

UNIVERSIDADE DO GRANDE RIO PROFESSOR JOSÉ DE SOUZA HERDY



DÉBORA ALVES COMUNE

**CARACTERIZAÇÃO DA PLURIPOTÊNCIA DE CÉLULAS-TRONCO DE
PLURIPOTÊNCIA INDUZIDA HUMANAS PARA APLICAÇÃO NA
BIOENGENHARIA DE TECIDOS HEPÁTICOS**

Duque de Caxias, RJ - Brasil

2025

DÉBORA ALVES COMUNE

**CARACTERIZAÇÃO DA PLURIPOTÊNCIA DE CÉLULAS-TRONCO DE
PLURIPOTÊNCIA INDUZIDA HUMANAS PARA APLICAÇÃO NA
BIOENGENHARIA DE TECIDOS HEPÁTICOS**

Trabalho de conclusão de curso apresentado como
requisito para aprovação na disciplina de Trabalho
de Conclusão do Curso de Biomedicina da
Universidade do Grande Rio (UNIGRANRIO).

Orientadora: M.e. Julia Helena Oliveira de Barros

Duque de Caxias, RJ – Brasil

2025

DÉBORA ALVES COMUNE

**CARACTERIZAÇÃO DA PLURIPOTENCIA DE CÉLULAS-TRONCO DE
PLURIPOTÊNCIA INDUZIDA HUMANAS PARA A APLICAÇÃO NA
BIOENGENHARIA DE TECIDOS**

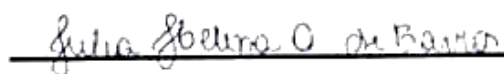
Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Universidade do Grande Rio "Prof. José de Souza
Herdy", como requisito parcial para a obtenção do título
de Bacharel em Biomedicina.

Orientadora: M.e. Julia Helena Oliveira de Barros

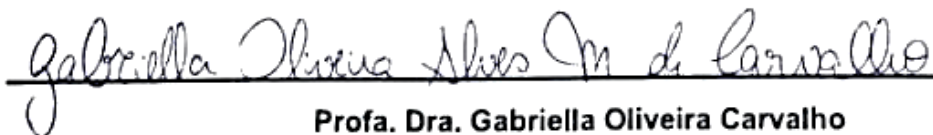
Aprovada em:

Duque de Caxias, 13 de novembro de 2025.

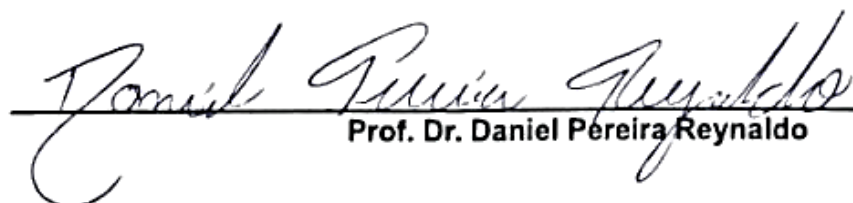
BANCA EXAMINADORA



M.e. Julia Helena Oliveira de Barros



Profa. Dra. Gabriella Oliveira Carvalho



Prof. Dr. Daniel Pereira Reynaldo

Dedico este trabalho aos meus pais, filhas e neta.

AGRADECIMENTOS

Confesso que este momento me fez refletir. Entendi ser impossível mensurar em palavras a gratidão que tenho por tanto. Mas como dizia meu avô Eliseu Comune: - comece do começo! Sendo assim, começo dizendo que realizo neste momento um sonho meu, o de ser a primeira filha bacharel dos meus pais que não viveram o suficiente para me ver com o diploma na mão. Amado pai Hércules Tadeu Comune e amada mãe Márcia Alves da Cunha, de onde vocês estiverem, saibam que dedico essa conquista a vocês. Agradeço ao universo e as forças superiores divinas que regem meus caminhos pela fé inabalável que me mantiveram de pé e com dignidade. Agradeço as minhas quatro filhas Rafaely, Maytê, Maria Flor e Maria Liz por terem sido as minhas maiores incentivadoras no decorrer do meu processo de aprendizado, por repetirem incansavelmente o quanto se orgulhavam de mim, por me fazerem de exemplo a ser seguido apesar dos erros decorrentes das tentativas de acerto, por entenderem os momentos de ausência que se fizeram necessários no decorrer destes quatro anos. Agradeço a minha neta Cecília por ter chegado feito um furacão em nossas vidas e me enchido de alegria, amor e esperança. Vovó ama tanto que chega a doer meu coração. A coragem que me move vem da existência de vocês. Agradeço ao meu parceiro de vida Yckaro, por todas as vezes que segurou nas minhas mãos, e principalmente, por nunca te-las soltado. Por todo o apoio “tecnológico” (risos) na execução dos meus trabalhos acadêmicos, pela escuta, compreensão e carinho. Agradeço aos professores Luís Hendrichsky, Felipe Tsuruta, Raphael Rangel, Cícero, Carlos Eduardo, Lucas Coutinho, Carol Mendes, Hury Hellen, César Carriço, Thuany, Natália Cordeiro, Fábio Câmara, Luan Fernandes, Giselle Fagundes, Gabriela Oliveira Carvalho, Raquel Chaves, Daniel Reynaldo, Julia Lourenço, Marcella Bandeira por compartilharem conhecimento com tanta responsabilidade, profundidade, seriedade e sabedoria. Vocês são incríveis e admiráveis! Agradeço as minhas primeiras orientadoras Renata Travassos e Isalira Ramos por terem aberto as portas da UFRJ. Foi neste momento, em julho de 2022, que descobri o universo da pesquisa científica. Agradeço aos meus colegas de laboratório do CPMP Thayane, Gustavo, Keyla, Ana, Ana Beatriz, Ana Célia, Michele, Cleusa, Alberto, Gabriel Souza pela parceria, amizade e conselhos. Agradeço ao Grupo de Estudos do Fígado, do qual faço parte a quase 3 anos, por todas as oportunidades e desafios, e seus integrantes professora

Regina, professor Marlon, Érica e Cibele. Agradeço a Gabriela Fraga pela parceria, por todos os protocolos compartilhados, por todas as vezes que não mediu esforços para me ajudar sempre que precisei, pelas boas risadas e pela “fosforilação” utilizada na complexidade das discussões quando precisávamos de conclusões (risos). Agradeço ao Lucas Guarnier da USP/GEF, o paulista mato-grossense biotecnologista mais gente boa que já conheci na vida. Você tornou os meus últimos três semestres mais leves e divertidos. Agradeço a Nathalia Ferrari do LCCM, a carioca, flamenguista, biotecnologista, a mais gentil e dona de uma risada faraônica, por ter me apresentado o mundo das células-tronco. E por fim, entre lágrimas, sorrisos, lembranças, saudades e reflexões, eu quero agradecer de todo coração a minha orientadora, que já foi coorientadora e que agora chamo de parceira, Julia Helena, por toda a responsabilidade, paciência, teimosia, rigidez e confiança que compartilhou comigo nesses últimos 3 anos. Por todos os ensinamentos, puxões de orelha, surtos e gargalhadas, por todos os experimentos realizados com “emoção” (risos), pelas oportunidades únicas, pelos desafios impostos, por nunca ter duvidado da minha capacidade e integridade, por ter acreditado em mim mais do que eu mesma, por ter me escolhido como IC, por me defender, por ter deixado as portas abertas todas as vezes que eu quis trilhar novos horizontes, e por me avisar que eu ia quebrar a cara (muitos risos), e me receber de braços abertos todas as vezes que eu quis voltar. Por vezes eu precisei ir embora, apenas para entender, que aqui é meu lugar, aprendendo todos os dias com a sua força e a sua forma inteligente de lidar com as dificuldades. Você é Luz, Julele!

A todos, que não me deixaram desistir, minha eterna gratidão.

“O que a vida quer da gente é Coragem”

João Guimarães Rosa

RESUMO

As iPSC são células somáticas adultas que foram geneticamente reprogramadas para retornar a um estado pluripotente, semelhante ao das células-tronco embrionárias. A pluripotência é a capacidade da célula de se autorrenovar indefinidamente e se diferenciar nos tipos celulares dos três folhetos embrionários ectoderma, mesoderma e endoderma. A caracterização da pluripotência consiste na confirmação de que uma célula reprogramada atingiu o estado de pluripotência. Este estudo visa utilizar a tecnologia das iPSC como uma alternativa para pacientes com graves doenças hepáticas crônicas onde o único tratamento é o transplante. A realização da caracterização ocorre por meio de vários ensaios de caracterização. Neste estudo utilizou-se o RT-PCR, imunofluorescência, citometria de fluxo e diferenciação espontânea. Inicialmente as iPSC foram descongeladas, expandidas e após alcançarem a confluência de 80% as células foram processadas para a execução das análises. O RT-PCR foi realizado para comprovar a ausência dos transcritos virais do Sendai SeV, KOS, KLF4 e c-Myc utilizados na reprogramação da população de eritroblastos oriundos das células mononucleares do sangue periférico isoladas das amostras do Pac 48. Em seguida, foi analisada a expressão dos transcritos relacionados a pluripotência DMNT3B, DPPA4, KLF4, LIN28, NANOG, NODAL, OCT3/4, REX1 e SOX2. Confirmando os resultados do RT-PCR, o ensaio de imunofluorescência foi realizado para identificar a expressão de proteínas, foram usados os marcadores intracelulares OCT3/4, SOX2 e NANOG, e os marcadores de superfície SSEA4 e TRA1-81. Adicionalmente foi realizada a análise quantitativa por citometria de fluxo para identificar a expressão dos marcadores intracelulares OCT3/4, SOX2, NANOG, e os marcadores de superfície SSEA4 e TRA1-60. Por fim, foi realizado o ensaio de diferenciação espontânea onde foi identificada a expressão dos três folhetos embrionários utilizando os marcadores HNF4 para endoderma, Brachyury para mesoderma e Nestina para ectoderma. Concluiu-se com eficiência a caracterização da pluripotência da iPSC Pac 48. Foi utilizado um compilado de técnicas de caracterização neste estudo, possibilitando o desenvolvimento de uma ferramenta poderosa e fundamentada por achados de outros autores e colaboradores descritos na literatura.

Palavras-chave: células-tronco de pluripotência induzida humanas, caracterização de pluripotência, bioengenharia de tecidos hepáticos.

ABSTRACT

iPSC are adult somatic cells that have been genetically reprogrammed to revert to a pluripotent state, similar to that of embryonic stem cells. Pluripotency is the cell's ability to self-renew indefinitely and differentiate into the cell types of the three embryonic germ layers: ectoderm, mesoderm, and endoderm. Pluripotency characterization consists of confirming that a reprogrammed cell has reached the pluripotent state. This study aims to use iPSC technology as an alternative for patients with severe chronic liver diseases where the only treatment is transplantation. The characterization is performed through various characterization assays. In this study, RT-PCR, immunofluorescence, flow cytometry, and spontaneous differentiation were used. Initially, the iPSCs were thawed and expanded, and after reaching 80% confluence, the cells were processed for the analyses. RT-PCR was performed to confirm the absence of the viral transcripts of Sendai SeV, KOS, KLF4, and c-Myc used in the reprogramming of the erythroblast population derived from peripheral blood mononuclear cells isolated from the Pac 48 samples. Subsequently, the expression of the pluripotency-related transcripts DMNT3B, DPPA4, KLF4, LIN28, NANOG, NODAL, OCT3/4, REX1, and SOX2 was analyzed. Corroborating the RT-PCR results, the immunofluorescence assay was performed to identify protein expression, using the intracellular markers OCT3/4, SOX2, and NANOG, and the surface markers SSEA4 and TRA1-81. Additionally, a quantitative analysis by flow cytometry was performed to identify the expression of the intracellular markers OCT3/4, SOX2, NANOG, and the surface markers SSEA4 and TRA1-60. Finally, the spontaneous differentiation assay was performed, where the expression of the three embryonic germ layers was identified using the markers HNF4 for endoderm, Brachyury for mesoderm, and Nestin for ectoderm. The pluripotency characterization of the Pac 48 iPSC was concluded efficiently. A compilation of characterization techniques was used in this study, enabling the development of a powerful tool substantiated by the findings of other authors and collaborators described in the literature.

Keywords: human induced pluripotent stem cells, pluripotency characterization, tissue bioengineering.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Lista de Figuras

Figura 1 –	Imagem representativa do processo de descelularização e recelularização de órgãos.....	20
Figura 2 –	Imagem ilustrativa dos reguladores de transcrição OSKM.....	26
Figura 3 –	Imagem ilustrativa da aplicação e das técnicas de reprogramação da iPSC.....	29
Figura 4 –	Esquema representativo das etapas do desenho experimental.....	34
Figura 5 –	Fluxograma do protocolo de diferenciação espontânea das iPSC Pac 48.....	41
Figura 6 –	Morfologia da iPSC Pac 48.....	44
Figura 7 –	Painel do resultado da avaliação da presença de transcritos virais por RT-PCR.....	45
Figura 8 –	Painel de resultado da caracterização da pluripotência da iPSC Pac 48 por RT-PCR.....	46
Figura 9 –	Avaliação da expressão de proteínas relacionadas a pluripotência por imunofluorescência.....	48
Figura 10 –	Avaliação da expressão de proteínas de pluripotência por citometria de fluxo.....	49
Figura 11 –	Imagens representativas da alteração na morfologia da iPSC no decorrer do protocolo de diferenciação espontânea.....	50
Figura 12 –	Avaliação de diferenciação espontânea da iPSC Pac 48 por imunofluorescência.....	51

Lista de Tabelas

Tabela 1 –	Lista dos genes e das sequências dos primers utilizados no RT-PCR para a caracterização da pluripotência.....	37
Tabela 2 –	Lista de anticorpos primários e secundários utilizados no ensaio de Imunofluorescência para caracterização da pluripotência das iPSC Pac 48.....	39
Tabela 3 –	Lista dos anticorpos de superfície e intracelulares utilizados na citometria de fluxo para a caracterização da pluripotência da iPSC Pac 48.....	40
Tabela 4 –	Lista dos anticorpos primários e secundários que foram usados no ensaio de imunofluorescência da diferenciação espontânea....	43
Tabela 5 –	Lista de características dos genes e marcadores da pluripotência utilizados neste estudo.....	57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- BMP4 – Proteína morfogenética óssea tipo 4 (do inglês *Bone morphogenetic protein* 4)
- BSA – Albumina sérica bovina (do inglês *Bovine Serum Albumin*)
- Cat – Catálogo
- cDNA – DNA complementar
- CHC - Carcinoma hepatocelular
- Cl3 - Clone 3
- D(X) – Dia (X) de diferenciação
- DAPI - 4',6-diamidino-2-fenilindol
- DMEM – Meio Eagle modificado por Dulbecco (do inglês *Dulbecco's Modified Eagle Medium*)
- DMSO – Dimetilsulfóxido
- EB – Corpos Embrionários (do inglês *Embryoid Bodies*)
- EPO - Eritropoietina
- ESC - Células-tronco embrionárias (do inglês *Embryonic Stem Cells*)
- FVS – Fixable Viability Stain
- GCP - Glicoproteína de superfície celular
- GAPDH – Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
- H&E - Hematoxilina e Eosina
- iMEF - fibroblastos embrionários murinos inativados (do inglês *Irradiated Mouse Embryonic Fibroblasts*)
- iPSC - Células-tronco de pluripotência induzida (do inglês *Induced Pluripotent Stem Cell*)
- iROCK - Inibidor de quinase-rho (do inglês *rho-kinase inhibitor*)
- LME - Lesão medular espinhal
- MASH - Esteatohepatite associada à disfunção metabólica (do inglês *Metabolic Dysfunction-Associated SteatoHepatitis*)
- MASLD - Doença hepática esteatótica associada à disfunção metabólica (do inglês *Metabolic Dysfunction-Associated Steatotic Liver Disease*)
- MEC - Matriz extracelular
- P10+7 - Passagem 10+7

PBMC - Células mononucleares do sangue periférico (do inglês *Peripheral Blood Mononuclear Cell*)

PBS – Solução salina tamponada com fosfato (do inglês *Phosphate Buffered Saline*)

PCR – Reação em cadeia da polimerase (do inglês *Polymerase Chain Reaction*)

PFA – Paraformaldeído

PODXL -Podocalixina

P/S – Penicilina/Estreptomicina

RNA – Ácido ribonucleico (do inglês *Ribonucleic Acid*)

RNA_m – RNA mensageiro

RT-PCR – Transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase (do inglês *Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction*)

SAP – Fator de fixação de arcabouço (do inglês *Scaffold-Attachment Factor*)

SDS - Dodecil sulfato de sódio (do inglês *Sodium Dodecyl Sulfate*)

SFB – Soro Fetal Bovino

TGF- β – Fator de crescimento transformante β

TNSC - transferência nuclear de células somáticas (do inglês *Somatic Cell Nuclear Transfer*)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	17
1.1	Fígado e doenças hepáticas.....	17
1.2	Bioengenharia de tecidos.....	18
1.2.1	Utilização da bioengenharia de tecidos na clínica em doenças hepáticas.....	19
1.2.2	Avanços na bioengenharia de tecidos na clínica em doenças hepáticas.....	20
1.3	Células-tronco de pluripotência induzida humanas (iPSC).....	23
1.3.1	Contexto histórico e propriedades das iPSC.....	23
1.3.2	Processo de reprogramação das iPSC.....	25
1.3.3	Aplicação das iPSC.....	26
2	JUSTIFICATIVA.....	29
3	OBJETIVO.....	30
3.1	OBJETIVO GERAL.....	30
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	30
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
4.1	Linhagem de iPSC do estudo.....	33
4.2	Manutenção e expansão da iPSC Pac 48.....	33
4.3	Avaliação da presença do vetor viral Sendai por RT-PCR da iPSC Pac 48...	34
4.4	Caracterização da pluripotência por RT-PCR da iPSC Pac 48.....	35
4.5	Caracterização da pluripotência por imunofluorescência da iPSC Pac 48...	36
4.6	Caracterização da pluripotência por citometria de fluxo da iPSC Pac 48.....	38
4.7	Caracterização da pluripotência da iPSC Pac 48 por ensaio de diferenciação espontânea.....	39
5	RESULTADOS.....	43
5.1	Morfologia da iPSC Pac 48.....	43
5.2	Avaliação da presença do vetor viral Sendai da iPSC Pac 48 por RT-PCR...	44
5.3	Caracterização da pluripotência da iPSC Pac 48 por RTR-PCR.....	45
5.4	Caracterização da pluripotência da iPSC Pac 48 por imunofluorescência....	46
5.5	Caracterização da pluripotência da iPSC Pac 48 por citometria de fluxo.....	48

5.6	Caracterização da pluripotência da iPSC Pac 48 por diferenciação espontânea.....	48
6	DISCUSSÃO.....	51
7	CONCLUSÃO.....	60
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	61

1 INTRODUÇÃO

1.1 Fígado e doenças hepáticas

O fígado é um órgão fundamental para a manutenção da homeostase do corpo humano. Este órgão, que desempenha funções imunológicas e metabólicas essenciais para o desenvolvimento do corpo, é predominantemente formado por células hexagonais conhecidas como hepatócitos, as quais exibem um domínio apical e basal repleto de organelas intracelulares (Junqueira e Carneiro, 2023).

Apesar de ser o segundo maior órgão do corpo e possuir uma imensa capacidade regenerativa, lesões graves podem comprometer significativamente sua funcionalidade e habilidade de recuperação. Muitos fatores, como o consumo excessivo de bebidas alcoólicas, uso de drogas, o aumento da obesidade, diabetes tipo 2, infecções causadas pelos vírus da hepatite B e C e fatores genéticos podem progredir para o quadro de fibrose e afetar este órgão (Ginès, *et al.*, 2021).

A fibrose é o primeiro sinal de que a lesão está se tornando grave, em estágios iniciais de fibrose leve a moderada, existe a possibilidade de tratamento onde o processo é constantemente reversível, já a cirrose é a fase avançada e grave da fibrose, neste estágio o tecido cicatricial se espalha e forma nódulos que causam um dano estrutural e funcional permanente no fígado, onde o tecido fibrosado não consegue realizar as funções normais do órgão como a produção de proteínas e desintoxicação, resultando no bloqueio do fluxo sanguíneo e causando a hipertensão portal (Ginès, *et al.*, 2021).

O carcinoma hepatocelular (CHC) em 80% a 90% dos casos, é decorrente de complicações da cirrose. Os danos causados pela inflamação crônica e a tentativa de regeneração celular forçada no fígado cirrótico pode causar erros genéticos originando mutações que as tornam cancerosas (Roehlen, *et al.*, 2020).

Sendo assim, lesões provocadas por esses fatores podem ser irreversíveis, sendo, atualmente, o transplante de fígado o único tratamento definitivo para doenças crônicas hepáticas avançadas (Roehlen, *et al.*, 2020). No entanto, a quantidade, disponibilidade e viabilidade são reduzidas o que torna alternativas para essa escassez imprescindíveis (Ginès, *et al.*, 2021). Nesse sentido, a medicina regenerativa, que é constantemente usada como sinônimo de bioengenharia de

tecidos ou tecidual em modelos com uso de células-tronco como fonte celular, surge como uma alternativa promissora para pacientes que convivem com doenças hepáticas graves que possuem como única alternativa o transplante de fígado (Berthiaume, *et al.*, 2011).

1.2 Bioengenharia de tecidos

A bioengenharia de tecidos consiste na substituição de células, tecidos ou órgãos humanos com objetivo de restaurar a função normal de um órgão ou tecido que foi danificado por diversos fatores, como envelhecimento, estilo de vida e possíveis deficiências congênitas (Dias, *et al.*, 2022).

A bioengenharia de tecidos envolve alguns aspectos, como a junção de células e fatores de crescimento, a produção de biomateriais possibilitando a criação de máquinas de perfusão de órgãos, técnicas de bioimpressão 3D, geração de organóides, o desenvolvimento de moléculas eletivas para fatores de crescimento, produção de órgãos em um chip por meio de microfluídica para testes de medicamentos e a criação de matriz extracelular como uma estrutura de órgãos abrangendo técnicas de descelularização (Dias, *et al.*, 2022).

Estudos recentes descritos na literatura por Telles-Silva, 2023; Nair, 2023 e Zhang, 2024 relacionados a fisiologia hepática, biologia molecular, células-tronco e matriz extracelular têm evidenciado o desenvolvimento da bioengenharia de tecidos demonstrando um avanço importante nessa área da ciência. Os avanços neste setor proporcionaram o desenvolvimento de técnicas para a geração de órgãos bioartificiais com potenciais aplicações na medicina regenerativa (Zhang, *et al.*, 2023). Destaca-se como estratégia da bioengenharia tecidual o estudo de arcabouços hepáticos baseados em matriz extracelular que vem sendo amplamente aplicado na medicina regenerativa, sugerindo que o transplante de arcabouço hepático pode auxiliar no restabelecimento da função hepática, o que representa um grande potencial como tratamento para pacientes com doença hepática (Dias, *et al.*, 2022).

1.2.1 Utilização da bioengenharia de tecidos na clínica em doenças hepáticas

Ao longo dos últimos 50 anos, o transplante hepático tornou-se procedimento padrão em muitos países do mundo (Meirelles, *et al.*, 2015). O sucesso terapêutico evidenciado pelas melhorias substanciais na sobrevida pós-operatória gerou um aumento significativo na disposição por órgãos. Contudo, apesar da introdução de transplantes com doadores vivos para mitigar a escassez de órgãos de doadores falecidos, a oferta se mantém criticamente defasada em relação a demanda (Associação Brasileira de Transplante de Órgãos – ABTO, 2025). Consequentemente, a questão do racionamento de fígados disponíveis tem apontado de forma lamentável a questão da ausência desses órgãos para a realização de transplantes que resultam na sobrecarga do sistema de saúde e na angústia de pacientes que aguardam na fila (Feng, *et al.*, 2024). O desequilíbrio existente entre a elevada procura por transplantes de fígado e o baixo número de órgãos disponíveis evidencia a necessidade imediata de estratégias terapêuticas alternativas para pacientes com insuficiência hepática aguda e crônica (Tsolalo, *et al.*, 2015).

O transplante de hepatócitos foi proposto como estratégia alternativa ao transplante de fígado. Desde o primeiro transplante de hepatócitos humanos realizado por Demetrious e colaboradores (1993), estudos clínicos têm sido conduzidos em pacientes com doenças hepáticas adquiridas ou hereditárias (Dhawuan, *et al.*, 2006; Gramignoli, *et al.*, 2015).

Em resumo, o procedimento consiste na infusão de hepatócitos pela veia porta, que sobreviveram por tempo consideravelmente necessário para corrigir parcialmente o distúrbio metabólico (Ibars, *et al.*, 2016). No entanto, a obtenção desses hepatócitos humanos é um processo complexo devido à escassez de fontes adequadas para o isolamento celular, à infraestrutura necessária para realizar esse isolamento, à conservação e à fragilidade da manutenção dos hepatócitos (Ibars, *et al.*, 2016).

Portanto, essa realidade impõe uma limitação significativa em relação ao avanço da pesquisa e da aplicação clínica do transplante celular. Nesse sentido, a bioengenharia de tecidos surge como uma ferramenta promissora, onde muito se tem estudado sobre atualizações e estratégias mais apropriadas para auxiliar no

desenvolvimento de enxertos hepáticos funcionais e de novas terapias para transplante.

1.2.2 Avanços na bioengenharia de tecidos na clínica em doenças hepáticas

De modo geral, terapias alternativas são fundamentais e um exemplo disso é a descelularização por perfusão ou *perfusion decellularization*. Inicialmente utilizada para criar um coração bioartificial (Taylor, *et al.*, 2020), essa técnica também permitiu a geração de enxertos hepáticos transplantáveis a partir de matriz hepática descelularizada (Ott, *et al.*, 2008; Uygun, *et al.*, 2010). O processo de descelurização encontra-se representada na Figura 1.

Resumidamente, a descelularização é um processo que utiliza diversas metodologias e agentes de descelularização para remover o conteúdo celular do tecido, deixando apenas a matriz extracelular (MEC) e moléculas bioativas (Morawski, *et al.*, 2025). Nesse sentido, o processo é dividido em duas fases: uma fase nucleica e uma fase de DNA, cada fase consiste em ciclos de descelularização de 2 horas aproximadamente, tanto na fase nucleica quanto na de DNA, cada ciclo é seguido por um intervalo e durante o intervalo, uma biópsia por agulha grossa é retirada do órgão (Morawski, *et al.*, 2025). Na fase nucleica, a biópsia deve ser avaliada quanto à presença de núcleos celulares em espécimes de cortes congelados usando colorações de hematoxilina e eosina (H&E) e na imunocoloração com o marcador nuclear DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) (Morawski, *et al.*, 2025). Os ciclos de descelularização da fase nucleica devem ser repetidos até que nenhum núcleo ou fragmento de DNA seja visível em nenhuma das colorações, essa observação justifica a transição para a fase de DNA, da mesma forma, a avaliação quantitativa do DNA e do comprimento do fragmento de DNA deve seguir cada ciclo na fase de DNA (Morawski, *et al.*, 2025). Os ciclos de descelularização devem ser repetidos até que os critérios para o conteúdo de DNA sejam atendidos, deixando no máximo <50 ng de DNA/mg de peso seco da MEC e nenhum fragmento de DNA com mais de 200 pb de comprimento sejam encontrados (Morawski, *et al.*, 2025).

Atualmente, as metodologias essenciais utilizadas para descelularização incluem métodos físicos, químicos ou enzimáticos. Em geral, o início da

descelularização começa com a perfusão de todo o fígado com solução salina ou água destilada, como demonstrado por Robertson e colaboradores (2018) na produção de scaffolds ou “arcabouços” de fígado de rato e por Lang e colaboradores (2011) na produção de scaffolds ou “arcabouços” de fígado de porco. Posteriormente, os detergentes químicos em várias concentrações são perfundidos para promover a remoção celular. Algumas modificações são observadas em protocolos distintos, como diferentes tipos de soluções detergentes, dodecil sulfato de sódio (SDS, do inglês Sodium Dodecyl Sulfate), Triton X-100, desoxicolato de sódio; duração da perfusão e vasos usados para realizar a perfusão das substâncias no processo de descelularização (Dias, *et al.*, 2022).

Os tecidos e órgãos descelularizados fornecem plataformas fisiológicas adequadas para enxerto e funcionalização das células. Essas abordagens originam um arcabouço tridimensional que mantém as propriedades bioquímicas, físico-químicas, biológicas e a integridade estrutural do tecido ou órgão original, preservando a composição e a função da MEC (Dias, *et al.*, 2022). A MEC pode fornecer um microambiente que mimetiza a fisiologia para melhorar as interações célula-célula e a secreção de proteínas essenciais e fatores de crescimento preservando os fatores de proliferação e diferenciação celular no reparo e remodelação do tecido desejado (Dias, *et al.*, 2022).

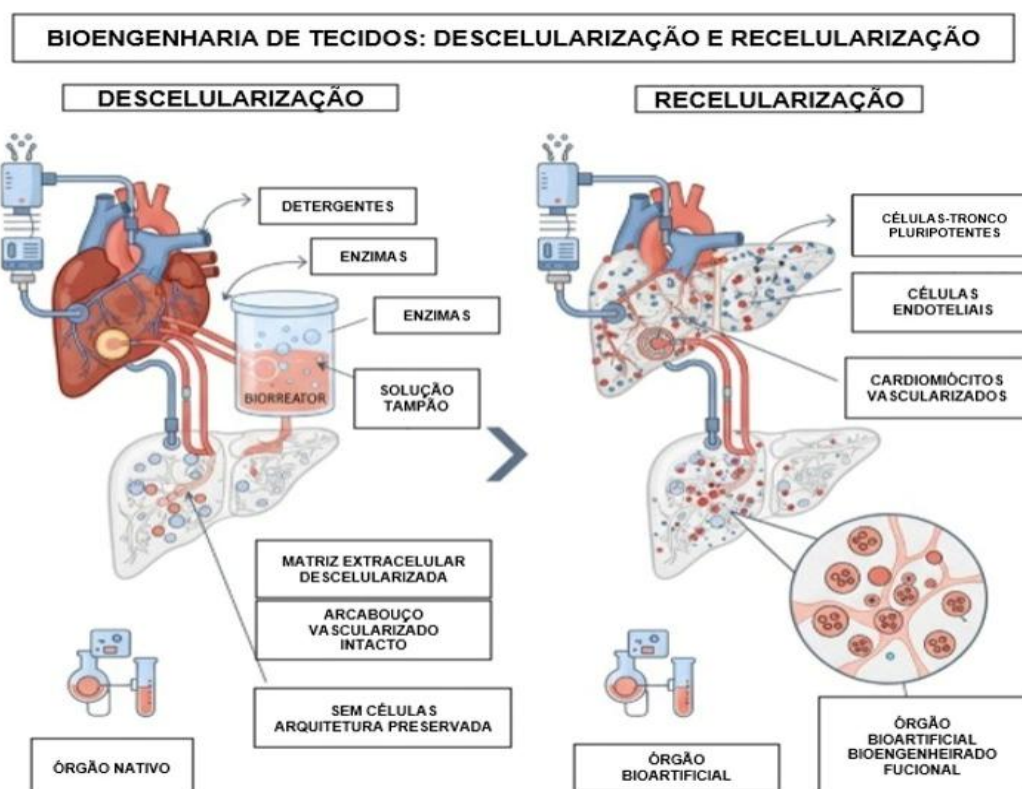
Após a descelularização, o enxerto de matriz extracelular pode ser repovoado com tipos de células específicas do órgão que aderem à microestrutura do tecido, constituindo a recelularização. Dois fatores-chave determinam a eficiência da recelularização: o método de deposição/reinserção celular e o tipo de célula (Asadi, *et al.*, 2021). O método de deposição pode ser do tipo estático ou ativo. Na deposição estática de células, ocorre a injeção de suspensões celulares concentradas no arcabouço, resultando em penetração celular, proliferação e estabelecimento de microvasos (Watanabe, *et al.*, 2019; Asadi, *et al.*, 2021). Já na deposição ativa envolve a perfusão celular por meio da rede vascular nativa do fígado, realizada por meio da canulação das veias porta e central resultando na proliferação e adesão das células (Asadi, *et al.*, 2021).

Com os recentes avanços na engenharia de tecidos hepáticos, diferentes estratégias têm sido estudadas para gerar hepatócitos ou células similares às

hepáticas *in vitro* (Dias, *et al.*, 2022). Conforme dito anteriormente, a obtenção de hepatócitos humanos primários é um processo difícil, sendo o isolamento celular dificultado pela baixa disponibilidade de fontes, pelas demandas de infraestrutura e pela rápida perda de funcionalidade *ex vivo*.

Essa limitação justifica a intensa procura por fontes celulares alternativas e ilimitadas, que possam ser expandidas mantendo as características metabólicas necessárias. Nesse contexto, as células-tronco de pluripotência induzida (iPSC) surgem como uma alternativa eficaz, sendo uma das fontes celulares alternativas que demonstram grande potencial como ferramenta para a geração de hepatócitos (Bayarsaikhan, *et al.*, 2024).

Figura 1 — Imagem ilustrativa do processo de descelularização e recelularização de órgãos. Na descelularização, um órgão nativo, neste exemplo, coração e fígado, é perfundido com detergentes e enzimas em um biorreator, removendo as células e deixando apenas a matriz extracelular (MEC) com sua arquitetura vascular intacta. Na recelularização, este arcabouço acelular é repovoado com células apropriadas (nesse caso, células-tronco pluripotentes, células endoteliais, cardiomiócitos no caso do coração) para reconstituir um órgão bioartificial funcional e vascularizado.



Fonte: Esquema ilustrativo disponível no Biorender e adaptado por Débora Alves Comune

1.3 Células-tronco de pluripotência induzida humanas (iPSC)

1.3.1 Contexto histórico e propriedades das iPSC

A descoberta da transferência nuclear de células somáticas comprovou que as células somáticas podem transportar o mesmo código genético que o zigoto e que partes estimuladoras deste código são suficientes para reprogramar a célula a um estado inicial de desenvolvimento (Takahashi e Yamanaka, 2006). A descoberta consistiu em um avanço revolucionário na reprogramação celular. Até então, acreditava-se que a diferenciação celular era um processo unidirecional, ou seja, uma célula somática especializada não poderia regredir a um estado pluripotente, definida como a capacidade de gerar todos os tipos de células do corpo, exceto a placenta (Takahashi e Yamanaka, 2006). Takahashi, Yamanaka e sua equipe, na Universidade de Kyoto, desafiaram essa teoria com a hipótese de que a introdução de fatores de transcrição específicos, que são as proteínas que se ligam ao DNA e regulam a expressão gênica, poderia induzir uma célula somática a reverter seu estado de diferenciação (Takahashi e Yamanaka, 2006).

A equipe inicialmente testou 24 fatores de transcrição que eram conhecidos por serem importantes na manutenção da pluripotência de células-tronco embrionárias (ESC). Os pesquisadores introduziram esses 24 fatores em células de fibroblastos de camundongo utilizando vetores virais. Em seguida, por meio de um processo de eliminação, Takahashi e Yamanaka descobriram que apenas quatro fatores de transcrição eram suficientes e essenciais para a reprogramação: OCT3/4, SOX2, KLF4 e c-Myc. A expressão desses quatro fatores induziu os fibroblastos adultos a regredir a um estado celular com características muito semelhantes às células-tronco embrionárias (Takahashi e Yamanaka, 2006). O impacto desta descoberta resultou nas células-tronco de pluripotência induzida (iPSC) que possuem capacidade de autorrenovação, reparo, regeneração e diferenciação celular, possuindo propriedade de pluripotência das células-tronco embrionárias, o que forneceu um mecanismo molecular para reprogramação celular (Karagiannis, *et al.*, 2019; Romanazzo, *et al.*, 2020).

A descoberta das iPSC contornou questões éticas associadas ao uso de células-tronco embrionárias, por não fazer uso de embriões no desenvolvimento de estudos e pesquisas. Diante disso, abriu caminho para a medicina regenerativa e de precisão

permitindo a geração de células específicas de pacientes com doenças genéticas para estudo e a possibilidade de gerar células de transplante como hepatócitos, neurônios ou cardiomiócitos a partir das próprias células do paciente, eliminando a rejeição imunológica (Takahashi e Yamanaka, 2007).

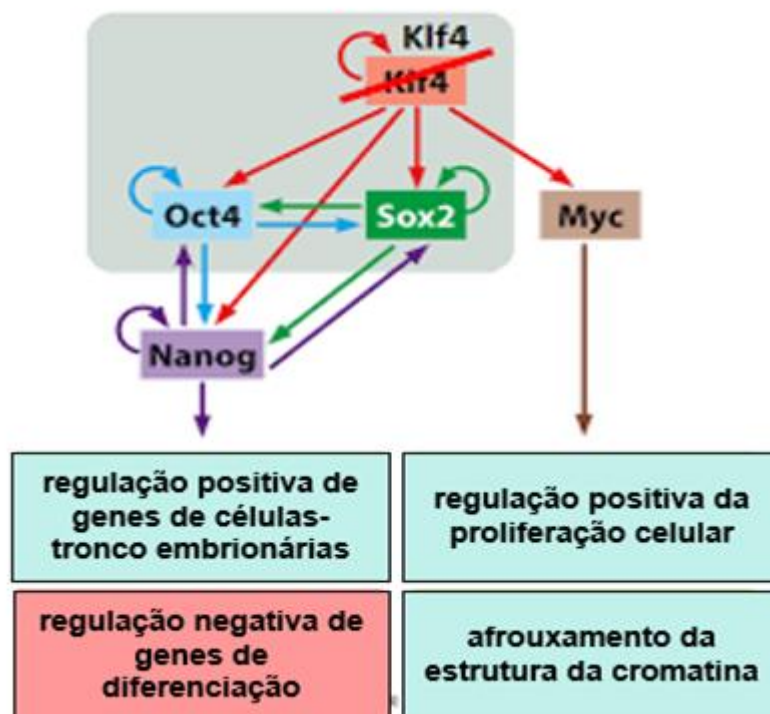
Conforme citado anteriormente, a elaboração inicial das iPSC foi realizada pela expressão ectópica de quatro genes específicos: OCT4, KLF4, SOX2 e c-Myc; conhecidos como fatores de Yamanaka ou fatores OSKM representados na Figura 2 (Takahashi e Yamanaka, 2006). Cada gene possui uma função reguladora importante responsável pela expressão da pluripotência da iPSC. OCT4 e SOX2 são responsáveis pela regulação positiva de genes de células-tronco embrionárias e a regulação negativa de genes de diferenciação, c-MYC e KLF4 pela regulação positiva de proliferação celular e c-MYC pelo afrouxamento da estrutura da cromatina (Takahashi e Yamanaka, 2006; Biologia Molecular da Célula, 2017).

Desde então, as iPSC vêm sendo obtidas de uma ampla gama de tipos celulares, propondo um mecanismo molecular universal, podendo ser obtidas a partir de células somáticas adultas, como células mononucleares do sangue periférico (PBMC, do inglês *Peripheral Blood Mononuclear Cell*) e fibroblastos (Takahashi e Yamanaka, 2007). Nesse sentido, considerando a abundância de fontes de iPSC em comparação as de outras células-tronco pluripotentes, estudos sobre uso de iPSC para modelar o desenvolvimento de tecidos, órgãos e outros sistemas do corpo tem se ampliado, bem como atualmente vêm sendo utilizadas para modelar doenças por meio da reprogramação de amostras de pacientes.

A possibilidade de reprogramar células somáticas como as PBMC, utilizando os fatores de Yamanaka, superou a escassez de células e as barreiras éticas da pesquisa com células-tronco embrionárias. Por esta razão, e devido às suas características de pluripotência ilimitada e potencial de diferenciação, as iPSC humanas fundamentam novas terapias celulares e a possibilidade de descoberta de fármacos com aplicação clínica. Essa aplicabilidade é relevante em diversos campos, inclusive na hepatologia, onde a capacidade de gerar hepatócitos específicos do paciente permite não apenas o estudo *in vitro* da toxicidade de novos medicamentos, mas também o avanço do transplante celular autólogo.

Ademais, diversos modelos foram propostos para explicar os eventos que reprogramam a célula para o estado pluripotente, sendo a estrutura para os eventos moleculares que reprogramam uma célula crucial para o avanço da tecnologia iPSC (Karagiannis, *et al.*, 2019).

Figura 2 — Imagem ilustrativa dos reguladores de transcrição OSKM.



Fonte: Adaptado do livro e Biologia Molecular da Célula; 2017. Parte V; as células em seu contexto social; pág. 1254; Figura 22-41.

1.3.2 Processo de reprogramação das iPSC

O comprometimento com o desenvolvimento de métodos de reprogramação *in vivo* para converter células em um tipo de célula específica para reparar danos no corpo representa um novo paradigma nas abordagens para regeneração de tecidos. Sendo assim, desde a primeira geração de iPSC por Yamanaka e colaboradores (2006) muito se tem avançado para desenvolver novos procedimentos que ampliassem a eficiência da reprogramação, eliminando a necessidade de vetores virais (Takahashi e Yamanaka, 2007).

Romanazzo e colaboradores (2020) apontaram as técnicas de aplicação para abordagens terapêuticas e reprogramação para geração de iPSC fornecendo uma

visão geral dos ensaios clínicos, sendo estas representados na Figura 3 (Romanazzo, *et al.*, 2020). Dentre eles, estudos recentes indicam citocinas específicas capazes de manter a pluripotência das células-tronco embrionárias, sendo elas inibidores de bFGF, MEK/ERK e GSK3, e usaram esses compostos para o transplante nuclear de células somáticas (TNSC, do inglês *Somatic Cell Nuclear Transfer*), um procedimento pelo qual o núcleo de uma célula somática é integrado com um ovócito maduro enucleado, com a finalidade de gerar uma célula-tronco embrionária (Junyung, *et al.*, 2014; Javier, *et al.*, 2016; Romanazzo, *et al.*, 2020).

Em 2009, Kim e colaboradores, visando métodos de reprogramação livres de vírus e transgenes, revelaram iPSC humanas pela integração de proteínas de reprogramação ancoradas em peptídeos de penetração celular apresentando desafios na distribuição de proteínas através da membrana celular (Kim, *et al.*, 2009; Xiao, 2013; Romanazzo, *et al.*, 2020).

Em 2010, Warren e colaboradores avançaram na área ao reprogramar células utilizando a transfecção de mRNA sintético modificado, conhecido como mod-mRNA descartando a necessidade de transdução viral (Warren, *et al.*, 2010; Michael, *et al.*, 2014; Romanazzo, *et al.*, 2020). Hou e colaboradores (2013) encontraram uma combinação que foi capaz de originar iPSC pela primeira vez, envolvendo o uso de proteínas e pequenas moléculas, como Forskolin (FSK), Valproic acid sodium salt (VPA), CHIR99021 (CHIR), resultando numa nova abordagem para a reprogramação pluripotente que elimina a necessidade de fatores virais e biomoléculas sensíveis (Hou, *et al.*, 2013; Romanazzo, *et al.*, 2020).

Independentemente da estratégia de reprogramação utilizada, as iPSC representam uma ferramenta de estudo fundamental devido a sua capacidade de diferenciação em células especializadas que as habilita para aplicação na prática clínica, desde a modelagem de doenças até o transplante celular em pacientes.

1.3.3 Aplicação das células-tronco das iPSC

Conforme discutido, considerando a capacidade de originar quase todos os tipos de células maduras do corpo humano e se autorrenovar indefinidamente, as iPSC têm desempenhado um papel central na terapia regenerativa e medicina de precisão na última década. A plasticidade somática desperta a possibilidade promissora de

reprogramar as células de um paciente para reparar qualquer tecido do corpo (Takahashi & Yamanaka, 2006). O surgimento da tecnologia iPSC obteve grande impacto em terapias regenerativas e modelagem de doenças (Romanazzo, *et al.*, 2020).

O estudo de modelos de doenças fundamentadas em iPSC humanas são consideradas alternativas promissoras devido ao seu suprimento ilimitado de células fenotípicas clinicamente importantes, sua origem humana, seu potencial de derivação a partir de qualquer indivíduo, fácil acessibilidade e escalabilidade e os avanços significativos na compreensão da etiologia e progressão de um conjunto diversificado de doenças, como a doença de Parkinson, a doença de Alzheimer e doenças cardíacas hereditárias (Doss, *et al.*, 2019).

Assim como em estudos fundamentais, o uso de terapia com células-tronco em pacientes com HIV otimizou a manutenção da latência da carga viral e capacidade de reduzir gradualmente os regimes antirretrovirais (Khalid, *et al.*, 2021). Bem como no transplante de células derivadas de iPSC em modelos pré-clínicos de Lesão Medular Espinhal (LME), foi demonstrada a recuperação da função motora promovida por meio da reconstrução do trato cortico espinhal, restaurando os circuitos neuronais interrompidos de maneira retransmitida (Martin-Lopez, *et al.*, 2021).

Além disso, as iPSC de células somáticas podem ser utilizadas no estudo da carcinogênese por meio da super expressão ou silenciamento de oncogenes e genes supressores de tumores e rastrear as alterações e comportamentos celulares durante o início e a progressão do câncer (Curry, *et al.*, 2015).

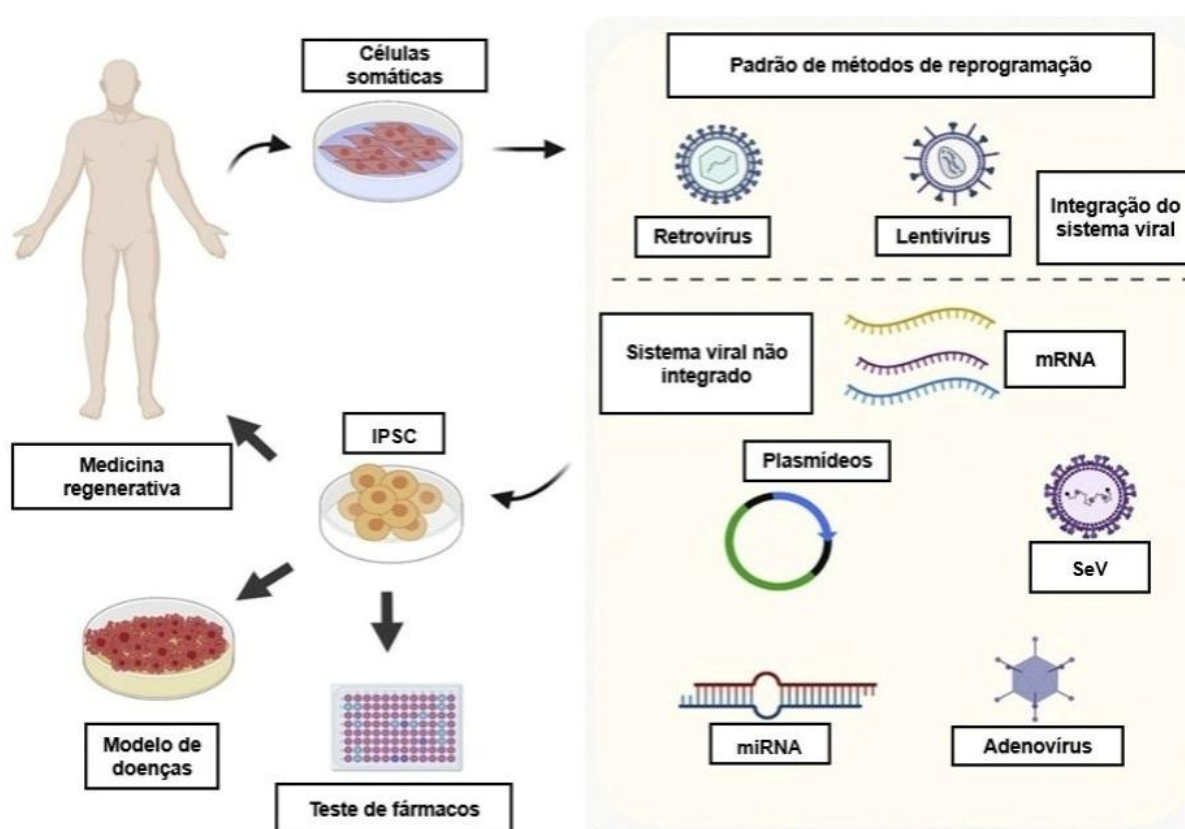
Ademais, a geração de iPSC a partir de células cancerígenas humanas representa a possibilidade de desenvolver modelos *in vitro* de carcinogênese para tipos de câncer como glioblastoma e câncer gastrointestinal, uma vez que, devido à ausência de um modelo relevante para estudar a progressão do câncer, a pesquisa adequada em ambientes clínicos tornou-se limitada (Stricker, *et al.*, 2014).

Ademais, as iPSC destacaram-se positivamente no estudo de novos fármacos e na descoberta promissora de medicamentos utilizando modelos humanos *in vitro* de doenças. Células fenotípicas como cardiomiócitos, células neuronais, hepatócitos, células β -pancreáticas secretoras de insulina e células progenitoras renais podem ser

geradas a partir de iPSC derivadas de indivíduos saudáveis e pacientes, em quantidade ilimitada para ensaios de alto rendimento (Elitt, *et al.*, 2018).

As análises ômicas em larga escala de iPSC diferenciadas em células fenotípicas doentes e saudáveis indicam as redes regulatórias prejudicadas pela doença e consequentemente afetadas por medicamentos. Desse modo, as iPSC tornam-se uma ferramenta importante para futuras descobertas na indústria farmacêutica (Shinde, *et al.*, 2016).

Figura 3 — Imagem ilustrativa da aplicação e das técnicas de reprogramação da iPSC.



Fonte: Adaptado de Romanazzo S, Lin K, Srivastava P, Kilian KA. "Targeting cell plasticity for regeneration: From in vitro to in vivo reprogramming." ("Publications - Kilian Lab") Adv Drug Deliv Rev. 2020;161-162:124-144. doi: 10.1016/j.addr.2020.08.007. Epub 2020 Aug 19. PMID: 32822682.

JUSTIFICATIVA

A doença hepática crônica é tratada unicamente por meio de transplante. Em 2023, a lista de espera para transplante teve a inclusão de 122 pacientes por dia, marcando um aumento de 6,9 vezes em comparação a 2022 (Organ Procurement and Transplantation Network, 2022). O prognóstico negativo associado à insuficiência hepática terminal sugere que qualquer avanço capaz de reduzir as listas de espera por transplantes e soluções que estendam a expectativa de vida dos pacientes e otimizem os gastos com saúde sejam consideradas. Dessa forma, a dependência de doadores limitados exigiu o desenvolvimento de tratamentos alternativos baseados em bioengenharia. A recelularização é uma abordagem promissora que visa solucionar a escassez de órgãos. Para isso, os arcabouços podem ser gerados por meio da descelularização, sendo estes preenchidos com células hepáticas específicas altamente funcionais resultando na recuperação de funções hepáticas importantes. Nesse sentido, o uso de hepatócitos diferenciados a partir de iPSC com o objetivo de recelularizar arcabouços hepáticos acelulares torna-se uma possibilidade. A utilização das iPSC é descrita na literatura como fonte celular confiável devido à sua proliferação sustentada por meio da autorrenovação e capazes de se diferenciar em linhagens celulares provenientes das três camadas germinativas (Yamanaka, 2020). Para isso, é fundamental que se defina protocolos de caracterização da pluripotência dessas células obtidas a partir de células somáticas para que estas sejam de fato caracterizadas como pluripotentes e utilizadas para o devido fim.

2 OBJETIVO

3.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar a pluripotência de células-tronco de pluripotência induzida humanas (iPSC) de indivíduo saudável.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.2.1 Cultivar iPSC de indivíduo saudável a partir do isolamento de células mononucleares do sangue periférico.

3.2.2 Avaliar a presença do vetor viral Sendai por RT-PCR.

3.2.3 Realizar a caracterização da pluripotência da iPSC por RT-PCR.

3.2.4 Avaliar a caracterização da pluripotência da iPSC por citometria de fluxo.

3.2.5 Analisar a caracterização da pluripotência da iPSC por imunofluorescência.

3.2.6 Efetuar a caracterização da pluripotência da iPSC por diferenciação espontânea.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

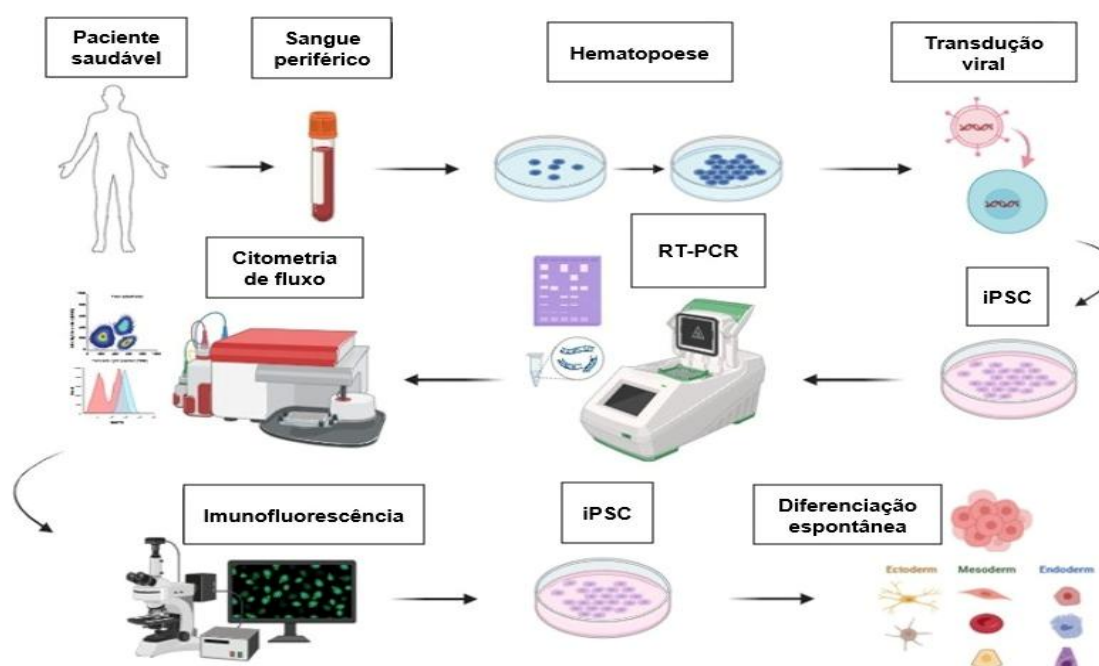
O projeto desenvolvido neste estudo visa a pesquisa experimental qualitativa realizada em laboratório com a finalidade de executar experimentos monitorados que assegurem sua aplicabilidade baseada nos resultados observados. A proposta deste estudo teve como intuito a seleção de uma (1) linhagem de iPSC em biobanco, gerada de doador jovem saudável, ou seja, o doador não representa riscos de transmissão de doenças, não possui doenças crônicas e comorbidades, para caracterização da pluripotência dessa célula-tronco oriunda do doador.

O projeto encontra-se aprovado no Comitê de Ética em Pesquisa sob número CAEE: 16079319.0.0000.5257.

A etapa de caracterização de pluripotência da célula-tronco corresponde ao passo posterior da geração da mesma, tendo esta sido realizada por pesquisadores do nosso grupo anteriormente a esse projeto. O protocolo da geração de iPSC estabelecido em nosso laboratório se inicia no isolamento de células mononucleares do sangue periférico e posterior realização da hematopoese de estresse e transdução viral das células obtidas. A hematopoese de estresse consistiu na reprogramação de 1×10^6 células mononucleares do sangue periférico. Para o cultivo *in vitro* das células mononucleares utilizou-se o volume de 1989,2 μ l do meio StenSpan (StemCell Technologies, cat. 100-0130) suplementado com 2 μ l eritropoietina EPO, 2 μ l Stem Cell Factor SCF (Santa Cruz Biotechnology, cat. SC-286072), 2 μ l dexametasona (Sigma- Aldrich, cat. D4902-100mg), 2 μ l interleucina 3 IL3 (R&D Systems, cat. 203-IL-010), 2 μ l ácido ascórbico (Sigma- Aldrich, cat. A8960-5g) e 0,8 μ l *Insulin-like Growth Factor 1* IGF1 (PeproTech, cat. 100-12), resultando no enriquecimento da população em eritroblastos. A transdução viral consistiu no processo de adição do vírus Sendai à cultura com eritroblastos, que contém os transgenes Klf4-Oct3/4-Sox2, c-Myc e Klf4, responsáveis pela expressão de pluripotência das células. Com o surgimento das primeiras colônias de iPSC após a transdução, realizou-se a seleção de um clone e o mesmo foi transferido para uma placa de Petri aderente previamente tratada com *Irradiated Mouse Embryonic Fibroblasts* (iMEF) composta por fibroblastos embrionários primários de camundongos irradiados com raios gama, ou seja, esta matriz celular auxilia no crescimento das células-tronco pluripotentes e não competem com as iPSC. Essas foram expandidas e necessitaram em média de 10 passagens.

Em seguida, o clone da iPSC Pac 48 foi transferido para outra placa de Petri aderente previamente tratada com Geltrex™ (Thermo Scientific, cat. A1413302) e precisou de 7 passagens para posterior realização do RT-PCR a fim de identificar a ausência de expressão viral na linhagem de iPSC. Em seguida, as células ausentes de mutações puderam ser cultivadas e expandidas. A caracterização da pluripotência foi realizada. Para isso, foi feito o RT-PCR para avaliação dos seguintes transcritos: DNMT3B, DPPA4, KLF4, LIN28, NANOG, NODAL, OCT3/4, REX1, SOX2. Em paralelo, a presença de proteínas expressas foi avaliada por imunofluorescência (NANOG, OCT3/4, SOX2, SSEA4 e TRA1-81) e por citometria de fluxo (NANOG, OCT3/4, SOX2, SSEA-4 e TRA1-60). Por fim, foi realizado o ensaio de diferenciação espontânea para a observação da expressão dos três folhetos embrionários: ectoderma, mesoderma e endoderma. As etapas do desenho experimental encontram-se representadas de forma esquemática na Figura 4.

Figura 4 — Esquema representativo das etapas do desenho experimental. O esquema descreve o protocolo de geração da iPSC Pac 48. Iniciou-se com a coleta do sangue periférico de paciente saudável, seguido da etapa de hematopoese e transdução viral, posteriormente realizou-se a caracterização da pluripotência por RT-PCR, citometria de fluxo, imunofluorescência e diferenciação espontânea.



Fonte: Fluxograma criado no Biorender por Débora Alves Comune.

4.1 Linhagem de iPSC do estudo

Conforme mencionado anteriormente, para a realização deste estudo foi utilizada uma linhagem de iPSC derivada de indivíduo do sexo masculino jovem e saudável, identificado como paciente 48 (Pac 48). Para o desenvolvimento deste trabalho foi utilizada a linhagem Pac 48 clone 3 (cl3) passagem 10+7 (P10+7). Em relação as passagens, conforme descrito na literatura, após a seleção do clone da linhagem de iPSC oriundo da transdução viral, o mesmo é transferido para uma placa previamente tratada com iMEF para que ocorra a expansão das células conforme descrito anteriormente, após alcançar a confluência de 80% as iPSC são transferidas novamente para outra placa contendo iMEF, esse processo se repete por 10 vezes com o intuito de diluir o vírus a níveis indetectáveis, resultando em linhagens de iPSC livres de vetor. O processo de expansão e transferência (passagens) das iPSC se repete por mais 7 vezes, nessa etapa a matriz iMEF é substituída pela matriz de aderência Geltrex. No cultivo celular *in vitro*, a função da matriz é mimetizar o ambiente natural da matriz extracelular e fornecer o substrato necessário para o crescimento, adesão e manutenção da identidade celular. Essa linhagem foi gerada no laboratório de cultivo celular de células humanas e armazenada no laboratório de criopreservação imersa em tanque de nitrogênio líquido localizados no Centro de Pesquisa em Medicina de Precisão – IBCCF/UFRJ.

4.2 Manutenção e expansão da iPSC Pac 48

O descongelamento das células consistiu em centrifugar as células, diluídas em solução salina tamponada com fosfato Phosphate Buffered Saline (PBS) 1x (Sigma Aldrich, cat. P5493-1L), na velocidade de 300 xg por 5 minutos. Posteriormente, as iPSC foram plaqueadas em uma densidade de 1×10^6 em placas de 100mm previamente tratadas com Geltrex™, cuja diluição foi feita em DMEM-F12 (Gibco, cat. 10565-018). O plaqueamento foi realizado na presença de 10 μ M de Y-27632 di-hidrocloride (iRock, Tocris Bioscience, cat 1254) diluído no meio StemFlex™ (Gibco, cat. A3349401). As células foram mantidas em estufa a 37°C com 5% de CO₂ e a troca de meio efetuada apenas com meio StemFlex™ (Gibco, cat. A3349401) realizada a cada 24 horas até as células alcançarem uma confluência de aproximadamente 80%. A dissociação dessas iPSC para fins de congelamento ou

passagem foi realizada utilizando Tryple™ Express (Gibco, cat. 12604013). Para o processo de congelamento, ao se dissociarem, foi acrescentado PBS10X (Sigma Aldrich, cat. P5493-1L), em seguida, foi feita a contagem das células na câmara de Neubauer e centrifugadas a 300 xg por 5 minutos. Após a centrifugação, o pellet formado foi ressuspensionado em meio de congelamento, sendo constituído de soro fetal bovino (SFB, Gibco, cat. 126657-029) suplementado com 10% de Dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma Aldrich, cat. D5879-100ML), que é um agente crioprotetor que previne a lise das células. As células ressuspensionadas foram colocadas em criotubos em uma densidade de $2,0 \times 10^6$, armazenadas em freezer -80 por 24h e, em seguida, transferidas para tanques de nitrogênio líquido para serem criopreservadas. Para fins de passagem, o protocolo coincide com o de congelamento até a etapa de centrifugação. O replaqueamento é feito na presença de 10 μ M de iRock diluído no meio StemFlex™. Essa etapa foi realizada seguindo protocolo descrito por BRASIL *et al.*, 2020.

4.3 Avaliação da presença do vetor viral Sendai por RT-PCR da iPSC Pac 48

Para identificar a ausência da expressão do vetor viral Sendai na linhagem de iPSC Pac 48 foi realizada a extração do RNA originado de um sedimento celular contendo $2,0 \times 10^6$ células resultantes da expansão da linhagem Pac 48 cl3 descrita no tópico anterior. Para a realização da extração de RNA foi utilizado o RNeasy Plus Kit (Qiagen, cat. 74134 e 74136). Em seguida, para obtenção do cDNA foi utilizado o kit High-Capacity Reverse Transcription (Applied Biosystems, cat. 4368814), seguindo as instruções do fabricante. A análise do RT-PCR foi feita a partir do cDNA adquirido previamente, armazenado a -20 °C. O kit GoTaq® DNA Polymerase (Promega, cat. M3005) foi usado para a análise do RT-PCR. Os genes KLF4, KOS, SEV, c-Myc foram avaliados, que representam a expressão do vetor viral Sendai. Como controle positivo da amplificação da reação foi utilizado GAPDH onde foi avaliada a expressão de mRNA em virtude desse gene ser essencialmente expresso. A amostra foi submetida aos ciclos de desnaturação, anelamento e extensão que permitem a replicação do DNA alvo utilizando o termociclador ProFlex PCR System (Applied Biosystems). Posteriormente, os produtos do PCR foram avaliados usando eletroforese em gel de

agarose a 2% e os resultados foram observados no fotodocumentador (Odyssey® Fc Dual-Mode Imaging System, LICOR Biosciences).

4.4 Caracterização da pluripotência por RT-PCR da iPSC Pac 48

Para a realização da caracterização da pluripotência por RT-PCR da iPSC Pac 48 foi realizada a extração do RNA originado de um sedimento celular contendo $2,0 \times 10^6$ células resultantes da expansão da linhagem Pac 48 cl3 utilizando o RNeasy Plus Kit (Qiagen, cat. 74134 e 74136). Em seguida, para obtenção do cDNA foi utilizado o kit High-Capacity Reverse Transcription (Applied Biosystems, cat. 4368814), seguindo as instruções do fabricante. A análise do RT-PCR foi feita a partir do cDNA adquirido previamente, armazenado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ utilizando o kit GoTaq® DNA Polymerase (Promega, cat. M3005), seguindo o protocolo disponibilizado no kit. Os primers utilizados foram descritos na Tabela 1 para os genes DNMT3B, DPPA4, KLF4, LIN28, NANOG, NODAL, OCT3/4, SOX-2, REX1, sendo cada um deles um gene indicador de pluripotência quando expressos na linhagem de iPSC observada. GAPDH foi usado como controle interno da amplificação da reação. A amostra foi submetida aos ciclos de desnaturação, anelamento e extensão que permitem a replicação do DNA alvo utilizando o termociclador ProFlex PCR System (Applied Biosystems). Posteriormente, os produtos do PCR foram avaliados usando eletroforese em gel de agarose a 2% e os resultados foram observados no fotodocumentador (Odyssey® Fc Dual-Mode Imaging System, LICOR Biosciences).

Tabela 1 — Lista dos genes e das sequências dos primers utilizados no RT-PCR para a caracterização da pluripotência.

Primer	Sequência direta senso Sequência reversa antissenso	Tamanho do produto (pb)
DNMT3B	TGCTGCTCACAGGGCCCGATACTTC TCCTTTCGAGCTCATGCACCACAAAC	241
DPPA4	GGAGCCTGCCCTGGAAAATTC TTTTTCCTGATATTCTATTCCCAT	408
KLF4	TCTCAAGGCACACCTGCGAA TAGTGCCTGGTCAGTTCATC	105

Primer	Sequência direta senso Sequência reversa antissenso	Tamanho do produto (pb)
LIN28	CAAAAGGAAAGAGCATGCAGAA ATGATCTAGACCTCCAGAGTTGTAGC	71
NANOG	CAGCCCCGATTCTTCCACCAGTCCC CGGAAGATTCCCAGTCGGGTTCCACC	391
NODAL	GGGCAAGAGGCACCGTCGACATCA GGGACTCGGTGGGGCTGGTAACGTTTC	234
OCT3/4	AGCCTGAGGGCGAAGCAGGA CCCCAGGGTGACCCCCACAT	236
REX1	CAGATCCTAAACAGCTCGCAGAAT GCGTACGCAAATTAAAGTCCAGA	306
SOX2	AGCTACAGCATGATGCAGGA GGTCATGGAGTTGTACTGCA	126
GAPDH	ACCATGGGGAAGGTGAAGGT CATGGGTGGAATCATATTGG	163

Fonte: Débora Alves Comune.

4.5 Caracterização da pluripotência por imunofluorescência da iPSC Pac 48

Para a realização da caracterização por imunofluorescência foi fundamental o uso da HES, uma célula-tronco embrionária como controle positivo, para este estudo. Na Tabela 2 estão descritos os anticorpos intracelulares e de superfície respectivamente utilizados, sendo eles: NANOG, OCT3/4, SOX2 (Cell Signalling) e TRA1-81 (BD Biosciences) e SSEA4 (Bio Legend). As células em cultura foram fixadas com paraformaldeído (PFA) (Sigma, cat. 158127-3000) 4% por 20 minutos em temperatura ambiente. Na sequência, as lamínulas foram retiradas da placa e lavadas em temperatura ambiente 3 vezes com PBS 1x (Sigma-Aldrich, cat. P5493-1L) durante 10 minutos cada e posteriormente, foi adicionado 80 µl de cloreto de amônio por 30 minutos para limpeza e conservação das amostras. A próxima etapa consistiu na permeabilização e adição dos anticorpos intracelulares, com Triton a 0,75% (Sigma-Aldrich, cat. T9284) por 30 minutos. Após esse período, foi retirado o excesso do Triton com 3 lavagens em temperatura ambiente de PBS 1x por 10 minutos cada e iniciou-se a etapa do bloqueio, que se resume em colocar uma solução de Bovine

Serum Albumin (BSA) a 5% (Sigma, cat. A9647-50g) com 0,1% de Triton diluído em PBS 1x por 1 hora. Os anticorpos de superfície não são permeabilizados. Finalizado o bloqueio, a retirada da solução foi realizada, vertendo a lamínula, em seguida, foram adicionados anticorpos de superfície e o anticorpo primário de cada lamínula em PBS-BSA 3% na diluição 1:100 e incubado na câmara escura e úmida a 4°C de forma overnight.

No dia seguinte, foram realizadas 3 lavagens com PBS 1x por 10 minutos cada. Os anticorpos secundários Anti-Rabbit IgG e Alexa Fluor 488 (Invitrogen) foi diluído em PBS-BSA 3% com 0,1% de Triton na proporção 1:400, e posteriormente foi incubado na câmara escura e úmida por 2 horas em temperatura ambiente. Para concluir, foram realizadas mais 3 lavagens com PBS 1x por 10 minutos cada e adicionado o DAPI (Sigma, cat. D9542-5mg) nas lamínulas (cerca de 80 µl em cada), deixando por 15 minutos. O DAPI é descrito como um marcador de viabilidade celular que possui afinidade por material genético expresso no núcleo das células, mas sua utilização se concentra em identificar células que estão mortas ou com membranas comprometidas. Em seguida, as lamínulas foram lavadas 2 vezes com PBS 1x por 10 minutos, foi realizada uma última lavagem com água destilada e, para finalizar a montagem das lâminas, as mesmas foram seladas utilizando 10 µl do Fluoromount™ (Thermo Fisher Scientific). As imagens foram adquiridas em microscópio confocal LSM 900 (ZEISS), com objetiva de 20x e 40x.

Tabela 2 — Lista de anticorpos primários e secundários utilizados no ensaio de Imunofluorescência para caracterização da pluripotência das iPSC Pac 48.

	Anticorpo	Catálogo	Marca
Anticorpos primários intracelulares	NANOG	4903P	Cell Signaling
	OCT3/4	2840P	Cell Signaling
	SOX2	3579P	Cell Signaling
Anticorpos primários de superfície	TRA1-81	560194	BD Biosciences
	SSEA4	330418-BL	Bio Legend
Anticorpos secundários	Anti-Rabbit IgG Alexa Fluor 488	A32731	Invitrogen

Fonte: Débora Alves Comune.

4.6 Caracterização da pluripotência por citometria de fluxo da iPSC Pac 48

Para a caracterização por citometria de fluxo, foi utilizado um sedimento celular contendo $2,0 \times 10^6$ células para realização da citometria. O protocolo foi iniciado pelo preparo das soluções fundamentais. Uma solução de PBS + BSA 0,5% foi preparada dissolvendo-se 0,25 g de BSA em 50 ml de PBS 1x. A solução de PBS + Triton 0,3% foi preparada misturando-se 0,15 ml de Triton em PBS 1x até completar 50 ml. A análise intracelular (OCT3/4, SOX2 e NANOG) das amostras envolveu várias etapas. A princípio, utilizou-se Fixable Viability Stain (FVS, BD cat. 564996), diluída na proporção 1:1000 para avaliar a viabilidade das células. Foi adicionado 100 µl de FVS às células, que permaneceram incubadas por 20 minutos fora do alcance da luz. Após o período de incubação, as células foram lavadas com 900 µl de PBS 1x e centrifugadas a 300 xg por 5 minutos, onde, ao final da centrifugação, o sobrenadante foi descartado. Posteriormente, foi realizada a fixação das células com 100 µl de PFA 4% (Sigma, cat. 158127-3000) por 20 minutos, em seguida, repetimos a lavagem com 900 µl de PBS 1x e centrifugação a 300xg por 5 minutos, desprezando novamente o sobrenadante. Na etapa de permeabilização das células, utilizou-se 100 µl de PBS + Triton 0,3%, onde as células ficaram incubadas por 30 minutos.

Depois, as células foram lavadas com 900 µl de PBS 1x e seguidamente centrifugadas a 300 xg por 5 minutos. A incubação com anticorpos para antígenos intracelulares foi feita a com volumes calculados com antecedência. Para OCT3/4, foi usada uma diluição de 1:50, para SOX2, a diluição foi de 1:40 e para NANOG, a diluição de 1:10. As células com os anticorpos em PBS + BSA 0,5% permaneceram incubadas por 1 hora a 4°C, após esse período foram lavadas com 900 µl de PBS 1x, centrifugadas a 300 xg por 5 minutos e ressuspensas em 150 µl de PBS + BSA 0,5%.

O protocolo utilizado para a análise de antígenos de superfície foi o mesmo usado para os antígenos intracelulares até a etapa de avaliação da viabilidade celular seguido da lavagem e centrifugação, não foram realizadas as etapas de fixação e permeabilização. Após centrifugação e descarte do sobrenadante, os anticorpos TRA-1-60 e SSEA4, ambos numa diluição de 1:40, e permaneceram incubados sob as mesmas condições dos antígenos intracelulares, em seguida, lavados com 900 µl de PBS 1x e centrifugadas a 300 xg por 5 minutos.

Por fim, as células foram ressuspensas em 150 µl de PBS + BSA 0,5% antes da análise. As amostras foram lidas em Citômetro de Fluxo BD Accuri C6, e as análises dos resultados foram realizadas utilizando o programa FlowJo. A lista com todos os anticorpos descritos pode ser observada na Tabela 3.

Tabela 3 — Lista dos anticorpos de superfície e intracelulares utilizados na citometria de fluxo para a caracterização da pluripotência da iPSC Pac 48.

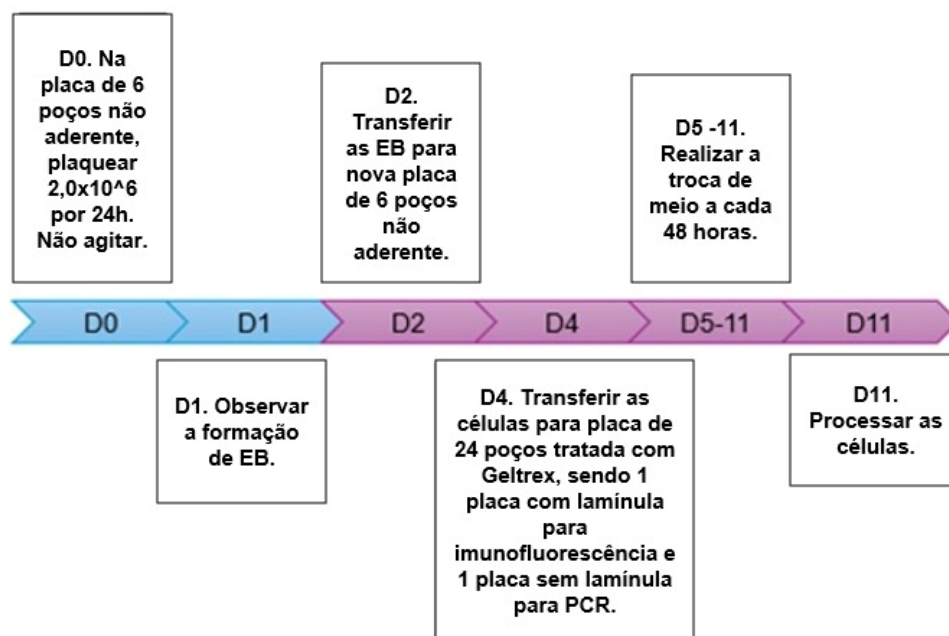
	Anticorpo	Fluorocromo	Catálogo	Marca
Anticorpos de superfície	SSEA4	APC	330418	Biolegend
	TRA1-60	Alexa Fluor 647	560850	BD Pharmigen
Anticorpos intracelulares	NANOG	PerCP-Cy5.5	562259	BD Pharmigen
	OCT3/4	Alexa Fluor 488	561628	BD Pharmigen
	SOX2	Alexa Fluor 488	560301	BD Pharmigen

Fonte: Débora Alves Comune.

4.7 Caracterização da pluripotência da iPSC Pac 48 por ensaio de diferenciação espontânea

Por ser uma célula-tronco pluripotente, as iPSC apresentam capacidade de se diferenciar nos três folhetos embrionários quando induzidas à diferenciação espontânea e não direcionada. Um fluxograma descrevendo as etapas do protocolo pode ser observado na Figura 5.

Figura 5 — Fluxograma do protocolo de diferenciação espontânea das iPSC Pac 48. O esquema descreve as etapas do protocolo de cultivo celular da iPSC Pac 48 no decorrer de 11 dias, incluindo a formação de corpos embrióides (EB), trocas de meio e a passagem das células em diferentes condições experimentais.



Fonte: Fluxograma criado no Biorender por Débora Alves Comune.

Para analisar a diferenciação espontânea, foram adicionadas lamínulas à placa para posterior realização de imunofluorescência. O protocolo iniciado em D0 consistiu no plaqueamento de 2×10^6 células da iPSC Pac 48 em 1 poço de uma placa de 6 poços não aderente e cultivadas em meio de diferenciação composto de StemPro™-34 SFM (Thermo Scientific, cat. 10639011) suplementado com 1% de glutamax (Life Technologies, cat. 35050061), 1% de Penicilina/Estreptomicina (Thermo Fisher Scientific, cat. 15140122), 10 µg/ml de ácido ascórbico (Sigma-Aldrich, cat. A89605G), 150 µg/ml de transferrina (Sigma-Aldrich, cat. T8158-100mg), 450 µM de monotioglicerol (Sigma-Aldrich, cat. M1753-100ml), 1 ng/ml de BMP4 (Thermo Scientific, cat. PHC9534), 5 µM de CHIR 99031 e 10 µM de iRock.

Em D1, foi observada a formação de corpos embrióides sem troca de meio. Em D2, após o cultivo por 48 horas sem agitação, os corpos embrióides foram transferidos para tubos cônicos de 15 ml para decantação e o meio foi substituído, trocando-se o meio de diferenciação por meio de manutenção (meio HES), sendo este, livre de iRock e composto por DMEM/F12 com 20% de KnockOut™ Serum Replacement (KSR)

(Life Technologies, cat. 10828028)– 1% de penicilina/estreptomicina, 1% de aminoácidos não-essenciais (Sigma-Aldrich, cat. M7145-100ml), 1% de glutamax, 240 μ M de piruvato de sódio (Gibco, cat. 11360070-100mM) e 0,1% de b-mercaptoetanol.

Os corpos embrioides decantados foram ressuspensos em meio HES e adicionados em 2 poços de uma nova placa de 6 poços não aderente, onde permaneceram por mais 48 horas. Em D4, os corpos embrioides foram transferidos para placas de 24 poços (aproximadamente 3 a 4 por poço) pré-tratadas com Geltrex™ na concentração de 1:100. A troca de meio HES foi realizada a cada 48 horas e as células foram preservadas em cultivo até o D11.

Após a obtenção dos corpos embrioides (EB) oriundos da diferenciação espontânea, realizou-se o ensaio de imunofluorescência para a identificação das três camadas germinativas. Para isso, foi utilizado como controle positivo a linhagem de célula-tronco embrionária HES. Em D11, para a realização da lavagem dos EB aderidos na placa de 24 poços, foi adicionado 500 μ L da solução PBS 1x por poço durante 10 minutos, em seguida, o sobrenadante foi descartado e este processo foi repetido por 3 vezes. Para fixação dos EB, foi adicionado 500 μ L de PFA 4% por poço durante 30 minutos, após esse tempo o sobrenadante foi descartado.

Foi adicionado 500 μ L de PBS 1x por poço com o objetivo de remover o excesso de PFA 4%, em seguida, o sobrenadante foi descartado e a placa vedada com parafilme e armazenada no refrigerador em temperatura de 6°C a 8°C. Para a realização da permeabilização, as lamínulas foram transferidas para placa de 24 poços, foi adicionado 500 μ L da solução PBS+Triton 0,3% por poço e colocado no agitador em temperatura ambiente por 10 minutos, logo após o sobrenadante foi descartado. Esse processo foi repetido por 3 vezes. Em seguida, iniciou-se a etapa de bloqueio adicionando 500 μ L da solução PBS+BSA 2% por poço e colocado no agitador em temperatura ambiente durante 30 minutos.

Após esse tempo, o sobrenadante foi descartado. A marcação dos anticorpos foi realizada em solução PBS+BSA 3% com os anticorpos primários anti-rabbit HNF4, marcador de endoderma, diluição 1:100 (Abcam, cat. AB92378); anti-mouse NESTINA, marcador de ectoderma, diluição 1:150 (Milipore, cat. MAB5326); anti-rabbit BRACHYURY, marcador de mesoderma, diluição 1:100 (Cell Signalling, cat. 12312S).

Os EB foram incubados com os anticorpos primários em câmara escura e úmida e colocados no refrigerador em temperatura 6°C a 8°C de forma overnight. Após o período de incubação, iniciou-se a etapa de lavagem, foi adicionado 500 µL de PBS 1x por poço e a placa colocada no agitador em temperatura ambiente por 10 minutos, em seguida, o sobrenadante foi descartado. Esse processo se repetiu por 3 vezes. Logo após, foi realizada a marcação com os anticorpos secundários: Anti-Rabbit IgG, Alexa Fluor 594, diluição 1:4000 (Invitrogen, cat. A11012); Anti-Mouse IgG, Alexa Fluor 488, diluição 1:4000 (Invitrogen, cat. A11029). Os EB foram incubados com os anticorpos secundários em câmara escura e úmida, colocados no refrigerador em temperatura 6°C a 8°C por 2 horas. Após o período de incubação repetiu-se a etapa de lavagem conforme descrita anteriormente. Para concluir, foi adicionado o DAPI nas lamínulas (cerca de 20 µL em cada), deixando por 15 minutos. O DAPI é descrito como um marcador de viabilidade celular que possui afinidade por material genético expresso no núcleo das células, mas sua utilização se concentra em identificar células que estão mortas ou com membranas comprometidas. Em seguida, as lamínulas foram lavadas 3 vezes com PBS 1x por 10 minutos, foi realizada uma última lavagem com água destilada e, para finalizar a montagem das lâminas, as mesmas foram seladas utilizando 10 µl do Fluoromount™ (Thermo Fisher Scientific). As imagens foram adquiridas em microscópio confocal LSM 900 (ZEISS), com objetiva de 20x e 40x. A lista com todos os anticorpos descritos pode ser observada na Tabela 4.

Tabela 4 — Lista dos anticorpos primários e secundários que foram usados no ensaio de imunofluorescência da diferenciação espontânea.

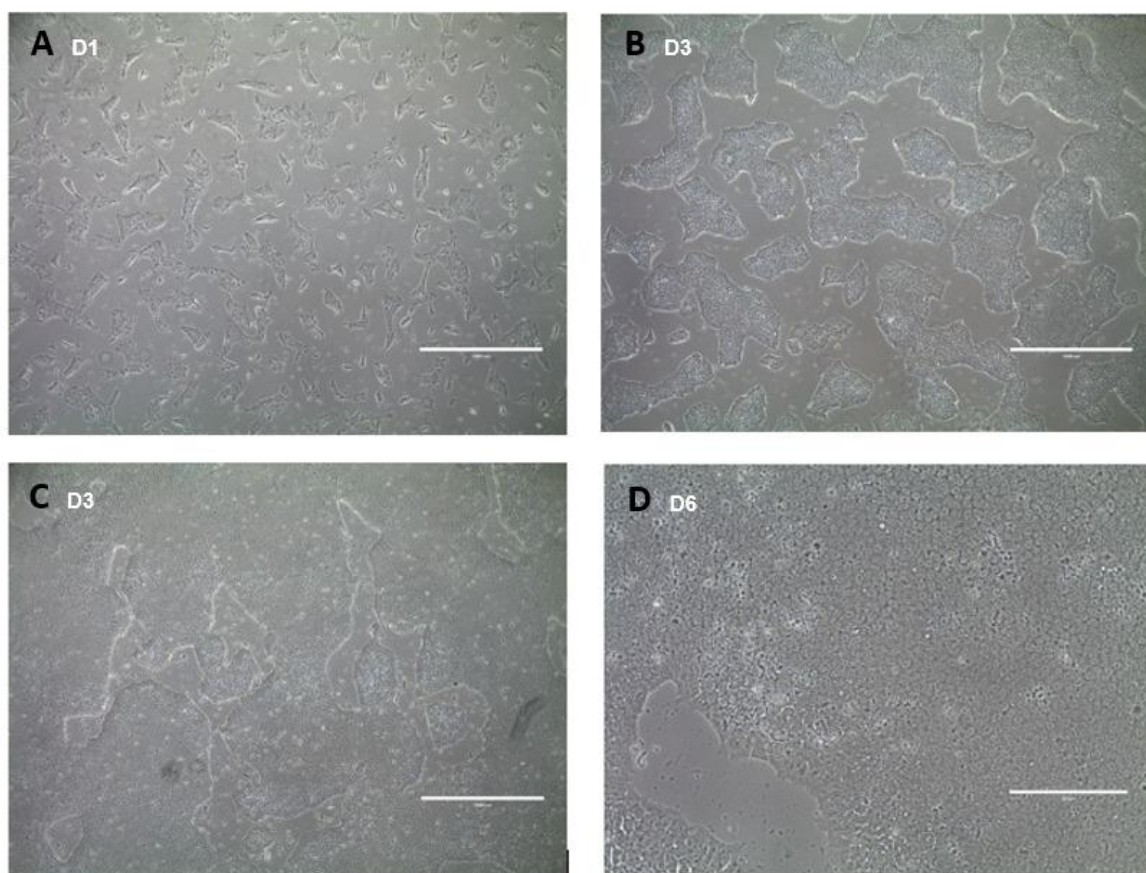
	Anticorpo	Catálogo	Marca
Anticorpos primários	HNF4	AB92378	Abcam
	NESTINA	MAB5326	Milipore
	BRACHYURY	12312S	Cell Signalling
Anticorpos secundários	Anti-Rabbit IgG	A11012	Invitrogen
	Anti-Mouse IgG	A11029	Invitrogen

5 RESULTADOS

5.1 Morfologia da iPSC Pac 48

A iPSC Pac 48 armazenada no biobanco foi descongelada e expandida em cultura até alcançar quantidade suficiente de células entre 2×10^6 e 6×10^6 variando de acordo com a realização dos experimentos relacionados a caracterização da pluripotência. As imagens representativas que demonstram as características morfológicas, formação de colônias, expansão e confluência adequada da iPSC podem ser observadas na Figura 6. Foi observado que ao final as células apresentavam morfologia característica de células-tronco, com colônias compactas e bordas definidas, além de expressarem uma alta relação núcleo/citoplasma (Figura 6D).

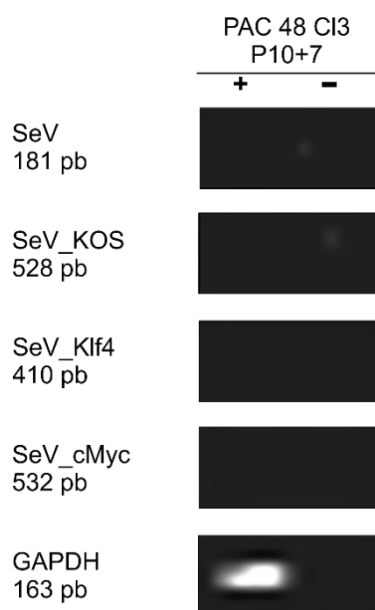
Figura 6 — Fotomicrografias capturadas por microscópio digital de fluorescência invertida da iPSC Pac 48. (A) iPSC Pac 48 em D1 sob objetiva de 4x após o descongelamento. Podemos observar a formação das colônias da iPSC apresentando morfologia irradiada característica da presença de iRock, que é definido como inibidor de apoptose. Barra de escala: 1000 μm . (B) iPSC Pac 48 em D3 sob objetiva de 4x onde observamos a formação de colônias. Barra de escala: 1000 μm . (C) iPSC Pac 48 em D5 sob objetiva de 4x em processo de expansão. Barra de escala: 1000 μm . (D) iPSC Pac 48 em D6 sob objetiva de 20x após alcançarem a confluência de aproximadamente 80%, evidenciando as características morfológicas das células-tronco pluripotentes. Barra de escala: 200 μm .



5.2 Avaliação da presença do vetor viral Sendai da iPSC Pac 48 por RT-PCR

Para avaliar a presença dos transcritos virais provenientes da reprogramação celular via transdução viral pelo conjunto de vetores Sendai, foram utilizados primers específicos para a amplificação de SeV, KOS, KLF4 e cMYC, como podemos observar na Figura 7. Para controle positivo da reação foi usado GAPDH onde foi avaliada a expressão de mRNA em virtude desse gene ser essencialmente expresso.

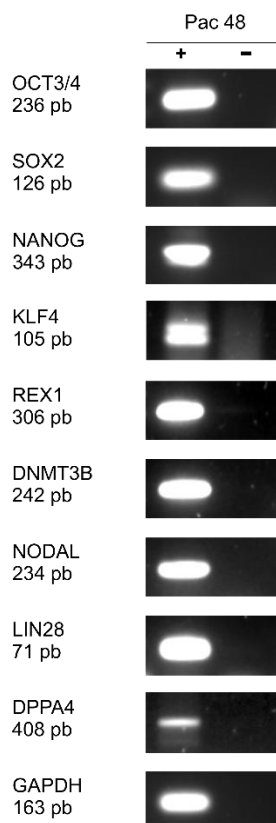
Figura 7 — Painel do resultado da avaliação da presença de transcritos virais por RT-PCR. A iPSC Pac 48 não apresentou amplificação para os transcritos virais utilizados na reprogramação celular SeV, KOS, KLF4 e cMYC. GAPDH foi utilizado como controle positivo da reação. A coluna indicada pelo sinal “-” representa o controle negativo obtido durante a síntese de cDNA, no qual não foi adicionada a enzima transcriptase reversa, evidenciando que não há contaminação das amostras por DNA gênomico.



5.3 Caracterização da pluripotência da iPSC Pac 48 por RTR-PCR

Para analisar a pluripotência da iPSC Pac 48 foi utilizado como controle interno da reação o GAPDH. E para amplificar os genes relacionados a pluripotência foram usados os primers específicos DNMT3B, DPPA4, KLF4, LIN28, NANOG, NODAL, OCT3/4, REX1 e SOX2 conforme representado na Figura 8. Conforme discutido, estes genes desempenham um papel fundamental na manutenção da pluripotência das células-tronco, além de serem geralmente transcritos em células-tronco embrionárias (Takashi & Yamanaka, 2006). Os produtos amplificados foram avaliados por eletroforese em gel de agarose, em seguida, foi observada a presença de bandas previstas para os genes relacionados à pluripotência, o que confirma a capacidade de diferenciação em diferentes tipos celulares da iPSC.

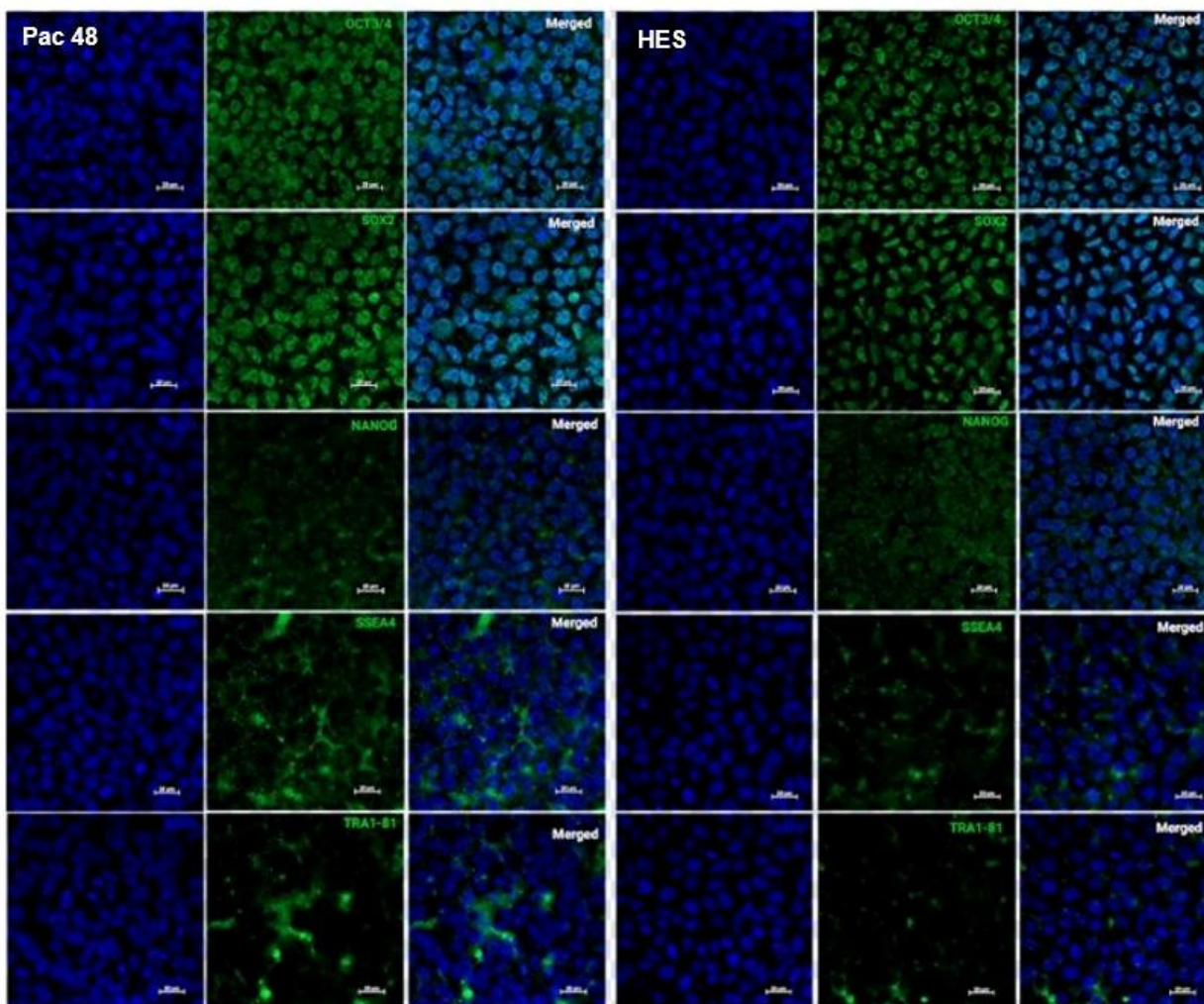
Figura 8 — Painel de resultado da caracterização da pluripotência da iPSC Pac 48 por RT-PCR. As imagens das bandas resultantes da expressão dos transcritos de pluripotência. A coluna indicada pelo sinal “-” representa o controle negativo obtido durante a síntese de cDNA, no qual não foi adicionada a enzima transcriptase reversa, evidenciando que não há contaminação das amostras por DNA gênomico.



5.4 Caracterização da pluripotência da iPSC Pac 48 por imunofluorescência

Para avaliar a expressão de proteínas relacionadas a pluripotência por imunofluorescência, foram utilizados os anticorpos intracelulares OCT3/4, NANOG e SOX2 e os anticorpos de superfície/membrana SSEA4 e TRA1-81 conforme representado na Figura 9. Esses indicadores representam a capacidade das células-tronco de manter seu potencial de diferenciação em outras linhagens celulares. A linhagem celular embrionária HES foi utilizada como controle positivo por ser conhecida uma célula pluripotente.

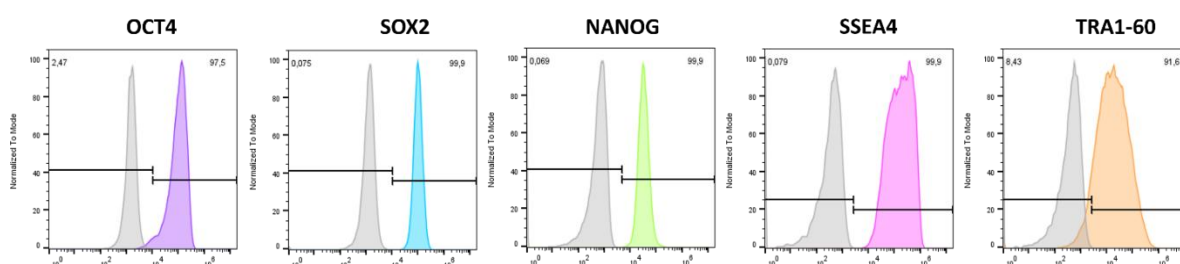
Figura 9 — As imagens adquiridas por microscopia confocal sob objetiva de 40x consistem na avaliação da expressão de proteínas relacionadas a pluripotência por imunofluorescência. Foi observada a expressão das proteínas intracelulares OCT3/4, SOX2, NANOG e das proteínas de superfície SSEA4 e TRA1-81. Os núcleos foram corados com DAPI (azul). Tanto o iPSC Pac 48 quanto o controle positivo HES expressaram todas as cinco proteínas investigadas. Barra de escala: 20 μ m.



5.5 Caracterização da pluripotência da iPSC Pac 48 por citometria de fluxo

Para a identificação quantitativa das proteínas intracelulares e de superfície relacionadas a pluripotência da iPSC Pac 48, foi realizada a citometria de fluxo. Os marcadores intracelulares apresentaram a expressão de 97,5% para OCT3/4, 99,9% para SOX2 e 99,9% para NANOG, assim como os marcadores de superfície 99,9% para SSEA4 e 91,6% para TRA1-60, conforme observado na Figura 10. Esse resultado corrobora a obtenção de células-tronco pluripotentes.

Figura 10 — Avaliação da expressão de proteínas de pluripotência por citometria de fluxo. Foi analisada e quantificada a expressão das proteínas intracelulares OCT3/4 pico em lilás (97,5%); SOX2 pico em azul (99,9%); NANOG pico em verde (99,9%); e das proteínas de superfície SSEA4 pico em rosa (99,9%); TRA1-60 pico em laranja (91,6%). As células não marcadas são representadas pelo pico em cinza.



5.6 Caracterização da pluripotência da iPSC Pac 48 por diferenciação espontânea

Para finalizar a caracterização da pluripotência da iPSC Pac 48 foi realizado o ensaio de diferenciação espontânea para avaliar a capacidade de diferenciação das mesmas nos três folhetos embrionários: mesoderma, ectoderma e endoderma. Observou-se a formação e a proliferação de corpos embrióides nos três primeiros dias (D1, D2 e D3) do protocolo de diferenciação indicando as alterações morfológicas características desse processo que resultam na formação das três camadas germinativas. Após 11 dias de cultivo (D11), no final do ensaio de diferenciação, as células apresentaram estruturas fusiformes e alongadas características de diferenciação em mesoderma, acompanhadas de densificação celular e variações na conformação das células características de diferenciação em ectoderma e endoderma

que são provenientes deste processo conforme representado na Figura 11. Para validar os resultados da diferenciação morfológica observados no desenvolvimento deste protocolo, realizou-se a análise de imunofluorescência que indicou a expressão de proteínas específicas relacionadas a cada linhagem germinativa identificando marcadores característicos de mesoderma (Brachyury), ectoderma (Nestina) e endoderma (HNF4) conforme representado na Figura 12.

Figura 11 — Fotomicrografias capturadas por microscópio digital de fluorescência invertida representativas da alteração na morfologia da iPSC no decorrer do protocolo de diferenciação espontânea. D1) iPSC Pac 48 após descongelamento, as células se encontravam aderidas apresentando morfologia de células pluripotentes (alta razão núcleo/citoplasma) e observou-se a formação dos primeiros corpos embrióides (EB) sob objetiva de 10x. Barra de escala: 400 μ m. D2) e D3) iPSC Pac 48, nota-se a proliferação de EB não aderentes sob objetiva de 10x. Em seguida, as células foram transferidas para placa de 24 poços que continham lamínulas de vidro. Barra de escala: 400 μ m. D11) iPSC Pac 48 se encontravam aderidas nas lamínulas de vidro e foi observado a existência de células com morfologias variadas sob objetiva de 4x. D11) iPSC Pac 48 sob objetiva de 10x evidenciando a diferenciação característica dos três folhetos embrionários.

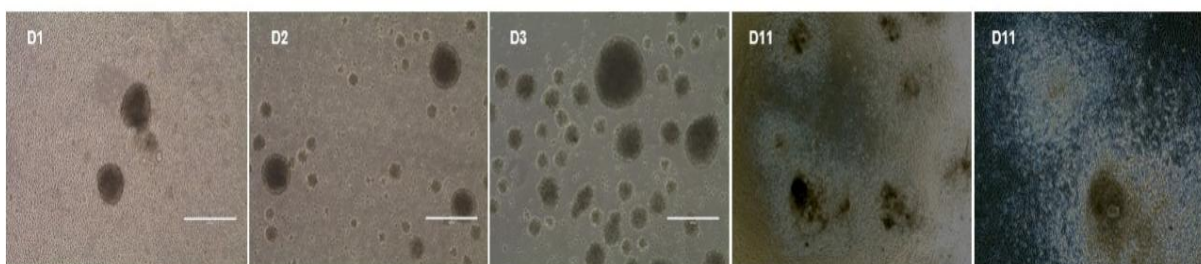
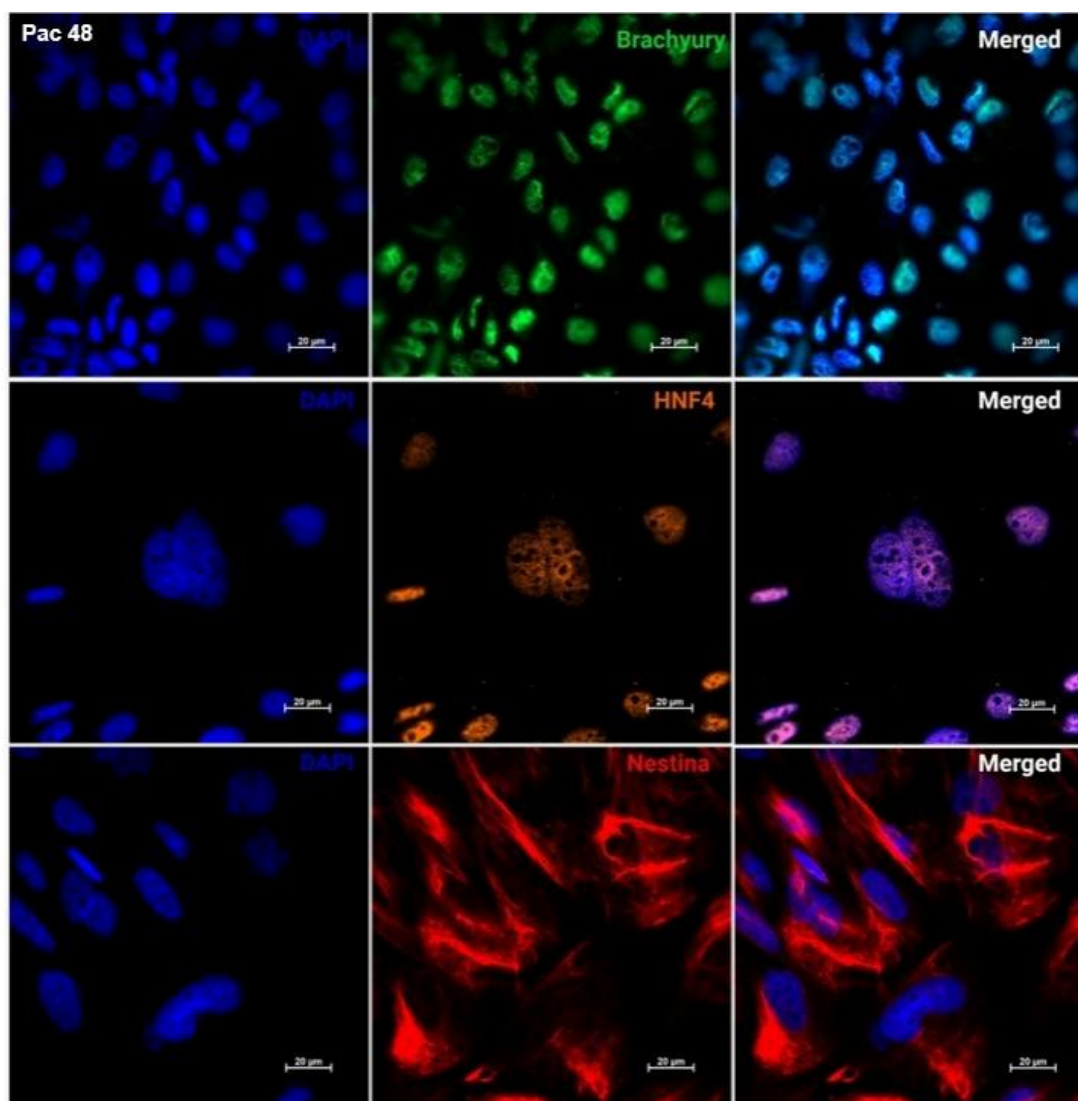


Figura 12 — Avaliação de diferenciação espontânea da iPSC Pac 48 por imunofluorescência.

Imagens adquiridas por microscopia confocal sob objetiva de 40x. Foi identificada a expressão de Brachyury (marcador de mesoderma) em verde, HNF4 (marcador de endoderma) em laranja e Nestina (marcador de ectoderma) em vermelho. O núcleo foi corado com DAPI em azul. A iPSC Pac 48 apresentou todos os marcadores analisados relacionados as três camadas germinativas evidenciando a sua característica pluripotente. Barra de escala: 20 μ m.



6 DISCUSSÃO

O presente estudo visou estabelecer um protocolo robusto de caracterização da pluripotência de iPSC a fim de se obter uma ferramenta que possibilite sua aplicação na bioengenharia de tecidos para colaborar com o desenvolvimento de modelagem de estudo de doenças, assim como na triagem de medicamentos e na medicina regenerativa.

Trabalhos como o de Takahashi e Yamanaka revolucionaram o campo da pesquisa em medicina de precisão ao demonstrar que células somáticas podem ser reprogramadas para um estado pluripotente, permitindo estudar alterações celulares específicas como disfunções mitocondriais, alterações na estrutura nuclear e doenças relacionadas ao envelhecimento (Takahashi e Yamanaka, 2006).

Nesse contexto, a caracterização da pluripotência da iPSC surge como uma ferramenta de extrema relevância, pois, por sua capacidade de ser pluripotente, possibilita a diferenciação em diversas linhagens celulares permitindo que estas sejam utilizadas de inúmeras formas, como por exemplo, na geração de esferóides e organóides, na recelularização de arcabouços hepáticos acelulares, no entendimento dos avanços em tratamentos das neoplasias que buscam resultados como a remissão da doença, auxiliando no estudo das degenerações provocadas pelo Alzheimer, Parkinson e HIV e transformando o campo da medicina e da bioengenharia ao permitir o desenvolvimento de terapias personalizadas, conforme visto anteriormente.

A caracterização da pluripotência das iPSC é considerada a etapa crítica e fundamental após a reprogramação de células somáticas. A validação científica e funcional relacionada à comprovação da reprogramação é descrita como a prova definitiva de que as células somáticas foram efetivamente reprogramadas para um estado semelhante ao das células-tronco embrionárias (Nimonkar, *et al.*, 2023). A sua relevância abrange diretamente a segurança, a validade e o potencial clínico e aplicabilidade dessas células.

Dessa forma, a caracterização minuciosa garante a identificação de colônias de células geradas quanto ao seu estado de pluripotência, possibilitando a capacidade de autorrenovação e de diferenciação em qualquer tipo celular derivado dos três folhetos germinativos: endoderma, mesoderma e ectoderma (Nimonkar, *et al.*, 2023).

Nesse sentido, a caracterização de pluripotência está diretamente ligada à capacidade de crescimento e proliferação contínua, possibilitando a comprovação dos mecanismos de autorrenovação ativos e necessários apresentados pelas iPSC que garantem um suprimento ilimitado de células para pesquisa e terapia (Pera, 2011).

A segurança em aplicações clínicas de células-tronco exige a prevenção da formação de teratomas, definidos como tumores. Esses tumores são um marcador de pluripotência descontrolada. Nas terapias celulares, o risco surge quando iPSC não diferenciadas ou mal caracterizadas são transplantadas, estimulando a tumorigênese (Takahashi e Yamanaka, 2006).

Para garantir a fidelidade de uso das iPSC na modelagem *in vitro* de doenças, como patologias hepáticas, cardíacas ou neurológicas, é imprescindível que essas células apresentem características genéticas e um potencial de diferenciação análogos aos das células embrionárias. A caracterização minuciosa é fundamental, pois assegura que as iPSC portadoras de mutações específicas possam ser diferenciadas eficientemente na linhagem celular comprometida, permitindo o estudo específico do fenótipo da patologia (Madson, *et al.*, 2015).

A comprovação do estado pluripotente das iPSC exige métodos de caracterização da pluripotência que especifique a morfologia, que confirme a expressão gênica e sua capacidade funcional. Para fins de comparação, foi observado na literatura o trabalho de Metzler e colaboradores (2020) onde relata-se a morfologia característica das iPSC derivadas das células mononucleares do sangue periférico (PBMC). Após o descongelamento, seguido da técnica de cultivo celular *in vitro*, onde ocorre processo de proliferação e expansão, a cultura observada foi descrita como colônias compactas com bordas definidas, além de expressar uma alta relação núcleo/citoplasma, que é uma característica comum de células-tronco de pluripotência induzida humanas (Metzler, *et al.*, 2020).

Vale ressaltar que nem todas as células-tronco expressam essa morfologia. As células-tronco mesenquimais, por exemplo, são classificadas como multipotentes e apresentam morfologia fibroblásticoide, alongada e fusiforme, com núcleo grande e oval, possuem um citoplasma estendido com duas ou mais projeções longas que se fixam à placa de cultura.

Após alcançarem confluência, suas colônias evidenciam características visuais similares a redemoinhos, que são comuns em células estromais, diferentemente do que é observado nas iPSC (Samsonraj, *et al.*, 2017). Nesse sentido, quando observadas no microscópio, notou-se que as colônias formadas resultantes da expansão da iPSC Pac 48 apresentavam as mesmas características morfológicas conforme descritas na literatura (Figura 6).

Entre os achados de outros autores relacionados a análise vírus Sendai por RT-PCR, podemos destacar o trabalho de Vlahos e colaboradores (2023) que, assim como descrito no desenvolvimento deste protocolo, também realizou a investigação da expressão de transcritos virais oriundos do conjunto de vetores virais Sendai, assim como usado na transdução da população enriquecida de eritroblastos resultantes da reprogramação das PBMC isoladas do sangue periférico do Pac 48 (doador saudável). Resumidamente, o Sendai (SeV) é um vírus de RNA de fita simples e sua função na reprogramação baseia-se em duas características principais: 1) o vetor SeV é geneticamente modificado, ou seja, desativado para replicação viral completa e patogenicidade e sua função é carregar os genes dos fatores de transcrição de pluripotência OCT4, SOX2, KLF4 e cMYC, conforme mencionado anteriormente (Takahashi e Yamanaka, 2006).

O vetor SeV transduz as células somáticas liberando o seu genoma de RNA no citoplasma, a transcrição e a replicação ocorrem no citoplasma da célula hospedeira, os fatores de transcrição são expressos em níveis elevados forçando a célula somática a reativar seu próprio circuito de pluripotência que resultam na expressão endógena de genes de pluripotência originando as iPSC (Takahashi e Yamanaka, 2006; Sarkar, *et al.*, 2024. 2) a função mais importante do vetor Sendai para aplicações clínicas é sua característica não integrativa. SeV é um vírus de RNA que realiza seu ciclo no citoplasma e não passa por uma fase de DNA, dessa forma, ele não possui a capacidade de inserir seu material genético ou os genes dos fatores de reprogramação no genoma do hospedeiro.

Após a célula atingir seu estado de pluripotência e começar o processo de divisão, o genoma viral e a expressão dos fatores se tornam progressivamente imperceptíveis e são eliminados da população celular resultando em iPSC ausentes de DNA viral (Fusaki, *et al.*, 2009; Desprat, *et al.*, 2025). Sendo assim, o resultado do

RT-PCR confirmou que a iPSC Pac 48 estava livre da expressão gênica dos transcritos virais derivados do Sendai (Figura 7), após o isolamento do clone e das passagens sucessivas provenientes do cultivo celular, conforme descrito no tópico 4 de Materiais e Métodos.

Diante disso, buscou-se evidenciar a importância da identificação qualitativa via RT-PCR da expressão gênica dos transcritos responsáveis pela manutenção da pluripotência característica de células embrionárias e que são definidos como fatores de transcrição e estão diretamente relacionados com a capacidade de diferenciação em diversos tipos celulares da iPSC. Um estudo desenvolvido por Kasai-Brunswick e colaboradores (2018) corroborou o resultado positivo do RT-PCR dos transcritos de pluripotência DMNT3B, DPPA4, KLF4, LIN28, NANOG, NODAL, OCT3/4, REX1 e SOX2 que identificamos na iPSC Pac 48, linhagem alvo da caracterização da pluripotência e de execução deste protocolo (Figura 8).

O gene DMNT3B codifica a DNA metiltransferase, uma enzima essencial para estabelecer padrões de metilação do DNA durante o desenvolvimento e na manutenção da identidade das células-tronco. Essa metilação é fundamental para o silenciamento de longo prazo de genes indesejados e para manter a integridade genômica das células pluripotentes (Mesquita *et al.*, 2015).

O DPPA4 codifica uma proteína nuclear que possui um domínio SAP (do inglês *Scaffold-Attachment Factor*) que se liga ao DNA e está envolvida na modificação da cromatina e na manutenção do estado epigenético ativo de genes alvo, sua expressão relaciona-se a células pluripotentes sendo essencial para a embriogênese e regulação de vias de sinalização para a ativação do genoma zigótico (Mesquita, *et al.*, 2015).

Já o KLF4 é importante para a indução e manutenção do estado de pluripotência. Ele atua promovendo a autorrenovação formando um complexo com OCT3/4 e SOX2 ligando-se as mesmas regiões genômicas, e age ativando a transcrição de NANOG que previne a diferenciação das células-tronco (Takahashi e Yamanaka, 2006).

O gene LIN28 codifica uma proteína de ligação ao RNA que possui duas isoformas, LIN28A e LIN28B, ambas promotoras de pluripotência, age inibindo o microRNAs let-7 e bloqueia seu processamento em microRNAs maduros colaborando com a manutenção do estado de pluripotência e as características de células

indiferenciadas. O LIN28 também foi identificado como regulador do metabolismo das células-tronco, mantendo a baixa função mitocondrial associada à pluripotência (Zhang *et al.*, 2016).

O transcrito NODAL é descrito como fator de crescimento (TGF- β) agindo como um sinalizador no desenvolvimento embrionário e atuando na manutenção da autorrenovação das iPSC. Seus substitutos mais comuns, Activina A e TGF- β 1, são amplamente utilizados em meios de cultura para manter o estado pluripotente. A interação de NODAL com outros fatores de transcrição promove a expressão de genes essenciais para a pluripotência, como NANOG e OCT4 (Hayes, *et al.*, 2021).

O gene REX1 é regulado pelo transcrito NANOG, tornando-se um dos responsáveis pela capacidade de autorrenovação da iPSC. Uma de suas funções é contribuir com a manutenção do estado indiferenciado da célula-tronco inibindo vias de sinalização, o que promovem a diferenciação. Também reduz a sua expressão quando as iPSC começam a se diferenciar sendo considerado um indicador sensível da perda de pluripotência (Mesquita, *et al.*, 2015).

A visualização por imunofluorescência das proteínas responsáveis pela manutenção da pluripotência complementou o resultado encontrado no RT-PCR, avaliando a expressão proteica dos marcadores intracelulares OCT3/4, SOX2 e NANOG e os de superfície SSEA4, TRA-1-81. OCT3/4 é responsável pela expressão de genes que são essenciais para a autorrenovação e para a manutenção do estado pluripotente, e age também inibindo a expressão de genes que induzem a diferenciação. SOX2, que forma um complexo proteico junto a OCT3/4 ativando a expressão de genes como NANOG, que são fundamentais para o estado de autorrenovação e expressão da pluripotência da célula, e atua colaborando com OCT3/4 na inibição de genes que induzem a diferenciação prematura. NANOG, garante a estabilidade celular contra o ambiente externo, sendo sua função a de inibir a transcrição de genes que induzem a diferenciação em resposta a sinais externos (Kimura, *et al.*, 2021).

Já nos marcadores de superfície, o SSEA4 é um antígeno glicolipídico de superfície celular agindo como marcador de pluripotência em células humanas e também marcador de subpopulações em células-tronco adultas. A expressão de SSEA4 fica ausente quando a célula pluripotente inicia o processo de diferenciação,

com isso, torna-se um indicador importante de iPSC em seu estado indiferenciado (Nimonkar, *et al.*, 2023). TRA-1-81 é um epítipo, sítio de ligação de anticorpo, da glicoproteína de superfície celular (GPC) expresso por células-tronco humanas pluripotentes, assim como SSEA4, é um forte marcador de células-tronco pluripotentes indiferenciadas (Wan, *et al.*, 2023). Portanto, a expressão desses marcadores permite a visualização da localização e intensidade das mesmas nas colônias de iPSC geradas a partir das PBMC (Kimura, *et al.*, 2021).

As iPSC Pac 48 apresentaram marcação nuclear e marcação de superfície para esses fatores, em um padrão similar ao das células-tronco embrionárias HES, que foram utilizadas como controle positivo (Figura 9). Esses resultados confirmam a característica pluripotente da iPSC em questão e a capacidade de reprodução de uma das técnicas estabelecida neste estudo, assim como os achados encontrados por Wan e colaboradores (2023), no qual foi realizada a caracterização da iPSC derivada de PBMC de um doador saudável utilizando a mesma técnica de imunofluorescência.

Adicionalmente, a citometria de fluxo foi utilizada para avaliar a expressão de marcadores intracelulares que demonstraram marcação de 97,5% em OCT3/4, 99,9% em SOX2, 99,9% em NANOG e de marcadores de superfície que apresentaram 99,9% em SSEA4 e 91,6% em TRA-1-60 de marcação relacionados à pluripotência (Figura 10). O marcador TRA1-60 é um epítipo glicosídico associado a uma proteína de membrana chamada Podocalixina (PODXL). O anticorpo monoclonal TRA-1-60 reconhece especificamente essa estrutura de glicano composta de ácido siálico presente na superfície celular. Sua principal função é sinalizar o estado indiferenciado e plenamente reprogramado das iPSC (Natunen, *et al.*, 2021).

Os resultados confirmaram que as iPSC Pac 48 expressaram esses fatores, indicando que as mesmas apresentam características pluripotentes. A relevância desses resultados está em correlação com a literatura existente, que mostra que a citometria é uma técnica sensível, quantitativa e eficaz para avaliação do estado pluripotente, como destacado por Vlahos e colaboradores (2023) e Kasai-Brunswick e colaboradores (2018), no qual ambos trabalhos utilizaram a citometria de fluxo para analisar a expressão de marcadores específicos de células-tronco embrionárias humanas, destacando o SSEA4 e TRA-1-60 que são definidos como marcadores padrão em análise de iPSC, especialmente em conjunto com fatores nucleares como

OCT3/4 e NANOG. As características dos genes e marcadores da pluripotência utilizadas neste estudo podem ser observadas na Tabela 5.

Tabela 5 — Lista das características dos genes e marcadores da pluripotência utilizados neste estudo.

GENE	CARACTERÍSTICAS
C-Myc	REGULAÇÃO POSITIVA DE PROLIFERAÇÃO CELULAR E AFROUXAMENTO DA ESTRUTURA DA CROMATINA
DMNT3B	CODIFICA A DNA METILTRANSFERASE, ENZIMA RESPONSÁVEL PELO DESENVOLVIMENTO E MANUTENÇÃO DA IDENTIDADE DAS CÉLULAS-TRONCO
DPPA4	CODIFICA UMA PROTEÍNA NUCLEAR (SAP), SENDO ESSENCIAL PARA EMBRIOGÊNESE
KLF4	REGULAÇÃO POSITIVA DE PROLIFERAÇÃO CELULAR E PREVINE A DIFERENCIAÇÃO DAS CÉLULAS-TRONCO
LIN28	CODIFICA UMA PROTEÍNA DE LIGAÇÃO AO RNA INIBINDO LET-7, COLABORA COM A MANUTENÇÃO DO ESTADO DE PLURIPOTÊNCIA E INDIFERENCIAÇÃO
NANOG	RESPONSÁVEL PELA AUTORRENOVAÇÃO E EXPRESSÃO DA PLURIPOTÊNCIA INIBINDO GENES QUE INDUZEM A DIFERENCIAÇÃO
NODAL	É UM FATOR DE CRESCIMENTO, AGE COMO SINALIZADOR NO DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO E AUTORRENOVAÇÃO DAS iPSC
OCT3/4	REGULAÇÃO POSITIVA DE CÉLULAS-TRONCO EMBRIONÁRIAS E REGULAÇÃO NEGATIVA DE GENES DE DIFERENCIAÇÃO
REX1	REGULADO POR NANOG, É RESPONSÁVEL PELA CAPACIDADE DE AUTORRENOVAÇÃO DA iPSC
SOX2	REGULAÇÃO POSITIVA DE CÉLULAS-TRONCO EMBRIONÁRIAS E REGULAÇÃO NEGATIVA DE GENES DE DIFERENCIAÇÃO
TRA1-81	É UM EPÍTOPO (SÍTIO DE LIGAÇÃO COM ANTICORPO), SENDO UM MARCADOR DE EXPRESSÃO DA PLURIPOTÊNCIA
TRA1-60	É UM EPÍTOPO GLICOSÍDICO, SUA FUNÇÃO É SINALIZAR O ESTADO INDIFERENCIADO E PLENAMENTE REPROGRAMADO DA iPSC
SSEA4	É UM ANTÍGENO GLICOLIPÍDICO, SENDO UM FORTE MARCADOR DE EXPRESSÃO DA PLURIPOTÊNCIA DE CÉLULAS HUMANAS

Fonte: Débora Alves Comune.

Adicionalmente, realizou-se o ensaio de diferenciação espontânea a fim de confirmar funcionalmente os resultados achados quanto à caracterização da pluripotência da iPSC Pac 48. A principal condição *in vitro* para evidenciar a diferenciação dos três folhetos é observar que as iPSCs se agregam em suspensão,

formando estruturas tridimensionais que imitam o estágio inicial de desenvolvimento embrionário definidos como corpos embrióides (EB).

As iPSC quando alcançam sua fase exponencial de cultivo passam pelo processo de indução utilizando o meio de diferenciação enriquecido com StemPro 34 SFM, glutamax, ácido ascórbico, monotioglicerol, BMP4 e CHIR. Essas citocinas são responsáveis pela formação dos corpos embrióides. Após a formação dos EB, as células necessitam de um meio de manutenção que possibilite a expansão das mesmas em monocamadas resultando na expressão diferenciada do endoderma, mesoderma e ectoderma (Mesquita, *et al.*, 2015). Nesse sentido, os resultados obtidos neste trabalho revelaram a presença da diferenciação celular por meio da morfologia em células de endoderma, mesoderma e ectoderma.

O surgimento de células alongadas e fusiformes semelhantes a fibroblastos é característica de células do mesoderma. A formação de células achatadas, com formato poligonal e dispostas em camadas planas que se assemelham a epitélios é característica de diferenciação em ectoderma e endoderma (Weatherbee, *et al.*, 2019). Podemos observar (Figura 11) as características morfológicas citadas no D11, fase final do protocolo de diferenciação espontânea, onde as células encontram-se aderidas em monocamadas nas lamínulas da placa de 24 poços.

A análise por imunofluorescência da cultura submetida a diferenciação espontânea indicou a expressão de proteínas específicas relacionadas a cada linhagem germinativa identificando marcadores característicos de mesoderma, ectoderma e endoderma. Diante disso, foi possível observar a expressão dos marcadores Brachyury (mesoderma), HNF4 (endoderma) e Nestina (ectoderma).

A análise molecular do RT-PCR que visa identificar os genes que representam os três folhetos embrionários e que reforçam os resultados descobertos até o presente momento encontra-se em andamento. Esses dados corroboram com estudos prévios, como os de Takahashi e Yamanaka (2006), que evidenciaram que células-tronco pluripotentes induzidas têm capacidade de diferenciação nos três folhetos embrionários quando mantidas em condições apropriadas. Além disso, destaca-se por similaridade, apesar de ser utilizado na literatura e não dispor de tantas opções de caracterização, o estudo de Nimonkar e colaboradores (2023) que fizeram o ensaio de diferenciação espontânea para caracterizar as iPSC derivadas

do PBMC e reprogramadas via transdução utilizando o vírus Sendai de uma doadora adulta saudável (Nimonkar, *et al.*, 2023).

No decorrer do processo de aprimoração deste trabalho, buscou-se em diferentes artigos quais eram as ferramentas de caracterização utilizadas por outros autores e colaboradores que validassem os resultados produzidos, e foi identificado que é possível realizar a caracterização das iPSC utilizando técnicas, marcadores, anticorpos, citocinas e a pesquisa de transcritos de forma parcial. De acordo com os achados na literatura apresentados anteriormente, percebe-se que foram utilizados um compilado de técnicas para realizar a caracterização da pluripotência da iPSC Pac 48.

Vale pontuar que alguns dos artigos pesquisados e usados como base para o desenvolvimento deste protocolo de caracterização não utilizaram todas as técnicas que realizamos no presente estudo. Foi reproduzido neste estudo diversas técnicas aplicadas por outros autores e colaboradores que fundamentam este trabalho. Com intuito de desenvolver e estabelecer um protocolo robusto, buscou-se na literatura tecnologias abrangentes que resultassem na validade da caracterização da pluripotência das iPSC.

Nesse sentido, a linhagem de iPSC poderá ser utilizada como controle saudável para diversos modelos de doenças *in vitro* e consequentemente para o estudo de seus mecanismos fisiopatológicos subjacentes. A tecnologia das iPSC transformou a pesquisa *in vitro*. As células iPSC humanas apresentaram morfologia, proliferação, antígenos de superfície, expressão gênica, estado epigenético de genes específicos de células pluripotentes e atividade da telomerase semelhantes às células-tronco embrionárias humanas. Portanto, surgiu como alternativa ao uso de células-tronco embrionárias (ESC) devido às controvérsias éticas que dificultam as aplicações das células ESC humanas (Takahashi & Yamanaka, 2006). Sendo assim, o presente estudo possibilitou o desenvolvimento de uma ferramenta importante que buscou contribuir de forma alternativa a futuras aplicações na bioengenharia de tecidos e medicina regenerativa.

7 CONCLUSÃO

Os resultados deste trabalho demonstram êxito na caracterização da pluripotência das iPSC de indivíduo saudável utilizando integralmente as técnicas descritas na literatura por outros autores e colaboradores que fundamentam este estudo. Foi possível cultivar as iPSC de indivíduo saudável a partir do isolamento das células mononucleares do sangue periférico, avaliar a presença do vetor viral Sendai por RT-PCR, realizar a caracterização da pluripotência da iPSC por RT-PCR, avaliar a caracterização da pluripotência por citometria de fluxo, analisar a caracterização da pluripotência da iPSC por imunofluorescência e efetuar a caracterização da pluripotência por diferenciação espontânea. A excelência na identificação da expressão de marcadores como fatores de transcrição e proteínas intracelulares e de superfície de forma qualitativa e quantitativa, reflete o potencial da aplicação dessa tecnologia como alternativa inovadora para a bioengenharia de tecidos, auxiliando no estudo de modelagem de doenças, na pesquisa de novos fármacos e a medicina regenerativa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE TRANSPLANTE DE ÓRGÃOS (ABTO). Registro Brasileiro de Transplantes (RBT): dados numéricos da doação/transplante de órgãos e tecidos no Brasil. São Paulo, [s.n.], Ano da Edição. Disponível em: http://www.abto.org.br/abtov03/Upload/RBT/rbt_completo_ano.pdf. Acesso em: 1 dez. 2025.

ACUN, A. et al. Human-Origin iPSC-Based Recellularization of Decellularized Whole Rat Livers. *Bioengineering (Basel)*, v. 9, n. 5, p. 219, 2022.

ALBERTS, B. et al. (Org.). *Biologia molecular da célula*. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.

ASADI, M. et al. Hepatic cell-sheet fabrication of differentiated mesenchymal stem cells using decellularized extracellular matrix and thermoresponsive polymer. *Biomed Pharmacother*, v. 134, p. 111096, fev. 2021.

BAYARSAIKHAN, D. et al. A Study on iPSC-Associated Factors in the Generation of Hepatocytes. *Tissue Eng Regen Med*, v. 21, n. 8, p. 1245-1254, dez. 2024.

BERTHIAUME, F.; MAGUIRE, T. J.; YARMUSH, M. L. Tissue engineering and regenerative medicine: history, progress, and challenges. *Annu Rev Chem Biomol Eng*, v. 2, p. 403-30, 2011.

CURRY, E. L. et al. Using induced pluripotent stem cells as a tool for modelling carcinogenesis. *World J Stem Cells*, v. 7, n. 2, p. 461-9, 26 mar. 2015.

DEMETRIOU, A. A. et al. Human liver cell transplantation: a preliminary report. *Ann Surg*, v. 217, n. 6, p. 639-47; discussion 647-9, 1993.

DESPRAT, R. et al. Somatic cell reprogramming from different origins and donors into iPSC, with four factors OSKM using viral Sendai vectors. *Stem Cell Res*, v. 86, p. 103736, ago. 2025.

DHAWAN, A.; MITRY, R. R.; HUGHES, R. D. Hepatocyte transplantation for liver-based metabolic disorders. *J Inherit Metab Dis*, v. 29, n. 4, p. 431-5, 2006.

DIAS, M. L.; PARANHOS, B. A.; GOLDENBERG, R. C. D. S. Liver scaffolds obtained by decellularization: A transplant perspective in liver bioengineering. *J Tissue Eng*, v. 13, p. 20417314221105305, 20 jun. 2022.

DOSS, M. X.; SACHINIDIS, A. Current Challenges of iPSC-Based Disease Modeling and Therapeutic Implications. *Cells*, v. 8, n. 5, p. 403, 30 abr. 2019.

ELITT, M. S.; BARBAR, L.; TESAR, P. J. Drug screening for human genetic diseases using iPSC models. *Hum Mol Genet*, v. 27, n. R2, p. R89-R98, 1 ago. 2018.

FENG, S. et al. The future of liver transplantation. *Hepatology*, v. 80, n. 3, p. 674-697, 1 set. 2024.

FRIEND, P. J.; IMBER, C. J. Current status of liver transplantation. *Methods Mol Biol*, v. 333, p. 29–46, 2006.

GASPAR, J. A. et al. Unique metabolic features of stem cells, cardiomyocytes, and their progenitors. *Circ Res*, v. 114, n. 8, p. 1346-60, 11 abr. 2014.

GINÈS, P. et al. Liver cirrhosis. *Lancet*, v. 398, n. 10308, p. 1359-1376, 9 out. 2021.

GORDON, R. D. et al. Liver transplantation under cyclosporine: a decade of experience. *Transplant Proc*, v. 23, n. 1 Pt 2, p. 1393-6, fev. 1991.

GRAMIGNOLI, R. et al. Clinical hepatocyte transplantation: practical limits and possible solutions. *Eur Surg Res*, v. 54, p. 162–77, 2015.

GUIMARÃES, J. S. F. et al. Burden of liver disease in Brazil, 1996-2022: a retrospective descriptive study of the epidemiology and impact on public healthcare. *Lancet Reg Health Am*, v. 33, p. 100731, 19 abr. 2024.

HAYES, K.; KIM, Y. K.; PERA, M. F. A case for revisiting Nodal signaling in human pluripotent stem cells. *Stem Cells*, v. 39, n. 9, p. 1137-1144, set. 2021.

HOU, P. et al. Pluripotent stem cells induced from mouse somatic cells by small-molecule compounds. *Science*, v. 341, n. 6146, p. 651-4, 9 ago. 2013.

IBARS, E. P. et al. Hepatocyte transplantation program: Lessons learned and future strategies. *World J Gastroenterol*, v. 22, n. 2, p. 874-86, 14 jan. 2016.

JAIN, A. et al. Long-term survival after living transplantation in 4,000 consecutive patients at a single center. *Ann Surg*, v. 232, n. 4, p. 490–500, 2000.

JUNQUEIRA, L. C. U.; CARNEIRO, J. *Histologia Básica: Texto e Atlas*. 14. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2023.

KARAGIANNIS, P. et al. Induced Pluripotent Cells and Their Use in Human Models of Disease and Development. *Physiol Rev*, v. 99, n. 1, p. 79-114, 1 jan. 2019.

KASAI-BRUNSWICK, T. H. et al. Generation of patient-specific induced pluripotent stem cell lines from one patient with Jervell and Lange-Nielsen syndrome, one with type 1 long QT syndrome and two healthy relatives. *Stem Cell Res*, v. 31, p. 174-180, ago. 2018.

KHALID, K. et al. Stem Cell Therapy and Its Significance in HIV Infection. *Cureus*, v. 13, n. 8, p. e17507, 27 ago. 2021.

KLOSE, E. L. et al. Teratoma Assay for Testing Pluripotency and Malignancy of Stem Cells: Insufficient Reporting and Uptake of Animal-Free Methods—A Systematic Review. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 24, n. 4, p. 3879, 2023.

LANG, R. et al. Three-dimensional culture of hepatocytes on porcine liver tissue-derived extracellular matrix. *Biomaterials*, v. 32, n. 29, p. 7042-52, out. 2011.

MARTIN-LOPEZ, M.; FERNANDEZ-MUÑOZ, B.; CANOVAS, S. Pluripotent Stem Cells for Spinal Cord Injury Repair. *Cells*, v. 10, n. 12, p. 3334, 27 nov. 2021.

MEIRELLES JÚNIOR, R. F. et al. Liver transplantation: history, outcomes and perspectives. *Einstein (Sao Paulo)*, v. 13, n. 1, p. 149-52, jan.-mar. 2015.

MESQUITA, F. C. et al. Generation of human iPS cell line ihFib3.2 from dermal fibroblasts. *Stem Cell Res*, v. 15, n. 3, p. 445-8, nov. 2015.

METZLER, E. et al. Generation of two human induced pluripotent stem cell lines derived from myoblasts (MDCi014-A) and from peripheral blood mononuclear cells (MDCi014-B) from the same donor. *Stem Cell Res*, v. 48, p. 101998, out. 2020.

MORAWSKI, M. et al. Decellularized Liver Matrices for Expanding the Donor Pool-An Evaluation of Existing Protocols and Future Trends. *Biomolecules*, v. 15, n. 1, p. 98, 10 jan. 2025.

NAIR, Deepa G.; WEISKIRCHEN, Ralf. Recent advances in liver tissue engineering as an alternative and complementary approach for liver transplantation. *Current Issues in Molecular Biology*, v. 46, n. 1, p. 262-278, 29 dez. 2023.

NATUNEN, S. et al. The binding specificity of the marker antibodies Tra-1-60 and Tra-1-81 reveals a novel pluripotency-associated type 1 lactosamine epitope. *Glycobiology*, v. 21, n. 9, p. 1125-30, set. 2011.

NIMONKAR, M. M. et al. Generation and characterisation of a human induced pluripotent stem cell line, NIMHi007-A, from peripheral blood mononuclear cells derived from an adult healthy female. *Stem Cell Res*, v. 70, p. 103130, ago. 2023.

RAJESH, D. et al. Human lymphoblastoid B-cell lines reprogrammed to EBV-free induced pluripotent stem cells. *Blood*, v. 118, n. 7, p. 1797–1800, 2011.

ROBERTSON, M. J. et al. Recellularization of rat liver: An in vitro model for assessing human drug metabolism and liver biology. *PLoS One*, v. 13, n. 1, p. e0191892, 29 jan. 2018.

ROEHLEN, N.; CROUCHET, E.; BAUMERT, T. F. Liver Fibrosis: Mechanistic Concepts and Therapeutic Perspectives. *Cells*, v. 9, n. 4, p. 875, 3 abr. 2020.

ROMANAZZO, S. et al. Targeting cell plasticity for regeneration: From in vitro to in vivo reprogramming. *Adv Drug Deliv Rev*, v. 161-162, p. 124-144, 2020.

SARKAR, J. et al. Generation of human-induced pluripotent stem cell line from PBMC of healthy donor using integration-free Sendai virus technology. *Stem Cell Res*, v. 77, p. 103402, jun. 2024.

SEKI, T. et al. Generation of induced pluripotent stem cells from human terminally differentiated circulating T cells. *Cell Stem Cell*, v. 7, n. 1, p. 11–14, 2010.

SHINDE, V. et al. Human Embryonic and Induced Pluripotent Stem Cell Based Toxicity Testing Models: Future Applications in New Drug Discovery. *Curr Med Chem*, v. 23, n. 30, p. 3495-3509, 2016.

SHUPE, T. et al. Method for the decellularization of intact rat liver. *Organogenesis*, v. 6, n. 2, p. 134-6, abr.-jun. 2010.

STRICKER, S.; POLLARD, S. Reprogramming cancer cells to pluripotency: an experimental tool for exploring cancer epigenetics. *Epigenetics*, v. 9, n. 6, p. 798-802, jun. 2014.

TAKAHASHI, K.; YAMANAKA, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, v. 126, n. 4, p. 663–676, 2006.

TAKAHASHI, K. et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*, v. 131, n. 5, p. 861–872, 2007.

TAYLOR, D. A.; HOCHMAN-MENDEZ, C.; SAMPAIO, L. C. Are we close to bioengineering a human-sized, functional heart? *J Thorac Cardiovasc Surg*, v. 159, n. 4, p. 1357-1360, abr. 2020.

Telles-Silva KA, Pacheco L, Chianca F, Komatsu S, Chiovatto C, Zatz M, Goulart E. iPSC-derived cells for whole liver bioengineering. *Front Bioeng Biotechnol*. 2024 Feb 7;12:1338762. doi: 10.3389/fbioe.2024.1338762. PMID: 38384436; PMCID: PMC10879941.

TSOLALO, E.; YANNAKI, E. Stem cell-based regenerative opportunities for the liver: state of the art and beyond. *World J Gastroenterol*, v. 21, n. 42, p. 12334–50, 2015.

UYGUN, B. et al. Organ reengineering through development of a transplantable recellularized graft using decellularized liver matrix. *Nat Med*, v. 16, n. 7, p. 814–20, 2010.

VLAHOS, K. et al. Generation of iPSC lines from peripheral blood mononuclear cells from five healthy donors. *Stem Cell Res*, v. 69, p. 103109, jun. 2023.

WEATHERBEE, B. A. T.; CUI, T.; ZERNICKA-GOETZ, M. Modeling human embryo development with embryonic and extra-embryonic stem cells. *Dev Biol*, v. 474, p. 91-99, jun. 2021.

YAMANAKA, S. Pluripotent stem cell-based cell therapy—Promise and challenges. *Cell Stem Cell*, v. 27, n. 4, p. 523–531, 2020.

YU, J. et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*, v. 318, n. 5858, p. 1917–1920, 2007.

ZHANG, J. et al. LIN28 Regulates Stem Cell Metabolism and Conversion to Primed Pluripotency. *Cell Stem Cell*, v. 19, n. 1, p. 66-80, 7 jul. 2016.

ZHANG, W. et al. Liver cell therapies: cellular sources and grafting strategies. *Front Med*, v. 17, n. 3, p. 432-457, jun. 2023.

ZHANG, Y. et al. Hydrogel-Based Strategies for Liver Tissue Engineering. *Chemical Biology & Engineering*, v. 1, n. 11, p. 887-915, 24 set. 2024.