

Geração e caracterização de células produtoras de insulina (IPC) a partir de células tronco pluripotentes induzidas (iPSC).

Lucas Pilenso Silveira

Dra. Marluce da Cunha Mantovani; Isaura Beatriz Borges Silva

Profa. Dra. Mari Cleide Sogayar

Instituto de Química - Universidade de São Paulo

lucaspilenso@usp.br

Objetivos

Gerar células humanas produtoras de insulina (IPC) a partir de células-tronco pluripotentes induzidas humanas (iPSC), previamente estabelecidas e caracterizadas pelo nosso grupo. Para isso, foi realizado o subcultivo, a manutenção e o controle de qualidade da cultura celular, reproduzindo o protocolo de geração de IPC disponível na literatura (Hogrebe *et al.*, 2021). A caracterização da diferenciação foi conduzida por citometria de fluxo e imunofluorescência, com ênfase na expressão dos fatores de transcrição NKX6-1 e PDX1, marcadores moleculares de identidade pancreática. Este projeto busca contribuir para a validação das etapas críticas do protocolo de geração de IPC a partir de iPSC, com ênfase na caracterização dos precursores endócrinos.

Métodos e Procedimentos

As células iPSC foram cultivadas em meio mTeSR1 sobre placa revestida com Matrigel e submetidas a um protocolo de diferenciação em seis etapas, interrompido ao final do estágio de progenitores pancreáticos II (PDX1+/NKX6-1+). As células foram dissociadas com a enzima Accutase, fixadas em PFA 4% e armazenadas em PBS. Após permeabilização (Triton X-100, 0,1%) e bloqueio (soro equino 5%), foram incu-

badas com anticorpos anti-PDX1 e anti-NKX6-1, seguidos de anticorpo secundário conjugado à GFP. As amostras foram analisadas através de citometria de fluxo (BD Accuri™ C6, 100.000 eventos, 488 nm), com exclusão de *debris* e *doublets*. Paralelamente, realizou-se imunofluorescência, utilizando-se os mesmos anticorpos e corante nuclear DAPI. As imagens foram obtidas sob microscópio de fluorescência (aumentos de 20X e 40X) com filtros para GFP e DAPI.

Resultados

O ensaio quantitativo de citometria de fluxo demonstrou expressão positiva de PDX1 em 99,3% dos eventos e de NKX6-1 em 44,4%, sem detecção na amostra controle (Figura 1A). Além disso, foi utilizado o parâmetro SSC (do inglês, *side scatter*) que relaciona a dispersão lateral da luz incidida com a complexidade interna das partículas analisadas. Observou-se que as células positivas para NKX6-1 apresentaram SSC médio 1,44 vezes superior à média geral, sugerindo aumento de complexidade morfológica, com análise realizada pelo software BD Accuri C6. Esses achados corroboram os resultados de imunofluorescência, nos quais a presença do fluoróforo GFP foi qualitativamente evidenciada nas células analisadas (Figura 1B).

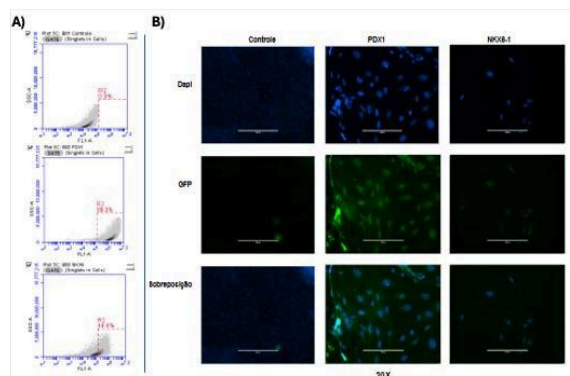


Figura 1: **A)** Dot plots mostrando a intensidade de fluorescência e a porcentagem de eventos positivos para GFP (anticorpo secundário), com controles PDX1 e NKX6.1 indicados pelas linhas tracejadas vermelhas. **B)** Imagens de imunofluorescência ao final do 4º estágio de diferenciação, com marcação nuclear (DAPI), ausência de anticorpo primário e detecção de PDX1 ou NKX6.1 com anticorpo secundário conjugado a GFP. Microscopia óptica, 20X (barra de escala = 200 μm).

Conclusões

Os resultados indicam que o protocolo foi eficaz na geração de progenitores pancreáticos, embora a eficiência para NKX6-1 possa ser otimizada. Como próximos passos, propõe-se investigar modificações epigenéticas (como m6A e m5C) e avaliar seu papel na diferenciação celular, além de completar os estágios finais para obtenção de IPC funcionais, incluindo ensaios de secreção de insulina estimulada por glicose (GSIS). Este trabalho visa contribuir para aumentar a compreensão sobre os mecanismos celulares envolvidos na diferenciação celular e, idealmente, aumentar a eficiência dos protocolos de reprogramação de iPSC já consolidados.

Os autores declaram não haver conflito de interesses. Autor LPS realizou o cultivo celular, os ensaios, coleta e análise dos dados. MCM participou da concepção e planejamento do estudo e ofereceu suporte para os ensaios, participou da redação e revisão final do resumo. IBBS participou da concepção e do planejamento do estudo e ofereceu suporte para os ensaios. MCS participou da concepção

e planejamento do estudo e da revisão final do resumo. Todos os autores aprovaram a versão final do resumo.

Agradecimentos

Gostaria de agradecer, sinceramente, a todo o Grupo NUCEL pela excelente supervisão e orientação, além da paciência e o carinho dispensados para a realização deste trabalho.

Referências

- DU, Y. et al. Human pluripotent stem-cell-derived islets ameliorate diabetes in non-human primates. *Nature Medicine*, v. 28, p. 272-282, 2022.
- HIGHFILL, S. L.; STRONCEK, D. F. Overcoming challenges in process development of cellular therapies. *Current Hematology and Malignant Reports*, v. 14, n. 4, p. 269-277, ago. 2019. DOI: 10.1007/s11899-019-00529-5.
- INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION (IDF). *Diabetes Atlas*. 8. ed. 2017. p. 14-24, 40-80.
- KOSSUGUE, Patricia Mayumi. Diferenciação de células-tronco embrionárias murinas (mESCs) em células produtoras de insulina (IPCs) e caracterização funcional do gene Purkinje cell protein 4 (Pcp4) neste processo. 2013. Tese (Doutorado em Bioquímica) - Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, v. 25, n. 4, p. 402-408, dez. 2001.
- LOJUDICE, F. H.; SOGAYAR, M. C. Células-tronco no tratamento e cura do diabetes mellitus. *Ciência & Saúde Coletiva*, v. 13, n. 1, p. 19-21, 2008.
- ODORICO, J. et al. Report of the Key Opinion Leaders Meeting on Stem Cell-derived Beta Cells. *Transplantation*, v. 102, n. 8, p. 1223-1229, ago. 2018. DOI: 10.1097/TP.0000000000002217.
- SILVA, Fernando Henrique Lojudice da. Identificação de genes diferencialmente expressos durante diferenciação de células-tronco e caracterização de células progenitoras mesenquimais. 2008. Tese (Doutorado em Bioquímica) - Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.
- MAHDAVI-AMIRI, Y.; CHUNG, K. C. K.; HILL, R. Single-nucleotide resolution of N⁶-adenine methylation sites in DNA and RNA by nitrite sequencing. *Chemical Science*, v. 12, p. 606-612, 2021.
- BOOTH, M. J. et al. Oxidative bisulfite sequencing of 5-methylcytosine and 5-hydroxymethylcytosine. *Nature Protocols*, v. 8, n. 10, p. 1841-1851, 2013.