

INSTITUTO CARLOS CHAGAS

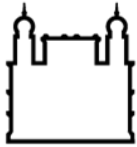
Mestrado em Biociências e Biotecnologia

**CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DO RECEPTOR DA
INTERLEUCINA 21 EM CÉLULAS-TRONCO DERIVADAS DE
TECIDO ADIPOSEO HUMANO**

BRUNA CRISTINA FALAVINHA

CURITIBA

2019



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO CARLOS CHAGAS
Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia

BRUNA CRISTINA FALAVINHA

Caracterização funcional do receptor da interleucina 21 em células-tronco derivadas de tecido adiposo humano

Dissertação apresentada ao Instituto Carlos Chagas
como parte dos requisitos para obtenção do título de
Mestre em Biociências e Biotecnologia

Orientadora: Prof. Dr. Patrícia Shigunov

CURITIBA/PR 2019



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO CARLOS CHAGAS

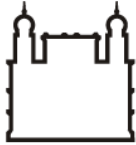
CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DO RECEPTOR DA INTERLEUCINA 21 EM CÉLULAS-TRONCO DERIVADAS DE TECIDO ADIPOSEO HUMANO

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Bruna Cristina Falavinha

As células-tronco são a base da terapia celular. O que se justifica pelo fato de possuírem grande capacidade de auto renovação por divisão celular e por serem capazes de dar origem a células de diferentes tipos de tecidos. A diferenciação das células-tronco em adipócitos ocorre através de condições fisiológicas específicas que interagem com várias vias de sinalização e influenciam a célula-tronco a especializar-se. Em um trabalho anterior do grupo, a expressão gênica do receptor da interleucina 21 diminuiu após a indução da diferenciação adipogênica. Esse receptor tem sido relacionado às doenças metabólicas, mas não foram encontrados estudos sobre sua função em células-tronco. Dessa maneira, surge a necessidade de caracterizar funcionalmente este receptor em células-tronco derivadas de tecido adiposo (ASCs). Por conseguinte, o objetivo do presente trabalho foi avaliar os efeitos do silenciamento e da superexpressão do gene IL-21R na proliferação celular, diferenciação adipogênica e atividade mitocondrial. Avaliando a localização de IL-21R em ASCs por imunofluorescência, foi observada a presença da proteína nas mitocôndrias das células. Os resultados de imunofluorescência também confirmaram uma diminuição estatisticamente significativa nos níveis da proteína IL-21R após o silenciamento, causando uma supressão da adipogênese sem alterações nas atividades proliferativas e mitocondriais. Os ensaios de superexpressão dos genes IL-21 e IL-21R foram inconclusivos uma vez que a superexpressão das proteínas não foi demonstrada.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO CARLOS CHAGAS

CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DO RECEPTOR DA INTERLEUCINA 21 EM CÉLULAS-TRONCO DERIVADAS DE TECIDO ADIPOSE HUMANO

ABSTRACT

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Bruna Cristina Falavinha

Stem cells are the core of cell therapy. This is justified by the fact that they have a great capacity for self-renewal by cell division and for being able to give rise to cells of different tissue types. Differentiation of stem cells into adipocytes occurs through specific physiological conditions that interact with various signaling pathways and influence the stem cell to specialize. In a previous study of the group, the gene expression of the interleukin 21 receptor decreased after the induction of adipogenic differentiation. This receptor has been linked to metabolic diseases and there are few studies on its function in stem cells. Thus, this arises the need to characterize this receptor functionally in stem cells derived from adipose tissue (ASCs). Therefore, the aim of the present study was to evaluate the effects of IL-21R silencing and overexpression on cell proliferation, adipogenic differentiation and mitochondrial activity. Assessing the location of IL-21R in ASCs by immunofluorescence, the presence of the protein in the mitochondria of the cells was observed. Immunofluorescence results also confirmed a statistically significant decrease in IL-21R protein levels after silencing, causing a suppression of adipogenesis without changes in proliferative and mitochondrial activities. The overexpression assays of the IL-21 and IL-21R genes were inconclusive since overexpression of the proteins was not demonstrated.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.1	Esquema representativo do processo de regeneração corporal em planárias	1
Figura 1.2	Formação dos três folhetos embrionários	3
Figura 1.3	Via de sinalização IL-21/IL-21R	8
Figura 3.1	Mapa do vetor pcDNA3.1+/C-(K)DYK	16
Figura 4.1	Imunofluorescência marcação mitocondrial	28
Figura 4.2	Imunofluorescência de α -IL-21R e α -ATP5B em ASCs	29
Figura 4.3	Quantificação relativa de RNAm de IL-21R	30
Figura 4.4	Imunofluorescência de α -IL-21R após silenciamento	30
Figura 4.5	Quantificação da intensidade de fluorescência	31
Figura 4.6	Ensaio de Rodamina 123 após silenciamento	31
Figura 4.7	Relação entre silenciamento e potencial de membrana mitocondrial	32
Figura 4.8	Ensaio de proliferação após silenciamento	32
Figura 4.9	Diferenciação adipogênica das células silenciadas	33
Figura 4.10	Quantificação da diferenciação adipogênica	33
Figura 4.11	Quantificação relativa de RNAm de IL21R após superexpressão	34
Figura 4.12	Técnica de Western Blot utilizando o anticorpo α -IL-21R	34
Figura 4.13	Ensaio de Rodamina 123 e EdU após superexpressão de IL-21R	35
Figura 4.14	Quantificação relativa de RNAm de IL21 após superexpressão	36
Figura 4.15	Ensaio de Rodamina 123 e EdU após superexpressão de IL-21	36
Figura 4.16	Quantificação relativa de RNAm de IL-21 e IL-21R após superexpressão	37
Figura 4.17	Ensaio de Rodamina 123 após superexpressão de IL-21 e IL-21R	37
Figura 4.18	Ensaio de proliferação celular após superexpressão de IL-21 e IL-21R	38
Figura 5.1	Marcação de IL-21R em 3 linhagens celulares	39

LISTA DE SIGLAS

ASCs	Células-tronco derivadas de tecido adiposo
IL-21	Interleucina 21
IL-21R	Receptor da Interleucina 21
cDNA	DNA complementar
MSCs	Células-tronco mesenquimais
ISCT	Sociedade Internacional de Terapia Celular
JAK	Janus kinase
STAT	<i>Signal transducer and activator of transcription</i>

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	1
1.1.	Células-tronco.....	2
1.2.	Células-tronco adultas.....	4
1.3.	Células-tronco derivadas de tecido adiposo.....	5
1.4.	O tecido adiposo e processo adipogênico.....	6
1.5.	A via de sinalização JAK-STAT.....	8
1.6.	O receptor da interleucina 21.....	9
2.	OBJETIVOS.....	11
2.1.	Objetivo principal.....	11
2.2.	Objetivos específicos.....	11
3.	MATERIAL E MÉTODOS	12
3.1.	Aspectos éticos	12
3.2.	Local de coleta do material para isolamento das ASCs.....	12
3.3.	Isolamento e cultura de células-tronco de tecido adiposo.....	12
3.4.	Silenciamento de IL-21R.....	13
3.4.1.	Padronização da transfecção e silenciamento.....	14
3.5.	Superexpressão de IL-21 e IL-21R.....	15
3.5.1.	Construção do vetor controle.....	16
3.5.2.	Transformação de bactérias DH5 α	18
3.5.3.	Purificação de DNA.....	18
3.6.	Extração de RNA total.....	18
3.7.	Síntese de DNA complementar (cDNA).....	19
3.8.	Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	19
3.9.	Eletroforese de DNA.....	20
3.10.	Reação em cadeia da polimerase em tempo real (qRT-PCR).....	21
3.11.	Extrato protéico de células.....	22
3.12.	Eletroforese de proteína em gel de acrilamida desnaturante (SDS-PAGE).....	23
3.13.	Ensaio de Western Blot.....	23
3.14.	Adipogênese <i>in vitro</i> e quantificação.....	24
3.15.	Ensaio de proliferação celular Click- iT EdU.....	24
3.16.	Ensaio de atividade mitocondrial (Rhodamine 123).....	25
3.17.	Imunofluorescência.....	25
3.18.	Marcação intracelular de proteínas para análise por citometria de fluxo.....	27
4.	RESULTADOS.....	28
4.1.	Localização de IL-21R em ASCs.....	28
4.2.	Silenciamento de IL-21R em ASCs.....	29
4.3.	Superexpressão de IL-21R em ASCs.....	34
4.4.	Superexpressão de IL-21 em ASCs.....	35
4.5.	Superexpressão de IL-21 e IL-21R em ASCs.....	37
5.	DISCUSSÃO.....	39
5.1.	Localização de IL-21R em ASCs.....	39
5.2.	Silenciamento de IL-21R em ASCs.....	40
5.3.	Superexpressão de IL-21 e IL-21R em ASCs.....	42
6.	CONCLUSÕES.....	43
7.	REFERÊNCIAS.....	44
8.	ANEXOS	

1. INTRODUÇÃO

As primeiras citações históricas sobre regeneração corporal aparecem na mitologia grega. No mito popularmente conhecido de Hércules, aparece a figura de um monstro com cabeças de serpentes chamado de Hidra. A capacidade regenerativa da Hidra foi notada quando Hércules, na tentativa de derrotar o monstro, cortou suas cabeças e foi surpreendido pelo crescimento de outras (Vacanti, 2007).

Na natureza, a capacidade de regeneração corporal é evidente. As planárias, por exemplo, possuem a capacidade de regenerar seus corpos inteiros a partir de pequenos fragmentos e as salamandras são capazes de reconstruir totalmente seus membros (Figura 1.1) (Tanaka, 2003; Tanaka e Reddien, 2011).

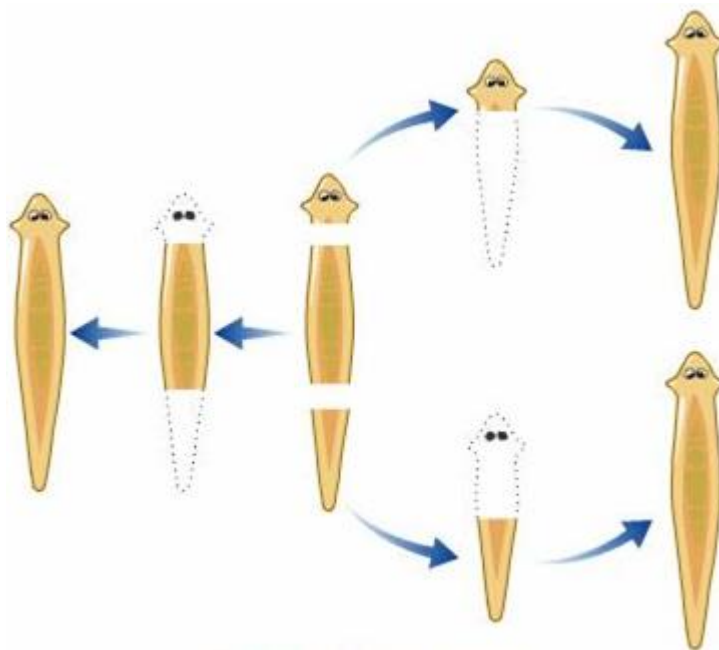


Figura 1.1 Esquema representativo do processo de regeneração em planárias. Adaptado de Science ABC.

Na busca pela capacidade humana de regeneração, surge a medicina regenerativa, que procura estimular a capacidade de regeneração do próprio corpo a fim de reparar tecidos danificados e restaurar suas funções naturais. A medicina regenerativa une técnicas e

especialidades, como engenharia tecidual, terapia celular e biologia molecular para reparar, substituir, sintetizar ou regenerar células, tecidos e órgãos (Frese *et al.*, 2016; Arrighi, 2018)

1.1 Células-tronco

As células-tronco são a base da terapia celular. O que se justifica pelo fato de possuírem grande capacidade de auto renovação por divisão celular e por serem capazes de dar origem a células de diferentes tipos de tecidos. Essas características podem ser observadas tanto durante o desenvolvimento embrionário quanto ao longo de toda a vida adulta. O processo de diferenciação é induzido por condições fisiológicas específicas que influenciam a célula-tronco a especializar-se com a finalidade de realizar funções características e integrar tecidos especializados (Wagers e Weissman, 2004).

As primeiras células-tronco são originadas já nos primeiros estágios embrionários dos seres vivos, que iniciam logo após a fecundação do óvulo pelo espermatozóide. Esses processos são guiados por princípios semelhantes em seres vivos de menor complexidade, como uma mosca da fruta, à seres vivos altamente complexos, como os seres humanos (Wells e Melton, 1999). Um dos eventos mais importantes no início do desenvolvimento é a formação dos três folhetos embrionários (Figura 1.2): a ectoderma (que origina o sistema nervoso e a pele), a mesoderma (que origina sangue, ossos, músculos, cartilagem e gordura) e a endoderma (que dá origem aos aparelhos digestivo e respiratório).

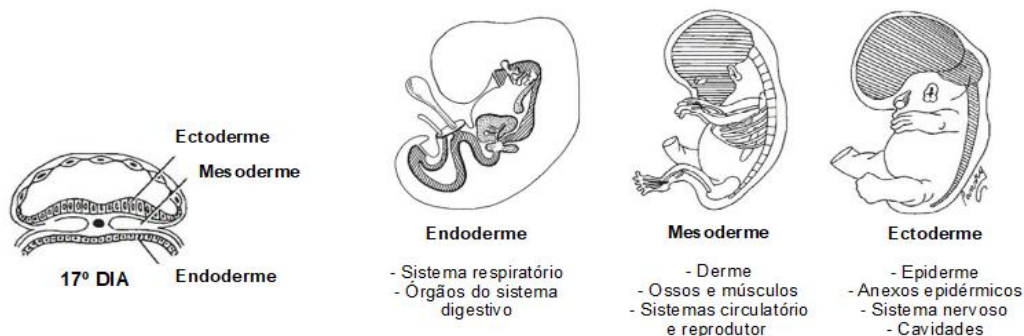


Figura 1.2. Formação dos três folhetos embrionários. Adaptado de Revisão de Embriologia Médica, Ben Pansky.

O comprometimento celular para a formação de cada um desses grupos é gerado pela ativação e inibição de inúmeros genes com redes de regulação altamente complexas nos quais diversos processos e elementos ainda permanecem desconhecidos (Wells e Melton, 1999; Wagers e Weissman, 2004).

De acordo com sua origem, podemos dividir as células-tronco em embrionárias ou adultas. As células-tronco embrionárias foram extraídas pela primeira vez há mais de 30 anos a partir de embriões em fase de blastocisto, etapa que precede a formação dos três folhetos germinativos (Evans e Kaufman, 1981; Martin, 1981). Por serem extraídas nesse período, essas células possuem a capacidade de gerar qualquer tecido com exceção aos anexos embrionários (Evans e Kaufman, 1981; Martin, 1981; Thomson *et al.*, 1998).

Ainda que elas possuam um grande potencial terapêutico, diversas questões éticas e políticas dificultam o seu uso na medicina regenerativa pelo fato de envolver a utilização de embriões. Por esse motivo, o uso de células-tronco adultas tem sido visto como uma melhor alternativa (Sterodimas *et al.*, 2010). Além disso, há outros fatores que corroboram a perspectiva de que células-tronco adultas seriam mais viáveis para a utilização na medicina regenerativa, segundo Gimble (2003) os critérios para uma célula ideal são:

- Estar disponível em grande quantidade (de milhões a bilhões de células);
- Poder ser extraída por um método minimamente invasivo;
- Poder diferenciar-se em várias linhagens de maneira regulada;
- Poder ser transplantada de modo autólogo ou alógeno com eficácia e segurança;
- Possuir potencial para ser produzida de acordo com o Manual de Boas Práticas de Fabricação (cGMP).

Levando em consideração tais critérios, as células-tronco adultas oferecem maiores vantagens quando comparadas às células-tronco embrionárias.

1.2 Células-tronco adultas

Após o processo de diferenciação nos três folhetos embrionários, as células-tronco adquirem uma capacidade mais limitada de diferenciação, e dessa forma, passam a serem chamadas de células-tronco adultas e multipotentes. Dentre as células-tronco adultas e multipotentes, estão as células-tronco mesenquimais (MSCs) ou “Células Mediciniais Sinalizadoras”, como sugerido mais recentemente (Caplan, 2017; De Windt *et al.*, 2017). Essas células estão presentes não somente em tecidos fetais, mas em muitos tecidos adultos com poucas exceções. Já foram extraídas de líquido amniótico, medula óssea, sangue periférico, polpa dentária e tecido adiposo, entre outros (Halder, 2018; Luo *et al.*, 2018; Shigunov *et al.*, 2018).

As MSCs são células auto-renováveis, com capacidade de diferenciação em múltiplas linhagens mesenquimais, de fácil acesso e expansão *in vitro*, ótima estabilidade genômica e poucos embates éticos. A diferenciação dessas células *in vitro* pode ser facilmente induzida pela adição de fatores específicos ao meio. Essas células também possuem secretoma regenerativo e funções imunomodulatórias, sendo responsáveis pela reposição celular e regeneração tecidual que mantém a homeostase dos organismos após o desenvolvimento embrionário. Por esses motivos, as MSCs são células extremamente promissoras para inúmeras aplicações na medicina regenerativa e engenharia tecidual (Wagers e Weissman, 2004; Ullah *et al.*, 2015; Fitzsimmons *et al.*, 2018).

Devido a uma necessidade de padronizar a definição de “célula-tronco mesenquimal”, a Sociedade Internacional de Terapia Celular (ISCT) criou três critérios básicos que devem ser demonstrados para uma célula ser considerada como célula-tronco mesenquimal. O primeiro critério estabelece que as células devem ser aderentes ao plástico quando mantidas nas condições padronizadas de cultura. O segundo critério estabelece que as células devem

expressar mais de 95% os marcadores para antígenos de superfície CD105, CD73 e CD90 e possuir menos de 2% de expressão de CD45, CD34, CD14 ou CD11b, CD79a ou CD19 e HLA de classe II, quando analisados por citometria de fluxo. O terceiro e último critério estabelece que as células devem se diferenciar em no mínimo três linhagens celulares *in vitro*: osteoblastos, adipócitos e condroblastos (Dominici *et al.*, 2006).

1.3 Células-tronco derivadas de tecido adiposo

As células-tronco derivadas de tecido adiposo (ASCs) são consideradas ideais para aplicação em terapias regenerativas por diversas razões, entre elas, a facilidade e eficiência nos processos de extração, manuseio e expansão (Frese *et al.*, 2016).

Em 1964, Rodbell foi o primeiro a descrever o isolamento de células progenitoras do tecido adiposo, tendo sido realizada em roedores (Rodbell, 1964). A descoberta do método de lipossucção em 1983 facilitou o processo de extração dessas células (Illouz, 1983). Atualmente, de acordo com a Sociedade Internacional de Cirurgia Plástica Estética (ISAPS), apenas em 2017 foram realizadas 12.623.694 cirurgias plásticas no mundo, sendo que 1.573.680 foram cirurgias de lipossucção, assumindo o segundo lugar no ranking global de cirurgias plásticas (Heidekrueger *et al.*, 2017). Ainda que outras fontes de células-tronco adultas, como medula óssea e cordão umbilical sejam promissoras, elas culminam em baixo rendimento celular e quantidade limitada de tecido. Dessa forma, o tecido adiposo representa uma importante fonte alternativa de células-tronco (Bajek *et al.*, 2016).

Devido à rápida expansão de estudos com células isoladas de tecido adiposo, os pesquisadores passaram a chamá-las por diferentes nomenclaturas, o que gerou desordem na literatura científica. Por essa razão, a Sociedade de Tecnologia Aplicada adotou o termo “células-tronco derivadas de tecido adiposo” (ASCs) para se referir às células multipotentes aderentes ao plástico isoladas desse tecido (Gimble, 2003).

Nos últimos anos, progressos importantes demonstraram efeitos terapêuticos mediados pelas ASCs. Foi possível observar que talvez essas células não funcionam somente como progenitoras do tecido adiposo, mas também estejam relacionadas a mecanismos envolvidos em processos inflamatórios, angiogênicos e de sobrevivência celular, entre outros (Frese *et al.*, 2016).

1.4 O tecido adiposo e o processo adipogênico

O tecido adiposo é um tecido conjuntivo frouxo que em conjunto com vários outros órgãos, forma o complexo sistema metabólico animal. A função primária desse sistema é gerenciar a estocagem de energia em períodos de abundância de alimentos e mobilizar esses estoques em fases em que há escassez alimentar. Dessa forma, quando a comida é abundante, carboidratos são estocados como pequenas reservas de glicogênio no fígado e grandes reservas de gordura, majoritariamente em forma de adipócitos. Assim, o tecido adiposo é o único tecido capaz de hidrolisar triglicerídeos e mobilizar ácidos graxos e glicerol na corrente sanguínea para que sejam utilizados pelos outros tecidos, como coração e músculos (Tang *et al.*, 2008; Lefterova e Lazar, 2009; Ali *et al.*, 2013; Xu *et al.*, 2013; Bajek *et al.*, 2016).

Por muito tempo, esse tecido foi visto apenas como um estoque passivo de energia. No entanto, a partir da confirmação de seu envolvimento endócrino, este tecido passou a ser visto como um órgão essencial para o metabolismo, sendo responsável pela mediação de vários processos fisiológicos e patológicos pela secreção de fatores que controlam o metabolismo glicolítico, respostas imunológicas e inflamatórias, apetite, angiogênese, regulação da pressão sanguínea e até mesmo a função reprodutiva. Além disso, o tecido adiposo também possui função estrutural, formando uma camada isolante sob a pele que ajuda a regular a temperatura corporal, protege e amortece o corpo (Tang *et al.*, 2008; Lefterova e Lazar, 2009; Ali *et al.*, 2013; Bajek *et al.*, 2016).

Nas sociedades mais desenvolvidas, o estilo de vida das pessoas tem proporcionado um consumo excessivo de alimentos calóricos associados a um comportamento sedentário. Como consequência, a obesidade e doenças por ela causadas, principalmente a resistência à insulina, diabetes tipo 2 e doenças cardíacas, têm se tornado sérios problemas de saúde pública. Isso se deve ao fato de o consumo calórico ser excedente ao gasto energético, produzindo um estado metabólico que promove a hiperplasia e hipertrofia de adipócitos. A hiperplasia está relacionada ao aumento de células-tronco recrutadas e diferenciadas, resultando em um aumento do número de adipócitos (Tang *et al.*, 2008).

Os adipócitos são as células maduras que compõem a maior parte do tecido adiposo. Elas podem ser caracterizadas por conter grandes inclusões lipídicas em seu interior, causando a compactação do citoplasma e o deslocamento do núcleo celular para a extremidade da célula. Os adipócitos são formados por um processo extremamente complexo e altamente regulado denominado adipogênese. Esse processo tem sido extensivamente estudado pela utilização de modelos pré-adipócitos *in vitro* para melhor compreender características dos adipócitos e do tecido adiposo saudável ou enfermo (Lefterova e Lazar, 2009; Ali *et al.*, 2013).

1.5 A via de sinalização JAK-STAT

Diversos agentes e vias de sinalização envolvidos na regulação da lipólise e adipogênese no tecido adiposo têm sido estabelecidos. Uma das vias de sinalização que quando moduladas, são capazes de regular o metabolismo lipídico em adipócitos, é a via JAK-STAT, que pode ser ativada através de receptores de citocinas e hormônios (Xu *et al.*, 2013). As proteínas transmembranas denominadas como receptores de interleucinas são responsáveis por receber moléculas sinalizadoras de interleucina e transduzir o sinal para o interior das células através das proteínas JAK e STATs influenciando diferentes processos (Figura 3). As proteínas STATs ativadas regulam o metabolismo lipídico de forma direta pela influência na expressão de

enzimas como a oxidase alternativa (AOX) e ácido graxo sintase (FAS). Elas também estão relacionadas a processos inflamatórios e anti-inflamatórios e a desregulação das vias JAK-STAT pode levar a várias desordens metabólicas (Figura 1.3). Dessa forma, medicamentos que interajam com essa via podem ser interessantes para o desenvolvimento de novos tratamentos para síndromes metabólicas (Xu *et al.*, 2013).

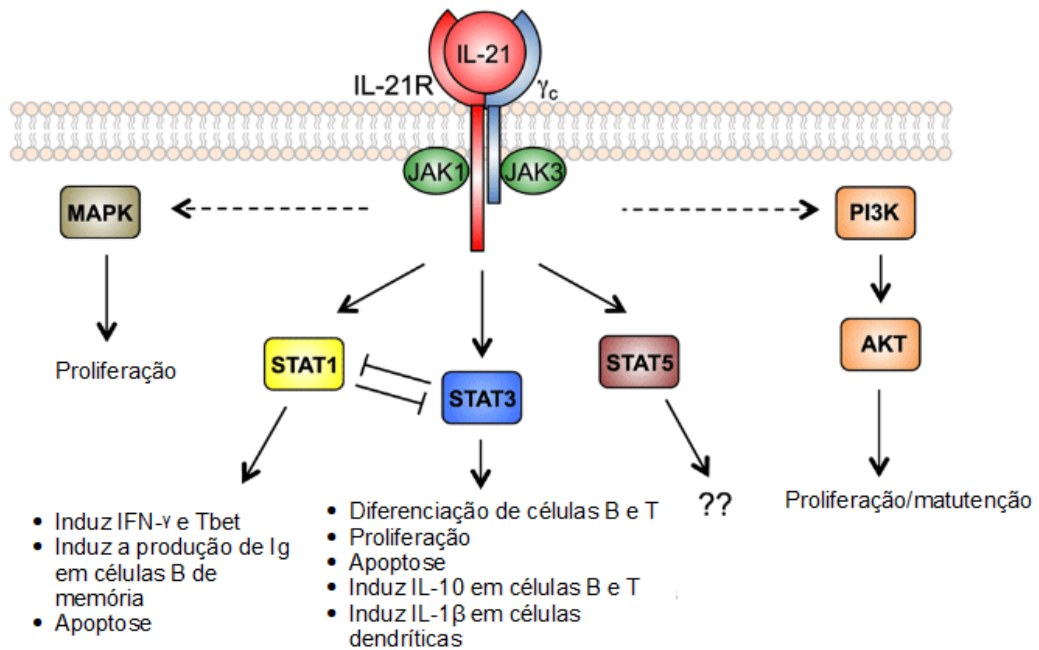


Figura 1.3. Via de sinalização JAK-STAT demonstrando a interleucina 21 interagindo com seu receptor (IL-21R) e transduzindo o sinal para o interior das células por meio das proteínas JAK1, JAK3 e as diferentes STATs (Adaptado de Warren J. Leonard 2016).

1.6 O Receptor da interleucina 21

O receptor da interleucina 21 é uma glicoproteína transmembrana com massa molecular de aproximadamente 75 kDa que faz parte do grupo de receptores de interleucina do tipo I. A proteína contém um domínio conservado WSXWS (Trp-Ser-X-Trp-Ser), dois domínios de fibronectina do tipo III e um sítio de ligação de STAT3 na porção C-terminal. A sua associação com uma cadeia gama comum (CD132), forma um complexo receptor heterodimérico. A resolução da estrutura cristalográfica da ligação de IL-21R com IL-21 demonstra que o motivo WSXWS é C-manosilado no primeiro triptofano. Além disso, a resolução demonstrou que

existe uma cadeia de açúcar que faz uma ponte entre os dois domínios de fibronectina da porção extracelular de IL-21R, ancorando no motivo WSXWS por pontes de hidrogênio (Figura 4) (Parrish-Novak *et al.*, 2000; Asao *et al.*, 2001; Hamming *et al.*, 2012).

O receptor da IL-21 é normalmente expresso em células do sistema imune, como células B, T, *Natural Killers*, macrófagos e células dendríticas. Essa proteína também foi encontrada em diversas linhagens celulares tumorais, em células do epitélio intestinal em doenças inflamatórias, em células do epitélio gástrico em infecção por *Helicobacter pylori* e reumatoide sinovial (Jüngel *et al.*, 2004; Caruso, Fina, Peluso, Fantini, *et al.*, 2007; Caruso, Fina, Peluso, Stolfi, *et al.*, 2007).

Em experimentos realizados com camundongos que apresentavam deficiência de IL-21R, foram observadas falhas em produção de anticorpos e redução nas respostas de linfócitos T citotóxicos (Ozaki *et al.*, 2002).

A expressão do mRNA de IL-21R em células-tronco de tecido adiposo já foi detectada em diferentes trabalhos. Segundo um estudo cujo objetivo era identificar os mRNAs associados aos polissomos das células-tronco de tecido adiposo em resposta a ativação e bloqueio da via Hedgehog, foi identificado que a quantidade do mRNA do receptor da interleucina 21 (IL-21R) diminuiu na fração polissomal com a ativação da via Hedgehog e aumentou com o bloqueio da mesma (Shigunov *et al.*, 2018). Outro trabalho identificou que a quantidade do mRNA de IL-21R também diminuiu com a diferenciação celular para adipócitos (Spangenberg *et al.*, 2013). Baseado nessas evidências, questionamos: qual o papel do receptor de IL-21 nas células-tronco derivadas de tecido adiposo? Esse receptor tem alguma influência na adipogênese uma vez que participa da via de sinalização JAK-STAT?

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo principal

Caracterizar a função do receptor da interleucina 21 em células-tronco de tecido adiposo através de silenciamento gênico e superexpressão, seguidos de estudos de diferenciação celular, proliferação e atividade mitocondrial.

2.2 Objetivos específicos

1. Padronização do silenciamento gênico de *IL-21R* em ASCs;
2. Avaliação do silenciamento de *IL-21R* durante diferenciação celular, proliferação e atividade mitocondrial;
3. Padronização da superexpressão de *IL-21R* e *IL-21* em ASCs;
4. Avaliação da superexpressão de *IL-21R* e *IL-21* durante diferenciação celular, proliferação e atividade mitocondrial.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Aspectos Éticos

O presente trabalho é parte integrante do projeto “Caracterização celular e molecular do potencial de diferenciação de células-tronco” submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da FIOCRUZ e aprovado em 29 de outubro de 2018 sob o número CAAE: 48374715.8.0000.5248 (ANEXO 1).

3.2 Local de coleta do material para isolamento das ASCs

O atual projeto foi realizado no Instituto Carlos Chagas (FIOCRUZ - PR) em colaboração com a Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR). A coleta e o isolamento das ASCs foram executados pelo Núcleo de Tecnologia Celular (PUCPR). O tecido adiposo foi obtido de pacientes submetidos à cirurgia de lipoaspiração e a coleta foi realizada após o esclarecimento dos objetivos do projeto de pesquisa aos doadores e assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido.

3.3 Isolamento e cultura de células-tronco de tecido adiposo

As células-tronco foram isoladas do tecido adiposo adquirido de doadores que passaram por cirurgia de lipoaspiração (Rebelatto *et al.*, 2008).

Após a retirada do tecido adiposo, os fragmentos foram removidos com auxílio de pinça e bisturi, lavados com PBS para remover o excesso de hemácias, macerados e digeridos com 1 mg/mL de colagenase tipo I (Invitrogen™, NY, USA) numa proporção de 1 parte de tecido adiposo para 4 partes de colagenase por 30 minutos a 37°C sob agitação constante. A eliminação de fragmentos não digeridos foi realizada através de um processo de dupla filtragem com filtro de 100 µm de membrana de nylon (BD FALCON™, BD Biosciences Discovery Labware, Bedford, USA). Em seguida, a suspensão de células foi centrifugada a 800 x g por

10 minutos e o sobrenadante foi descartado. O tampão hemolítico (NH₄Cl 155 mmol/L, Tris 20 mmol/L pH 7,3) foi adicionado ao precipitado por 10 minutos para lise das hemácias e centrifugado novamente à 800 x g por 10 minutos. O sedimentado foi suspenso em PBS e filtrado (filtro com poro de 40 µm). As células foram centrifugadas novamente e ressuspendidas em meio DMEM/F12 suplementado com 10% SBF, 100 µg/mL de estreptomicina e 100 U/mL de penicilina. A contagem de células foi realizada com o auxílio de uma câmara de Neubauer. As ASCs foram então plaqueadas em uma concentração de 1,4x10⁵ células / cm² em frascos próprios para cultura de 75 cm². Os frascos foram incubados em estufa umidificada a 37°C com 5% de tensão de CO₂. O meio de cultura foi trocado duas vezes por semana até atingir a confluência celular. Uma vez confluentes, as células aderentes foram dissociadas utilizando tripsina - EDTA 0,25 % e novamente plaqueadas em concentração de 1,3 x 10⁴ células por cm² (primeira passagem).

3.4 Silenciamento de IL-21R

Como um mecanismo de defesa, células hospedeiras reconhecem RNA de dupla fita e sinalizam a destruição de seu RNA homólogo (Hannon 2002). Em células mamíferas, RNAs de Interferência (RNAi) podem ser acionados por RNAs curtos de interferência (siRNAs) que causam forte inibição dos genes específicos de forma temporária. Dessa forma, a transfecção de siRNAs em células de mamíferos pode ocasionar a supressão transiente da expressão gênica (Brummelkamp *et al.*, 2002; Paddison, Caudy, Bernstein, *et al.*, 2002; Paddison, Caudy e Hannon, 2002; Paddison e Hannon, 2002).

O silenciamento de *IL-21R* foi realizado por siRNA (*Short Interference RNA* - RNA curto de interferência). O kit de siRNA (Origene) contém 3 diferentes sequências de siRNA sintético para *IL-21R* (representadas como A, B e C) e uma sequência de siRNA universal embaralhada como controle negativo (Scramble). Como recomendado pelo fabricante, as

amostras foram eluídas em “Duplex Buffer” (Origene) para concentração final de 20 μ M, homogeneizadas em vórtex e aquecidas por 2 minutos a 94°C. As amostras foram então aliquotadas e armazenadas a -80°C.

3.4.1 Padronização da transfecção e silenciamento

Para otimizar o processo de silenciamento e estabelecer o método de transfecção mais eficiente para o tipo celular, foi realizada a padronização da técnica.

Diferentes concentrações de siRNA (0,1 nM, 1 nM e 10 nM), diferentes tempos de incubação (24h e 48h) e diferentes combinações de sequências (A, B, C, AB, AC, BC) foram testadas.

Diferentes agentes transfectantes (Nucleofector e Lipofectamina 3000) foram testados. Segue abaixo a descrição do protocolo de cada agente:

- Nucleofector: foram alocadas 2×10^5 células por garrafa de 75 cm² até atingirem no máximo 85% de confluência. Quando confluentes, as células foram lavadas em BSS, dissociadas utilizando tripsina - EDTA 0,25 %, centrifugadas a 2000 x g por 5 minutos. As células foram então contadas com o auxílio de uma câmara de Neubauer e ressuspendidas em 4×10^5 células para cada 100 μ L de solução. Foram testadas duas diferentes soluções: OptiMEM (Gibco) e Nucleofection Solution (Human Stem Cell Nucleofection Kit - Lonza). Em sequência, as amostras foram alocadas em cubetas para transfecção (Lonza) e foram adicionadas diferentes concentrações de siRNA. Foram testados um programa de alta eficiência (U23) e alta viabilidade (C17). Após a transfecção, as células foram transferidas para placas de 6 poços em meio de cultivo DMEM com 10% de SBF, 100 μ g/mL de estreptomicina e 100 U/mL de penicilina.

- Lipofectamina® 3000: Foram plaqueadas 2×10^5 células por poço em placas de 6 poços para que atingissem 90% de confluência em 24h. Foram testadas duas concentrações de Lipofectamina (3,5 μ L e 7,5 μ L para diluição final em 2 mL de meio por poço) conforme orientações do fabricante. As células foram lavadas em PBS à 37°C e foram adicionados 1 mL de meio em cada poço. Em dois tubos de 1,5 mL devidamente identificados, foram adicionados 150 μ L de Opti-MEM™ (Gibco). Em um deles foi adicionado a Lipofectamina 3000 e no outro foram diluídos os fragmentos de siRNA sintéticos. O conteúdo dos dois tubos foi misturado e incubado por 5 minutos em temperatura ambiente. Imediatamente após a incubação, a solução foi diluída no meio anteriormente adicionado às placas. As células foram retornadas à estufa umidificada a 37°C com 5% de tensão de CO₂ por 24h ou 48h para posterior comparação.

3.5 Superexpressão de *IL-21* e *IL-21R*

A superexpressão de *IL-21* e *IL-21R* foi realizada através de plasmídeos GenEZ ORF produzidos em vetor pcDNA3.1+/C-(K)-DYK (GenScript, New Jersey, EUA). Os clones GenEZ ORF são construídos pela tecnologia de clonagem sem interrupção CloneEZ®, em que a ORF alvo é introduzida sem nenhum nucleotídeo extra antes ou depois da ORF. Essa estratégia de clonagem permite alcançar um alto nível de expressão e reduzir o impacto dos aminoácidos a mais introduzidos em outras técnicas. A estrutura final dos clones GenEZ ORF pode ser observada na figura abaixo (Figura 3.1):

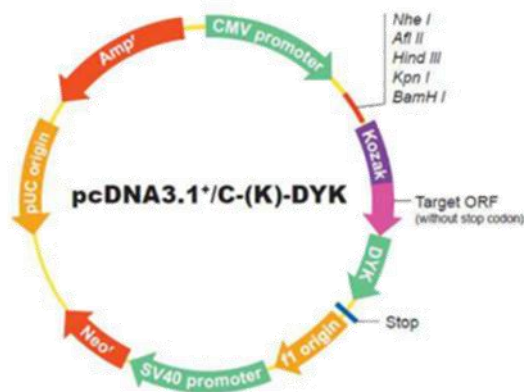


Figura 3.1. Mapa do vetor pcDNA3.1+/C-(K)DYK (GeneScript).

As ORFs clonadas no vetor pcDNA3.1+/C-(K)DYK são expressas em células mamíferas e as proteínas são marcadas com uma etiqueta C-terminal DYKDDDDK (Sigma-Aldrich). Dessa forma, as proteínas expressas por esse vetor podem ser detectadas e/ou purificadas usando anticorpos anti-DYKDDDDK.

Os clones (pcDNA3.1+/C-(K)DYK-IL-21R e pcDNA3.1+/C-(K)DYK-IL-21) foram recebidos liofilizados. Antes de abrir, os tubos foram centrifugados a 6000 g por um minuto a 4°C e então foi adicionado 100 µl de água destilada para dissolver o DNA e as amostras foram aquecidas a 50°C por 15 minutos. As soluções foram aliquotadas e armazenadas a -20°C.

Para a transfecção, foram plaqueadas 2×10^5 células por poço em placas de 6 poços para que atingissem 90% de confluência em 24h de acordo com o protocolo descrito pelo fabricante. As células foram, então, lavadas em PBS à 37°C e foram adicionados 2 mL de meio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) (Gibco) em cada poço. Em dois tubos Eppendorf de 1,5 mL devidamente identificados, foram adicionados 250 µL de Opti-MEM™ (Gibco). Em um deles foi adicionado 3,5 µL de Lipofectamina 3000 e no outro foram diluídos 2,5 µg de DNA e 10 µL de P3000 conforme orientações do fabricante. O conteúdo dos dois tubos foi misturado e incubado por 15 minutos em temperatura ambiente. Imediatamente após a incubação, a solução

foi diluída no meio anteriormente adicionado às placas. As células foram retornadas à estufa umidificada a 37°C com 5% de tensão de CO² por 24h ou 48h para posterior comparação.

3.5.1 Construção do vetor controle

Como controle dos vetores pcDNA3.1+/C-(K)DYK-IL-21R e pcDNA3.1+/C-(K)DYK-IL-21pcDNA3.1+/C-(K)DYK, foi utilizado o clone de *IL-21R* truncado. Para truncar a ORF *IL-21R*, foi escolhida a enzima Hind III cuja sequência estava presente tanto no vetor, como no gene e cuja clivagem gera uma mudança no frame de leitura e pequenos fragmentos. Para a digestão enzimática, foram adicionadas as soluções conforme a tabela abaixo (tabela 3.1) e incubado a 37°C por uma hora.

Tabela 3.1. Componentes para a digestão com a enzima de restrição Hind III.

Componente	50 µL de reação
DNA	1 µg
10X NEB Buffer	5 µL (1X)
BSA 1µg/µL	5 µL
Hind III	1 µL (ou 10 unidades)
Água livre de nucleases	para completar 50 µL

Após a reação de digestão enzimática, foi realizada eletroforese de DNA para a confirmação da clivagem do vetor. A banda contendo o vetor aberto foi recortada com o auxílio de um bisturi e purificada utilizando o kit illustra GFX PCR DNA and Band Purification Kit conforme orientações do fabricante. Após a quantificação do DNA extraído, foi realizada a reação de ligação utilizando a enzima T4 ligase. Foram utilizados T4 DNA ligase buffer 1X,

0,1 µg de DNA, 0,1 U de T4 DNA ligase e água ultrapura para 20 µL. A amostra foi incubada a 25°C por uma hora e foi realizada a transformação.

3.5.2 Transformação de bactérias DH5α

Para a transformação, foram utilizadas bactérias *Escherichia coli* DH5α competentes e 0,2 µg de DNA (clones comerciais de IL-21, IL-21R ou reação de ligação de IL-21R truncado). Após o descongelamento das bactérias e adição do DNA, a solução foi incubada por 30 minutos à 4°C (gelo), por 1 minuto à 42°C e 2 minutos à 4°C. Então, foi adicionado 1 mL de meio LB (Luria Bertani) e a amostra foi incubada por 1h à 37°C sob agitação. Após esse período, a amostra foi centrifugada por 5 minutos a 4000 rpm, o pellet foi ressuspensionado em 100 µL e foi inoculado em placa de LB contendo ampicilina. A placa foi mantida em estufa bacteriológica por 24h para o crescimento das colônias de DH5α. Após esse período, uma única colônia foi coletada da placa e adicionada à 150 mL de meio LB líquido contendo Ampicilina 1 mg/mL e incubado durante a noite a 37°C sob agitação.

3.5.3 Purificação de DNA

Para a purificação dos plasmídeos inseridos nas bactérias DH5α, foi utilizado o kit High Speed Plasmid Kit (QIAGEN) conforme orientações do protocolo do fabricante. A concentração de DNA das amostras foi determinada por espectrofotômetro (NanoDrop). Após a extração e determinação de concentração, o tamanho dos fragmentos de DNA foi analisado por eletroforese e as amostras foram armazenadas a -20°C.

3.6 Extração de RNA total

A extração de RNA total foi realizada a partir do Kit RNeasy (QIAGEN), sendo também utilizada a DNase I (QIAGEN), conforme orientações do protocolo do fabricante. A

concentração de RNA das amostras foi determinada por espectrofotômetro (NanoDrop). Após a extração e determinação de concentração, as amostras foram armazenadas a -80°C.

3.7 Síntese de DNA complementar (cDNA)

O cDNA foi sintetizado a partir de 1 µg de RNA total em um volume máximo de 10,1 µl. O RNA total foi incubado com 0,5 µg de iniciador oligo dT por 5 minutos a 70°C seguidos de 5 minutos a -4°C. Em seguida, os reagentes necessários para a reação (Tabela 3.2) foram adicionados totalizando 20 µl de volume total. As amostras foram então incubadas por 5 minutos a 25°C, 60 minutos por 42°C e 15 minutos por 70°C. Em seguida, foram adicionados 200 µl de água ultrapura e a dosagem de cDNA final foi determinada por espectrofotômetro (NanoDrop). As amostras foram armazenadas a -20°C.

Tabela 3.2. Componentes para a reação da enzima transcriptase reversa

Componente	8,9 µL de reação
Improm II RT 5X Reaction Buffer	4 µL
MgCl ₂	2,4 µL
DNTP 10nM	1 µL
RNase Out	0,5 µL
Improm II Reverse Transcriptase	1 µL

3.8 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Os oligonucleotídeos foram desenhados com base nas sequências dos genes humanos disponíveis no NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) e sintetizados pela companhia Integrated DNA Technologies (Iowa, EUA). A enzima utilizada para a reação foi a Taq polimerase produzida

pelo Instituto de Biologia Molecular do Paraná (Paraná, Brasil). Para cada reação, foram utilizados os reagentes abaixo descritos (Tabela 3.3). A relação de oligonucleotídeos está na tabela 3.4.

Tabela 3.3. Componentes para reação da polimerase em cadeia (PCR)

Componente	20μL de reação
Tampão de PCR do IBMP	1X
MgCl ₂	2,5 mM
dNTPs	1,25 mM
Taq Polimerase	1 U
Iniciador Inicial	10 μ mol
Iniciador Final	10 μ mol
cDNA	20ng
Água ultrapura	para 20 μ L

As reações foram incubadas em termociclador (Termociclador Biocycler MyGeneTm - Series Peltier Thermal Cyler, Perkin-Elmer 9700 ou MWG de Biotech) com o seguinte programa: 94°C por 3 minutos; 35 ciclos de 94°C por 10 segundos, 60°C por 30 segundos, 65°C por 30 segundos; 65°C por 3 minutos.

3.9 Eletroforese de DNA

Os fragmentos de DNA foram separados por massa molecular por meio de eletroforese em gel de agarose. A concentração do gel variou de acordo com o tamanho dos fragmentos de DNA analisados. As amostras foram preparadas com adição de tampão de amostra de DNA e

submetidas ao gel submerso em tampão Tris/Borato/EDTA (TBE) e voltagem de 80 V. Após a migração do DNA no gel, o mesmo foi incubado em solução de Gel Red 3X e visualizado por transiluminação.

3.10 Reação em cadeia da polimerase em tempo real (qRT-PCR)

A análise quantitativa dos transcritos dos genes de interesse foi realizada por meio da PCR em tempo real (qRT-PCR). Essa técnica torna possível detectar e quantificar a amplificação do material genético durante a reação da PCR. A detecção é realizada através de um elemento chamado Sybr-Green. Durante a amplificação, o Sybr-Green se incorpora na molécula dupla-fita que está sendo sintetizada e emite a fluorescência que é detectada pelo aparelho simultaneamente. Dessa forma, é possível estabelecer uma razão entre a intensidade da fluorescência e a quantidade do produto amplificado observado em cada reação.

A qRT-PCR foi realizada no aparelho LightCycler® 96 SW 1.1. As amostras foram ensaiadas em volume final de 20 µL de reação, contendo 5 µL de cDNA e 15 µL de SYBR Select Master Mix (Applied Biosystems®) com os iniciadores (Tabela 3.4), conforme instruções do fabricante. Os ciclos da PCR consistiram de: 95°C por 3 minutos; seguidos por 35 ciclos de 95°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos e 72°C por 2 minutos; seguidos de mais um ciclo chamado de “melting” que correspondente a etapa que analisa a dissociação: 72°C por 10 minutos. Todas as amostras foram ensaiadas em triplicatas técnicas.

Tabela 3.4. Conjuntos de iniciadores usados para Reação de Polimerase em Cadeia Quantitativa

Símbolo oficial	NCBI ID	Sequência iniciadora (5´-3´)	Tamanho do produto
GAPDH	NM_002046.3	Forward: GGCGATGCTGGCGCTGAGTAC Reverse: TGGTTCACACCCATGACGA	149 bp
IL-21R	NM_181078.2	Forward: TCCTGGAAATGTGGAACCTCC Reverse: TGGCCTCGTCCTTCAGCT	81 bp
IL-21	NM_001207006.2	Forward: TGTGAATGACTTGGTCCCTGAA Reverse: AACAGGAAAAGCTGACCACTCA	78 bp

GAPDH, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase; IL-21R, receptor da interleucina 21; IL-21, interleucina 21.

Para a normalização das amostras, a média dos valores relativos de expressão do gene de interesse foi dividido pela média dos valores relativos da expressão de gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), que é um gene que se expressa de forma regular entre as amostras. A curva de dissociação (melting) foi utilizada para verificar a especificidade do produto da reação. Os resultados foram analisados por teste T.

3.11 Extrato protéico de células

Para a obtenção de extratos protéicos das ASCs, as células cultivadas em placas de 6 poços foram lisadas com solução tampão de amostra para proteínas 1X (Tris-HCl 40 mM pH 6,8, SDS 1%, β -mercaptoetanol 2,5%, glicerol 6%, azul de bromofenol 0,005% (500 μ l/poço).

Logo em seguida, as amostras foram transferidas para tubos de 1,5 mL e incubadas a 94°C por 10 minutos. Os extratos prontos foram armazenados a 20°C.

3.12 Eletroforese de proteína em gel de acrilamida desnaturante (SDS-PAGE)

As proteínas foram desnaturadas com tampão de amostra como descrito anteriormente e submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida com tampão contendo SDS (Dodecil sulfato de sódio). Levando em consideração a massa molecular dos polipeptídeos analisados, foram preparados géis numa concentração de acrilamida/bis-acrilamida de 13%, utilizando 30 mA de corrente elétrica por gel.

3.13 Ensaio de Western Blot

A técnica de transferência de proteínas Western Blot, consiste na transferência de proteínas separadas por SDS-PAGE previamente, para um suporte sólido, que no caso é a membrana de nitrocelulose (Towbin *et al.*, 1979). Após a eletroforese, foi realizada a eletrotransferência das proteínas para uma membrana de nitrocelulose (Hybond-ECL) utilizando tampão de transferência a 60V e 4°C overnight. Após a transferência, a solução de Ponceau S (Ponceau S 0,5 %, ácido acético 0,1 %) foi utilizada para corar e verificar a qualidade da transferência. A descoloração foi realizada em seguida com PBS / Tween 0,1 % para posterior incubação com solução de bloqueio (5 % de leite em pó desnatado em TBS / Tween 0,1 %) por 2 horas à temperatura ambiente. Após essa etapa, a membrana foi incubada em solução de bloqueio contendo o anticorpo primário diluído: anti-coelho IL-21R 1:250 (ProteinTech, Illinois, EUA) ou anti-coelho GAPDH peroxidase (Sigma-Aldrich), permanecendo na solução de bloqueio durante a noite a 4°C, e em seguida, lavada três vezes por 5 minutos com TBST (TBS / Tween 0,1 %). O anticorpo secundário utilizado foi o anti-coelho conjugado com peroxidase 1:8000 (ECL-Amershan) incubado por duas horas à temperatura ambiente. Para a revelação por quimioluminescência, as membranas foram

novamente lavadas três vezes por 5 minutos com TBST, incubadas com as soluções do kit ECL-Amersham misturadas e distribuídos sobre a membrana, como orientado pelo fabricante. Após incubação por 1 minuto, membrana revelada por quimioluminescência com exposição de 10 minutos.

3.14 Adipogênese *in vitro* e quantificação

Para análise da capacidade de diferenciação adipogênica nas diferentes condições, as ASCs foram plaqueadas em placas de 96 poços para a indução da diferenciação e análise em Operetta High-Content Imaging System (PerkinElmer). A indução da diferenciação celular em adipócitos foi realizada utilizando o meio comercial (Lonza) segundo o protocolo do fabricante por um período de 10 dias. Após a esse período, as células foram fixadas com paraformaldeído 4% (diluído em PBS) por 10 minutos e lavadas com PBS aquecido a 37°C três vezes. Posteriormente, as células foram incubadas com vermelho Nilo 1:1000 por 30 minutos no escuro e lavadas novamente com PBS. As células foram, então, incubadas com DAPI diluído 1:1000 (1mg/mL) por 10 minutos no escuro, lavadas com PBS e mantidas no mesmo tampão até a realização da leitura. Como controle da eficiência da diferenciação, ASCs dos mesmos doadores foram mantidas nas mesmas condições com meio de cultura controle (DMEM com SBF, Penicilina e Estreptomicina). A placa foi analisada em equipamento em sistema de imagem High-Content Operetta com a captura de 20 fotos por poço com objetiva de 20x em triplicata biológica e 6 réplicas técnicas. Máscaras para reconhecimento de núcleo e citoplasma foram aplicados, bem como a quantificação das vesículas lipídicas marcadas com vermelho nilo por célula (intensidade de fluorescência e número de *spots*).

3.15 Ensaio de proliferação celular Click- iT EdU

O ensaio de proliferação celular foi realizado a partir do Kit para ensaios de citometria de fluxo Click-iT EdU Alexa Fluor 488 (Invitrogen). EdU (5-Etynil-2'-desoxiuridina) é uma

substância análoga à timidina que é incorporada ao DNA durante sua síntese. A detecção é baseada em uma reação química covalente entre uma azida e um alcino. Nesse caso, o alcino vem da porção etinil de EdU, e a azida é acoplada à Alexa Fluor® 488. A porcentagem de células que passaram por processo de proliferação é calculada por uma metodologia padrão de citometria de fluxo.

Para a realização do ensaio, logo após os tratamentos específicos, as células foram incubadas com EdU e analisadas depois de 24 horas. Foram seguidas as orientações do protocolo do fabricante. As amostras foram analisadas pelo citômetro de fluxo FACSCanto (BD Biosciences, San Jose, CA) e as análises foram feitas através do programa FlowJo (FlowJo, Ashland, USA).

3.16 Ensaio de atividade mitocondrial (Rhodamine 123)

Para avaliar o potencial de membrana mitocondrial, as células foram incubadas com 50 µM Rhodamine 123 (Life Technologies®), por 15 minutos a 4 °C (protegidas da luz), lavadas e ressuspensas em PBS. A intensidade de fluorescência foi detectada pelo citômetro de fluxo FACSCanto flow cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA) e analisadas através do programa FlowJo.

3.17 Imunofluorescência

A imunolocalização das proteínas nas células foi realizada por imunofluorescência indireta. As células foram plaqueadas em lamínulas estéreis de vidro em placas de 24 poços para visualização por microscopia confocal e em placas de 96 poços para análise por Operetta High-Content Imaging System (PerkinElmer). As células foram lavadas três vezes com PBS a 37°C por 5 minutos e fixadas em Metanol (Merck) -20°C por 10 minutos. As células foram lavadas novamente com PBS três vezes por 5 minutos e incubadas com PBS/Triton 0,5% a

temperatura ambiente por 30 minutos sem agitação. Posteriormente, foram lavadas três vezes com PBS e incubadas com PBS/BSA (Affymetrix Inc., California, EUA) 1% por 1 hora sob agitação e lavadas novamente três vezes com PBS. Foi realizada, então, a incubação com os anticorpos primários (anti-coelho IL-21R 1:10 (ProteinTech, Illinois, EUA), anti-camundongo IL-21R 1:50 (Santa Cruz Biotechnology, California, EUA), ou anti-camundongo ATP5B (Santa Cruz Biotechnology, California, EUA)) diluídos em PBS/BSA 1% overnight a 4°C. Após esse procedimento, as células foram lavadas com PBS três vezes e incubadas com anticorpo secundário Alexa Fluor 488 (Sigma) ou Alexa Fluor 546 (Sigma) 1:400 por uma hora a temperatura ambiente protegido de luz. Após serem lavadas novamente três vezes com PBS, as células foram incubadas com DAPI (1 µg/µl) diluído em PBS por 5 minutos, lavadas três vezes em PBS. As lamínulas foram montadas com Prolong Gold (Invitrogen) e seladas com esmalte sobre uma lâmina de microscopia óptica. As lâminas foram observadas por microscopia confocal de fluorescência com objetivas de 20x, 40x e 100x. A quantificação de IL-21R nas placas de 96 poços foi realizada usando o sistema High Content Imaging System (Operetta CLS, Perkin Elmer). Um total de 25 fotos foram adquiridas por poço em aumento de 20x em triplicata biológica. Para a quantificação dos núcleos, as imagens foram adquiridas no canal DAPI (excitação de 355–385 nm e emissão de 430–500 nm) com 20 milissegundos de exposição. Foram considerados nas análises os núcleos com circularidade > 0.9 para exclusão de debris celulares. Para a quantificação de IL-21R nas células, as imagens foram adquiridas no canal Alexa 488 (excitação de 460–490 nm e emissão de 500–550 nm) com 400 milissegundos de exposição, 50% de potência para DAPI e 80% para Alexa 488. Foi realizada a quantificação e determinação da intensidade da marcação de IL-21R utilizando o sistema Operetta CLS and Analysis Software 4.5 (Perkin Elmer). Os resultados foram expressos como quantidade de núcleos por poço, porcentagem de células IL-21R positivas e marcação de alta ou baixa intensidade quando comparado à média de intensidade.

3.18 Marcação intracelular de proteínas para análise por citometria de fluxo

Após a dissociação com tripsina - EDTA 0,25 %, as células foram lavadas com PBS, centrifugadas a 2000 x g por 5 minutos e fixadas com paraformaldeído 4% por 10 minutos. As células foram contadas por câmara de Neubauer e foram separadas 6×10^5 células por amostra. Após duas lavagens com 1X tampão BD Perm/Wash (BD Biosciences), as células foram permeabilizadas com o mesmo tampão em incubação por 15 minutos à temperatura ambiente como sugerido pelo fabricante. As amostras foram, então, incubadas com 20 µl de anticorpos primários, anti-coelho IL-21R 1:25 (ProteinTech, Illinois, EUA), anti-camundongo IL-21R 1:25 (Santa Cruz Biotechnology, California, EUA), diluídos em tampão BD Perm/Wash por duas horas a 4°C. Após a incubação, as células foram lavadas duas vezes em tampão BD Perm/Wash e centrifugadas a 2000 x g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células sedimentadas foram incubadas por 1h e 30 minutos com 20 µl de anticorpo secundário anti-IgG com fluoróforo acoplado (Anti-coelho conjugado com FITC ou anti-camundongo conjugado com FITC), diluído 1:400. Uma última lavagem foi realizada e as células foram ressuspensas em 400 µl do tampão BD Perm/Wash. As amostras foram, então, armazenadas a 4°C até a leitura em citômetro de fluxo FACSCanto (BD Biosciences, San Jose, CA) e analisadas no software FlowJo (FlowJo, Ashland, USA).

4. RESULTADOS

4.1 Localização de IL-21R em ASCs

A presença e localização do receptor da interleucina 21 (IL-21R) em células-tronco derivadas de tecido adiposo (ASCs) ainda não foi descrita em literatura. Em outras linhagens celulares, sua localização ainda continua incerta, entretanto, em ensaios de imunofluorescência já realizados utilizando anticorpos anti-IL-21R, a proteína foi encontrada no citoplasma e membrana celular, como descrito pela plataforma The Human Protein Atlas (Uhlen et al., 2010). Dessa forma, para verificar a localização da proteína IL-21R em ASCs, foi utilizada a técnica de imunofluorescência com o anticorpo anti-IL-21R (ProteinTech). A imagem observada por microscópio confocal (Figura 4.1A) apresentou localização mitocondrial. O padrão de marcação em células-tronco mesenquimais, foi comparado com imagens de artigos já publicados, sendo levantada a hipótese de localização mitocondrial (Figura 4.1B) (Zhang *et al.*, 2013).

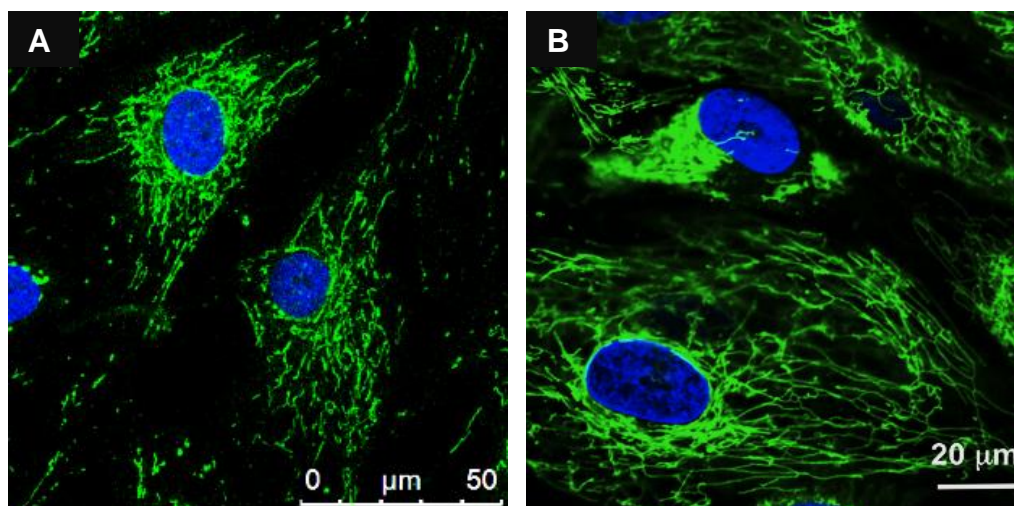


Figura 4.1. (A) ASCs foram incubadas com o anticorpo primário α -IL-21R e com um anticorpo secundário conjugado a Alexa 488. (B) Figura adaptada de Zhang et al. Células-tronco mesenquimais marcadas com mitotracker green (2013).

Para a verificação dessa suposição, foi realizada a dupla marcação de IL-21R e da proteína presente na subunidade beta da ATP sintase (ATP5B), presente na mitocôndria das

células. As figuras 4.2A e 4.2E representam a marcação (em verde) da porção intracelular da proteína IL-21R com anti-IL-21R (Proteintech). As figuras 4.2B e 4.2F representam a marcação mitocondrial (em vermelho) com anti-ATP5B (Santa Cruz). As figuras 4.2C e 4.2G representam a marcação nuclear (azul) com DAPI. As figuras 4.2D e 4.2E representam a junção das três imagens (A, B e C; E, F e G) demonstrando a co-localização de IL-21R e em laranja. A imunofluorescência realizada com o anticorpo anti-IL-21R (Proteintech) também apresentou marcação nuclear ainda que variável de acordo com o doador e tratamento.

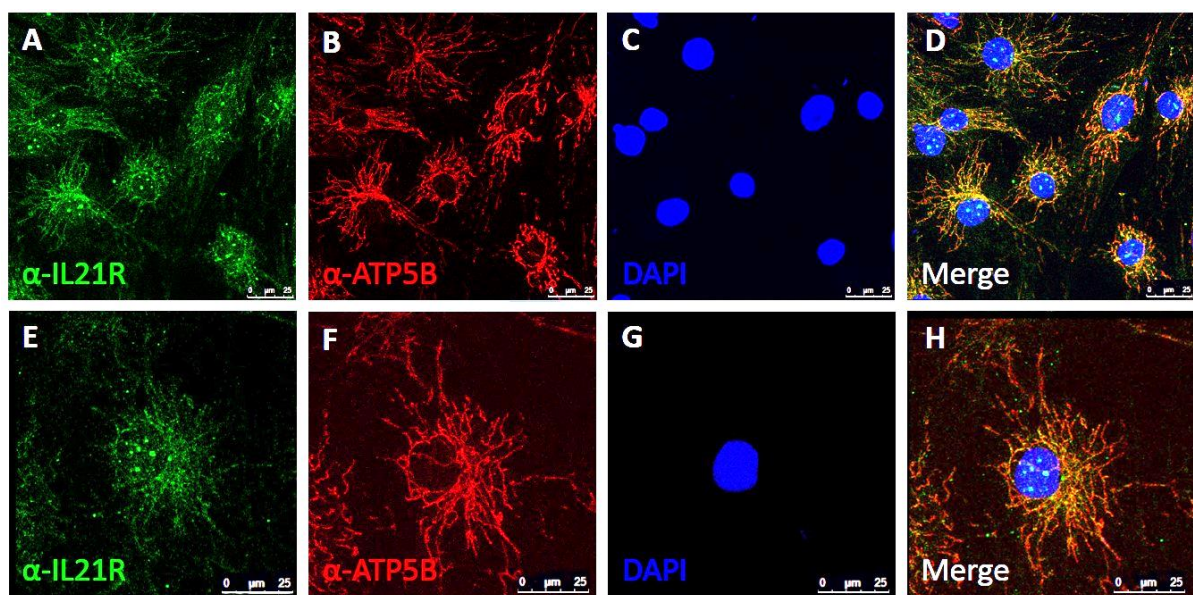


Figura 4.2. Imunofluorescência de α -IL-21R e α -ATP5B em ASCs sob microscópio confocal. (A,E) ASCs foram incubadas com o anticorpo primário α -IL-21R e com um anticorpo secundário conjugado a Alexa 488. (B,F) ASCs foram incubadas com o anticorpo primário α -ATP5B (Atp5b ATP sintase localizada na mitocôndria) e com um anticorpo secundário conjugado a Alexa 546. (C,G) ASCs também foram coradas com DAPI marcação nuclear. (D,H) A junção das imagens demonstra que α -IL-21R está co-localizando com α -ATP5B, indicando que IL-21R está localizada na mitocôndria das ASCs. : 25 μ m

4.2 Silenciamento de IL-21R em ASCs

A fim de compreender o papel da proteína IL-21R em células-tronco derivadas de tecido adiposo, realizamos o silenciamento gênico para reduzir os níveis da proteína e assim, identificar os processos afetados por tal alteração. No presente trabalho, o silenciamento foi realizado com a utilização de um siRNA (RNA curto de interferência) específico para o gene em questão. A verificação da eficiência do silenciamento foi avaliada por PCR em tempo real e por imunofluorescência, possibilitando a quantificação da alteração do nível de RNA

mensageiro e da proteína IL-21R. Comparando os resultados das células incubadas com siRNA IL-21R com siRNA Scramble (controle), foi possível verificar uma diminuição significativa no nível de RNAm do gene *IL-21R*, ainda que as triplicatas biológicas tenham apresentado grande variabilidade (Figura 4.3).

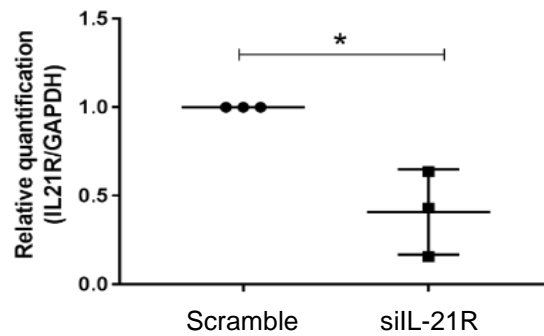


Figura 4.3. Quantificação relativa de RNA de IL-21R normalizado por GAPDH usando PCR em tempo real (qRT-PCR). Teste T, $p^* < 0,05$.

Os resultados de imunofluorescência também demonstram uma diminuição estatisticamente significativa da proteína IL-21R após o silenciamento. Na figura 4.4 é possível comparar as imagens obtidas por Operetta High-Content Imaging System das ASCs tratadas com siRNA Scramble (controle) e siRNA IL-21R.

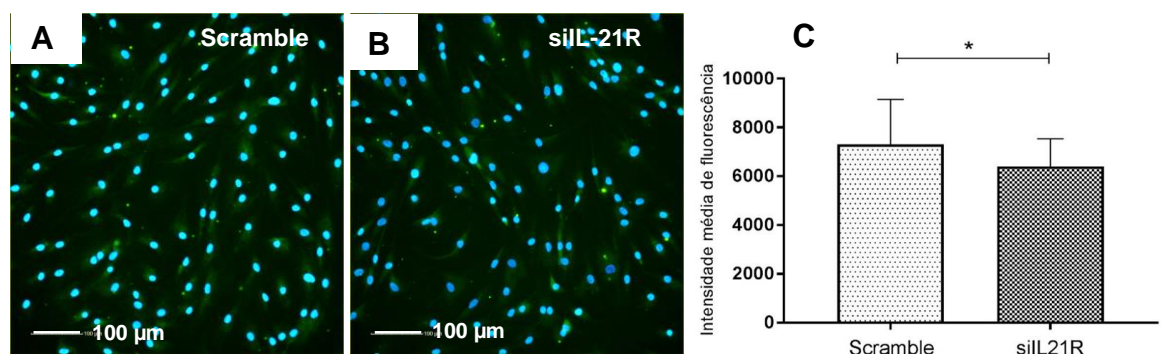


Figura 4.4. (A, B) Após o silenciamento, as ASCs incubadas com o anticorpo primário α -IL-21R e com o anticorpo secundário conjugado a Alexa488 (verde) e o núcleo corado com DAPI (azul). A intensidade da fluorescência foi avaliada e quantificada por Operetta High-Content Imaging System ($n=122500$). (C) A intensidade da fluorescência foi quantificada por Operetta High-Content Imaging System ($n=122500$). Teste T, $p^* < 0,05$.

Para mensurar se houve uma alteração significativa de aproximadamente 20% no nível da proteína IL-21R, a intensidade média de fluorescência Alexa 488 das imagens foi quantificada pelo programa do *Operetta High-Content Imaging System* (Figura 4.4C).

Considerando a localização de IL-21R nas mitocôndrias, nos perguntamos se o silenciamento da proteína poderia influenciar no potencial de membrana mitocondrial das células. Para isso, avaliamos a diferença do corante Rodamina 123 absorvido pelas células e não observamos diferenças estatísticas entre as ASCs tratadas com siIL-21R e com siRNA Scramble (Figuras 4.5).

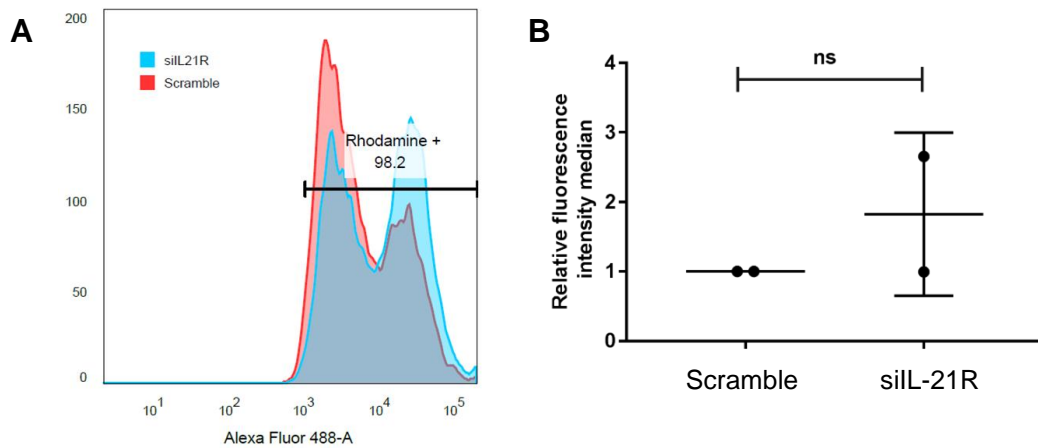


Figura 4.5. Após o silenciamento gênico, as células foram incubadas com Rhodamine 123 para a verificação de sua atividade mitocondrial. A intensidade de Rhodamine 123 quantificada por citômetro de fluxo e analisada por FloJo. (A) Histograma. (B) Média de intensidade das triplicatas biológicas. Análise estatística: Teste T.

No entanto, quando comparamos a quantificação do silenciamento de RNAm por qRT-PCR com os resultados obtidos com Rhodamine 123, podemos observar que as células que obtiveram maior silenciamento (83%) também apresentaram maior mediana de intensidade de fluorescência Alexa 488 (Rhodamine 123) quando comparado às células do doador que obteve menor silenciamento (Figura 4.6).

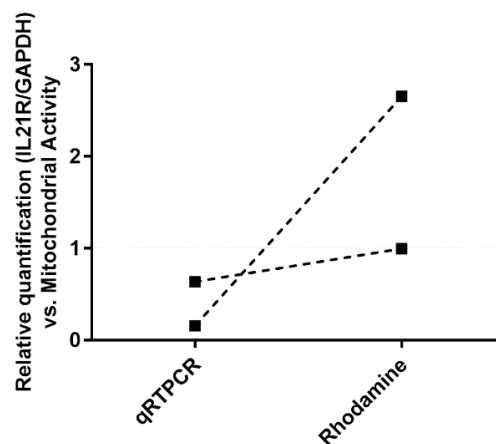


Figura 4.6. Relação entre a porcentagem da diminuição de RNAm de IL-21R por qRT-PCR e a mediana de intensidade de fluorescência de Rhodamine 123.

A fim de verificar se a atividade proliferativa das células seria afetada pela diminuição da proteína IL-21R, foi utilizada a técnica de EdU. Nas figuras 4.7A e 4.7B podemos observar que não houve diferença estatística na proliferação das células silenciadas.

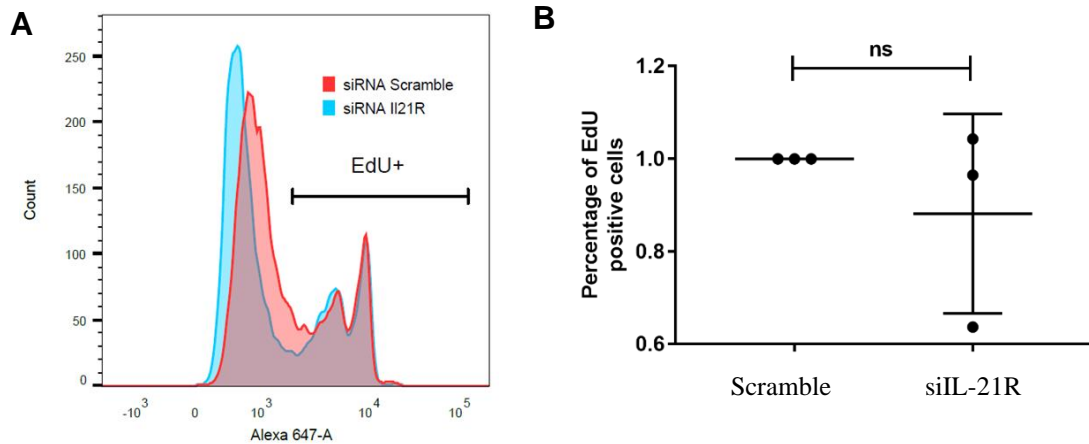


Figura 4.7. Avaliação proliferativa das células siIL21R através da incorporação de EdU. A porcentagem de células Edu+ foram quantificadas por citômetro de fluxo e analisados com o software FlowJo. (A) Histograma (B) Gráfico representando triplicata biológica com a porcentagem de células marcadas com EdU.

Outro importante parâmetro avaliado foi a capacidade das células silenciadas para diferenciar a adipócitos. As células silenciadas para IL-21R e controle foram induzidas a diferenciação adipogênica por 10 dias. Após esse período, as ASCs foram coradas com Vermelho Nilo para

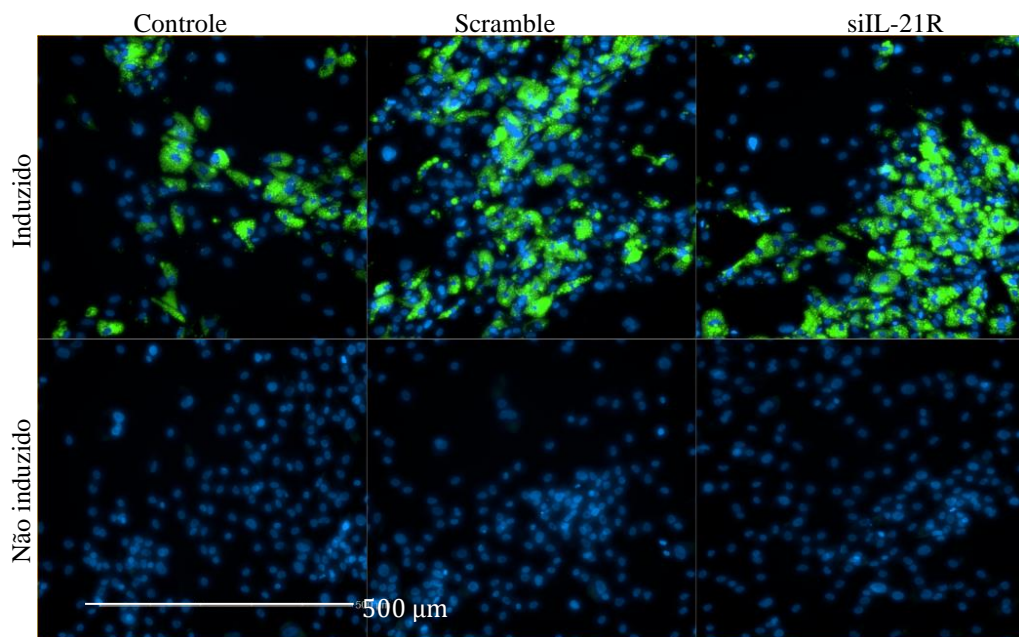


Figura 4.8. Diferenciação adipogênica das células silenciadas para IL-21R foram avaliadas pela marcação com Vermelho Nilo (marca vesículas lipídicas) e analisado por Operetta High-Content Imaging System (n=1).

quantificação das vesículas lipídicas por *Operetta High Content Imaging*. Analisando o número de vesículas lipídicas, a porcentagem de células marcadas, e a área total das células marcadas com Vermelho Nilo, o silenciamento demonstrou redução significativa na adipogênese (Figuras 4.8 e 4.9).

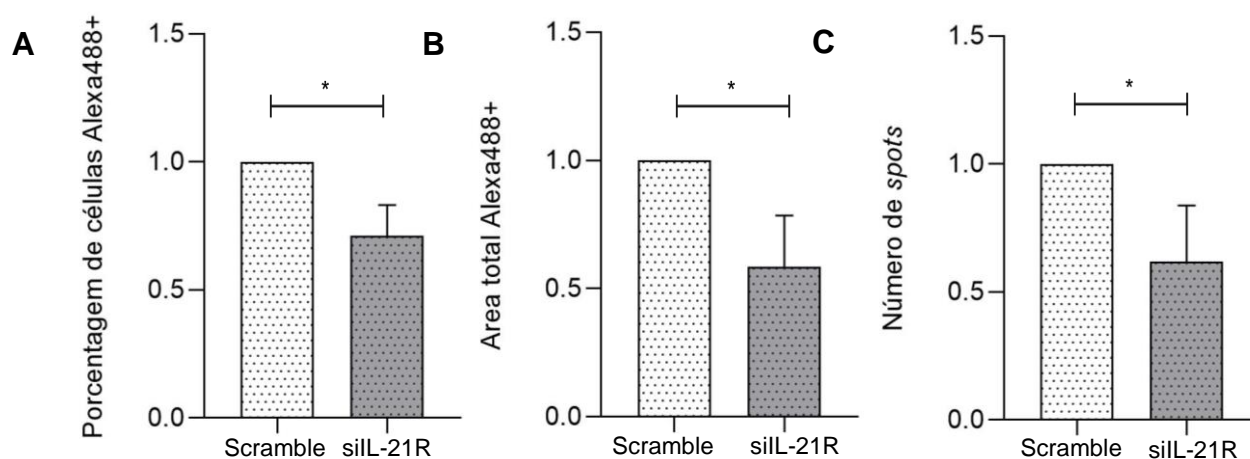


Figura 4.9. Quantificação da diferenciação adipogênica. (A) Porcentagem de células marcadas com Vermelho Nilo. (B) Área total marcada por Vermelho Nilo. (C) Número de vesículas lipídicas totais (spots) reconhecidos.

4.3 Superexpressão de IL-21R em ASCs

A fim de verificar quais os efeitos do aumento do nível de IL-21R nas ASCs, foi realizada a superexpressão do gene *IL-21R* pela transfecção de clones comerciais. A alteração dos níveis de RNAm após o tratamento foi mensurada por PCR quantitativo. Dessa forma, verificamos que a superexpressão de RNAm de IL2-1R foi estatisticamente significativa entre

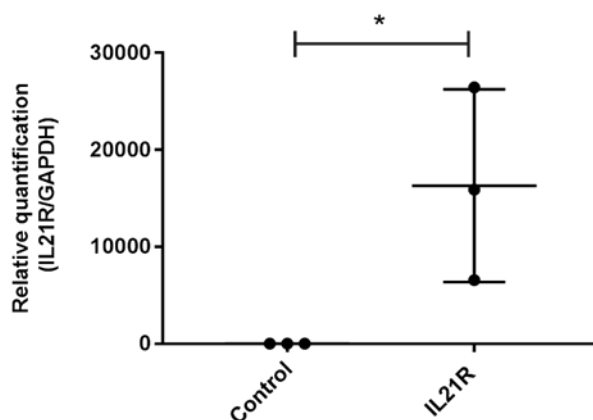


Figura 4.10. Quantificação relativa de RNA de IL-21R normalizado por GAPDH usando PCR em tempo real (qRT-PCR). Teste T, $p < 0,05$.

as células transfectadas com vetor de expressão de IL-21R em comparação às transfectadas com o vetor controle (vetor truncado), apesar da grande variação entre as triplicatas biológicas (Figura 4.10).

O aumento em nível protéico de IL-21R foi verificado através da técnica de Western Blot, onde foi possível notar uma diminuição da banda com 100 kDa, provavelmente a proteína IL-21R glicosilada e um aumento da banda de 70kDa, supostamente de proteínas não glicosiladas, quando comparado ao controle (Figura 4.11). No entanto, novos ensaios devem ser realizados para confirmar essa hipótese.

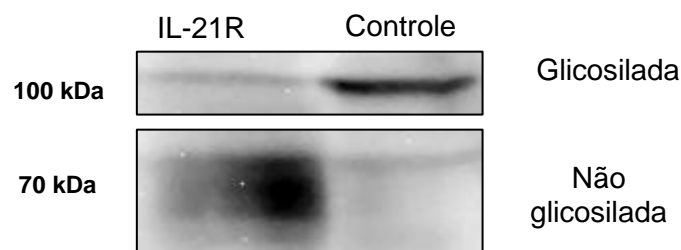
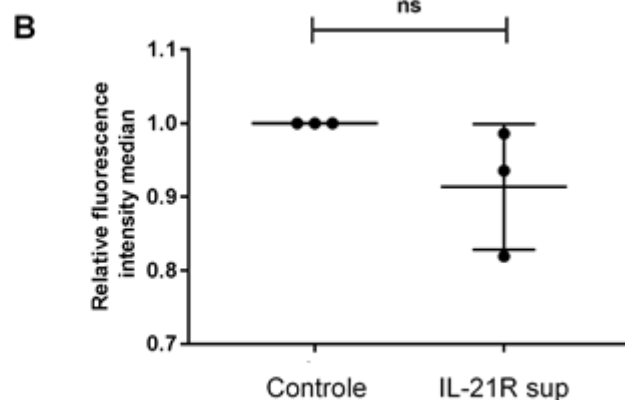
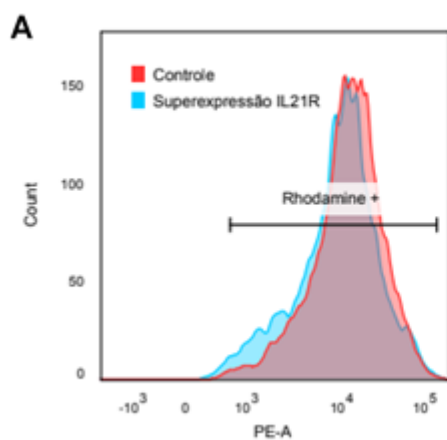


Figura 4.11. Técnica de Western Blot utilizando o anticorpo anti-IL-21R gel SDS-PAGE 13%.

Os ensaios de atividade mitocondrial (4.12A e 4.12B) e de proliferação celular (Figuras 4.12C e 4.12D) não apresentaram resultados estatisticamente significativos entre as células com superexpressão de IL-21R comparado ao controle (vetor truncado).



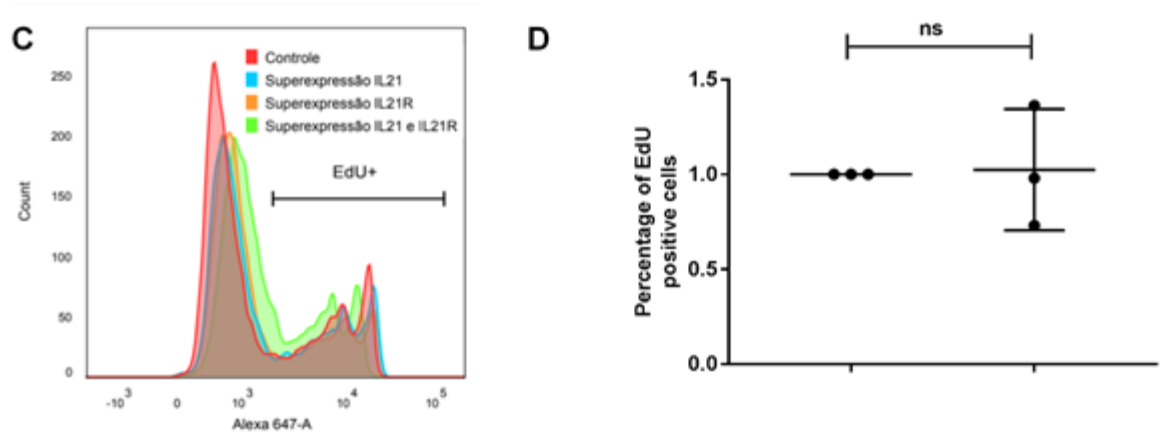


Figura 4.12. A,B) Ensaio de potencial de membrana mitocondrial utilizando Rodamina 123 analisado por citometria de fluxo. (C,D) Ensaio de proliferação celular utilizando EdU analisado por citometria de fluxo. Teste tT, $p^* < 0,05$.

4.4 Superexpressão de IL-21 em ASCs

O efeito de um receptor celular exige a presença do ligante, neste caso o receptor de IL-21 necessita da presença da interleucina 21 para avaliação de sua função no ambiente celular. Com o propósito de verificar qual o efeito do aumento da interleucina 21 nas ASC foi realizada sua superexpressão pela transfecção de um clone comercial. Os níveis de RNAm de IL-21 avaliados por PCR em tempo real sugerem que a superexpressão não foi estatisticamente significativa devido à alta variabilidade entre as triplicatas (Figura 4.13), embora todas as triplicatas biológicas apresentam aumento na expressão de IL-21.

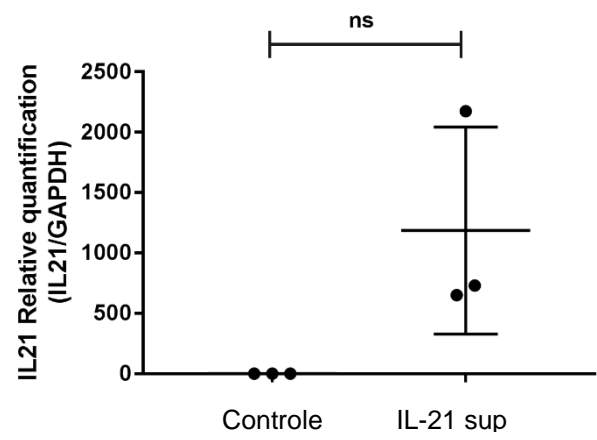


Figura 4.13. Quantificação relativa de RNA de IL-21 normalizado por GAPDH usando PCR em tempo real (qRT-PCR). Teste T, $p^* < 0,05$.

Os ensaios de atividade mitocondrial (Figuras 4.14A e 4.14B) e proliferação celular (Figuras 4.14C e 4.14D) também não foram estatisticamente relevantes.

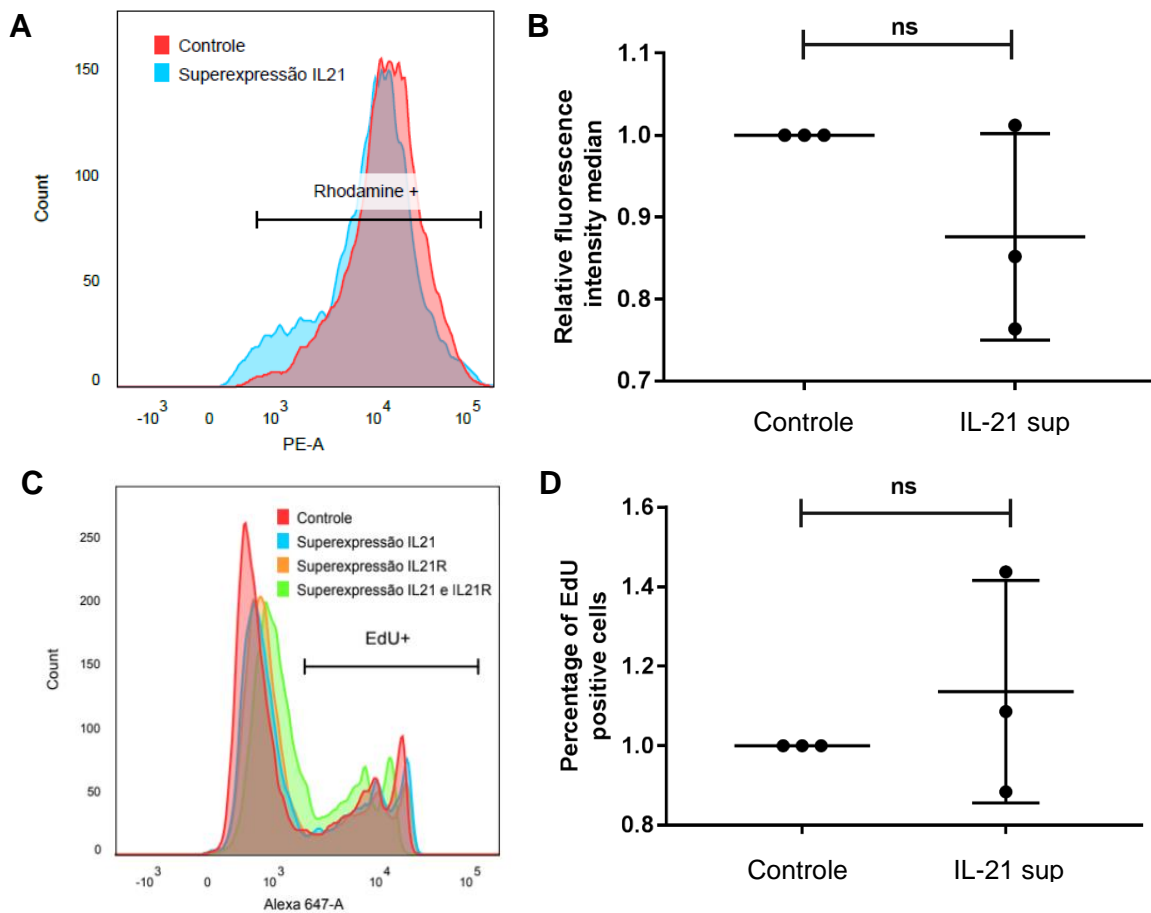


Figura 4.14. (A,B) Ensaio de potencial de membrana mitocondrial utilizando Rodamina 123 analisado por citometria de fluxo. (C,D) Ensaio de proliferação celular utilizando EdU analisado por citometria de fluxo. Teste T, $p^* < 0,05$.

4.5 Superexpressão de IL-21 e IL-21R em ASCs

Com a finalidade de verificar o efeito do aumento tanto da IL-21 como de seu receptor, foi realizada uma superexpressão dupla pela transfecção de dois clones. Os níveis de RNAm dos genes foram avaliados por PCR em tempo real e sugerem que a superexpressão de IL-21 foi estatisticamente significativa, mas o aumento do nível de IL-21R não foi considerado estatisticamente relevante (Figura 4.15).

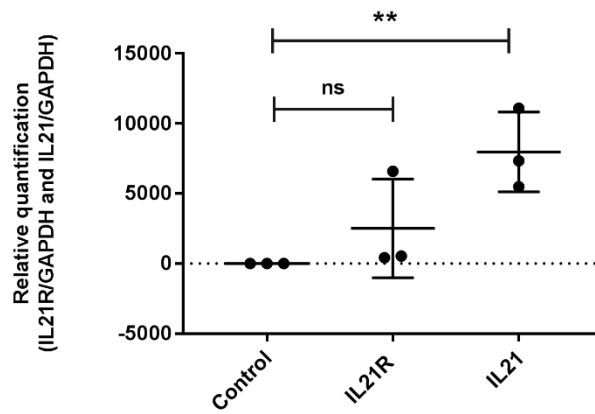


Figura 4.15. Superexpressão dos genes IL-21 e IL-21R utilizando clone comercial (GenScript). Quantificação relativa de RNA IL-21 e IL-21R normalizado por GAPDH usando PCR quantitativo (Biológica n=3, técnica n=3). Teste T, $p^* < 0,05$.

Os ensaios de atividade mitocondrial (Figuras 4.16A e 4.16B) e proliferação celular (Figuras 4.18A e 4.18B) também não foram estatisticamente significativos.

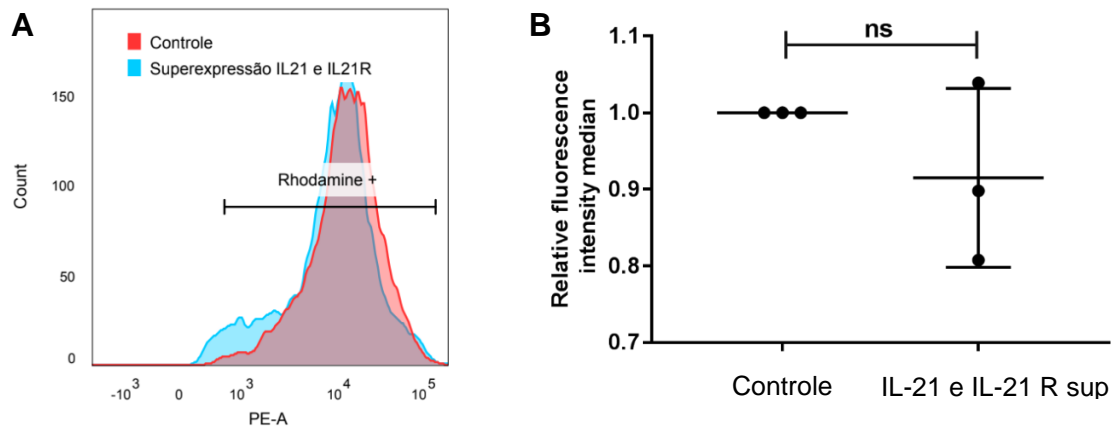


Figura 4.16. Após realizar a superexpressão de IL-21 e IL-21R, as ASC foram incubadas com Rhodamine 123 para verificar a funcionalidade mitocondrial (n=3). Teste T, $p^* < 0,05$.

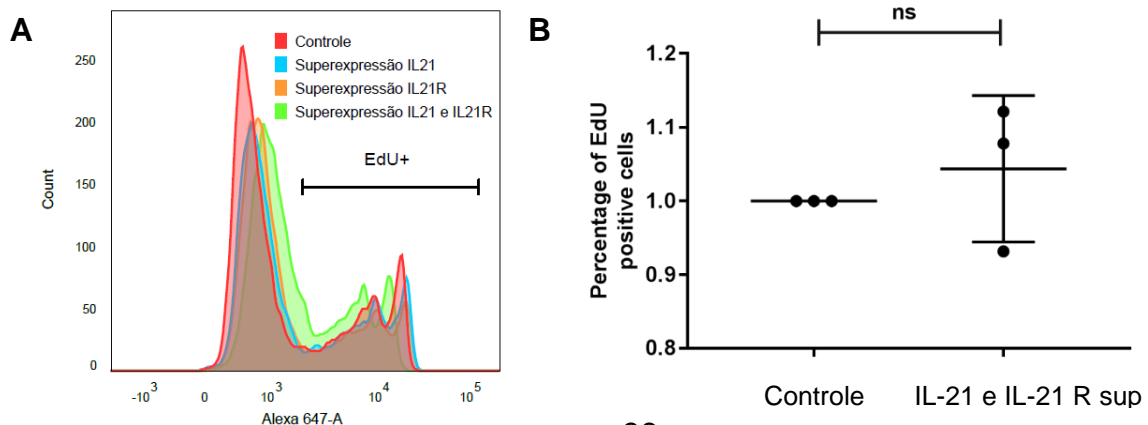


Figura 4.17. Atividade proliferativa por incorporação de EdU das células com superexpressão de IL-21 e IL-21R ou controle (n=3). Teste T, $p^* < 0,05$.

5. DISCUSSÃO

5.1 Localização de IL-21R em ASCs

A localização de IL-21R e presença desse receptor na mitocôndria (ou próxima dessa organela) foi demonstrada nas ASCs de forma inédita neste trabalho. Em outros tipos de células, a proteína já foi identificada na membrana plasmática e no citoplasma segundo O Atlas da Proteína Humana (Human Protein Atlas - ENSG00000103522) (Figura 5.1).

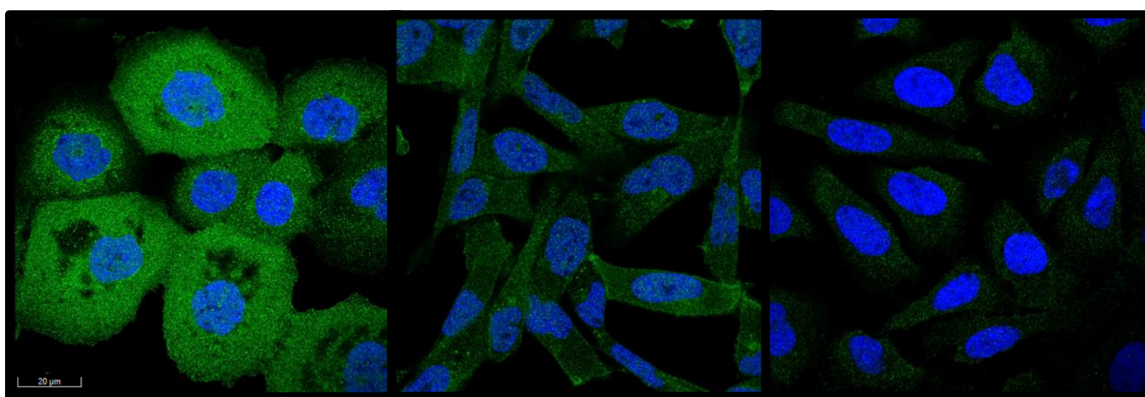


Figura 5.1. Adaptado de The protein Atlas: Marcação citoplasmática de IL-21R em 3 linhagens celulares (A-321, RH-30 e U-2 OS).

Os resultados aqui demonstrados evidenciam uma possível localização mitocondrial em ASCs, o que nos leva a questionar a relação de IL-21R com a organela. Tendo em vista que a proteína é um receptor de membrana e não tem sido associado à outras funções, a hipótese levantada para essa questão seria uma possível participação da proteína em plataformas lipídicas (*lipid rafts*).

Muito além de uma simples delimitação celular, a membrana plasmática é responsável por reconhecer alterações no celular externo e promover a sinalização intracelular. Antigamente, acreditava-se que a membrana plasmática seria formada por uma estrutura fluida onde as proteínas poderiam se deslocar livremente em um modelo denominado como mosaico fluido (Singer e Nicolson, 1972). Mais recentemente, foi proposto que as moléculas não se

moveriam de forma livre pela membrana, mas estariam arranjadas em plataformas lipídicas organizadas, o que originou o conceito de microdomínios lipídicos de membrana (Verkade e Simons, 1997). Também foi visto que as plataformas lipídicas podem formar endossomos quando associadas a proteínas chamadas de caveolinas. As caveolinas são proteínas sintetizadas no retículo endoplasmático e enviadas à membrana plasmática como proteínas integrais de membrana, adotando um formato incomum pela exposição das extremidades N e C-terminal ao citoplasma. Os endossomos, também chamados de caveolos ou signalossomos, carregam receptores da membrana para o interior das células, facilitando a interação com outras proteínas e participando de vias de sinalização. Além disso, essas estruturas são extremamente importantes para o metabolismo lipídico, cobrindo cerca de 40% da superfície celular de adipócitos (Monier *et al.*, 1995; Bastiani e Parton, 2010).

A Caveolina-1 é uma das proteínas fundamentais para a formação dos endossomos. Essa proteína também está associada à diversos processos celulares em células-tronco, como migração, proliferação, senescência, diferenciação, crescimento e controle oxidativo mitocondrial. Em trabalhos recentes, também foi visto que essa é uma proteína essencial para a diferenciação de células-tronco derivadas de tecido adiposo e está presente em diferentes níveis ao longo da adipogênese (Bastiani e Parton, 2010; Fernández-Real *et al.*, 2010; Baker e Tuan, 2013; Guan *et al.*, 2016).

5.2 Silenciamento de IL-21R em ASCs

O silenciamento de IL-21R demonstrou uma diminuição significativa da adipogênese durante a fase inicial da diferenciação. STAT3, fator de transcrição ativado pela via de sinalização JAK2-STAT3 pela ligação de IL-21 à IL-21R, já foi descrito como importante regulador da fase inicial da adipogênese e estudos envolvendo o silenciamento de STAT3 demonstraram diminuição da diferenciação adipogênica (Zhang *et al.*, 2011; Kramer, Edkins,

et al., 2015; Kramer, Kadye, *et al.*, 2015; Yuan *et al.*, 2017; Lee *et al.*, 2018). Dessa forma, levantamos a hipótese de que o silenciamento de IL-21R tenha levado à diminuição de STAT3, e conseqüentemente, à supressão da adipogênese. Para posterior confirmação dessa hipótese, serão necessários novos experimentos.

Em nossos experimentos, mesmo após diversas modificações do protocolo para um silenciamento eficiente, não foi possível obter silenciamento gênico homogêneo entre os doadores. A alta variabilidade entre as amostras biológicas tem sido frequente nos estudos com amostras de doadores, dessa forma o banco de células-tronco do ICC tem realizado um questionário mais completo com informações sobre idade, sexo, altura, peso e doenças pré-existentes. Quando comparamos as células que obtivemos o maior silenciamento (TAL32), com as células com menor silenciamento (TAL28), podemos notar uma grande diferença de idade entre os pacientes e uma disfunção metabólica do paciente TAL32 (Tabela 5). Já foi visto que a idade dos pacientes causa claras alterações tanto em nível transcricional quanto pós-transcricional, resultando em diversas mudanças biológicas relacionadas à idade (Peffer *et al.*, 2016). Por conseguinte, levantamos a hipótese de que a idade e saúde dos pacientes pode ter influenciado nos resultados. Para confirmação, novos testes deverão ser realizados.

Tabela 5.1. Dados dos doadores de ASCs

Doador	Idade	Sexo	Altura (m)	Peso (kg)	Doenças
TAL32	48	FEMININO	1,75	90	TIREÓIDE
TAL28	20	FEMININO	1,74	75	NENHUMA
TAL27	46	FEMININO	1,66	74,5	NENHUMA
TAL22	44	FEMININO	1,63	72	FIBROMIALGIA

Outro possível fator que pode ter afetado o silenciamento gênico foi o fato de que a lipofectamina utilizada como agente de transfecção, causou um aumento dos níveis de RNAm de IL-21R nas células quando comparadas às células sem nenhum tratamento (dados não mostrados). Esse reagente é formado por agentes lipossômicos e podem ativar a via lipídica das ASCs e aumentando os níveis de IL-21R, porém novos experimentos devem ser realizados para validar essa hipótese.

5.3 Superexpressão de IL-21 e IL-21R em ASCs

A partir dos resultados da técnica de Western Blot (Figura 4.12), podemos inferir que a tentativa de superexpressão do gene IL-21R estaria causando alterações nos níveis de proteína funcional (glicosilada) e aumentando os níveis de proteína não funcional (não glicosilada), uma vez que a proteína IL-21R é C-manosilada no primeiro triptofano e essa estrutura extracelular garante sua ligação com IL21 (Hamming *et al.*, 2012). A glicosilação é uma estrutura de açúcar que interfere diretamente na funcionalidade da proteína e sua formação não é controlada apenas por sua informação genética, mas por diversos outros fatores que variam de acordo com o tipo celular (Spiro, 2002). Dessa forma, é extremamente difícil certificar-se de a proteína superexpressada seja glicosilada e alcance sua estrutura final funcional. Além disso, pelo fato do receptor ser heterodimérico e se associar à cadeia gama comum para realizar sua função, existe a possibilidade de que a superexpressão apenas do receptor sem a cadeia gama comum não seria suficiente para verificar a função do receptor. Dessa forma, não é possível chegar a nenhuma conclusão sobre os efeitos da superexpressão de IL-21R aqui apresentados.

6. CONCLUSÕES

- A proteína IL-21R colocaliza com a proteína alfa-ATP5B. Dessa forma, sugere-se que esse receptor está localizado na mitocôndria das células-tronco derivadas de tecido adiposo.
- O silenciamento de IL-21R afetou negativamente a adipogênese durante as fases iniciais da diferenciação de ASCs, mas não demonstrou alterações significativas na atividade proliferativa ou mitocondrial das células.
- A superexpressão de IL-21 e IL-21R não apresentou diferenças significativas nos níveis de mRNA ou proteína.

7. REFERÊNCIAS

ALI, A. T. et al. Adipocyte and adipogenesis. **Eur J Cell Biol**, v. 92, n. 6-7, p. 229-36, 2013 Jun-Jul 2013. ISSN 1618-1298. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23876739> >.

ARRIGHI, N. Stem cells : therapeutic innovations under control. 2018. ISSN 9780081025888 0081025882. Disponível em: < <http://public.ebib.com/choice/publicfullrecord.aspx?p=5335415> >.

ASAO, H. et al. Cutting edge: the common gamma-chain is an indispensable subunit of the IL-21 receptor complex. **J Immunol**, v. 167, n. 1, p. 1-5, Jul 2001. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11418623> >.

BAJEK, A. et al. Adipose-Derived Stem Cells as a Tool in Cell-Based Therapies. **Arch Immunol Ther Exp (Warsz)**, v. 64, n. 6, p. 443-454, Dec 2016. ISSN 1661-4917. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27178663> >.

BRUMMELKAMP, T. R.; BERNARDS, R.; AGAMI, R. Stable suppression of tumorigenicity by virus-mediated RNA interference. **Cancer Cell**, v. 2, n. 3, p. 243-7, Sep 2002. ISSN 1535-6108. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12242156> >.

CAPLAN, A. I. Mesenchymal Stem Cells: Time to Change the Name! **Stem Cells Transl Med**, v. 6, n. 6, p. 1445-1451, Jun 2017. ISSN 2157-6564. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28452204> >.

CARUSO, R. et al. IL-21 is highly produced in Helicobacter pylori-infected gastric mucosa and promotes gelatinases synthesis. **J Immunol**, v. 178, n. 9, p. 5957-65, May 2007. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17442980> >.

_____. A functional role for interleukin-21 in promoting the synthesis of the T-cell chemoattractant, MIP-3alpha, by gut epithelial cells. **Gastroenterology**, v. 132, n. 1, p. 166-75, Jan 2007. ISSN 0016-5085. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17241869> >.

DE WINDT, T. S.; VONK, L. A.; SARIS, D. B. F. Response to: Mesenchymal Stem Cells: Time to Change the Name! **Stem Cells Transl Med**, v. 6, n. 8, p. 1747-1748, Aug 2017. ISSN 2157-6564. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28696033> >.

DOMINICI, M. et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v. 8, n. 4, p. 315-7, 2006. ISSN 1465-3249. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16923606> >.

EVANS, M. J.; KAUFMAN, M. H. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. **Nature**, v. 292, n. 5819, p. 154-6, Jul 1981. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7242681> >.

FITZSIMMONS, R. E. B. et al. Mesenchymal Stromal/Stem Cells in Regenerative Medicine and Tissue Engineering. **Stem Cells Int**, v. 2018, p. 8031718, 2018. ISSN 1687-966X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30210552> >.

FRESE, L.; DIJKMAN, P. E.; HOERSTRUP, S. P. Adipose Tissue-Derived Stem Cells in Regenerative Medicine. **Transfus Med Hemother**, v. 43, n. 4, p. 268-274, Jul 2016. ISSN 1660-3796. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27721702> >.

GIMBLE, J. M. Adipose tissue-derived therapeutics. **Expert Opin Biol Ther**, v. 3, n. 5, p. 705-13, Aug 2003. ISSN 1471-2598. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12880371> >.

HALDER, U. C. Bone marrow stem cells to destroy circulating HIV: a hypothetical therapeutic strategy. **J Biol Res (Thessalon)**, v. 25, p. 3, Dec 2018. ISSN 1790-045X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29445623> >.

HAMMING, O. J. et al. Crystal structure of interleukin-21 receptor (IL-21R) bound to IL-21 reveals that sugar chain interacting with WSXWS motif is integral part of IL-21R. **J Biol Chem**, v. 287, n. 12, p. 9454-60, Mar 2012. ISSN 1083-351X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22235133> >.

HEIDEKRUEGER, P. I. et al. Global aesthetic surgery statistics: a closer look. **J Plast Surg Hand Surg**, v. 51, n. 4, p. 270-274, Aug 2017. ISSN 2000-6764. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27844485> >.

ILLOUZ, Y. G. Body contouring by lipolysis: a 5-year experience with over 3000 cases. **Plast Reconstr Surg**, v. 72, n. 5, p. 591-7, Nov 1983. ISSN 0032-1052. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6622564> >.

JÜNGEL, A. et al. Expression of interleukin-21 receptor, but not interleukin-21, in synovial fibroblasts and synovial macrophages of patients with rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum**, v. 50, n. 5, p. 1468-76, May 2004. ISSN 0004-3591. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15146416> >.

LEFTEROVA, M. I.; LAZAR, M. A. New developments in adipogenesis. **Trends Endocrinol Metab**, v. 20, n. 3, p. 107-14, Apr 2009. ISSN 1043-2760. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19269847> >.

LUO, L. et al. Potential Roles of Dental Pulp Stem Cells in Neural Regeneration and Repair. **Stem Cells Int**, v. 2018, p. 1731289, 2018. ISSN 1687-966X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29853908> >.

MARTIN, G. R. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 78, n. 12, p. 7634-8, Dec 1981. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6950406> >.

OZAKI, K. et al. A critical role for IL-21 in regulating immunoglobulin production. **Science**, v. 298, n. 5598, p. 1630-4, Nov 2002. ISSN 1095-9203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12446913> >.

PADDISON, P. J. et al. Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells. **Genes Dev**, v. 16, n. 8, p. 948-58, Apr 2002. ISSN 0890-9369. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11959843> >.

PADDISON, P. J.; CAUDY, A. A.; HANNON, G. J. Stable suppression of gene expression by RNAi in mammalian cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 99, n. 3, p. 1443-8, Feb 2002. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11818553> >.

PADDISON, P. J.; HANNON, G. J. RNA interference: the new somatic cell genetics? **Cancer Cell**, v. 2, n. 1, p. 17-23, Jul 2002. ISSN 1535-6108. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12150821> >.

PARRISH-NOVAK, J. et al. Interleukin 21 and its receptor are involved in NK cell expansion and regulation of lymphocyte function. **Nature**, v. 408, n. 6808, p. 57-63, Nov 2000. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11081504> >.

BAKER, N.; TUAN, R. S. The less-often-traveled surface of stem cells: caveolin-1 and caveolae in stem cells, tissue repair and regeneration. **Stem Cell Res Ther**, v. 4, n. 4, p. 90, Jul 2013. ISSN 1757-6512. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23899671> >.

BASTIANI, M.; PARTON, R. G. Caveolae at a glance. **J Cell Sci**, v. 123, n. Pt 22, p. 3831-6, Nov 2010. ISSN 1477-9137. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21048159> >.

FERNÁNDEZ-REAL, J. M. et al. Study of caveolin-1 gene expression in whole adipose tissue and its subfractions and during differentiation of human adipocytes. **Nutr Metab (Lond)**, v. 7, p. 20, Mar 2010. ISSN 1743-7075. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20226013> >.

GUAN, X. et al. Caveolin-1 is essential in the differentiation of human adipose-derived stem cells into hepatocyte-like cells via an MAPK pathway-dependent mechanism. **Mol Med Rep**,

v. 13, n. 2, p. 1487-94, Feb 2016. ISSN 1791-3004. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26717806> >.

HAMMING, O. J. et al. Crystal structure of interleukin-21 receptor (IL-21R) bound to IL-21 reveals that sugar chain interacting with WSXWS motif is integral part of IL-21R. **J Biol Chem**, v. 287, n. 12, p. 9454-60, Mar 2012. ISSN 1083-351X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22235133> >.

KRAMER, A. H. et al. Dynamic Mitochondrial Localisation of STAT3 in the Cellular Adipogenesis Model 3T3-L1. **J Cell Biochem**, v. 116, n. 7, p. 1232-40, Jul 2015. ISSN 1097-4644. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25565605> >.

_____. Mitochondrial STAT3 and reactive oxygen species: A fulcrum of adipogenesis? **JAKSTAT**, v. 4, n. 2, p. e1084084, 2015. ISSN 2162-3988. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27127727> >.

LEE, J. H. et al. The fruits of *Gleditsia sinensis* Lam. inhibits adipogenesis through modulation of mitotic clonal expansion and STAT3 activation in 3T3-L1 cells. **J Ethnopharmacol**, v. 222, p. 61-70, Aug 2018. ISSN 1872-7573. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29689351> >.

MONIER, S. et al. VIP21-caveolin, a membrane protein constituent of the caveolar coat, oligomerizes in vivo and in vitro. **Mol Biol Cell**, v. 6, n. 7, p. 911-27, Jul 1995. ISSN 1059-1524. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7579702> >.

PEFFERS, M. J. et al. Age-related changes in mesenchymal stem cells identified using a multi-omics approach. **Eur Cell Mater**, v. 31, p. 136-59, Feb 2016. ISSN 1473-2262. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26853623> >.

REBELATTO, C. K. et al. Dissimilar differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, and adipose tissue. **Exp Biol Med (Maywood)**, v. 233, n. 7, p. 901-13, Jul 2008. ISSN 1535-3702. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18445775> >.

SINGER, S. J.; NICOLSON, G. L. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. **Science**, v. 175, n. 4023, p. 720-31, Feb 1972. ISSN 0036-8075. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4333397> >.

SPIRO, R. G. Protein glycosylation: nature, distribution, enzymatic formation, and disease implications of glycopeptide bonds. **Glycobiology**, v. 12, n. 4, p. 43R-56R, Apr 2002. ISSN 0959-6658. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12042244> >.

TOWBIN, H.; STAEHELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 76, n. 9, p. 4350-4, Sep 1979. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/388439> >.

VERKADE, P.; SIMONS, K. Robert Feulgen Lecture 1997. Lipid microdomains and membrane trafficking in mammalian cells. **Histochem Cell Biol**, v. 108, n. 3, p. 211-20, Sep 1997. ISSN 0948-6143. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9342615> >.

YUAN, Y. et al. STAT3 stimulates adipogenic stem cell proliferation and cooperates with HMGA2 during the early stage of differentiation to promote adipogenesis. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 482, n. 4, p. 1360-1366, Jan 2017. ISSN 1090-2104. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27940362> >.

ZHANG, K. et al. JAK2/STAT3 pathway is involved in the early stage of adipogenesis through regulating C/EBP β transcription. **J Cell Biochem**, v. 112, n. 2, p. 488-97, Feb 2011. ISSN 1097-4644. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21268070> >.

ZHANG, Y. et al. Mitochondrial respiration regulates adipogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. **PLoS One**, v. 8, n. 10, p. e77077, 2013. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24204740> >.

RODBELL, M. METABOLISM OF ISOLATED FAT CELLS. I. EFFECTS OF HORMONES ON GLUCOSE METABOLISM AND LIPOLYSIS. **J Biol Chem**, v. 239, p. 375-80, Feb 1964. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14169133> >.

SHIGUNOV, P. et al. Crosstalk between Hedgehog pathway and energy pathways in human adipose-derived stem cells: A deep sequencing analysis of polysome-associated RNA. **Sci Rep**, v. 8, n. 1, p. 8411, May 2018. ISSN 2045-2322. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29849100> >.

SPANGENBERG, L. et al. Polysome profiling shows extensive posttranscriptional regulation during human adipocyte stem cell differentiation into adipocytes. **Stem Cell Res**, v. 11, n. 2, p. 902-912, Jun 2013. ISSN 1876-7753. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23845413> >.

STERODIMAS, A. et al. Tissue engineering with adipose-derived stem cells (ADSCs): current and future applications. **J Plast Reconstr Aesthet Surg**, v. 63, n. 11, p. 1886-92, Nov 2010. ISSN 1878-0539. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19969517> >.

TANAKA, E. M. Regeneration: if they can do it, why can't we? **Cell**, v. 113, n. 5, p. 559-62, May 2003. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12787496> >.

TANAKA, E. M.; REDDIEN, P. W. The cellular basis for animal regeneration. **Dev Cell**, v. 21, n. 1, p. 172-85, Jul 2011. ISSN 1878-1551. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21763617> >.

TANG, Q.-Q.; LI, X.; HUANG, H.-Y. From pluripotent stem cell to adipocyte. **Cell Research**, v. 18, p. S96, 08/04/online 2008. Disponível em: < <https://doi.org/10.1038/cr.2008.186> >.

THOMSON, J. A. et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. **Science**, v. 282, n. 5391, p. 1145-7, Nov 1998. ISSN 0036-8075. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9804556> >.

ULLAH, I.; SUBBARAO, R. B.; RHO, G. J. Human mesenchymal stem cells - current trends and future prospective. **Biosci Rep**, v. 35, n. 2, Apr 2015. ISSN 1573-4935. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25797907> >.

VACANTI, J. P. Tissue engineering and regenerative medicine. **Proc Am Philos Soc**, v. 151, n. 4, p. 395-402, Dec 2007. ISSN 0003-049X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18831155> >.

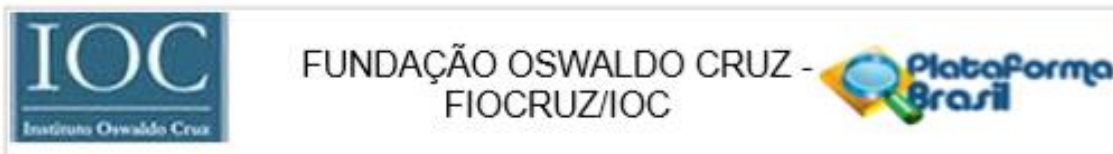
WAGERS, A. J.; WEISSMAN, I. L. Plasticity of adult stem cells. **Cell**, v. 116, n. 5, p. 639-48, Mar 2004. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15006347> >.

WELLS, J. M.; MELTON, D. A. Vertebrate endoderm development. **Annu Rev Cell Dev Biol**, v. 15, p. 393-410, 1999. ISSN 1081-0706. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10611967> >.

XU, D. et al. JAK-STAT in lipid metabolism of adipocytes. **JAKSTAT**, v. 2, n. 4, p. e27203, Oct 2013. ISSN 2162-3988. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24498541> >.

8. ANEXOS

Anexo 1



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: CARACTERIZAÇÃO CELULAR E MOLECULAR DO POTENCIAL DE DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO

Pesquisador: Bruno Dallagiovanna Muniz

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP.);

Versão: 5

CAAE: 48374715.8.0000.5248

Instituição Proponente: FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

Patrocinador Principal: Fundação Oswaldo Cruz

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.987.735

Apresentação do Projeto:

Trata-se de uma Emenda referente ao projeto projeto 419/07, já aprovado pelo CEP Fiocruz/IOC.

As células-tronco estão presentes em diversos tecidos, são autorrenováveis e possuem potencial em diferenciar em diversos tipos celulares específico, além de possuir papel imunorregulatório. O presente projeto pretende analisar os mecanismos celulares e moleculares envolvidos com o processo de diferenciação, ativação e autorrenovação de células-tronco com fins de estudar sua biologia básica e também avaliar possíveis implicações em terapias futuras.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Estudar os mecanismos celulares e moleculares da resposta das células-tronco de diferentes origens quanto a diferentes abordagens experimentais visando seu potencial de diferenciação para terapias celulares.

Objetivos Secundários:

Subprojeto 1: Isolamento e caracterização de células-tronco adultas / progenitores de diferentes fonte e seus derivados (microvesículas, DNA, RNA, proteína etc.) e tecido de origem.

Subprojeto 2: Potencial de diferenciação de células-tronco em diversas linhagens celulares

Endereço: Av. Brasil 4036, Sala 705 (Campus Expansão)
Bairro: Manguinhos **CEP:** 21.040-360
UF: RJ **Município:** RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)3882-9011 **Fax:** (21)2561-4815 **E-mail:** cepfiocruz@ioc.fiocruz.br



Continuação do Parecer: 2.987.735

utilizando método de cultivo, meio condicionado, extrato de tecidos, potenciais indutores e entre outros.

Subprojeto 3: Mecanismos pós-transcricionais da regulação da autorrenovação e diferenciação de células tronco adultas de diferentes fontes e linhagens pluripotentes.

Subprojeto 4: Estudos metabólicos em células-tronco adultas de diferentes fontes e linhagens pluripotentes.

Subprojeto 5: Análise epigenética e de expressão gênica de células-tronco adultas de diferentes fontes durante a proliferação, diferenciação e outras condições.

Subprojeto 6: Construção de ferramentas para acompanhamento do processo de proliferação e diferenciação celular (Plasmídeos, vetores lentivirais e entre outros).

Subprojeto 7: Estudo da interação de patógenos com células-tronco e/ou subprodutos celulares de diferentes fontes.

Subprojeto 8: Transplante de células-tronco adultas /progenitores humanas e seus derivados em modelo animal em ensaios pré-clínicos.

Subprojeto 9: Caracterização e diferenciação de linhagem de células-tronco pluripotentes.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Os protocolos de obtenção e processamento das amostras biológicas são estabelecidos e padronizados e já utilizados. O pesquisador descreve os riscos referentes à cada material que será coletado.

Benefícios:

Não existe benefício direto e imediato ao sujeito da pesquisa com a realização deste projeto. Contudo espera-se como principal benefício deste projeto o desenvolvimento científico e tecnológico do país.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O presente projeto é continuidade do projeto 419/07, previamente submetido e aprovado pelo CEP/FIOCRUZ, incluindo seus adendos e relatórios.

Seguindo a orientação do CEP/FIOCRUZ, CAAE No. 42803015.4.0000.5248 no parecer no 1.036.167 de 14/04/2015, de submetermos este projeto na plataforma Brasil, como um projeto novo. Buscamos atender ao que foi colocado no referido parecer, além disso, o projeto foi atualizado, mas a sua essência continua a mesma, descrita a seguir.

O presente projeto tem como objetivo geral a pesquisa básica dos mecanismos celulares e

Endereço: Av. Brasil 4036, Sala 705 (Campus Expansão)
Bairro: Manguinhos **CEP:** 21.040-360
UF: RJ **Município:** RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)3882-9011 **Fax:** (21)2561-4815 **E-mail:** cepfiocruz@ioc.fiocruz.br



Continuação do Parecer: 2.987.735

moleculares das células-tronco de diferentes origens visando seu potencial de proliferação e diferenciação. Tecidos, células e derivados (DNA, RNA, proteína, etc) provenientes de um mesmo doador podem ser utilizados em diversas abordagens experimentais para melhor entender esses processos celulares. Desta forma, se reduz o número de doadores e se maximiza a obtenção de conhecimento. O melhor entendimento dos mecanismos que controlam a proliferação e diferenciação celular possibilita novas perspectivas para terapias regenerativas.

O entendimento dos mecanismos celulares e moleculares das células-tronco de diferentes origens quanto a diferentes abordagens experimentais irá permitir a potencialização da diferenciação para terapias celulares. Projeto relevante para a saúde pública, na busca de procedimentos eficientes para a terapia celular, por meio do estudo comparativo das células-tronco de diferentes fontes, o que contribuirá para uma melhor compreensão da potencialidade destes tipos celulares, além de fornecer dados importantes sobre sua utilização em terapias futuras.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foi apresentado e avaliado o seguinte documento: PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_693358_E1

Recomendações:

A Emenda em tela deverá ser desenvolvida na forma em que foi aprovada pelo CEP Fiocruz/IOC.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Todas as solicitações do CEP foram atendidas, incluindo a última pendência referente à, tradução para o português da carta do termo de doação do Instituto de Pesquisa Murdoch Children.

Considerações Finais a critério do CEP:

Diante do exposto, em sua 243ª Reunião Ordinária, o Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Oswaldo Cruz (CEP FIOCRUZ/IOC), de acordo com as atribuições definidas na Res. CNS 466/12, o Colegiado manifestou-se por Aprovar a Emenda ao projeto de Pesquisa 419/07.

Cabe ressaltar que a responsabilidade do pesquisador é indelegável e indeclinável e compreende os aspectos éticos e legais.

Apresentar relatório final do projeto de pesquisa é responsabilidade indelegável do pesquisador principal.

Manter os dados da pesquisa em arquivo, físico ou digital, sob sua guarda e responsabilidade, por

Endereço: Av. Brasil 4036, Sala 705 (Campus Expansão)
Bairro: Manguinhos **CEP:** 21.040-360
UF: RJ **Município:** RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)3882-9011 **Fax:** (21)2561-4815 **E-mail:** cepfiocruz@ioc.fiocruz.br

Continuação do Parecer: 2.987.735

um

período de cinco anos após o término da pesquisa.

Encaminhar os resultados da pesquisa para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico integrante do projeto.

Justificar fundamentadamente, perante o CEP ou a CONEP, interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados. (Res CNS 466/12, item XI).

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_693358 E1.pdf	14/09/2018 16:43:26		Aceito
Outros	Termo_de_doacao_traduzido.pdf	26/09/2017 16:56:58	PATRICIA SHIGUNOV	Aceito
Outros	Termo_de_doacao_original.pdf	26/09/2017 16:56:33	PATRICIA SHIGUNOV	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto.pdf	26/09/2017 16:46:11	PATRICIA SHIGUNOV	Aceito
Outros	Carta_para_CEP_dez2016.pdf	09/12/2016 14:19:02	PATRICIA SHIGUNOV	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Termo_de_confidencialidade_ICC_3.pdf	06/12/2016 08:28:01	PATRICIA SHIGUNOV	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Termo_confidencialidade_SantaCasa.pdf	05/12/2016 11:14:10	PATRICIA SHIGUNOV	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Declaracao_de_co_participacao_SANTA_CASA.pdf	05/12/2016 11:12:06	PATRICIA SHIGUNOV	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO_DETALHADO_2016_V4.pdf	05/12/2016 11:06:39	PATRICIA SHIGUNOV	Aceito
Outros	Ficha_de_cadastro.pdf	01/09/2015 10:09:09	Bruno Dallagiovanna Muniz	Aceito
Outros	Carta_CEP_2015.pdf	01/09/2015 10:06:15	Bruno Dallagiovanna Muniz	Aceito
Outros	Termo de confidencialidade_PUC.pdf	10/08/2015 11:04:36		Aceito

Endereço: Av. Brasil 4036, Sala 705 (Campus Expansão)

Bairro: Manguinhos

CEP: 21.040-360

UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)3882-9011

Fax: (21)2561-4815

E-mail: cepflocruz@ioc.fiocruz.br

Continuação do Parecer: 2.987.735

Outros	Termo de confidencialidade_ICC_2.pdf	10/08/2015 11:04:26		Aceito
Outros	Termo de confidencialidade_ICC_1.pdf	10/08/2015 11:04:18		Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Declaração de co-participação_PUC.pdf	10/08/2015 11:03:41		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_sangue_menstrual_v1.pdf	10/08/2015 11:03:06		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_medula_v1.pdf	10/08/2015 11:02:55		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_lipoaspiração_2015_v1.pdf	10/08/2015 11:02:46		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_leite_2015_v1.pdf	10/08/2015 11:02:36		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_dente_v1.pdf	10/08/2015 11:02:26		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_cordao_umbilical_2015_v1.pdf	10/08/2015 11:02:12		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_bariátrica_2015_v1.pdf	10/08/2015 11:01:59		Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Av. Brasil 4036, Sala 705 (Campus Expansão)

Bairro: Manguinhos

CEP: 21.040-360

UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)3882-9011

Fax: (21)2561-4815

E-mail: cepflocruz@ioc.fiocruz.br



FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ -
FIOCRUZ/IOC



Continuação do Parecer: 2.987.735

RIO DE JANEIRO, 29 de Outubro de 2018

Assinado por:

**Maria Regina Reis Amendoeira
(Coordenador(a))**

Endereço: Av. Brasil 4036, Sala 705 (Campus Expansão)

Bairro: Manguinhos

CEP: 21.040-360

UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)3882-9011

Fax: (21)2561-4815

E-mail: cepflocruz@ioc.fiocruz.br