

# Influência dos fatores de Yamanaka na formação de teratomas

DARUZI CEZAR FELIPPE<sup>1</sup>, GUIDO LENZ<sup>2</sup>,

<sup>1</sup> Graduanda em Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

<sup>2</sup> Departamento de Biofísica, Universidade do Rio Grande do Sul



**UFRGS** **XXV SIC**  
PROFESQ Salão Iniciação Científica

**CB - Ciências Biológicas**

## INTRODUÇÃO

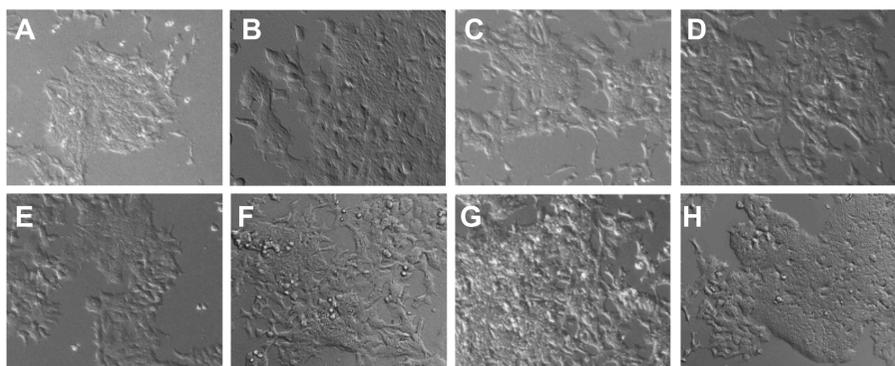
- ▶ Em 2006, Takahashi e Yamanaka publicaram um trabalho onde células fetais e adultas de camundongo tiveram o seu estado diferenciado alterado pela expressão de quatro fatores de transcrição, reprogramando uma pequena fração destas em **células pluripotentes induzidas (iPSCs)**.
- ▶ A aplicação terapêutica direta destas células ainda esbarra no seu potencial tumorigênico, uma vez que a formação de **teratomas** (crescimentos malignos contendo células dos três folhetos embrionários) é um dos principais testes para confirmar a obtenção de iPSCs.
- ▶ Ainda não existem ferramentas que permitem avaliar se uma célula derivada de iPSC é segura para se usada e por isso o desenvolvimento de uma metodologia que possa identificar e eliminar as células potencialmente tumorigênicas é fundamental para o uso seguro de células derivadas de iPSCs.

## OBJETIVO

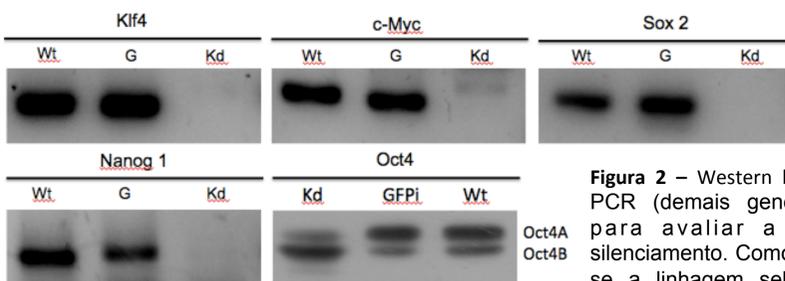
Estabelecer uma ferramenta para avaliar a agressividade das iPSCs e usá-la para testar estratégias genéticas e farmacológicas que possam diminuir a agressividade tumorigênica dessas células.

## RESULTADOS PARCIAIS

A morfologia das células após a transdução são apresentadas na Figura 1. Através de Western Blot para Oct4 e de RT-PCR para os demais genes, vimos redução ou ausência da expressão correspondente ao gene silenciado (Figura 2).



**Figura 1** – Células P19 foram cultivadas usando DMEM 10 % SFB e foram transduzidas usando shRNA. (A) P19 selvagem – P19.wt; (B) P19 transduzida com a sequência controle – P19.GFPi; (C) P19 silenciada para Nanog – P19.N1; (D) P19 silenciada para outra sequência de Nanog – P19.N2; (E) P19 silenciada para c-myc – P19.M; (F) P19 silenciada para Sox2 – P19.S; (G) P19 silenciada para Klf4 – P19.K; (H) P19 silenciada para Oct4 – P19.O. Aumento: 100x

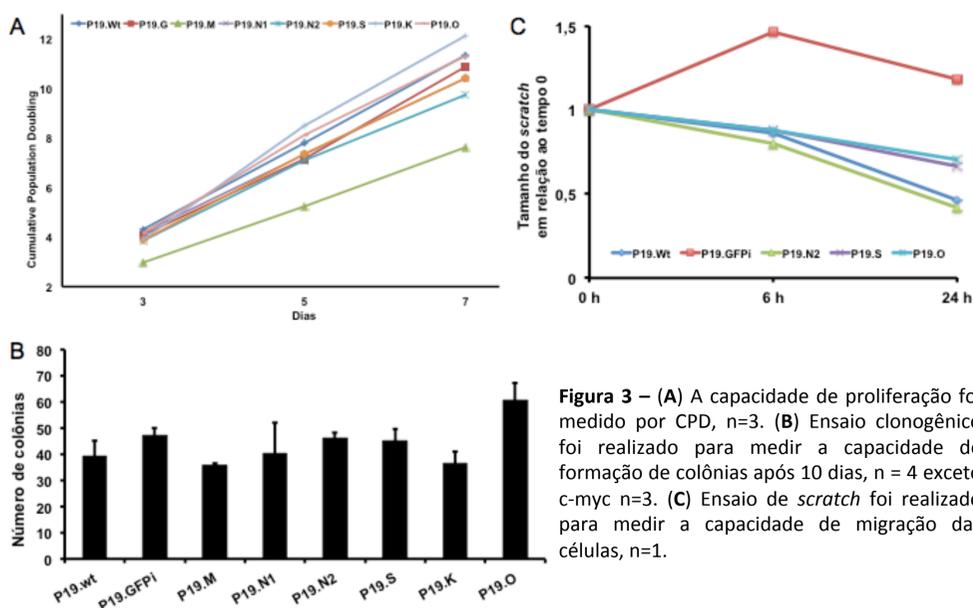


**Figura 2** – Western blot (Oct4) ou RT-PCR (demais genes) foi realizado para avaliar a eficiência do silenciamento. Como controle utilizou-se a linhagem selvagem (wt) e o controle da transdução (GFPi).

## METODOLOGIA

- ▶ Células da linhagem P19 (teratocarcinoma de camundongo semelhante às iPSCs) foram cultivadas em condição padrão com DMEM *Low Glucose* suplementado com soro fetal bovino 10 %;
- ▶ **Silenciamento por shRNA:** sequências de shRNA comerciais para Oct4, Sox2, Klf4, c-myc e Nanog (2 sequências) além de uma sequência controle foram transduzidas utilizando vetor lentiviral. Após, as células foram selecionadas com puomicina por 10 dias;
- ▶ **RT-PCR:** RNA das células foi extraído e quantificado. PCR utilizando primers específicos para os genes de interesse foi realizado para comprovar o silenciamento.
- ▶ **Western Blot:** Células foram lisadas e a concentração da proteína foi quantificada. Após realizou-se o *blotting* usando anticorpos específicos para as proteínas de interesse para comprovar o silenciamento.
- ▶ **Ensaio Clonogênico:** 150 células foram semeadas em placa de 6 poços e mantidas em cultura por 10 dias. Após foram fixadas por 5 minutos com metanol e coradas com cristal de violeta.
- ▶ **Cumulative Population Doubling (CPD):** 70000 células / poço foram semeadas. Population doubling (PD) foi determinado de acordo com a fórmula  $PD = \frac{[\log N(t) * \log N(t_0)]}{\log 2}$ , onde  $N(t)$  é o número de células por poço no dia da passagem e  $N(t_0)$  é o número de células semeadas na passagem anterior. A soma dos PDs foi plotada versus os dias de contagem.
- ▶ **Ensaio de Scratch:** Células foram semeadas em poços de placa 24. 24 horas após foi feito um risco na placa. A capacidade das células de fechar o risco (migrar) foi acompanhado por 6 e 24 horas. O tamanho do risco foi analisado via software ImageJ.

Células transduzidas apresentaram proliferação semelhante, exceto para as silenciadas para c-myc e Klf4 (Figura 3A). A capacidade de formar colônias não foi afetado pela transdução (Figura 3B). A capacidade de migração tendeu a ser menor nas silenciadas para Oct4 e Sox2 (Figura 3C).



**Figura 3** – (A) A capacidade de proliferação foi medido por CPD, n=3. (B) Ensaio clonogênico foi realizado para medir a capacidade de formação de colônias após 10 dias, n = 4 exceto c-myc n=3. (C) Ensaio de *scratch* foi realizado para medir a capacidade de migração das células, n=1.

## PERSPECTIVAS

- ▶ Comprovar o silenciamento das células transduzidas por Western blot;
- ▶ Finalizar a análise da migração;
- ▶ Verificar se as células transduzidas ainda possuem a capacidade de se diferenciar em células derivadas nos três folhetos embrionários.



**MODALIDADE DE BOLSA**

**IC voluntária**