

## **Geração de células-tronco pluripotentes induzidas equinas (eiPSC) a partir de mecanismo episomal**

**Gabriela Barbosa<sup>1\*</sup>, Kaiana Recchia<sup>3</sup>, Ramon Cesar Botigelli<sup>2</sup>, Fabiana Fernandes Bressan<sup>1,3</sup>**

<sup>1</sup>Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo; <sup>2</sup>Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, <sup>3</sup>Faculdade Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo.

\*e-mail: gabriela2.barbosa@usp.br

### **Objetivos**

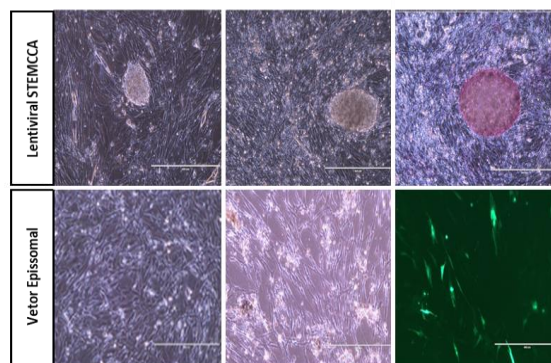
Em 2006, Takahashi et al. demonstraram ser possível a obtenção de células-tronco pluripotentes por indução gênica, através do mecanismo retroviral, inserindo 4 fatores exógenos (Oct4, Sox2, Klf4 e c-Myc – OSKM). Neste mecanismo, os transgenes permanecem integrados ao genoma, e sua expressão residual pode produzir mutações que interferem na função celular. Buscando aperfeiçoar a reprogramação, uma nova abordagem foi descrita, empregando o uso de vetores episomais, no qual são inseridos genes que permitem a sua replicação extracromossomal. Este trabalho tem como objetivo a reprogramação celular através do mecanismo não integrativo e avaliação da manutenção da pluripotência das eiPSC.

### **Métodos e Procedimentos**

A indução à pluripotência por vetores episomais foi realizada de acordo com o protocolo de Li, 2018. Células mesenquimais de tecido adiposo equino, cultivadas em meio IMDM suplementado, foram nucleoporadas com os vetores episomais C5 e Tg, sendo os fatores de reprogramação do plasmídeo C5: Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc e Lin-28; ou com os vetores pCXLE, sendo: pCXLE - hOCT3/4shp53, pCXLE - hSK e pCXLE - hUL. Como controle da nucleoporação foi utilizado o vetor pmaxGFP, e como controle da indução à pluripotência, as células foram transduzidas com um vetor lentiviral para expressão dos vetores exógenos OSKM. As células foram cultivadas durante 20 dias, as colônias geradas foram isoladas, cultivadas e caracterizadas quanto à detecção da fosfatase alcalina (FA).

### **Resultados**

Através da expressão dos fatores OSKM pelo lentivírus foi possível gerar colônias de iPSC equinas com morfologia típica, apresentando borda bem definida, alta razão núcleo/citoplasma e positivas para a FA. No protocolo episomal, a taxa de eficiência de entrada do plasmídeo na célula de 43,8% a partir de avaliação realizada na citometria de fluxo, porém, não houve a formação de colônias.



**Figura 1:** Formação de colônias de eiPSC na reprogramação lentiviral, com detecção da fosfatase alcalina dezesseis dias após a transdução. Grupo C5+Tg e pCXLE oito dias após a nucleoporação. As células mantiveram a morfologia fibroblastóide e não houve a formação de colônias.

### **Conclusões**

A reprogramação a partir dos vetores episomais requer novas estratégias para a reprogramação e manutenção da pluripotência. A transdução lentiviral, porém, mostrou-se efetiva para a geração de células iPS equinas.

## Generation of equine induced pluripotent stem cells (eiPSC) from episomal mechanism

**Gabriela Barbosa<sup>1\*</sup>, Kaiana Recchia<sup>3</sup>, Ramon Cesar Botigelli<sup>2</sup>, Fabiana Fernandes Bressan<sup>1,3</sup>**

<sup>1</sup>Faculty of Animal Science and Food Engineering, University of São Paulo;

<sup>2</sup>University of São Paulo State “Júlio de Mesquita Filho”, <sup>3</sup>Faculty Veterinary Medicine and Animal Science, University of São Paulo.

\*e-mail: gabriela2.barbosa@usp.br

### Objective

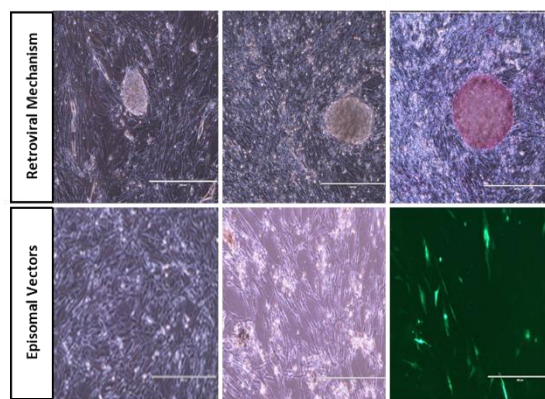
In 2006, Takahashi et al. demonstrated that it is possible to obtain pluripotent stem cells by gene induction through the retroviral mechanism by inserting 4 exogenous factors (Oct4, Sox2, Klf4 and c-Myc - OSKM), but in this mechanism the transgenes remain integrated into the genome, and its residual expression can produce mutations that interfere with cellular function. In order to improve reprogramming, a new approach was described, employing the use of episomal vectors, in which genes are inserted that allow their extrachromosomal replication. This work aims to reprogram cell through the non-integrative mechanism and evaluate the maintenance of eiPSC pluripotency.

### Materials and Methods

The induction to pluripotency by episomal vectors was carried out according to protocol Li, 2018. Equine fat tissue mesenchymal cells cultured in supplemented IMDM medium were nucleoporated with the C4 and Tg episomal vectors, with the reprogramming factors of plasmid C5: Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc and Lin-28; or with the pCXLE vectors: pCXLE -hOCT3/4, 4shp53, pCXLE - hSK and pCXLE - hUL. As control was used nucleoporation pmaxGFP vector, and how to control induction of pluripotent cells were transduced with a lentiviral vector for expression of exogenous OSKM vectors. The cells were cultured for 20 days, the generated colonies were isolated, cultured and characterized for detection of alkaline phosphatase (AF).

### Results

Through the expression of OSKM factors by lentivirus it was possible to generate equine iPSC colonies with typical morphology, presenting well defined edge, high nucleus/cytoplasm ratio and positive for AF. In the episomal protocol, the plasmid entry efficiency rate was 43,8% from the flow cytometry evaluation, however there was no formation of colonies.



**Figure 1:** Formation of eiPSC colonies in lentiviral reprogramming with detection of alkaline phosphatase sixteen days after transduction. Group C5 + Tg and pCXLE eight days after nucleoporation. The cells maintained the fibroblast morphology and there was no colony formation.

### Conclusions

Reprogramming from episomal vectors requires new strategies for reprogramming and maintenance of pluripotency. Lentiviral transduction, however, was effective for the generation of equine iPS cells.