Direto	TCACCCACACTGTGCCCATGTACGA	qRT-PCR
	Oligonucleotídeo Reverso	GGATGCCACAGGATTCCATACCCA	qRT-PCR

<sup>1</sup> De acordo com Hansen et al. (2007).

### 3.7) Geração de iPSC

Foram semeadas  $1,5 \times 10^4$  MSC em cada poço de placa de 24 poços. No dia seguinte quantidades iguais dos 4 vetores ou combinações diferentes destes foram usadas para transdução das células em meio de cultivo HDMEM juntamente com  $6 \mu\text{g/mL}$  de polibrene (Millipore) por 16 h. Após este período o meio de cultivo foi trocado. Este processo foi repetido no dia seguinte em um dos experimentos. Após 3 ou 5 dias, as MSC foram ressuspensas com o auxílio de tripsina (Invitrogen) e passadas para co-cultivo com MEF ou para placa recoberta com gelatina 0,2%, após 16h o meio foi substituído pelo meio mESC.

### 3.8) Detecção da Atividade de Fosfatase Alcalina

Inicialmente as células foram fixadas com solução de 2% de paraformaldeído por 30 minutos a temperatura ambiente e, posteriormente, lavadas com solução PBS. Em seguida, as amostras foram incubadas com  $1 \text{ mg/mL}$  de nitroazul de tetrazólio,  $0,1 \text{ mg/mL}$  de 5-Bromo-4 Cloro-3 Indolyl Fosfato em solução de revelação ( $100 \text{ mM}$  Tris-HCl, pH 9,5;  $100 \text{ nM}$  de Na Cl;  $50 \text{ mM}$   $\text{MgCl}_2$ ) por 30 minutos a  $37^\circ\text{C}$ . A contagem das colônias positivas, em cor azul, foi realizada em microscópio óptico invertido (Axiovert 25, Zeiss, Hallbergmoos, Alemanha).

### 3.9) Análise Estatística

A padronização da transferência gênica foi analisada com ANOVA *two way* e teste *t*. Já as comparações entre as diferentes MSC transduzidas foi realizada com Kruskal-Wallis e teste de Dunn, já que estes resultados não se encontraram em distribuição normal. Para a aplicação dos testes foi utilizado o software *BioEstat5.0*. Foi considerado estatisticamente significativo  $p < 0,05$ .

## **4) Resultados**

### *4.1) Isolamento e Caracterização das MSC Isoladas*

O estágio inicial do cultivo celular do material isolado a partir de todas as amostras foi marcado por uma grande heterogeneidade na morfologia das células (Figura 3).

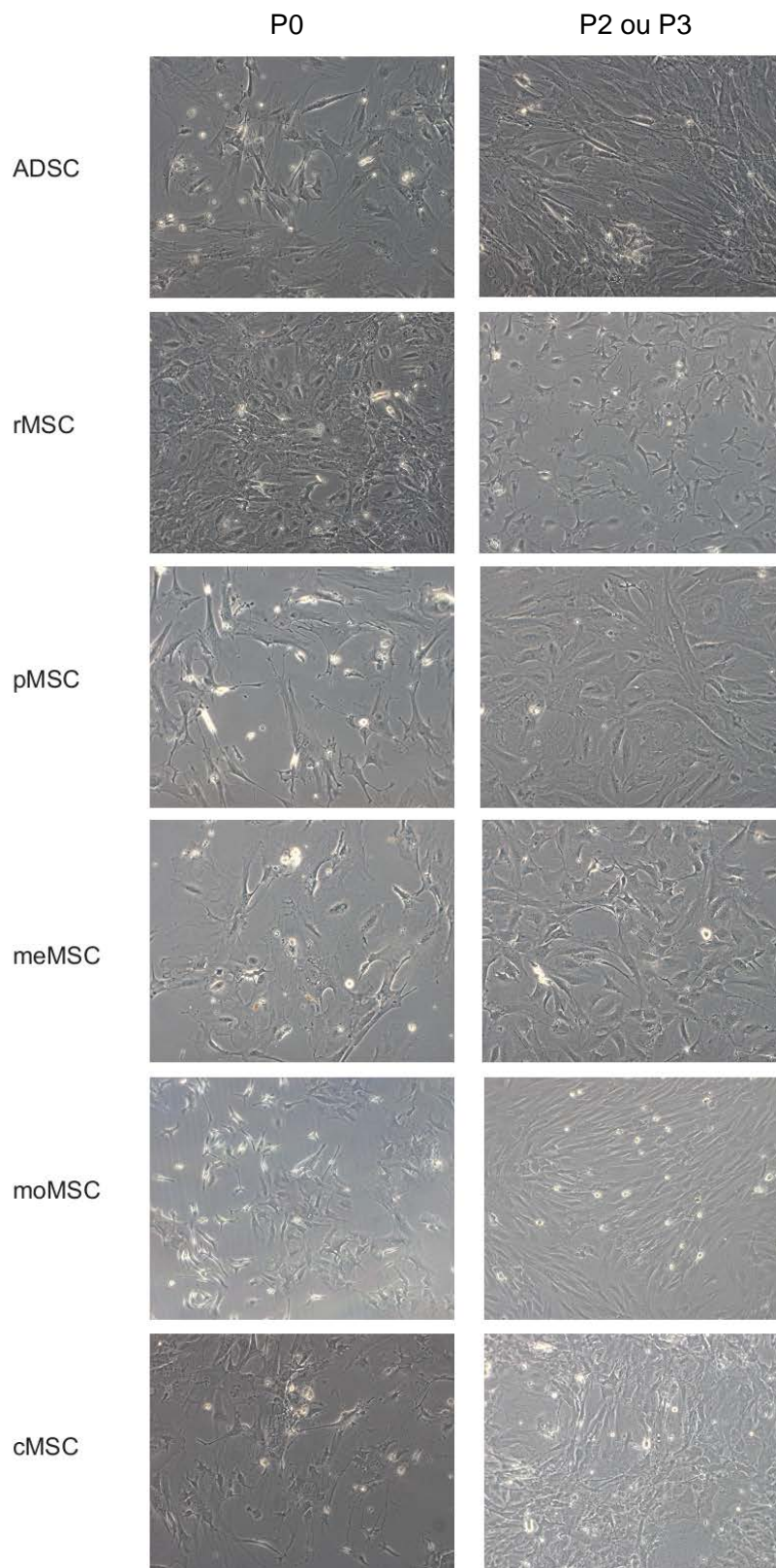


Figura 3. Cultivo de MSC. Fase inicial (P0) e cultivo estabelecido (a partir de P2). Aumento de 100x



Com o passar do tempo houve uma predominância de células com formato alongado apresentando algumas projeções, características esperadas para MSC. Os cultivos de pMSC e ADSC já apresentaram homogeneidade a partir da passagem 2. Já meMSC e rMSC se mostraram homogêneas a partir da passagem 3, enquanto moMSC em passagem 4.

Foi observado um comportamento bastante peculiar em meMSC. Após a passagem 13, sempre que estas células ocupavam 90 % ou mais da superfície de cultivo a morfologia delas era alterada para arredondada (Figura 4).

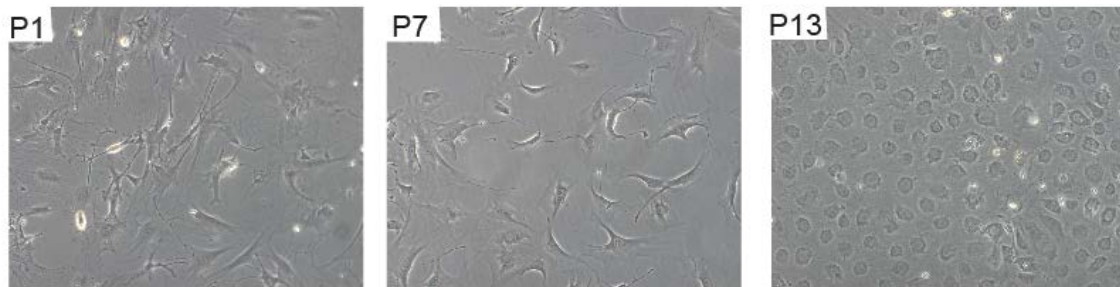


Figura 4. Diferenças morfológicas em meMSC ao decorrer do cultivo celular. Aumento de 100x

A caracterização das MSC foi realizada por diferenciação em adipócitos e osteócitos (figura 5) e por imunofenotipagem (figura 6 e figura 7). Todas as amostras testadas diferenciaram em adipócitos, já a meMSC foi a única a não diferenciar em osteócito.

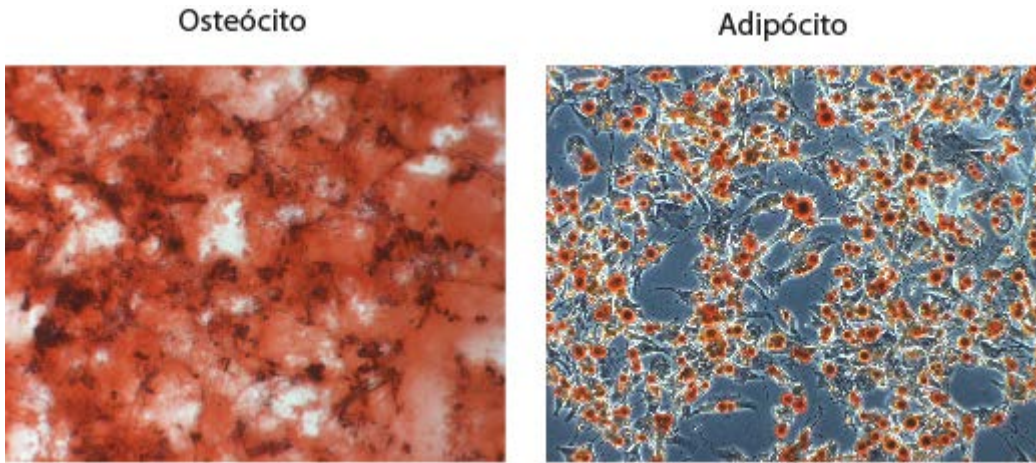


Figura 5. Fotomicrografias de moMSC diferenciadas em osteócitos e adipócitos após a coloração. Aumento de 100x.

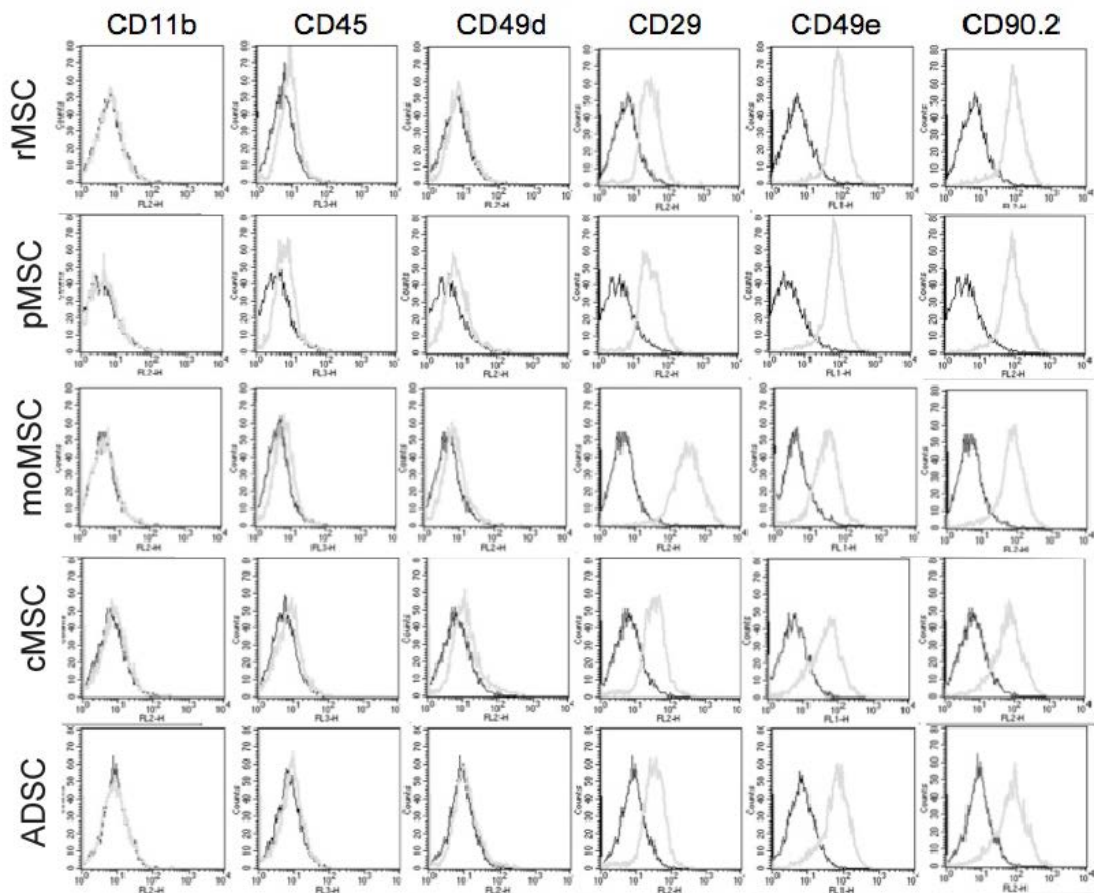


Figura 6. Imunofenotipagem de rMSC, pMSC, moMSC, cMSC e ADSC

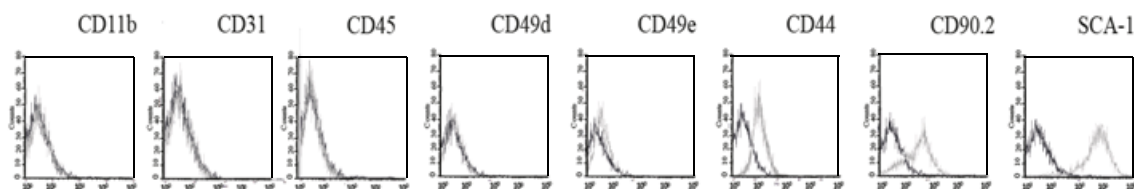


Figura 7. Imunofenotipagem de meMSC

As MSC foram testadas quanto à presença de um painel de marcadores de superfície. As rMSC, pMSC, moMSC, cMSC e ADSC não apresentaram expressão de CD11B, CD45, CD49d. E apresentaram a expressão de CD29, CD49 e CD90.2 (figura 6). Já as meMSC apresentaram a expressão de CD44, CD90.2 e SCA-1, mas não foi observada a presença de CD11b, CD31, CD45 e CD49.

#### 4.2) Transfecção

O primeiro experimento utilizando transferência gênica teve como objetivo selecionar a melhor proporção de pEGFP-N1 e lipofectamine 2000 tendo em conta a eficiência, avaliada pela porcentagem de MSC expressando EGFP e viabilidade. Este segundo parâmetro foi quantificado pelo número de células marcadas com PI, que indica morte celular.

Inicialmente, foram selecionadas três quantidades de vetor: 1, 2 e 5  $\mu\text{g}$ . Em seguida foram selecionadas três proporções de lipofectamine 2000, 1:2, 1:3 e 1:5 ( $\mu\text{g}$  de pEGFP-N1:  $\mu\text{L}$  de lipofectamine 2000); todos estes parâmetros estavam dentro daqueles indicados na bula do fabricante. Estas condições foram testadas em triplicatas em moMSC em passagem 6.

As condições que se mostraram mais interessantes para utilização em MSC foram 1:2 e 1:3 (figura 8). A porcentagem de células EGFP nas demais condições foi consideravelmente mais baixa. Não houve diferença significativa

na viabilidade celular entre os tratamentos. Sendo assim, elegemos a condição 1:2 para continuar os experimentos.

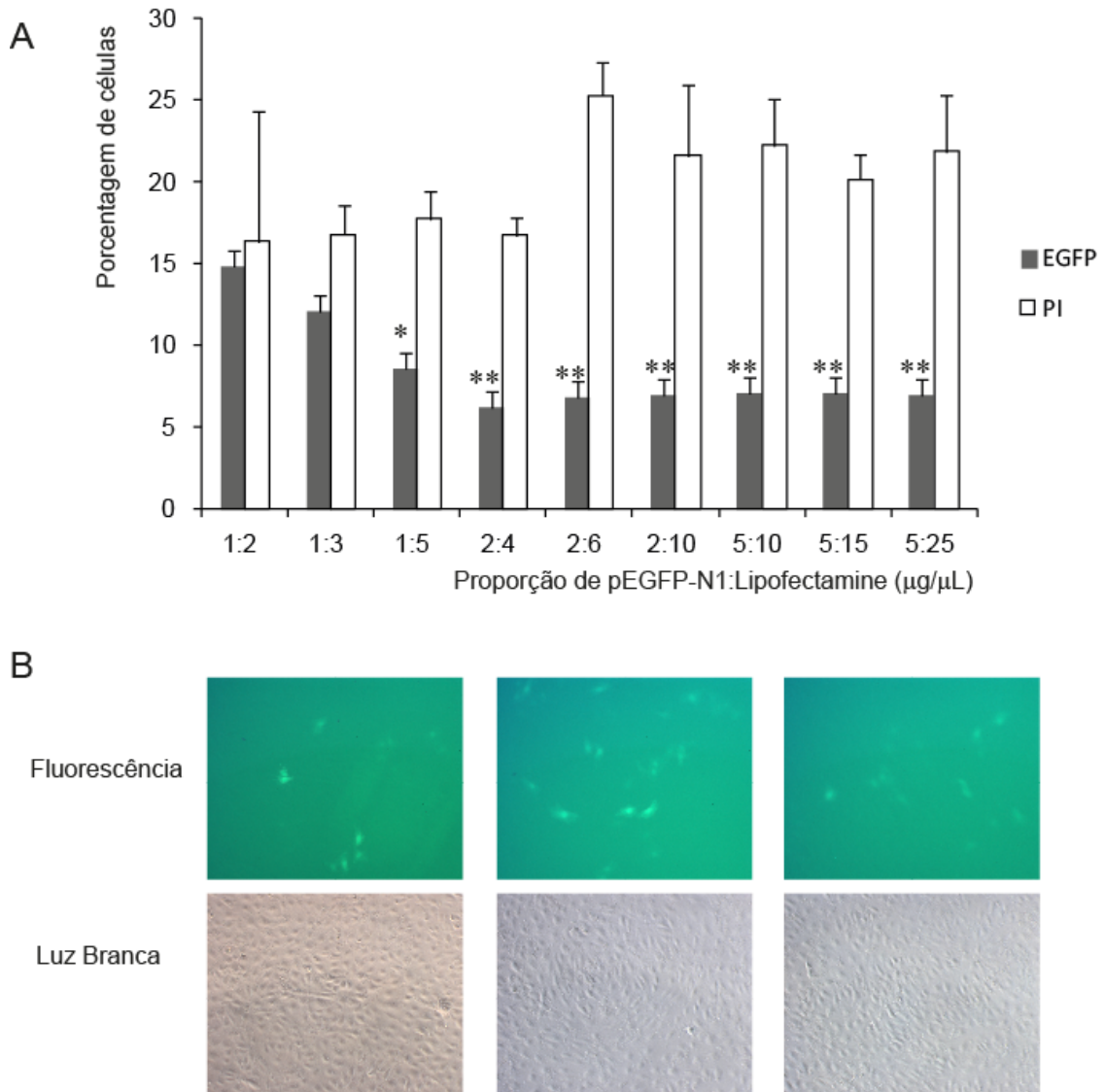


Figura 8. Padronização das condições de transfecção com lipofectamine 2000. A. Porcentagem de células positivas para EGFP e para Iodeto de Propídeo (PI). \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,001$ . B. Exemplos de células transfectadas. Aumento de 100x.

As MSC de diferentes origens foram tratadas com 1:2 de pEGFP-N1:Lipofectamine em seguida uma série de análises foi realizada. As comparações de eficiência e viabilidade que seguiram consideraram a origem das MSC e o estágio de cultivo. Depois de todas as análises realizadas, podemos constatar que nas culturas em estágio tardio a porcentagem de rMSC e de pMSC positivas para EGFP são maiores que moMSC. Também foi constatado que a viabilidade de pMSC tardia é menor que em pMSC intermediária e que cMSC tardia. Além disso, nenhuma alteração significativa em eficiência de transferência gênica ou viabilidade foi observada (figura 9).

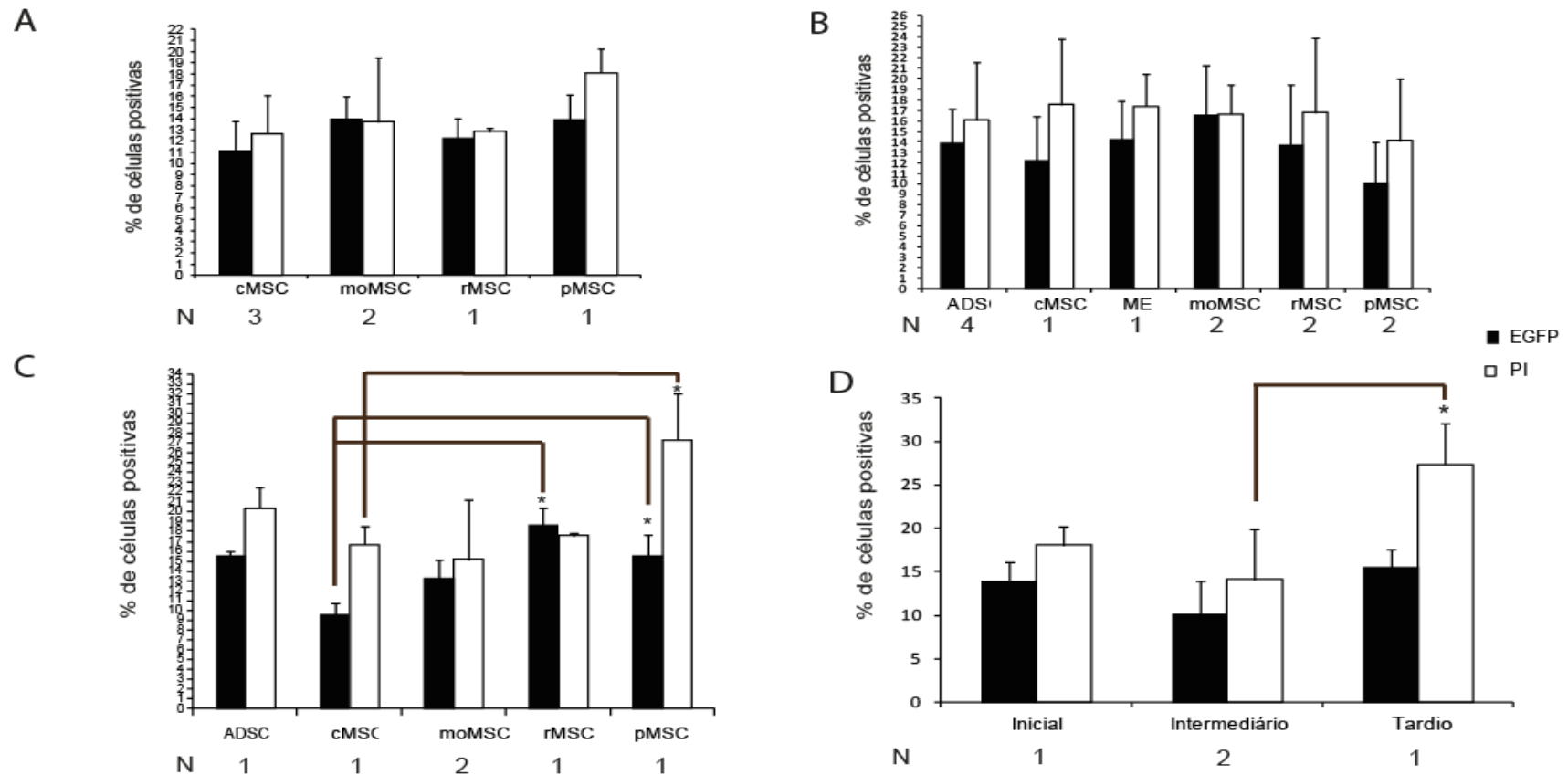


Figura 9. Eficiência de transfecção de pEGFP-N1 com Lipofectamine 2000 e viabilidade após o tratamento de diferentes MSC nos estágios de cultivo estado. A. cMSC, moMSC, rMSC e pMSC em estágio inicial de cultivo (até P7). B. ADSC, cMSC, meMSC, moMSC, rMSC e pMSC em estágio intermediário de cultivo (de P8 a P12). C. ADSC, cMSC, moMSC, rMSC e pMSC em estágio tardio de cultivo (a partir de P13). D. pMSC nos três estágios de cultivo. \*  $P < 0,05$

#### *4.3) Quantificação da Expressão dos Fatores de Pluripotência em MSC*

A expressão de Oct4, Klf4, Sox2, c-Myc, Lin28, Tcl-1 $\alpha$  e Nanog foi mensurada através da técnica de qRT-PCR nas MSC isoladas de diferentes órgãos e tecidos em três diferentes etapas de cultivo. Os valores obtidos foram normalizados pelos genes constitutivos  $\beta$ -actina e Gapdh. A Figura 10 mostra a expressão destes fatores em diferentes MSC comparada com a expressão na linhagem de células-tronco embrionárias USP1.

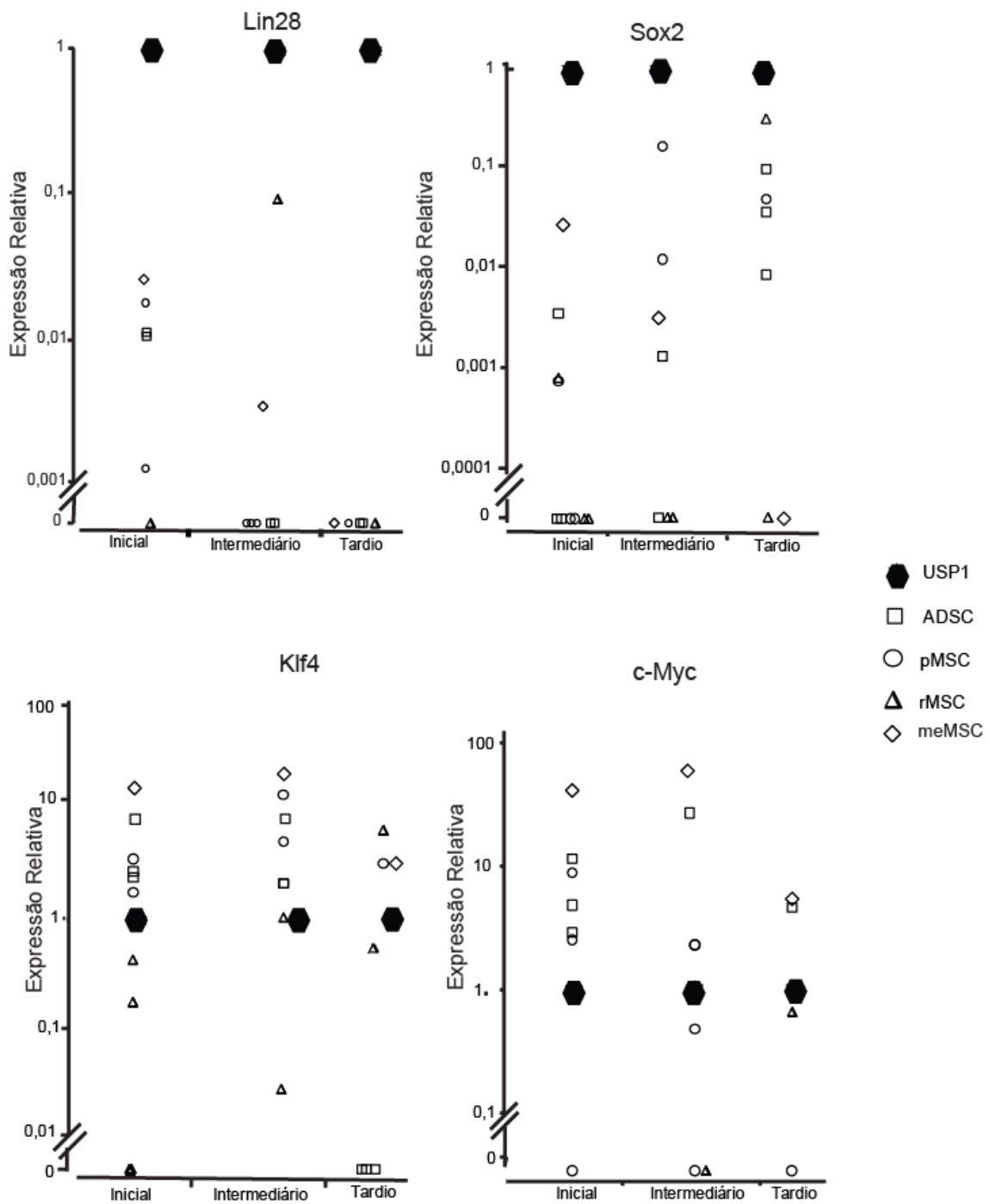


Figura 10. Expressão relativa dos fatores de pluripotência em diferentes MSC ao decorrer do cultivo celular.



De acordo com os nossos dados, todas as MSC testadas apresentam a expressão Klf4, c-Myc, Sox2 e Lin28 em ao menos um momento durante o cultivo. A expressão de Sox2 e Lin28 em meMSC decresce ao decorrer do cultivo. Além disso, a detecção de Lin28 somente na fase inicial do cultivo de ADSC, pMSC sugere que este fator seja expresso apenas no estabelecimento do cultivo. A única detecção de Lin28 em rMSC foi na fase intermediária de cultivo. Klf4 e c-Myc e não mostram uma tendência clara na variação da expressão durante a dinâmica de cultivo nas amostras testadas, assim como Sox2 em pMSC, rMSC e ADSC.

Nenhuma das nossas amostras apresentou expressão de Oct4, Tcl-1 $\alpha$  e Nanog.

#### *4.4) Geração de iPSC*

O primeiro experimento de reprogramação foi realizado com a utilização de pMSC em passagem 9. As células foram transduzidas com quantidades iguais dos vetores expressando os 4 YA e este dia foi considerado o dia 0 (Figura 11).

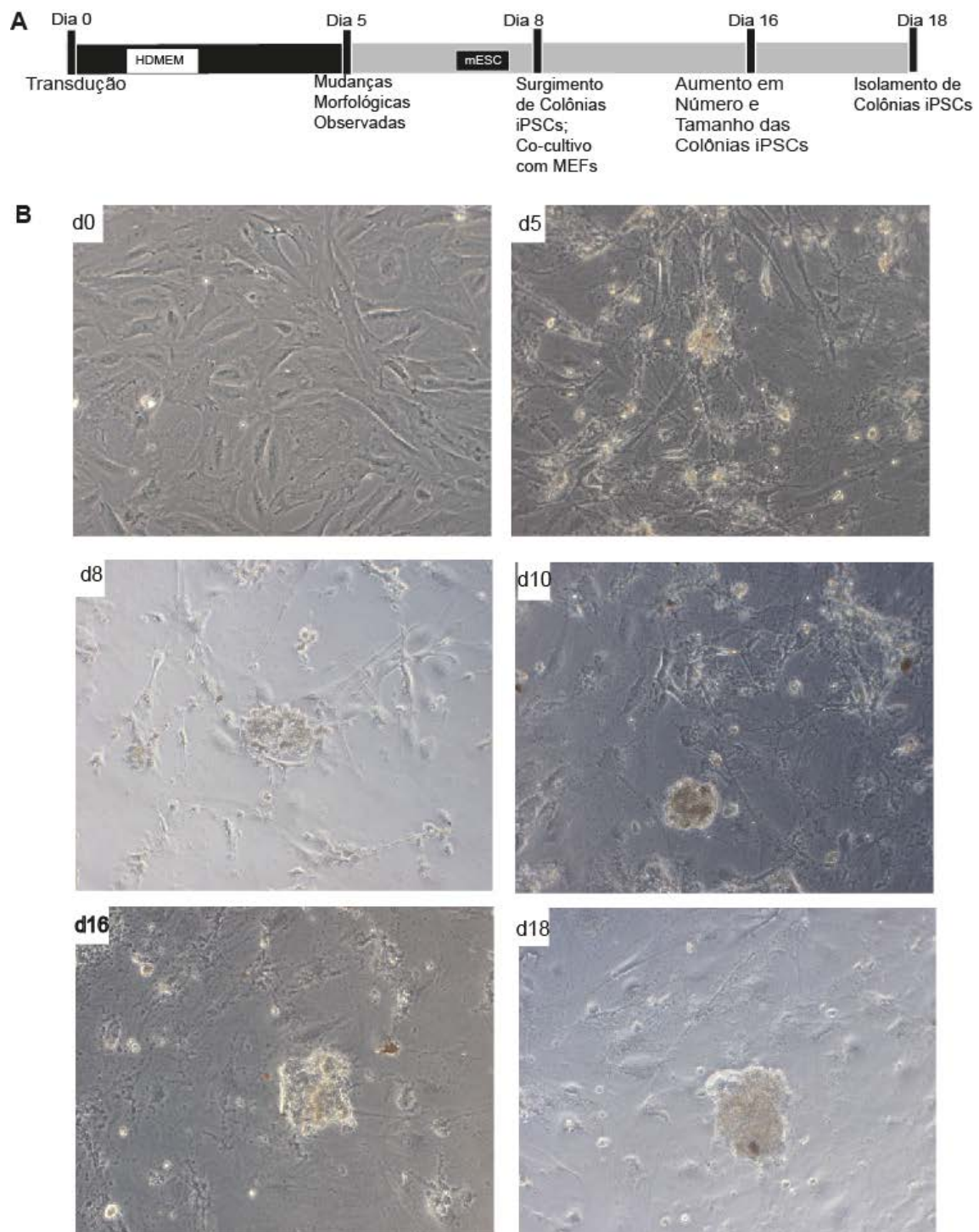
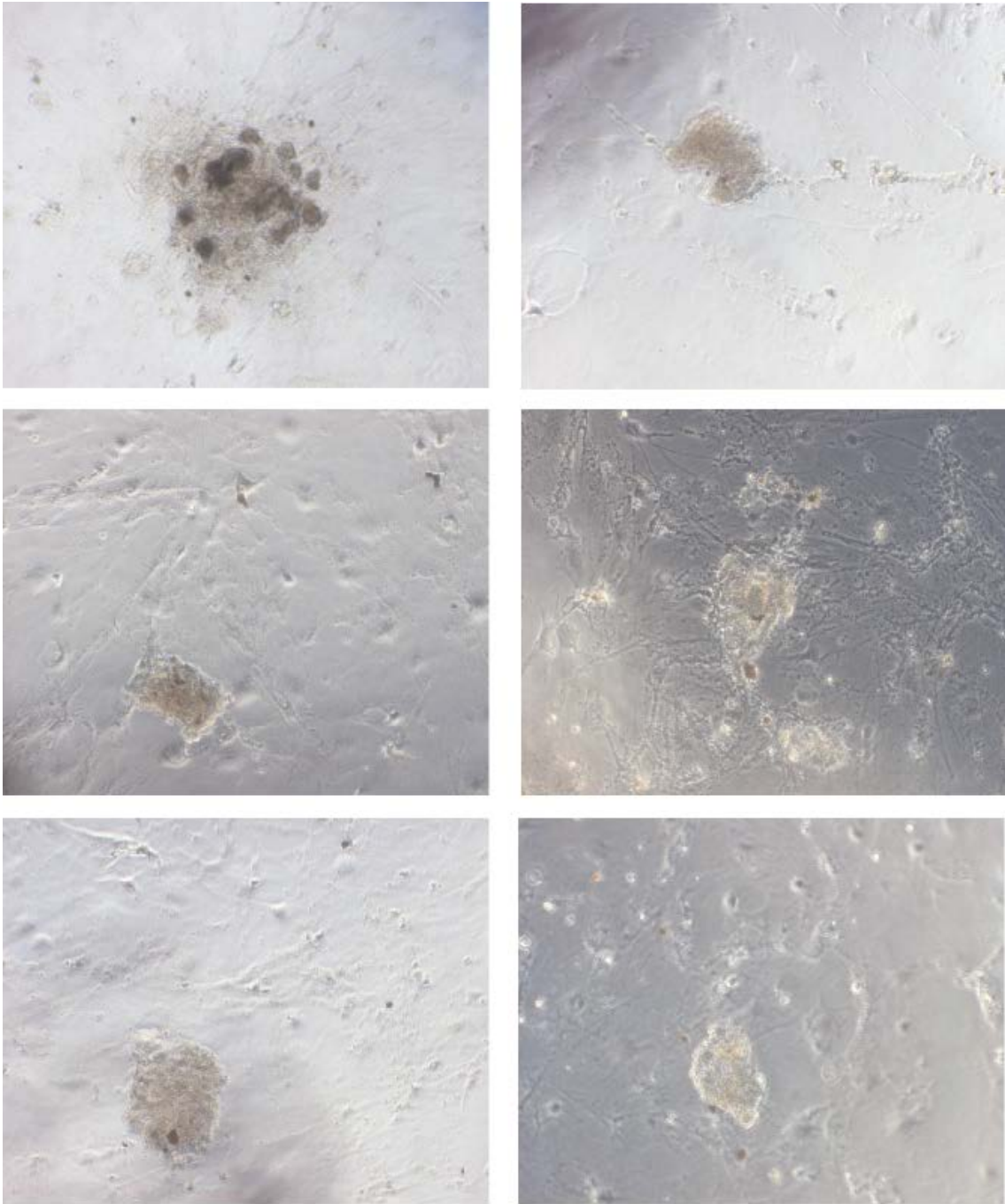


Figura 11. Mudanças morfológicas após a transdução com YAs. A. Esquema com principais modificações ocorridas com o passar do tempo. B. Exemplos das mudanças morfológicas nas células após a transdução. Aumento de 100x

No dia seguinte o meio de cultivo foi trocado por meio fresco. No dia 5 algumas modificações na morfologia das células foram observadas, e o meio de cultivo HDMEM foi substituído por meio mESC. A partir do oitavo dia estas modificações se tornaram mais marcantes com o surgimento de pequenas estruturas redondas bem definidas, as células foram tratadas com tripsina e co-cultivadas em MEF. A partir do décimo dia pode ser observado o crescimento destas estruturas. No décimo sexto dia um número maior destas estruturas, agora com formato extremamente similar ao de colônias mESC, foi observado. No décimo oitavo dia foram isoladas 24 colônias com o auxílio de microscópio invertido (Figura 12).



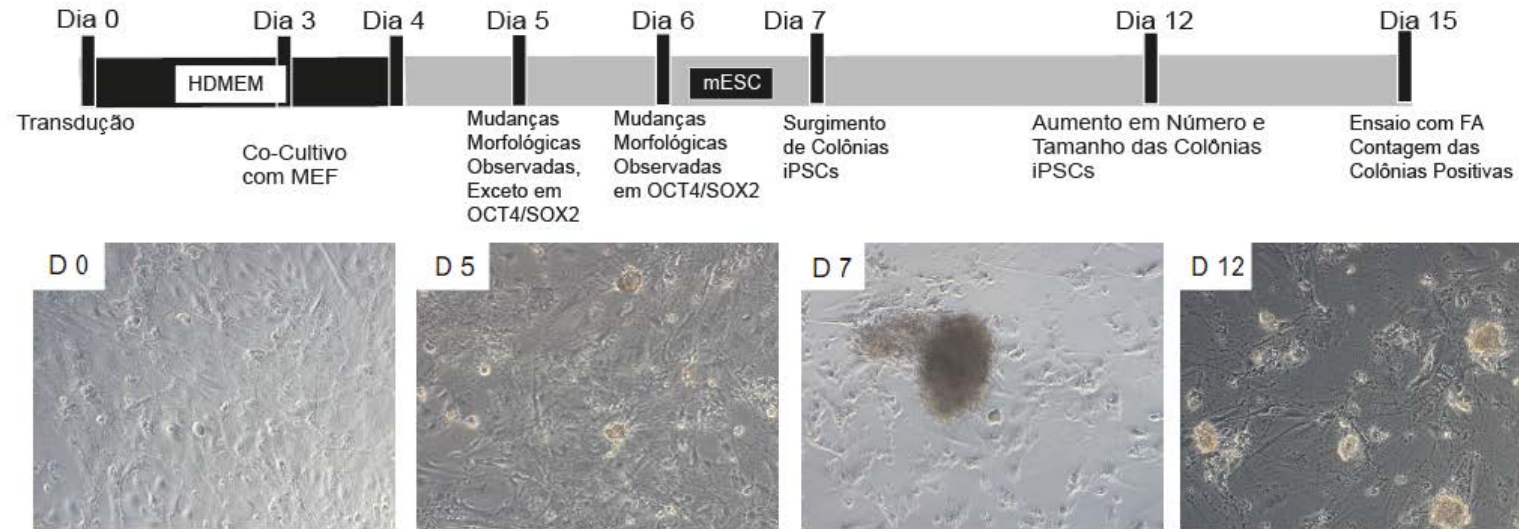
**Figura 12.** Exemplos de colônias iPSC isoladas. Aumento de 100x.

O segundo experimento de reprogramação foi planejado para a otimização da plataforma de reprogramação celular. Aqui foram testados os seguintes parâmetros: ciclos de transdução, diferentes combinações dos vetores expressando os YA e a variação no tempo de substituição das condições do cultivo de MSC por aquelas usadas para o cultivo de células pluripotentes. Foram utilizadas moMSC em passagem 5.

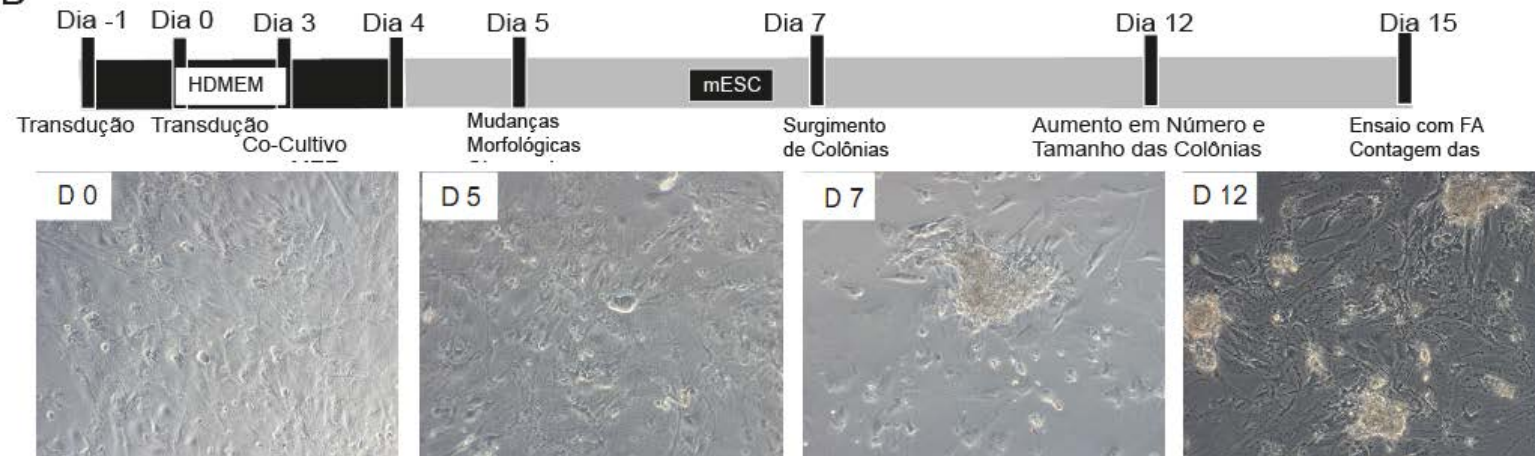
As moMSC sofreram 1 ou 2 ciclos de transdução em dias consecutivos. Foi considerado dia 1 aquele que sucedeu a transdução única ou a segunda transdução. As combinações utilizadas de fatores foram: OCT4, SOX2, KLF4 e C-MYC (4F); OCT4, SOX2 e C-MYC; OCT4, SOX2 e KLF4; OCT4, SOX2(2F). As células transduzidas foram co-cultivadas com MEF a partir do dia 3 (d3) ou 5 (d5), já o meio mESC substituiu o meio HDMEM no dia 4 ou 6. Todas as condições foram testadas em duplicata.

Na Figura 13 pode-se visualizar mais facilmente o procedimento adotado, as modificações que surgiram no cultivo celular e alguns exemplos de colônias. Pudemos observar a reprogramação celular em todas as condições testadas, mas com algumas variações.

A



B



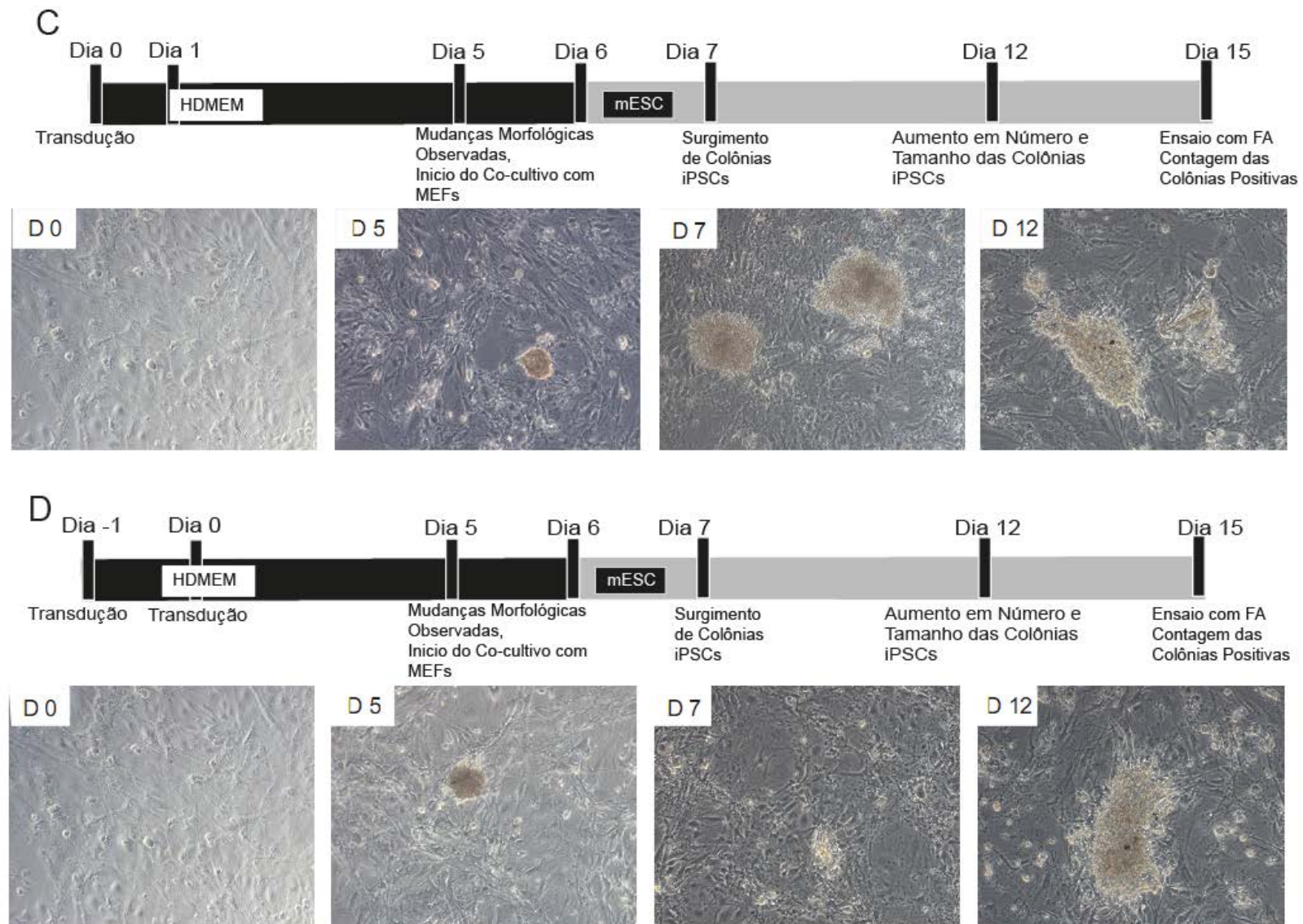


Figura 13. Esquema com principais modificações ocorridas nas moMSC após os diferentes tratamentos, juntamente com exemplos das mudanças morfológicas nas células após a transdução. A. Uma transdução e substituição do meio HDMEM por meio mESC no dia 3. B. Duas transduções e substituição do meio HDMEM por meio mESC no dia 3. C. Uma transdução e substituição do meio HDMEM por meio mESC no dia 5. D. Duas transduções e substituição do meio HDMEM por meio mESC no dia 5. Aumento de 100x

A transdução das moMSC foi realizada por um período de 16 horas. Posteriormente o meio foi substituído por HDMEM. Este foi considerado o dia 1 para as células transduzidas apenas uma vez. Nos casos onde foi testada uma segunda transdução, as células tiveram o seu meio removido após aproximadamente 8 horas e foram incubadas novamente aos vetores. O meio foi novamente substituído por HDMEM após 16 horas e este ponto foi considerado o dia 1.

No dia 5, foi possível detectar alterações morfológicas nas MSC de todos os testes; à excessão daquelas que sofreram uma transdução com dois fatores e início do co-cultivo com MEF a partir do dia 3, que apresentaram estas alterações no dia 6.

No dia 7, foi observado surgimento de colônias iPSC com tamanhos variados em todos os tratamentos, O aumento número e no tamanho das colônias foi constatado no dia 12.

No dia 15 foram isoladas colônias a partir de um poço de cada teste, totalizando 60 colônias, com o auxílio de lupa. No mesmo dia, foi realizada a detecção de atividade de fosfatase alcalina nas colônias do outro poço (Figura 14). Posteriormente foi realizada a contagem de colônias positivas (Tabela 4).



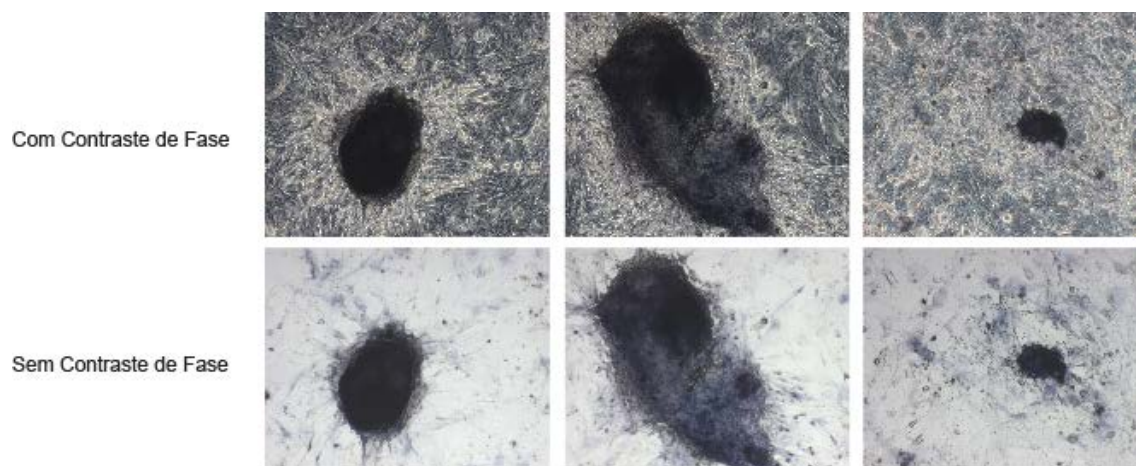


Figura 14. Detecção da atividade da Enzima Fosfatase Alcalina nas colônias iPSC. Imagens com e sem contraste de fase. Aumento de 100x.

Tabela 4. Número de colônias *iPSC* positivas para fosfatase alcalina em cada tratamento.

Combinção YA	Co-Cultivo com MEF	Número Colônias com Atividade de Fosfatase Alcalina	
		1	2
Número de Rodadas de Transdução		1	2
OCT4/SOX2/c-Myc/KLF4	3	7	20
OCT4/SOX2/c-Myc/KLF4	5	81	54
OCT4/SOX2/c-Myc	3	44	23
OCT4/SOX2/c-Myc	5	90	146
OCT4/SOX2/KLF4	3	44	NA*
OCT4/SOX2/KLF4	5	86	45
OCT4/SOX2	3	20	21
OCT4/SOX2	5	88	101

\* As replicatas foram perdidas antes da contagem

A terceira rodada de reprogramação teve como objetivo testar gelatina como substrato para a geração e manutenção das iPSC dispensando as MEF. Adotamos também o meio mESC induzido por MEF.

Adotamos as combinações dos fatores descritas anteriormente e substituição do meio HDMEM pelo meio mESC no quinto dia e apenas uma rodada de transdução em moMSC P6. Todas as condições foram testadas em duplicata.

A primeira diferença constatada foi que o surgimento das primeiras estruturas arredondadas ocorreu no dia 8 (figura 15).

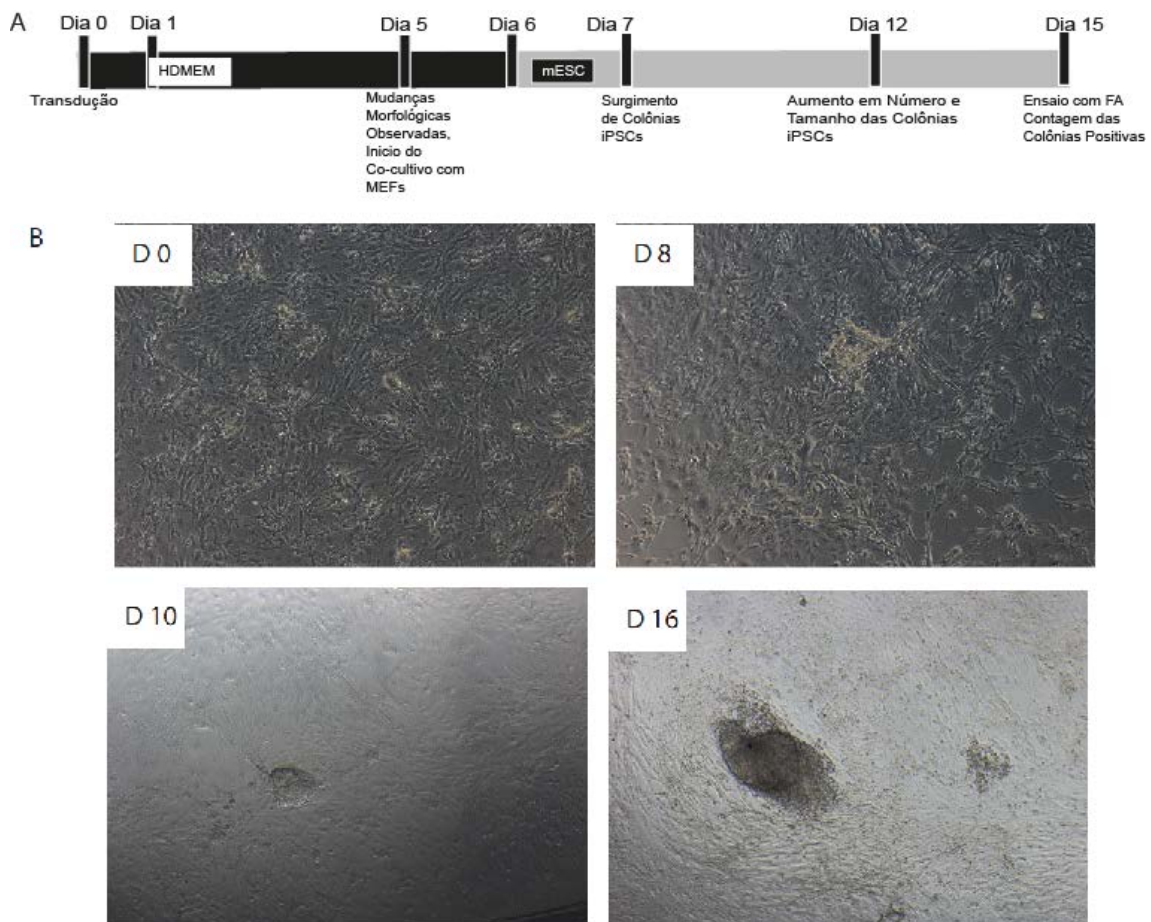


Figura 15. Reprogramação utilizando placas cobertas por 0,2% de gelatina. A. Esquema com principais modificações ocorridas com o passar do tempo. B. Exemplos das mudanças morfológicas nas células após a transdução. Aumento de 100x

No dia 15 foi realizada a contagem de colônias com base na morfologia (tabela 5). Neste experimento não foi detectada a reprogramação das moMSC transduzidas apenas com 2F. As moMSC que não sofreram modificações morfológicas após a transdução se mantiveram no cultivo, mesmo após as passagens.

Tabela 5. Número de Colônias iPSC observado em cada tratamento.

Combinação YA	Número	Número
	Colônias 1	Colônias 2
OCT4/SOX2/c-Myc/KLF4	34	23
OCT4/SOX2/c-Myc	12	11
OCT4/SOX2/KLF4	11	0
OCT4/SOX2	0	0

A última rodada de reprogramação foi executada com pMSC em P7, rMSC em P5, ADSC em P5. As condições de reprogramação adotadas foram: administração de quantidades igual de cada vetor, substituição do meio HDMEM pelo meio mESC condicionado no quinto dia após a única rodada de transdução.

Os cultivos celulares foram acompanhados durante 35 dias. Durante todo o experimento foram mantidas amostras não transduzidas de cada MSC como controle negativo. Os controles negativos não apresentaram qualquer mudança morfológica perceptível. As primeiras alterações morfológicas foram observadas nas pMSC no dia 10, culminando no surgimento das iPSC no dia 17 (Figura 16).

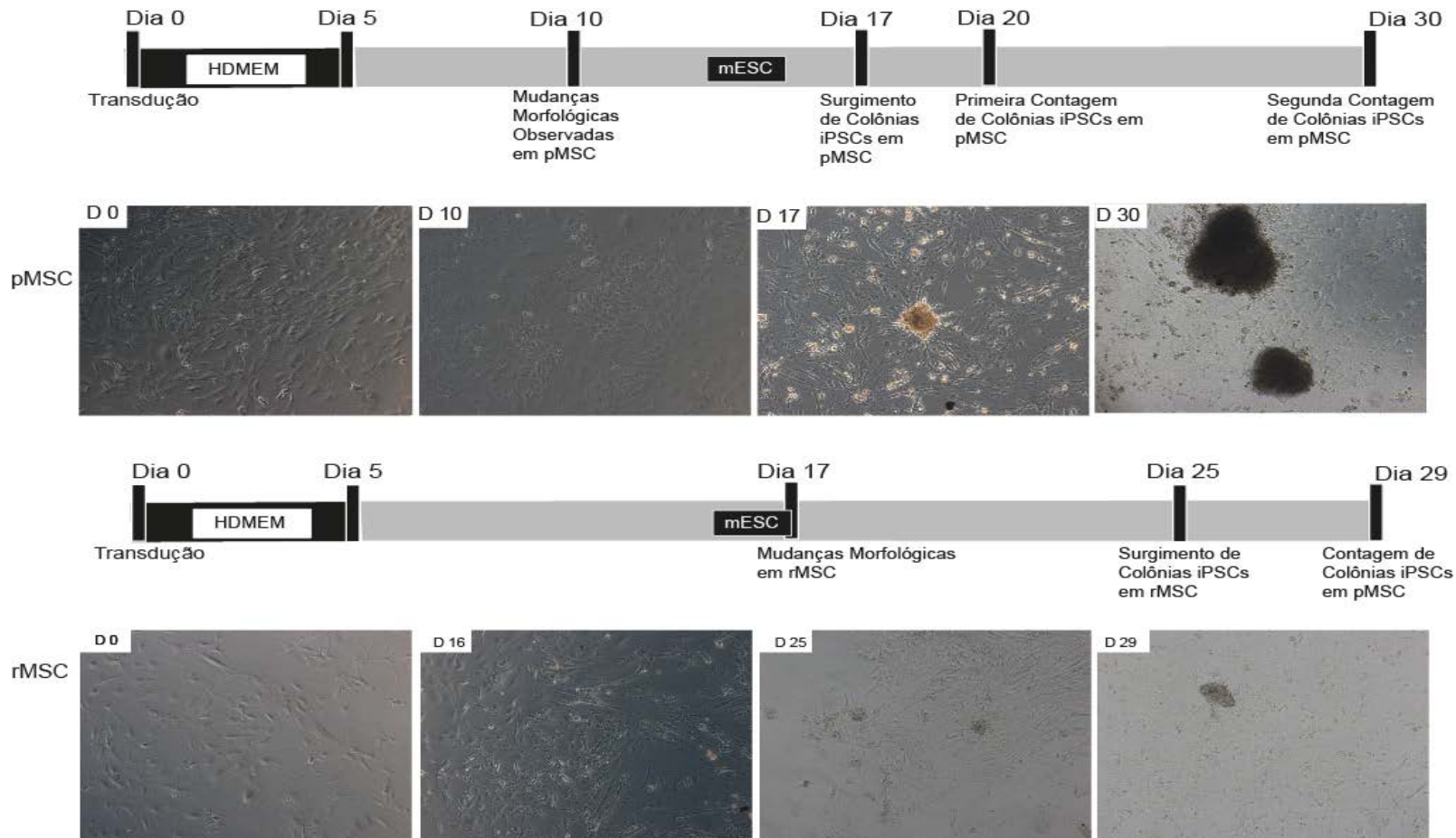


Figura 16. Reprogramação utilizando rMSC e pMSC em placas cobertas por 0,2% de gelatina. A. Esquema com principais modificações ocorridas com o passar do tempo. B. Exemplos das mudanças morfológicas nas células após a transdução. Aumento de 100x

. No dia 25, foram contadas 14 colônias iPSC na cultura de pMSC. Este número subiu para 49 no dia 30 (Figura 9). As rMSC apresentaram mudanças somente a partir do dia 16 e o aparecimento de iPSC no dia 25 (Figura 16). No dia 29 foram contadas 0 e 5 colônias iPSC nas duplicatas de rMSC (Figura 9). Os resultados com moMSC reprogramada com os quatro fatores (tabela 5) foram utilizados na construção da tabela 6. Nenhuma alteração foi percebida nas ADSC durante o experimento.

Tabela 6. Número de colônias iPSC após a reprogramação de MSC de diferentes origens.

	Número de Colônias 1	Número de Colônias 2
pMSC	49	NA
moMSC	34	23
rMSC	5	0
ADSC	0	0

## **5) Discussão**

As células-tronco mesenquimais são caracterizadas pelo seu potencial de diferenciação em células de origem mesenquimal como, por exemplo, condrócitos, osteócitos e adipócitos. Além disto, as MSC podem secretar fatores e citocinas, servindo de suporte para outros tipos celulares; possuem uma capacidade imunorregulatória e tropismo por regiões lesionadas e câncer. Esta série de características as tornam candidatas extremamente promissoras para a terapia celular. Outra peculiaridade é que a expressão de diferentes genes ligados a pluripotência já foi descrita nestas células.

Neste trabalho foram isoladas e caracterizadas MSC murinas de diferentes tecidos e órgãos com o objetivo de estudar as possíveis diferenças entre a expressão destes genes, capacidade de transferência gênica por Lipofectamine 2000 e potencial de reprogramação celular.

No presente trabalho, foi descrito pela primeira vez o isolamento de células provenientes de medula espinhal de camundongo com perfil de marcadores de superfície, adesão ao substrato e potencial de diferenciação em células de origem mesenquimal. Apesar de apresentar os requisitos mínimos para serem consideradas MSC, as meMSC diferiram das demais em três critérios: imunofenotipagem, capacidade de diferenciação e morfologia ao decorrer do cultivo. Dentro do painel de marcadores que foi utilizado as meMSC não mostraram a expressão de CD49e. Em princípio, esta questão não é muito importante, pois a presença deste marcador não é detectada em todas MSC (da Silva Meirelles et al., 2006).

Quando expostas ao meio de cultivo indutor de diferenciação adipogênica, as meMSC apresentam vacúolos com lipídeos, condizente com as demais MSC. Mas quando foi testada nas condições para diferenciação osteogênica não foi detectado qualquer depósito de cálcio, contrastando com o estudo de Asari et al. (2012) realizado com células humanas. O potencial de diferenciação osteogênico não é constante entre diferentes MSC, apresentando variação na quantidade de depósito de cálcio assim como no tempo de resposta as condições indutoras (da Silva Meirelles et al., 2006; Cheng et al., 2012). Estudos com novas condições e alteração no tempo de exposição

devem ser realizados para definir com maior precisão o potencial de diferenciação destas células.

A associação da terapia celular com a terapia gênica já vem sendo analisada nas MSC (tabela 1). O uso destas células como plataforma para a terapia gênica *ex vivo* é bastante almejado devido à fácil manutenção capacidade de imunorregulação e o tropismo por lesões. A fonte de isolamento mais utilizada de MSC é a medula óssea, mas as ADSC apresentam uma opção menos invasiva de obtenção e diferentes estudos de caracterização assim como aqueles que comparam diferentes parâmetros entre as duas, indicam que ambas se mostram muito equivalentes.

Estudos com diferentes vetores mostram muita heterogeneidade nas eficiências, mas apontam que estas células são refratárias à transferência gênica. A maior parte destes estudos prioriza os parâmetros relativos ao vetor, não dando grande importância à fonte de MSC. No presente trabalho foi constatado que os tratamentos empregando menor quantidade de plasmídeo e as menores proporções de Lipofectamine 2000 (1:2 e 1:3) se mostraram mais eficientes que os demais testados. Na avaliação comparativa entre as MSC, uma maior porcentagem de células transduzidas em pMSC e rMSC quando comparada com cMSC foi observada; todas em passagem tardia. O tratamento parece ser mais prejudicial para as pMSC quando utilizadas em estágio tardio, já que apresentaram um maior número de células marcadas com PI que o estágio intermediário.

A literatura mostra uma grande variação na eficiência de transdução com Lipofectamine 2000. moMSC em passagem 7 e ADSC em passagem 6, ambas humanas, apresentaram melhor transfecção, quando comparadas com as passagens 4 e 6, respectivamente (Yang et al., 2009). Este trabalho utilizou apenas uma linhagem de cada MSC. Outro trabalho utilizando também moMSC humana elegeu a proporção 1:1,25 (vetor:lipofectamine 2000) como a ideal. Posteriormente, amostras de dois indivíduos foram transfectadas nas passagens 1, 2, 3, 4. Os autores perceberam uma grande variação entre as duas amostras e uma tendência a diminuir a eficiência de transfecção ao decorrer do tempo (Madeira et al., 2010).

Outra questão extremamente importante diz respeito a expressão de genes envolvidos na pluripotência. Esta questão ainda é largamente discutida e o consenso parece bastante distante devido a variabilidade nos resultados (Agnes et al., 2010; Sugii et al., 2011). Esta ausência de homogeneidade é, provavelmente, reflexo da variação nas condições de cultivo (Baer and Geager, 2012). Poucos estudos tentaram mostrar a variação destes fatores ao decorrer do cultivo celular (Liu et al., 2011).

Neste trabalho é mostrada a expressão de Klf4, Sox2, Lin28 e c- Myc em MSC murinas isoladas de pulmão, rim, tecido adiposo e medula espinhal. Lin28 foi detectado apenas no estágio inicial do cultivo de pMSC e ADSC e intermediário de rMSC. Enquanto que nas meMSC, Lin28 e Sox2 parecem diminuir com o tempo de cultivo chegando a zero no cultivo tardio. Não existe uma tendência clara na variação dos demais fatores ao decorrer do cultivo celular. Klf4 e c-Myc foram mais expressos nas MSC que em USP1, fato corroborado pelo estudo de Sugii et al., 2011. Não foi detectada a expressão de Oct4, Tcl-1 $\alpha$  ou Nanog. Uma possível explicação para a ausência de Oct4 é que a sua expressão em moMSC de rato diminui ao decorrer do cultivo chegando a não ser detectado na passagem 6 (Ji et al., 2009).

Uma limitação da técnica de qRT-PCR relativo é que o resultado é expresso sob a forma de média das células numa população celular heterogênea. Sendo assim, é considerado que todas as células dentro do cultivo não só estão expressando os fatores como que as quantidades são iguais quando o número de células expressando os YA é quantificado. Esta premissa não é correta, pois já foi realizado um estudo utilizando citometria de fluxo e o percentual de células expressando os fatores diferiu consideravelmente de acordo com a fonte de MSC (Jaramillo-Ferrada et al., 2011). Aquele trabalho comparou a frequência de MSC de medula óssea, membrana amniótica e membrana coriônica expressando OCT4, SOX2, e NANOG. As MSC de membrana amniótica apresentaram maior frequência em todos os fatores: 27,5  $\pm$  1% (OCT4); 60  $\pm$  4% (SOX2) e 79  $\pm$  8% (NANOG). Nas MSC de membrana coriônica tiveram os valores intermediários: 11,8  $\pm$  8%



(OCT4);  $20,8 \pm 6\%$  (SOX2) e  $75 \pm 6\%$  (NANOG). E moMSC os mais baixos: 2,1% (OCT4); 8,7% (SOX2) e 42,9% (NANOG).

Em 2006, o grupo conduzido por Shinya Yamanaka conseguiu produzir células que apresentavam o mesmo potencial e características das ESC, a partir de fibroblastos. Este resultado foi extremamente importante, pois resolve duas das três barreiras para aplicação de células pluripotentes na clínica: imunogenicidade e as questões éticas ligadas à destruição do blastocisto; restando apenas o aumento da segurança com a eliminação ou diminuição do potencial teratogênico, até o momento inerente as células pluripotentes. Desde esta primeira publicação, diferentes grupos vêm se esmerando em entender o processo de reprogramação, identificar as condições e células ideais e estudar as aplicações desta nova tecnologia.

Apesar da geração de iPSC a partir de MSC não ser novidade, este trabalho é o primeiro a mostrar a reprogramação de pMSC e rMSC além, de comparar com ADSC e moMSC. Outro dado inédito é a reprogramação de moMSC apenas com OCT4 e SOX2 quando é utilizado o co-cultivo com MEF. Aqui também pode ser visto que existe uma relação direta entre eficiência de geração de iPSC e o tempo de substituição das condições de cultivo. Quando o co-cultivo em MEF é iniciado no quinto dia após a transdução, e a substituição do meio HDMEM para o meio mESC no sexto, a reprogramação é mais eficiente, considerando toda as combinações de vetores e nos dois números de rodadas de transdução, quando comparada as mesmas alterações no terceiro e quarto dia, respectivamente. Quando o co-cultivo em MEF é substituído por placas recobertas por gelatina e meio mESC induzido, não é observada a reprogramação apenas com dois fatores, sendo obrigatória a adição de c-MYC ou KLF4.

Existe uma grande variação dentro dos experimentos, mas é possível verificar que pMSC apresenta maior número de iPSC quando comparada às demais, seguida de moMSC e rMSC. Não identificamos reprogramação em ADSC. Outra informação extremamente importante foi que as moMSC reprogramam mais rapidamente (dia 8), sendo seguidas pelas pMSC (dia 10) e pelas rMSC (dia 16). Nossos dados não sustentam a colaboração da

expressão endógena dos fatores de pluripotência devido a grande variação detectada. A diferença do tempo de reprogramação entre pMSC e rMSC pode estar correlacionada à expressão de Lin28 e Klf4. Um dado que poderia colaborar de maneira bastante expressiva para explicar a variação no número de iPSC seria a quantificação e comparação da eficiência de transdução entre as diferentes MSC.

Considerando todas as MSC utilizadas neste trabalho, as ADSC e as moMSC são aquelas que apresentam obtenção menos invasiva. Infelizmente não foi possível reprogramar as ADSC dentro das condições testadas. Trabalhos anteriores mostraram que ADSC humanas foram reprogramadas sem o co-cultivo com MEF (Sun et al., 2009) ou de c-Myc (Aoki et al., 2010).

### *5.1) Conclusões e Perspectivas*

A totalidade do potencial terapêutico das MSC ainda é desconhecida. Já é sabido que elas não estão localizadas exclusivamente na medula óssea, mas virtualmente em todo o organismo. Quando caracterizadas é possível notar que estas células não são idênticas, mas sim equivalentes (Cheng et al., 2012), mostrando a extrema importância de se realizar mais estudos básicos com o objetivo de identificar toda a potencialidade terapêutica dos diferentes tipos de MSC.

Nossos resultados mostram de maneira bastante clara que a expressão dos fatores de pluripotência não é uniforme entre as MSC, entretanto não foi possível definir a alteração desta ao decorrer do cultivo celular.

Constatamos também que existe uma variação no potencial de transfecção entre as MSCs ao decorrer do cultivo celular, assim como uma diferença na resistência a este tratamento. O número de cultivos celulares estudados é diferente então ainda é preciso aumentar este número para que as comparações sejam mais precisas.

No que tange à reprogramação celular, ainda é preciso caracterizar quanto a marcadores de pluripotência e capacidade de diferenciação os clones gerados de diferentes MSC.

Considerando todos os dados gerados aqui, o potencial de utilização das MSC na terapia gênica *ex vivo* e na reprogramação celular é variável e possivelmente está associado ao local de onde estas células são isoladas, além do estágio de cultivo. Ainda assim, muitos estudos ainda precisam ser realizados para estipular de forma exata a colaboração que cada MSC pode oferecer para o uso clínico.

## 6) Referências Bibliográficas

Alipio Z, Liao W, Roemer EJ, Waner M, Fink LM, Ward DC and Ma Y (2010) Reversal of hyperglycemia in diabetic mouse models using induced-pluripotent stem (iPS)-derived pancreatic beta-like cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:13426-31.

Anchan RM, Quaas P, Gerami-Naini B, Bartake H, Griffin A, Zhou Y, Day D, Eaton JL, George LL, Naber C, Turbe-Doan A, Park PJ, Hornstein MD and Maas RL (2011) Amniocytes can serve a dual function as a source of iPS cells and feeder layers. *Hum Mol Genet* 20:962-74.

Ang YS, Gaspar-Maia A, Lemischka IR and Bernstein E (2011) Stem cells and reprogramming: breaking the epigenetic barrier? *Trends Pharmacol Sci* 32:394-401.

Aoki T, Ohnishi H, Oda Y, Tadokoro M, Sasao M, Kato H, Hattori K and Ohgushi H (2010) Generation of induced pluripotent stem cells from human adipose-derived stem cells without *c-Myc*. *Tissue Eng Part A* 16:2197-206.

Aslan H, Zilberman Y, Arbeli V, Sheyn D, Matan Y, Liebergall M, Li JZ, Helm GA, Gazit D and Gazit Z (2006) Nucleofection-based ex vivo nonviral gene delivery to human stem cells as a platform for tissue regeneration. *Tissue Eng* 12:877-89.

Baer PC and Geiger H (2010) Adipose-derived mesenchymal stromal/stem cells: tissue localization, characterization, and heterogeneity. *Stem Cells Int* 2012:812693.

Ben-Nun IF, Montague SC, Houck ML, Tran HT, Garitaonandia I, Leonardo TR, Wang YC, Charter SJ, Laurent LC, Ryder OA and Loring JF (2011) Induced pluripotent stem cells from highly endangered species. *Nat Methods* 8:829-31.

Boland MJ, Hazen JL, Nazor KL, Rodriguez AR, Gifford W, Martin G, Kupriyanov S and Baldwin KK (2009) Adult mice generated from induced pluripotent stem cells. *Nature* 461:91-4.

Bosch P, Fouletier-Dilling C, Olmsted-Davis EA, Davis AR and Stice SL (2006) Efficient adenoviral-mediated gene delivery into porcine mesenchymal stem cells. *Mol Reprod Dev* 73:1393-403.

Brambrink T, Foreman R, Welstead GG, Lengner CJ, Wernig M, Suh H and Jaenisch R (2008) Sequential expression of pluripotency markers during direct reprogramming of mouse somatic cells. *Cell Stem Cell* 2:151-9.

Brohlin M, Mahay D, Novikov LN, Terenghi G, Wiberg M, Shawcross SG and Novikova LN (2009) Characterisation of human mesenchymal stem cells following differentiation into Schwann cell-like cells. *Neurosci Res* 64:41-9.

Broxmeyer HE, Lee MR, Hangoc G, Cooper S, Prasain N, Kim YJ, Mallett C, Ye Z, Witting S, Cornetta K, Cheng L and Yoder MC (2011) Hematopoietic stem/progenitor cells, generation of induced pluripotent stem cells, and isolation of endothelial progenitors from 21- to 23.5-year cryopreserved cord blood. *Blood* 117:4773-7.

Caplan AI (2009) Why are MSCs therapeutic? New data: new insight. *J Pathol* 217:318-24.

CDC-Center for Disease control and Prevention; National Institute of Health (1999). Biosafety in microbial and Biomedical Laboratories. 4rd edition. U.S. Government Printing Office, USA.

Cheng CC, Lian WS, Hsiao FS, Liu IH, Lin SP, Lee YH, Chang CC, Xiao GY, Huang HY, Cheng CF, Cheng WT and Wu SC (2012) Isolation and characterization of novel murine epiphysis derived mesenchymal stem cells. *PLoS One* 7:e36085

Chen XA, Zhang LJ, He ZJ, Wang WW, Xu B, Zhong Q, Shuai XT, Yang LQ and Deng YB (2011) Plasmid-encapsulated polyethylene glycol-grafted polyethylenimine nanoparticles for gene delivery into rat mesenchymal stem cells. *Int J Nanomedicine* 6:843-53.

Cheng Z, Ou L, Zhou X, Li F, Jia X, Zhang Y, Liu X, Li Y, Ward CA, Melo LG and Kong D (2008) Targeted migration of mesenchymal stem cells modified with CXCR4 gene to infarcted myocardium improves cardiac performance. *Mol Ther* 16:571-9.

Chiesa S, Morbelli S, Morando S, Massollo M, Marini C, Bertoni A, Frassoni F, Bartolome ST, Sambuceti G, Traggiai E and Uccelli (2011) A Mesenchymal stem cells impair in vivo T-cell priming by dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:17384-9.

Cho HJ, Lee CS, Kwon YW, Paek JS, Lee SH, Hur J, Lee EJ, Roh TY, Chu IS, Leem SH, Kim Y, Kang HJ, Park YB and Kim HS (2010) Induction of pluripotent stem cells from adult somatic cells by protein-based reprogramming without genetic manipulation. *Blood* 116:386-95.

Chou BK, Mali P, Huang X, Ye Z, Dowe SN, Resar LM, Zou C, Zhang YA, Tong J and Cheng L (2011) Efficient human iPS cell derivation by a non-integrating plasmid from blood cells with unique epigenetic and gene expression signatures. *Cell Res* 21:518-29.

Cucchiari M, Ekici M, Schetting S, Kohn D and Madry H (2011) Metabolic activities and chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells following recombinant adeno-associated virus-mediated gene transfer and overexpression of fibroblast growth factor 2. *Tissue Eng Part A* 17:1921-33.

Czepiel M, Balasubramanian V, Schaafsma W, Stancic M, Mikkers H, Huisman C, Boddeke E and Copray S (2011) Differentiation of induced pluripotent stem cells into functional oligodendrocytes. *Glia* 59:882-92.

da Silva Meirelles L, Chagastelles PC and Nardi NB (2006) Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J Cell Sci* 119:2204-13.

Dalberto TP, Nardi NB and Camassola M (2010) Mesenchymal stem cells as a platform for gene therapy protocols. *Sci Prog* 93:129-40.

Dimos JT, Rodolfa KT, Niakan KK, Weisenthal LM, Mitsumoto H, Chung W, Croft GF, Saphier G, Leibel R, Goland R, Wichterle H, Henderson CE and Eggan K (2008) Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons. *Science* 321:1218-21.

Do JT, Joo JY, Han DW, Arauzo-Bravo MJ, Kim MJ, Greber B, Zaehres H, Sobek-Klocke I, Chung HM and Scholer HR (2009) Generation of parthenogenetic induced pluripotent stem cells from parthenogenetic neural stem cells. *Stem Cells* 27:2962-8.

Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop D and Horwitz E (2006) Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8:315-7.

Dropulic B (2011) Lentiviral vectors: their molecular design, safety, and use in laboratory and preclinical research. *Hum Gene Ther* 22:649-57.

Eminli S, Foudi A, Stadtfeld M, Maherali N, Ahfeldt T, Mostoslavsky G, Hock H and Hochedlinger K (2009) Differentiation stage determines potential of hematopoietic cells for reprogramming into induced pluripotent stem cells. *Nat Genet* 41:968-76.

Eminli S, Utikal J, Arnold K, Jaenisch R and Hochedlinger K (2008) Reprogramming of neural progenitor cells into induced pluripotent stem cells in the absence of exogenous Sox2 expression. *Stem Cells* 26:2467-74.

Ergen AV and Goodell MA (2010) Mechanisms of hematopoietic stem cell aging. *Exp Gerontol* 45:286-90.

Esteban MA, Wang T, Qin B, Yang J, Qin D, Cai J, Li W, Weng Z, Chen J, Ni S, Chen K, Li Y, Liu X, Xu J, Zhang S, Li F, He W, Labuda K, Song Y, Peterbauer A, Wolbank S, Redl H, Zhong M, Cai D, Zeng L and Pei D (2010) Vitamin C enhances the generation of mouse and human induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 6:71-9.

Evans MJ and Kaufman MH (1981) Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292:154-6.

Friedenstein AJ, Chailakhjan RK and Lalykina KS (1970) The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet* 3:393-403.

Gera A, Steinberg GK and Guzman R (2010) In vivo neural stem cell imaging: current modalities and future directions. *Regen Med* 5:73-86.

Gheisari Y, Soleimani M, Azadmanesh K and Zeinali S (2008) Multipotent mesenchymal stromal cells: optimization and comparison of five cationic polymer-based gene delivery methods. *Cytotherapy* 10:815-23.

Ghosh Z, Wilson KD, Wu Y, Hu S, Quertermous T and Wu JC (2010) Persistent donor cell gene expression among human induced pluripotent stem cells contributes to differences with human embryonic stem cells. *PLoS One* 5:e8975.

Giorgetti A, Montserrat N, Aasen T, Gonzalez F, Rodriguez-Piza I, Vassena R, Raya A, Boue S, Barrero MJ, Corbella BA, Torrabadella M, Veiga A and Izpisua Belmonte JC (2009) Generation of induced pluripotent stem cells from human cord blood using *OCT4* and *SOX2*. *Cell Stem Cell* 5:353-7.

Gonzalez F, Boue S and Izpisua Belmonte JC (2011) Methods for making induced pluripotent stem cells: reprogramming a la carte. *Nat Rev Genet* 12:231-42.

Grisafi D, Piccoli M, Pozzobon M, Ditadi A, Zaramella P, Chiandetti L, Zanon GF, Atala A, Zacchello F, Scarpa M, De Coppi P and Tomanin R (2008) High transduction efficiency of human amniotic fluid stem cells mediated by adenovirus vectors. *Stem Cells Dev* 17:953-62.

Haleem-Smith H, Derfoul A, Okafor C, Tuli R, Olsen D, Hall DJ and Tuan RS (2005) Optimization of high-efficiency transfection of adult human mesenchymal stem cells in vitro. *Mol Biotechnol* 30:9-20.



Han JW and Yoon YS (2011) Induced pluripotent stem cells: emerging techniques for nuclear reprogramming. *Antioxid Redox Signal* 15:1799-820.

Hankowski KE, Hamazaki T, Umezawa A and Terada N (2011) Induced pluripotent stem cells as a next-generation biomedical interface. *Lab Invest* 91:972-7.

Hansen JM, Klass M, Harris C and Csete M (2007) A reducing redox environment promotes C2C12 myogenesis: implications for regeneration in aged muscle. *Cell Biol Int* 31:546-53.

Hanna J, Saha K, Pando B, van Zon J, Lengner CJ, Creighton MP, van Oudenaarden A and Jaenisch R (2009) Direct cell reprogramming is a stochastic process amenable to acceleration. *Nature* 462:595-601.

Hanna JH, Saha K and Jaenisch R (2010) Pluripotency and cellular reprogramming: facts, hypotheses, unresolved issues. *Cell* 143:508-25.

Hao L, Wang J, Zou Z, Yan G, Dong S, Deng J, Ran X, Feng Y, Luo C, Wang Y and Cheng T (2009) Transplantation of BMSCs expressing hPDGF-A/hBD2 promotes wound healing in rats with combined radiation-wound injury. *Gene Ther* 16:34-42.

Helledie T, Nurcombe V and Cool SM (2008) A simple and reliable electroporation method for human bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev* 17:837-48.

Helmrich U, Marsano A, Melly L, Wolff T, Christ L, Heberer M, Scherberich A, Martin I and Banfi A (2012) Generation of human adult mesenchymal stromal/stem cells expressing defined xenogenic vascular endothelial growth factor levels by optimized transduction and flow cytometry purification. *Tissue Eng Part C Methods* 18:283-92.

Ho PJ, Yen ML, Lin JD, Chen LS, Hu HI, Yeh CK, Peng CY, Lin CY, Yet SF and Yen BL (2010) Endogenous *KLF4* expression in human fetal endothelial cells allows for reprogramming to pluripotency with just OCT3/4 and SOX2--brief report. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 30:1905-7.

Hoffman LM and Carpenter MK (2005) Characterization and culture of human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 23:699-708.

Hoffmann A, Pelled G, Turgeman G, Eberle P, Zilberman Y, Shinar H, Keinan-Adamsky K, Winkel A, Shahab S, Navon G, Gross G and Gazit D (2006) Neotendon formation induced by manipulation of the Smad8 signalling pathway in mesenchymal stem cells. *J Clin Invest* 116:940-52.

Hotta A and Ellis J (2008) Retroviral vector silencing during iPS cell induction: an epigenetic beacon that signals distinct pluripotent states. *J Cell Biochem* 105:940-8.

Huang B, Li T, Alonso-Gonzalez L, Gorre R, Keatley S, Green A, Turner P, Kallingappa PK, Verma V and Oback B (2011) A Virus-Free Poly-Promoter Vector Induces Pluripotency in Quiescent Bovine Cells under Chemically Defined Conditions of Dual Kinase Inhibition. *PLoS One* 6:e24501.

Huangfu D, Maehr R, Guo W, Eijkelenboom A, Snitow M, Chen AE and Melton DA (2008a) Induction of pluripotent stem cells by defined factors is greatly improved by small-molecule compounds. *Nat Biotechnol* 26:795-7.

Huangfu D, Osafune K, Maehr R, Guo W, Eijkelenboom A, Chen S, Muhlestein W and Melton DA (2008b) Induction of pluripotent stem cells from primary human fibroblasts with only *Oct4* and *Sox2*. *Nat Biotechnol* 26:1269-75.

Itoh M, Kiuru M, Cairo MS and Christiano AM (2011) Generation of keratinocytes from normal and recessive dystrophic epidermolysis bullosa-induced pluripotent stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:8797-802.

Iwamuro M, Komaki T, Kubota Y, Seita M, Kawamoto H, Yuasa T, Shahid JM, Hassan RA, Hassan WA, Nakaji S, Nishikawa Y, Kondo E, Yamamoto K, Fox IJ and Kobayashi N (2010) Hepatic differentiation of mouse iPS cells in vitro. *Cell Transplant* 19:841-7.

Jafari M, Soltani M, Naahidi S, Karunaratne DN and Chen P (2012) Nonviral approach for targeted nucleic acid delivery. *Curr Med Chem* 19:197-208.

Jaramillo-Ferrada PA, Wolvetang EJ and Cooper-White JJ Differential mesengenic potential and expression of stem cell-fate modulators in mesenchymal stromal cells from human-term placenta and bone marrow. *J Cell Physiol* 227:3234-42.

Jopling C, Boue S and Izpisua Belmonte JC (2011) Dedifferentiation, transdifferentiation and reprogramming: three routes to regeneration. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12:79-89.

Judson RL, Babiarz JE, Venere M and Blalock R (2009) Embryonic stem cell-specific microRNAs promote induced pluripotency. *Nat Biotechnol* 27:459-61.

Kawamura T, Suzuki J, Wang YV, Menendez S, Morera LB, Raya A, Wahl GM and Belmonte JC (2009) Linking the p53 tumour suppressor pathway to somatic cell reprogramming. *Nature* 460:1140-4.

Khare R, Chen CY, Weaver EA and Barry MA (2011) Advances and future challenges in adenoviral vector pharmacology and targeting. *Curr Gene Ther* 11:241-58.

Kim D, Kim CH, Moon JI, Chung YG, Chang MY, Han BS, Ko S, Yang E, Cha KY, Lanza R and Kim KS (2009a) Generation of human induced pluripotent stem cells by direct delivery of reprogramming proteins. *Cell Stem Cell* 4:472-6.

Kim JB, Sebastiano V, Wu G, Arauzo-Bravo MJ, Sasse P, Gentile L, Ko K, Ruau D, Ehrich M, van den Boom D, Meyer J, Hubner K, Bernemann C, Ortmeier C, Zenke M, Fleischmann BK, Zaehres H and Scholer HR (2009b) *Oct4*-induced pluripotency in adult neural stem cells. *Cell* 136:411-9.

Kleger A, Mahaddalkar PU, Katz SF, Lechel A, Joo JY, Loya K, Lin Q, Hartmann D, Liebau S, Kraus JM, Cantz T, Kestler HA, Zaehres H, Scholer H and Rudolph KL (2012) Increased reprogramming capacity of mouse liver progenitor cells, compared with differentiated liver cells, requires the BAF complex. *Gastroenterology* 142:907-17.

Kotin RM (2011) Large-scale recombinant adeno-associated virus production. *Hum Mol Genet* 20:R2-6.

Krabbe C, Zimmer J and Meyer M (2005) Neural transdifferentiation of mesenchymal stem cells--a critical review. *APMIS* 113:831-44.

Lee G and Studer L (2011) Modelling familial dysautonomia in human induced pluripotent stem cells. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 366:2286-96.

Lenz G (2010) Transient oncogenes. *Med Hypotheses* 75:660-2.

Li G, Zhang XA, Wang H, Wang X, Meng CL, Chan CY, Yew DT, Tsang KS, Li K, Tsai SN, Ngai SM, Han ZC, Lin MC, He ML and Kung HF (2009a) Comparative proteomic analysis of mesenchymal stem cells derived from human bone marrow, umbilical cord, and placenta: implication in the migration. *Proteomics* 9:20-30.

Li H, Collado M, Villasante A, Strati K, Ortega S, Canamero M, Blasco MA and Serrano M (2009b) The Ink4/Arf locus is a barrier for iPS cell reprogramming. *Nature* 460:1136-9.

Li M, Jayandharan GR, Li B, Ling C, Ma W, Srivastava A and Zhong L (2010) High-efficiency transduction of fibroblasts and mesenchymal stem cells by tyrosine-mutant AAV2 vectors for their potential use in cellular therapy. *Hum Gene Ther* 21:1527-43.

Liang G, Taranova O, Xia K and Zhang Y (2010) Butyrate promotes induced pluripotent stem cell generation. *J Biol Chem* 285:25516-21.

Liao J, Wu Z, Wang Y, Cheng L, Cui C, Gao Y, Chen T, Rao L, Chen S, Jia N, Dai H, Xin S, Kang J, Pei G and Xiao L (2008) Enhanced efficiency of generating induced pluripotent stem (iPS) cells from human somatic cells by a combination of six transcription factors. *Cell Res* 18:600-3.

Liu H, Ye Z, Kim Y, Sharkis S and Jang YY (2010) Generation of endoderm-derived human induced pluripotent stem cells from primary hepatocytes. *Hepatology* 51:1810-9.

Liu TM, Wu YN, Guo XM, Hui JH, Lee EH and Lim B (2009) Effects of ectopic *Nanog* and *Oct4* overexpression on mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev* 18:1013-22.

Liu XH, Bai CG, Xu ZY, Huang SD, Yuan Y, Gong DJ and Zhang JR (2008) Therapeutic potential of angiogenin modified mesenchymal stem cells: angiogenin improves mesenchymal stem cells survival under hypoxia and enhances vasculogenesis in myocardial infarction. *Microvasc Res* 76:23-30.

Locke M, Ussher JE, Mistry R, Taylor JA and Dunbar PR (2011) Transduction of human adipose-derived mesenchymal stem cells by recombinant adeno-associated virus vectors. *Tissue Eng Part C Methods* 17:949-59.

Lv H, Zhang S, Wang B, Cui S and Yan J (2006) Toxicity of cationic lipids and cationic polymers in gene delivery. *J Control Release* 114:100-109.

Madeira C, Mendes RD, Ribeiro SC, Boura JS, Aires-Barros MR, da Silva CL and Cabral JM (2010) Nonviral gene delivery to mesenchymal stem cells using cationic liposomes for gene and cell therapy. *J Biomed Biotechnol* 2010:735349.

Mallanna SK and Rizzino (2010) A Emerging roles of microRNAs in the control of embryonic stem cells and the generation of induced pluripotent stem cells. *Dev Biol* 344:16-25.

Marion RM, Strati K, Li H, Murga M, Blanco R, Ortega S, Fernandez-Capetillo O, Serrano M and Blasco MA (2009) A p53-mediated DNA damage response limits reprogramming to ensure iPS cell genomic integrity. *Nature* 460:1149-53.

Martin GR (1981) Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78:7634-8.

McMahon JM, Conroy S, Lyons M, Greiser U, O'Shea C, Strappe P, Howard L, Murphy M, Barry F and O'Brien T (2006) Gene transfer into rat mesenchymal

stem cells: a comparative study of viral and nonviral vectors. *Stem Cells Dev* 15:87-96.

Meirelles Lda S and Nardi NB (2003) Murine marrow-derived mesenchymal stem cell: isolation, in vitro expansion, and characterization. *Br J Haematol* 123:702-11.

Meyerrose TE, Roberts M, Ohlemiller KK, Vogler CA, Wirthlin L, Nolte JA and Sands MS (2008) Lentiviral-transduced human mesenchymal stem cells persistently express therapeutic levels of enzyme in a xenotransplantation model of human disease. *Stem Cells* 26:1713-22.

Miura K, Okada Y, Aoi T, Okada A, Takahashi K, Okita K, Nakagawa M, Koyanagi M, Tanabe K, Ohnuki M, Ogawa D, Ikeda E, Okano H and Yamanaka S (2009) Variation in the safety of induced pluripotent stem cell lines. *Nat Biotechnol* 27:743-5.

Mizuno Y, Chang H, Umeda K, Niwa A, Iwasa T, Awaya T, Fukada S, Yamamoto H, Yamanaka S, Nakahata T and Heike T (2010) Generation of skeletal muscle stem/progenitor cells from murine induced pluripotent stem cells. *FASEB J* 24:2245-53.

Narsinh KH, Jia F, Robbins RC, Kay MA, Longaker MT and Wu JC (2011) Generation of adult human induced pluripotent stem cells using nonviral minicircle DNA vectors. *Nat Protoc* 6:78-88.

Niibe K, Kawamura Y, Araki D, Morikawa S, Miura K, Suzuki S, Shimmura S, Sunabori T, Mabuchi Y, Nagai Y, Nakagawa T, Okano H and Matsuzaki Y (2010) Purified mesenchymal stem cells are an efficient source for iPS cell induction. *PLoS One* 6:e17610.

Niyibizi C, Wang S, Mi Z and Robbins PD (2004) The fate of mesenchymal stem cells transplanted into immunocompetent neonatal mice: implications for skeletal gene therapy via stem cells. *Mol Ther* 9:955-63.

Noel D, Caton D, Roche S, Bony C, Lehmann S, Casteilla L, Jorgensen C and Cousin B (2008) Cell specific differences between human adipose-derived and mesenchymal-stromal cells despite similar differentiation potentials. *Exp Cell Res* 314:1575-84.

Noiseux N, Gneccchi M, Lopez-Illasaca M, Zhang L, Solomon SD, Deb A, Dzau VJ and Pratt RE (2006) Mesenchymal stem cells overexpressing Akt dramatically repair infarcted myocardium and improve cardiac function despite infrequent cellular fusion or differentiation. *Mol Ther* 14:840-50.

Ohta S, Imaizumi Y, Okada Y, Akamatsu W, Kuwahara R, Ohyama M, Amagai M, Matsuzaki Y, Yamanaka S, Okano H and Kawakami Y (2011) Generation of human melanocytes from induced pluripotent stem cells. *PLoS One* 6:e16182.

Omlor GW, Bertram H, Kleinschmidt K, Fischer J, Brohm K, Guehring T, Anton M and Richter W (2010) Methods to monitor distribution and metabolic activity of mesenchymal stem cells following in vivo injection into nucleotomized porcine intervertebral discs. *Eur Spine J* 19:601-12.

Ozawa K, Sato K, Oh I, Ozaki K, Uchibori R, Obara Y, Kikuchi Y, Ito T, Okada T, Urabe M, Mizukami H and Kume A (2008) Cell and gene therapy using mesenchymal stem cells (*MSCs*). *J Autoimmun* 30:121-7.

Palmer GD, Steinert A, Pascher A, Gouze E, Gouze JN, Betz O, Johnstone B, Evans CH and Ghivizzani SC (2005) Gene-induced chondrogenesis of primary mesenchymal stem cells in vitro. *Mol Ther* 12:219-28.

Papapetrou EP, Tomishima MJ, Chambers SM, Mica Y, Reed E, Menon J, Tabar V, Mo Q, Studer L and Sadelain M (2009) Stoichiometric and temporal requirements of *Oct4*, *Sox2*, *Klf4*, and *c-Myc* expression for efficient human iPSC induction and differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:12759-64.

Park IH, Zhao R, West JA, Yabuuchi A, Huo H, Ince TA, Lerou PH, Lensch MW and Daley GQ (2008) Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. *Nature* 451:141-6.

Park JH, Daheron L, Kantarci S, Lee BS and Teixeira JM (2011) Human endometrial cells express elevated levels of pluripotent factors and are more amenable to reprogramming into induced pluripotent stem cells. *Endocrinology* 152:1080-9.

Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S and Marshak DR (1999) Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284:143-7.

Plath K and Lowry WE (2011) Progress in understanding reprogramming to the induced pluripotent state. *Nat Rev Genet* 12:253-65.

Polo JM, Liu S, Figueroa ME, Kulalert W, Eminli S, Tan KY, Apostolou E, Stadtfeld M, Li Y, Shioda T, Natesan S, Wagers AJ, Melnick A, Evans T and Hochedlinger K (2010) Cell type of origin influences the molecular and functional properties of mouse induced pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol* 28:848-55.

Potta SP, Sheng X, Gaspar JA, Meganathan K, Jagtap S, Pfannkuche K, Winkler J, Hescheler J, Papadopoulos S and Sachinidis (2012) A Functional characterization and gene expression profiling of alpha-smooth muscle actin expressing cardiomyocytes derived from murine induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Rev* 8:229-42.

Pouya A, Satarian L, Kiani S, Javan M and Baharvand H (2011) Human induced pluripotent stem cells differentiation into oligodendrocyte progenitors and transplantation in a rat model of optic chiasm demyelination. *PLoS One* 6:e27925.

Ren C, Kumar S, Chanda D, Kallman L, Chen J, Mountz JD and Ponnazhagan S (2008) Cancer gene therapy using mesenchymal stem cells expressing interferon-beta in a mouse prostate cancer lung metastasis model. *Gene Ther* 15:1446-53.



Ricks DM, Kutner R, Zhang XY, Welsh DA and Reiser J (2008) Optimized lentiviral transduction of mouse bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev* 17:441-50.

Rios HF, Lin Z, Oh B, Park CH and Giannobile WV (2011) Cell- and gene-based therapeutic strategies for periodontal regenerative medicine. *J Periodontol* 82:1223-37.

Ruiz S, Brennand K, Panopoulos AD, Herrerias A, Gage FH and Izpisua-Belmonte JC (2010) High-efficient generation of induced pluripotent stem cells from human astrocytes. *PLoS One* 5:e15526.

Soldner F, Hockemeyer D, Beard C, Gao Q, Bell GW, Cook EG, Hargus G, Blak A, Cooper O, Mitalipova M, Isacson O and Jaenisch R (2009) Parkinson's disease patient-derived induced pluripotent stem cells free of viral reprogramming factors. *Cell* 136:964-77.

Sommer CA, Sommer AG, Longmire TA, Christodoulou C, Thomas DD, Gostissa M, Alt FW, Murphy GJ, Kotton DN and Mostoslavsky G (2010) Excision of reprogramming transgenes improves the differentiation potential of iPS cells generated with a single excisable vector. *Stem Cells* 28:64-74.

Son EY, Ichida JK, Wainger BJ, Toma JS, Rafuse VF, Woolf CJ and Eggan K (2010) Conversion of mouse and human fibroblasts into functional spinal motor neurons. *Cell Stem Cell* 9:205-18.

Spaeth E, Klopp A, Dembinski J, Andreeff M and Marini F (2008) Inflammation and tumor microenvironments: defining the migratory itinerary of mesenchymal stem cells. *Gene Ther* 15:730-8.

Stender S, Murphy M, O'Brien T, Stengaard C, Ulrich-Vinther M, Soballe K and Barry F (2007) Adeno-associated viral vector transduction of human mesenchymal stem cells. *Eur Cell Mater* 13:93-9; discussion 99.

Subramanyam D and Blelloch R (2011) From microRNAs to targets: pathway discovery in cell fate transitions. *Curr Opin Genet Dev* 21:498-503.

Subramanyam D, Lamouille S, Judson RL, Liu JY, Bucay N, Derynck R and Blaloch R (2011) Multiple targets of miR-302 and miR-372 promote reprogramming of human fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol* 29:443-8.

Sugii S, Kida Y, Berggren WT and Evans RM (2011) Feeder-dependent and feeder-independent iPS cell derivation from human and mouse adipose stem cells. *Nat Protoc* 6:346-58.

Sun N, Panetta NJ, Gupta DM, Wilson KD, Lee A, Jia F, Hu S, Cherry AM, Robbins RC, Longaker MT and Wu JC (2009) Feeder-free derivation of induced pluripotent stem cells from adult human adipose stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:15720-5.

Swenson ES (2012) Direct conversion of mouse fibroblasts to hepatocyte-like cells using forced expression of endodermal transcription factors. *Hepatology* 55:316-8.

Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K and Yamanaka S (2007) Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131:861-72.

Takahashi K and Yamanaka S (2006) Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126:663-76.

Tat PA, Sumer H, Jones KL, Upton K and Verma PJ (2010) The efficient generation of induced pluripotent stem (iPS) cells from adult mouse adipose tissue-derived and neural stem cells. *Cell Transplant* 19:525-36.

Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS and Jones JM (1998) Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282:1145-7.

Tiemann U, Sgodda M, Warlich E, Ballmaier M, Scholer HR, Schambach A and Cantz T (2011) Optimal reprogramming factor stoichiometry increases colony

numbers and affects molecular characteristics of murine induced pluripotent stem cells. *Cytometry A* 79:426-35.

Togel F, Weiss K, Yang Y, Hu Z, Zhang P and Westenfelder C (2007) Vasculotropic, paracrine actions of infused mesenchymal stem cells are important to the recovery from acute kidney injury. *Am J Physiol Renal Physiol* 292:F1626-35.

Tsuda H, Wada T, Ito Y, Uchida H, Dehari H, Nakamura K, Sasaki K, Kobune M, Yamashita T and Hamada H (2003) Efficient BMP2 gene transfer and bone formation of mesenchymal stem cells by a fiber-mutant adenoviral vector. *Mol Ther* 7:354-65.

Tumbar T, Guasch G, Greco V, Blanpain C, Lowry WE, Rendl M and Fuchs E (2004) Defining the epithelial stem cell niche in skin. *Science* 303:359-63.

Utikal J, Polo JM, Stadtfeld M, Maherali N, Kulalert W, Walsh RM, Khalil A, Rheinwald JG and Hochedlinger K (2009) Immortalization eliminates a roadblock during cellular reprogramming into iPS cells. *Nature* 460:1145-8.

Viero Nora CC, Camassola M, Bellagamba B, Ikuta N, Christoff AP, Meirelles LD, Ayres R, Margis R and Nardi NB (2011) Molecular Analysis of the Differentiation Potential of Murine Mesenchymal Stem Cells from Tissues of Endodermal or Mesodermal Origin. *Stem Cells Dev.*

Wada H, Kojo S, Kusama C, Okamoto N, Sato Y, Ishizuka B and Seino K (2011) Successful differentiation to T cells, but unsuccessful B-cell generation, from B-cell-derived induced pluripotent stem cells. *Int Immunol* 23:65-74.

Warren L, Manos PD, Ahfeldt T, Loh YH, Li H, Lau F, Ebina W, Mandal PK, Smith ZD, Meissner A, Daley GQ, Brack AS, Collins JJ, Cowan C, Schlaeger TM and Rossi DJ (2010) Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA. *Cell Stem Cell* 7:618-30.

Watt FM and Hogan BL (2000) Out of Eden: stem cells and their niches. *Science* 287:1427-30.

Yalvac ME, Ramazanoglu M, Gumru OZ, Sahin F, Palotas A and Rizvanov AA (2009) Comparison and optimisation of transfection of human dental follicle cells, a novel source of stem cells, with different chemical methods and electro-poration. *Neurochem Res* 34:1272-7.

Yan X, Qin H, Qu C, Tuan RS, Shi S and Huang GT (2010) iPS cells reprogrammed from human mesenchymal-like stem/progenitor cells of dental tissue origin. *Stem Cells Dev* 19:469-80.

Yang F, Green JJ, Dinio T, Keung L, Cho SW, Park H, Langer R and Anderson DG (2009) Gene delivery to human adult and embryonic cell-derived stem cells using biodegradable nanoparticulate polymeric vectors. *Gene Ther* 16:533-46.

Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, Nie J, Jonsdottir GA, Ruotti V, Stewart R, Slukvin, II and Thomson JA (2007) Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 318:1917-20.

Yusa K, Rad R, Takeda J and Bradley A (2009) Generation of transgene-free induced pluripotent mouse stem cells by the piggyBac transposon. *Nat Methods* 6:363-9.

Zachos T, Diggs A, Weisbrode S, Bartlett J and Bertone A (2007) Mesenchymal stem cell-mediated gene delivery of bone morphogenetic protein-2 in an articular fracture model. *Mol Ther* 15:1543-50.

Zhou W and Freed CR (2009) Adenoviral gene delivery can reprogram human fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Stem Cells* 27:2667-74.

## **Anexo: Mesenchymal stem cell as a platform for gene therapy protocols**