

Diferenciação de linhagens celulares neuronais para o estudo da Doença de Alzheimer por reprogramação de queratinócitos humanos, a partir da indução de pluripotência

Ana Fátima Amorim, Nuno Domingues e Susana Silvestre

*Departamento de Biologia Vegetal, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, Ed.C2, 1749-016
Lisboa, Portugal*

Lisboa, 2010

ABREVIATURAS

A β - amiloide β
AD - *Alzheimer's Disease*
AP - *Alkaline Phosphatase*
APP - *Amyloid Precursor Protein*
ARCUT – *Artificial Restriction DNA Cutter*
BFP – *Blue Fluorescent Protein*
EGFP - *Enhanced Green Fluorescent Protein*
FMR1- *Fragile X Mental Retardation 1*
GSK3 β - *Glycogen synthase kinase-3 β*
HDAC - *Histone Deacetylase*
IDE - *Insulin degrading enzyme*
IRES - *Internal Ribosome Entry Site*
iPS - *Induced Pluripotent Stem*
KPI - *Kunitz protease inhibitors*
MAP - *Microtubule Associated Protein*
NFT - *Neurofibrillary Tangles*
ORF - *Open Reading Frame*
pcPNA – *pseudo-complementary Peptide Nucleic Acid*
PCR - *Polymerase Chain Reaction*
PHF - *Paired Helical Filament*
qRT-PCR - *quantitative Reverse Transcriptase - Polymerase Chain Reaction*
VPA - *Valproic Acid*
ZF – *Zinc Finger*
ZFN – *Zinc Finger nuclease*

ÍNDICE

Problema	4
Revisão bibliográfica	4
1. Reprogramação celular	4
2. Doença de Alzheimer	6
Objectivo	9
Metodologia	10
1. Indução de pluripotência	10
2. Recombinação homóloga em genes alvo para terapia da doença de Alzheimer.....	14
3. Diferenciação em neurónios	18
Protocolo resumido	24
Resultados esperados	26
Conclusões e perspectivas	30
Referências bibliográficas	31
Anexos	35

PROBLEMA

Diversos fenómenos são observados no cérebro de pacientes com Alzheimer, sendo o principal desafio perceber como todos estes se relacionam entre si, para a compreensão dos mecanismos e para a aquisição de novos alvos para terapia. Existem várias hipóteses para os mecanismos de causa/efeito da doença mas o seguimento dos mesmos é difícil, dado que estão envolvidos numa complexa cascata de reacções que resultam na deposição de amiloide- β e tau. Assim, torna-se importante actuar sobre vários processos, como a amiloide- β , inflamação, stress oxidativo, patologia da Tau e neuroprotecção (Frautschy e Cole, 2010). No entanto, como tudo indica uma predisposição para a doença provocada por deficiências no metabolismo da APP e a formação das placas amilóides, este parece ser dos melhores alvos para possíveis terapias. Como tal são necessários mais estudos com modelos experimentais fidedignos e que mimetizando os mecanismos reais da doença possam fornecer mais informação.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Reprogramação Celular

A reprogramação de células somáticas é um processo a partir do qual se faz a desdiferenciação de células somáticas adultas para produzir células estaminais pluripotentes sem recorrer a embriões (Hipp e Atala, 2008). As células geradas deste modo serão geneticamente iguais às células que lhes deram origem, pelo que não serão rejeitadas pelo dador (Hipp e Atala, 2008).

A diferenciação das células é caracterizada por mudanças epigenéticas da cromatina verificadas através da hiperacetilação do cerne das histonas H3 e H4, o que também reflecte a demetilação de sequências promotoras específicas dos genes de pluripotência, tais como o *Oct-4* (Alberio *et al.* 2006). Também é observado níveis reduzidos de metilação de DNA nas sequências onde estão activados os genes de pluripotência, enquanto a expressão de genes somáticos é baixa (Alberio *et al.* 2006). Outras características necessárias para aquisição de pluripotência são a descondensação do DNA, a remodelação da lâmina nuclear e a hiper- di/tri-metilação da lisina-4 numa histona H3 (Alberio *et al.* 2006). Estes acontecimentos ocorrem em simultâneo com mudanças dos padrões de expressão com sobre-regulação rápida de vários factores expressos de modo muito restrito durante a fase de pluripotência, a qual resulta em mudanças de toda a expressão génica (Lewitzky e Yamanaka, 2007). Assim todas estas alterações nas células alvo são condições necessárias para a obtenção de um estado reprogramado estável, e que pode ser redireccionada para programas de diferenciação específicos (Alberio *et al.* 2006). Foi demonstrado que a identidade celular pode ser afectada pela manipulação *in vitro* e que ainda há muitos testes a realizar acerca do destino de células reprogramadas, contudo as estratégias desenvolvidas baseadas em células poderão vir a ser uma solução para tratamento de várias doenças (Alberio *et al.* 2006).

Várias técnicas de reprogramação celular têm vindo a ser estudadas, entre as quais transferência nuclear somática, fusão de células somáticas com células pluripotentes (híbridos celulares), indução de células estaminais pluripotentes (iPS), extractos celulares e reprogramação utilizando moléculas sintéticas.

A reprogramação utilizando extractos celulares consiste na permeabilização da membrana plasmática das células e de seguida as células são expostas a um extracto de células pluripotentes (Simonsson e Bogesta, 2008). A membrana celular é libertada e o extracto possui os componentes reguladores nucleares que medeiam as alterações no perfil da expressão génica, enquanto os componentes citoplasmáticos são usados, possivelmente, para promover a importação nuclear de componentes reguladores (Collas, 2003). Esta técnica é simples e permite a obtenção de células que re-expressam marcadores de pluripotência e que são capazes de se rediferenciar em múltiplas linhagens (Lewitzky e Yamanaka, 2007; Simonsson e Bogesta, 2008).

A utilização de moléculas sintéticas para induzir a reprogramação mostrou potencial para conduzir as células a novos fenótipos, embora ainda não seja compreendido o modo de acção destas moléculas e de que forma se relaciona com mecanismos epigenéticos que intervêm na diferenciação celular (Alberio *et al.* 2006).

A partir da estratégia de fusão de células somáticas adultas com células embrionárias de carcinoma pluripotentes, tanto em ratinhos como em humanos, foi observado que factores das células embrionárias de carcinoma podem reprogramar os núcleos somáticos até um estado de pluripotência ((Simonsson e Bogesta, 2008). Esta técnica permite a fusão de duas células somáticas com um inibidor da divisão celular para assegurar que os dois núcleos se mantêm separados. Para tal, podem ser tratados um grande número de células, ser activado o gene *Oct-4* e inactivados os genes somáticos e além disso as células reprogramadas podem contribuir para várias linhagens celulares quando intactos em ratinhos (Alberio *et al.* 2006; Gurdon e Melton, 2008). Contudo, há uma série de desvantagens associadas, tais como as células híbridas reprogramadas possuírem um conjunto adicional de cromossomas, o que pode limitar a sua utilização para fins terapêuticos e podem ser necessários núcleos de células pluripotentes para a reprogramação. Também a remoção dos núcleos das células estaminais embrionárias pode não ser possível e foi mostrado ainda que este processo inibe a capacidade do citoplasma de células estaminais reactivar a expressão de marcadores de pluripotência em híbridos com células somáticas (Lewitzky e Yamanaka, 2007).

Uma das técnicas mais conhecidas e que apresenta melhores resultados é a técnica de transferência nuclear de células somáticas que envolve a destruição ou remoção de um núcleo de um ovo não fertilizado que depois é substituído com um núcleo de uma célula somática dadora (Gurdon e Melton, 2008). Verificou-se que podem ser transplantados núcleos de blastocistos para derivar células estaminais embrionárias, cuja capacidade é testada pela transplantação destas células, para embriões hospedeiros normais. A reprogramação de um ovo diminui à medida que as células dadoras se tornam mais diferenciadas e tem apresentado pouco sucesso em humanos (Gurdon e Melton, 2008; Park *et al.* 2008; Simonsson e Bogesta, 2008). A aplicação desta estratégia pode ser limitada à disponibilidade de oócitos e baixa eficiência de

clonagem, para além de poder ser observado o desenvolvimento de várias anormalidades nos animais clonados (Lewitzky e Yamanaka, 2007). Há ainda restrições devido a problemas éticos e legais que se prendem com a sua aplicação a células humanas e a sua utilização a nível terapêutico está limitada aos riscos associados com a presença de núcleos de células embrionárias de carcinoma (Alberio *et al.* 2006; Lewitzky e Yamanaka, 2007).

Nos últimos anos, tem sido explorada a hipótese de indução de células estaminais pluripotentes a partir de factores definidos, assim em 2006, num estudo de Takahashi e Yamanaka, foi conseguida a indução do estado de pluripotência (*induced pluripotent stem* – iPS) em células somáticas. As células iPS exibem propriedades de crescimento e morfologia semelhantes a células estaminais embrionárias e não entram em senescência como as células que lhes deram origem (Lewitzky e Yamanaka, 2007). A indução de pluripotência é conseguida através da expressão dos factores de transcrição exógenos, Oct4, Sox2, c-Myc e Klf4 (Takahashi e Yamanaka, 2006). Os factores Oct3/4 e Sox2 têm uma função de manutenção do estado de pluripotência em células estaminais, enquanto os factores c-Myc e Klf4, muito activos em tumores, contribuem para a rápida proliferação e manutenção do fenótipo, a longo prazo, de células estaminais (Takahashi e Yamanaka, 2006). Estes dois últimos factores apresentam-se como uma desvantagem, pois podem ser reactivados havendo assim uma elevada probabilidade de mutagénese destas células (Wang, *et al.*, 2010). Este método tem outra grande desvantagem, pois a eficiência de reprogramação de células somáticas a células iPS é ainda muito baixa, com valores de cerca de 0,02%, o que torna difícil a terapia celular específica do doente a partir de uma pequena população de células (Huangfu *et al.*, 2008; Wang, *et al.*, 2010; Takahashi *et al.*, 2007).

Esta nova técnica de indução de pluripotência apresenta um grande potencial de estudo de doenças e de terapêuticas específicas para o paciente (Wang, *et al.*, 2010). Apesar de haver muitos modelos de estudos de doenças, há desordens genéticas humanas, como o Síndrome de *Down* (trissomia no cromossoma 21), cujos modelos existentes não conseguem mimetizar, como tal a indução de pluripotência em células somáticas poderá estabelecer novos modelos de doenças (Park, *et al.*, 2008; Wang, *et al.*, 2010). Estes poderão ser utilizados para o estudo dos próprios mecanismos da doença, para testar drogas e potenciais farmacêuticos (Wang, *et al.*, 2010). A sua aplicação em terapias de substituição celular com células iPS específicas do paciente, derivadas de células somáticas autólogas, tem a grande vantagem de uma possível diminuição das reacções de rejeição, pelo sistema imunitário do paciente (Park, *et al.*, 2008; Wang, *et al.*, 2010).

Doença de Alzheimer

A doença de Alzheimer (AD) é uma doença neurodegenerativa que resulta num declínio progressivo na aprendizagem e memória (Spronsen e Hoogenraad, 2010). A AD é responsável por 50 a 60% dos casos de deterioração mental em pessoas acima dos 65 anos de idade (Francis *et al.*, 1999), afectando cerca de 35 milhões de pessoas em todo o mundo (Ertekin-Taner, 2010), passando-se em média oito anos e meio entre o diagnóstico e a morte dos pacientes (Francis *et al.*, 1999). As regiões do cérebro com mais

funções mentais são as mais afectadas, como o hipocampo e o neocórtex. Foi descrita pela primeira vez em 1911 por Alois Alzheimer, como provocada por lesões no córtex cerebral correspondentes a enrolamentos neurofibrilares intraneuronais e mais tarde foram descritas as placas amilóides extracelulares, assim designadas por possuírem propriedades físico-químicas semelhantes a polissacáridos (Maccioni *et al.*, 2001). Os agregados intracelulares só foram identificados nos anos 80 como sendo filamentos helicoidais emparelhados (*Paired Helical Filaments* - PHFs) de tau, constituídos por esta proteína que normalmente se encontra associada a microtúbulos, numa forma hiperfosforilada (Spronsen e Hoogenraad, 2010). Por volta da mesma altura os depósitos extraneuronais foram identificados como tendo uma estrutura beta significativa, sendo assim designada por amilóide- β ($A\beta$) (Maccioni *et al.*, 2001), que tem origem da clivagem da APP, ou *amyloid precursor protein* (Spronsen e Hoogenraad, 2010). Ao longo dos tempos os diferentes mecanismos disfuncionais da doença deram origem a várias hipóteses explicativas do seu mecanismo de desencadeamento e acção, sendo as mais aceites actualmente as que consideram a deposição da amilóide- β como o factor de desencadeamento, mas não se podendo ignorar todos os outros desvios da normalidade que revelam a necessidade de encarar o tratamento da AD de um modo pleiotrópico (Frautschy e Cole, 2010).

A hipótese colinérgica considera que a degeneração dos neurónios colinérgicos, isto é, produtores de acetilcolina e responsáveis pela sua neurotransmissão, no prosencéfalo e a consequente perda de transmissão da acetilcolina no córtex e outras regiões do cérebro, contribui significativamente para a deterioração da função cognitiva (Francis *et al.*, 1999). Esta foi a primeira interpretação bioquímica da doença, e actualmente os fármacos utilizados para diminuir os efeitos da doença são à base essencialmente de inibidores da acetilcolinesterase, que pretendem diminuir a degradação da acetilcolina por esta enzima, permitindo assim uma maior transmissão sináptica deste neurotransmissor (Francis *et al.*, 1999; Lleó *et al.*, 2006). A perda cognitiva correlaciona-se melhor com a perda de sinapses do que com a formação de placas de amilóide- β , a seguir decritas (Frautschy e Cole, 2010; Spronsen e Hoogenraad, 2010), sendo a disfunção das sinapses evidente anteriormente à sua perda e à dos neurónios.

A amilóide- β é considerada uma das indicadoras iniciais de uma propensão para a manifestação da doença. Esta é formada a partir de uma proteína precursora denominada APP (*Amyloid Precursor Protein*), que é uma glicoproteína transmembranar, com um domínio extracelular N-terminal ou no lúmen de vesículas intracelulares. A extremidade C-terminal encontra-se no domínio citoplasmático e é sensível a proteases denominadas secretases (α , β ou γ) (Lleó *et al.*, 2006; Maccioni *et al.*, 2001). As acumulações de amilóide- β devem-se a mutações desta proteína, que sofre splicing alternativo e ainda modificações pós-traducionais como glicosilações, fosforilações e sulfatações. As funções propostas para a APP incluem inibição de proteases de serina, adesão celular, neurotrofia, neuroprotecção ou possivelmente no tráfego de vesículas nos axónios. Assim sendo, o transporte destas vesículas ao longo dos axónios alterados pelas interacções anormais de APP com a cinesina-I, geram uma sinalização anormal para a maquinaria de transporte de microtúbulos (Maccioni *et al.*, 2001).

Foram descritas duas vias para a produção de A β , uma delas envolvendo a segregação de APP para o RE, onde é processada e clivada para originar A β (Caine *et al.*, 2007; LaFerla *et al.*, 2007). A segunda via é pela formação de endossomas, em que a APP à superfície da membrana é internalizada pelos neurónios por um processo de endocitose mediado por clatrina, ocorrendo posteriormente clivagem de A β dentro do endossoma, no axónio (Caine *et al.*, 2007; LaFerla *et al.*, 2007). Finalmente a A β é reciclada para a superfície celular onde é segregada para o fluído extracelular, activando vias de sinalização na membrana pós-sináptica (Caine *et al.*, 2007; LaFerla *et al.*, 2007). A A β_{1-42} , que é a forma mais frequente de A β encontrada nas placas, parece ser maioritariamente produzida por esta via de exocitose (Spronsen e Hoogenraad, 2010).

A amilóide- β segregada pelos neurónios é encontrada no fluído cerebrospinal e no sangue, acumulando-se nos capilares cerebrais, arteríolas e vénulas e no cérebro em várias regiões como o cerebelo, o corpo estriado e o tálamo (Maccioni *et al.*, 2001). Os agregados de amilóide- β , particularmente os oligómeros podem induzir inflamação, danos oxidativos e múltiplos sinais de eventos de transdução de sinal como a activação de cinases de tau, levando à sua hiperfosforilação (LaFerla *et al.*, 2007).

A proteína tau é uma proteína associada a microtúbulos que exerce funções essenciais na sua formação, estabilização e ligação a outros componentes do citosqueleto. Uma marcação com anticorpos às PHFs revelou que estas eram maioritariamente constituídas por tau. Os NFTs (*Neurofibrillary Tangles*), compostos por várias destas placas encontram-se em maior quantidade nos neurónios do hipocampo, do córtex entorrinal e das amígdalas. A tau hiperfosforilada parece ser suficiente para causar deficiências cognitivas (Frautschy e Cole, 2010). As patologias que provoca são progressivas e profundas, com ganho de funções tóxicas pelos agregados que formam e também pela perda da sua actividade normal quando associada aos microtúbulos (Frautschy e Cole, 2010).

OBJECTIVO

Com o advento das técnicas de indução de pluripotência em células somáticas, bem como a possível reprogramação e diferenciação em linhas celulares de interesse há possibilidade de conseguir estudar de modo mais aprofundado e fiel os mecanismos de várias doenças, nomeadamente a doença de Alzheimer.

Embora se tratem de ferramentas promissoras ainda há obstáculos relativamente às suas taxas de eficiência e praticabilidade dos protocolos, por este motivo pretendemos aumentar o sucesso de indução de pluripotência nas células somáticas e obter culturas com variados fenótipos que nos esclareçam sobre os mecanismos envolvidos na doença.

Para tal serão criados linhas celulares de células neuronais a partir de queratinócitos humanos, tanto de indivíduos doentes como de indivíduos saudáveis. As linhas celulares que se obtiverem a partir de doentes que apresentem mutações para os genes de susceptibilidade à doença (sobre os quais se vai actuar (*APP* e *PSEN-1*), servirão de base de estudo de processos envolvidos na doença. Para além disso, será ainda tentada uma mutagénese dirigida através de recombinação homóloga para tentar recuperar o fenótipo saudável das linhas celulares obtidas a partir de pacientes.

METODOLOGIA

1. Indução de Pluripotência

Cultura de queratinócitos:

Os protocolos de indução de pluripotência até hoje estudados em ratinhos foram aplicados principalmente em fibroblastos da mesoderme, células epiteliais e queratinócitos, já com células humanas a grande maioria dos estudos são aplicados a fibroblastos, havendo também alguns com queratinócitos (Aasen *et al*, 2008). Fazendo a comparação entre fibroblastos e queratinócitos humanos, os primeiros necessitam de um tempo mais prolongado, cerca de 20-25 dias, para formar colónias com características de células estaminais e apresentam uma eficiência de reprogramação de cerca 0,01%, enquanto que para os queratinócitos ao fim de 10-14 dias apresentam já as características pretendidas com uma taxa de eficiência de cerca 0,9% (Aasen *et al*, 2008). Para além disto, num estudo de Aasen *et al* (2008) observou-se que as diferenças entre as linhagens de células induzidas a partir de queratinócitos eram da mesma ordem das diferenças entre linhagens de células estaminais embrionárias. Os queratinócitos são células multipotentes, com elevada densidade em queratina, a partir dos quais se forma a epiderme e apêndices como unhas e cabelo, estas células têm um elevado nível de expressão de c-Myc, não sendo completamente necessária a sua introdução exogenamente (Fuchs, 2007; Wang *et al*, 2010). Estes resultados demonstram que os queratinócitos são uma boa opção para a indução de pluripotência, pois tendo em conta o objectivo do nosso trabalho são uma possível fonte de células multipotentes ao longo da vida adulta de uma pessoa, para além de que ainda possuem um certo nível de indiferenciação que facilita a aplicação do protocolo. Assim neste protocolo haverá uma recolha prévia de queratinócitos de pacientes com a doença de Alzheimer, que são o objecto do nosso estudo, como controlo será feita a recolha de queratinócitos de pessoas saudáveis com a mesma idade dos pacientes.

Factores de reprogramação:

Em 2006, Takahashi e Yamanaka reportaram a indução de pluripotência (células iPS – *induced pluripotent stem cells*) em células somáticas por factores definidos, em que identificaram Oct4, Sox2, Klf4 e c-Myc como factores essenciais para a indução. Desde este trabalho que outros grupos têm explorado este campo, tentando novas abordagens para os problemas inerentes a este método (Wang *et al*, 2010). Um dos problemas é o facto de se utilizar o factor de transcrição c-Myc, que devido à sua elevada expressão em células tumorais é considerado um oncogene, e como tal um factor de risco para a proliferação celular (Huangfu *et al*, 2008; Takahashi e Yamanaka, 2006). Sabendo isto, muitos investigadores tentaram a indução de pluripotência reduzindo o número de factores (sem c-Myc) ou substituindo este factor por outros genes (Blelloch *et al*, 2007; Nakagawa *et al*, 2008; Wang *et al*, 2010). Num estudo de Nakagawa *et al* (2008) em que fizeram a indução de

pluripotência em fibroblastos humanos e de rato sem o factor c-Myc, observaram que, apesar da formação de células iPS demorar mais tempo (30 dias, em contraste com 14-21 dias com c-Myc) e ter uma menor eficiência, a indução de pluripotência era mais específica, ou seja, a percentagem de células iPS era superior às que não entraram em estado de pluripotência. Neste mesmo estudo verificou-se que ratinhos transplantados com células iPS formadas sem c-Myc não formaram tumores nos estados iniciais de vida, ao contrário de ratinhos com células iPS com c-Myc (Nakagawa *et al*, 2008). Noutras experiências, cujo objectivo era a substituição de c-Myc, pode-se salientar uma em que utilizaram o factor n-Myc, que pertence à família de c-Myc e é altamente expresso em células pluripotentes, mas tem uma menor actividade oncogénica (Blelloch *et al*, 2007). Outro exemplo, será o estudo feito por Zhao *et al*, (2008), no qual verificaram que a utilização de siRNA de p53 e de UTF1 aumenta a eficiência de reprogramação, mesmo sem o factor c-Myc. UTF1 é um coactivador transcricional presente em células estaminais embrionárias cuja expressão não é encontrada em tecidos diferenciados (Okuda *et al*, 1998). Neste mesmo estudo UTF1 é reportado como tendo um efeito específico em células com indução de pluripotência, pois induziu um aumento significativo no número de colónias de células iPS. Como tal, os mesmos autores sugerem uma nova combinação de factores de indução de pluripotência, na qual o factor c-Myc é substituído pelo UTF1 (Zhao *et al*, 2008). Tendo em conta os resultados obtidos por estes e outros estudos anteriores, decidimos não utilizar o factor c-Myc, mas substituí-lo pelo coactivador UTF1.

Em relação aos outros factores de transcrição usados, a bibliografia consultada mostra que Oct4 e Sox2 são indispensáveis para a indução de pluripotência (Huangfu *et al*, 2008; Zhao *et al*, 2008; Wang *et al*, 2010), já no caso do Klf4, apesar de na bibliografia ser referido como oncogene, continua a ser usado. Assim sendo, neste projecto iremos utilizar estes três factores de transcrição indispensáveis, Oct4, Sox2 e Klf4.

Vectores de transdução:

Uma grande parte dos estudos de reprogramação celular a partir da técnica de indução de pluripotência utiliza vectores virais, geralmente derivados de retrovírus ou lentivírus. A utilização deste tipo de vírus implica a sua integração no genoma da célula e como tal, aumenta a propensão para mutações genéticas e instabilidade genómica (Wang *et al*, 2010). Aliado a estas desvantagens está o objectivo final do método, a aplicação em terapia humana (Wang *et al*, 2010), o que faz com seja necessário o desenvolvimento de protocolos mais seguros e em que uma das preocupações é a utilização de um vector que alie a segurança de utilização à eficiência de transfecção. Tendo todos estes factores em conta, vários estudos foram feitos com outros tipos de vírus não integrativos, como sendai e adenovírus, ou vectores não virais sem integração de transgenes no genoma celular ou ainda métodos que utilizam transposões (Kaji *et al*, 2009; Wang *et al*, 2010; Zhou e Freed, 2009). Num estudo de Zhou e Freed (2009) foi testada a hipótese da utilização de adenovírus como vector de transdução, que introduz os genes pretendidos nas células sem que haja integração, diminuindo assim a propensão para mutações. Apesar deste sistema parecer promissor, os adenovírus perdem a

capacidade de expressão após a divisão celular sendo por isso necessárias várias aplicações, com multiplicidades de infecção elevadas (Zhou e Freed, 2009). Este facto aliado a uma baixa eficiência de reprogramação (Zhou e Freed, 2009), tornam este sistema pouco apropriado ao objectivo pretendido. Outros métodos foram estudados e entre eles o transposão *piggyBac*, que tem uma elevada taxa de integração em células humanas e é possível a sua excisão eficiente do genoma celular, com baixa probabilidade de mutações (Wilson *et al*, 2007). Assim, Woltjen *et al* (2009) publicaram um estudo em que utilizaram este transposão indutível por doxiciclina, no qual após 12 dias de cultura obtiveram linhas celulares pluripotentes, e após 24 dias, 86% destas colónias conseguiram manter o estado de pluripotência independentemente da presença de doxiciclina no meio. Neste estudo, foi ligado aos genes dos factores de transcrição um gene que codifica para um péptido 2A, que na presença de transposase aumenta a eficiência de excisão do transposão do genoma celular, mantendo uma baixa probabilidade de mutação (Woltjen *et al*, 2009). Analisando os resultados destes estudos anteriores a utilização do transposão *piggyBac* como vector de transfecção parece ser a opção mais promissora, pois apesar de ser um sistema integrativo possui um método de excisão até agora comprovado como eficaz. Deste modo pode ser desenvolvido um protocolo que permita uma expressão estável dos factores de transcrição necessários à indução, mas seguro quanto à probabilidade de mutagénese.

Electroporação célula-a-célula:

Os métodos normalmente utilizados para a transfecção de células com DNA exógeno possuem baixas taxas de eficiência. Estes baseiam-se na permeabilização da célula recorrendo a reagentes ou electroporação, visto a membrana servir como barreira entre o citoplasma e o meio extracelular que impede a penetração de substâncias polares como corantes, proteínas, DNA e outras moléculas (Khine *et al.*, 2004). Existem disponíveis reagentes como o Transfectin (Bio-RadTM) ou o LipofectAMINE conjugado com Plus Reagent (InvitrogenTM), mas a eficiência de transfecção obtida é baixa. A electroporação consiste na criação de campos eléctricos que induzem rearranjos estruturais nas membranas, formando-se poros quando o potencial transmembranar atinge um certo valor. Este método tem revelado ser pouco eficiente, necessitando de voltagens muito altas para induzir poros e não actuando eficazmente ao nível individual. Para ultrapassar esta limitação desenvolver-se a electroporação célula-a-célula, que requer que uma célula esteja bem isolada ou que o campo eléctrico esteja dirigido para a célula alvo (Khine *et al*, 2004). Utilizando-se o sistema microfluídico descrito por Valero *et al*, (2008), conseguiram-se eficiências de transfecção na ordem dos 50-60%, tanto utilizando vectores virais ou plasmídicos. Com este método de inserção de DNA conseguem-se eficiências muito altas de transfecção, como tal será o método de eleição (Tabela A1) (Valero *et al*, 2008).

Outros factores:

Para uma maximização da eficiência do protocolo proposto, há outros factores a ter em conta, como o meio de cultura usado ou a adição de compostos adicionais que aumentam a eficiência de indução. Assim, numa primeira fase do procedimento de reprogramação celular iremos utilizar um meio de cultura sem soro (*serum free*) e com baixos níveis de cálcio, pois promove um estado proliferativo e permite manter o nível de indiferenciação dos queratinócitos recolhidos dos pacientes (Aasen *et al*, 2008). Segundo o protocolo, o meio será alterado antes da aplicação dos factores de reprogramação para um meio tipicamente utilizado para cultura de células estaminais, contendo KnockOut™ Serum Replacement (Invitrogen™, 2010) que, num estudo realizado por Blelloch *et al* (2007), demonstrou promover a eficiência de reprogramação em células de ratinho.

Na tentativa de melhorar a eficiência do processo muitos estudos foram feitos de modo a identificar compostos químicos que pudessem ter um efeito significativo a este nível (Tabela A2) (Wang *et al*, 2010). Destes estudos destacamos o ácido valpróico (*Valproic acid* - VPA), um inibidor de histona desacetilases (*Histone Deacetylase* - HDAC), que adicionado ao meio de cultura aumenta a eficiência de reprogramação, ou pode mesmo substituir os factores Klf4 e c-Myc (Huangfu *et al*, 2008). Apesar de no protocolo proposto usarmos o factor Klf4, iremos substituir o factor c-Myc pelo UTF1, como tal pretende-se que ao adicionar VPA, a eficiência do método aumente.

Caracterização de células reprogramadas:

Tendo em conta que esta técnica é relativamente recente e tem ainda taxas de eficiência baixas torna-se imperativo recorrer a técnicas de biologia molecular de forma a caracterizar e seleccionar as colónias de células com características de células estaminais, ou seja, as que foram reprogramadas. Assim sendo os testes aplicados neste caso são os utilizados na caracterização de células estaminais (O'Connor *et al*, 2008). Tendo em conta o nosso protocolo, haverá um passo de caracterização das células iPS após a sua selecção com neomicina de modo a confirmar o fenótipo e genótipo de células pluripotentes, em que iremos analisar o padrão de expressão dos factores de reprogramação e dos marcadores celulares, pelas técnicas de qRT-PCR (*quantitative Reverse Transcriptase – Polymerase Chain Reaction*) e de imunofluorescência, respectivamente. A pluripotência destas células também será testada por análise da sua capacidade de diferenciação nas três linhas germinativas, endoderme, mesoderme e ectoderme. Haverá ainda um ponto de controlo, após a aplicação da transposase de modo a retirar o transposão que está integrado no genoma, em que se verifica por PCR que o transposão foi de facto removido do genoma.

Os vários tipos de células têm diferentes padrões de expressão de proteínas que as tornam facilmente identificáveis. No caso das células pluripotentes um dos marcadores mais característicos é o da actividade da fosfatase alcalina (*Alkaline Phosphatase* - AP), em que o número de colónias positivas para esta enzima está relacionado linearmente com o número de células estaminais humanas na cultura, permitindo assim uma detecção

constante destas colónias (O'Connor *et al*, 2008). Na bibliografia consultada destacam-se os marcadores NANOG, SSEA1, SSEA3, SSEA4, TRA-1-60 e TRA-1-81, Oct4 e Sox2 característicos das células estaminais embrionárias humanas e como tal bons indicadores de pluripotência (Aasen *et al*, 2008; Brambrink *et al*, 2008; Zhao *et al*, 2008; Zhou *et al*, 2009). Pode-se também destacar o marcador Rex1 cuja expressão é elevada em células estaminais embrionárias e vai diminuindo à medida que a célula se diferencia (Rogers *et al*, 1991).

2. Recombinação homóloga em genes alvo para terapia de AD

A maioria dos casos de Alzheimer não são hereditários, e neste caso a doença é designada por doença de Alzheimer esporádica (SAD). No entanto, cerca de 1% dos casos de Alzheimer ocorrem numa fase mais precoce da vida, e nestes casos diz-se que os pacientes sofrem de doença de Alzheimer familiar (FAD), que é manifestada mais cedo na vida dos doentes do que a forma esporádica e é por isso considerada precoce (Ertekin-Taner, 2010). Estes casos são provocados por mutações em genes envolvidos na acumulação de A β , como os que codificam para a presenilina (1 e 2) e a APP, que dá origem aos péptidos de A β . O gene *APP* no cromossoma 21q foi o primeiro gene de susceptibilidade identificado para a doença, sendo seguido das presenilinas 1 e 2 (*PSEN-1* e 2), nos cromossomas 14 e 1, respectivamente (Figura 1) (Ertekin-Taner, 2010). Até à data foram identificadas 32 mutações no gene *APP*, 177 no *PSEN-1* e 14 em *PSEN-2* identificados em 86, 392 e 23 famílias, respectivamente (Ertekin-Taner, 2010). Há ainda outro gene identificado como factor de risco para a doença, localizado no cromossoma 19, que codifica para a ApoE. Este gene no entanto, não é suficiente para causar a doença, não sendo herdado de modo autossómico dominante, como os referidos anteriormente (Hutton e Hardy, 1997). A constituição dos alelos com as variantes de ApoE determina a predisposição para desenvolver esta doença, bem como outras neurodegenerativas, devendo por isso esta apolipoproteína estar envolvida de um modo geral nos processos neurodegenerativos (Ertekin-Taner, 2010).

Na FAD precoce o aumento na produção de A β_{1-42} ocorre antes de qualquer outro sintoma, devendo por isso ser a causa da doença (Vassar, 2004). A A β é formada pela clivagem da APP, que é catalizada por enzimas denominadas secretases, que clivam proteínas inseridas nas membranas plasmáticas (Hatchett *et al*, 2007). Na doença de Alzheimer os complexos enzimáticos β e γ -secretase clivam a APP dando origem aos seus fragmentos A β (Figura 1). As presenilinas, tanto a isoforma 1 como a 2, são subunidades do complexo γ -secretase, fazendo parte do seu domínio catalítico e actuando assim na clivagem de APP com formação de A β_{1-42} (Hatchett *et al*, 2007). A maior parte dos casos em que se verifica a doença de Alzheimer devida a uma mutação num ou mais destes genes, deve-se ao gene da presenilina 1 (*PSEN-1*) (Ertekin-Taner, 2010; Leroy *et al*, 2003), que causa uma versão da doença mais agressiva (Bentahir *et al*, 2006).

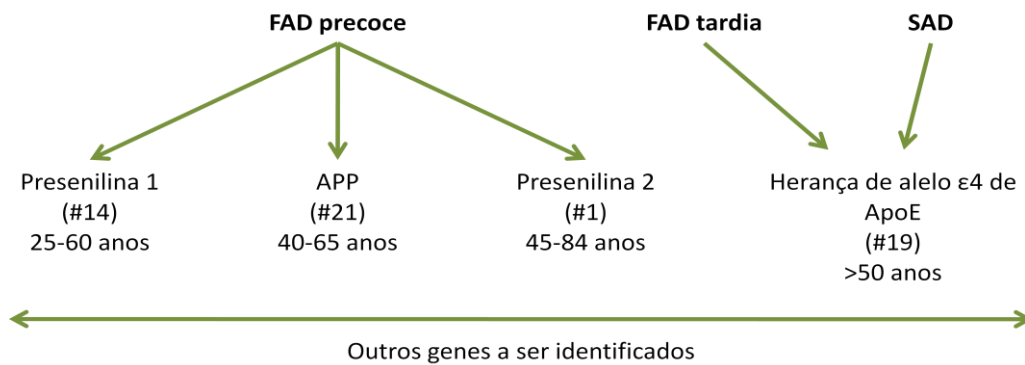


Figura 1 – Genes de susceptibilidade e sua relação com o tipo de doença de Alzheimer (Adaptado de George-Hyslop, 2000).

Existem mutações no gene da presenilina 1 que ao contrário do efeito nocivo normalmente gerado, resultam numa menor clivagem da APP e consequentemente numa menor produção de A β (Bentahir *et al.*, 2006). A base de todas as mutações encontradas em vários organismos para os genes de susceptibilidade da AD podem ser encontrados online na base de dados *Alzheimer Disease & Frontotemporal Dementia Mutation Database*.

A especificidade da actividade proteolítica da γ -secretase é modulada pelo motivo de dimerização GxxxG da sequência transmembranar da APP (Munter *et al.*, 2010). Já no início de 2010, Munter *et al.* observaram que uma mutação provocada neste motivo provoca uma diminuição na produção da forma de 42 aminoácidos da A β (Figuras 2 e A1). Os resíduos de glicina nas posições 29 e 33 do motivo GxxxG correspondem ao local de contacto principal entre a APP e a PS1. A substituição de qualquer um destes dois resíduos diminuiu a estabilidade do homodímero, provocou uma diminuição de A β ₁₋₄₂ e aumentou a produção de A β ₁₋₃₈, que não forma placas (Munter *et al.*, 2010). Estes autores estudaram o efeito da substituição deste gene em células humanas e verificaram a diminuição na produção de A β ₁₋₄₂.

Pretende-se portanto transfectar células de doentes com o gene da APP com esta mutação, ou com o da presenilina, de modo a avaliar os efeitos nas culturas, comparando com culturas de células não reprogramadas com estes genes, isto é, possuindo as versões danosas dos genes. Com estes factos em mente, uma possível manipulação das células de um paciente, substituindo o gene mutado, como o da presenilina 1 ou da APP

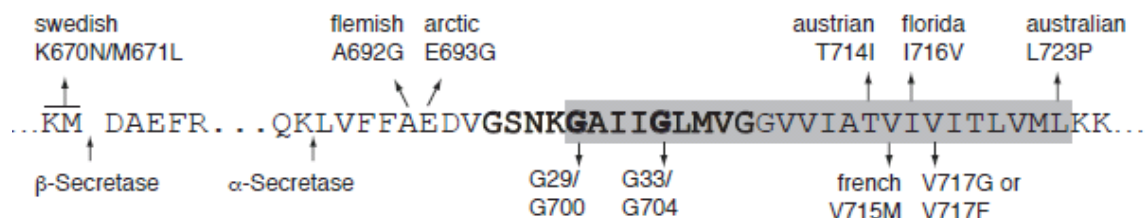


Figura 2 – Mutações da doença de Alzheimer familiar em APP. Estão indicados os locais de clivagem da β - e γ -secretase bem como as mutações conhecidas nesta zona da proteína. Os resíduos de glicina que medeiam a dimerização estão sobressaídos, G29/G700 e G33/G704 de acordo com numeração com base na A β ou APP770, respectivamente (Fonte: Munter *et al.*, 2010).

Recombinação homóloga dos genes pretendidos:

- a) Transfecção utilizando plasmídeo como vector para os genes PSEN-1 (de pessoa saudável) e APP com mutação G33A.

Embora existam vários métodos para obter recombinação homóloga de um gene alvo para ser substituído pelo gene pretendido, uns revelam maior eficiência que outros, embora existam vantagens e desvantagens independentemente desta. A utilização de vectores como adenovírus recombinantes é referido como sendo presentemente o método de escolha para recombinação homóloga por Nakayama (2010). Existem outros instrumentos disponíveis para se inserir genes em células, tanto *in vitro* como *in vivo*. Embora utilizando vectores não virais como plasmídios diminua a eficiência de transfecção, o factor referido anteriormente de exclusão de vírus de toda a estratégia torna-o o método de entrega escolhido. Este consiste em inserir a sequência do gene que queremos alterar no vector, inseri-lo na célula e esperar que ocorra a recombinação entre a sequência complementar no cromossoma, um processo que se designa de mutação dirigida. Com base no que foi referido para os genes *APP* e *PSEN-1*, pretendemos obter para além das culturas de controlo negativo (pessoas saudáveis), esperam-se obter culturas para as várias mutações nestas proteínas que sejam obtidas nas pessoas com AD. Irão-se então transfectar as células iPS com plasmídios onde foi inserida a sequência que irá recombinar com a sua homóloga no genoma das células, com fim a analisar o fenótipo das culturas relativamente à deposição de amiloide- β e outras alterações a nível celular e histológico. Com a inserção do transgene espera-se que haja uma melhoria no destino do tecido cultivado, com redução dos sintomas correspondentes à AD.

Serão inseridos no plasmídeo então mutações no motivo GxxxG do gene *APP*, com substituição do último resíduo de guanina por um resíduo de adenina (mutação G33A), que mostrou resultar numa diminuição de produção de A β 1-42 (Munter *et al.*, 2010). Para o gene da presenilina-1 utilizar-se-á uma sequência sem a mutação para ver se é eficiente na diminuição de A β 1-42.

- b) Potenciação da recombinação homóloga

Não resultando destas metodologias uma taxa elevada de sucesso, existem estratégias para aumentar a eficiência de recombinação homóloga. Uma das formas mais eficientes de aumentar a frequência de recombinação homóloga é criando uma quebra no cromossoma no local alvo (Wright *et al.*, 2005). Isto porque se o DNA for quebrado serão desencadeados mecanismos de reparação que resultarão numa recombinação entre a cadeia danificada e a cromátide homólogo (Griffiths *et al.*, 2005). Com este facto em conta foram desenvolvidos métodos para criar quebras localizadas num alvo de interesse do genoma para que seja promovida a recombinação com uma sequência homóloga num vector (Wright *et al.*, 2005). Do mesmo parece ser possível realizar esta quebra ao nível da sequência inserida no vector, promovendo também a recombinação (Katada *et al.*, 2009).

As nucleases *zinc finger* (ZFNs) recombinantes consistem em enzimas de restrição com construção personalizada, que são desenhadas de modo a

dirigir-se a uma sequência alvo e alterar genes específicos em células estaminais (Katada, 2009; Nakayama, 2010). Estas nucleases foram inicialmente descobertas em *Xenopus*, constituindo o motivo de ligação ao DNA mais comum em todos os metazoários (Urnov *et al*, 2005). São compostas por domínios Cys₂-His₂-zinco. Estes reconhecem tripletos nucleotídicos específicos, estando disponíveis ZFs que se ligam a todos os GNN e ANN e alguns CNN e TNN e vários podem ser fundidos para reconhecerem com grande afinidade sequências com maior especificidade (Wright *et al*, 2005). Vários autores, como Urnov *et al*, 2005 e Wright *et al*, 2005, conseguiram eficiências de transfecção aumentadas em 20%. Estas possuem domínios de ligação ao DNA (*zinc fingers*, ZF) que são fundidos ao domínio catalítico da nuclease Fok1. Esta possui a propriedade de digerir DNA após dimerização proteica. Para aumentar a especificidade do alvo no genoma e se provomever uma quebra da dupla cadeia utilizam-se 2 domínios ZF de ligação ao DNA diferentes que reconhecem sequências em sentido oposto e igualmente espaçadas, e a Fok1 no centro destas duas unidades cliva o DNA no local onde ficar (Urnov *et al*, 2005). Esta quebra induzida por ZFNs estimula a recombinação homóloga com a sequência inserida no vector que é entregue em conjunto com a enzima (Nakayama, 2010) pelos mecanismo de reparação celular (Figura A2). No entanto, podem ocorrer efeitos indesejáveis como a destruição total ou parcial do genoma humano sem que seja detectado (Nakayama, 2010).

A hipótese que se averiguou apresentar resultados mais promissores é o ARCUT (*Artificial Restriction DNA Cutter*) (Ito *et al*, 2009; Katada *et al*, 2009; Komiyama *et al*, 2008). Este método revela-se particularmente útil para substituição de grandes fragmentos de DNA, e usufrui de uma elevada eficiência. Estes autores desenvolveram uma enzima de restrição de origem química, constituída por duas cadeias de pcPNA (*pseudo-complementary Peptide Nucleic Acid*) e uma 'tesoura molecular' que é o complexo Ce(IV)/EDTA (Figura A3), que promove a recombinação homóloga (Katada *et al*, 2009).

Estes resultados foram demonstrados por microscopia de fluorescência onde se observa com 2 filtros diferentes as duas proteínas a serem expressas (Figura A4). No caso da EGFP (*Enhanced Green Fluorescent Protein*), que não possuía promotor, a fluorescência verde é detectada porque esta foi eficientemente substituída pela BFP (*Blue Fluorescent Protein*) e transcrita devida à presença do promotor no plasmídeo (Katada *et al*, 2009).

As eficiências de recombinação como se pode observar são bastantes superiores a quando se utilizam enzimas de restrição (Figura A5). Foi também já demonstrado e provado que é possível dirigir a recombinação a uma sequência específica no genoma, desde que não seja uma sequência totalmente complementar, tendo-se conseguido cortar especificamente o gene FMR1 (*Fragile X Mental Retardation*) (Ito *et al*, 2009). Infelizmente não há ainda um protocolo definido para a utilização de ARCUT, por ser um método ainda em desenvolvimento, pelo que se optará por uma ZFN dirigida ao alvo a ser mutado e recombinação com um plasmídeo, não descartando nunca a possibilidade de se utilizar este método promissor.

Após a recombinação o processo de selecção das células, após a formação de colónias, que recombinaram eficientemente será determinado por qPCR dirigido ao transcrito (RT-qPCR) e sequenciação de uma amostra de cada

colônia. Isto de modo a confirmar se está a ocorrer transcrição e se o gene que está a ser expresso possui a mutação que foi induzida. Para avaliação do impacto das mutações utilizaremos um método para medição das várias formas de A β (A β 1-38; A β 1-40; A β 1-42).

3. Diferenciação Neuronal

Diferenciação neuronal:

O desenvolvimento da tecnologia de iPS tornou possível a obtenção de células para serem modelo de estudo de várias doenças como Parkinson, Huntington, Síndrome de Down, Esclerose Amiotrófica Lateral (*Amyotrophic Lateral Sclerosis* - ALS), entre outras (Chamberlain *et al*, 2008). Anteriormente, estudos acerca destas doenças não seriam possíveis pela inexistência de ratinhos transgênicos para este efeito. Os modelos *in vitro* permitem uma melhor compreensão dos mecanismos da expressão génica dos neurónios humanos e são um sistema atractivo para potenciais terapias para as doenças neurodegenerativas (Chamberlain *et al*, 2008).

A produção de progenitores neuronais é obtida a partir de cultura de células em suspensão que formam agregados originando corpos embrióides (Li *et al*, 2009). Estes contêm uma mistura de ectoderme, endoderme e mesoderme, sendo normalmente realizada a diferenciação em neurónios através do enriquecimento de derivados da ectoderme (Li *et al*, 2009). Este processo envolve a utilização de sinais neutralizadores que podem ser obtidos de células de alimentação, pela adição de factores de crescimento ou de suplementos de crescimento ao meio (Li *et al*, 2009). Além disso, têm de ser realizados vários passos para a obtenção de tipos específicos de neurónios (Li *et al*, 2009). Os protocolos para diferenciação de neurónios são difíceis de realizar, podem ser dispendiosos e é necessário muito tempo para a sua execução (Li *et al*, 2009).

Para a expansão de células progenitoras neuronais há necessidade de ser adicionado FGF-2 (*Fibroblast Growth Factor*) ou EGF (*Epidermal Growth Factor*) ao meio N3, um meio para diferenciação de células progenitoras neuronais (Imitola, 2007). Os genes associados à diferenciação neuronal são: *Hes1*, *Hes5*, *Neurogenina1*, *Neurogenina2*, *Sox10*, *Olig1*, *Olig2*, *GLI1*, *Wnt3*, *Wnt5*, *Notch*, *GDNF*, *EPO*, *TH*, *LIF* (Imitola, 2007). A diferenciação neuronal é identificada através do aparecimento de células colunares que se organizam em rosetas neuronais, cerca de 10 dias após o início da diferenciação (Chamberlain *et al*, 2008). A ectoderme neuronal representa o primeiro tipo de células da linhagem neuronal (Chamberlain *et al*, 2008). As células neuroectodérmicas, inicialmente adquirem um fenótipo rostral, expressando um conjunto de factores de transcrição característicos do prosencéfalo, tais como *forkhead box G1* (FoxG1), *LIM homeobox 2* e *ortho denticle homeobox 2* (OTX2).

As células humanas iPS aquando da diferenciação da ectoderme exibem aumento da expressão de NES, Pax6, Sox1 e Sox2 que são marcadores neuronais e podem diferenciar-se em neurónios, astrócitos e oligodendrócitos,

se forem colocadas no meio em placas de cultura ou cobertos com poliornitina/laminina juntamente com os factores de crescimento adequados (Chamberlain *et al*, 2008). A inibição das vias BMP (*Bone Morphogenetic Protein*) e *Activin/Nodal* permite uma diferenciação neuronal eficiente, para além de ser necessária a remoção do meio de cultura de factores mitogénicos como o β -FGF e EGF (Kim *et al*, 2010; Denham e Dottori, 2009).

In vitro, neurónios positivos para tubulina são os que se desenvolvem primeiro seguidos dos astrócitos que expressam GFAP (*Glia Fibrilar Acidic Protein*) e por fim formam-se os oligodendrócitos (Chamberlain *et al*, 2008). Esta sequência de acontecimentos possui a mesma ordem durante o desenvolvimento *in vivo* (Chamberlain *et al*, 2008). A diferenciação de oligodendrócitos também pode ser acompanhada pela expansão e selecção dos seus precursores através da utilização de ácido retinóico, de *noggin*, de PDGF (*Platelet-Derived Growth Factor*) e EGF (Chamberlain *et al*, 2008).

A diferenciação de células da glia, quando realizada em neuroesferas, necessita de substrato de fibronectina, enquanto os neurónios necessitam de laminina, para que haja diferenciação (Denham e Dottori, 2009). Por outro lado, o meio neuronal basal é mantido com a suplementação de β -FGF e EGF bem como de PDGF-AB (Denham e Dottori, 2009).

Em estádios subsequentes ao início da diferenciação, a observação dos eventos iniciais da maturação da diferenciação neuronal poder ser obtida através da expressão de MAP2, NeuN e III-tubulina e em estados mais avançados poderão ser detectados marcadores, como a sinatofisina e neurofilamentos (Werning *et al*, 2002).

No caso específico de neurónios colinérgicos envolvidos em várias desordens, como o Alzheimer, um dos factores mais bem caracterizados é o factor trófico, NGF (*Nerve Growth Factor*) no cérebro adulto (Calza *et al*, 2003). Este factor actua também na indução de precursores envolvidos na diferenciação dos neurónios, bloqueando a proliferação celular (Calza *et al*, 2003). O ácido retinóico (AR) também está envolvido na diferenciação, especialmente ao nível de aquisição de destino neuronal e da aquisição do fenótipo colinérgico em várias linhas e tipos celulares (Calza *et al*, 2003).

Células com características de células neuronais:

As células estaminais neuronais possuem capacidade de proliferação e de diferenciação em todos os tipos de células neuronais das diferentes regiões do sistema nervoso central (Cho *et al*, 2002). As membranas das células neuronais possuem canais iónicos que desempenham papéis importantes na transmissão de sinais eléctricos que estão relacionados com a manutenção de diversas actividades celulares tais como a definição dos potenciais de repouso, repolarização e hiperpolarização das células e tamponamento do potássio extracelular (Cho *et al*, 2002). Neste sentido, a expressão de um determinado canal iónico é considerada como marcador de células precursoras neuronais (Cho *et al*, 2002). Além disso, neurónios totalmente diferenciados possuem pelo menos dois tipos de canais iónicos dependentes de voltagem, nomeadamente canais de sódio sensíveis à tetrodotoxina e canais de potássio, sendo ambos os tipos necessários para gerar um pico regenerativo (Cho *et al*, 2002). As células da glia também apresentam diversos canais de sódio e de potássio (Cho *et al*, 2002).

Do mesmo modo, as células reprogramadas deverão não só exibir o fenótipo pretendido, como deverão ser funcionais além de serem capazes de conseguir interagir com as células envolventes. Os neurónios maduros do sistema nervoso central, são células polarizadas, não mitóticas e que apresentam um axónio e várias dendrites (Song *et al*, 2002). As células diferenciadas deverão ser capazes de despoletar potenciais de acção e de comunicar com as outras células libertando e detectando neurotransmissores nas suas sinapses (Song *et al*, 2002).

Complexidade da morfologia e estabelecimento da polaridade neuronal após reprogramação:

É importante verificar se as células neuronais diferenciadas de células iPS apresentam polaridade neuronal, ou seja a formação apropriada de axónios e dendrites, assim o estabelecimento da polaridade é um marcador da diferenciação neuronal (Song *et al*, 2002). Para tal pode ser observada a distribuição de algumas proteínas como a GAP-43 (proteína de crescimento do cone axonal) e a MAP-2 (marcador de dendrites) (Song *et al*, 2002). Do mesmo modo, ao longo do tempo de diferenciação em cultura, pode ser detectado o aumento de complexidade da morfologia, ramificação das dendrites, o que também é indicador do processo de maturação das células (Vierbuchen *et al*, 2010; Werning *et al*, 2008). O estado de maturação das células também pode ser obtido realizando ensaios para determinar o pico do potencial de acção, potencial de repouso da membrana, resistência de entrada da membrana e capacitância de modo a observar sinais de maturação ao longo do tempo (Vierbuchen *et al*, 2010; Werning *et al*, 2008).

Funcionalidade das membranas celulares:

Para verificar se as membranas dos neurónios são funcionais podem ser realizados ensaios de *patch-clamp* de modo a observar actividade espontânea de pequenas correntes pós-sinápticas inibitórias (*miniature Inhibitory Post-Synaptic Currents* - mIPSCs) (Vierbuchen *et al*, 2010). Estas correntes podem ser inibidas pela aplicação de tetrodotoxina que é um bloqueador específico de canais de sódio, abolindo o potencial de acção (Maximov *et al*, 2007; Vierbuchen *et al*, 2010).

Pode também ser realizado um ensaio de *voltage-clamp* de modo a tentar observar a existência de correntes para dentro e para fora das membranas, o que será indicador da existência de canais dependes de voltagem de potássio e sódio, respectivamente (Vierbuchen *et al*, 2010). Está descrita a existência de vários tipos de neurónios e outras células que expressam canais de potássio que eliciam correntes para dentro da membrana em resposta a pulsos de hiperpolarização bem como a presença de canais de sódio dependentes de voltagem (Cai *et al*, 2004).

Canais iónicos dependentes de ligandos funcionais:

Uma das formas de verificar se os canais iónicos dependentes de ligandos são funcionais, pode ser mediada pela aplicação exógena de GABA que induz uma resposta pelas células neuronais (Vierbuchen *et al*, 2010). Em

canais funcionais esta resposta é inibida pela picrotoxina, dado que é um antagonista do receptor de GABA (Vierbuchen *et al*, 2010).

Caracterização do fenótipo dos neurotransmissores nas células neuronais:

Neurotransmissores podem ser moléculas de baixo peso molecular que são acumuladas em vesículas nos terminais nervosos, tais como acetilcolina, norepinefrina, epinefrina, dopamina, glutamato, GABA (*γ-Aminobutyric Acid*), TH (Tirosina Hidroxilase), entre outros (Nicholls *et al*, 2001).

O neurotransmissor presente em maior quantidade poderá ser o GABA, podendo encontrar-se outros tipos em menor quantidade como o glutamato ou acetilcolina (Vierbuchen *et al*, 2010).

Glut1, um receptor de glutamato, é regulado de modo complexo e parece estar implicado na diferenciação e desenvolvimento celular (Cai *et al*, 2004). Não é expresso em células progenitoras de diferenciação neuronal ou em neurónios e células da glia totalmente diferenciados, mas foi observado estar presente em cérebros de ratos adultos em astrócitos e oligodendrócitos (Cai *et al*, 2004; Singh *et al*. 1996; Yu 1998). Assim Glut1 poderá ser específico de células neuronais estaminais nos estádios iniciais de desenvolvimento (Cai *et al*, 2004). A sua presença é indicadora de existência de neurónios glutamatérgicos (Vierbuchen *et al*, 2010).

Segundo Ecurat *et al*, (1990) a periferina, que é um filamento intermédio dos neurónios periféricos, não se expressa em células estaminais neuronais e pode expressar-se juntamente com a NF-L (*Neurofilament Light subunit*) tanto em neurónios com a mesma origem ou origens diferentes mas com a mesma função, como em neurónios com funções diferentes.

Por outro lado, em cultura podem estar ser formados neurónios do tipo dopaminérgico os quais podem ser detectados pela marcação com TH (Huawei *et al*, 2009).

Determinação da eficiência de conversão em células neuronais

A eficiência de conversão pode ser estimada por quantificação (Vierbuchen *et al*, 2010). São escolhidas células com morfologia neuronal, ou seja que possuem aparência circular e que possuem estruturas tridimensionais tipo dendrites maiores que o seu corpo celular (Vierbuchen *et al*, 2010; Werning *et al*, 2008). A eficiência de reprogramação pode ser calculada através da contabilização do número de colónias iPS o qual é dividido pelo número de células e foram capazes de se tornarem reprogramadas (Hamilton *et al*, 2009).

Assim é possível estimar a percentagem de células da população inicial que adquiriram características de neurónios (Vierbuchen *et al*, 2010). De modo a identificar as células que se diferenciaram, é adicionado ao meio de cultura 5-bromodioxiuridina (BrdU) um dia após a aplicação do *piggyBac* (Vierbuchen *et al*, 2010). Há ainda que referir que estes cálculos podem ser subestimados dada a verdadeira taxa de conversão, pois nem todas as células são transfectadas (Vierbuchen *et al*, 2010).

Deteccção de sinapses nas células neuronais:

As sinapses são locais de contacto entre as células nervosas e os seus alvos, sendo transmitidos sinais de uma célula para outra (Nicholls *et al*, 2001). Podemos distinguir entre sinapses eléctricas e químicas. No caso de sinapses eléctricas a corrente passa de um terminal nervoso pré-sináptico para um terminal nervoso pós-sináptico o que resulta numa alteração de potencial (Nicholls *et al*, 2001). Nas sinapses químicas quando se dá um potencial de acção num terminal nervoso pré-sináptico, há libertação de moléculas de neurotransmissor (Nicholls *et al*, 2001). Estas podem ser classificadas em directas, nas quais o transmissor se liga a receptores ionotrópicos na membrana celular pós-sináptica e indirectas, nas quais estão envolvidos receptores metabotrópicos e mensageiros secundários intracelulares (Nicholls *et al*, 2001).

O tempo de duração das correntes sinápticas depende de vários factores, tais como a composição dos receptores sinápticos, a taxa à qual se dessensibilizam, a sua afinidade para o transmissor e a taxa e a duração do tempo a que o transmissor se liberta da fenda sináptica (Wall *et al*, 2002). Ao longo do desenvolvimento também se verificam mudanças na morfologia das sinapses e na expressão de receptores e transportadores bem como de diferentes tipos de transmissores (Wall *et al*, 2002). Assim, verifica-se que a característica distintiva de neurónios maduros é a sua capacidade de formar sinapses (Song *et al*, 2002). A existência de sinapses em neurónios maduros pode ser detectada através de marcação com sinapsina I, que é uma proteína de vesícula sináptica que se concentra nas sinapses (Song *et al*, 2002). A formação das sinapses pode ser detectada não só através da sinapsina mas também através de sinaptofisina (Song *et al*, 2002).

Determinação da funcionalidade das sinapses:

Além da detecção de sinapses, é necessário verificar se são funcionais o que pode ser realizado através da monitorização da sua capacidade de integração de ligações neuronais pré-existentes e verificando se as células são capazes de formar sinapses entre si (Vierbuchen *et al*, 2010). De modo a detectar a existência de ligações neuronais pré-existentes, pode realizar-se o ensaio em *patch clamp* verificando-se assim se há correntes excitatórias e inibitórias (Vierbuchen *et al*, 2010). Nas primeiras os transmissores abrem canais que são permeáveis a aniões que normalmente mantêm o potencial de membrana negativo relativamente ao limiar de acção. Nas segundas a abertura dos canais permite a passagem de catiões o que resulta num aumento do potencial de membrana conduzindo a um limiar de acção (Nicholls *et al*, 2001).

De modo a detectar correntes pós-sinápticas inibitórias (IPSCs) espontâneas podem ser aplicados CNQX (6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione) e D-AP5 (D(-)-2-amino-5-phosphonovaleric acid) (Vierbuchen *et al*, 2010). Estes são bloqueadores dos seguintes receptores dos canais: AMPA (α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid) e NMDA (N-methyl-D-aspartate) o que deste modo leva a existência de correntes em direcção ao interior (Maximov *et al*, 2007). A detecção de IPSCs evocados pode ser observada por aplicação de picrotoxina que é um bloqueador e eliciador de IPSCs. Da mesma forma podem ser detectadas correntes pós-sinápticas excitatórias (EPSCs) por bloqueio com picrotoxina (Vierbuchen *et al*, 2010). Quando é mantido um potencial de corrente negativo, EPSCs possuem uma

corrente em direcção ao interior, que é inicialmente mediada por receptores AMPA, dado que os receptores NMDA estão bloqueados pela presença de extracelular de magnésio (Maximov *et al*, 2007). Quando é alterada a voltagem para valores positivos, o bloqueio sobre os receptores NMDA diminui, o que leva a ocorrência de corrente com direcção para o exterior (Maximov *et al*, 2007). EPSCs espontâneos podem ser observados pela presença de picrotoxina (Vierbuchen *et al*, 2010).

Os astrócitos produzem vários factores solúveis associados às membranas que influenciam o desenvolvimento do sistema nervoso central, nomeadamente a sinapsogénese (Song *et al*, 2002). Por este motivo são colocadas as culturas de neurónios juntamente com uma monocamada de células da glia o que nos permite saber se as células são capazes de formar sinapses entre si (Vierbuchen *et al*, 2010). Para tal são monitorizadas EPSCs espontâneas e evocadas. Em EPSCs espontâneas, o NBQX (2,3-dihydroxy-6-nitro-7-sulphamoyl-benzo[f]quinoxaline-2,3-dione) é um antagonista do receptor AMPA e observa-se EPSCs mediadas pelo receptor NMDA (Vierbuchen *et al*, 2010). Do mesmo modo D-AP5 é um bloqueador de resposta de EPSCs mediada por AMPAR. Quando são evocadas respostas de EPSCs é observado o bloqueio através de NBQX e D-AP5 (Vierbuchen *et al*, 2010).

Deteccção de neurónios colinérgicos:

Estudos anteriores descrevem a expressão determinados tipos de receptores desde o estágio células estaminais neuronais, tais como receptores de nicotina, muscarina e acetilcolina (Cai *et al*, 2004). Além disso a activação do receptor colinérgico desempenha um papel importante na proliferação neuronal e na diferenciação (Cai *et al*, 2004). No entanto, muitas vezes verifica-se que as células estaminais não respondem à maioria dos neurotransmissores (Cai *et al*, 2004). Por exemplo, não foi detectada a expressão colina acetiltransferase em neurónios em fibroblastos embrionários de ratinhos, 21 dias após a aplicação de meio neuronal para diferenciação em neurónios (Vierbuchen *et al*, 2010).

A disfunção nos neurónios colinérgicos, na zona do prosencéfalo basal resulta em defeitos cognitivos e motores como no caso da doença do Alzheimer (Furusho *et al*, 2006). Os neurónios colinérgicos são o maior conjunto de neurónios do sistema nervoso central dos mamíferos e podem ser identificados pela actividade da acetilcolinesterase, que é uma enzima limitante na taxa de síntese da acetilcolina (Furusho *et al*, 2006). Assim a presença de acetilcolina pode ser identificada por imunohistoquímica, utilizando anticorpo anti-acetilcolinesterase, o que permite reconhecer a presença do tipo de neurónios referido.

De modo a verificar a actividade, sabe-se que, por exemplo os receptores de acetilcolina nicotínicos, apresentam uma corrente de rectificação de potencial transmembranar maiores de que -40mV, o que permite que o fluxo de corrente quando a célula está hiperpolarizada e este fluxo vai diminuindo progressivamente. Os receptores passam corrente e proporcionam a entrada de cálcio a potenciais de membrana negativos o que provoca uma força condutora de corrente para o interior (Dani e Bertrand, 2007).

Há várias substâncias descritas e utilizadas para observação da cinética dos neurónios. Assim através de ensaios de *patch clamp* podem ser aplicadas substâncias antagonistas dos receptores de acetilcolina. Por exemplo a

aplicação de metilcanonitina ou α -bungarotoxina bloqueiam a correntes de que resultam da activação do receptor de acetilcolina (7- α -nAChR) (Albuquerque *et al*, 2009).

PROTOCOLO RESUMIDO

Indução de pluripotência:

Adaptado de Aasen *et al*, 2008 e Woltjen *et al*, 2009.

1. Meio de cultura

Os queratinócitos recolhidos de pacientes com a doença de Alzheimer após tripsinização são colocados em meio sem soro e com baixos níveis de cálcio. 24 horas antes da transfecção altera-se o meio para um meio de cultura típico de células estaminais contendo 20% de KnockOutTM Serum Replacement (InvitrogenTM).

2. Transposão *piggyBac*

O transposão *piggyBac* é construído através da montagem dos seus vários factores, sendo constituído por um promotor indutível por doxíciclina ($tetO_2$), seguido das *Open Reading Frames* (ORFs) dos quatro factores de reprogramação, Oct4, Sox2, Klf4 e UTF1, clonados a partir de vectores virais, ligadas à sequência codificante do péptido 2A (OSKU2A). O transposão tem também uma sequência IRES (*Internal Ribosome Entry Site*) para a iniciação da tradução, uma *cassete* de fusão entre o gene para a β -galactosidase (gene repórter) e o de resistência à neomicina (β geo), finalizado pela sequência poliA.



Figura 3 – Esquema da constituição do transposão *piggyBac*

3. Transfecção

Após 24 horas no meio de cultura transfectam-se os queratinócitos com o transposão *piggyBac* inserido num plasmídeo vector e um plasmídeo adicional codificante para a transposase específica de *piggyBac*, utilizando-se para tal a técnica de electroporação célula-a-célula. Passadas 24 horas suplementa-se o meio com doxíciclina e com VPA, sendo este o dia 0 da cultura. O meio é mudado a cada 48 horas e continua-se o tratamento com doxíciclina durante 20 dias.

4. Imunofluorescência e análise da actividade da AP

Uma amostra das células reprogramadas é retirada, colocada em câmaras de plástico e fixada com paraformaldeído a 4%. Para a análise são utilizados os anticorpos primários anti AP, TRA-1-60, TRA-1-81, SSEA-1, SSEA-3, SSEA-4, Sox2, Oct4, NANOG e Rex-1, como anticorpo secundário utiliza-se AlexaFluor. As imagens são adquiridas com um microscópio confocal e a actividade da AP é directamente analisada através de um *kit* próprio para o efeito.

5. Análise de PCR

A técnica de qRT-PCR é utilizada para análise de expressão dos factores de reprogramação exógenos com *primers* específicos para Oct4, Sox2, Klf4 e UTF1, e para o estudo de expressão dos marcadores típicos de células estaminais embrionárias humanas com *primers* específicos para hNanog, hLin28, hDnmt3b, hRex1, hFGF4, hTERT, hESG, hGDF e Gapdh (como controlo interno).

Após remoção do transposão utilizamos a técnica de PCR, com *primers* específicos para as sequências do transposão β geo, 5'TR e 3'TR.

6. Remoção do transposão

As culturas de clones estáveis são transfectadas com o plasmídeo contendo a transposase específica para o *piggyBac*, numa proporção elevada. A confirmação da remoção do transposão é feita por PCR específico do transposão.

Recombinação homóloga:

Adaptado de Urnov *et al*, 2005 e Wright *et al*, 2005.

7. Através do mesmo método electroporação célula-a-célula acima descrito, insere-se o plasmídeo que codifica a ZFN em conjunto com o plasmídeo com a cadeia de DNA dadora (a que irá recombinar com o genoma).

Diferenciação de células neuronais:

Adaptado de Vierbuchen *et al*, 2010; Wernig *et al*, 2008 e Wu *et al*, 2007.

8. Cultura das células para indução de células neuronais

As células são cultivadas em meio de cultura neuronal N3 (Meio de Eagle modificado F12 – DMEM/F12, 25µg/mL de insulina, 50 µg/mL APO transferrina, 50mM de Selenito de Sódio, 20mM de progesterona, 100nM de putrescina, 10ng/mL FGF2 e penicilina/streptomomicina).

São realizados quatro variantes do meio de cultura durante 12 dias, uma em meio N3 sem suplementos, outra em meio N3 juntamente com EGF e FGF2. De modo a expandir inicialmente as células com posterior diferenciação em qualquer célula neuronal progenitora utiliza-se o meio N3 suplementado com EGF e FGF2, os quais são retirados ao fim de 8 dias. Para promover a formação de neurónios colinérgicos segue-se o passo anterior, adicionando-se ácido retinóico, NDF e astrócitos após os factores EGF e FGF2 serem retirados

9. Detecção da presença de marcadores neuronais

Após 7 e 12 dias realiza-se testes de imunofluorescência, com anticorpos para antigénios que incluam marcadores de células estaminais neuronais (Sox2, Brn2, GFAP), marcadores de progenitoras de células neuronais periféricas e espinais (p75, Pax3, Pax6, Pax7, Nkx2-2, Olig1) e marcadores de neurónios e de células da astroglia (Tuj1, TauEGFP, GFAP, Olig1). Fixa-se as células com paraformaldeído a 4% em PBS durante 10 minutos.

Realiza-se RT-PCR a partir de cDNA isolado das células para verificar a expressão ao longo de um período de tempo, cerca de 72 horas.

10. Caracterização das células

Ao longo do tempo da cultura observar o aumento da complexidade da morfologia das células e o desenvolvimento de polaridade neuronal.

Para verificar a funcionalidade das membranas das células utiliza-se a técnica de *patch-clamp*, realizando medições 8, 12 e 20 dias após indução de pluripotência. Observar o bloqueio dos potenciais de acção com TTX que é um bloqueador específico de canais iónicos de sódio.

Para verificar se as células possuem canais iónicos dependentes de ligandos funcionais, induz-se as células a responder ao GABA aplicado. Aplicar também picrotoxina, antagonista do receptor de GABA.

A caracterização do fenótipo dos neurotransmissores é realizada após 21 dias das células em cultura em meio neuronal mínimo, através de imunofluorescência.

11. Determinação da eficiência e de conversão das células

A eficiência de conversão (EF) pode ser calculada pelo número de células tratadas com BrdU que se diferenciam dividindo-o pelo número total de células induzidas à pluripotência a partir do dia 1 após a indução.

12. Deteccção de Sinapses Funcionais

Realiza-se imunofluorescência para detectar sinapsina, que é indicadora da existência de sinapses.

Para determinar se as sinapses funcionais e capazes de integração de ligações neuronais pré-existentes coloca-se as células em cultura de neurónios corticais neo-natais. Após 7 dias, realiza-se *patch-clamp* para observação de correntes pos-sinápticas IPSCs espontâneas e evocadas. A observação da ocorrência IPSCs espontâneas pode ser realizada, aplicando MCNQX e D-AP5. Os IPSCs evocados podem ser bloqueados com a aplicação de picrotoxina. Realiza-se a monitorização do potencial de voltagem dos receptores AMPA e NMDA. Do mesmo modo pode ser observada a existência de EPSCs.

Para determinar se as células são capazes de formar sinapses entre si, são colocadas durante 7 dias em cultura de monocamada de astrócitos primários, que se pensa terem papel importante na sinapsogénese. Após este período realiza-se o *patch-clamp*. Monitoriza-se EPSCs espontâneas e evocadas, mediadas por NMDAR na presença de NBQX e D-AP5. Utilizar os mesmos reagentes para monitorizar IPSCs evocadas e espontâneas.

13. Deteccção e determinação da actividade de neurónios colinérgicos

Realização de imunofluorescência utilizando anticorpo anti-acetilcolinesterase e *patch clamp* utilizando o bloqueador α -bungarotoxina.

RESULTADOS ESPERADOS

Indução de pluripotência:

A eficiência esperada de reprogramação dos queratinócitos é cerca de 1% ou superior, apesar de ser um valor baixo é superior ao valor obtido nos estudos iniciais por Takahashi e Yamanaka (2006), devido ao facto de ter sido substituído o factor c-Myc pelo UTF1 e suplementado o meio com VPA.

Espera-se que as células reprogramadas expressem marcadores celulares típicos de células estaminais ao fim de cerca de 20 dias, como exemplificado pela figura 4, podendo esta expressão ser confirmada por qRT-PCR. No estado de pluripotência, as células têm capacidade de se diferenciarem nas três linhagens germinativas, sendo esta diferenciação um dos testes controlo. Com o nosso protocolo espera-se que haja diferenciação das células iPS nestas três linhagens, endoderme, mesoderme e ectoderme, como representado pela figura 5).

A utilização de transposões requer posterior remoção destes do genoma celular após reprogramação, como tal e a partir do nosso protocolo esperamos obter uma elevada eficiência de remoção, a qual pode ser confirmada por PCR específico para o transposão utilizado (Figura 6).

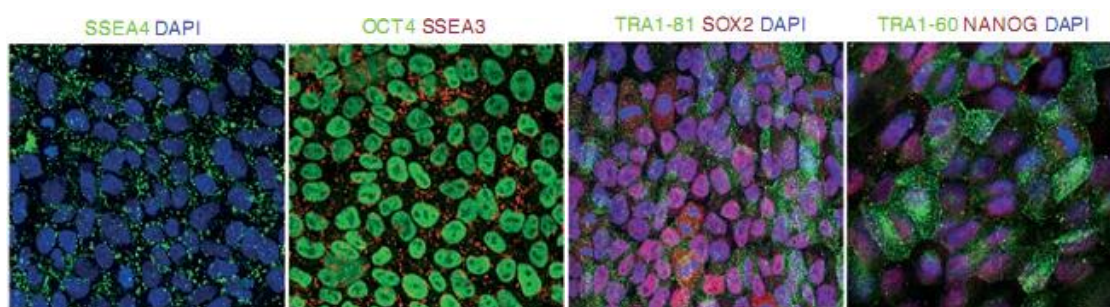


Figura 4 – Representação da análise por imunofluorescência de expressão de alguns dos marcadores típicos de células estaminais em células induzidas à pluripotência. Adaptado de Aasen *et al*, 2008.

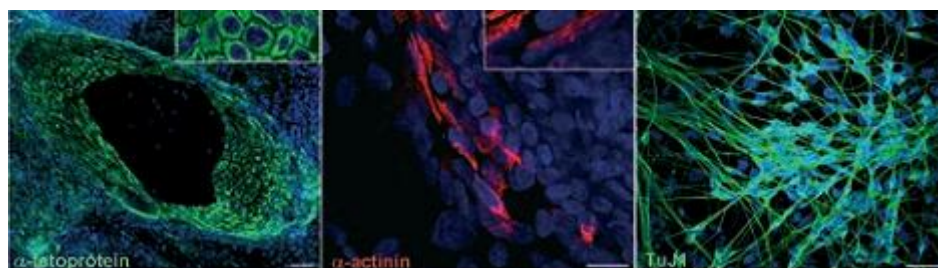


Figura 5 – Representação por imunofluorescência da diferenciação das células iPS nas três linhagens germinativas, endoderme (α -fetoprotein, verde), mesoderme (α -actinin, vermelho) e ectoderme (TuJ1, verde). Adaptado de Aasen *et al*, 2008.

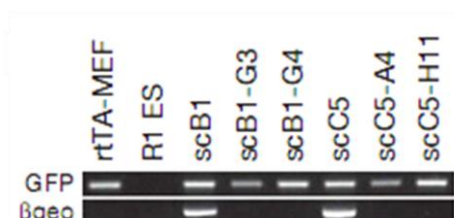


Figura 6 – Demonstração molecular da remoção do transposão das linhas celulares iPS (scB1-G3, scB1-G4, scC5-A4 e scC5-H11 são subclones das colónias de células iPS). GFP é um controlo interno, β geo é o marcador específico para a detecção do transposão, rtTA-MEF são células parentais e R1ES é um controlo negativo. Adaptado de Woltjen *et al*, 2009.

Deteccção da presença de marcadores neuronais:

As células após 14 dias em meio neuronal deverão exibir características de células neuronais, tais como a polaridade e morfologia complexa e expressão de marcadores referidos no protocolo (figura 7).

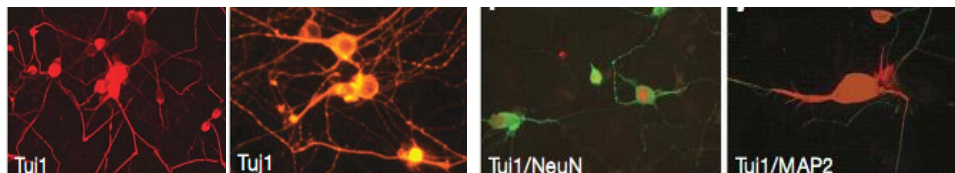


Figura 7 - Características das células ao fim de 12 dias. As células apresentam morfologia complexa e ensaios imunofluorescência revelam a presença de marcadores da diferenciação neuronal. Representação da presença de diferentes marcadores neuronais: *Tuj1* (vermelho), *NeuN* (vermelho), *MAP2* (vermelho). Adaptado de Vierbuchen *et al*, 2010.

Expressão de marcadores neuronais através de RT-PCR:

A realização de RT-PCR permite verificar se os marcadores da diferenciação de células neuronais estão a expressar e completa a informação fornecida pelo ensaio de imunofluorescência. O ensaio de RT-PCR pode ser realizado para vários períodos de tempo tal como é apresentado na figura 8.

Assim espera-se um aumento da expressão dos genes ao longo do tempo indicando que as células apresentam uma morfologia mais complexa e se tornam mais diferenciadas.

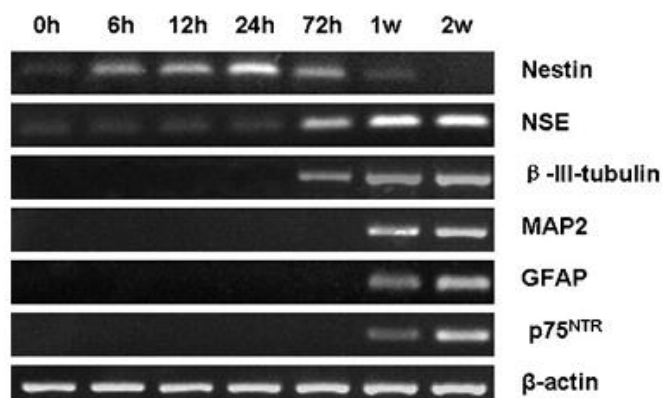


Figura 8 - Confirmação da presença de marcadores neuronais através de RT-PCR ao longo de um período de 72 horas. O gene de β -actina é utilizado como controlo. Os restantes genes representados são marcadores da diferenciação neuronal. Adaptado de Ni *et al*, 2010.

Caracterização das células com características neuronais:

De modo a verificar a funcionalidade das membranas das células realizam ensaios de modo a verificar a existência de potenciais de acção, resistência da membrana e capacitância da membrana, 8, 12 e 20 dias após a indução da diferenciação sendo indicadores de maturação das células. Além disso a

aplicação de TTX deverá levar ao bloqueio dos canais de sódio ocorrendo diminuição da corrente de voltagem (figura 9).

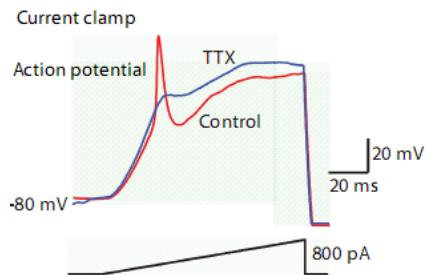


Figura 9 - Bloqueio do potencial de acção com a aplicação de TTX. Adaptado de Vierbuchen *et al*, 2010.

Existência de canais funcionais dependentes de ligandos:

A aplicação de GABA deverá induzir aumento de actividade a deverá ser bloqueada após a aplicação de picrotoxina, o que pode ser observado através da figura 10. Este ensaio é mostra que as células apresentam canais funcionais dependentes de ligandos.

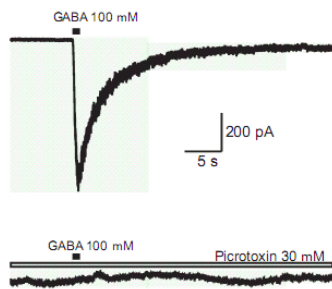


Figura 10- Respostas das células à aplicação de GABA e de picrotoxina. Adaptado de Vierbuchen *et al*, 2010.

Caracterização do fenótipo do neurotransmissor:

Dada elevada diversidade de neurotransmissores que existem pode ser observada a presença de diferentes tipos, tais como acetilcolina, norepinefrina, epinefrina, dopamina, glutamato, GABA e TH. Esperando-se que haja variações, sendo que alguns irão ser mais predominantes e outros poderão nem ser detectados.

Deteccção de sinapses nas células neuronais:

Anteriormente foi referido que as sinapses podem ser detectadas pela presenças de sinapsina, assim espera-se que através de imunofluorescência visualizar a sua presença (figura 11).



Figura 11: Representação da marcação de sinapsina em células em fase de diferenciação neuronal. Adaptado de Vierbuchen *et al*, 2010.

Determinação da funcionalidade das sinapses:

De acordo com a bibliografia consultada espera-se a observação de correntes pós sinápticas excitatórias e inibitórias tanto espontâneas, como evocadas. Assim deveria observar-se a actividade ao nível dos receptores AMPA e NMDA. Estes deverão ser sofrer alteração com a aplicação dos compostos referidos que são bloqueadores específicos dos receptores. Em cultura com neurónios corticais, espera-se que CNQX e AP5 levem ao IPSCs espontâneas, e que a picrotoxina possua o mesmo efeito sobre EPSCs espontâneas. Para IPSCs evocados a aplicação de picrotoxina deverá inicialmente bloquear a corrente e de seguida eliciar, assim ao fim de relativamente pouco tempo a corrente pós-sináptica inibitória regressa ao valor inicial.

Para observação de ligações das células neuronais entre si em cultura juntamente com astrócitos esperando-se a o bloqueio de correntes EPSCs evocadas nos receptores AMPA através da aplicação de NBQX e AP-5. Além disso, para EPSCs espontâneas espera-se que ocorra bloqueio do receptor AMPA, ocorrendo apenas correntes mediadas por NMDAR que posteriormente também serão bloqueados.

Deteccção de neurónios colinérgicos

Relativamente à obtenção e detecção de neurónios colinérgicos espera-se a observação de elevada densidade destes, cuja formação foi induzida (figura 12). Do ensaio electrofisiológico é esperada a observação do bloqueio do potencial através da aplicação α -bungarotoxina que é um bloqueador de neurónios de acetilcolina.

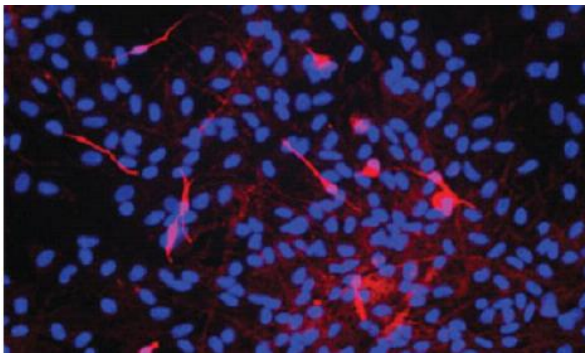


Figura 12 - Representação de células estaminais do sistema nervoso humanas cultivados em meio com astrócitos diferenciadas e marcadas com anticorpo contra a acetilcolinesterase. Adaptado de Jordan *et al*, 2008.

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Com o desenvolvimento da ciência e tecnologia podem ser realizadas diversas abordagens para procurar encontrar terapias possíveis para diversas doenças, cujos mecanismos ainda são desconhecidos e cujos tratamentos existentes nem sempre são suficientemente eficazes. Neste sentido, surge a tentativa de reprogramar e diferenciar células após a indução de pluripotência com o objectivo de possuir modelos mais aproximados da realidade para melhor compreensão dos processos envolvidos nas doenças. Assim, o objectivo final será a obtenção de tecidos saudáveis que poderiam ser

inseridos cirurgicamente nos doentes, evitando-se por vezes o transplante de órgãos heterólogos, que podem ser rejeitados.

Apesar de promissoras, estas técnicas ainda requerem optimização, pois ainda apresentam baixas taxas de sucesso tanto a nível de indução de pluripotência, como na diferenciação de células e/ou tecidos pretendidos. Há ainda que referir que as células iPS possuem um tempo de vida definido e que nem todos os tipos de células somáticas são igualmente passíveis de ser induzidas a pluripotência. Por outro lado, são técnicas dispendiosas, morosas e que são difíceis de executar, sendo por isso necessários mais avanços de modo a ser aumentado a eficiência e rapidez das mesmas.

Com este projecto apresenta-se um método que visa o melhoramento dos protocolos e que seria útil na medida em que permitiria estudar mais a fundo os processos da doença de Alzheimer, com a perspectiva de uma terapia.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aasen, T., Raya, A., Barrero, M.J., Garreta, E., Consiglio, A., Gonzalez, F., Vassena, R., Bilic, J., Pekarik, V., Tiscornia, G., Edel, M., Boué, S. e Belmonte, J.C.I. (2008) Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes. *Nature Biotechnology*, 26: 1276-1284. doi: 10.1038/nbt.1503.
- Alberio, R., Campbell, K.H., e Johnson, A.D. (2006) Focus on Stem Cells, Reprogramming somatic cells into stem cells. *Reproduction*, 132: 709–720. doi: 10.1530/rep.1.01077.
- Albuquerque, E.X., Pereira, E.F.R., Alkondon, M., e Rogers, S.W., (2009). Mammalian Nicotinic Acetylcholine Receptors: From Structure to Function. *Physiol Rev*, 89, 73–120.
- Bentahir, M.; Nyabi, O.; Verhamme, J., Tolia, A.; Horr , K., Wiltfang, J., Esselmann, H. e De Strooper, B. (2006) Presenilin clinical mutations can affect gamma-secretase activity by different mechanisms, *J Neurochem.*, 96(3): 732-742.
- Blelloch, R., Venere, M., Yen, J., Ramalho-Santos, M. (2007) Generation of induced pluripotent stem cells in the absence of drug selection. *Cell Stem Cell*, 1: 245-247. doi:10.1016/j.stem.2007.08.008.
- Brambrink, T., Foreman, R., Welstead, G.G., Lengner, C.J., Wernig, M., Suh, H. e Jaenisch, R. (2008) Sequential expression of pluripotency markers during direct reprogramming of mouse somatic cells. *Cell Stem Cell*, 2: 151-159. doi: 10.1016/j.stem.2008.01.004.
- Cai, J., Cheng, A., Luo, Y., Lu, C., Mattson, M.P., Rao, M.S., e Furukawa, K., (2004). Membrane properties of rat embryonic multipotent neuronal stem cells. *Journal of Neurochemistry*, 88, 212–226.
- Caine, J.; Sankovich, S.; Antony, H.; Waddington, L.; Macreadie, P.; Varghese, J. e Macreadie, I. (2007) Alzheimer's A β fused to greenfluorescent protein induces growth stress and a heat shock response, *FEMS Yeast Res*, 7: 1230–1236.
- Calza, L., Giuliani, A., Fernandez, M., Pirondi, S., D'Intino, G., Aloe, L., e Giardino, L., (2003). Neuronal stem cells and cholinergic neurons: Regulation by immunolesion and treatment with mitogens, retinoic acid, and nerve growth factor. *PNAS*, vol. 100, no. 12, 7325–7330.
- Chamberlain, S.J., Li, X.J., e Lalande, M., (2008). Induced pluripotent stem (iPS) cells as in vitro models of human neurogenetic disorders. *Neurogenetics*, 9, 227–235.
- Cho, T., Bae, J. H., Choi, H. B., Kim, S. S., McLarnon, J. G., Kim, H.S., Kim, S.U., CA e C. K. Min, C.K., (2002). Human neuronal stem cells: electrophysiological properties of voltage-gated ion channels. *Membrane Biophysics and Biochemistry*, 13(117): 1447-1452.
- Collas, P., (2003). Nuclear reprogramming in cell-free extracts. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*, 358: 1389-1395. doi: 10.1098/rstb.2003.1334.
- Dani, J.A., e Bertrand D., (2007). Nicotinic Acetylcholine Receptors and Nicotinic Cholinergic Mechanisms of the Central Nervous System. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 47, 699-729.

- Denham, M., e Dottori, M. (2009). Signals Involved in Neuronal Differentiation of Human Embryonic Stem Cells. *Neurosignals*, 17, 234–241.
- Escurat, M., Djabali, K., Gumpel, M., Gros, F. e Portier, M. M. (1990). Differential expression of two neuronal intermediate-filament proteins, peripherin and the low-molecular-mass neurofilament protein (NF-L), during the development of the rat. *J. Neurosci.* 10, 764–784.
- Ertekin-Taner, N. (2010) Genetics of Alzheimer disease in the pre- and post-GWAS era. *Alzheimer's Research & Therapy*, 2:3. doi:10.1186/alzrt26.
- Francis, P.T.; Palmer, A.M.; Snape, M. (1999) The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: a review of progress, *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 66: 137-147. doi: 10.1136/jnnp.66.2.13.
- Frautschy, S.A. e Cole, G.M. (2010) Why Pleiotropic Interventions are Needed for Alzheimer's Disease, *Mol Neurobiol*, doi:10.1007/s12035-010-8137-1.
- Fuchs, E. (2007) Scratching the surface of skin development. *Nature*, 445: 834-842. doi: 10.1038/nature05659.
- George-Hyslop, P.H. (2000) Molecular genetics of Alzheimer's disease, *Biological Psychiatry*, 47: 183-199.
- Griffiths, A.J.F.; Wessler, S.R.; Lewontin, R.C.; Gelbart, W.M.; Suzuki, D.T. e Miller, J.H. (2005) Mutation, repair and recombination. In: Introduction to genetic analysis, pp.451-480, 8ª Edição, W.H. Freeman and Company, EUA, Nova Iorque.
- Gurdon, J.B., e Melton, D.A., (2008) Nuclear Reprogramming in Cells. *Science*, 322: 1811-1815. doi: 10.1126/science.1160810.
- Hamilton, B., Feng, Q., Ye, M., e Welstead, G.G., (2009). Generation of induced pluripotent stem cells by reprogramming mouse embryonic fibroblasts with a four transcription factor, doxycycline inducible lentiviral transduction system. *Stemgent, Inc.* 1-10.
- Hipp, J., e Atala, A., (2008) Sources of Stem Cells for Regenerative Medicine. *Stem Cell Rev*, 4: 3 - 11. doi:10.1007/s12015-008-9010-8.
- Huangfu, D., Osafune, K., Maehr, R., Guo, W., Eijkelenboom, A., Chen, S., Muhlestein, W. e Melton, D.A. (2008) Induction of pluripotent stem cells from primary human fibroblasts with only Oct4 and Sox2. *Nature Biotechnology*, 26: 1269-1275. doi:10.1038/nbt.1502.
- Hutton, M. e Hardy, J. (1997) The presenilins and Alzheimer's disease, *Human Molecular Genetics*, 6(10): 1639–1646.
- Imitola, J., (2007). Prospects for Neuronal Stem Cell-Based Therapies for Neurological Diseases. *The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, 4, 701–714.
- Invitrogen™. (2010). KnockOut™ Serum Replacement for ES & iPS Cell Culture. Retirado no dia 17 de Maio de 2010, do site <http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/Products-and-Services/Applications/Cell-Culture/Stem-Cell-Research/Embryonic-Stem-Cells/ESC-Stem-Cell-Culture-Media-Reagents/knockout-serum-replacement.html>.
- Ito, K.; Katada, H.; Shigi, N. e Komiyama, M. (2009) Site-selective scission of human genome by artificial restriction DNA cutter, *Chem. Commun.*, 6542–6544, doi: 10.1039/b911208a.
- Jordan, P.M., Cain, L.D., e Wu, P., (2008). Astrocytes Enhance Long-Term Survival of Cholinergic Neurons Differentiated From Human Fetal Neuronal Stem Cells. *Journal of Neuroscience Research*, 86: 35 - 47. Doi: 10.1002/jnr.21460.
- Kaji, K., Norrby, K., Paca, A., Mileikovsky, M., Mohseni, P. e Woltjen, K. (2009). Virus-free induction of pluripotency and subsequent excision of reprogramming factors. *Nature*, 458: 771-775. doi:10.1038/nature07864.
- Katada, H.; Chen, H.J.; Shigi, N. e Komiyama, M. (2009) Homologous recombination in human cells using artificial restriction DNA cutter, *Chem. Commun.*, 43: 6545–6547. doi: 10.1039/b912030k.
- Khine, M.; Lau, A.; Ionescu-Zanetti, C.; Seo, J. e Lee, L.P. (2005) A single cell electroporation chip, *Lab Chip*, 5: 38–43.
- Kim, D.S., Lee, J.S., Leem, J.W., Huh, Y.J., Kim, J.Y., Kim, H.S., Park, I.H., Daley, G.Q., Hwang, D.Y., Kim, D.W., (2010). Robust Enhancement of Neuronal Differentiation from Human ES and iPS Cells Regardless of their Innate Difference in Differentiation Propensity. *Stem Cell Rev and Rep.*

- Komiyama, M.; Aiba, Y.; Yamamoto, Y. e Sumaoka, J. (2008) Artificial restriction DNA cutter for site-selective scission of double-stranded DNA with tunable scission site and specificity, *Nature Protocols*, 3: 655 – 662.
- LaFerla, F.M.; Green, K.N. e Oddo, S. (2007) Intracellular amyloid- β in Alzheimer's disease, *Nature*, 8: 499-509. doi:10.1038/nrn2168.
- Lewitzky, M., e Yamanaka, S., (2007). Reprogramming somatic cells towards pluripotency by defined factors. *Current Opinion in Biotechnology*, 18: 467–473. doi: 10.1016/j.copbio.2007.09.007.
- Li, H., Liu, H., Corrales, C.E., Risner, J.R., Forrester, J., Holt, J.R., Heller, S., e Edge, A.SB, (2009). Differentiation of neurons from neuronal precursors generated in floating spheres from embryonic stem cells. *BMC Neuroscience*, 10,122, 1 a 12.
- Lleó, A.; Greenberg, S.M. e Growdon, J.H. (2006) Current pharmacotherapy for Alzheimer's disease, *Annu. Rev. Med.*, 57: 513–533.
- Maccioni, R.B.; Muñoz, J.P. e Barbeito, L. (2001) The Molecular Bases of Alzheimer's Disease and Other Neurodegenerative Disorders, *Archives of Medical Research*, 32: 367–381.
- Maximov, A., Pang, Z. P., Tervo, D. G., e Sudhof, T. C. (2007). Monitoring synaptic transmission in primary neuronal cultures using local extracellular stimulation. *J. Neurosci. Methods* 161, 75–87.
- Maximov, A. & Sudhof, T. C. (2005). Autonomous function of synaptotagmin 1 in triggering synchronous release independent of asynchronous release. *Neuron*, 48, 547–55.
- Mohandas, E.; Rajmohan, V. e Raghunath, B. (2009) Neurobiology of Alzheimer's disease, *Indian Journal of Psychiatry*, 51(1): 55-61.
- Munter, L-M., Botev, A., Richter, L., Hildebrand, P.W., Althoff, V., Weise, C., Kaden, D. e Multhaup, G., (2010). Aberrant APP processing in hereditary forms of Alzheimer disease caused by APP-FAD mutations can be rescued by mutations in the APP GxxxG motif. doi/10.1074/jbc.M109.088005.
- Nakagawa, M., Koyanagi, M., Tanabe, K., Takahashi, K., Ichisaka, T., Aoi, T., Okita, K., Mochiduki, Y., Takizawa, N. e Yamanaka, S. (2008) Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nature Biotechnology*, 26: 101-106. doi: 10.1038/nbt1374.
- Nakayama, M. (2010) Homologous recombination in human iPS and ES cells for use in gene correction therapy, *Drug Discovery Today*, 15(5/6): 198-202. doi:10.1016/j.drudis.2010.01.006.
- Ni, W.F., Yinb, L.H., Luc, J., Xua,H.Z., Chi, Y.L., Wub, J.B., Zhangd, N., (2010). In vitro neuronal differentiation of bone marrow stromal cells induced by co-cultured olfactory en sheathing cells. *Neuroscience Letters*, 475: 99 - 103. doi:10.1016/j.neulet.2010.03.056.
- Nicholls, J.G., Martin, A.R., Wallace, B.G., Fuchs, P.A. (2009) Principles of direct Synaptic Transmission. In: From neuron to brain, pp. 155-173. 4ª Edição. *SINAUER Associates*, Inc, Publishers, EUA, Massachusetts.
- O'Connor, M.D., Kardel, M.D., Iosfina, I., Youssef, D., Lu, M., Li, M.M., Vercauteren, S., Nagy, A., Eaves, C.J. (2008) Alkaline phosphatase-positive colony formation is a sensitive, specific, and quantitative indicator of undifferentiated human embryonic stem cells. *Stem Cells*, 26: 1109-1116. doi: 10.1634/stemcells.2007-0801.
- Okuda, A., Fukushima, A., Nishimoto, M., Orimo, A., Yamagishi,T., Nabeshima, Y., Kuro-o, M., Nabeshima, Y., Boon, K., Keaveney, M., Stunnenberg, H.G. e Muramatsu, M. (1998) UTF1, a novel transcriptional coactivator expressed in pluripotent embryonic stem cells and extra-embryonic cells. *The EMBO Journal*, 17: 2019-2032.
- Park, I.H., Arora, N., Huo, H., Maherali, N., Ahfeldt,T., Shimamura, A., Lensch, M.W., Cowan, C., Hochedlinger, K., Daley, G.Q. (2008). Disease-specific induced pluripotent stem cells. *Cell*, 134: 877-886. doi:10.1016/j.cell.2008.07.041.
- Rogers, M.B., Hosler, B.A. e Gudas, L.J. (1991) Specific expression of a retinoic acid-regulated, zinc-finger gene, Rex-1, in preimplantation embryos, trophoblast and spermatocytes. *Development*, 113: 815-824.
- Simonsson, S., e Bogesta, Y.R., (2008).Stem cell reprogramming: generation of patient-specific stem cells by somatic cell nuclear reprogramming. *Drug Discov Today: Technol*, 1 - 8. doi:10.1016/j.ddtec.2008.11.006.
- Singh L. D., Singh S. P., Handa R. K., Ehmann S. and Snyder A. K. (1996) Effects of ethanol on GLUT1 protein and gene expression in rat astrocytes. *Metab. Brain Dis.*, 11, 343–357.

- Song, H.J., Stevens, C.F., e Gage, F.H., (2002). Neuronal stem cells from adult hippocampus develop essential properties of functional CNS neurons. *Nature Neuroscience* , vol 5, nº 5 , 438-445.
- Spronsen, M. e Hoogenraad, C.C. (2010) Synapse Pathology in Psychiatric and Neurologic Disease, *Curr Neurol Neurosci Rep*, 10: 207–214.
- Takahashi, K. e Yamanaka, S. (2006) Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 126: 663-676. doi:10.1016/j.cell.2006.07.024.
- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K. e Yamanaka, S. (2007) Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*, 131: 861-872. doi:10.1016/j.cell.2007.11.019.
- Urnov, F.D.; Miller, J.C.; Lee, Y.; Beausejour, C.M.; Rock, J.M.; Augustus, S.; Jamieson, A.C; Porteus, M.H.; Gregory, P.D. e Holmes, M.C. (2005) Highly efficient endogenous human gene correction using designed zinc-finger nucleases, *Nature*, 435: 646-651. doi:10.1038/nature03556.
- Valero, A.; Post, J.N.; van Nieuwkastele, W.; ter Braak, M.; Kruijer, W. e van den Berg, A. (2008) Gene transfer and protein dynamics in stem cells using single cell electroporation in a microfluidic device, *Lab Chip*, 8, 62–67. doi: 10.1039/b713420g.
- Vassar, R. (2004) BACE1: The β -Secretase Enzyme in Alzheimer's Disease, *Journal of Molecular Neuroscience*, 23: 105-113.
- Wall, M.J., Robert, A., Howe, J.R., e Usowicz, M.M., (2002). The speeding of EPSC kinetics during maturation of a central synapse. *European Journal of Neuroscience*, 15, 785-797.
- Wang, Y., Mah, N., Prigione, A., Wolfrum, K., Andrade-Navarro, M.A. e Adjaye, J. (2010) A transcriptional roadmap to the induction of pluripotency in somatic cells. *Stem Cell Rev and Rep*. doi:10.1007/s12015-010-9137-2.
- Wernig, M., Tucker, K.L., Gornik, V., Schneiders, A., Buschwald, R., Wiestler, O.D., Barde, y.a., Brüstle, O., (2002). Tau EGFP embryonic stem cells: an efficient tool for neuronal lineage selection and transplantation. *J. Neurosci. Res.* 69, 918–924
- Wernig, M., Lengner, C.J., Hanna, J., Lodato, M.A., Steine, E., Foreman, R., Staerck, Y., Markoulaki, S. e Jaenisch, R. (2008) A drug-inducible transgenic system for direct reprogramming of multiple somatic cell types. *Nature Biotechnol.* 26, 916–924.
- Wilson, M.H., Coates, C.J., George Jr., A.L. (2007) PiggyBac transposon-mediated gene transfer in human cells. *The American Society of Gene Therapy*, 15: 139-145. doi:10.1038/sj.mt.6300028.
- Woltjen, K., Michael, I.P., Mohseni, P., Desai, R., Mileikovsky, M., Härmäläinen, R., Cowling, R., Wang, W., Liu, P., Gertsenstein, M., Kaji, K., Sung, H. e Nagy, A. (2009) piggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Nature*, 458: 766-770. doi: 10.1038/nature07863.
- Wright, D.A.; Townsend, J.A.; Winfrey Jr, R.J.; Irwin, P.A.; Rajagopal, J.; Lonosky, P.M.; Hall, B.D.; Jondle, M.D. e Voytas, D.F. (2005) High-frequency homologous recombination in plants mediated by zinc-finger nucleases, *The Plant Journal*, 44: 693–705. doi: 10.1111/j.1365-313X.2005.02551.x.
- Wu, H. et al. Integrative genomic and functional analyses reveal neuronal subtype differentiation bias in human embryonic stem cell lines. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 104, 13821–13826 (2007).
- Yin, H., Wang, H., Cao, H., Zhang, Y., Tao, Y., Zhang, X., (2009). Cell reprogramming for the creation of patient-specific pluripotent stem cells by defined factors. *Front. Agric. China*, 3(2), 199–208.
- Yu S. and Ding W. G. (1998). The 45 kDa form of glucose transporter 1 (GLUT1) is localized in oligodendrocyte and astrocyte but not in microglia in the rat brain. *Brain Res.* 797, 65–72.
- Zhao, Y., Yin, X., Qin, H., Zhu, F., Liu, H., Yang, W., Zhang, Q., Xiang, C., Hou, P., Song, Z., Liu, Y., Yong, J., Zhang, P., Cai, J., Liu, M., Li, H., Li, Y., Qu, X., Cui, K., Zhang, W., Xiang, T., Wu, Y., Zhao, Y., Liu, C., Yu, C., Yuan, K., Lou, J., Ding, M. e Deng, H. (2008) Two supporting factors greatly improve the efficiency of human iPSC generation. *Cell Stem Cell*, 3: 475-479. doi: 10.1016/j.stem.2008.10.002.
- Zhou, W. e Freed, C.R. (2009) Adenoviral gene delivery can reprogram human fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Stem Cells*, 27: 2667-2674. doi: 10.1002/stem.201.

ANEXOS

Tabela A1 – Eficiências de transfecção 24 h após electroporação de EGFP e EGFP-ERK-1 em células C2C12 e hMSCs (Fonte: Valero *et al.*, 2008).

Cell type	GFP experiments				GFP-ERK experiments			
	# Trapped cells	# Transfected cells (green cells)	TE (%)		# Trapped cells	# Transfected cells (green cells)	TE (%)	
			24 h	Avg			24 h	Avg
C2C12	7	7	100	75	7	7	100	70
	8	3	38		5	3	60	
	9	7	78		3	1	33	
hMSC	6	5	80	65	7	6	86	90
					4	4	100	
					5	5	100	
					8	8	100	
	6	3	50		8	6	75	
					6	4	67	
					5	5	100	
					8	8	100	
					4	3	75	

Tabela A2 - Factores adicionais que aumentam a eficiência ou substituem os factores de reprogramação.

Modelo Animal	Composto químico	Alvo/Função	Factores de reprogramação*	Eficiência **
Rato	5-azaC	Inibidor da DNA metiltransferase	OSKM	4x
	VPA	Inibidor histona desacetilase (HDAC)	OSKM	>100x
			OSK	50x
	TSA	Inibidor histona desacetilase	OSKM	~15x
	BIX01294 + RG108	RG108: inibidor da DNA metiltransferase	OK	~30x
	Vitamina C	Antioxidante	OSK	~3,8%
			OSKM	2-9%
Humano	VPA	Inibidor histona desacetilase (HDAC)	OSK	10-20x
			OS	Substitui Klf4 e c-Myc
	Tiazovinina SB431542 PD03259013	SB431542: inibidor de ALK5 PD03259013: inibidor de MEK	OSKM	>200x

* O – Oct4, S – Sox2, K – Klf4, M – c-Myc.

** Número de vezes ou percentagem que a eficiência aumenta com os respectivos compostos adicionados, relativamente ao primeiro trabalho de reprogramação celular que utilizou estes factores de reprogramação, Takahashi e Yamanaka, 2006. Adaptado de Wang *et al.*, 2010.

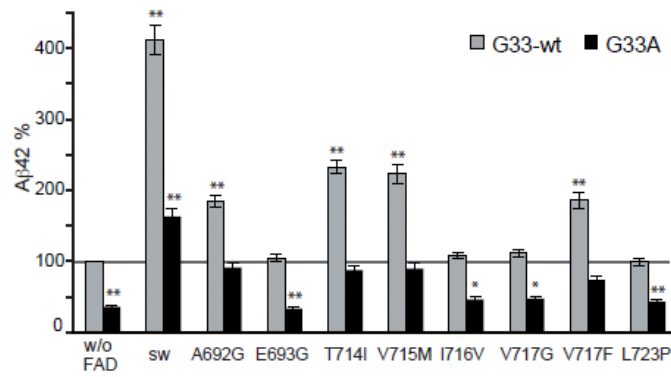


Figura A1 - Impacto da mutação de APP-GxxxG mutation na doença de Alzheimer familiar em APP. Níveis de A β 42, com APP-wt definido como 100% (média $\pm$ s.e.m., n= 5-17). G33-wt (barras cinzentas) mutado (G33, barras cinzentas) leva a uma redução de A β 42 (Fonte: Munter *et al.*, 2010).

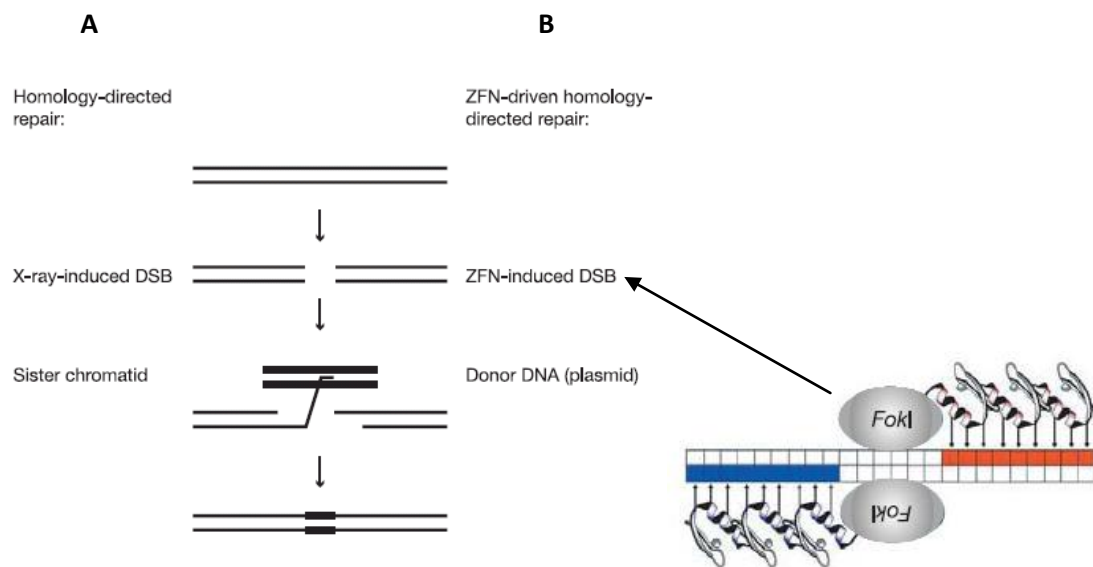


Fig. ? – Mecanismos de recombinação homóloga com o cromátídeo homólogo (A) e com recurso às ZFNs, provomendo a recombinação com plasmídeo dador (B) (Adaptado de Urnov *et al.*, 2005).

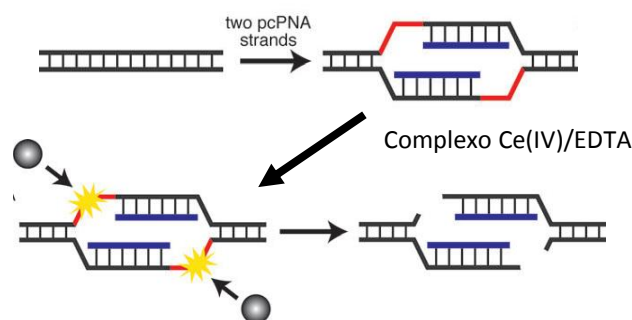


Fig. ?- Mecanismo de acção da ARCUT (Adaptado de Katada *et al.*, 2009). A ARCUT cliva o DNA de cadeia dupla num local específico. Adicionando-se duas cadeias de pcPNA (azul) à cadeia dupla de DNA (preto), são formadas porções de cadeia simples (vermelho) no complexo de invasão. Estas porções de cadeia simples são hidrolizadas pelo complexo Ce(IV)/EDTA (círculo cinzento).

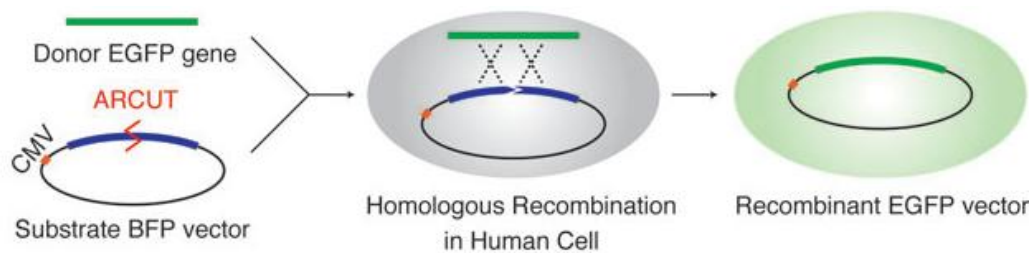


Fig. ? – Esquema de como se dá a acção da ARCUT dentro das células, com substituição do gene da EGFP pela BFP (Adaptado de Katada *et al.*, 2009).

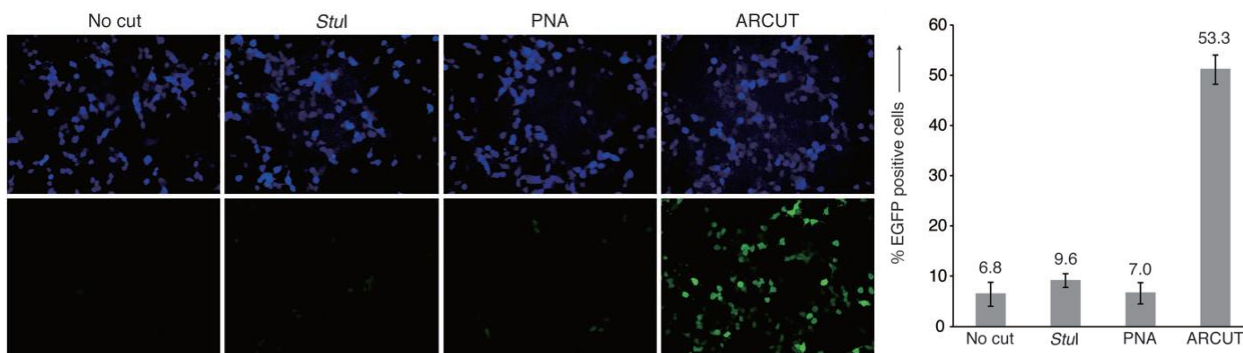


Fig. ? – Eficiência da ARCUT (Fonte: Katada *et al.*, 2009).