



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ

ESCOLA DE MEDICINA
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

TAMARA BORGONOVO

AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE GENÔMICA DE CÉLULAS-TRONCO CULTIVADAS

**Curitiba
2016**

TAMARA BORGONOVO

**AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE GENÔMICA DE
CÉLULAS-TRONCO CULTIVADAS**

Tese de doutorado apresentada
ao Curso de Pós-Graduação em
Ciências da Saúde da Pontifícia
Universidade Católica do Paraná
como requisito para a obtenção do
título de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Paulo
Roberto Slud Brofman

Co-orientadores: Prof. Dr. Iglenir
João Cavalli e Prof^a. Dr^a. Enilze
Maria de Souza Fonseca Ribeiro

**Curitiba
2016**

Dados da Catalogação na Publicação
Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Sistema Integrado de Bibliotecas – SIBI/PUCPR
Biblioteca Central

B734a
2016 Borgonovo, Tamara
Avaliação da integridade genômica de células-tronco cultivadas / Tamara Borgonovo ; orientador: Paulo Roberto Slud Brofman ; co-orientadores: Iglénir João Cavalli e Enilze Maria de Souza Fonseca Ribeiro. – 2016.
149 f. : il. ; 30 cm

Tese (doutorado) – Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, 2016
Bibliografia: f. 111-120

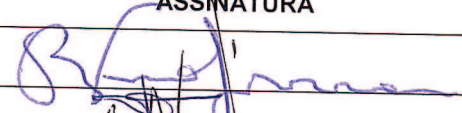
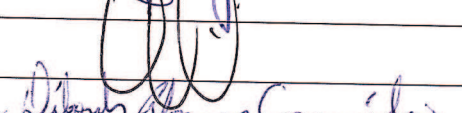
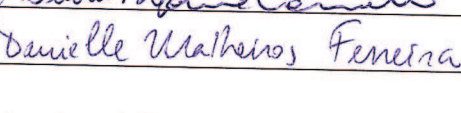
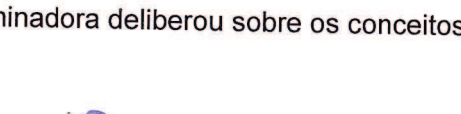
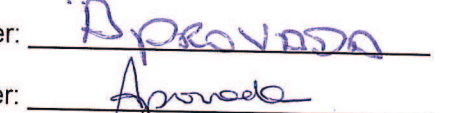
1. Citogenética. 2. Células-tronco – Pesquisa. 3. Células mesenquimais estromais. 4. Bandeamento cromossômico. I. Brofman, Paulo Roberto Slud. II. Cavalli, Iglénir João. III. Ribeiro, Enilze Maria de Souza Fonseca. IV. Pontifícia Universidade Católica do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. V. Título.

CDD 22. ed. – 572.8

ATA DA SESSÃO PÚBLICA DE EXAME DE TESE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE EM NÍVEL DE DOUTORADO DA PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ

Aos quinze dias do mês de abril de 2016 às 08hs e 00min, realizou-se a sessão pública de defesa de tese sob o título provisório: **“AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE GENÔMICA DE CÉLULAS-TRONCO CULTIVADAS”**, apresentado por **TAMARA BORGONOVO** para obtenção do título de doutor; Área de Concentração: Medicina e áreas afins.

A Banca Examinadora foi composta pelos seguintes membros:

MEMBROS DA BANCA	ASSINATURA
Prof. Dr. Paulo Roberto Slud Brofman (PUCPR) - Presidente	
Profa. Dra. Paula Cristina Trevillato (PUCPR)	
Prof. Dr. Cleber Machado de Souza (PUCPR)	
Profa. Dra. Profa. Déborah Afonso Cornélio (CSU)	
Profa. Dra. Danielle Malheiros (UFPR)	

De acordo com as normas regimentais a Banca Examinadora deliberou sobre os conceitos a serem distribuídos e que foram os seguintes:

Prof. Dr. Paulo Roberto Slud Brofman (PUCPR) Parecer: Aprovada

Profa. Dra. Paula Cristina Trevillato (PUCPR) Parecer: Aprovada

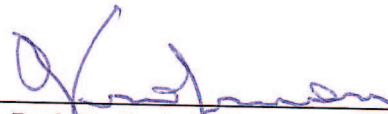
Prof. Dr. Cleber Machado de Souza (PUCPR) Parecer: Aprovada

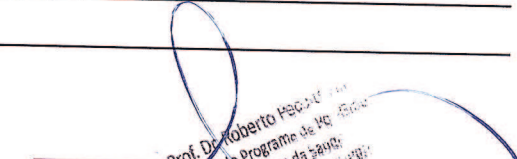
Profa. Dra. Profa. Déborah Afonso Cornélio (CSU) Parecer: Aprovada

Profa. Dra. Danielle Malheiros (UFPR) Parecer: APROVADO

Parecer Final: Aprovada

Observações da Banca Examinadora:


Prof. Dr. Paulo Roberto Slud Brofman
Presidente da Banca Examinadora
Banca


Prof. Dr. Roberto Flávio Silva Pecoits-Filho
Coordenador do PPGCS PUCPR

AGRADECIMENTOS

Agradeço o incentivo e apoio que recebi de todos os que me cercam: a família, colegas de trabalho, orientadores, professores, alunos, estagiários e funcionários do Núcleo de Tecnologia Celular e da Pós Graduação em Ciências da Saúde. Em especial a cada pessoa que, além disso, foi meu (minha) amigo (amiga): eu senti seu apoio todos os dias, ao longo destes anos, e esta amizade foi a força que precisava para vencer cada um dos obstáculos....

Agradeço também aos pacientes, e seus familiares, que depositaram suas esperanças nas novas formas promissoras de tratamento e confiaram na seriedade do nosso trabalho.

RESUMO

A utilização de células estromais mesenquimais humanas (MSC, do inglês *Mesenchymal Stromal Cell*) é uma estratégia promissora para a medicina regenerativa com terapia celular. Porém, a expansão *ex vivo* destas células pode levar a um acúmulo de alterações genéticas e epigenéticas, caracterizando uma instabilidade genética, que pode explicar, pelo menos em parte, seu potencial tumorigênico. Portanto, a integridade genômica das células-tronco deve ser cuidadosamente monitorada tanto para uso na pesquisa básica como para uso terapêutico, incluindo a análise cariotípica para confirmar a ausência da instabilidade genética. Diferentemente das células-tronco embrionárias humanas, onde há vários relatos de surgimento de anormalidade genética e formação de tumores em ratos, as células-tronco adultas humanas, especialmente as MSCs, têm demonstrado manter a estabilidade genômica durante o cultivo celular. Esta tese objetiva padronizar e implantar testes citogenéticos no Núcleo de Tecnologia Celular da PUCPR, para as células-tronco cultivadas de diversas origens, como parte de um programa de controle de qualidade, dando suporte aos projetos ali desenvolvidos que almejam o uso terapêutico destas células em humanos. Neste trabalho, a integridade genômica de 158 amostras de MSCs de 47 pacientes, além de cinco amostras de células-tronco pluripotentes induzidas (iPS, do inglês *induced Pluripotent Stem cells*), foi avaliada utilizando três técnicas: cariotipagem com bandeamento GTG, hibridização *in situ* com fluorescência (FISH) e teste de instabilidade cromossômica com Diepoxibutano (DEB). Foram comparadas MSCs de diferentes origens: medula óssea, tecido adiposo e origem dental e também comparadas em relação à duração do cultivo: fases iniciais, intermediárias e tardias. Metáfases foram obtidas com sucesso em todos os casos. Foram observadas falhas e quebras, cromossômicas e cromatídicas, e tetraploidia, o que pode representar uma etapa intermediária para tumorigênese. Mais do que isso, detectamos o surgimento de aberrações cromossômicas clonais nas fases iniciais de cultivo, em um dos 47 pacientes, e, nas fases tardias de cultivo, em um dos 13 pacientes cujas amostras foram avaliadas até este período. Os resultados confirmam a importância da análise cromossômica com bandeamento G, uma vez que esta técnica é capaz de detectar aberrações numéricas e estruturais, incluindo rearranjos balanceados e mosaicismo, além de evidenciar sinais de instabilidade cromossômica. Em relação às diversas origens, houve evidências de que as MSC de tecido adiposo podem ser mais propensas à instabilidade genética. As iPS podem manter o cariótipo normal após reprogramação genética, dependendo do protocolo utilizado. Concluímos que as MSCs mantêm a estabilidade genética após cultivo durante as passagens iniciais, demonstrado por meio da manutenção do cariótipo normal em 97,87% dos casos. Porém, alguns casos podem apresentar aberrações cromossômicas clonais e estas amostras não devem ser usadas em protocolos clínicos, pois não se pode descartar seu potencial tumorigênico.

Palavras-chave: Células Estromais Mesenquimais, Citogenética, Bandejamento GTG, Potencial Tumorigênico.

ABSTRACT

The use of human mesenchymal stromal cells (MSCs) is a promising strategy for cell therapy in injured tissues recovery. However, *ex vivo* expansion of these cells can lead to an accumulation of genetic and epigenetic alterations, featuring a genetic instability that may explain, at least in part, their tumorigenic potential. Therefore, the genomic integrity of stem cells (SC) should be monitored carefully for uses in basic research and clinical trials, including karyotype analysis to confirm the absence of genetic instability. Differently from embryonic SC, where there have been several reports of genetic abnormalities and tumor formation in rats, human adult SC, especially MSCs, seem to maintain their genomic stability during cultivation. This thesis focuses on the padronization and implantation of cytogenetic tests in the Núcleo de Tecnologia Celular of PUCPR, for cultivated SC from multiple sources, as part of a quality control program, supporting their projects that aim for the therapeutic use of these cells in humans. In this work, the genomic integrity of 158 MSCs samples of 47 patients, other than five samples of induced Pluripotent Stem cells (iPS), was evaluated using three techniques: GTG banding karyotyping, fluorescence *in situ* hybridization (FISH) and chromosomal instability test with Diepoxybutane (DEB). MSCs from different sources were compared: bone marrow, dental and adipose tissue. They were also compared in relation to the cultivation time: early, intermediate and late stages. Metaphases were successfully obtained in all the cases. Chromosomic and chromatid gaps, breaks and tetraploidy were observed, which could indicate an intermediate step for tumorigenesis. Moreover, we detected the emergence of clonal chromosome aberrations at early stages in one of the 47 patients evaluated. At late stages, one of the 13 patients whose samples were evaluated until this period showed clonal chromosome aberrations. The results confirm the importance of G-banding chromosomic analysis, once this technique is able to detect both numeric and structural alteration, including balanced rearrangements and mosaicism, evidencing chromosomal instability signs. Regarding the many origins, there was evidence that the adipose tissue derived MSC can be more prone to genetic instability. The iPS can maintain a normal karyotype after genetic reprogramming, depending on the protocol in use. MSCs maintain genetic stability after cultivation until the early passages, which can be demonstrated through the maintenance of normal karyotypes in 97.87% of the cases. However, some cases may have clonal chromosomal aberrations and these samples should not be used in clinical protocols, because we cannot rule out its tumorigenic potential.

Keywords: Mesenchymal Stromal Cell, Cytogenetics, G-banding karyotyping, Tumorigenic Potential.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

' - minutos
" - segundos
% - porcentagem
 χ^2 – qui-quadrado
 μg - micrograma
 μL - microlitro
ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BPF – Boas Práticas de Fabricação
CD – grupos de diferenciação celular (do inglês *Cluster of differentiation*)
CEP – Comitê de Ética em Pesquisa
CGH – hibridização genômica comparativa (do inglês *Comparative Genome Hybridization*)
Chrb – quebra cromossômica (do inglês *chromosome break*)
Chrg – falha cromossômica (do inglês *chromosome gap*)
Chtb – quebra cromatídica (do inglês *chromatide break*)
Chtg – falha cromatídica (do inglês *chromatide gap*)
 CO_2 - dióxido de carbono
CTC – Centro de Tecnologia Celular
CONEP – Comitê Nacional de Ética em Pesquisa
DAPI - dihidrocloreto de 4',6-diamidino-2-fenilindole
DEB – 1,2,3,4-diepoxibutano
DMEM-F12 – meio Eagle modificado por Dulbecco
DNA - ácido desoxirribonucléico
EDTA - ácido etilenodiaminotetracético (do inglês *ethylenediaminetetraacetic acid*)
FISH - hibridização *in situ* com fluorescência (do inglês *Fluorescence in situ hybridization*)
FITC - *fluorescein isothiocyanate*
g - unidade de gravidade
GTG – bandeamento G com Tripsina e Giemsa
GTW – bandeamento G com Tripsina e Wright
h - horas
HLA – antígeno leucocitário humano (do inglês *Human Leucocyte Antigen*)
IL- interleucina
IMDM – meio Dulbecco modificado por Iscove
IP – sigla para amostras de células-tronco pluripotentes induzidas
iPS – células-tronco pluripotentes induzidas (do inglês *induced pluripotent stem cells*)
ISCN – *International System for Human Cytogenetic Nomenclature*
Kb – kilobase
KCl – cloreto de potássio
M – molar
ME – sigla para amostras de células-tronco mesenquimais
M-FISH – FISH multicolor
mg - miligrama
min - minutos
mL – mililitro
MO – medula óssea

MSC – células-tronco mesenquimais (do inglês *Mesenchymal Stem Cell*)
NA – não avaliado
NaCl – cloreto de sódio
NTC – Núcleo de Tecnologia Celular
P - passagem
PBS - solução tampão fosfatada
p – braço curto do cromossomo
q – braço longo do cromossomo
RB1- retinoblastoma 1 (gene)
RDC – Resolução da Diretoria Colegiada
RNA – ácido ribonucleico
SBF - soro bovino fetal
SKY – cariotipagem espectral (do inglês *Spectral Karyotyping*)
SSC – solução salina citratada
STEMCCA – *stem cell cassette*
T – tempo de cultivo
TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TCUD – Termo de Consentimento de Utilização de Dados
TP53 – tumor protein 53 (gene)
TRITC - *tetramethyl rhodamin isothiocyanate*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
1.1 Terapia celular com células-tronco.....	15
1.2 Potencial tumorigênico das células-tronco.....	18
1.3 Estudos citogenéticos e a escolhas das técnicas.....	20
1.4 Justificativa.....	28
1.5 Objetivos.....	29
2. MATERIAL.....	30
2.1 Células-tronco mesenquimais.....	31
2.2 Células-tronco pluripotentes induzidas	37
3. MÉTODOS.....	38
3.1 Isolamento e Cultivo.....	39
3.1.1 Células-tronco mesenquimais derivadas de medula óssea.....	39
3.1.2 Células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo.....	40
3.1.3 Células-tronco mesenquimais de origem dental.....	40
3.1.4 Células-tronco pluripotentes induzidas.....	41
3.2 Análise citogenética.....	41
3.2.1 Cariotipagem com bandeamento GTG.....	41
3.2.1.1 Padronização do protocolo.....	41
3.2.1.2 Protocolo padronizado.....	44
3.2.2 Hibridização <i>in situ</i> com fluorescência (FISH).....	46
3.2.2.1 Padronização do protocolo e validação das sondas.....	46
3.2.2.2 Protocolo padronizado.....	53
3.2.3 Teste de Instabilidade Cromossômica com Diepoxibutano (DEB)....	54
3.2.3.1 Padronização do protocolo.....	54
3.2.3.2 Protocolo padronizado.....	55
3.3 Subdivisão do cultivo em longo prazo.....	58
3.4 Análise Estatística.....	58

4. RESULTADOS.....	59
4.1 Cariotipagem com bandeamento GTG.....	61
4.1.1 Células-tronco mesenquimais nas passagens iniciais.....	63
4.1.2 O caso 34.....	70
4.1.3 Células-tronco mesenquimais nas passagens intermediárias e tardias.....	74
4.1.4 O caso 42.....	77
4.1.5 Células-tronco Pluripotentes Induzidas (iPS).....	78
4.2 Hibridização <i>in situ</i> com fluorescência (FISH).....	82
4.2.1 Teste de FISH para gene <i>TP53</i>	82
4.2.2 Teste de FISH para gene <i>RB1</i>	85
4.3 Teste de Instabilidade Cromossômica com Diepoxibutano (DEB).....	89
4.4 Comparação das três técnicas citogenéticas.....	93
5. DISCUSSÃO.....	94
5.1 A importância da padronização para estudos com células-tronco.....	94
5.2 Instabilidade cromossômica e potencial tumorigênico.....	95
5.2.1 Comparação entre antes e após cultivo em longo prazo.....	96
5.2.2 Comparação durante o cultivo em longo prazo prolongado.....	102
5.3 Comparação das diferentes fontes de células.....	104
5.3.1 Células-tronco mesenquimais derivadas de medula óssea, tecido adiposo e origem dental.....	104
5.3.2 Células-tronco mesenquimais e células pluripotentes induzidas.....	104
5.4 Comparação da sensibilidade das técnicas.....	105
6. CONCLUSÕES.....	109
7. REFERÊNCIAS.....	111
8. ANEXOS.....	121
9. ARTIGOS PUBLICADOS.....	149

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Tipos de células-tronco.....	16
Figura 2: Momentos de coleta de amostras para realização de análise citogenética.....	38
Figura 3: ME005. Metáfase mostrando sobreposição de cromossomos.....	43
Figura 4: ME121 P6. Cariograma normal: 46,XY.....	44
Figura 5: Localização do gene <i>TP53</i> - sonda LPH 017.....	47
Figura 6: Localização do gene <i>RB1</i> - sonda LPS 011.....	48
Figura 7: Núcleo interfásico. Sonda <i>TP53</i>	48
Figura 8: Metáfase. Sonda <i>TP53</i>	48
Figura 9: Metáfase. Sonda <i>RB1</i>	49
Figura 10: Núcleo interfásico. Sonda <i>RB1</i>	49
Figura 11: Exemplos de variantes cromossômicas.....	56
Figura 12: Caso 21. Amostra MO011. Medula óssea.....	62
Figura 13: Caso 41. Amostra ME121. MSCs em P6.....	62
Figura 14: Caso 35. Amostra ME112. Chtb no cromossomo 4.....	65
Figura 15: Caso 44. Amostra ME143. Chtg observadas na metáfase	66
Figura 16: Caso 44. Amostra ME143. Chtg nos cromossomo 4 e 9.....	66
Figura 17: Caso 23. Amostra ME057. Chtb no cromossomo 9.....	67
Figura 18: Caso 35. Amostra ME106. Célula tetraplóide.....	67
Figura 19: Caso 34. Amostra MO030. Cariograma representativo.....	71
Figura 20: Caso 34. Amostra ME147. Cariograma representativo.....	71
Figura 21: Primeiro cultivo.....	72
Figura 22: Segundo cultivo.....	72
Figura 23: Caso 34. Amostra ME161. Cariograma - metáfase 1.....	73
Figura 24: Caso 34. Amostra ME161. Cariograma - metáfase 13.....	73
Figura 25: Caso 42. Amostra ME154. Cariograma - metáfase 5.....	77
Figura 26: Protocolo para geração de iPS.....	78
Figura 27: Expressão de moléculas relacionadas à pluripotência por RT-PCR... ..	78
Figura 28: Avaliação por citometria de fluxo.....	79
Figura 29: Expressão de marcadores de pluripotência por imunofluorescência..	79
Figura 30: Cariograma representativo de IP003.....	80
Figura 31: IP006. Cariograma.....	81
Figura 32: IP006. Metáfase com quebra cromatídica.....	81

Figura 33: Caso 4. Amostra ME004. Sonda <i>TP53</i> . Resultado 2G2R.....	82
Figura 34: Caso 40. Amostra ME109. Sonda <i>TP53</i> . Resultado 2G2R.....	84
Figura 35: Caso 40. Amostra ME109. Sonda <i>TP53</i> . Resultado 2G1R.....	84
Figura 36: Caso 44. Amostra ME143. Sonda <i>RB1</i>	85
Figura 37: Caso 4. Amostra ME004. Sonda <i>TP53</i>	87
Figura 38: Caso 42. Amostra ME146. Sonda <i>TP53</i>	87
Figura 39: Caso 40. Amostra ME109. Sonda <i>TP53</i> . Núcleo interfásico.....	88
Figura 40: Caso 44. Amostra ME143. Sonda <i>RB1</i> . Núcleos interfásicos.....	88
Figura 41: Caso 27. Metáfase apresentando um cromossomo em anel.....	90
Figura 42: Caso 25. Metáfase apresentando uma quebra cromatídica.....	90
Figura 43: Caso 25. Cariograma apresentando um fragmento acêntrico.....	91
Figura 44: Caso 26. Metáfase com quebra e falha.....	91

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Número de metáfases por paciente e diluição de DEB.....	55
Gráfico 2: Comparação entre os índices dos pacientes e controles.....	92

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Comparação para avaliação da Integridade Genômica.....	25
Quadro 2: Valores das alterações para cálculo do índice.....	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Caracterização dos pacientes.....	35
Tabela 2: Tempos e concentrações testados para a colheita das amostras..	42
Tabela 3: Tempos e concentrações testados para bandeamento GTG.....	43
Tabela 4: Número de metáfases analisadas para sonda <i>TP53</i>	49
Tabela 5: Número de metáfases analisadas para sonda <i>RB1</i>	50
Tabela 6: Sensibilidade e Especificidade das sondas <i>TP53</i> e <i>RB1</i>	49
Tabela 7: Resultados obtidos com a sonda <i>TP53</i>	51
Tabela 8: Resultados obtidos com a sonda <i>RB1</i>	52
Tabela 9: Amostras analisadas de cada paciente.....	60
Tabela 10: Cariótipos das amostras analisadas.....	64
Tabela 11: Frequências de quebras, falhas e células tetraploides.....	68
Tabela 12: Análise estatística de quebras, falhas e tetraploides.....	69
Tabela 13: Número de metáfases no cultivo a longo prazo: T1, T2 e T3.....	74
Tabela 14: Frequência de quebras: T1, T2 e T3.....	75
Tabela 15: Frequência de falhas: T1, T2 e T3.....	75
Tabela 16: Frequência de células tetraploides (4n): T1, T2 e T3.....	76
Tabela 17: Frequências de sinais por metáfase.....	76
Tabela 18: Teste FISH resultados 2G2R, para sonda <i>TP53</i>	83
Tabela 19: Teste FISH resultados 2G1R, para sonda <i>TP53</i>	83
Tabela 20: Teste FISH resultados 2G2R, para sonda <i>RB1</i>	85
Tabela 21: Teste FISH resultados 2G1R, para sonda <i>RB1</i>	86
Tabela 22: Teste FISH resultados 2G1R, para sonda <i>TP53</i> e <i>RB1</i>	86
Tabela 23: Número de metáfases e índices obtidos com o teste do DEB.....	89
Tabela 24: Comparação de resultados das três técnicas utilizadas.....	93

1 INTRODUÇÃO

1.1 TERAPIA CELULAR COM CÉLULAS-TRONCO

Células-tronco têm mostrado um grande potencial para uso em diversas áreas da terapia celular, por possuírem capacidade única de autorrenovação e diferenciação multipotencial, podendo dar origem a vários tipos celulares. Isto nos estimula a imaginar a possibilidade de utilizar as células-tronco para gerar tecidos que possam recuperar a qualidade funcional de um músculo, osso, pele, cartilagem, entre outros, e melhorar a qualidade de vida de pacientes com diversos tipos de doenças, principalmente as degenerativas (SHARMA *et al.*, 2014).

O transplante com estas células tem sido considerado um grande avanço, não somente na medicina regenerativa e terapia celular, mas também na biologia básica, contribuindo para um melhor conhecimento sobre o comportamento das células, como se diferenciam e como dão origem a tecidos e estruturas complexas.

Segundo Martino *et al.* (2012) (fig 1), as células-tronco podem ser divididas basicamente em:

- a) Células-tronco embrionárias: células derivadas da camada interna do blastocisto, pluripotentes e que podem se diferenciar em qualquer tipo celular;
- b) Células-tronco pluripotentes induzidas: células geradas *in vitro*, a partir de células somáticas diferenciadas, com superexpressão de alguns genes, gerando células pluripotentes, com propriedades semelhantes às células-tronco embrionárias;
- c) Células-tronco adultas: são geradas durante a ontogenia (por exemplo: células-tronco mesenquimais de medula óssea), tem um potencial de diferenciação mais restrito e permanecem na maioria dos tecidos animais adultos.

Figura 1: Tipos de células-tronco

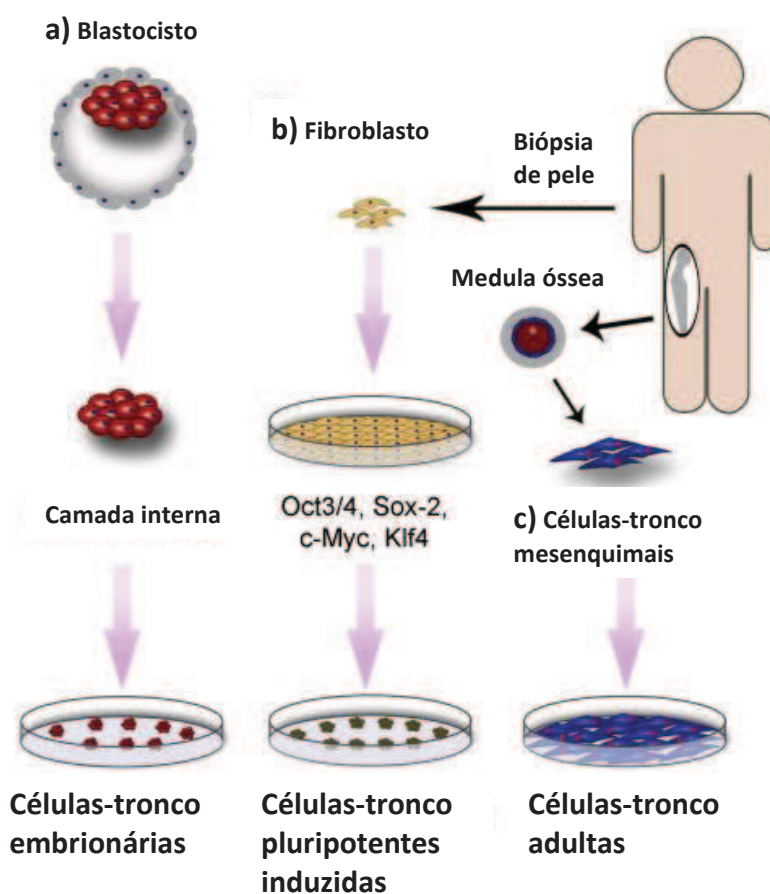


Figura 1: As vias a), b) e c) mostram como são originados os três tipos de células-tronco. a) células-tronco embrionárias derivadas de blastocisto; b) células-tronco pluripotentes induzidas derivadas de fibroblastos adultos, com superexpressão dos genes OCT3/4, SOX2, cMYC, KLF4; c) células-tronco adultas derivadas de medula óssea, por exemplo: células-tronco mesenquimais.

Fonte: Martino, 2012, http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S07349750_11000917

Para uso terapêutico humano, a maioria dos projetos clínicos tem usado um tipo específico de células-tronco adultas: as células-tronco mesenquimais (MSC, do inglês *Mesenchymal Stem Cell*) ou células estromais mesenquimais (HORWITZ *et al.*, 2005 e SALEM; THIEMERMANN, 2010) que apresentam várias vantagens para sua utilização, incluindo considerações éticas quando comparadas ao uso de células-tronco embrionárias. A nomenclatura destas células passou por adaptações ao constatar-se que elas estão localizadas no

nicho vascular de grandes e médios vasos sanguíneos, em todos os órgãos e tecidos do corpo, sugerindo que elas possam ser as células conhecidas como pericitos. Elas também são atraídas para o sítio de inflamação ou tecidos lesados e secretam altos níveis de agentes tróficos e imunomodulatórios, o que poderia indicar que a capacidade terapêutica pode não estar associada com a habilidade de diferenciação em diversos tipos celulares, e sim a uma ação parácrina. Desta forma, o termo *stem* não seria o mais apropriado para descrever estas células. Há também evidências de que as MSCs são altamente heterogêneas e as várias subpopulações tem potencial de diferenciação variável. Por isto, o termo “*stroma*” (estromal), referindo-se à sua origem, foi proposto para substituir o termo “*stem*” (tronco), permanecendo a sigla MSC (GIROLAMO *et al.*, 2013).

As MSCs são originadas da camada germinativa mesodérmica e se caracterizam pela autorrenovação, ou seja, são capazes de se multiplicar mantendo seu estado indiferenciado, proporcionando uma reposição ativa de sua população de maneira constante nos tecidos (LEMISCHKA, 2005), sendo também capazes de se diferenciar em adipócitos, condrócitos e osteócitos, tanto *in vitro* como *in vivo*. Várias características tornam estas células uma ótima fonte para aplicação clínica no reparo e regeneração de tecidos como: possibilidade de isolamento a partir de vários tecidos adultos, grande potencial de expansão em cultura, propriedades imunossupressoras, comportamento migratório para tecidos lesados e baixa imunogenicidade, permitindo o uso em transplante alogênico. Além disso, apresentam efeito parácrino e características de plasticidade que sugerem que as MSCs são responsáveis pelo *turnover* na manutenção de todos os tecidos do organismo (CAPLAN, 2009). Diferentes fontes de MSCs, como por exemplo: medula óssea, cordão umbilical, tecido adiposo, podem apresentar diferentes taxas proliferativas, potenciais de diferenciação e perfis de expressão genética (HEO *et al.*, 2016), por isto informações sobre a análise comparativa de diferentes fontes podem melhorar nosso entendimento sobre a função destas células, propiciando uma seleção mais apropriada do tipo celular para cada aplicação clínica (CHEN *et al.*, 2015).

Quando comparadas às MSC, as células-tronco pluripotentes, tanto as embrionárias como as induzidas (iPS ou iPSC, do inglês *induced Pluripotent Stem Cells*), mostram maior instabilidade genética. Células-tronco embrionárias

apresentam aberrações cromossômicas recorrentes que afetam a capacidade de diferenciação e aumentam sua tumorigenicidade (BLUM; BENVENISTY, 2009). Em relação às iPS, embora tenham sido consideradas, inicialmente, com genoma normal e estável, agora é amplamente aceito que durante o cultivo em longo prazo, estas células adquirem aberrações cromossômicas que podem conferir vantagens proliferativas, e isto influencia a interpretação dos estudos biológicos com estas células. Portanto, a avaliação da integridade genômica é extremamente importante tanto para pesquisa básica como para uma futura aplicação clínica (MAYSHAR *et al.*, 2010).

1.2 POTENCIAL TUMORIGÊNICO DAS CÉLULAS-TRONCO

O uso terapêutico de células derivadas de linhagens de células-tronco, como as MSCs, requer programas de controle que garantam qualidade, segurança e rastreabilidade. Um dos principais problemas em linhagens derivadas de células-tronco é a possibilidade do surgimento de instabilidade genômica, como as alterações cromossômicas, que podem explicar, pelo menos em parte, seu potencial tumorigênico *in vivo* (CATALINA *et al.*, 2008, FOUDAH *et al.*, 2009). O risco potencial de formação de tumor é frequentemente considerado como o principal obstáculo para o uso terapêutico seguro de células-tronco (HERBERTS *et al.*, 2011). O caso de um menino que desenvolveu um tumor cerebral multifocal quatro anos após ter recebido transplante de células-tronco neurais (AMARIGLIO *et al.*, 2009) alarmou a comunidade científica. A biópsia mostrou a presença de uma neoplasia glioneural cuja origem, identificada pela análise de microssatélite e HLA (antígenos leucocitários humanos), não era do hospedeiro, mas sim de vários doadores, provavelmente das células-tronco neurais derivadas de tecido periventricular de fetos abortados, que haviam sido usadas no transplante. Não foi realizada análise cariotípica das células após cultivo, antes da utilização no tratamento. Este fato ilustrou muito bem que o risco de formação de tumor das células-tronco é real e não somente teórico, determinando que este procedimento deva ser cuidadosamente avaliado. Entender o início do processo tumorigênico é fundamental para avaliarmos este fator de risco.

Embora o câncer seja uma entidade patológica extremamente complexa, a genética do câncer está baseada no princípio de que ele surge a partir de um

clone de células que acumularam aberrações genéticas somáticas adquiridas, resultando na transformação maligna (STRATTON *et al.*, 2011). Alterações genéticas, desde uma mutação de ponto até monossomias e trissomias cromossômicas, podem ser adquiridas durante a expansão de células-tronco em cultura (BEN-DAVID; BENVENISTY, 2012). Aberrações cromossômicas são importantes no início da tumorigênese: em vários tipos tumorais temos a descrição de aberrações que podem ser específicas, e até mesmo patognomônicas. Estes achados, em paralelo com a elucidação das consequências genéticas moleculares das anormalidades citogenéticas, forneceram uma confirmação incontestável da idéia de Boveri que, em 1914, afirmou que as aberrações cromossômicas adquiridas são o fator causal da origem do câncer (MITELMAN; JOHANSSON; MERTENS, 2007).

Aberrações cromossômicas recorrentes estão descritas em todos os tipos tumorais suficientemente estudados (MITELMAN; JOHANSSON; MERTENS, 2016). Um banco de dados continuamente atualizado com anormalidades cromossômicas e suas consequências moleculares em neoplasias apresenta atualmente a informação citogenética de 66.234 casos, com identificação de 10180 fusões gênicas resultantes de rearranjos estruturais (*Mitelman Database of Chromosome Aberrations and Gene Fusions in Cancer*, 2016). Os rearranjos cromossômicos balanceados recorrentes, principalmente as translocações, estão associados a tipos tumorais distintos e devem representar eventos iniciais na oncogênese, indicando a localização de genes potencialmente tumorigênicos. Aberrações primárias, como alterações citogenéticas únicas, geralmente balanceadas, são patogeneticamente significativas como eventos iniciais na tumorigênese. Aberrações secundárias são adquiridas durante a progressão tumoral, sendo importantes nos estágios mais avançados da doença. A ação tumorigênica pode originar-se por dois mecanismos alternativos: superexpressão de um dos genes localizados no ponto de quebra ou criação de um gene híbrido, pela fusão de dois genes, localizados nos diferentes pontos de quebra (MITELMAN; JOHANSSON; MERTENS, 2007). A maioria dos genes está rearranjada em translocações cromossômicas recorrentes, particularmente encontradas em leucemias, linfomas e sarcomas (STRATTON *et al.*, 2011).

Portanto, a presença de aberrações cromossômicas é uma importante evidência do potencial tumorigênico de uma linhagem celular.

Em células tronco embrionárias já está confirmada a presença de alterações cromossômicas recorrentes e de formação de tumores, em estudos experimentais em camundongos (BUZZARD; GOUGH; CROOK, 2004, INZUNZA *et al.*, 2004, NÄRVÄ *et al.*, 2010, LAURENT *et al.*, 2011). Já nas células-tronco humanas adultas, há controvérsias. Em especial nas MSCs, segundo alguns autores, a estabilidade genética parece ser mantida durante o cultivo celular (BERNARDO *et al.*, 2007), e, portanto, este tipo de células-tronco não seria suscetível à transformação maligna (POLONI *et al.*, 2011, WANG *et al.*, 2012). Porém, existem alguns relatos de formação de tumores em ratos e camundongos após injeção com MSCs (TOLAR *et al.*, 2007; PAN *et al.*, 2014). Além disso, o fato de que qualquer célula cultivada possa desenvolver alterações cromossômicas ao longo do tempo, independente de ser célula-tronco (MEISNER; JOHNSON, 2008), expõe o risco potencial de que células-tronco, mesmo adultas, poderiam desenvolver um potencial tumorigênico após a expansão *in vitro* (BEN-DAVID *et al.*, 2011, HERBERTS *et al.*, 2011).

Em relação à origem de clones de células anormais durante o cultivo celular Wang *et al.* (2005) elabora duas hipóteses para a presença de MSCs transformadas em cultivo: (1) uma população de MSC que passou por transformação durante a cultura; ou (2) presença de células anormais em baixa frequência no doador de medula óssea que se expandiram durante o cultivo. Embora neste trabalho as MSCs fossem derivadas da medula óssea, estas explicações poderiam ser estendidas também para MSCs de outras fontes (tecido adiposo, cordão umbilical, origem dental, etc...), pois, em sua essência, o fato principal é que o cultivo pode ter propiciado um ambiente favorável para as células transformadas expandirem-se e propagarem-se *in vitro*.

1.3 ESTUDOS CITOGENÉTICOS E A ESCOLHA DAS TÉCNICAS

A maioria dos genes envolvidos na etiologia e ou desenvolvimento dos diferentes tipos de cânceres humanos foi identificada pela análise da citogenética convencional. A análise cromossômica foi, e ainda é, um dos métodos mais influentes no impacto da ciência do câncer (STRATTON *et al.*, 2011). Estudos citogenéticos também são considerados determinantes para

avaliação consistente do potencial uso terapêutico de células-tronco cultivadas, sendo utilizados, principalmente, a cariotipagem, a hibridização *in situ* com fluorescência (FISH) e a hibridização genômica comparativa (CGH) (CATALINA *et al.*, 2007). Além destas técnicas de citogenética, a avaliação da integridade genômica também pode ser analisada por métodos baseados na análise do DNA (sequenciamento total do genoma, microarranjos de CGH e SNP-polimorfismos de nucleotídeo único) e baseados em RNA (*e-karyotyping*). No entanto, utiliza-se prioritariamente a análise cromossômica, através da cariotipagem com bandeamento G (BEN-DAVID; BENVENISTY, 2012, MUNTION *et al.*, 2012).

A análise cromossômica, ou cariotipagem, por bandeamento GTG (com tripsina e Giemsa) permite a análise de todo o genoma num único experimento. Interrompendo a divisão de células que estão em crescimento, esta técnica tem como principal objetivo a obtenção de metáfases que vão permitir a construção de kariogramas com os 46 cromossomos. Aberrações, tanto numéricas (euploidias e aneuploidias) como estruturais (translocações, deleções, inversões, duplicações, etc...), podem ser identificadas e por isto esta técnica é vantajosa em relação à mera contagem cromossômica ou cariotipagem multicolor, como M-FISH (FISH multicolor) ou SKY (cariotipagem espectral multicolor). A detecção de aberrações cromossômicas, às vezes sutis, deve ser feita por citogeneticistas com muita experiência para garantir o controle de qualidade de uma linhagem (MEISNER; JOHNSON, 2008). Uma grande vantagem da cariotipagem é a possibilidade de analisar célula a célula, o que permite detectar diferentes linhagens de células somáticas, geneticamente diferentes, como acontece em estudos de câncer, onde clones anormais são detectados em meio às células normais. Este conceito costuma ser chamado de mosaicismo: diferentes linhagens que se originam de um mesmo zigoto; diferentemente de quimerismo, quando se originam de zigotos diferentes.

A hibridização *in situ* com fluorescência (FISH) marcou, há quatro décadas, o começo de uma nova era no estudo da função e estrutura dos cromossomos. Esta técnica consiste essencialmente na hibridização de uma sonda de DNA com sua sequência complementar na preparação cromossômica previamente fixada em lâmina. As sondas são marcadas diretamente, pela incorporação de nucleotídeos fluorescentes, ou indiretamente, pela incorporação de moléculas repórter que são

subsequentemente detectadas por anticorpos fluorescentes. Sondas e alvos são então visualizados *in situ* por análise microscópica de fluorescência. Com uma abordagem que combina análise citológica e molecular, esta técnica tem uma habilidade única de oferecer um nível intermediário de resolução entre a análise de DNA e a análise cromossômica, mantendo a informação célula por célula (VOLPI; BRIDGER, 2008). A FISH pode identificar alterações além da resolução da microscopia comum (utilizada na cariotipagem com bandeamento G), permitindo a detecção de microdeleções, e também auxilia a esclarecer rearranjos cromossômicos não detectáveis pelo bandeamento convencional (rearranjo críptico) ou de difícil interpretação (como rearranjos complexos envolvendo mais de um cromossomo). Essa técnica é usada para avaliar os cromossomos de células em metáfase, mas sua principal contribuição é na análise de células em núcleos interfásicos (VERMAS; BABU, 1995), permitindo a identificação de um grande número de células o que facilita, por exemplo, a análise em amostras de cultivo prolongado, onde às vezes é difícil a obtenção de número adequado de metáfases. Também é importante para a detecção de mosaicismo, quando a proporção de uma das linhagens celulares é muito baixa (SABHNANI *et al.*, 2011).

Esta técnica permite também a detecção de alterações de um cromossomo, de uma região ou de um gene específico, de acordo com a sonda utilizada, e é recomendada como exame complementar aos de citogenética convencional já que permite esclarecer diversas alterações estruturais, como translocações e pequenas deleções, não identificadas com outras técnicas (NATARAJAN; BOEI, 2003).

Para avaliação da integridade genômica em células-tronco, a FISH pode ser aplicada como teste complementar desde que exista uma região cromossômica suspeita pré-determinada, de interesse (BEN-DAVID; BENVENISTY, 2012, MUNTION *et al.*, 2012). No presente trabalho escolhemos os genes *TP53*, localizado no braço curto do cromossomo 17 (17p13.1), e o gene *RB1*, localizado no braço longo do cromossomo 13 (13q14.2), para serem avaliados por esta técnica. Estes genes supressores de tumor fazem parte das duas principais vias que controlam a resposta celular a estímulos potencialmente tumorigênicos, portanto, alterações nos mesmos explicam o potencial envolvimento universal na etiologia do câncer (SHERR; McCORMICK, 2002). Tanto o gene *TP53* como o *RB1* fazem parte da lista de

genes supressores de tumor sugerida por Meza-Zepeda *et al.* (2008), que seriam frequentes alvos para alteração em culturas celulares. A perda de p53 (o produto proteico de *TP53*) e a inativação de Rb (o produto proteico de *RB1*) cooperam para promover a carcinogênese, num processo ainda não completamente entendido (AKENO *et al.*, 2015). Importaneamente, estudos de sarcomagênese, onde as MSCs passam pelo processo de imortalização/transformação, mostram que a deficiência de p53 e Rb são *hits* oncogênicos que levam à formação de liposarcoma mixóide (RODRIGUEZ *et al.*, 2013).

O gene *TP53* é o mais frequentemente alterado nos tumores humanos e é o principal componente na resposta ao dano do DNA (GATZ; WIESMÜLLER, 2006). Em alguns casos, como nas leucemias linfoblásticas agudas com cariótipo hipodiploide/*near* triploide, a perda de um dos alelos pode ocorrer numa frequência maior que 90% (MÜHLBACHER *et al.*, 2014). Em mielodisplasias (SANCHEZ-CASTRO *et al.*, 2015), sugere-se a aplicação da técnica de FISH para 17p13 para identificar o número de cópias do gene *TP53*, como complementação da investigação citogenética, pois o gene pode estar ausente mesmo quando o cariótipo está aparentemente normal.

O gene *RB1* é infrarregulado em vários tipos de tumores mesenquimais (DAHELN *et al.*, 2003) e é perdido quando ocorre monossomia do cromossomo 13, aberração esta já recorrente em MSC (BEN-DAVID; MAYSHAR; BENVENISTY, 2011). As alterações genéticas dos genes supressores de tumores mais frequentemente associadas ao processo tumorigênico são as que levam à perda de função, o que pode acontecer por mutação deletéria ou pela perda física de uma cópia do gene, por causa da monossomia ou deleção na região cromossômica onde o gene está localizado. Tanto a monossomia como a deleção podem ser detectados usando sonda específica na técnica de FISH, mais sensível que a citogenética convencional. A FISH é capaz de detectar o número de cópias destes genes mesmo se, dentro da população total de células, somente uma pequena porcentagem apresenta alteração (mosaicismo), e também detecta ausência do gene mesmo em microdeleções, que seriam crípticas à cariotipagem.

A Hibridização Genômica Comparativa em *array* (aCGH) é uma técnica de alta resolução para detecção de ganhos e perdas de DNA nos cromossomos. A análise de CGH por microarranjos (*array*) permite uma melhor


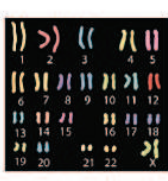

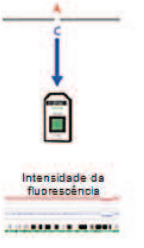
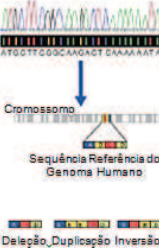
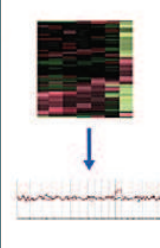
resolução que a citogenética convencional (cariotipagem) na análise do genoma em um único experimento. É similar ao CGH convencional, porém usa sondas genômicas imobilizadas em lâminas de vidro, organizadas em arranjos ao invés de metáfases cromossômicas como alvo para hibridização. As sondas imobilizadas hibridizam competitivamente com o alvo da amostra, diferentemente marcadas, levando à alta resolução da identificação do número de cópias no genoma (FAN, 2005).

Comparando estas três principais técnicas de citogenética (cariotipagem FISH e CGH), a FISH é relativamente rápida e de fácil interpretação, capaz de ser utilizada tanto em metáfases (células em divisão) como em núcleos interfásicos, e com grande sensibilidade (detecta uma célula aberrante em 200); suas limitações são a impossibilidade de avaliar o genoma como um todo e a necessidade de conhecer a alteração cromossômica de interesse, fazendo com que a interpretação do resultado limite-se a responder a presença ou ausência de alterações nas regiões cromossômicas investigadas naquele teste específico. A CGH requer somente DNA genômico e tem grande poder de resolução, detectando pequenas alterações cromossômicas, de até 1,5 Mb, não detectáveis por cariotipagem convencional. Porém, sendo específica para ganhos e perdas, não detecta rearranjos balanceados (inversões e translocações), alguns mosaicismos somáticos, alterações de ploidias ou perdas menores que 100-500 Kb (CATALINA *et al.*, 2007). A análise por microarranjos de CGH foi descartada para ser utilizada neste trabalho porque, além do alto custo, as limitações para detectar rearranjos balanceados e mosaicismos, não informariam sobre estas duas importantes alterações que podem ocorrer em células cultivadas. A cariotipagem com bandeamento G detecta todos os tipos de alterações cromossômicas do genoma não detectáveis pelas técnicas anteriores e o custo é menor. Suas limitações são: a necessidade de células em divisão (para obtenção de metáfases) e dificuldade de análise e interpretação dos dados, pois o resultado confiável depende de citogeneticistas experientes (CATALINA *et al.*, 2007) infelizmente cada vez menos disponíveis, devido ao apelo proporcionado pela Biologia Molecular aos jovens pesquisadores.

Considerando as vantagens e limitações das técnicas atualmente utilizadas para avaliar a integridade genômica de células-tronco (quadro 1) observamos que as técnicas baseadas em DNA e RNA, como aCGH, tem uma

importante limitação na detecção de pequenos clones alterados (mosaicismo), detectando só se esta frequência for de pelo menos 20%, ao passo que a Cariotipagem com bandeamento G pode detectar a partir de 5% (BEN-DAVID; BENVENISTY, 2012).

Quadro 1: Comparação das metodologias disponíveis para avaliação da integridade genômica de células-tronco.

	Citogenética		Baseado em DNA			Baseado em RNA
Métodos	Cariotipagem por Bandejamento G 	Cariótipo Espectral 	aCGH DNA da referência Amostra de DNA Fusão Co-hibridização 	Arranjo SNP 	Sequenciamento Completo do Genoma 	Arranjo de Expressão Gênica 
Resolução	~10 Mb	Varável (depende do tipo de aberração)	Menos de 1 Mb	Menos de 1 Mb	Pares de base individuais	~10 Mb
Sensibilidade	~5%	~5%	Mais de 20%	Mais de 20%	Mais de 20%	Mais de 30%
Custo	Alto (centenas de \$)	Alto (centenas de \$)	Alto (centenas de \$)	Alto (centenas de \$)	Muito alto (milhares de \$)	Alto (centenas de \$)
Vantagens Únicas	<ul style="list-style-type: none"> Fácil e confiável Alta sensibilidade para culturas em mosaicismos Deteção de translocações balanceadas e inversões 	<ul style="list-style-type: none"> Alta sensibilidade para culturas em mosaicismos Deteção de translocações balanceadas e cariótipos complexos 	Alta resolução	<ul style="list-style-type: none"> Alta resolução Deteção de LOH 	<ul style="list-style-type: none"> Resolução final Deteção de mutações pontuais 	<ul style="list-style-type: none"> Mesmo material biológico usado para perfil de expressão e análise de integridade genômica Identificação de genes envolvidos
Limitações Únicas	Baixa resolução	<ul style="list-style-type: none"> Baixa proporção de resolução por custo Incapacidade de identificar pequenas duplicações e deleções 	<ul style="list-style-type: none"> Baixa sensibilidade para culturas em mosaicismos Não pode detectar poliploidia 	Baixa sensibilidade para culturas em mosaicismos	Custo muito elevado	<ul style="list-style-type: none"> Cromossomos sexuais não são facilmente analisados Baixa sensibilidade para culturas em mosaicismos

Fonte: BEN-DAVID, U.; BENVENISTY, N. Analyzing the genomic integrity of stem cells. StemBook, 2012. doi: 10.3824/stembook.1.150.1. Acesso em: 05 out. 2015.

Considerando as vantagens e limitações de cada técnica, o padrão-ouro para avaliação cromossômica tem sido considerado a cariotipagem com bandeamento G. Porém, nos estudos iniciais sobre instabilidade genética em CT, vários autores descreveram dificuldades em obter metáfases de boa qualidade que permitam esta análise (INZUNZA *et al.*, 2004, BERNARDO *et al.*, 2007, SPITS *et al.*, 2008), sendo este um dos motivos para optarem por técnicas moleculares como o FISH e CGH. Atualmente algumas dificuldades técnicas foram superadas, fazendo com que, também no estudo de CT cultivadas, a cariotipagem seja considerada padrão-ouro e a mais informativa para avaliação genética de uma linhagem celular (CATALINA *et al.*, 2007, MEISNER; JOHNSON, 2008, SPITS *et al.*, 2008, PAYÃO; SEGATTO; SANTOS, 2009, DUARTE; CORNÉLIO; CORADO, 2012). Mais do que isso, só a

cariotipagem permite, em um mesmo teste: a avaliação de todo o genoma, detecção de mosaicismo, identificação de anomalias cromossômicas numéricas (incluindo ploidias) e identificação de anomalias cromossômicas estruturais, incluindo translocações balanceadas, que é considerado o principal tipo de aberração cromossômica com importante papel nas etapas iniciais da tumorigênese.

Por isto, a cariotipagem com bandeamento G foi escolhida como a principal técnica de avaliação para as CT cultivadas neste estudo, seguida da técnica de FISH, para avaliar especificamente os genes supressores de tumor *TP53* e *RB1*.

Uma terceira técnica foi escolhida no presente estudo para complementar a avaliação da instabilidade genética: o teste de instabilidade cromossômica com utilização de agente alquilante. Não encontramos relatos na literatura sobre a utilização deste teste em células-tronco. Este teste citogenético é usado como importante auxiliar diagnóstico para algumas síndromes de instabilidade cromossômica, como Xeroderma Pigmentoso, Ataxia-Telangectasia, Síndrome de Bloom, Anemia de Fanconi, Anemia de Blackfan-Diamond e a Síndrome de Nijmegen (MALUF *et al.*, 2011). Todas estas síndromes são conhecidas por ter um aumento na predisposição a diversos tipos de neoplasias hematológicas e tumores sólidos, sendo esta uma forte evidência de que a instabilidade cromossômica está associada ao câncer. A mitomicina, o Tetrametansulfonil-d-mannit, a mostarda nitrogenada e o diepoxibutano (DEB) são exemplos de agentes clastogênicos que podem ser utilizados nestes testes, possibilitando uma avaliação da instabilidade através de um aumento de quebras cromatídicas e cromossômicas nas células cultivadas em presença destes agentes (CAPUTO, 2002, AUERBACH, 2003).

O DEB($C_4H_6O_2$) é um agente alquilante bifuncional, com propriedades clastogênicas que, molecularmente, provoca a formação de ligações cruzadas (ICLs - *interstrandcrosslinks*) na dupla hélice do DNA, tanto inter como intra fita. A forma 1,2,3,4-diepoxibutane é resultante da oxidação, pelo citocromo P450, do 1,3-Butadiene, um químico industrial e ambiental, presente na fumaça urbana e do cigarro, classificado como carcinógeno humano (SENEVIRATNE *et al.*, 2010).

Testes utilizando DEB são comumente usados para avaliar citotoxicidade (GHEREZGHIHER *et al.*, 2013), genotoxicidade (KHANDELWAL; ABRAHAM, 2014) e carcinogenicidade (CHO; GUENGERICH, 2013) além de auxiliar na avaliação da instabilidade genética em doenças como, por exemplo, neoplasia endócrina múltipla (TOMASSETTI *et al.*, 1995) hemocromatose hereditária (ANDRADE *et al.*, 2013), síndrome de Nijmegen (OWEN; FROHNMAYER; EILER, 2003) e anemia de Fanconi (AUERBACH, 2003).

O teste de instabilidade cromossômica com DEB realizado em células cultivadas baseia-se nas suas propriedades clastogênicas, que determinam um bloqueio da replicação e transcrição, que deve ser reparado para que a célula sobreviva e possa exercer suas funções. A instabilidade cromossômica pode então ser evidenciada se houver problemas nas vias de reparo, caracterizando uma hipersensibilidade ao agente clastogênico (WANG; D'ANDREA, 2004), sendo este teste portanto, uma evidência da expressão dos genes de reparo. O resultado é a ocorrência de quebras que podem ser observadas em todos os cromossomos do genoma, nas bandas G claras e sítios frágeis (KOSSULL; AULA, 1973) e podem estar associadas aos pontos de quebra em locos de oncogenes e outros genes envolvidos no processo cancerígeno (HECHT, 1988).

A análise, por quantificação das quebras cromossômicas, pode ser feita em culturas de linfócitos, fibroblastos, amniócitos ou mesmo células da vilosidade coriônica. A instabilidade pode ser avaliada pelo número de aberrações por célula e pela porcentagem de células com aberrações (TOMASSETTI *et al.*, 1995; ANDRADE *et al.*, 2013, AUERBACH, 2015).

A análise da integridade genômica de uma linhagem pode ser feita por todas estas técnicas, cada uma delas com grandes vantagens e algumas limitações específicas. A combinação e comparação entre elas pode nos oferecer resultados interessantes.

1.4 JUSTIFICATIVA

Em concordância com a literatura mundial, que considera o cultivo de CT *in vitro* um fator de risco para formação de tumor, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) do Brasil, por meio da resolução que dispõe sobre o funcionamento dos CTCs (Resolução da Diretoria Colegiada RDC09/2011), estabelece a realização de controle genético como critério de liberação para uso destas células. Em 2015 este critério de liberação foi reafirmado na RDC que dispõe sobre as “Boas práticas em células humanas para o uso terapêutico e pesquisa clínica”, que ainda está em fase de discussão e será disponibilizada para consulta pública em 2016. Pesquisadores de todos os centros vêm reconhecendo a importância de detectar células com anormalidades cromossômicas, numéricas ou estruturais, como forma de avaliar a integridade genômica antes do uso terapêutico destas células, para garantir um procedimento seguro e com melhores resultados.

A literatura indica que avaliação da propensão para a transformação maligna pode e deve ser feita por meio de estudos citogenéticos, principalmente cariotipagem, um indicador confiável para avaliar a estabilidade genética das MSCs e deve ser critério de liberação para a utilização clínica destas células (WANG *et al.*, 2005 e ZHANG *et al.*, 2007).

No Brasil, oito Centros de Tecnologia Celular (CTC) foram criados em 2008 com o apoio do Ministério da Saúde, estimulando o desenvolvimento de ensaios clínicos, garantindo qualidade e segurança nas novas tecnologias relacionadas à terapia celular. Esta tese foi realizada em um destes oito centros, o CTC localizado no Núcleo de Tecnologia Celular da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (NTC-PUCPR).

Este trabalho proporcionou a padronização e implantação de testes citogenéticos no NTC-PUCPR para as células-tronco cultivadas de diversas origens, como parte de um programa de controle de qualidade, dando suporte aos projetos ali desenvolvidos que almejam o uso terapêutico destas células em humanos.

1.5 OBJETIVOS

GERAL

Padronizar e implantar testes citogenéticos no NTC-PUCPR para avaliar a manutenção da integridade genômica em células-tronco mesenquimais (MSCs) cultivadas.

ESPECIFICOS

- Padronizar e implantar os seguintes testes citogenéticos: Cariotipagem com bandeamento GTG, hibridização *in situ* com fluorescência (FISH) e teste de instabilidade cromossômica com Diepoxibutano (DEB).
- Avaliar a manutenção da integridade genômica em MSC, comparando, por meio do teste de Cariotipagem, células antes e após cultivo em longo prazo.
- Verificar a diferença da integridade genômica, por meio do teste de Cariotipagem, entre células-tronco com e sem manipulação gênica, comparando MSCs e células-tronco pluripotentes induzidas (iPS).
- Avaliar a manutenção da estabilidade durante o cultivo em longo prazo prolongado, até as passagens tardias, por meio do teste de Cariotipagem.
- Verificar a diferença entre as diversas origens de MSCs: medula óssea, tecido adiposo e origem dental, usando o mesmo método: cariotipagem.
- Avaliar a presença ou ausência dos genes *TP53* e *RB1*, por meio do teste FISH, ao longo das sucessivas passagens, em MSCs de diversas origens.
- Avaliar a manutenção da estabilidade genética em células-tronco cultivadas, comparando, por meio do teste DEB, MSCs derivadas de medula óssea, na presença e na ausência do agente alquilante.
- Verificar a diferença entre os métodos: Cariotipagem, FISH e teste DEB, quanto à sensibilidade para detecção de anormalidades, usando as mesmas amostras de MSCs derivadas de medula óssea.

2 MATERIAL

Foram estudadas neste trabalho 158 amostras de MSCs derivadas de 47 pacientes e cinco linhagens de iPS.

O projeto que deu origem a esta tese foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) por meio da Plataforma Brasil e foi aprovado em 12.06.2013 sob o número 306.197 (anexo 1). Conforme apresentado no projeto enviado ao CEP, as células-tronco avaliadas nesta tese foram provenientes de vários projetos que estavam em andamento no Núcleo de Tecnologia Celular da PUCPR, no período de 2010 a 2015, dando origem a 114 amostras de MSCs originadas de medula óssea (35 pacientes), 35 de MSCs originadas de tecido adiposo (9 pacientes) e 9 de MSCs de origem dental (3 pacientes).

Todos os pacientes assinaram termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), de acordo com seu projeto de origem. O Núcleo de Tecnologia Celular possui um modelo de TCLE para ser usado nos projetos que envolvem isolamento e manipulação de CT mesenquimais, onde consta autorização para realizar testes genéticos que avaliam a manutenção da estabilidade das células (anexo 2). Além deste, foi elaborado um Termo de Consentimento de Utilização de Dados (TCUD) para utilização dos dados citogenéticos pré-existent no Núcleo de Tecnologia Celular (anexo 3).

A seguir estão descritas as principais características de cada projeto, dando especial atenção à algumas características dos pacientes como: idade, gênero, doença e, dentro dos critérios de inclusão e exclusão, um possível histórico de neoplasias, o que poderia predispor as células a apresentarem instabilidade genética durante o cultivo.

2.1 Células-tronco mesenquimais

As CT mesenquimais foram originadas dos 6 projetos a seguir:

Derivadas da MEDULA ÓSSEA:

A) Estudo multicêntrico randomizado de terapia celular em cardiopatias – EMRTCC. Doença isquêmica crônica do coração. CEP 1370 CONEP 3818.

Responsáveis: Paulo Roberto Slud Brofman, Alexandra Cristina Senegaglia, Carmen Lucia K. Rebelatto

Este projeto de Pesquisa Clínica integra o Estudo Multicêntrico Randomizado de Terapia Celular em Cardiopatias (“MiHeart Study”) (disponível em *Trials* 2007;8:2), Módulo: Doença Isquêmica Crônica do Coração. Além das aprovações em CEP e CONEP, encontra-se registrado no Sistema de Registro de Protocolos do *National Institutes of Health* dos Estados Unidos, sob número NCT00362388, disponível em <http://www.clinicaltrials.gov>. Fazia parte dos critérios de inclusão dos pacientes: ser portador de doença arterial coronária aterosclerótica obstrutiva, tanto homens quanto mulheres com idade entre 18 e 75 anos, o paciente deve permanecer sintomático (classe funcional de angina II a IV) em decorrência de isquemia miocárdica, a despeito de otimização da terapêutica clínica e do controle das co-morbidades e fatores de risco associados como hipertensão arterial, diabetes, dislipidemia e obesidade, o paciente deve apresentar evidências clínicas (angina de peito aos esforços ou equivalente anginoso) e por imagem (ecocardiografia). Eram critérios de exclusão: diagnóstico confirmado, história prévia e/ou tratamento anterior de neoplasia, de qualquer localização e estadiamento, nos últimos 10 anos, estarem em tratamento clínico ou aguardando tratamento cirúrgico de neoplasia, de qualquer localização e estadiamento ou apresentarem, durante a investigação ambulatorial, achados inequívocos de neoplasia.

B) Estudo multicêntrico randomizado de terapia celular em cardiopatias – EMRTCC. Cardiomiopatia dilatada. CEP 1371 CONEP 11259

Responsáveis: Paulo Roberto Slud Brofman, Alexandra Cristina Senegaglia, Carmen Lucia K. Rebelatto

Este projeto inclui 300 pacientes brasileiros com insuficiência cardíaca grau III ou IV da NYHA causada por cardiomiopatia dilatada. Critérios de Inclusão: em acompanhamento ativo e regular em serviço de cardiologia, idade entre 18 e 65 anos, tratamento medicamentoso adequado ao final do período de otimização. Critérios de exclusão: qualquer co-morbidade com impacto na sobrevida em 2 anos, hipertensão arterial sistêmica (HAS) ativa ou história de HAS. Não estavam incluídos critérios relacionados a neoplasias.

C) Transplante autólogo de células mesenquimais cultivadas e expandidas no tratamento da cardiomiopatia isquêmica grave e refratária. CEP 5250
Responsáveis: Paulo Roberto Slud Brofman, Alexandra Cristina Senegaglia, Carmen Lucia K. Rebelatto

Estudo clínico prospectivo, controlado, longitudinal e aberto, considerado como fase II. Foi escolhida a fase II (Estudo Terapêutico Piloto), pois os objetivos pretendem demonstrar a atividade, estabelecer a segurança e a efetividade das células, em pacientes com miocardiopatia isquêmica. As pesquisas realizam-se em um número pequeno e limitado de pacientes e freqüentemente são seguidas de um estudo de administração. Foram selecionados 10 pacientes para receberem o tratamento da cardiomiopatia isquêmica por meio do transplante autólogo de células tronco mesenquimais. Estes pacientes foram tratados clinicamente por angioplastia, com a utilização ou não de prótese intraluminal ou por cirurgia de revascularização do miocárdio, e continuam ou apresentam novos sintomas de insuficiência coronariana devido a evolução da doença de base que é a aterosclerose. A evolução desta doença é comum nestes pacientes e faz com que o tratamento por angioplastia e cirurgia sejam considerados paliativos e não curativos. Critérios de inclusão: pacientes de ambos os sexos, com idade entre 18 e 75 anos, portadores de doença arterial coronariana aterosclerótica, sintomáticos (classe funcional II a IV - NYHA) em consequência a doença isquêmica, com terapêutica clínica otimizada e com controle de co-morbidades ou fatores de risco associados. Pacientes já tratados clinicamente, com angioplastia coronariana com ou sem implante de prótese intraluminal (*stent*) e revascularizados com cirurgia e sem possibilidade de nova intervenção invasiva.

D) O uso de células-tronco mesenquimais autólogas da medula óssea no tratamento de lesões da cartilagem articular. CEP 5258 CONEP 16645 Plataforma Brasil CAAE 16744813.0.0000.0020 parecer 518.599

Responsáveis: Alcy Villas Boas Jr, Alexandra Cristina Senegaglia, Carmen Lucia K. Rebelatto, Paula Hansen Suss e Paulo Roberto Slud Brofman.

Os pacientes apresentavam lesão da cartilagem articular de joelho, com avaliação pré operatória realizada por meio de estudos radiológicos, nas posições anteroposterior com carga e apoio monopodal, perfil e axial, e através de estudo da cartilagem articular por exame de ressonância magnética. E, por meio de questionários para a vida cotidiana, Western Ontário and MacMaster Universities Osteoarthritis (WOMAC) e Lequesne – atualizado por Faucher em 2003. Eram critérios de inclusão: pacientes portadores de doença degenerativa articular (artrose) primária ou secundária, defeitos condrais e defeitos osteocondrais. Estes pacientes já se encontravam em tratamentos convencionais sob os cuidados do Dr. Alcy Vilas Boas Jr. Eram critérios de exclusão: pacientes portadores de doença degenerativa da cartilagem articular secundária a fatores metabólicos e pacientes anteriormente tratados com quimioterapia; pacientes com um desvio do eixo axial (varo ou valgo) maior que 12 graus; pacientes imunocomprometidos, pacientes com doenças autoimunes e doenças inflamatórias sistêmicas.

Derivadas de TECIDO ADIPOSEO

E) Corticoterapia e uso de células-tronco em ratos submetidos à lesão raquimedular. Plataforma Brasil CAAE: 04257912.6.0000.0020 Número do Parecer: 67978.

Responsáveis: José Ademar Villanova Junior e Leticia Fracaro

Este projeto desenvolveu um modelo experimental em ratos para estudar o tratamento após lesão raquimedular. Como fonte de células-tronco, foram utilizadas amostras CT mesenquimais humanas, derivadas de tecido adiposo, de pacientes de ambos os sexos, de idade entre 25 e 55 anos, que se submeteram à cirurgia bariátrica e dermolipectomia e doaram este tecido para pesquisa. Como neste projeto as amostras destinavam-se apenas para

pesquisa experimental, sem previsão do uso destas células para terapia celular em humanos, não existiram critérios de inclusão ou exclusão para os doadores do tecido adiposo.

Derivadas de ORIGEM DENTAL

- F) Estudo das células-tronco de diferentes regiões dentais: isolamento, cultivo, caracterização, análises morfológica, morfométrica, citogenética e comportamento frente a agentes estressantes. Plataforma Brasil CAAE:04166512.7.0000.0020 Número do Parecer: 96.328.

Responsável: Sergio Adriane Bezerra de Moura

Este projeto elaborou um protocolo para isolamento e caracterização de CT mesenquimais derivadas de tecidos de origem dental: ligamento periodontal, polpa de dentes permanentes, polpa de dentes decíduos, papila apical e folículo dental. Os pacientes que doaram estes tecidos eram saudáveis e não faziam uso de medicamentos. Foram submetidos à cirurgia com anestesia local, realizada em ambiente cirúrgico por Cirurgião Buco-Maxilo-Facial. Os dentes utilizados não apresentavam cárie e/ou doença periodontal e foram removidos por indicação de planejamento em ortodontia ou por serem inclusos ou impactados. Como neste projeto as amostras destinavam-se apenas para pesquisa experimental, sem previsão do uso destas células para terapia celular em humanos, não existiram outros critérios de inclusão ou exclusão para os doadores do tecido de origem dental.

A caracterização dos pacientes está resumida na tabela 1.

Tabela 1: Caracterização dos pacientes

Nº	Sigla	Gênero	Idade	Projeto	Códigos das amostras (diferentes passagens)
1	NAR	f	35	A	ME001
2	GR	m	63	A	ME002
3	MAP	m	62	A	ME003
4	ATP	m	45	A	ME004
5	NC	m	48	A	ME005
6	FAB	m	64	A	ME006
7	IGO	m	51	A	ME007
8	MS	m	66	A	ME008
9	EWA	m	63	C	ME009
10	JFS	m	44	B	ME010
11	JATH	m	58	B	ME011
12	DL	m	61	C	ME012
13	VCO	m	46	C	ME017
14	PJON	m	54	C	ME018
15	AMPRC	f	49	UC	MO002 ME021
16	VAA	m	54	C	MO004, ME026, ME028, ME029, ME030, ME033, ME035
17	RLLM	m	56	C	MO005 ME037
18	EMS	f	54	D	MO006, MO009 ME045
19	VS	m	55	D	MO007, MO008 ME044
20	ASRJ	m	57	C	MO010 ME052
21	JCB	f	35	D	MO011 ME055
22	RD	m	67	UC	MO012 ME059
23	DFL	m	43	D	MO013 ME057
24	NSL	f	65	D	MO014 ME060

Tabela 1: Caracterização dos pacientes (continuação)

Nº	Sigla	Gênero	Idade	Projeto	Códigos das amostras
25	DGA	m	27	D	MO015 ME062, ME063, ME064,ME065,ME066, ME069,ME070,ME071,ME073,ME076, ME077,ME078,ME079,ME083,ME086, ME089,ME090
26	ABB	f	54	D	MO016 ME067
27	MBG	m	42	C	MO017 ME074
28	EE	m	43	D	MO018 ME072
29	MEA	f	51	D	MO019 ME080
30	VCSR	f	48	D	MO020 ME082
31	AMF	m	51	C	MO021 ME087
32	SC	m	54	C	MO027 ME133
33	NKJ	m	57	C	MO028 ME137
34	MSS	m	67	C	MO030,ME147, ME153, ME156, ME161, ME172
35	ISQ	m	68	A	ME095,ME097,ME098, ME100, ME102,ME106, ME108,ME110,ME112, ME114, ME115,ME118, ME120
36	TAV	f	53	E	ME014
37	TAS	m	28	E	ME015
38	TAW	m	69	E	ME016
39	TA VLT	f	64	E	ME022
40	TA ANG	f	50	E	ME043,ME099,ME101,ME103,ME104, ME105,ME107,ME109,ME111,ME113,M E116,ME119, ME124
41	TA IG	m	55	E	ME117,ME121,ME122,ME125,ME127,M E128, ME134,ME135,ME141, ME150
42	TAMC	f	26	E	ME129,ME131,ME132,ME138,ME144,M E146, ME152,ME154,ME159, ME169
43	TAMJBC	f	67	E	ME130,ME142,ME148,ME158, ME163,ME175
44	TATF	f	66	E	ME136,ME143,ME145, ME155,ME160
45	AV	f	17	F	ME023,ME024
46	PS	f	30	F	ME025,ME027
47	RAF	m	16	F	ME040,ME041,ME047, ME048,ME050,ME051, ME054

m- masculino, **f-** feminino, **A-** projeto Estudo Multicêntrico (doença isquêmica crônica do coração). **B-** projeto Estudo Multicêntrico (cardiomiopatia dilatada). **C-** projeto Transplante autólogo em cardiomiopatia isquêmica. **D-** projeto Uso de células-tronco mesenquimais em lesão da cartilagem articular. **E-** projeto Corticoterapia e uso de células-tronco em ratos submetidos à lesão medular. **F-** projeto Uso de células-tronco em diferentes regiões dentais. **UC**—uso compassivo, **ME**- células-tronco mesenquimais, **MO** – células de medula óssea,

2.2 Células-tronco pluripotentes induzidas

Para comparar nossos resultados de MSCs com células que tenham passado por manipulação gênica, foram estudadas células-tronco pluripotentes induzidas (iPS) do projeto: Geração e diferenciação cardíaca de células-tronco pluripotentes induzidas humanas (CEP: 24138414.1.0000 5272) numa parceria realizada com o Laboratório de Cardiologia Celular e Molecular, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, com a pesquisadora Fernanda Mesquita, sob orientação do Prof. Antônio Carlos de Carvalho e da Prof^a Adriana Carvalho. Após obtenção de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido uma biópsia de pele foi realizada em indivíduos normais, saudáveis, com idade entre 18 e 35 anos. As células-tronco pluripotentes induzidas originaram-se de fibroblastos de um doador, cultivados a partir de fragmentos destes tecidos.

3 MÉTODOS

Para a realização dos testes citogenéticos propostos nesta tese (cariotipagem, FISH e teste DEB) as células primeiramente foram isoladas e cultivadas. Por exemplo, as células originadas da medula óssea são primeiramente coletadas, isoladas em ambiente estéril e semeadas em garrafas de cultivo, por algumas passagens, denominadas de P0, P1, P2 e assim por diante. Nos casos onde estava previsto o tratamento autólogo com as MSCs, as células foram infundidas em P2, que corresponde aproximadamente a 4 semanas de cultivo. Nestes casos foram coletadas amostras para realização de análise citogenética antes (medula óssea) e após a expansão celular do cultivo em longo prazo (MSCs em P2) (fig 2).

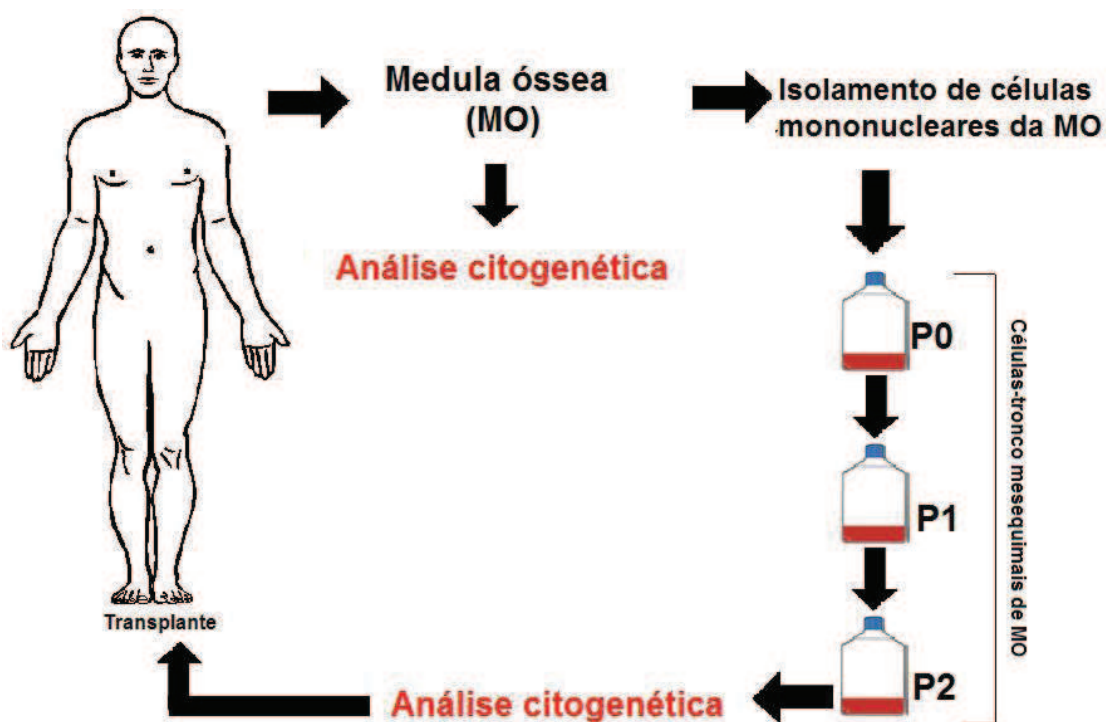


Figura 2: Momentos de coleta de amostras para realização de análise citogenética

Fonte: o autor

3.1 ISOLAMENTO E CULTIVO

3.1.1 Células-tronco mesenquimais da MEDULA ÓSSEA

A medula óssea (MO) foi coletada por hematologista em centro cirúrgico (Irmandade da Santa Casa de Misericórdia e Hospital Marcelino Champagnat, ambos de Curitiba, Paraná) e colocada em frascos estéreis com Meio Dulbecco Modificado por Iscove (IMDM – Gibco™) com 1% de antibiótico penicilina/estreptomicina e heparina. Foi então transportada até o laboratório e manipulada em área estéril, seguindo rigorosamente as Boas Práticas de Fabricação (BPF) e recomendações da ANVISA. A medula óssea foi filtrada e diluída em meio IMDM. Utilizando tubos cônicos de 50 mL, a MO diluída foi cuidadosamente colocada sobre o gradiente de densidade Ficoll-Hypaque 1.077 g/cm³ (Sigma-Aldrich). A centrifugação foi realizada a 400 g por 30 minutos. Após a centrifugação, as células mononucleares foram coletadas por aspiração da interface entre o plasma diluído e o gradiente de densidade. As células foram transferidas para outro tubo, diluídas em meio e centrifugadas em três ciclos de 10 minutos a 400 g. As células então foram filtradas usando peneira apropriada com malha de 100 µm e semeadas em frascos de cultura de 150 cm². O cultivo foi realizado com meio IMDM suplementado com 15 % de soro bovino fetal (SBF-Gibco), em incubadora com atmosfera úmida, com 5% CO₂, a 37°C. Após 72 h de cultivo, as células não aderentes foram removidas e descartadas. As MSCs, após semeadas, cresceram aderidas ao plástico. As trocas de meio foram realizadas duas vezes por semana e as células foram cultivadas (P0) até alcançarem cerca de 90% de confluência, quando então foram dissociadas utilizando tripsina-EDTA 0,25% (Gibco™, NY, USA), e ressemeadas em outras garrafas de cultivo, caracterizando a primeira passagem (P1). Após isto, ao atingirem a confluência, eram expandidas continuamente, por várias passagens (P2, P3, P4 e assim por diante), sempre sob condições de Boas Práticas de Fabricação (BPF). Além de serem encaminhadas para a análise citogenética, as amostras são rotineiramente caracterizadas por citometria de fluxo e ensaios de diferenciação osteogênica, adipogênica e condrogênica, caracterizando as células como MSCs, em protocolo de rotina já estabelecido em nosso Centro de Tecnologia Celular (REBELATTO *et al*, 2008), que segue critérios mínimos estabelecidos pela

Sociedade Internacional de Terapia Celular (HORWITZ *et al.*, 2005 e DOMINICI *et al.*, 2006).

3.1.2 Células-tronco mesenquimais de TECIDO ADIPOSEO

O tecido adiposo foi coletado por cirurgião plástico, em centro cirúrgico, em clínicas de cirurgia plástica, durante a cirurgia bariátrica e dermolipectomia. Os frascos foram transportados até o laboratório e, em área estéril, os fragmentos de gordura foram separados em placa de Petri, com auxílio de pinça e bisturi. O material foi lavado várias vezes com solução tampão fosfatada (PBS), macerado com bisturi e dissociado com collagenase tipo I (0,4 g para cada 100 mL de gordura), 30 minutos a 37°C, sob agitação. Após a sedimentação, a parte líquida inferior foi retirada e filtrada com *cell strainer* (poro de 100 µm). O tampão hemolítico foi adicionado e, após centrifugações, o botão de células resultante foi ressuspendido em meio Dulbecco (DMEM-F12) e as células semeadas em frascos de 150 cm² (20 x 10⁶ células em 20 mL de DMEM-F12 suplementado com 15% de SBF e 1% de antibiótico). As MSCs aderidas foram continuamente cultivadas a 37°C com 5% de CO₂ e expandidas conforme descrito no item 3.1.1.

3.1.3 Células-tronco mesenquimais de ORIGEM DENTAL

Tecidos de origem dental como polpa de dentes permanentes, polpa de dentes decíduos, papila apical, ligamento periodontal e folículo dental foram coletados em ambiente cirúrgico por Cirurgião Buco-Maxilo-Facial, no setor de Odontologia da Universidade Federal do Paraná, e transportados até o laboratório. Em ambiente estéril o material da superfície dental foi removido mecanicamente por meio de raspagem, com auxílio de bisturi. A suspensão celular foi submetida a uma digestão enzimática pela ação da collagenase tipo II (4 mg/mL), por uma hora a 37°, sob agitação. O material foi filtrado em *cell strainer* 40 µm e em seguida foi centrifugado a 400 g por 10 min. As células foram semeadas em frascos de 25 cm² e cultivadas em meio IMDM suplementado com 20% de soro bovino fetal e 1% de penicilina/streptomicina. As CTMs aderidas foram continuamente cultivadas a 37°C com 5% de CO₂ e expandidas conforme descrito no item 3.1.1.

3.1.4 Células-tronco Pluripotentes Induzidas (iPS)

A partir da biópsia de pele, pequenos fragmentos de tecido foram colocados em contato com meio DMEM rico em glicose, com 10% SBF e 1% de penicilina-estreptomicina (Life Technologies). Fibroblastos humanos migraram espontaneamente dos tecidos e foram expandidos a 37°C em 5% de CO₂ até a terceira passagem (P3). Para a reprogramação das células foram usadas partículas lentivirais recombinantes, produzidas em linhagem celular HEK293FT (Life Technologies), usando o reagente de transfecção FuGene 6 (Roche Life Sciences) e os seguintes vetores: VSV-g, Gag/Pol, Rev e Tat e um vetor policistrônico, lentiviral, chamado STEMCCA, do inglês *stem cell cassette*, que codifica todos os 4 fatores de reprogramação: OCT4, SOX2, KLF4 e c-MYC. As células então foram transduzidas e transferidas para placas tratadas com MatrigelTM e cultivadas em mTeSRTM 1 (*Stem Cell Technologies*).

3.2 ANÁLISE CITOGENÉTICA

As técnicas utilizadas para análise citogenética foram: Cariotipagem com bandeamento GTG, Hibridização *in situ* com Fluorescência (FISH) e Teste de Instabilidade Cromossômica com Diepoxibutano (DEB).

3.2.1 CARIOTIPAGEM COM BANDEAMENTO GTG

3.2.1.1 PADRONIZAÇÃO DO PROTOCOLO

Como a técnica de cariotipagem está descrita na literatura principalmente para utilização em células de sangue periférico ou medula óssea, houve necessidade de várias adaptações para aplicação desta técnica em MSCs. Diversas amostras dos primeiros 9 pacientes foram utilizadas para padronizar um protocolo para colheita e bandeamento cromossômico, onde foram avaliadas um total de 434 metáfases (VAZ; BORGONOVO; BROFMAN, 2011).

A colheita das amostras para testes citogenéticos é constituída basicamente pelas seguintes fases: interrupção mitótica com colchicina ou

colcemid, hipotonização com cloreto de potássio (KCl), fixação e lavagens com fixador Carnoy (metanol e ácido acético).

Os reagentes testados para colheita estão listados na tabela 2.

Tabela 2: Tempos e concentrações testados para a colheita das amostras.

REAGENTES	CONCENTRAÇÕES TESTADAS	TEMPOS TESTADOS
Colchicina	0,32 µg/mL, 0,64 µg/mL, 0,96 µg/mL e 10 µg/mL	30', 3h, 4h, 5h, 6h, 9h, 10h e 22h
Colcemid	10 µg/mL, 1 µg/mL e 0,5 µg/mL	1h, 2h, 3h, 4h, 17h
Cloreto de Potássio (KCl)	Solução I: 0,075 M Solução II: sol. I e meio IMDM em proporção 1:1 Solução III: sol. I e meio IMDM em proporção 2:1 Solução IV: 0,057 M	10', 15', 20' e 30'
Fixador: Metanol/Ácido Acético	3:1, 5:2, 1:1 e 2:1	10', 1h, 2h e 16h

Diferentemente das células de sangue periférico ou medula óssea, percebemos que as culturas com células aderidas necessitam de mais tempo com interruptor mitótico (colchicina ou colcemid) para compensar uma taxa de crescimento mais lenta. Porém, há um efeito dose-dependente, podendo o excesso alterar a qualidade dos cromossomos quanto ao comprimento, forma das cromátides e dispersão na lâmina. É recomendado o monitoramento do crescimento celular por microscópio invertido.

A etapa de hipotonização é extremamente importante para não gerar falsa interpretação de aneuploidias. Pouco tempo/concentração de hipotonia pode não ser suficiente para uma boa dispersão dos cromossomos metafásicos, resultando em muitas sobreposições cromossômicas, ao passo que o excesso pode fragilizar a membrana plasmática, permitindo, eventualmente, o rompimento e a perda de alguns cromossomos. A figura 3 é um exemplo de amostra com hipotonização por 10 minutos, com KCl 0,075M, mostrando cromossomos sobrepostos, impossibilitando a análise. A persistência de citoplasma nas metáfases das MSC foi resolvida com concentrações maiores de ácido acético nas últimas lavagens.

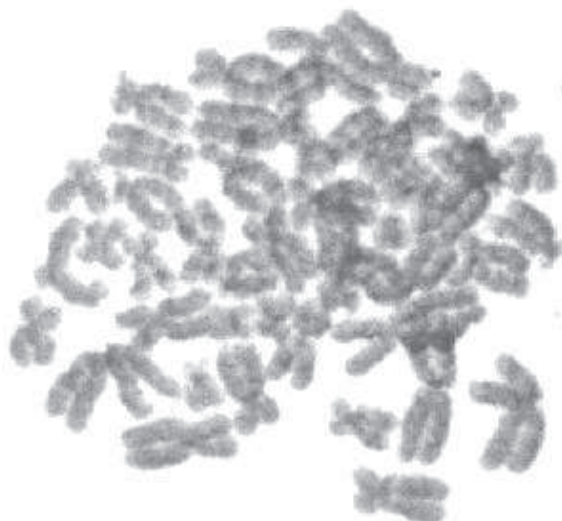


Figura 3: ME005 . Metáfase mostrando sobreposição de cromossomos, resultante do tempo de hipotonização de 10 minutos com solução de KCl 0,075 M.

Para o bandejamento GTG (banda G com Tripsina e Giemsa) também foram testados diversos reagentes, tempos e concentrações (tabela 3).

Tabela 3: Tempos e concentrações testados para bandejamento GTG

REAGENTES	CONCENTRAÇÕES TESTADAS	TEMPOS TESTADOS
Tripsina – tipo II	0,025%, 0,05%, 0,125% e 0,25%	1", 2", 4", 5", 8", 10", 20" e 60"
Tripsina – 1:250	0,025%, 0,05%, 0,125%, 0,25% e 0,2%	1", 2", 4", 5", 8", 10", 20" e 60"
Corante Giemsa	1:40 e 1:20	5', 6', 7', 8', 9' e 10'
Corante Wright	1:5 e 1:6	1'

Para o bandejamento GTG das MSCs foi necessária uma concentração de tripsina maior que na técnica usual, devendo ser de pelo menos 0,2 %, com o tempo variando de 5 a 20 segundos, dependendo do caso e das condições de preparo das lâminas. O tempo desta imersão é extremamente importante para a qualidade das metáfases, pois se expostos mais que o necessário, os cromossomos se danificam, prejudicando a análise. Na figura 4 são mostrados cromossomos bandeados com tempo e concentração ideal de tripsina. A coloração foi feita usando o corante Giemsa ou o corante Wright, dando origem

ao bandeamento GTG (com Tripsina e Giemsa) ou GTW (com Tripsina e Wright). Os resultados foram equivalentes.

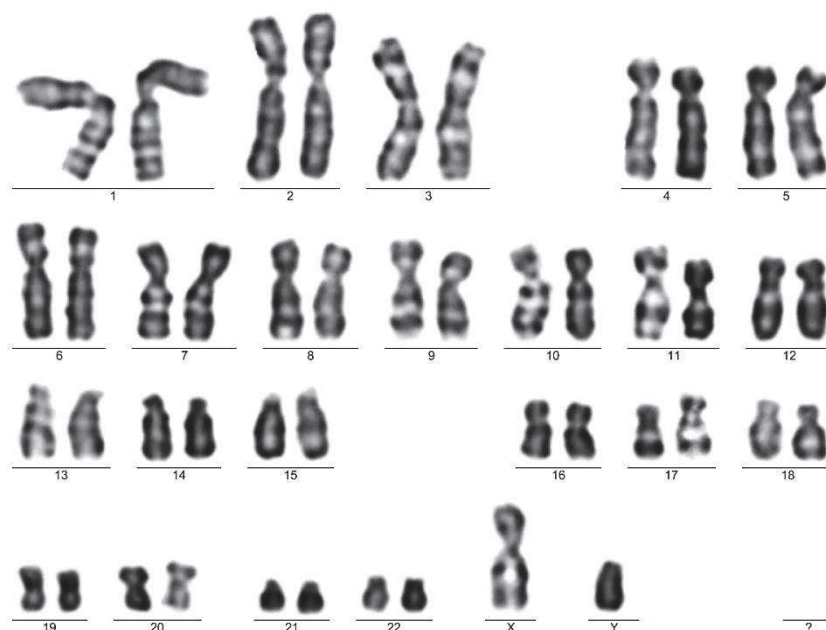


Figura 4: ME121 P6. Exemplo de cariograma normal, com carótipo: 46,XY. Amostra bandeada com tripsina 1:250 durante 5 segundos por lâmina e corada com corante Giemsa 0,2%, por 7 minutos.

3.2.1.2 PROTOCOLO PADRONIZADO

Independentemente da origem celular, para realizar a análise cromossômica, a colheita das amostras foi realizada em dois frascos de 150 cm² (comumente chamados de T150), com aproximadamente 80% de confluência, quando então foram submetidas as seguintes etapas:

INTERRUPÇÃO MITÓTICA

- adicionar colchicina (0,1 µg/mL) por 3 a 6 horas, monitorando as células em microscópio invertido

COLHEITA

- retirar o sobrenadante e lavar a garrafa com PBS, reservando-o em um tubo identificado

- adicionar 8 ml de tripsina/EDTA 0,25%
- manter 3 min a 37°C
- monitorar o descolamento das células em microscópio invertido
- adicionar 0,2 mL de soro e transferir para o tubo previamente identificado
- lavar a garrafa com PBS
- transferir este PBS para o mesmo tubo
- centrifugar 8 min. a 400g
- retirar sobrenadante

HIPOTONIZAÇÃO

- ressuspender células em 6 mL de KCl (0,057M) com Hepes, aquecido, adicionando lentamente
- manter 30 min. à 37°C

FIXAÇÃO

- adicionar 1mL de fixador 3:1(metanol/ácido acético), gelado
- centrifugar 8 min. a 400g
- desprezar sobrenadante e adicionar lentamente 5 mL de fixador gelado
- manter no mínimo 10 min a -5°C
- centrifugar 8 min a 400 g
- lavar com fixador 2:1 duas vezes
- transferir para um tubo criogênico previamente identificado
- armazenar a -20°C

PREPARO DAS LÂMINAS E BANDEAMENTO

- lavar individualmente e secar as lâminas
- descongelar e lavar o material com fixador 2:1
- pingar gotas da amostra sobre as lâminas em ambiente úmido, à 60°C (banho-maria)
- deixar evaporar por aproximadamente 10 min
- desidratar em estufa 60°C por 12 a 36 horas
- mergulhar cada lâmina em solução de tripsina 1:250 (0,2% em NaCl 0,9%) por cinco segundos
- lavar lâmina em solução SBF/NaCl (1:40)
- lavar lâmina com água destilada
- mergulhar lâmina em corante Giemsa (1:20 em solução de Sorensen) por 7 minutos

- enxaguar com água destilada e secar à temperatura ambiente

ANÁLISE MICROSCÓPICA

- localizar metáfases usando objetiva 10X
- avaliar e selecionar a metáfase com objetiva de 100X
- capturar e montar cariograma usando o programa LUCIA (*Laboratory Universal Computer Image Analysis*, do LIM – *Laboratory Imaging s.r.o*)
- anotar o cariótipo de cada célula na ficha de análise (anexo 1)
- analisar 20 metáfases e observar a presença de alterações clonais e não clonais
- revisar e concluir cariótipo final, conforme regras do *International System for Human Cytogenetic Nomenclature* (ISCN – 2013)
- elaborar laudo com cariótipo normal ou com aberrações clonais, se existentes.

3.2.2 HIBRIDIZAÇÃO *IN SITU* COM FLUORESCÊNCIA – FISH

3.2.2.1 PADRONIZAÇÃO DO PROTOCOLO E VALIDAÇÃO DAS SONDAS

Para padronização da técnica em MSCs foram utilizadas vários tipos de sondas (Cytocell): gene-específicas, pintura cromossômica, centroméricas e teloméricas. Foram realizados 24 testes em 8 amostras de medula óssea, 3 de sangue periférico e 13 de MSC. Foi aplicado o protocolo recomendado pelo fabricante, que funcionou bem, com pequenas adaptações, principalmente em relação à escolha da área da lâmina e à quantidade de sonda e do corante DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole).

Para a técnica de FISH, mais importante que a padronização, que foi muito mais fácil do que a padronização da cariotipagem, é fundamental que seja feita a validação pré-clínica das sondas. Mesmo as sondas comerciais, que são testadas e possuem uma eficácia comprovada pelo fabricante, a validação é uma etapa importante e que deve ser realizada em cada laboratório antes do uso clínico (WOLFF, *et al.* 2007). O principal ao se validar uma sonda é saber se, em amostras normais, existe a chance de encontrar sinais

anormais, e em qual porcentagem. Ao sabermos, por exemplo, que 5% das células normais exibem um determinado tipo de sinal anormal, saberemos, quando testarmos uma amostra, que só deverá ser valorizado um resultado acima de 5%.

O processo de validação seguiu as etapas indicadas pela literatura (WIKTOR *et al.*, 2006, SAXE *et al.*, 2012) onde busca-se a avaliação de:

- Sensibilidade da sonda: porcentagem de células em que a sonda hibridiza nos *loci* cromossômicos esperados (avaliado em metáfases)
- Especificidade da sonda: porcentagem de células em que a sonda só hibridiza nos *loci* cromossômicos esperados (avaliado em metáfases)
- Porcentagem de núcleos interfásicos que apresentam os sinais esperados

Foram validadas duas sondas, que detectam a presença ou ausência dos genes *TP53* e *RB1*. Para avaliação do gene *TP53* foi utilizada a sonda *Cytocell LPH017 TP53 deletion*, de sequência única, com sinal controle para o centrômero do cromossomo 17, como demonstrado na figura 5.

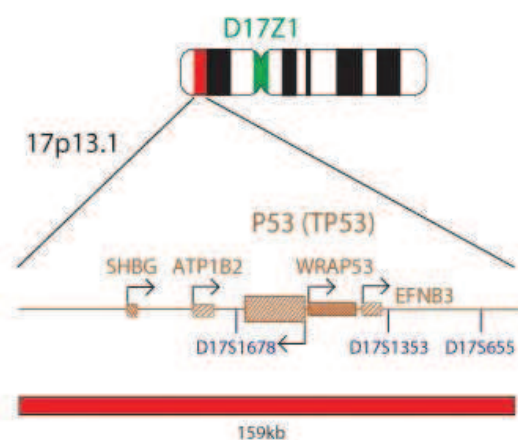


Figura 5: Localização do gene *TP53* (17p13.1, marcado em vermelho) e sinal controle no centrômero (D17Z1, marcado em verde) - sonda *Cytocell Deletion LPH 017*.
(Fonte: <http://cytoCELL.co.uk/>)

Neste caso, espera-se encontrar no núcleo interfásico e nas metáfases de células normais dois sinais vermelhos na região do gene, localizado no braço curto do cromossomo 17, e dois sinais verdes na região centromérica.

Para avaliação da presença ou ausência do gene *RB1* foi utilizada a sonda *Cytocell LPH013 RB1 deletion*. Esta sonda é de sequência única para o gene localizado no braço longo do cromossomo 13, como demonstrado na figura 6. Nas células normais, é possível observar dois sinais vermelhos na região do

gene e dois sinais verdes na região telomérica no cromossomo. Em casos de perda de um dos genes (alelo paterno ou materno) esperam-se encontrar dois sinais verdes e apenas um sinal vermelho em cada núcleo interfásico.

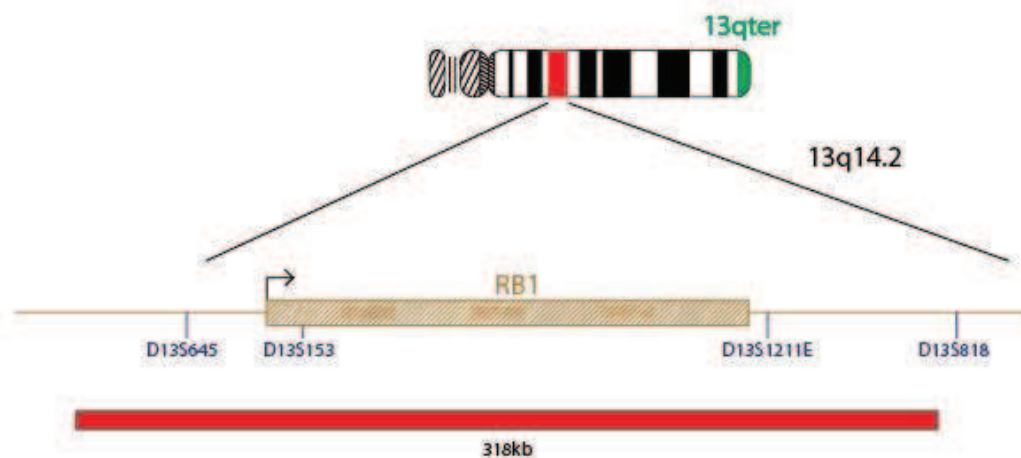


Figura 6: Localização do gene *RB1* (13q14.2, marcado em vermelho) e sinal controle no telômero (13qter, marcado em verde)- sonda *Cytocell Deletion* LPS 011.
(Fonte: <http://cytocell.co.uk/>)

Para esta validação foram utilizadas seis amostras de sangue periférico de indivíduos adultos normais, que demonstraram os sinais esperados: 2G2R (do inglês *Green* e *Red*) em cada núcleo ou metáfase analisada (figuras 7, 8 e 9). A perda de uma das cópias do gene (paterno ou materno) é visualizada com o resultado: 2G1R (2 verdes e 1 vermelho), como vemos na figura 10.

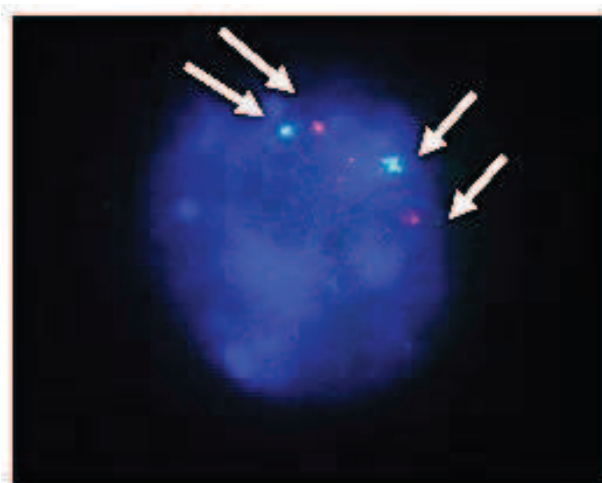
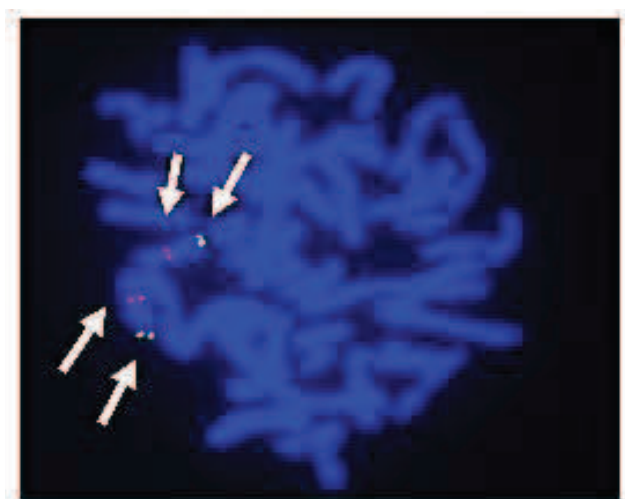


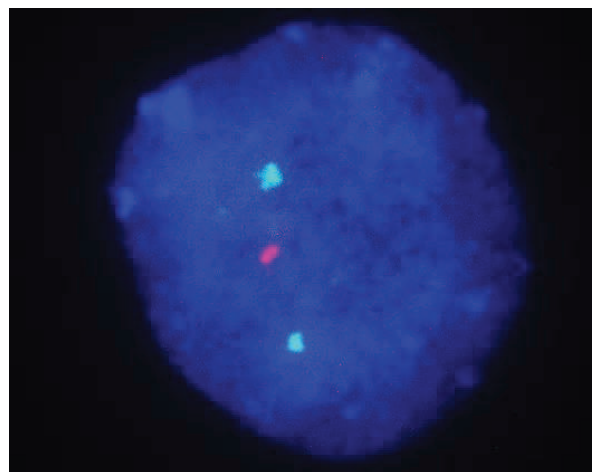
Figura 7: Núcleo interfásico. Sonda *TP53*.
Fonte: o autor



Figura 8: Metáfase. Sonda *TP53*.
Fonte: o autor



**Figura 9: Metáfase. Sonda *RB1*.
Resultado: 2G2R.
Fonte: o autor**



**Figura 10: Núcleo interfásico. Sonda *RB1*.
Resultado: 2G1R.
Fonte: o autor**

Todas as amostras obtiveram resultados normais (2G2R) na maioria dos núcleos interfásicos e das metáfases avaliadas (tabelas 4 e 5). Apenas duas células, na amostra SP013, mostraram outros tipos de sinais (1G2R e 0G2R) além do sinal normal esperado (2G2R) (anexo4).

Tabela 4: Tipos de sinais e número de metáfases avaliadas para sonda *TP53*

Amostras	Normal (2G 2R)	Anormal (2G 1R)	Outras
SP011	11	0	0
SP013	18	0	2
SP024	28	0	0
SP025	16	0	0
SP026	21	0	0
SP027	16	0	0
TOTAL	110	0	2

Tabela 5: Tipos de sinais e número de metáfases avaliadas para sonda *RB1*

Amostras	Normal (2G 2R)	Anormal (2G 1R)	Outras
SP011	19	0	0
SP013	12	0	0
TOTAL	31	0	0

A sensibilidade e especificidade da sonda são calculadas pela porcentagem de sinais normais esperados em metáfases normais. O *American College of Medical Genetics FISH Guidelines* (www.acmg.net) recomenda que a sensibilidade e especificidade da sonda sejam de pelo menos 98% (SAXE *et al.*, 2012). Dessa forma, é possível observar que ambas as sondas possuem uma ótima acurácia, o que significa que foram altamente sensíveis e específicas aos testes propostos, detectando os alvos cromossômicos esperados e hibridizando apenas nos *loci* cromossômicos corretos (tabela 6).

Tabela 6: Sensibilidade e Especificidade analítica das sondas *TP53* e *RB1*

	<i>TP53</i>		<i>RB1</i>	
	Núcleo Interfásico	Metáfases	Núcleo Interfásico	Metáfases
Sensibilidade	NA	98,2%	NA	100%
Especificidade	NA	100%	NA	100%
% de sinais esperados	84,10%	NA	91,80%	NA

NA: não avaliada porque não se aplica neste caso

Depois de avaliar o desempenho das sondas, a última etapa consiste na determinação dos valores de corte (*cut off*) que se espera que ocorra em 95% dos indivíduos saudáveis para cada tipo de sonda. Uma das alternativas para calcular este valor é por meio da função “beta inverso” (BETAINV) disponível no Microsoft Excel, capaz de determinar a frequência de resultados falsos positivos para cada padrão de sinal já pré-estabelecido (CIOLINO; TANG; BRYANT *et al.*, 2009, SAXE, *et al.*, 2012). As variáveis a serem inseridas na função incluem: probabilidade; parâmetro de distribuição associado à alfa de beta; “A” como um limite inferior opcional para o intervalo X; e “B” como um limite superior opcional para o intervalo X. Para completar a equação, a probabilidade é igual a 0,95; alfa é igual ao maior número de núcleos falso positivos + 1 encontrado em amostras normais ; beta é igual ao número total de células analisadas; “A” é igual a 0 ; e “B” é igual a 1. Por exemplo, na tabela 7, os valores máximos encontrados para o sinal 2G1R foram 3 e 4 (3+4=7), portanto BETAINV (0,95, 7+1, 200) = 6,3%.

Os valores de corte (Betainv%) encontrados neste teste de validação estão apresentados nas tabelas 7 e 8, para a sonda *TP53* e *RB1*, respectivamente.

Tabela 7: Resultados obtidos com a sonda TP53

sianis		SP011 ①	SP013 ②	SP024 ③	SP025 ④	SP026 ⑤	SP027 ⑥	Média	Mínimo	Máximo	Desvio Padrão	Betainv (%)
2G 2R	A1	74	78	94	84	77	84	81,8	74	94	7,2	
	A2	81	82	92	84	86	93	86,3	81	93	5,1	
	%	77,5	80	93	84	81,5	88,5	84,1	80	93	5,8	
2G 1R	A1	1	2	2	2	3	0	1,7	0	3	1,0	
	A2	4	4	1	2	3	2	2,7	1	4	1,2	
	%	2,5	3	1,5	2	3	1	2,2	1	3	0,8	6,3
1G 2R	A1	11	12	1	8	10	8	8,3	1	12	3,9	
	A2	7	9	2	6	9	2	5,8	2	9	3,2	
	%	9	10,5	1,5	7	9,5	5	7,1	1,5	10,5	3,4	13,4
2G 3R	A1	3	3	0	0	5	3	2,3	0	3	2,0	
	A2	3	1	0	2	0	3	1,5	0	3	1,4	
	%	3	2	0	1	2,5	3	1,9	0	3	1,2	5,6
1G 3R	A1	0	0	0	0	0	1	0,2	0	1	0,4	
	A2	0	0	0	0	0	0	0,0	0	0	0,0	
	%	0	0	0	0	0	0,5	0,1	0	0,5	0,2	2,3
1G 1R	A1	1	2	3	2	3	0	1,8	0	3	1,2	
	A2	2	0	3	1	1	1	1,3	0	3	1,0	
	%	1,5	1	3	1,5	2	0,5	1,6	0,5	3	0,9	5,6
4G 4R	A1	0	0	0	1	0	0	0,2	0	1	0,4	
	A2	1	0	0	0	1	0	0,3	0	1	0,5	
	%	0,5	0	0	0,5	0,5	0	0,3	0	0,5	0,3	3,1
4G 2R	A1	0	0	0	0	0	1	0,2	0	1	0,4	
	A2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0	
	%	0	0	0	0	0	0,5	0,1	0	0,5	0,2	2,3
2G4R	A1	0	0	0	0	1	0	0,2	0	1	0,4	
	A2	1	0	0	0	0	0	0,2	0	1	0,4	
	%	0,5	0	0	0	0,5	0	0,2	0	0,5	0,3	3,1
2G5R	A1	0	0	0	0	0	0	0,0	0	0	0,0	
	A2	0	2	0	0	0	0	0,3	0	2	0,8	
	%	0	1	0	0	0	0	0,2	0	1	0,4	3,1
3G2R	A1	0	2	0	0	0	1	0,5	0	2	0,8	
	A2	0	0	2	0	0	0	0,3	0	2	0,8	
	%	0	1	1	0	0	0,5	0,4	0	1	0,5	4,4
0G2R	A1	5	1	0	1	0	2	1,5	0	5	1,9	
	A2	1	2	0	4	0	0	1,2	0	4	1,6	
	%	3	1,5	0	2,5	0	1	1,3	0	3	1,3	7,4
0G1R	A1	2	0	0	1	0	0	0,5	0	2	0,8	
	A2	0	0	0	1	0	0	0,2	0	1	0,4	
	%	1	0	0	1	0	0	0,3	0	1	0,5	3,8
0G0R	A1	0	0	0	1	0	0	0,2	0	1	0,4	
	A2	0	0	0	0	0	0	0,0	0	0	0,0	
	%	0	0	0	0,5	0	0	0,1	0	0,5	0,2	2,3

A1= analisador 1, A2= analisador 2, G= green (sinal verde), R= red (sinal vermelho)

Tabela 8: Resultados obtidos com a sonda *RB1*

sinais		SP011 ①	SP024 ②	Média	Mínimo	Máximo	Desvio Padrão	Betainv (%)
2G 2R	A1	91	96	93,5	91	96	3,5	
	A2	86	94	90	86	94	5,7	
	%	88,5	95	91,8	88,5	95	4,6	
2G 1R	A1	2	1	1,5	1	2	0,7	
	A2	4	4	4	4	4	0,0	
	%	3	2,5	2,75	2,5	3	0,4	5,7
1G 2R	A1	1	2	1,5	1	2	0,7	
	A2	4	1	2,5	1	4	2,1	
	%	2,5	1,5	2	1,5	2,5	0,7	5,7
2G 3R	A1	4	2	3	2	4	1,4	
	A2	4	0	2	0	4	2,8	
	%	4	1	2,5	1	4	2,1	6,8
1G 1R	A1	1	1	1	1	1	0,0	
	A2	0	0	0	0	0	0,0	
	%	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,0	2,3
4G 4R	A1	1	0	0,5	0	1	0,7	
	A2	0	0	0	0	0	0,0	
	%	0,5	0	0,25	0	0,5	0,4	2,3
2G 5R	A1	0	0	0	0	0	0,0	
	A2	1	0	0,5	0	1	0,7	
	%	0,5	0	0,25	0	0,5	0,4	2,3
2G 0R	A1	0	0	0	0	0	0,0	
	A2	1	0	0,5	0	1	0,7	
	%	0,5	0	0,25	0	0,5	0,4	2,3

A1= analisador 1, A2= analisador 2, G= *green* (sinal verde), R= *red* (sinal vermelho)

Foi elaborada uma ficha de validação para ambas as sondas contendo todos os valores de corte aqui pré-estabelecidos e todas as informações descritas no catálogo da Cytocell (<http://cytocell.co.uk/>, acessado em julho de 2015) para as sondas *Cytocell LPH017 TP53 deletion* e *Cytocell LPH013 RB1 deletion* utilizadas (Anexos 4 e 5).

Conforme demonstrados nas tabelas acima, considerando os valores de corte de 6,3% calculado para o gene *TP53* (resultado 2G1R) e 5,7% para o gene *RB1* (resultado 2G1R), é possível concluir que é necessário um número mínimo de 13 das 200 células para o teste ser considerado positivo para perda o gene *TP53* e um mínimo de 12 das 200 células para o gene *RB1*. Estes valores serão utilizados quando o teste de FISH for realizado para investigação da presença das duas cópias do gene *TP53*, ou do gene *RB1*. Por exemplo: sabemos que nestas amostras normais, obtivemos um valor de corte de 5,7%

de células com sinal 2G1R, que corresponde à perda de uma das cópias do gene *RB1*; portanto, quando este teste for aplicado em alguma amostra com suspeita de perda de uma das cópias gênicas, o resultado somente será considerado “positivo” (com perda de uma das cópias) se a porcentagem de células 2G1R for superior a 5,7%, o que corresponde a pelo menos 12 células de um total de 200 analisadas.

3.2.2.2 PROTOCOLO PADRONIZADO

A técnica de FISH compreende as etapas de desnaturação, hibridização, lavagens de estringência e coloração, em dois dias consecutivos.

No primeiro dia as lâminas com as amostras já previamente fixadas foram lavadas com solução salina 2x SSC e, em seguida, foram desidratadas em uma série de soluções em etanol 70%, 85% e 100%, permanecendo durante 2 minutos em cada solução. Para a aplicação das duas sondas que foram validadas, *TP53* (Cytocell LPH017 – *TP53* deletion) e *RB1* (Cytocell LPH013 – *RB1* deletion), foram cuidadosamente selecionadas áreas estratégicas da lâmina que continham núcleos ou metáfases, observando ao microscópio com contraste de fase. Lâminas e sonda foram aquecidas a 37°C. Na área escolhida, em ambiente escuro, 5 µl de solução contendo as sondas foram aplicados em área previamente marcada com caneta de diamante ou usando lâmina branca como molde. Esta área foi então coberta com uma lamínula e selada com *rubber solution*. A lâmina foi então exposta a uma temperatura de 75°C durante 2 minutos para ocorrer a desnaturação, e então, incubada a 37°C, durante cerca de 18 horas, em ambiente escuro e úmido para que ocorresse a hibridização.

No segundo dia, as lâminas foram retiradas do hibridizador e levadas para um local escuro para que o *rubber solution* e as lamínulas fossem removidos. As lâminas então foram mergulhadas em solução 0,4x solução salina citratada (SSC) aquecida a 72°C durante 2 minutos e imersas em solução 2xSSC com 0,05% de Tween para que pudessem ser transportadas novamente para um local escuro. Após retirar as lâminas da solução transporte e esperar que todo o excesso de líquido tivesse escoado, era aplicado 5 µl de

solução DAPI com *antifade* no mesmo local anteriormente selecionado. O local foi coberto com uma lamínula, retiradas as bolhas e então permaneceu em local escuro, à temperatura ambiente, para posterior análise no microscópio de fluorescência. Após 24 horas, as lâminas foram estocadas a -20°C.

Para a interpretação das amostras de FISH, foi elaborada uma ficha de análise (anexo 6) onde foi estabelecido que no mínimo 100 células de cada amostra seriam avaliados no microscópio de fluorescência. Nesta ficha foi anotado quantos sinais verdes e quantos sinais vermelhos era possível observar em cada núcleo e em cada metáfase capturada.

A interpretação dos sinais e elaboração do resultado seguiu as normas previstas no *Guidelines and Quality Assurance for Acquired Cytogenetics* da *European Cytogeneticists Association* (HASTINGS *et al.*, 2013) e ISCN (2013) - *International System For Human Cytogenetic Nomenclature*.

3.2.3 TESTE DE INSTABILIDADE CROMOSSÔMICA COM DIEPOXIBUTANO -DEB

3.2.3.1 PADRONIZAÇÃO DO PROTOCOLO

Três amostras de MSC derivadas de medula óssea foram cultivadas até a segunda passagem (P2) para avaliação de duas variáveis:

- a - concentração final de DEB: 0,01µg/mL; 0,05µg/mL; 0,1µg/mL; 0,2µg/mL
- b- tempo de exposição ao DEB: 48 horas e 72 horas

A concentração de DEB foi uma preocupação importante porque a literatura recomenda uma diluição final de 0,01µl/mL para fibroblastos (BARCH; KNUTSEN; SPURBECK, 1997) e 0,1µl/mL para linfócitos (AUERBACH; ROGATKO; SCHROEDER-KURTH, 1989). Altas concentrações podem ser tóxicas para as células e levar à ausência de metáfases para análise, e baixas concentrações podem não ter efeito clastogênico suficiente para detectar o resultado desejado. As quatro diluições testadas mostraram, como era esperado, uma variação na quantidade de metáfases obtidas conforme mostrado no gráfico 1.

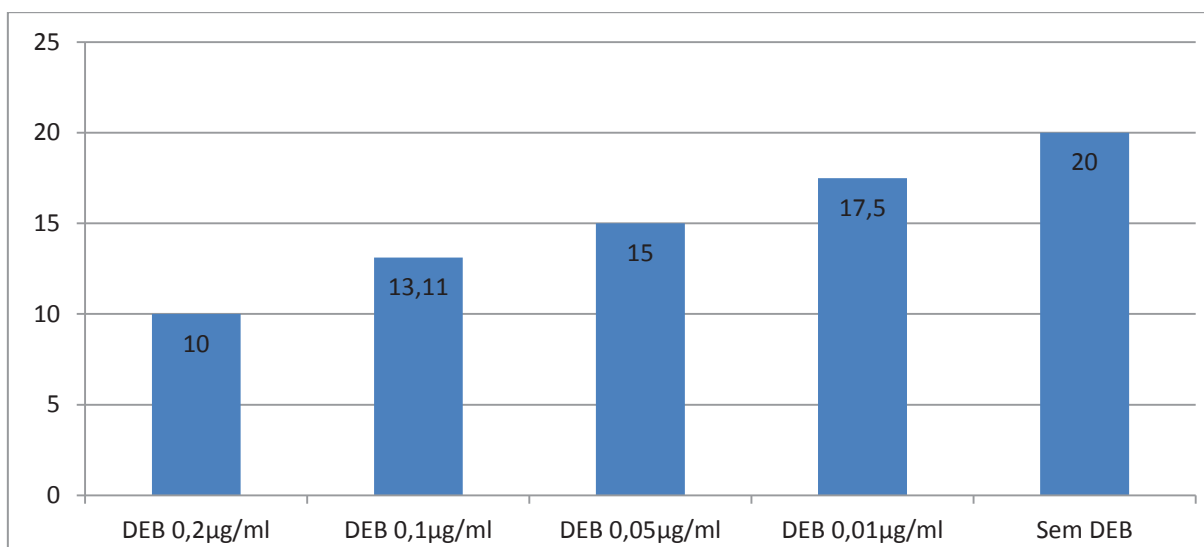


Gráfico 1: Média do número de metáfases obtidas por amostra de acordo com a diluição de DEB.

Portanto, a menor concentração de DEB permite um maior número de metáfases para análise. Na escolha do protocolo definitivo, foi mantida esta concentração (0,01 µg/mL) como também a concentração de 0,1 µg/mL, para verificar se a baixa concentração (0,01 µg/mL) não daria resultados falso-negativos.

Quanto ao tempo de exposição ao DEB, foi observado que um tempo prolongado prejudicou o crescimento celular, resultando em um menor número de metáfases, quando comparados 48 horas e 72 horas, e, portanto, foi escolhido o tempo de 48 horas.

3.2.3.2 PROTOCOLO PADRONIZADO

Este teste consiste na quantificação de quebras, comparando amostras que são mantidas em cultivo com e sem a presença do agente clastogênico, oferecendo, respectivamente, o resultado de quebras induzidas e quebras espontâneas. Para isto, 4 frascos de 25cm² (comumente chamados de T25) foram cultivados sem DEB e 8 são cultivadas com DEB (4 para cada concentração testada), conforme etapas a seguir:

CULTIVO CELULAR

- cultivar as MSCs até a segunda passagem e, quando as células atingem 80% de confluência, adicionar o DEB (0,01 µg/mL em 4 frascos e 0,1 µg/mL nos outros 4 frascos)

- manter o cultivo por mais 48h

INIBIÇÃO MITÓTICA E COLHEITA

- adicionar o inibidor mitótico (colchicina)

- seguir o mesmo protocolo de colheita previamente descrito para cariotipagem.

- confeccionar as lâminas em ambiente úmido, desidratá-las em estufa 60°C e corar com Giemsa (2/40) por 7 minutos

ANÁLISE MICROSCÓPICA

- realizar a análise em microscópio óptico com objetiva de 100X

- avaliar 60 metáfases: 20 da amostra com concentração 0,01µg/mL, 20 da amostra com concentração 0,1µg/mL, e 20 da amostra que não entrou em contato com o DEB (ficha de análise em anexo)

- anotar a frequência de quebras, falhas, figuras radiais e fragmentos encontrados em cada célula, identificados conforme observado na figura 11.



Figura 11: Exemplos de variantes cromossômicas: (a) cromossomo em anel, (b) dicêntrico, (c) fragmentos, (d) falha cromatídica, (e) quebras cromatídicas, (f) falha cromossômica, (g) quebra cromossômica, (h) figura triradial, (i) figura quadriradial e (j) rearranjo. (adaptado de Caputo, 2002)

Como critério para quantificação de sinais de instabilidade cromossômica foi utilizado o recomendado pelo Registro Internacional de Anemia de Fanconi (IFAR) e padronizado por Auerbach, Rogatko e Schroeder-Kurth (1989).

Cada tipo de alteração tem um valor correspondente, conforme quadro 2 a seguir:

Quadro 2: Valores atribuídos para cada alteração cromossômica, para cálculo do índice, recomendado pelo IFAR.

ALTERAÇÃO	VALOR
Falha	0
Quebra cromatídica	1
Quebra cromossômica	1
Fragmento acêntrico	1
Figura radial	2
Cromossomo em anel	2
Cromossomo dicêntrico	2

O índice de quebras por célula analisada define a positividade do teste e é calculado conforme a seguinte fórmula:

$$I = \frac{\text{Número total de quebras}}{\text{Número total de células analisadas}}$$

O **número total de quebras** corresponde à soma dos valores das alterações encontradas (quadro 1), por exemplo: numa amostra onde foram identificadas **18** quebras cromossômicas + **5** figuras radiais, o resultado do índice será 1,4 (considerando 20 células analisadas).

$$I = \frac{18 (18 \times 1) + 10 (5 \times 2)}{20} = \frac{28}{20} = 1,4$$

Indivíduos que apresentarem um índice médio variando entre 1,06 a 23,9 quebras por célula são considerados DEB+. Indivíduos normais apresentam índice de 0 a 0,36 (AUERBACH, 2015).

No mínimo duas metáfases de cada paciente foram selecionadas para captura e arquivamento em sistema de imagem.

A biossegurança durante a realização desta técnica merece uma atenção especial. Por ser um reagente extremamente tóxico, durante a utilização do DEB é essencial o uso de paramentação adequada com uso de jaleco, máscaras do tipo Respirador Multi-uso, com filtros para vapores orgânicos, óculos de proteção e luvas nitrílicas. Além disso, é indispensável o

uso da capela de exaustão durante o procedimento. Todo o material utilizado deve ser descartado em um frasco para descarte com tampa de rosca que contenha solução de ácido clorídrico a 6 M, para inativação do DEB (CAPUTO, 2002).

3.3 SUBDIVISÃO DO CULTIVO EM LONGO PRAZO

Para organizar os resultados, obtidos em diferentes passagens durante o cultivo das MSCs, dividimos o cultivo em longo prazo (considerado a partir de 72h) em três períodos de tempo, numa subdivisão semelhante à utilizada por BERNARDO *et al* (2007), ROEMELING-VAN RHIJN *et al* (2013) e CHEN *et al* (2014):

T1: Tempo de cultivo que corresponde às passagens **iniciais**, de P0 até P3, considerando que este é o tempo de cultivo utilizado nos protocolos clínicos, onde já é possível obter um número suficiente de células para aplicação terapêutica.

T2: Tempo de cultivo que corresponde às passagens **intermediárias**, de P4 até P10.

T3: Tempo de cultivo que corresponde às passagens **tardias**, a partir de P11, onde é comum observar sinais de senescência, como mudanças morfológicas das células (alteração de contorno e aumento de vacúolos citoplasmáticos) e diminuição do ritmo de crescimento (demora de mais de uma semana para atingir confluência).

3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para avaliar os resultados foram comparadas as amostras antes e após cultivo celular em longo prazo, e durante o cultivo em longo prazo prolongado (T1, T2 e T3). O teste do χ^2 foi utilizado para avaliar a significância das diferenças das distribuições dos números absolutos de quebras e falhas cromossômicas e cromatídicas e de células tetraploides em metáfases com e sem estas alterações. A frequência destas alterações também foi comparada, pelo mesmo teste, entre as diferentes fases do cultivo celular em longo prazo prolongado, ou seja, entre as fases iniciais, intermediárias e tardias. Valores de $P < 0,01$ indicaram significância estatística. Foram utilizadas as fórmulas apresentadas por Beiguelman (1988).

4 RESULTADOS

Do ponto de vista acadêmico, com a criação do Laboratório de Citogenética no Centro de Tecnologia Celular e a implementação das técnicas citadas na metodologia, esta tese possibilitou a colaboração e realização de vários trabalhos de iniciação científica, conclusão de curso, mestrado e pós-doutorado, resultando em 13 resumos apresentados em congressos nacionais e internacionais (anexo 7).

Um total de 47 pacientes com idade média de $51,02 \pm 11,9$ anos (de 16 a 69 anos) foram avaliados, dos quais 31 eram homens (proporção 1,94 M/1F). Deste total, 32 foram analisados antes da expansão celular (amostras de medula óssea), 40 foram analisados nas fases iniciais do cultivo (T1) e 13 foram analisados nas fases intermediárias (T2) e tardias (T3). Nestes últimos (T2 e T3) foi usado o termo: cultivo em longo prazo “prolongado”, significando que foram mantidos além das fases iniciais.

A tabela 9 indica quais amostras foram analisadas de cada paciente.

Para cada paciente, várias amostras foram analisadas. Por exemplo: em T1 foram analisadas 60 amostras de 40 pacientes.

Cada passagem foi considerada uma amostra. Por exemplo: o paciente 1 teve 4 amostras analisadas: medula óssea (MO), passagem 0 (P0), passagem 1 (P1) e passagem 2 (P2) (tabela 10).

Tabela 9: Amostras analisadas de cada paciente, antes e após a expansão celular

Paciente	Origem	Antes da expansão celular	Após expansão celular		
		MO	T1	T2	T3
1	MO	X	X		
2	MO	X	X		
3	MO	X	X		
4	MO	X	X	X	X
5	MO	X	X	X	
6	MO			X	
7	MO			X	X
8	MO	X	X		
9	MO	X	X		
10	MO	X	X		
11	MO	X	X		
12	MO	X	X		
13	MO	X	X		
14	MO	X	X		
15	MO	X	X		
16	MO	X	X	X	
17	MO	X	X		
18	MO	X	X		
19	MO	X	X		
20	MO	X	X		
21	MO	X	X		
22	MO	X	X		
23	MO	X	X		
24	MO	X	X		
25	MO	X	X	X	X
26	MO	X	X		
27	MO	X	X		
28	MO	X	X		
29	MO	X	X		
30	MO	X	X		
31	MO	X	X		
32	MO	X	X		
33	MO	X	X		
34	MO	X	X		
35	MO			X	X
36	TA		X		
37	TA		X		
38	TA		X		
39	TA		X		
40	TA		X		X
41	TA			X	X
42	TA				X
43	TA				X
44	TA				X
45	OD		X		
46	OD		X		
47	OD		X	X	X

MO –medula óssea; TA – tecido adiposo; OD – origem dental; T1- tempo de cultivo 1; T2- tempo de cultivo 2; T3 – tempo de cultivo 3; marcação em vermelho para amostras que apresentaram aberrações clonais.

Todas as tabelas e figuras apresentadas neste capítulo são do próprio autor, com exceção de algumas imagens de iPS, onde está citada a fonte. Os resultados serão demonstrados de acordo com cada uma das três técnicas utilizadas:

4.1 CARIOTIPAGEM COM BANDEAMENTO GTG

O número total de exames de cariotipagem realizados foi 190, sendo 32 em amostras de medula óssea e 158 em amostras de MSCs, em diferentes passagens (60 em T1, 42 em T2 e 56 em T3). O número de metáfases avaliadas através da montagem de kariograma foi: 612 em medula óssea, 803 em T1 e 563 em T2 e T3, totalizando 1978 metáfases, com uma média de $42,08 \pm 23,47$ por paciente.

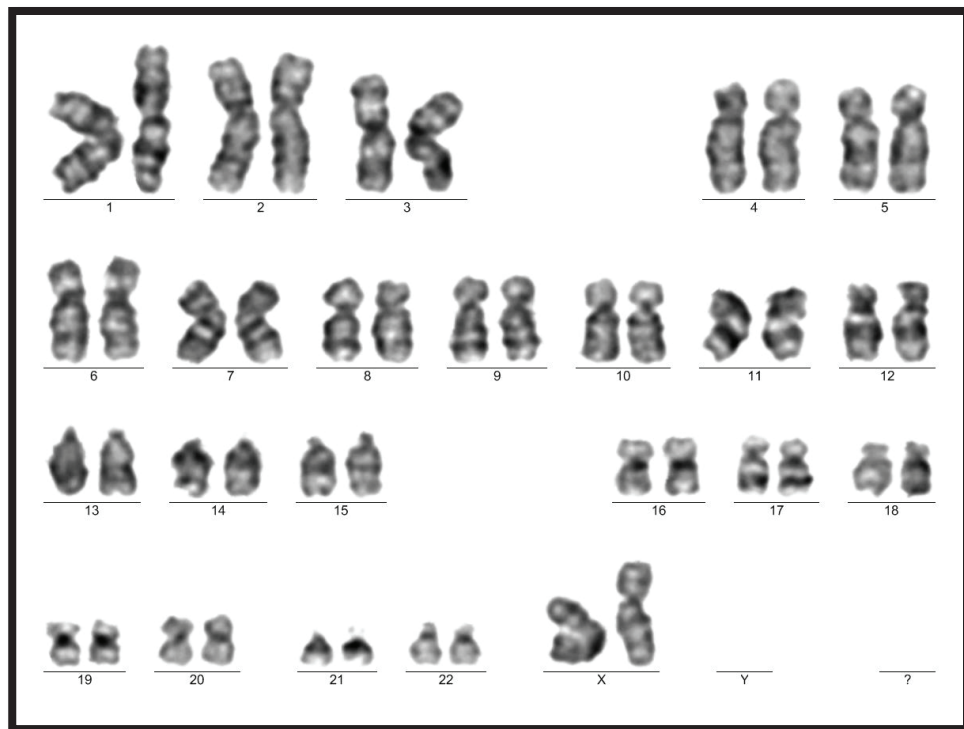
Metáfases foram obtidas com sucesso em todos os 47 pacientes.

Todas as amostras apresentaram monossomias não clonais que foram consideradas perdas cromossômicas ao acaso, conforme “definição de clone” estabelecida pelo ISCN-2013.

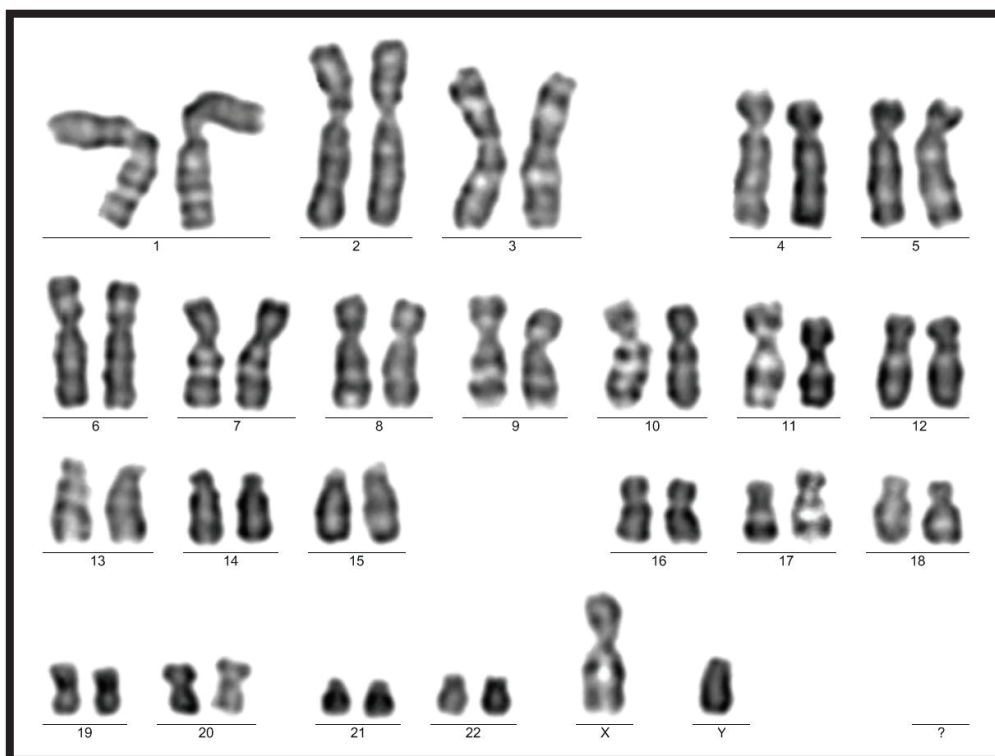
Apenas um caso apresentou aberrações cromossômicas clonais (caso 34) nas passagens iniciais (T1) e as células não foram utilizadas para o transplante (caso relatado no item 4.1.2).

Apenas um caso apresentou aberração cromossômica clonal (caso 42, relatado no item 4.1.4) nas passagens tardias (T3). As amostras em passagens intermediárias (T2) e tardias (T3) não se destinavam a transplantes.

Todos os casos restantes apresentaram cariótipo normal, tanto nas amostras de medula óssea (exemplo de kariograma na figura 12) quanto nas amostras de MSCs, cultivadas de P0 até P27 (exemplo de kariograma na figura 13).



**Figura 12 : Caso 21. Amostra MO011. Exemplo da cariograma de célula de medula óssea.
Cariótipo: 46,XX.**



**Figura 13 : Caso 41. Amostra ME121. Exemplo de cariograma de células-tronco mesenquimal (MSC) cultivada até a sexta passagem (P6).
Cariótipo: 46,XY.**

4.1.1 Células-tronco mesenquimais nas passagens iniciais (T1)

Quarenta (85%) dos 47 pacientes foram avaliados nas passagens iniciais. As amostras dos pacientes 6, 7, 35 e 41 foram avaliadas somente a partir das passagens intermediárias e dos pacientes 42, 43 e 44 somente nas passagens tardias. Para as MSCs originadas da medula óssea, foi possível comparar o cariótipo antes e após a expansão celular (tabela 10). Os resultados antes da expansão referem-se ao cariótipo obtido após o cultivo de curto prazo (16 horas) de células totais da medula óssea. Este resultado tinha por objetivo avaliar se os pacientes apresentavam cariótipo constitucional normal, ou se eram portadores de alguma translocação cromossômica balanceada, ou ainda, se eram portadores de alterações consideradas como variantes normais dentro da população, como por ex: heteromorfismos da região heterocromática dos cromossomos 1, 9 e 16, inversão da região heterocromática do cromossomo 9 e perdas do cromossomo Y (comuns em pacientes acima dos 55 anos). Um paciente apresentou inversão na região heterocromática do cromossomo 9.

Os resultados após expansão celular referem-se às MSCs após isolamento e cultivo conforme descrito na seção 3.1. Nas amostras após cultivo, em T1, apenas um (paciente 22) não apresentou metáfases (tabela 10).

Todos os pacientes mantiveram cariótipo normal após a expansão celular, nas fases iniciais do cultivo de MSCs (exemplo de cariograma na figura 13), com exceção do paciente 34, que será relatado no item 4.1.2. Todos os cariótipos estão apresentados na tabela 10.

As amostras dos pacientes 36 a 47 são derivadas de tecido adiposo ou origem dental. Nestes, somente foi possível realizar análise citogenética após a expansão celular.

Tabela 10: Cariótipos das amostras analisadas antes e após a expansão celular até T1

Paciente	Antes da expansão celular (medula óssea)	Após expansão celular (passagens iniciais – T1) (MSC em P0, P1, P2 e P3)	
	Cariótipo [número de metáfases analisadas]	Amostras analisadas (passagens)	Cariótipo [número de metáfases analisadas, somando as passagens]
1	46,XX[20]	P0,P1, P2	46,XX[15]
2	46,XY[35]	P0,P1, P2	46,XY[23]
3	46,XY[20]	P1, P2,P3	46,XY[22]
4	46,XY[12]	P0,P1,P2,P3	46,XY[17]
5	46,XY,inv(9)(p12q13)[15]	P0,P1,P3	46,XY,inv(9)(p12q13) [20]
8	46,XY[24]	P2	40~46,XY[32]
9	46,XY[10]	P2,P3	46,XY[15]
10	46,XX[8]	P0,P1, P2,P3	46,XX[11]
11	46,XY[18]	P1, P2,P3	46,XY[18]
12	46,XY[13]	P2,P3	46,XY[22]
13	46,XY[20]	P2	46,XY[20]
14	46,XY[20]	P2, P3	46,XY[40]
15	46,XX[20]	P2	46,XX[15]
16	46,XY[20]	P2	46,XY[20]
17	46,XY[20]	P2	46,XY[20]
18	46,XX[20]	P2	36~46,XX[20]
19	46,XY[20]	P2	46,XY[20]
20	46,XY[20]	P2	46,XY[20]
21	46,XX[20]	P2	46,XX[20]
22	46,XY[20]	P2	Sem metáfases
23	46,XY[10]	P2	46,XY[22]
24	46,XY[21]	P2	46,XY[20]
25	46,XY[20]	P2,P3	20~46,XY[45]
26	46,XX[20]	P2	46,XX[20]
27	46,XY[30]	P2	46,XY[20]
28	46,XY[20]	P2	46,XY[20]
29	46,XX[30]	P2	46,XX[21]
30	46,XY[20]	P2	46,XX[20]
31	46,XY[20]	P2	46,XY[20]
32	46,XY[6]	P2	46,XY[24]
33	46,XY[20]	P2	46,XY[20]
34	46,XY[20]	P2	43~52, XY,+X,+4,+5,+10[cp4]/46,XY[18]
36	NA	P2	46,XX[15]
37	NA	P2	46,XY[12]
38	NA	P2	46,XY[20]
39	NA	P3	46,XX[20]
40	NA	P2	46,XX[20]
45	NA	P3	30~46,XX[20]
46	NA	P3	36~46,XX[16]
47	NA	P3	46,XY[20]
Total	612		803
média	$\bar{x} = 19,1 \pm 5,95$ (612/32)		$\bar{x} = 20,1 \pm 6,95$ (803/40)

P- passagem; T1 – tempo de cultivo 1 (passagens iniciais) NA – não analisada

Além das aberrações numéricas ou estruturais clonais, que foram encontradas somente no paciente 34, também foi investigada a presença de sinais de instabilidade cromossômica, como: cromossomo em anel, cromossomo dicêntrico, figuras radiais, quebras cromossômicas ou cromatídicas (representados com os símbolos em inglês *chr**b*- *chromosome break* e *cht**b* – *chromatid break*), falhas cromossômicas ou cromatídicas (representados com os símbolos em inglês *chr**g*- *chromosome gap* e *cht**g* – *chromatid gap*), e presença de células tetraploides (4n). Destes sinais, três tipos foram observados espontaneamente (sem a presença de agente clastogênico) em nossa amostra: quebras, falhas e células tetraploides (figura 14, 15, 16, 17 e 18), tanto antes como após a expansão celular (tabela 11).

Foram observados sinais de instabilidade cromossômica em 27 (67,5%) dos 40 pacientes analisados até T1. De um total de **1435** metáfases analisadas foram detectados 66 sinais (4,59%), numa frequência de 1,92% antes da expansão celular (12 sinais em 625 metáfases) e 6,67% após a expansão celular (54 sinais em 810 metáfases) (tabela 11)

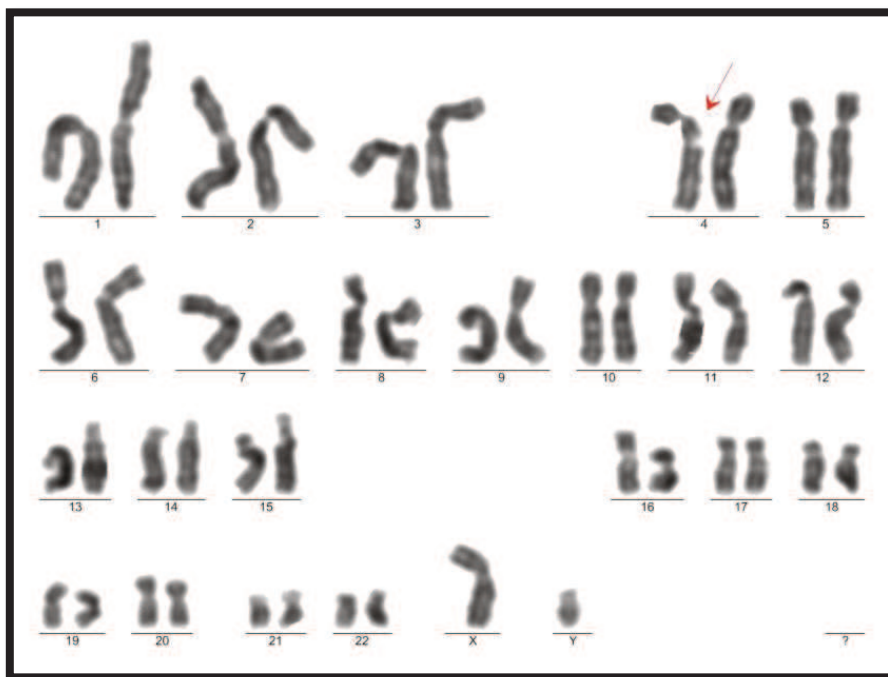


Figura 14: Caso 35. Amostra ME112. Quebra no braço longo do cromossomo 4 (seta vermelha).



Figura 15: Caso 44. Amostra ME143. Falhas cromatídicas observadas na metáfase (setas vermelhas).

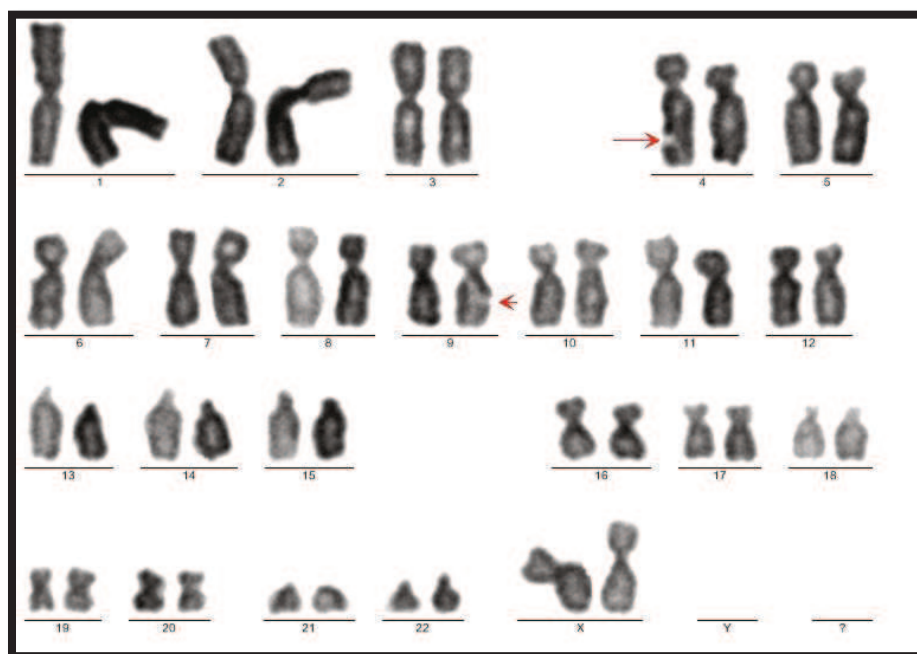


Figura 16: Caso 44. Amostra ME143. Falhas cromatídicas observadas no kariograma, nos braços longos dos cromossomo 4 e 9 (setas vermelhas).

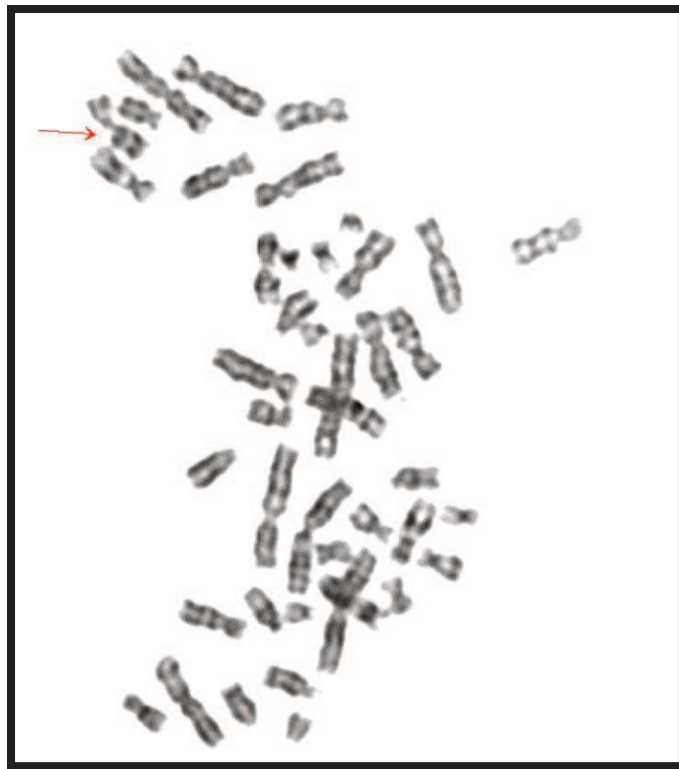


Figura 17: Caso 23. Amostra ME057. Quebra no braço longo do cromossomo 9 (seta vermelha).

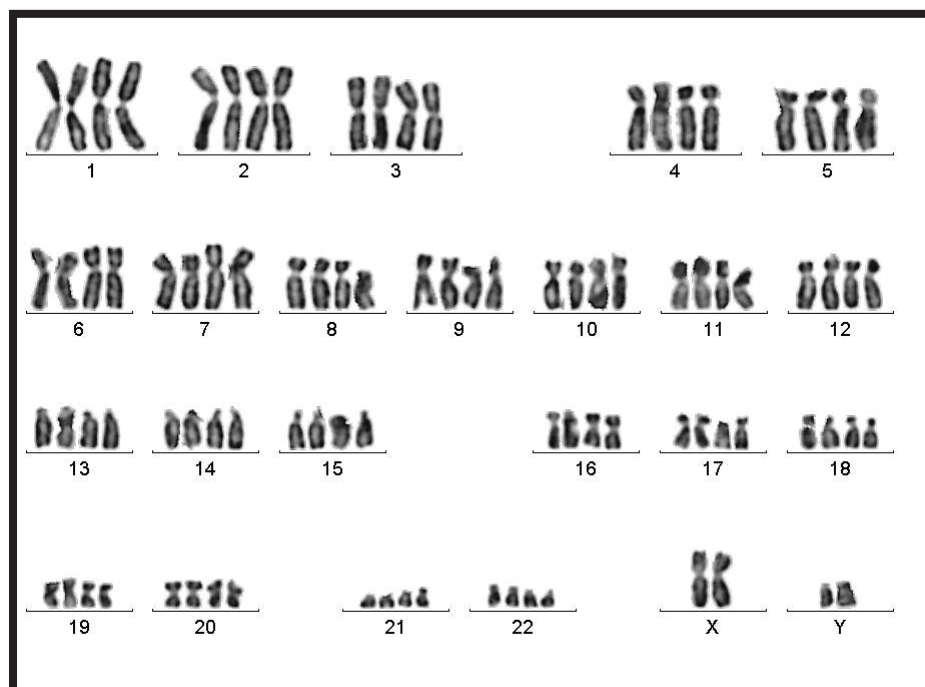


Figura 18: Caso 35. Amostra ME106. Célula tetraplóide. Cariótipo 92,XXYY.

Tabela 11: Frequências de quebras e falhas (cromossômicas e cromatídicas) e células tetraploides

Paciente	Antes da expansão celular (medula óssea)			Após expansão celular (MSC em P0,P1,P2 e P3)		
	Quebras – chtb e chrb	Falhas – chtg e chrg	Tetraploides	Quebras – chtb e chrb	Falhas – chtg e chrg	Tetraploides
1						1/3
2						
3						
4						
5						1/16
8						
9						
10						
11						
12						
13		chtg (13q) 1/20		chrb (9q) 1/20		
14	chrb (3q) 1/20		1/21			2/22
15			1/21			
16			3/23			
17			1/21	chrb(10q) 1/20		1/21
18						2/20
19						
20	chrb(10q) 1/30					1/21
21				chrb(1q) chrb(22q) 2/20		
22						
23	Chrb(5q)1/10]			chrb(1p) chrb(5q) chrb(9q) chrb(7p) 4/22		
24				chrb(6q) 1/20	chtg(8q) 1/20	1/21
25						
26						
27		Chrg(13q)1/30		chrb(17q) chrb(5q) 2/20		2/22
28					chtg(4q) 1/20	
29				chrb(6q) 1/21	chtg(14q) chrg(3P) 2/21	
30					chtg(13q) 1/20	1/21
31				chrb(14q) 1/20		
32				chrb(7q) chrb(12q) chrb(2p) chrb(6p) 4/24	chtg(13q) 1/24	
33				chrb(13q) 1/24		5/25
34	chrb(13q) 1/20					
						1/27 2/15
				chrb(18q) 1/13		1/11
36						
37						
38						
39				chrb(13q) 1/20		3/23
40				chrb(1p) 1/20		2/22
45						
46				chrb(11q) 1/10		
47						
TOTAL	4	2	6	22	6	26
Frequência	4/625=0,006	2/625=0,003	6/625=0,009	22/810=0,03	6/810=0,007	26/810=0,03

chrb-*chromosome break*, chtb- *chromatid break*, chrg- *chromosome gap*, chtg – *chromatid gap*,
p - braço curto do cromossomo, q - braço longo do cromossomo

As quebras e falhas, cromossômicas e cromatídicas, estavam distribuídas em diversos cromossomos, tanto no braço curto (p) como no braço longo (q). Nas células de medula óssea foram observadas 3 quebras e 2 falhas nas regiões 3q, 5q, 10q e 13q. Nas MSCs em T1 foram observadas 23 quebras e 6 falhas nas regiões: 1p, 1q, 2p, 3p, 3q, 4p, 5q, 6p, 6q, 7p, 7q, 8q, 9q, 10q, 11q, 12q, 13q, 14q, 17q, 19q e 22q.

Comparando o total dos valores absolutos de metáfases com e sem alterações, observados antes e após a expansão celular, em cada uma das alterações (quebras, falhas e células tetraploides), conforme os dados apresentados na tabela 11 verificou-se que as quebras e as células tetraploides não se distribuíram igualmente, mostrando o aumento de células com alterações após a expansão celular (tabela 12)

Tabela 12: Análise estatística da frequência de quebras, falhas e células tetraploides antes e após a expansão celular.

	Antes da expansão celular	Depois da expansão celular	χ^2	P
n (pacientes)	32	40		
Metáfases	625	810		
Frequência de quebras por metáfase	0,006 (4/625)	0,030 (22/810)	8,55	P<0,01
Frequência de falhas por metáfase	0,003 (2/625)	0,007 (6/810)	1,13	P>0,20
Frequência de 4n por metáfase	0,009 (6/625)	0,030 (26/810)	8,19	P<0,01
Total (quebras+falhas+4n)	0,019 (12/625)	0,067 (54/810)	14,05	P<0,001

4.1.2 O caso 34

Somente este caso, de um total de 47, apresentou aberração clonal nas fases iniciais do cultivo (T1) e esta amostra não foi utilizada para transplante celular. O paciente (MSS) relata história de nefrectomia por causa de um tumor maligno no rim direito detectado aos 45 anos de idade e, aos 54 anos, foi diagnosticado com infarto de miocárdio, quando então foi realizada uma cirurgia de revascularização do miocárdio. Em, 2014, aos 67 anos de idade, o paciente apresentava queixa de dor precordial, várias vezes ao dia, que aliviava com uso de vasodilatadores. A cintilografia mostrou hipocaptação moderada e transitória (isquemia) em região anteroseptal média e basal do ventrículo esquerdo. Foi então acompanhado e selecionado para um tratamento com MSCs, no projeto “Transplante autólogo de células mesenquimais cultivadas e expandidas no tratamento da cardiomiopatia isquêmica grave e refratária” (projeto D, descrito na seção 2.1). Para obtenção das células-tronco foram colhidos 135 mL de medula óssea. Após isolamento, foram obtidas 808×10^6 células mononucleares. Parte destas células foram cultivadas numa densidade de 2×10^6 por mL e o restante foi congelado para *backup*.

A análise citogenética foi realizada na amostra antes do cultivo (medula óssea) e após o cultivo (MSCs). As células de medula óssea apresentaram cariótipo normal: 46,XY[20] (Fig19).

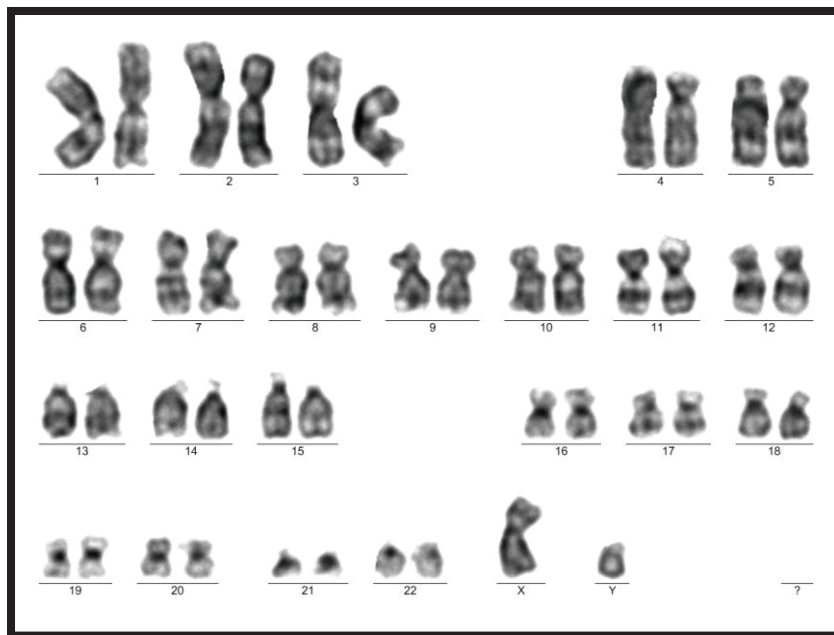


Figura 19: Caso 34. Amostra MO030. Exemplo de cariógrama de células de medula óssea, antes da expansão celular. Cariótipo: 46,XY.

Após quatro semanas, uma amostra das MSCs, que estava em P2, foi encaminhada para o Laboratório de Citogenética. A análise cromossômica com bandeamento GTG mostrou um clone hiperdiplóide, com cariótipo composto: 43~52,XY,+X,+4,+5,+10[cp4]/46,XY[18], e trissomias não clonais: +2,+12,+20 (fig 20). Considerando estes resultados, a equipe decidiu não realizar a infusão destas células no paciente que aguardava o tratamento.

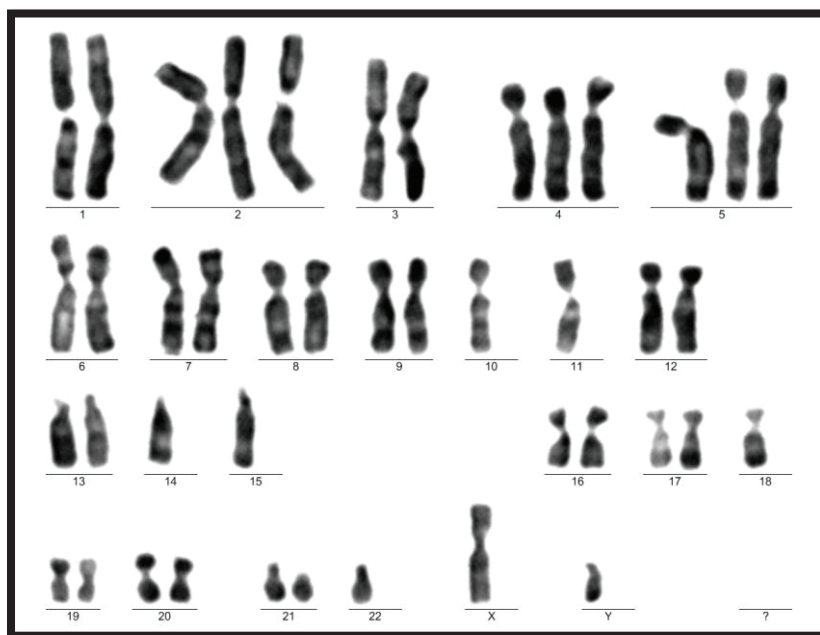


Figura 20: Caso 34. Amostra ME147. Cariograma de MSC na segunda passagem (P2). Cariótipo: 43,XY,+2,+4,+5,-10,-11,-14,-15,-18,-22.

Embora a amostra não tenha sido utilizada para transplante, as células foram mantidas em cultivo para avaliação da manutenção do clone aberrante. Em P4 e em P5 o cariótipo estava normal: 46,XY[26] e 44~46,XY[13], respectivamente (fig 21)

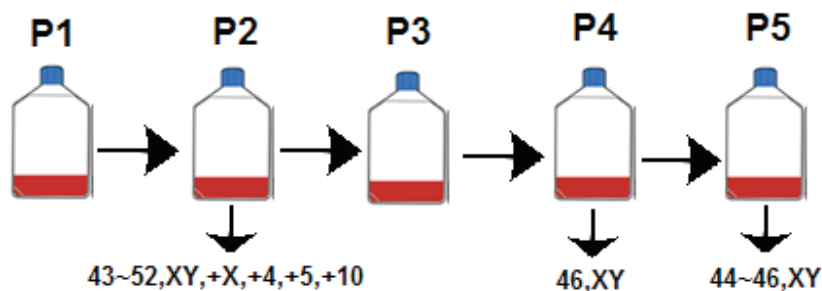


Figura 21: Primeiro cultivo da amostra ME147. Em P2 foram observadas trissomias clonais +X, +4, +5 e +10. Em P4 e P5 estas alterações não foram mais detectadas.

Para poder investigar melhor esta evidência de instabilidade, foi descongelada outra amostra de células, do mesmo paciente, que havia sido reservada para *backup*. Um segundo cultivo então foi realizado e, na terceira passagem (P3), as células não mostraram mais o clone hiperdiploide que havia surgido no primeiro cultivo, mas, ao invés disso, mostraram uma translocação clonal, aparentemente balanceada: $46,XY,t(9;18)(p24;q11)[8]/46,XY[5]$ (fig 22, 23 e 24). Na continuação do cultivo, em P5, o cariótipo foi: $26\sim44,XY[10]$.

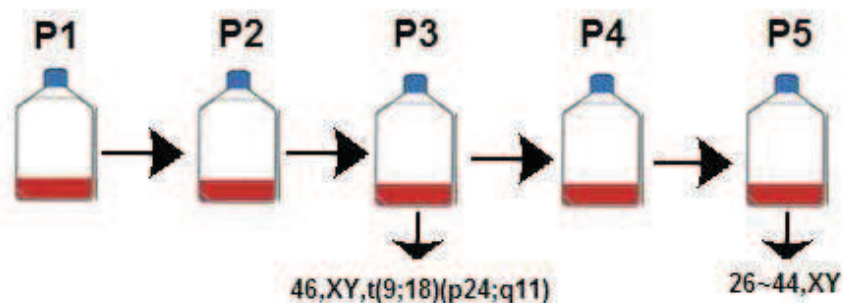


Figura 22: Segundo cultivo da amostra ME147. Em P3 foi observada uma translocação $t(9;18)(p24;q11)$. Em P5 esta alteração não foi mais detectada.



Figura 23: Caso 34. Amostra ME161. Cariograma de MSC do segundo cultivo, na terceira passagem (P3), metáfase 1. Cariótipo: 46,XY, t(9;18)(p24;q11).

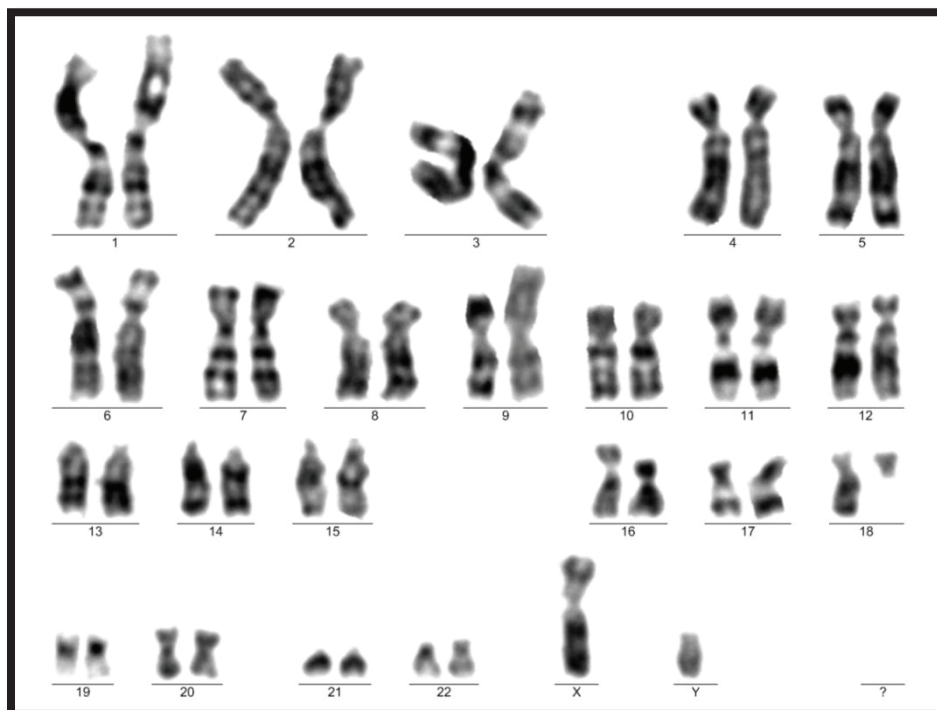


Figura 24: Caso 34. Amostra ME161. Cariograma de MSC do segundo cultivo, na terceira passagem (P3), metáfase 13. Cariótipo: 46,XY, t(9;18)(p24;q11).

4.1.3 Células-tronco mesenquimais cultivadas até as passagens tardias (T1, T2 e T3)

Treze (28%) dos 47 casos foram cultivados além das fases iniciais (T2 e T3). Como esperado, a obtenção de metáfases foi cada vez mais difícil ao longo do cultivo, pois o crescimento celular é cada vez mais lento, até entrar em senescência (anexo 8). Um resumo dos resultados das células cultivadas em T1, T2 e T3, está apresentado abaixo, em relação ao número de metáfases (tabela 13) e frequências dos sinais de instabilidade (tabelas 14, 15 e 16)

Tabela 13: Número de metáfases analisadas no cultivo em longo prazo: T1, T2 e T3

	T1	T2	T3	Média geral	Total
n	6	9	11		13
Número de metáfases analisadas	142	241	322		705
Média de metáfases por paciente	23,66	26,78	29,27	705/13= 54,23±35,66	
Número de passagens avaliadas (soma das amostras dos pacientes)	12	42	56		110
Média de metáfases por passagem avaliada	11,28	5,74	5,75	705/110= 6,41±7,15	

Para o cálculo das frequências dos sinais de instabilidade (quebras, falhas e células 4n), foi excluído um paciente do T3 (paciente 5) porque este não apresentou nenhuma metáfase nesta fase do cultivo, embora tenham sido avaliadas duas passagens. Também foram excluídas as passagens nas quais não obtivemos metáfases (duas em T1, doze em T2 e vinte e duas em T3), (anexos 9 e 10). O resumo destes resultados está apresentado nas tabelas 14 e 15.

Na tabela 14, observa-se que o número absoluto de quebras aumenta de T1 para T3, tanto nas metáfases como nas passagens (e nestas também as frequências) analisadas. No entanto a distribuição dos valores observados não apresentou diferenças estatisticamente significantes nas metáfases e nas passagens com e sem quebras em T1, T2 e T3 ($\chi^2_2=2,21$; $P>0,30$ e $\chi^2_2=1,18$; $P>0,50$, respectivamente para metáfases e para passagens).

Tabela 14: Frequência de quebras cromossômicas e cromatídicas no cultivo em longo prazo: T1, T2 e T3

	T1	T2	T3	Média geral	Total
n	6	9	11-1=10		13
Número de metáfases analisadas	142	241	322		705
Frequência de quebras por metáfases	1/142= 0,007	7/241= 0,029	9/322= 0,028	17/705= 0,024	
Número de passagens avaliadas (soma das amostras dos pacientes)	12 – 2 = 10	42-12= 30	56-22= 34		110-36= 74
Frequência de quebras por passagem	1/10= 0,10	7/30= 0,23	9/34= 0,26	17/74 = 0,23	

Os resultados observados para falhas (tabela 15) apresentaram o mesmo comportamento dos detectados para quebras (tabela 14), com o número absoluto e as frequências aumentando de T1 para T3, sem que as diferenças tenham sido estatisticamente significantes, tanto para metáfases ($\chi^2_2=3,40$; $P>0,10$) como para passagens ($\chi^2_2=3,33$; $P>0,10$).

Tabela 15: Frequência de falhas cromossômicas e cromatídicas no cultivo em longo prazo: T1, T2 e T3

	T1	T2	T3	Média geral	Total
n	6	9	11-1=10		13
Número de metáfases analisadas	142	241	322		705
Frequência de falhas por metáfases	0/142= 0,00	3/241= 0,012	7/322= 0,022	10/705= 0,014	
Número de passagens avaliadas (soma das amostras dos pacientes)	12 – 2 = 10	42-12= 30	56-22= 34		110-36= 74
Frequência de falhas por passagem	0/10= 0,00	3/30= 0,10	7/34= 0,21	10/74= 0,135	

Para o cálculo da frequência de células 4n foram somadas as metáfases 4n às metáfases completamente analisadas, por exemplo: no paciente 40, em P2, foram vistas 3 células 4n além das 20 metáfases completamente

analisadas, portanto a frequência de células 4n foi 3/23 e não 3/20 (anexo 11). A tabela 16 apresenta estes resultados resumidamente.

A distribuição dos valores observados não apresentou diferenças estatisticamente significantes nas metáfases e nas passagens com e sem células tetraploides em T1, T2 e T3. ($\chi^2_2=0,14$; $P>0,90$ e $\chi^2_2=0,76$; $P>0,50$, respectivamente para metáfases e para passagens).

Tabela 16: Frequência de células tetraploides (4n) no cultivo em longo prazo: T1, T2 e T3

	T1	T2	T3	Média geral	Total
n	6	9	11-1=10		13
Número de metáfases	142 + 4 = 146	241+8= 249	322+9 = 331		705+21 =726
Frequência de 4n por metáfases	4/146 = 0,027	8/249= 0,032	9/331= 0,027	21/726= 0,029	
Frequência de 4n por paciente	2/6 =0,33	5/9= 0,55	5/10= 0,50		9/13= 0,69
Número de passagens avaliadas (soma das amostras dos pacientes)	12 – 2 = 10	42-12= 30	56-22= 34		110-36= 74
Frequência de 4n por passagem	4/10= 0,40	8/30= 0,27	9/34= 0,26	21/74= 0,28	

O resumo da análise estatística das frequências de quebras (tabela 14), falhas (tabela 15) e células tetraploides (tabela 16) está apresentado na tabela 17.

Tabela 17: Frequência de quebras, falhas e células tetraploides (4n), por metáfase, no cultivo em longo prazo: T1, T2 e T3

	T1	T2	T3	Média geral	Total	χ^2	P
n (pacientes)	6	9	10		13		
Amostras (passagens)	10	30	34		74		
Metáfases	142	241	322		705		
Frequência de quebras por metáfase	0,007	0,029	0,028	0,024		2,21	P>0,30
Frequência de falhas por metáfase	0,00	0,012	0,022	0,014		3,40	P>0,10
Frequência de 4n por metáfase	0,027	0,032	0,027	0,029		0,14	P>0,90

A localização de quebras e falhas ao longo das passagens (T1, T2 e T3) mostrou recorrência (duas repetições ou mais) nos cromossomos 4, 8, 9, 11, 12 e 13 (anexo 12).

4.1.4 O caso 42

Amostras de MSCs derivadas de tecido adiposo do paciente TAMC, (do projeto F), onde as células foram doadas para pesquisa experimental, foram avaliadas nas passagens P17, P19, P22, P24, P26 e P27. Na passagem P24 (ME154) observou-se uma aberração cromossômica clonal: material adicional no braço curto do cromossomo 1, em 6 das 8 metáfases analisadas (figura 25). Esta aberração não estava presente nas amostras das passagens anteriores.

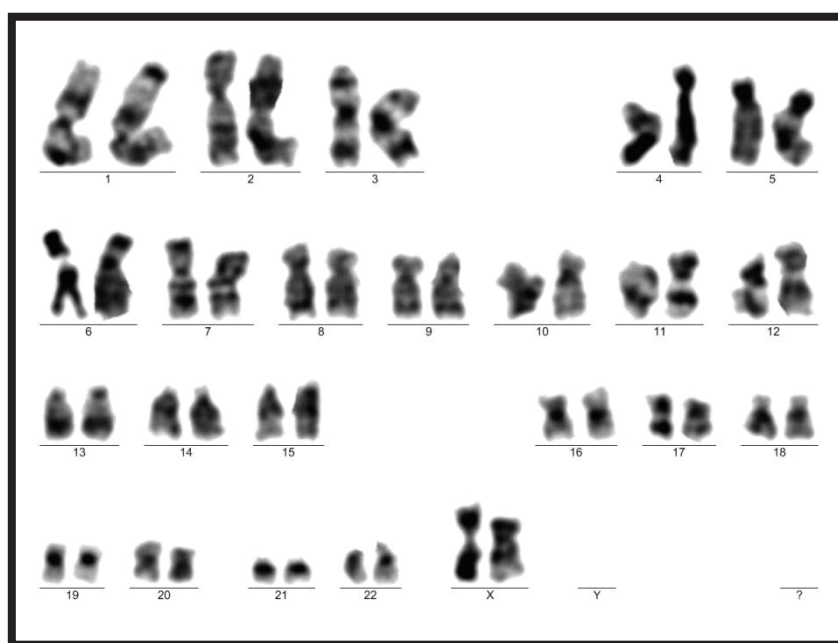


Figura 25: Caso 42. Amostra ME154. Cariograma de MSC na 24ª passagem (P24), metáfase 5. Cariótipo: 46,XX, add(1)(p36)

4.1.5 Células-tronco Pluripotentes Induzidas (iPS)

As linhagens de iPS foram geradas conforme descrito no item 3.1.4. com o vetor hSTEMCAA. Os fibroblastos foram transduzidos e as colônias começaram a surgir aproximadamente após 12 dias, quando então os clones foram selecionados (fig 26).

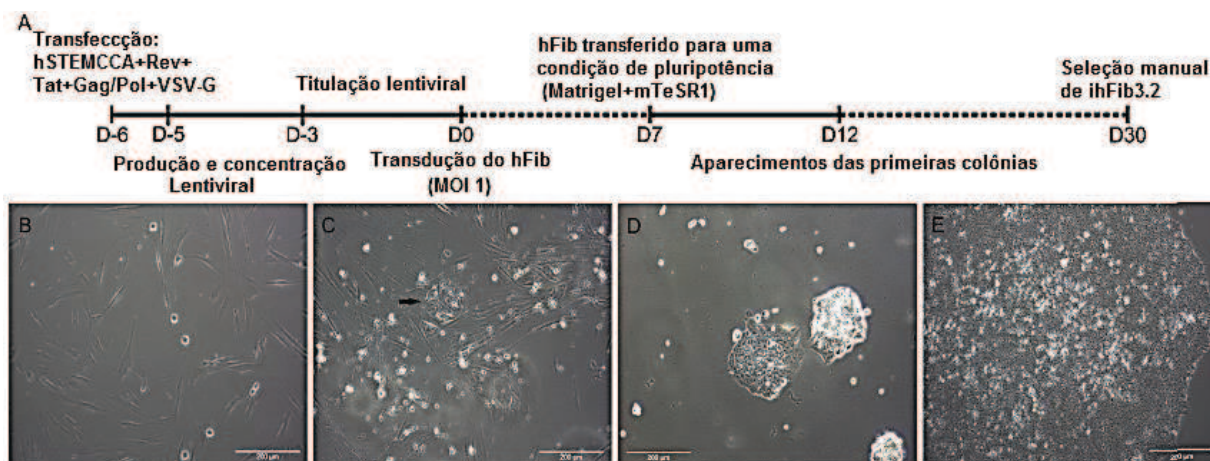


Figura 26: A) Protocolo para geração de iPS. B) Fibroblastos 24 horas depois da transdução C) Colônias. (D) clones selecionados. (E) ihFib3.2 depois de 6 passagens.

Fonte: Mesquita *et al*, 2015.

A expressão dos marcadores de pluripotência foi confirmada por RT-PCR (fig 27), por citometria de fluxo (fig 28) e por imunofluorescência (fig 29).

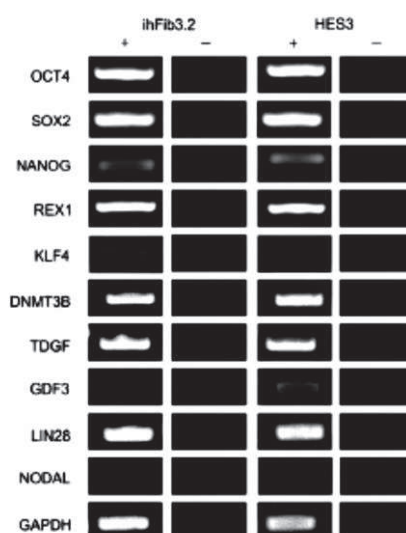


Figura 27: Expressão de moléculas relacionadas à pluripotência por RT-PCR. GAPDH foi usado como controle endógeno e a linhagem embrionária humana HES3 foi usada como controle positivo.

Fonte: Mesquita *et al*, 2015.

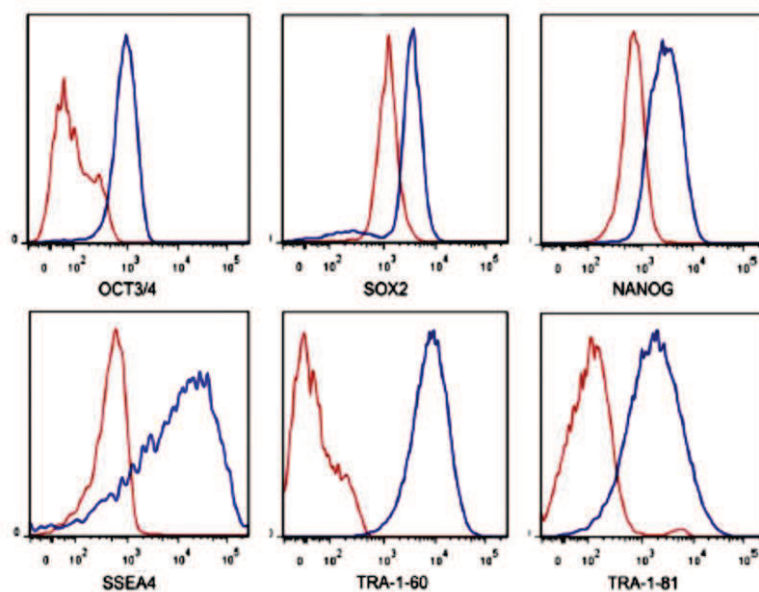


Figura 28: A avaliação por citometria de fluxo mostrou presença de altos níveis de OCT4 (90,7%), SOX2 (84,7%), NANOG (97,7%), SSEA4 (78,5%), TRA-1-60 (98,2%) and TRA-1-81 (79,2%). Histogramas em vermelho representam isótipos controles.
Fonte: Mesquita *et al*, 2015.

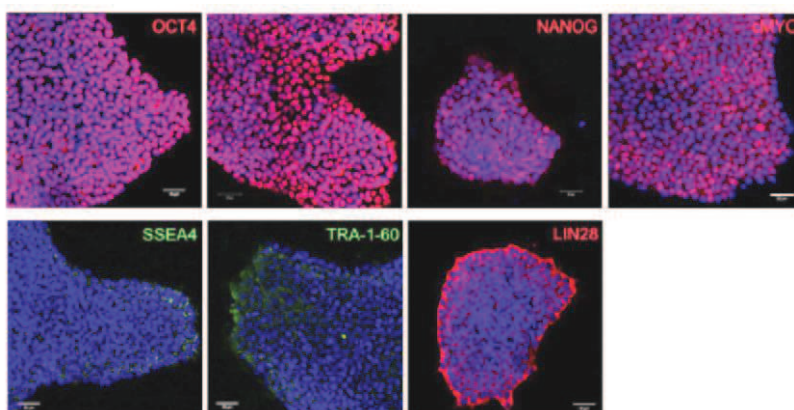


Figura 29: Expressão de marcadores de pluripotência por imunofluorescência: OCT4, SOX2, NANOG, cMYC e LIN28 estão mostrados em vermelho, SSEA4 e TRA-1-60 estão mostrados em verde e os núcleos estão corados em azul.
Fonte: Mesquita *et al*, 2015.

Para avaliação citogenética, a cariotipagem com bandeamento GTG foi realizada em uma amostra de fibroblastos (que originou as linhagens de iPS) e cinco amostras de iPS: IP001, IP002, IP003, IP004 e IP006.

A amostra de fibroblastos foi avaliada em P6 e apresentou cariótipo normal: 46,XX[20].

As primeiras três amostras de iPS (IP001, IP002 e IP003), avaliadas em P10, apresentaram um cariótipo complexo, com número cromossômico variando de 59 a 72, várias alterações estruturais e cromossomos marcadores. Estes eram possivelmente originados de alterações estruturais envolvendo os cromossomos 1, 3, 8, 12, 16, isocromossomo 17 e cromossomo 22 deletado. A qualidade destas primeiras amostras não foi boa o suficiente para esclarecer completamente a origem destes marcadores, concluindo-se com o seguinte cariótipo: 59~72,XX, add(1)(p?),add(1)(q?), +6, +7, +10, add(11)(p15), +12, +14, +15, +mar1x2, +mar2, +mar3, +mar4x2, +mar5x2, +mar6, +mar7 (fig 30 e anexo 13).

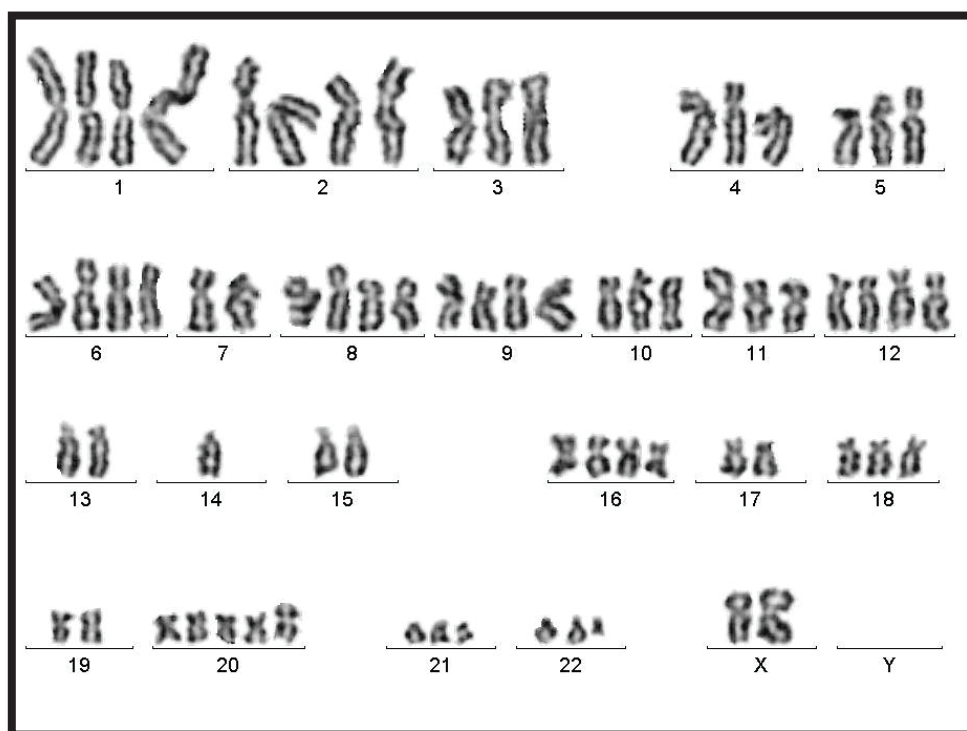


Figura 30: Cariograma representativo de IP003 com várias aberrações numéricas e estruturais complexas.

A amostra IP004, avaliada em P5, apresentou uma qualidade que não possibilitou a análise citogenética.

A amostra IP006, avaliada em P9, apresentou cariótipo normal: 46,XX[20] (fig 31), sem aberrações clonais, apenas com perdas ocasionais e uma célula com quebra cromatídica no braço longo do cromossomo 8 (fig 32).

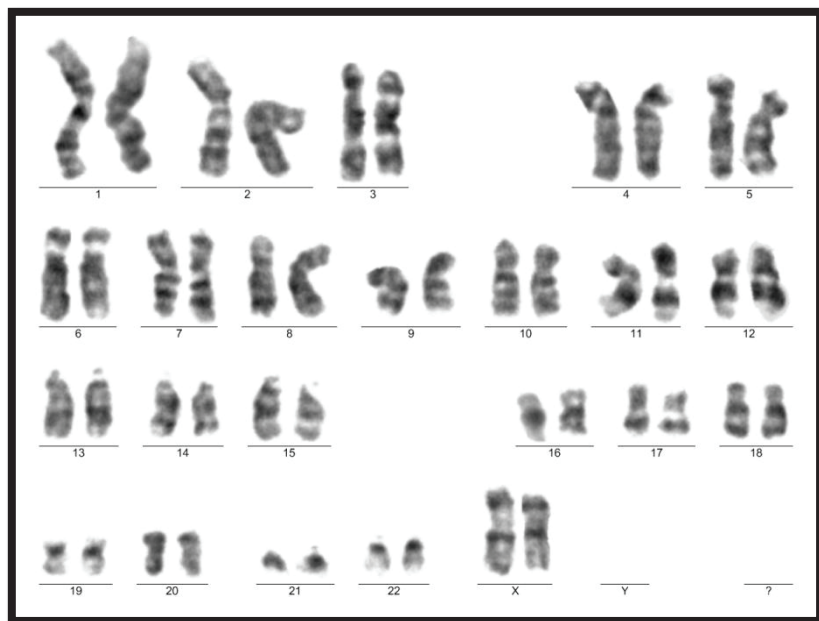


Figura 31: Amostra IP006. Exemplo de cariograma de células de iPS. Cariótipo: 46,XX[20]

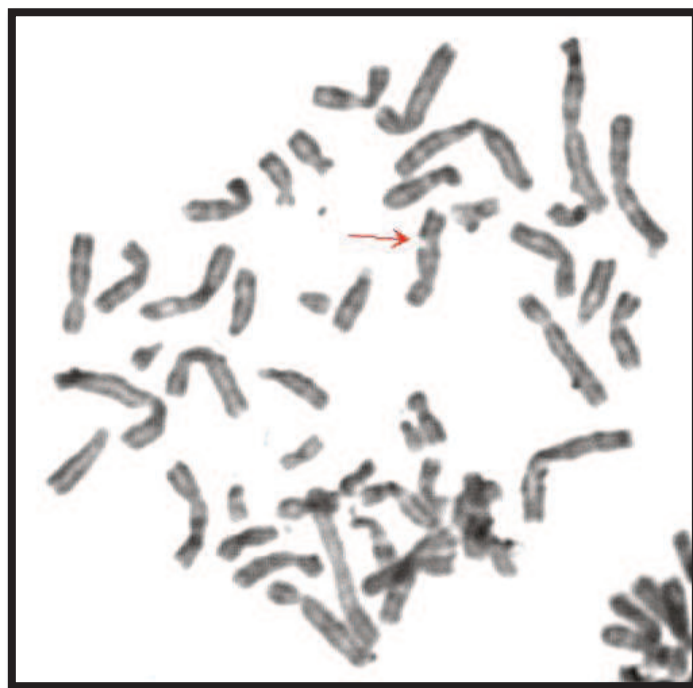


Figura 32: Amostra IP006. Metáfase com quebra cromatídica no braço longo do cromossomo 8 (seta vermelha).

4.2 Hibridização *in situ* com fluorescência - FISH

Foram realizados 22 testes de FISH em MSCs (T1, T2 e T3) em 10 casos, sendo 12 testes para avaliar a presença ou ausência do gene *TP53* e 10 testes para avaliar a presença ou ausência do gene *RB1*. Todas as amostras apresentaram os sinais esperados para células normais, sendo possível observar a presença de ambos os alelos, paterno e materno, de ambos os genes, *TP53* e *RB1*.

4.2.1 Teste de FISH para detectar presença ou ausência de cópia do gene *TP53*

Este teste foi realizado com a sonda comercial *Cytocell LPH01 - TP53 deletion*, anteriormente descrita no item 3.2.2.1. Na figura 33 observa-se o resultado da forma como ele é apresentado usando o programa LAS-AF da Leica. São quatro imagens repetidas do mesmo campo, mostrando a imagem obtida com cada cubo de filtros e por último, a sobreposição das três cores. O detalhamento dos parâmetros para captura das imagens está exemplificado no anexo 14.

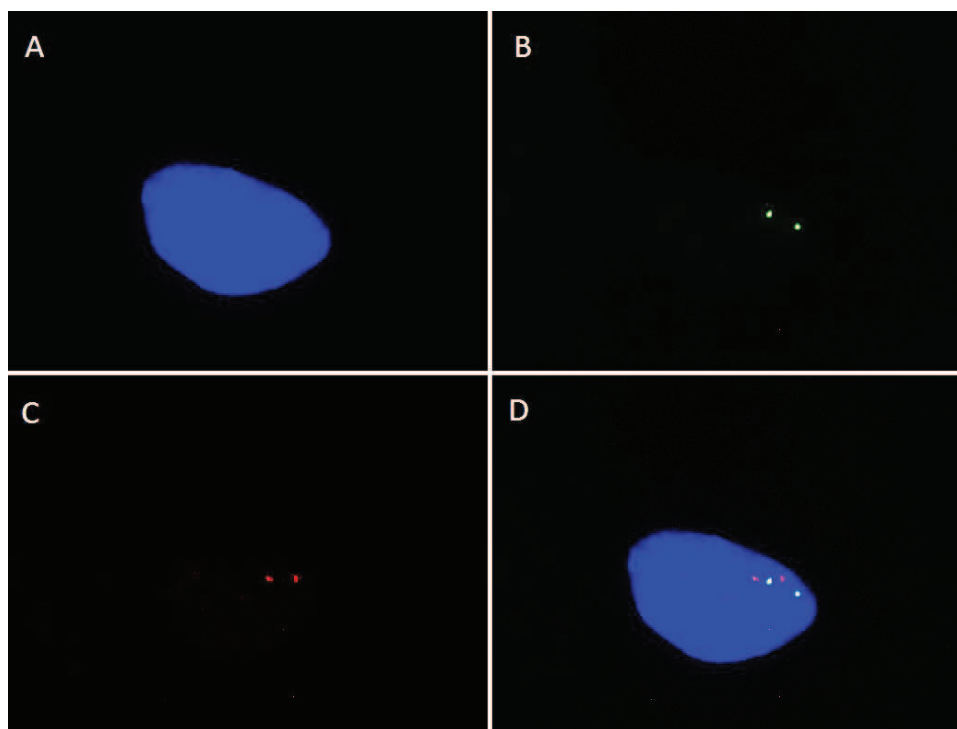


Figura 33: Caso 4. Amostra ME004. Sonda TP53.

A: cubo de filtros A4, que permite a visualização do material corado com DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole). B: cubo L5, para visualizar FITC (*fluorescein isothiocyanate*). C: cubo N2.1, para visualizar TRITC (*tetramethyl rhodamin isothiocyanate*). D: sobreposição das três imagens anteriores. Resultado: 2G2R

As porcentagens de células com sinais normais (duas cópias do gene *TP53*)- 2G2R estão descritos na tabela 18. Exemplo na fig 34.

Tabela 18: Teste FISH com porcentagem de resultados 2G2R, para sonda *TP53*

Paciente	Passagem	Amostra	Resultado	%
4	P7	ME004	nuc ish (TP53x2) [87/100]	87
21	P2	ME055	ish 17(D17Z1x2),17p13(TP53x2)[6].nuc ish (TP53x2) [89/100]	89
23	P2	ME057	ish 17(D17Z1x2),17p13(TP53x2)[3].nuc ish (TP53x2) [96/100]	96
24	P2	ME060	nuc ish (TP53x2) [84/100]	84
25	P3	ME064	nuc ish (TP53x2) [214/250]	85,6
25	P4	ME066	nuc ish (TP53x2) [86/100]	86
25	P17	ME083	nuc ish (TP53x2) [82/100]	82
26	P2	ME067	ish 17(D17Z1x2),17p13(TP53x2)[4].nuc ish (TP53x2) [256/300]	85,3
35	P15	ME115	nuc ish (TP53x2) [92/100]	92
40	P19	ME109	ish 17(D17Z1x2),17p13(TP53x2)[2].nuc ish (TP53x2) [71/100]	71
42	P19	ME146	nuc ish (TP53x2) [90/100]	90
44	P13	ME143	ish 17(D17Z1x2),17p13(TP53x2)[4].nuc ish (TP53x2) [84/100]	84
média				86

ish: hibridização in situ; nuc ish: hibridização in situ em núcleo interfásico; D17Z1: região Z1 do centrômero do cromossomo 17

As porcentagens de células com apenas um sinal, 2G1R, representando a perda de uma das cópias do gene *TP53*, estão descritos na tabela 19. Exemplo na figura 35.

Tabela 19: Teste FISH com porcentagem de resultados 2G1R, para sonda *TP53*. Em vermelho resultado anormal, acima do ponto de corte validado.

Paciente	Passagem	Amostra	Resultado	%
4	P7	ME004	nuc ish (TP53x1) [3/100]	3
21	P2	ME055	ish 17(D17Z1x2),17p13(TP53x2)[6].nuc ish (TP53x1) [2/100]	2
23	P2	ME057	ish 17(D17Z1x2),17p13(TP53x2)[3].nuc ish (TP53x1) [1/100]	1
24	P2	ME060	nuc ish (TP53x1) [3/100]	3
25	P3	ME064	nuc ish (TP53x1) [4/250]	1,6
25	P4	ME066	nuc ish (TP53x1) [2/100]	2
25	P17	ME083	nuc ish (TP53x1) [3/100]	3
26	P2	ME067	ish 17(D17Z1x2),17p13(TP53x2)[4].nuc ish (TP53x1) [8/300]	2,7
35	P15	ME115	nuc ish (TP53x1) [3/100]	3
40	P19	ME109	ish 17(D17Z1x2),17p13(TP53x2)[2].nuc ish (TP53x1) [24/100]	24
42	P19	ME146	nuc ish (TP53x1) [4/100]	4
44	P13	ME143	ish 17(D17Z1x2),17p13(TP53x2)[4].nuc ish (TP53x1) [1/100]	1

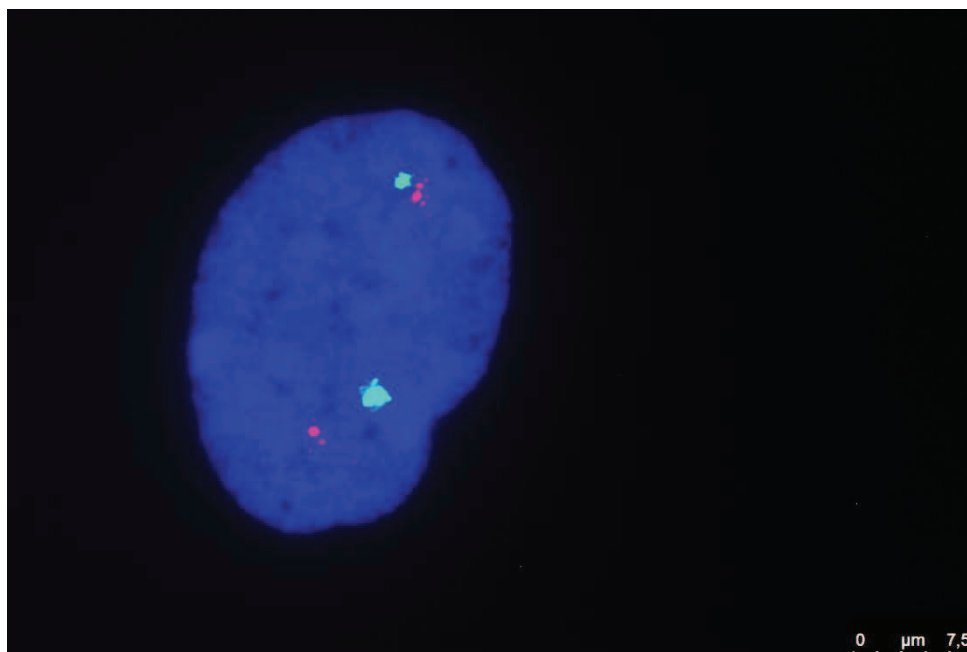


Figura 34: Caso 40. Amostra ME109. Sonda *TP53*. Resultado 2G2R.

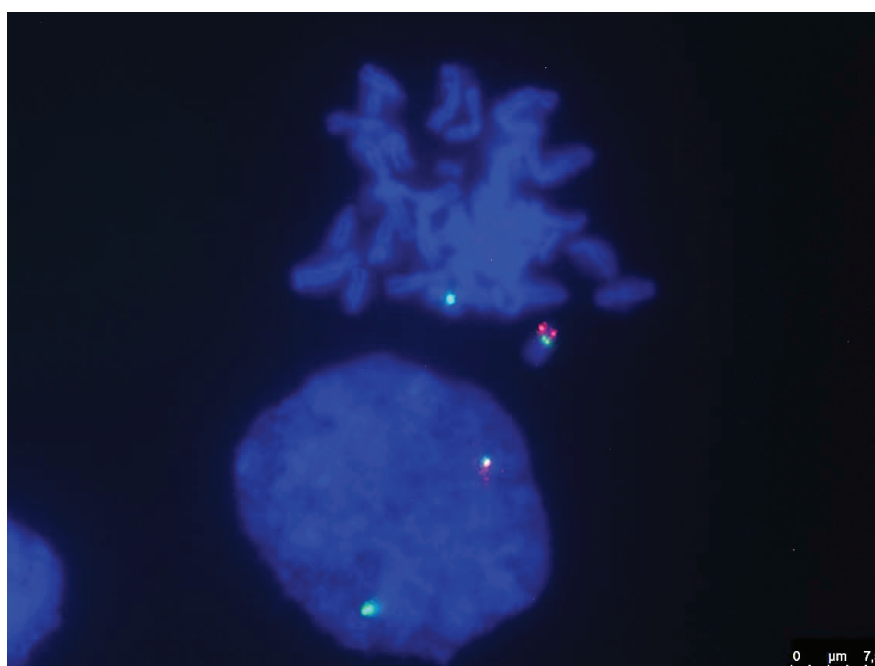


Figura 35: Caso 40. Amostra ME109. Sonda *TP53*.

Acima: Metáfase com resultado 2G1R. Abaixo: núcleo interfásico com resultado 1G1Y (neste caso o sinal Y representa um sinal G e um R muito próximos, portanto equivale a um resultado 2G1R).

4.2.2 Teste de FISH para detectar presença ou ausência de cópia do gene *RB1*

Este teste foi realizado com a sonda comercial *Cytocell LPH013 - RB1 deletion*, descrita no item 3.2.2.1. Os resultados mostrando as porcentagens de células com sinais normais (duas cópias do gene *RB1*)- 2G2R estão descritos na tabela 20. Exemplo na figura 36.

Tabela 20: Teste FISH com porcentagem de resultados 2G2R, para sonda *RB1*

Paciente	Passagem	Amostra	Resultado	%
4	P7	ME004	nuc ish (RB1x2) [87/100]	87
21	P2	ME055	ish 13q14.2(RB1x2), 13q34(13qterx2)[5].nuc ish (RB1x2)[76/100]	76
25	P17	ME083	nuc ish (RB1x2) [80/100]	80
26	P2	ME067	nuc ish (RB1x2) [92/100]	92
29	P2	ME080	nuc ish (RB1x2) [92/100]	92
30	P2	ME082	nuc ish (RB1x2) [95/100]	95
35	P15	ME115	nuc ish (RB1x2) [90/100]	90
40	P19	ME109	ish 13q14.2(RB1x2), 13q34(13qterx2)[1]. nuc ish (RB1x2)[94/100]	94
42	P19	ME146	ish 13q14.2(RB1x2), 13q34(13qterx2)[1]. nuc ish (RB1x2)[95/100]	95
44	P13	ME143	ish 13q14.2(RB1x2), 13q34(13qterx2)[2]. nuc ish (RB1x2)[88/100]	88
Média				89

ish: hibridização *in situ*; nuc ish: hibridização *in situ* em núcleo interfásico; 13 qter: região terminal do do braço longo do cromossomo 13

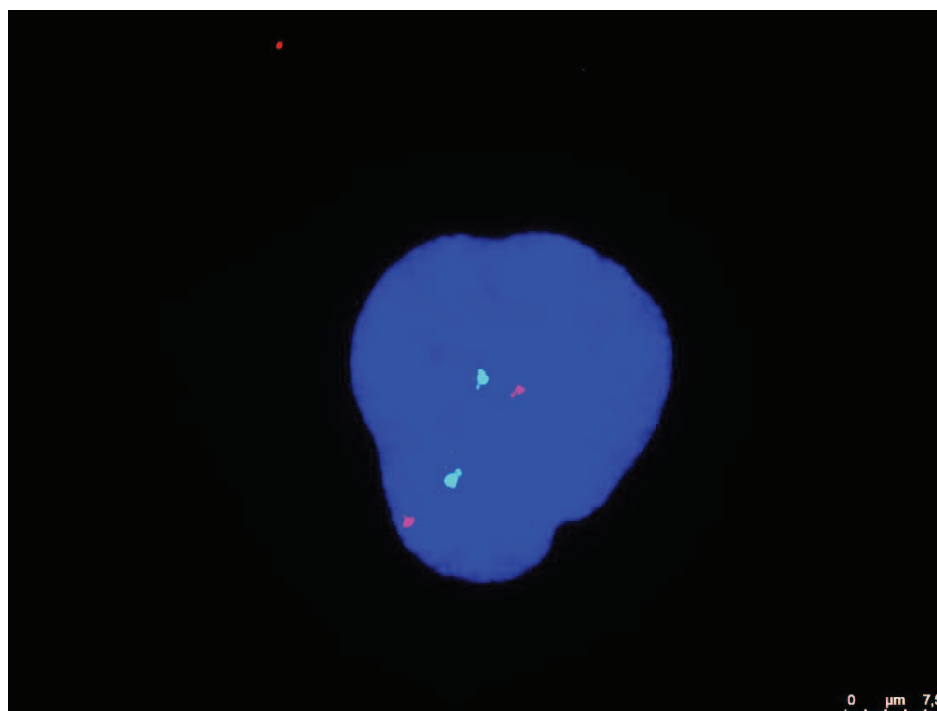


Figura 36: Caso 44. Amostra ME143. Sonda *RB1*. Resultado 2G2R.

As porcentagens de células com apenas um sinal vermelho, 2G1R, representando a perda de uma das cópias do gene *RB1* estão descritos na tabela 21.

Tabela 21: Teste FISH com porcentagem de resultados 2G1R, para sonda *RB1*. Em vermelho resultado anormal, acima do ponto de corte validado.

Paciente	Passagem	Amostra	Resultado	%
4	P7	ME004	nuc ish (RB1x1) [6/100]	6
21	P2	ME055	ish 13q14.2(RB1x2), 13q34(13qterx2)[5]. nuc ish (RB1x1)[7/100]	7
25	P17	ME083	nuc ish (RB1x1) [0/100]	0
26	P2	ME067	nuc ish (RB1x1) [2/100]	2
29	P2	ME080	nuc ish (RB1x1) [0/100]	0
30	P2	ME082	nuc ish (RB1x1) [0/100]	0
35	P15	ME115	nuc ish (RB1x1) [3/100]	3
40	P19	ME109	ish 13q14.2(RB1x2), 13q34(13qterx2)[1]. nuc ish (RB1x1) [0/100]	0
42	P19	ME146	ish 13q14.2(RB1x2), 13q34(13qterx2)[1]. nuc ish (RB1x1) [1/100]	1
44	P13	ME143	ish 13q14.2(RB1x2), 13q34(13qterx2)[2]. nuc ish (RB1x1) [1/100]	1

ish: hibridização *in situ*; nuc ish: hibridização *in situ* em núcleo interfásico; 13 qter: região terminal do do braço longo do cromossomo 13

As médias de perda de uma das cópias de cada um dos genes ao longo do cultivo (T1, T2 e T3) estão demonstradas na tabela 22.

Tabela 22: Teste FISH com porcentagem de resultados 2G1R, para sonda *TP53* e *RB1*. Em vermelho resultado anormal, acima do ponto de corte validado.

Paciente	Passagem	<i>TP53</i> %	médias	<i>RB1</i> %	médias
21	P2	2		7	
23	P2	1			
24	P2	3			
26	P2	2,7	T1 =2,06±0,81	2	T1 =2,25±3,304
29	P2			0	
30	P2			0	
25	P3	1,6			
25	P4	2	T2=2,50±0,71		T2=6
4	P7	3		6	
44	P13	1	T3=7,00±9,56	1	T3=1,00±1,224
35	P15	3		3	
25	P17	3		0	
40	P19	24		0	
42	P19	4		1	

Em relação aos dois genes, *TP53* e *RB1*, foram encontrados sinais normais (2G2R) em 87,5% (média) das células, e sinais de perda de uma das cópias do gene (2G1R) em 3,1% (média). Algumas células mostraram baixa porcentagem (máximo de 2%) de outros tipos de sinais, como por exemplo: 2G3R (fig 37), 0G2R, 0G1R, etc... Alguns sinais eram correspondentes às alterações que já haviam sido observadas na análise citogenética convencional, não relatadas nos cariótipos por não serem clonais, como, por exemplo: monossomia (1G1R) (fig 38) dos cromossomos envolvidos (cromossomo 13 para *RB1* e cromossomo 17 para *TP53*) e tetraploidia (4G4R) (figs 39 e 40).

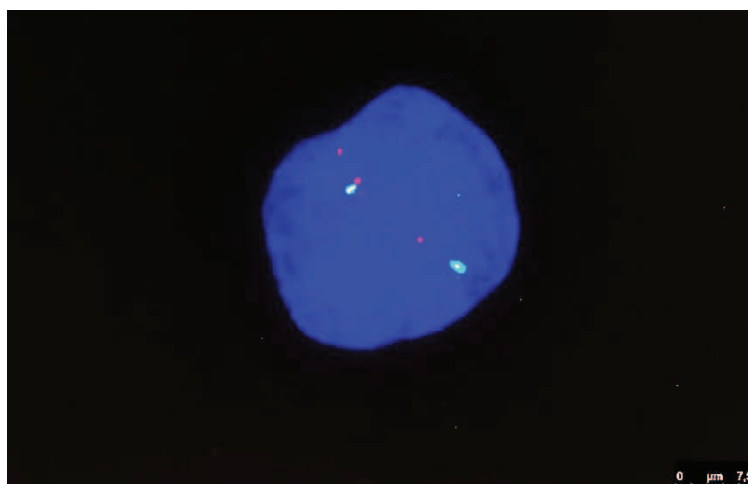


Figura 37: Caso 4. Amostra ME004. Sonda *TP53*. Resultado 2G3R.



Figura 38: Caso 42. Amostra ME146. Sonda *TP53*. Resultado 1G1R.

Quando dois sinais estão tão próximos que a distância entre eles é menor que o tamanho do sinal, são considerados como um só, como ocorre no sinal vermelho deste núcleo interfásico.

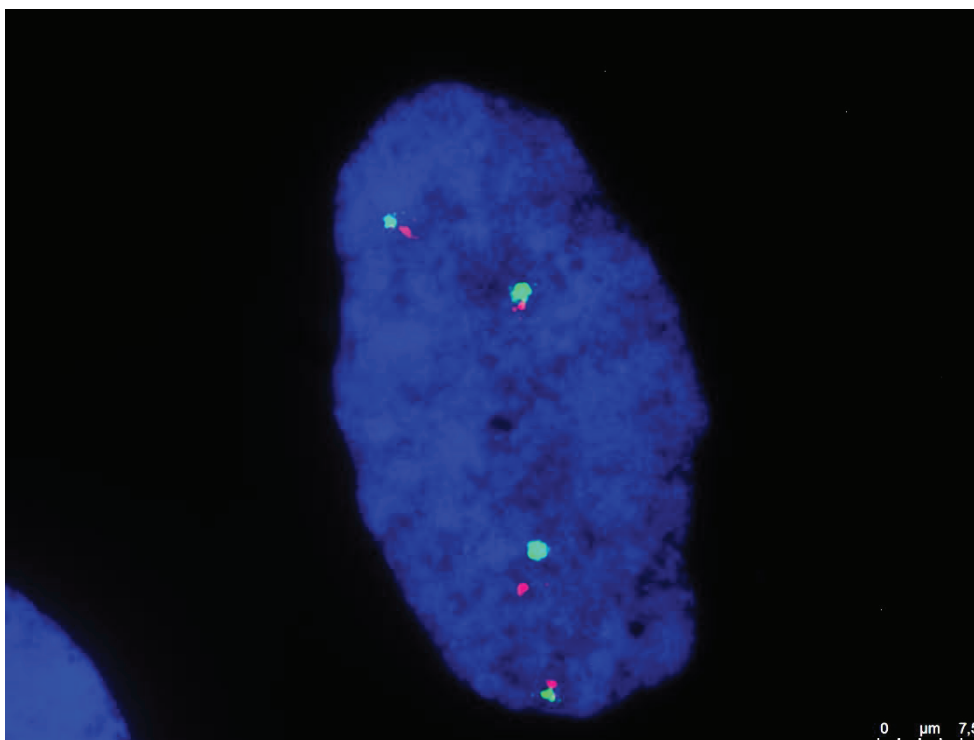


Figura 39: Caso 40. Amostra ME109. Sonda *TP53*. Núcleo interfásico. Resultado 4G4R.

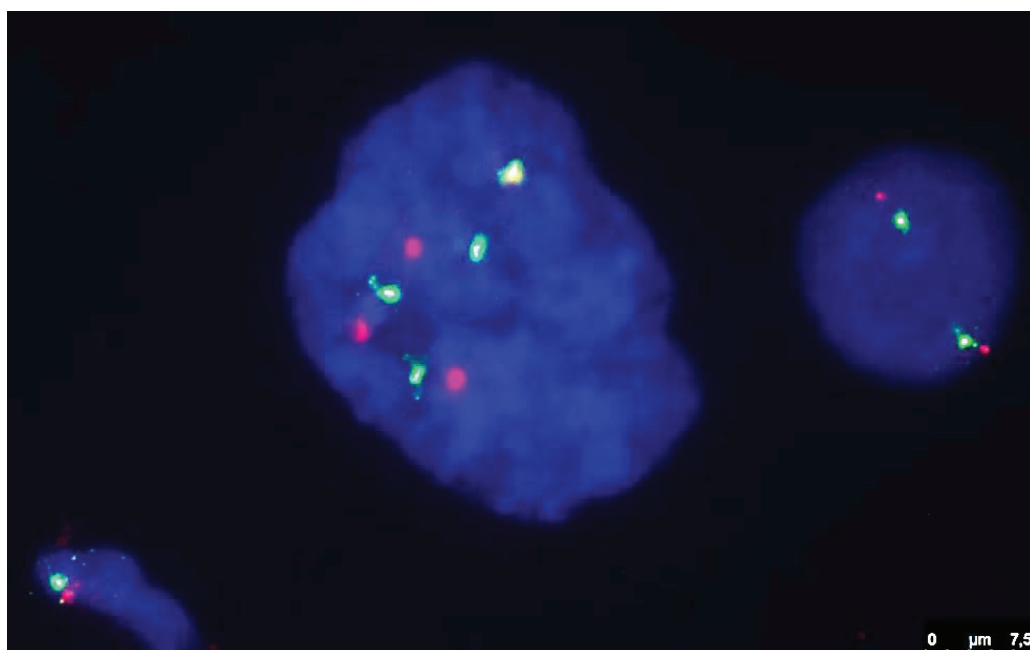


Figura 40: Caso 44. Amostra ME143. Sonda *RB1*. Núcleos interfásicos.

Ao centro: 3G3R1Y; à direita: 2G2R; à esquerda: não informativo por apresentar contornos irregulares. O sinal “Y” (do inglês *yellow*), observado no ponto mais alto do núcleo ao centro, representa a sobreposição de um sinal verde e um vermelho.

4.3 TESTE DE INSTABILIDADE CROMOSSÔMICA COM DIEPOXIBUTANO (DEB)

Um total de nove amostras de MSCs derivadas de medula óssea em P2 foram utilizadas para realização de Teste de Instabilidade Cromossômica com DEB (tabela 23).

Tabela 23: Número de metáfases e índices obtidos com o teste do DEB

Paciente	Alterações espontâneas		Alterações induzidas DEB 0,1µg/mL			Alterações induzidas DEB 0,01µg/mL		
	Nº de metáfases	Nº de quebras/falhas	Nº de metáfases analisadas	Nº de quebras/falhas	Índice	Nº de metáfases analisadas	Nº de quebras/falhas	Índice
19	20	2 quebras	20	1 quebra	0,05	20	2 falhas	0
20	20	0	08	0	0	10	1 quebra	0,10
21	20	0	20	1 quebra	0,05	20	0	0
23	20	5 quebras	20	1 falha	0	20	2 quebras	0,10
24	20	0	10	0	0	20	0	0
25	20	0	20	1 quebra e 1 fragmento	0,10	25	2 quebras e 1 fragmento	0,12
26	20	0	20	2 quebras e 4 falhas	0,10	20	2 quebras e 1 falha	0,10
27	20	2 quebras	20	1 quebra e 1 falha	0,05	20	1 cromossomo em anel	0,10
31	20	1 falha	20	0	0	20	0	0
Total	180	9 quebras 1 falha	158	6 quebras 6 falhas 1 fragmento	-	175	7 quebras 3 falha 1 fragmento 1 cromossomo em anel	-
Média da frequência de sinais por metáfase		0,055±0,085		0,082±0,093			0,068±0,057	

Exemplos das alterações encontradas podem ser observadas nas figuras 41 a 44.

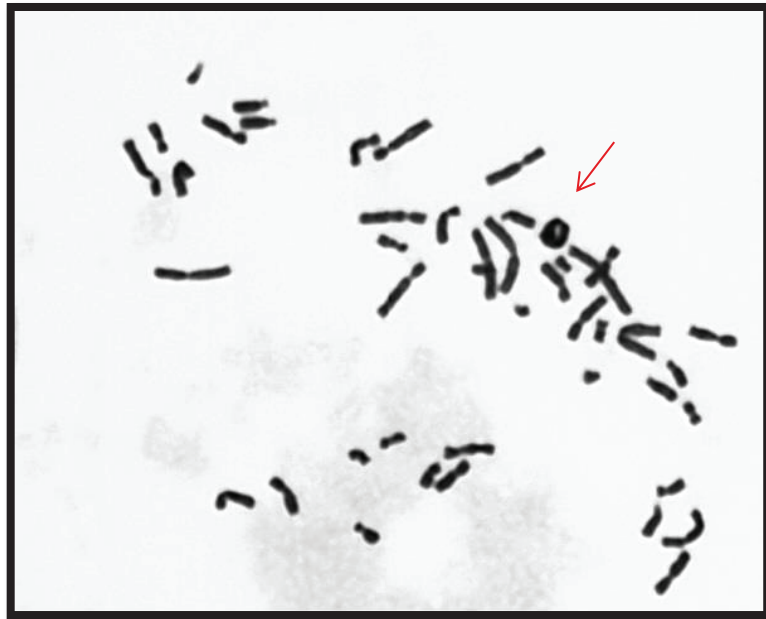


Figura 41: Caso 27. Metáfase apresentando um cromossomo em anel (seta vermelha).

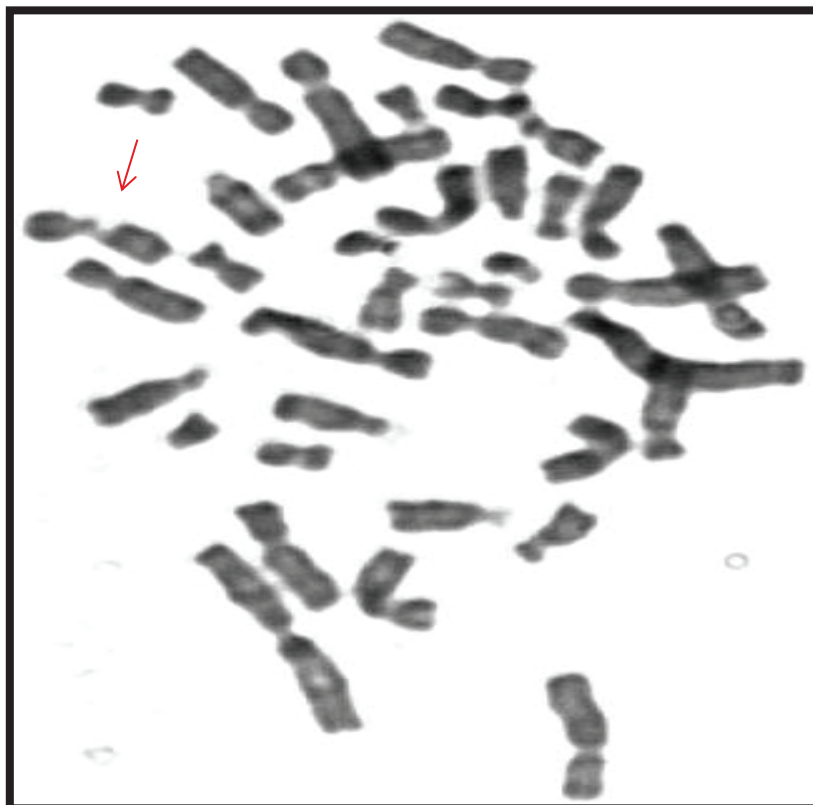


Figura 42: Caso 25. Metáfase apresentando uma quebra cromatídica (seta vermelha).

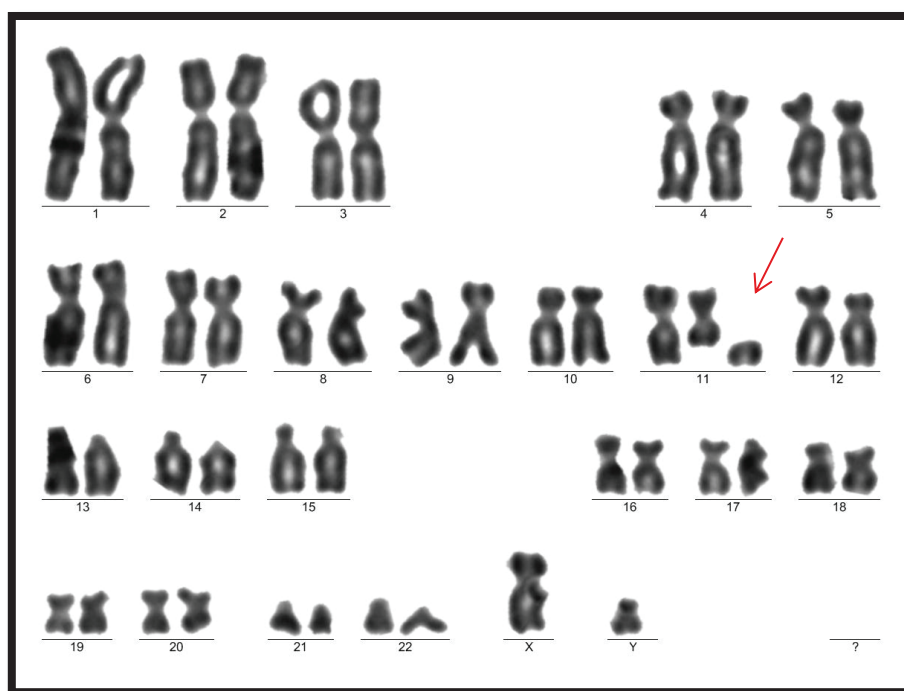


Figura 43: Caso 25. Cariograma apresentando um fragmento acêntrico, provavelmente originado do braço longo do cromossomo 11 (seta vermelha).



Figura 44: Caso 26. Metáfase apresentando uma quebra cromossômica (a) e uma falha cromatídica (b) (setas vermelhas).

A comparação dos índices levando em consideração a diluição de DEB utilizada, está apresentada no gráfico 2. Como controle negativo foram considerados os valores de referência encontrados em indivíduos normais. Como controle positivo, foram considerados os valores encontrados em pacientes que tem síndrome de instabilidade cromossômica, especificamente pacientes com Anemia de Fanconi, onde o teste com DEB é considerado padrão ouro para diagnóstico. Nestes, o resultado é considerado positivo quando o índice é a partir de 1,06. No gráfico 2, os pacientes estão numerados de 1 a 9, correspondendo aos 9 pacientes com resultados apresentados na tabela 23.

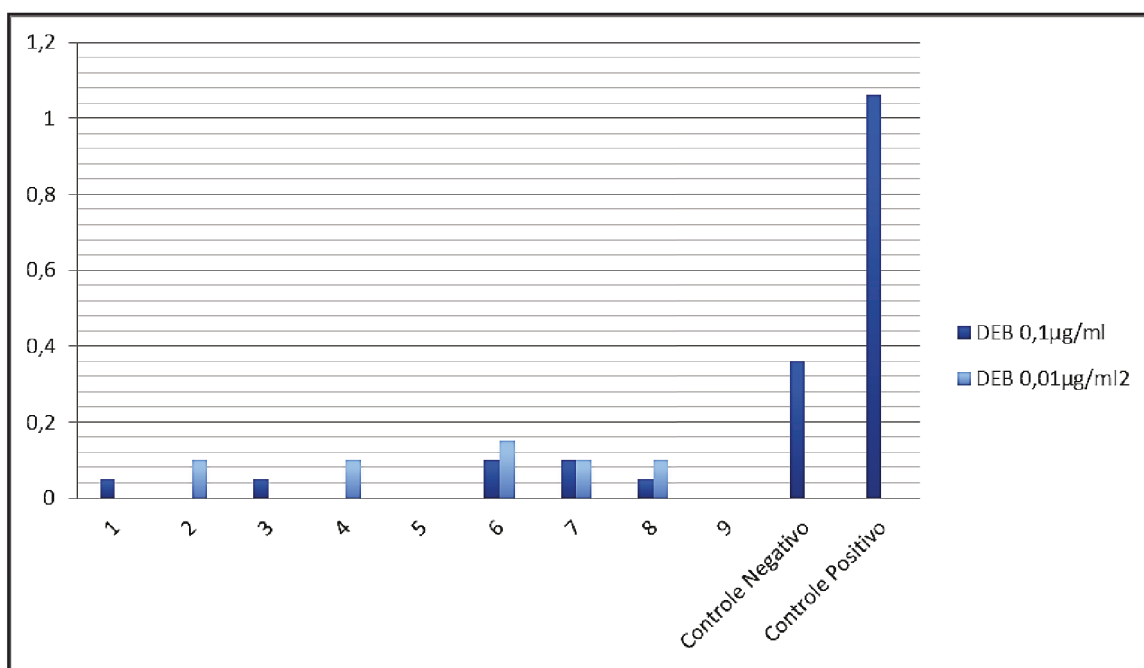


Gráfico 2: Comparação entre os índices obtidos dos pacientes analisados e o controles negativo e positivo (DEB+), considerando índice a partir de 1,06.

Todas as amostras apresentaram resultados normais, negativos para instabilidade cromossômica, comparados com os valores de referência para indivíduos normais (índice de 0 a 0,36).

As diferentes diluições de DEB (0,01 µg/mL e 0,1 µg/mL) apresentaram resultados estatisticamente iguais (distribuição de *Student* ao nível de 5% de significância, valor de $z = 1,61$).

4.4 COMPARAÇÃO DAS TRÊS TÉCNICAS CITOGENÉTICAS

Com o objetivo de verificar se alguma das técnicas foi mais sensível que outra na detecção de anormalidades, no mesmo paciente, foram comparados os resultados das três metodologias (tabela 24).

Todos os 47 pacientes apresentaram resultados na análise citogenética com bandeamento GTG; doze pacientes apresentaram resultados pela análise por FISH e nove pacientes apresentaram resultados na análise por DEB. Em cinco casos foi possível comparar os resultados das três técnicas, como demonstrado na tabela 24. Nesta comparação, o único resultado anormal foi no FISH para *RB1* do paciente 21 (em vermelho). Na FISH, foram considerados como anormais as porcentagens que estavam acima dos valores de corte definidos no trabalho de validação das sondas, descrito no capítulo 3.2.2.1. Nesta validação os valores de corte considerados foram de 6,3% para perda do *TP53* e de 5,7% para perda do *RB1*.

Tabela 24: Comparação de resultados das três técnicas utilizadas, em 5 pacientes. Em vermelho resultado anormal, acima do ponto de corte validado.

Casos	Bandeamento GTG		FISH - porcentagem de células com sinais 2G1R				DEB- concentração final 0,1µg/ml	
	passagem	cariótipo	passagem	<i>TP53</i>	passagem	<i>RB1</i>	passagem	índice
21	P2	46,XX[20]	P2	2%	P2	7%	P2	0,05
23	P2	46,XY[22]	P2	1%			P2	0,00
24	P2	46,XY[20]	P2	3%			P2	0,00
25	P2	46,XY[25]	P3	1,6%			P2	0,10
	P3	46,XY[20]	P4	2%				
			P17	3%	P17	0%		
26	P2	46,XX[20]	P2	2,7%	P2	2%	P2	0,10

5 DISCUSSÃO

5.1 A IMPORTÂNCIA DA PADRONIZAÇÃO EM ESTUDOS COM CÉLULAS-TRONCO

As três técnicas utilizadas nesta tese são indicadas principalmente para células de sangue periférico e de medula óssea. Há uma carência na descrição de protocolos para obter metáfases de boa qualidade em células-tronco cultivadas. Além disso, vários autores discutem a necessidade de padronizar a análise cromossômica para estas células e ressaltam a importância da experiência do citogeneticista para a segurança da interpretação dos resultados (CATALINA *et al.*, 2007, MEISNER; JOHNSON, 2008, BOCHKOV *et al.*, 2009). A presença de células com perdas cromossômicas (monossomias), por exemplo, pode ser interpretada incorretamente. A perda de cromossomos pode acontecer durante o processamento do material devido à falta de ajuste no tempo de exposição à solução hipotônica: pouco tempo pode não ser suficiente para uma boa dispersão, resultando na sobreposição de cromossomos nas metáfases, e a superexposição pode determinar um enfraquecimento da membrana plasmática, resultando, eventualmente, no rompimento da mesma e consequente perda de cromossomos (BARCH; KNUTSEN; SPURBECK, 1997). Portanto, o tratamento hipotônico é crítico para o teste de cariotipagem, e sua padronização é crucial para a correta interpretação dos resultados. Na nossa experiência, metáfases de MSCs derivadas de medula óssea, tiveram uma boa dispersão com 30 minutos de KCl numa concentração de 0,075 M, a 37°C. A variação deste tempo, desta concentração ou desta temperatura pode causar sobreposição dos cromossomos, o que dificulta muito a análise, ou dispersão demasiada, resultando em interpretações errôneas de perdas cromossômicas. Em relação à interrupção mitótica, nossos dados mostraram que, diferentemente das células da medula óssea ou das células de sangue periférico estimulado, as células-tronco cultivadas, que crescem aderentes aos frascos de cultivo, necessitam de períodos mais longos em contato com o inibidor mitótico (colchicina) para compensar uma taxa de crescimento mais lenta. Porém, há um efeito dose-dependente que pode alterar a qualidade dos cromossomos,

seu comprimento, forma e dispersão das cromátides, conforme foi descrito na metodologia. Concluímos, a partir destas comparações, que menos de uma hora de interrupção mitótica não é suficiente para gerar um número razoável de metáfases e mais de seis horas interfere na qualidade dos cromossomos. Finalmente, para otimizar a qualidade das metáfases para análise cromossômica, padronizamos alterações nas lavagens e no bandeamento. Nas lavagens foi utilizada uma solução mais concentrada de ácido acético (metanol: ácido acético 2:1), quando comparada à proporção convencionalmente utilizada na literatura (metanol:ácido acético 3:1). No bandeamento os resultados foram melhores com altas concentrações de tripsina (pelo menos 0,002 g/mL) e um tempo de exposição de 5 a 20 segundos, dependendo do período de desidratação das lâminas.

Para a técnica de FISH é fundamental que seja feita a validação das sondas. Em primeiro lugar a sensibilidade e especificidade da sonda devem ser de pelo menos 98% (SAXE, 2012), como demonstrado nos nossos resultados, e, em segundo lugar, deve ser definido o valor de corte acima do qual o resultado será considerado positivo para o teste. Nos nossos resultados, este valor foi de 6,3% para o gene *TP53* e 5,7% para o gene *RB1*. A partir destes valores podemos afirmar que tivemos uma amostra com resultado positivo para a ausência do gene *TP53* (caso 40) e duas amostras para o gene *RB1* (casos 4 e 21). Não encontramos na literatura valores para validação destas sondas.

Para o teste de DEB duas diluições do agente clastogênico mostraram serem aplicáveis em MSCs: 0,01 µg/mL e 0,1 µg/mL. Os resultados não apresentaram diferenças estatisticamente significantes entre as duas diluições e a mais diluída (0,01 µg/mL) apresentou maior número de metáfases, portanto esta seria a diluição indicada em futuros testes com MSCs. Não encontramos relatos na literatura sobre padronização do teste do DEB para células-tronco.

5.2 INSTABILIDADE CROMOSSÔMICA E POTENCIAL TUMORIGÊNICO

O câncer é uma doença genética causada pela instabilidade genômica. Em muitos cânceres esta instabilidade é manifestada por rearranjos cromossômicos que podem resultar numa complexidade cariotípica (ROSCHKE, 2005). A frequência elevada de alterações cromossômicas pode

ser um pré-requisito para um processo oncogenético que envolve múltiplas etapas genéticas, como a inativação de genes supressores de tumor e amplificação de oncogenes (LENGAUER; KINZLER; VOGELSTEIN, 1998). Por isto, as alterações cromossômicas detectadas neste trabalho, embora em baixa frequência, são sugestivas de que estas células possam alcançar um potencial tumorigênico. Detectamos em um dos 47 pacientes (2,1%) a presença de aberração clonal em P2 e, dos 13 pacientes cujas amostras foram mantidas por cultivo prolongado até T3, um paciente (7,7%) apresentou aberração clonal em P24. Além disso, foram detectados vários sinais de instabilidade cromossômica: falhas e quebras, cromossômicas e cromatídicas, e células tetraploides.

5.2.1 Comparação entre antes e após cultivo em longo prazo

Em relação aos sinais de instabilidade cromossômica: quebras e falhas (cromossômicas e cromatídicas) e células tetraploides, estavam todos presentes tanto nas amostras antes do cultivo a longo prazo (32 amostras de medula óssea) como após o cultivo a longo prazo (40 amostras de MSC cultivadas até as fases iniciais - T1). Houve um aumento significativo de quebras e células tetraploides quando comparado antes e após o cultivo em longo prazo. Não encontramos dados na literatura sobre frequência de quebras e falhas em células-tronco cultivadas.

A tetraploidia, um tipo de euploidia onde a célula apresenta o número cromossômico haploide ($n=23$) quaduplicado, ou seja, 92 cromossomos, é frequentemente observada em células cultivadas. Este tipo de célula ocorre numa frequência de 3 a 5% em fibroblastos humanos cultivados (THERMAN; SUSMAN, 1996), e também já foi descrita em cultivos de células-tronco: 11,6% em células derivadas de vilosidade coriônica (GRIMES *et al.*, 2009). No nosso trabalho, a frequência de células tetraploides passou de 0,9% nas células da medula óssea para 3% nas MSCs após cultivo. Esta diferença, pouco superior a três, já é suficiente para indicar erros durante a divisão celular. Embora a frequência não seja alta, o problema no surgimento destas células é que isto está relacionado a um erro durante a mitose, caracterizado pela regressão do sulco de clivagem, dando origem, assim, a células binucleadas. Problemas

nesta fase da divisão celular (citocinese) estão, em geral, intimamente associadas à não disjunção cromossômica, resultando em células tetraploides, que, por sua vez, nas divisões subsequentes, devido à instabilidade causada pela duplicação do material genético, podem tornar-se aneuplóides (SHI; KING, 2005), que é o tipo de alteração cromossômica (trissomias, monossomias, etc...) mais descrito em células cultivadas e em cânceres.

É interessante salientar que este tipo de anormalidade no mecanismo mitótico (desregulação da citocinese) está descrito justamente na progressão de tumores mesenquimais malignos, onde a frequência aumentada de aberrações cromossômicas pode ser explicada por um processo iniciado pela disfunção telomérica, com formação de ponte anafásica, falha na citocinese e uma frequência aumentada de células multinucleadas (GISSELSSON *et al.*, 2004).

Nossos dados confirmam a presença deste tipo de células (tetraploides) em MSC e, portanto, sendo estas células geneticamente instáveis, reforça a evidência de que o cultivo em longo prazo pode representar um passo intermediário para a tumorigênese, como já discutido por Shi e King, (2005) Payão *et al.*, (2009) e Pampalona *et al* (2012), embora não tenhamos detectado aumento da frequência destas células ao longo do cultivo, nem surgimento de aberrações clonais nas amostras que apresentaram tetraploidia.

Além das células tetraploides, outros sinais de instabilidade cromossômica foram observados na nossa amostra: falhas e quebras cromossômicas ou cromatídicas. A presença destas alterações é característica de síndromes de instabilidade cromossômica, onde é bem conhecido o risco aumentado para doenças neoplásicas, portanto a presença destes sinais de instabilidade em células-tronco cultivadas também podem ser uma evidência do seu potencial tumorigênico. Nossos resultados mostram aumento estatisticamente significativo para quebras (de 0,6% para 3%) e não para falhas. Interessantemente, as falhas, embora também aparentemente resultantes da quebra da dupla fita de DNA, também não tem valor preditivo no teste do DEB para Anemia de Fanconi, uma síndrome de instabilidade cromossômicas diagnosticada pelo aumento na frequência de quebras cromossômicas e cromatídicas (AUERBACH, 2015).

Em relação à presença de aberrações cromossômicas clonais, das 32 amostras de MO apenas uma apresentou aberração cromossômica clonal constitutiva (caso 5): inversão na região heterocromática do braço longo do cromossomo 9 (9qh), considerada uma variante normal na população. Outro caso (nº20) apresentou uma aberração não clonal (que não se repetiu em outras das 20 metáfases analisadas): translocação balanceada t(1;12). Consideramos importante termos analisado as amostras antes do cultivo em longo prazo, pois, nestes dois exemplos, sem esta análise prévia, poder-se-ia interpretar que as aberrações apareceram durante o cultivo. Após o cultivo em longo prazo, apenas um caso demonstrou o surgimento de aberração clonal que não estava presente antes do cultivo (caso 34) e não foi mais detectado nas passagens posteriores. Embora seja somente um caso, representando 2,1% do total, a detecção de uma aberração cromossômica clonal no mesmo já é suficiente para justificar que a avaliação cromossômica seja feita em todas as amostras que serão infundidas, o que representa um maior rigor metodológico e uma maior expectativa do sucesso do procedimento clínico.

No nosso CTC, um dos critérios para liberação da amostra para que possa ser usadas em transplante, é: ausência de aberrações cromossômicas clonais descritas em neoplasias (modelo de laudo – anexo 15). Este critério está de acordo com o que já foi descrito por Barkholt *et al.* (2013) e Capelli *et al.* (2015).

Entende-se então que somente células com cariótipo normal deveriam ser liberadas para uso clínico. Porém, isto não é consenso entre os pesquisadores. Isto acontece porque há dúvidas sobre a capacidade tumorigênica das células com anormalidades citogenéticas, que ocorrem tanto em células pluripotentes como em CT adultas (HESLOP *et al.*, 2015).

No contexto de avaliação da instabilidade genômica de uma linhagem celular devemos levar em consideração que a ocorrência de células aneuploides não está necessariamente associada à transformação: tanto MSCs com ou sem alterações cromossômicas mostram interrupção do crescimento e entram em senescência (TARTE *et al.*, 2010).

Sensebé *et al.* (2012) defende a hipótese de que a estabilidade genômica observada em MSC é consistente e não representa uma preocupação, pois a presença de uma aberração cromossômica adquirida num

primeiro momento, seguida de um cariótipo normal, pode indicar que esta aberração não confere vantagem proliferativa.

Realmente, como relatado na Introdução desta tese, somente aberrações que conferem vantagem proliferativa poderiam estar relacionadas ao início de um processo tumorigênico.

Porém, Ben-David *et al.* (2012), referindo-se à Sensebé *et al.* (2012), argumentam que existem dois tipos de aberrações genômicas: (1) aberrações transitórias que aparecem ocasionalmente na cultura, mas são desvantajosas, e, portanto, desaparecem ao longo do cultivo; e (2) aberrações recorrentes vantajosas, as quais acumulam-se rapidamente na cultura, de maneira clonal. Estes dois tipos de manifestações de instabilidade genômica existem simultaneamente em culturas de células-tronco. Sensebé *et al.* (2012) refere-se somente ao primeiro tipo de aberração genômica.

Podemos considerar então, que células aberrantes podem superar as células normais em crescimento, o que nos permite supor, portanto, que aberrações recorrentes em MSC podem indicar o início de uma transformação espontânea na cultura (BEN-DAVID; MAYSHAR; BENVENISTY, 2012).

A dificuldade prática é que a decisão de infundir ou não células com cariótipo anormal tem que ser feita em poucas horas. Quando é encontrada uma aberração clonal em P2, como aconteceu no caso nº34 deste trabalho (ME147 com várias trissomias), a equipe está preparada para processar a amostra final e o paciente para receber estas células. Portanto, não há tempo para esperar as passagens seguintes para avaliar se esta aberração que foi encontrada é temporária ou não. Seria muito útil se, a exemplo do Banco de Dados sobre aberrações cromossômicas recorrentes em neoplasias (MITELMAN; JOHANSSON; MERTENS, 2016), existisse uma lista com as aberrações recorrentes em CT cultivadas. Para células pluripotentes embrionárias e pluripotentes induzidas já existem relatos de aberrações recorrentes (MARTINS-TAYLOR; XU, 2012), mas não encontramos na literatura nenhum levantamento semelhante em relação às MSCs. Ainda assim, mesmo que existisse esta lista, ainda precisaríamos da informação se a aberração que estamos detectando, além de estar na lista das recorrentes, é transitória ou não nos cultivos. Ou seja, ainda não temos dados disponíveis suficientes para classificar o real risco do potencial tumorigênico de cada

aberração que podemos encontrar. Por isso, a exemplo de Muntion *et al.* (2012) que também descreveu um caso com aberração clonal em paciente que aguardava pelo transplante com MSC, nós também decidimos não usar estas células para o transplante, por considerar que existe um alto risco para potencial tumorigênico, que não pode ser ignorado.

Interessantemente, neste trabalho, duas alterações clonais diferentes foram encontradas em dois cultivos paralelos do mesmo paciente (nº 34): cariótipo hiperdiploide com várias trissomias: 43~52,XY,+X,+4,+5,+10 (amostra em P2 do primeiro cultivo) e com aberração estrutural: 46,XY,t(9;18)(p24;q11) (amostra em P3 do segundo cultivo). Isto pode indicar uma propensão individual à instabilidade genética, pois este paciente tem uma história de tumor maligno no rim. Isto chama a atenção para a necessidade de avaliar estas amostras caso por caso, especialmente em pacientes com história previa de câncer.

Neste caso, vias diferentes durante o cultivo celular resultaram em produtos finais diferentes (aberrações cromossômicas clonais diferentes). Isto pode ser considerado como um exemplo da dinâmica evolucionária observada *in vivo* e *in vitro* por Heng *et al.* (2006) onde são definidos dois tipos de aberrações: as não clonais (que geralmente são ignoradas pelos pesquisadores, por considerarem que são artefatos ou achados acidentais) e as aberrações clonais, que por sua vez podem ser transitórias. Stepanenko *et al.* (2015) considera o surgimento deste tipo de aberrações uma evidência da diversidade genômica da população celular, a qual é aumentada por alterações cromossômicas caóticas, durante a instabilidade cromossômica observada na evolução genômica de células tumorais. Segundo estes autores, o padrão da evolução genômica pode ser dividido em duas fases: uma contínua, gradativa, com aberrações cromossômicas clonais dominantes e baixa frequência de aberrações não clonais; e outra fase descontínua, pontuada, caracterizada pela presença de aberrações não clonais e aberrações clonais transitórias, como observado nos nossos dois cultivos deste caso.

Em relação ao tipo de aberração cromossômica que pode ocorrer durante um cultivo, observa-se que o surgimento de aneuploidias, por exemplo trissomias e monossomias, é um fenômeno já bem conhecido e alguns estudos com camundongos imunodeficientes mostram que isto não necessariamente

está associado à transformação e formação de tumor (ROEMELING-VAN RHIJN *et al.*, 2013). Porém, é interessante observar que cada tipo de célula-tronco tem propensão para adquirir anormalidades cromossômicas recorrentes distintas, e, o que é importante, assemelha-se às aberrações características dos tumores da mesma origem celular (BEN-DAVID; MAYSHAR; BENVENISTY, 2012). Por exemplo: a trissomia do cromossomo 12 é a aberração mais frequente em linhagens de células-tronco pluripotentes (embrionárias e pluripotentes induzidas); e esta é também a aberração mais comum nos três tipos de tumores de células germinativas (teratomas, seminomas e adenomas ovarianos) (BEN-DAVID; MAYSHAR; BENVENISTY, 2011), ressaltando a importância do surgimento da alteração genética como etapa importante para o estabelecimento do processo tumoral.

No caso 34 deste trabalho encontramos alterações cromossômicas que estão descritas em vários tipos de câncer (<http://cgap.nci.nih.gov/Chromosomes/RecurrentAberrations2015>). Cariótipos hiperdiploides com as trissomias encontradas (ME147) são comuns em algumas leucemias e tumores sólidos. Translocações envolvendo a região 18q11 (ME161) já foram descritas em vários casos de leucemias e também em sarcomas, que são neoplasias de origem mesenquimal. Portanto, a semelhança entre a alteração genética da célula-tronco e de uma célula tumoral de mesma origem é inegável, indicando que aquela aberração confere vantagem proliferativa naquele tipo celular (BEN-DAVID; MAYSHAR; BENVENISTY, 2011). Mais do que isso, quando consideramos o uso de MSCs expandidas *ex vivo*, a possibilidade da instabilidade genética e da transformação espontânea após o cultivo em longo prazo deve ser considerada (ESTRADA *et al.*, 2013, PAN *et al.*, 2014), pois o potencial oncogênico destas células ainda não está completamente entendido (RODRIGUEZ, *et al.*, 2014). Por isto Barkholt *et al.* (2013) insiste que, ainda que nem sempre possa ser demonstrada a formação de tumor a partir de células transformadas, a possibilidade deste risco tem que ser considerada, por causa das incertezas das características destas células anormais e porque o acompanhamento destes pacientes ainda é muito limitado.

Não encontramos descrição na literatura de todas as aberrações (+X,+4,+5,+10 e t(9;18)(p24;q11) encontradas em nossa amostra. Muntion *et al.* (2012) descrevem um caso de trissomia do cromossomo 10 em 61

pacientes analisados, e Capelli *et al.* (2014), em 92 amostras de 58 pacientes, descrevem um caso de inversão do cromossomo 1, um com monossomia do cromossomo X e um com suspeita de translocação t(9;4). Segundo estes autores, esta é a maior amostra já analisada de MSCs cultivadas para grau clínico.

5.2.2 Comparação durante o cultivo em longo prazo prolongado (T1,T2 e T3)

A instabilidade genética aumenta ao longo do cultivo. A análise da composição genômica realizada nas passagens iniciais pode não ser representativa da análise de expressão realizada nas passagens mais tardias, pois as células-tronco podem adquirir alterações genômicas durante o cultivo e mudar o perfil genômico após algumas passagens (BEN-DAVID; MAYSHAR; BENVENISTY, 2013). Binato *et al.* (2012) demonstraram, por exemplo, a manutenção da estabilidade genômica das MSCs até P4, mas, a partir de P5, várias alterações genéticas foram observadas, demonstrando a necessidade de fazer esta avaliação caso por caso, se forem desejadas células de fases tardias para uso terapêutico. Algumas aberrações cromossômicas podem conferir vantagem proliferativa e aumentar sua frequência depois de algumas passagens, como demonstrado por Catalina *et al.* (2008): a trissomia do 12, observada em uma linhagem de células-tronco embrionárias em P17, em 26% das células, alcançou mosaicismo de 89% em P30. Já a trissomia do 14, observada em P10, permaneceu durante todo o tempo de cultivo com níveis de mosaicismo entre 15 e 36%.

Em relação à frequência de aberrações cromossômicas clonais, nos 13 casos que mantivemos o cultivo em longo prazo prolongado, analisando um total de 110 amostras, uma amostra (do caso 42) apresentou aberração cromossômica clonal em T3, especificamente em P24: material adicional no braço curto do cromossomo, em 75% das células. Embora não tenha sido avaliado antes da expansão celular e nas fases iniciais, é interessante observar que este caso apresentou um resultado normal, 46,XX[20], em P19, mostrando que a aberração detectada em P24 realmente surgiu (ou foi selecionada) durante o cultivo celular. Nas duas avaliações seguintes (P26 e P27) não foram

detectadas metáfases, o crescimento celular parou. A frequência de amostras com aberração cromossômica clonal em T3 foi de 1,78% (1 em 56).

Em relação aos sinais de instabilidade cromossômica (quebras, falhas e tetraploidia) observamos um aparente aumento da frequência quando comparamos T1 (fases iniciais) com T2 e T3 (fases intermediárias e tardias), embora sem significância estatística.

É possível que a frequência de quebras dependa do paciente, mostrando uma predisposição individual à instabilidade genética, pois, dos 13 pacientes analisados, somente quatro tiveram quebras, mas três destes mais de uma vez ao longo das passagens (anexo 9). Estes três pacientes (35, 40 e 47), além de terem quebras mais de uma vez, também apresentaram falhas. Isto confirma a observação de Catalina (2008) de que a propensão à instabilidade cariotípica é inerente a algumas linhagens de células-tronco cultivadas e não a outras, independente das condições de cultivo.

Por outro lado, a única amostra que apresentou aberração cromossômica clonal nas fases tardias (paciente 42) não havia apresentado nenhum sinal de instabilidade. Com isso, podemos admitir que alguns pacientes podem apresentar maior propensão a mostrar sinais de instabilidade genética, mas isto não necessariamente significa que ele desenvolverá aberrações cromossômicas clonais durante o cultivo.

Em relação às regiões do genoma que apresentaram quebras e falhas, dentre as 22 regiões detectadas (considerando os braços curto e longo de cada cromossomo) apenas três regiões são comuns ao que foi detectado na medula óssea e nas MSCs: 5q, 19q e 13q. A recorrência pode estar indicando a presença de sítios frágeis: regiões localizadas em pontos específicos dos cromossomos, com tendência a quebras, evidenciada pela produção de fragmentos acêntricos e deleções cromossômicas (BORGES-OSÓRIO, 2001). Em MSC a região onde se observou mais quebras e falhas em T1 foi a 13q (tabela 11). Interessantemente, o braço longo do cromossomo 13 é a localização do gene *RB1*, frequentemente alterado em vários tipos de tumores mesenquimais (DAHELN *et al.*, 2003). A perda deste gene, pela monossomia ou deleção desta região, é uma aberração recorrente em MSC (BEN-DAVID; MAYSHAR; BENVENISTY, 2011).

5.3 COMPARAÇÃO DAS DIFERENTES FONTES DE CÉLULAS

5.3.1 Células-tronco mesenquimais derivadas de medula óssea, tecido adiposo e origem dental

No cultivo até as fases avançadas (T1, T2 e T3) tanto as células derivadas de medula óssea (casos 4, 5, 6, 7, 16, 25 e 35), como de tecido adiposo (casos 40, 41, 42, 43 e 44) e de origem dental (caso 47) mostraram manutenção do cariótipo normal até a senescência, com exceção do caso 42 que apresentou um clone com material adicional no braço curto do cromossomo 1. Observe-se que esta amostra é originada de tecido adiposo, onde existe um aumento do *stress* oxidativo e do processo de inflamação. Estes processos são conhecidos por afetar os telômeros (estruturas localizadas nas extremidades dos cromossomos eucarióticos), que, por sua vez, tem um papel crítico na manutenção da integridade genômica. Isto é especialmente evidenciado em células somáticas cultivadas *in vitro* (TZANETAKOU *et al.*, 2012), como as células do presente estudo. Portanto, é provável que MSCs derivadas de tecido adiposo sejam mais propensas à instabilidade genética, do que células derivadas de outras fontes, mas uma amostra maior deve ser estudada para confirmar estes dados.

5.3.2 Células-tronco mesenquimais e células pluripotentes induzidas

Nesse trabalho MSCs cultivadas até P2 mostraram cariótipo normal em 97,9% dos casos como a maioria dos relatos na literatura (BERNARDO *et al.*, 2007, WANG *et al.*, 2012). Já em células-tronco pluripotentes induzidas e pluripotentes embrionárias há relatos de várias alterações genéticas recorrentes após cultivo prolongado (MARTINS-TAYLOR; XU, 2012, WEISSBEIN; BENVENISTY; BEN-DAVID, 2014), entre elas, as que foram detectadas nas nossas primeiras três amostras (IP001, IP002 e IP003): amplificação em 1p, amplificação em 1q, trissomia do cromossomo 12 e deleção do cromossomo 22. Segundo Ben-David, Benvenisty e Mayshar (2010) vários fatores podem contribuir para o estabelecimento de tais anormalidades como: o tipo e a idade do tecido somático de origem, a reprogramação

ineficiente que pode selecionar clones aberrantes (aumenta a pressão seletiva na cultura), o processo de reprogramação em si que envolve drásticas alterações na expressão gênica (incluindo oncogenes) e modificações epigenéticas, e, por fim, o processo de adaptação em cultura, promovendo as células com maior sobrevivência ou com vantagem seletiva de crescimento durante a rotina de cultivo *in vitro*.

O fato de apresentarem aberrações recorrentes é um obstáculo para o uso deste tipo de células como terapia, portanto há um grande esforço por parte dos pesquisadores em desenvolver protocolos que garantam a manutenção da estabilidade genética mesmo após a manipulação gênica necessária para a reprogramação destas células. Como apresentado por Mesquita *et al.* (2015), a equipe da UFRJ desenvolveu um protocolo que manteve a normalidade cariotípica após a transdução dos fibroblastos, utilizando uma multiplicidade de infecção (MOI) de 1 como observado no cariótipo de IP006. As principais mudanças no novo protocolo, que podem justificar a prevenção do surgimento de aberrações cromossômicas, é o fato de, neste protocolo, fazerem a titulação do vírus antes da transdução dos fibroblastos, o que possibilitou uma adequação de quantidade de partículas virais por célula, que nos primeiros protocolos não era feito. Portanto, embora na literatura seja frequente a descrição de aberrações cromossômicas recorrentes em iPS, estes resultados demonstram que neste tipo de célula-tronco também é possível a manutenção do cariótipo normal, como nas MSCs.

5.4 COMPARAÇÃO DA SENSIBILIDADE DAS TÉCNICAS

A escolha da técnica mais adequada para a avaliação da instabilidade genética é importante porque as MSCs são consideradas um produto de terapia avançada e, como tal, precisam satisfazer todas as exigências para produtos médicos que se destinam ao uso humano. Para isto, a análise cariotípica deve ser incluída na avaliação da qualidade e segurança destas células, para demonstrar a ausência da instabilidade genética (TORRE *et al.*, 2015). Neste trabalho aplicamos outras duas técnicas de citogenética, a FISH e o teste do DEB, para comparar com a técnica mais usada: a cariotipagem com bandeamento GTG.

A cariotipagem foi capaz de detectar alterações clonais significativas em 1,9% das amostras analisadas (3 em 158), sendo 3,3% nas passagens iniciais (2 em 60) e 1,8% nas passagens tardias (1 em 56).

A FISH foi capaz de detectar alterações significativas (acima do valor de corte validado) em 13,64% das amostras analisadas (3 em 22), sendo 8,3% para gene *TP53* (1 em 12) e 20% para o gene *RB1* (2 em 10). Os valores de corte foram determinados em trabalho para validação pré-clínica (SEMMER *et al.*, 2015). Para testar especificamente a perda destes genes, a FISH mostrou-se mais sensível que a cariotipagem.

O teste do DEB não detectou resultados anormais em nenhuma das 9 amostras analisadas.

Não encontramos relatos na literatura sobre uso da FISH, para avaliação de *TP53* e *RB1*, nem do teste do DEB em MSCs.

Quando comparadas as três técnicas observamos que a FISH foi capaz de detectar alterações em amostras que tinham cariótipos normais (P2 do caso 21 e P19 do caso 40) e em um caso que não tinha sido possível fazer o cariótipo por falta de metáfases (P7 do caso 4). Isto confirma a vantagem do uso desta técnica para detectar o que não pôde ser observado na cariotipagem, podendo ser utilizado até mesmo em casos sem metáfases (como aconteceu também na P17 do caso 25). Porém, é importante enfatizar que a FISH não avalia todo o genoma, o resultado limita-se a avaliar a presença ou ausência de alterações nas regiões cromossômicas investigadas naquele teste específico, neste caso, presença ou ausência dos genes *TP53* e *RB1*. Embora a ausência destes dois genes possa ser uma etapa fundamental no processo tumorigênico, como já discutido anteriormente, a falta de mais dados na literatura em relação às estas alterações em MSCs, impossibilita uma interpretação correta de como poderíamos usar estes resultados na prática, incluindo ou não como critério de rejeição de uma amostra.

Por outro lado a importância da cariotipagem fica evidente considerando as alterações encontradas no caso 34: trissomias e translocação, ambas já descritas em neoplasias. Este foi o único caso em que as alterações genéticas encontradas foram critério de rejeição da amostra. O que é importante: estas aberrações clonais não teriam sido detectadas na FISH a não ser que estivéssemos interessados especificamente nestas regiões do genoma. A

translocação não seria detectada nem por FISH nem por microarranjos de CGH, por ser uma aberração balanceada. As trissomias também não seriam detectadas por estar em mosaico baixo (menos de 20% de células anormais).

Em concordância com Barkholt *et al.* (2013) acreditamos que as três técnicas: cariotipagem, FISH e microarranjos de CGH podem ser usados de forma complementar, ressaltando que a cariotipagem, apesar de ter baixo poder de resolução (5-10 Mb) é capaz de detectar rearranjos balanceados, como aconteceu no nosso caso 34.

Ben-David, Mayshar e Benvenisty (2013) propuseram a substituição da cariotipagem por um método baseado na avaliação da expressão gênica, chamado pelos autores de *e-karyotyping*. Microarranjos de expressão gênica são gerados das linhagens celulares de interesse e então são comparados com uma base de dados de perfis de expressão gênica similar, usando duas análises de bioinformática complementares. Os resultados obtidos destas análises são então combinados para determinar quais aberrações genômicas estão presentes na amostra examinada. Este método está sendo proposto para células-tronco pluripotentes (iPS e embrionárias) e uma limitação importante, comentada pelos próprios autores, é que isto é plataforma-dependente para cada tipo celular, ou seja, os parâmetros das análises de bioinformática tem que ser ajustados e validados para cada plataforma de micro arranjos e cada tipo de célula-tronco.

Finalmente, propomos dois questionamentos importantes na reflexão deste assunto. Depois de discutir as limitações dos métodos atuais: cariotipagem e CGH, que são pouco sensíveis, e a FISH, que precisa do conhecimento do alvo, Sensebé (2013) questiona sobre a estabilidade genética das MSCs:

- estamos na direção certa?
- temos um alvo real definido?

A transformação das células é um evento extremamente raro e nunca foi descrito em mais de 15 anos de uso clínico das MSCs, então como podemos prever algo que nunca aconteceu? Para estudar o potencial de transformação das MSCs expandidas, precisaríamos de clones de MSCs transformados....

Mas na prática, o que realmente precisa ser considerado, é que o desenvolvimento de qualquer procedimento terapêutico depende da avaliação rigorosa dos riscos e dos benefícios para o paciente. Prockop (2010) comenta que os riscos são sempre baseados em estimativas, como a probabilidade de contaminação de um tablete de aspirina por uma toxina ou a probabilidade de contaminação de uma preparação celular por células tumorigênicas. Os benefícios também são baseados em estimativas, como a probabilidade da progressão da doença ou de um prognóstico favorável para um determinado paciente. A questão não é simples.

Devemos incessantemente buscar respostas para poder oferecer um tratamento seguro para os milhões de pacientes que depositam suas esperanças na terapia celular.

6 CONCLUSÕES

Baseados nos resultados de 158 amostras de células-tronco cultivadas, de 47 pacientes, utilizando as técnicas de cariotipagem com bandeamento GTG, FISH e teste do DEB, concluímos que:

1- Os resultados obtidos demonstram a relevância da padronização, implantação e utilização rotineira de testes citogenéticos (cariotipagem com bandeamento GTG, FISH e teste do DEB) em células-tronco cultivadas para procedimentos terapêuticos.

2 - Células-tronco mesenquimais (MSCs) mantêm a estabilidade genética após cultivo até as passagens iniciais, demonstrado por meio da manutenção do cariótipo normal em 97,87% dos casos.

3 - Todas as amostras de células-tronco que se destinam à utilização em protocolos clínicos devem ser avaliadas para manutenção da estabilidade genética, pois a frequência de 2,12% de pacientes com surgimento de alterações cariotípicas após o cultivo, justifica este procedimento. Atenção especial deve ser direcionada aos pacientes com histórico de câncer ou doenças que cursam com instabilidade genômica.

4 - Amostras que apresentam aberrações cromossômicas clonais não devem ser utilizadas em protocolos clínicos, pois não se pode minimizar o risco para potencial tumorigênico.

5 - Quando mantidas em longo prazo, prolongado até as fases tardias, e avaliadas por cariotipagem, as MSCs podem apresentar alterações cromossômicas clonais, sendo observada, na nossa amostra, uma frequência de 1,78% em 56 amostras de 13 pacientes.

6 - Sinais de instabilidade cromossômica (quebras e tetraploidia) aumentam a frequência quando comparados antes e após cultivo em longo prazo, confirmando o potencial tumorigênico devido à expansão celular *in vitro*.

7 - A perda de uma das cópias do gene *TP53* e do gene *RB1*, detectadas por FISH, pode ocorrer em MSCs mantidas em longo prazo, porém, amostras maiores precisam ser avaliadas para confirmar, ou não, a frequência destes resultados.

8 - É possível avaliar a instabilidade cromossômica de MSC por meio do teste do DEB, porém, amostras maiores precisam ser avaliadas para confirmar, ou não, os resultados negativos desta amostra.

9 - É provável que MSCs derivadas de tecido adiposo sejam mais propensas à instabilidade genética, do que células derivadas de outras fontes, entretanto amostras mais consistentes devem ser estudadas para confirmar estes dados.

10 – É possível manter o cariótipo normal em iPS após reprogramação de fibroblastos de pele, embora seja frequente a descrição de aberrações cromossômicas recorrentes nestas células, fazendo com que este resultado deva ser interpretado com cautela.

11 - O teste mais informativo para avaliação da estabilidade cromossômica é a cariotipagem com bandeamento GTG.

7 REFERÊNCIAS

AKENO, N. et al. p53 suppresses carcinoma progression by inhibiting mTOR pathway activation. **Oncogene**, Cincinnati, v. 34, n. 5, p. 589-599, 2015.

AMARIGLIO, N. et al. Donor-derived brain tumor following neural stem cell transplantation in an ataxia telangiectasia patient. **Plos Medicine**, San Francisco, n. 6, p. 221-231, 2009.

ANDRADE, L. F. R. et al. **Hereditary hemochromatosis**: cellular response to oxidative stress. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Bioquímica clínica, Universidade de Aveiro, Portugal, 2013. Disponível em: < <http://hdl.handle.net/10773/12495>>. Acesso em: 07 dez. 2015.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **RDC09**: Requisitos técnico-sanitários para o funcionamento de Centros de Tecnologia Celular, que fornecem células humanas e seus derivados para pesquisa clínica e terapia. Brasília, 2011. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/623ecb0047458efe9836dc3fbc4c6735/RDC_09_2011.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em: 17 nov. 2015.

AUERBACH, A. D. Diagnosis of fanconi anemia by diepoxybutane analysis. **Current Protocols in Human Genetics**, Nova York, v. 8.7, 2003.

AUERBACH, A. D. Diagnosis of fanconi anemia by diepoxybutane analysis. **Current Protocols in Human Genetics**, Nova York, v. 85, p.8.7.1-8.7.17, 2015. doi: 10.1002/0471142905.hg0807s85. Disponível em : <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/0471142905.hg0807s85/pdf>. Acesso em 14.01.16.

AUERBACH, A. D. Fanconi anemia diagnosis and diepoxybutane (DEB) test. **Experimental Hematology**, Nova York, v. 21, p. 731-733, 1993.

AUERBACH, A. D.; ROGATKO, A.; SCHROEDER-KURTH, T. M. International fanconi anemia registry: relation of clinical symptoms to diepoxybutane sensitivity. **Blood**, Nova York, v. 73, p. 391-396, 1989.

BARCH, M. J.; KNUTSEN, T.; SPURBECK, J. L. **The AGT Cytogenetic Laboratory Manual**. 3.ed. Filadélfia: Lippincott Williams & Wilkins, 1997.

BARKHOLT, L. et al. Risk of tumorigenicity in mesenchymal stromal cell-based therapies – bridging scientific observations and regulatory viewpoints. **Cytotherapy**, v. 15, p. 753-759, 2013.

BEIGUELMAN, B. **Curso Prático de Bioestatística**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1988.

BEN-DAVID, U.; BENVENISTY, N. Analyzing the genomic integrity of stem cells. **StemBook**, Cambridge, ed. The stem cell research community, 10 jun. 2012. doi: 10.3824/stembook.1.150.1. Acesso em: 05 out. 2015.

BEN-DAVID, U.; BENVENISTY, N.; MAYSHAR, Y. Genetic instability in human induced pluripotent stem cells. **Cell Cycle**, v. 9, n. 23, p. 4603-4604, 2010.

BEN-DAVID, U.; MAYSHAR, Y.; BENVENISTY, N. Large-scale analysis reveals acquisition of lineage-specific chromosomal aberrations in human adult stem cells. **Cell Stem Cell**, Cambridge, v. 9, n. 2, p. 97-102, 2011.

BEN-DAVID, U.; MAYSHAR, Y.; BENVENISTY, N. Significant acquisition of chromosomal aberrations in human adult mesenchymal stem cells: response to Sensebé et al. **Cell Stem Cell**, Cambridge, v. 10, n. 6, p. 10-11, 2012.

BEN-DAVID, U.; MAYSHAR, Y.; BENVENISTY, N. Virtual karyotyping of pluripotent stem cells on the basis of their global gene expression profiles. **Nature Protocols**, London, v. 8, n. 5, p. 989-997, 2013.

BERNARDO, M. E.; ZAFFARONI, N.; NOVARA, F. *et al.* Human bone marrow derived mesenchymal stem cells do not undergo transformation after long-term in vitro culture and do not exhibit telomere maintenance mechanisms. **Cancer research**, v. 67, n. 19, p. 9142-9, 2007.

BINATO, R. et al. Stability of human mesenchymal stem cells during *in vitro* culture: considerations for cell therapy. **Cell Proliferation**, v. 46, n. 1, p. 10-22, 2012.

BLUM, B.; BENVENISTY, N. The tumorigenicity of diploid and aneuploid human pluripotent stem cells. **Cell Cycle**, v. 8, p. 3822-3830, 2009.

BOCHKOV, N. P. et al. Methodological guidelines for genetic safety testing of cell transplants. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**, v. 148, n. 4, p. 677-683, 2009.

BORGES-OSÓRIO, M. R.; ROBINSON, W. M. **Genética humana**. 2.ed. Porto Alegre: Artmed Editora, 2001.

BUZZARD, JJ, GOUGH NM, CROOK JM, C. A. Karyotype of human ES cells during extended culture. **Nature Biotechnol**, v. 22, n. 4, p. 381-382, 2004.

CAPELLI, C. et al. Frequent occurrence of non-malignant genetic alterations in clinical grade mesenchymal stromal cells expanded for cell therapy protocols. **Haematologica**, v. 99, n. 6, e94-97, 2014.

CAPELLI, C. et al. Clinical grade expansion of MSCs. **Immunology Letters**, v. 168, n. 2, dez. 2015. doi: 10.1016/j.imlet.2015.06.006. Acesso em: 23 fev. 2016.

CAPLAN, A. I. Why are MSCs therapeutic? New data: new insight. **The Journal of Pathology**, v.217, n. 2, p. 318-324, 2009.

CAPUTO, L.Z. **Implantação da técnica de quebras cromossômicas com diepoxibutano (DEB) em laboratório de citogenética: estudo de 148 casos.** São Paulo, 2002. Dissertação (mestrado). Universidade de São Paulo.

CATALINA, P. et al. Conventional and molecular cytogenetic diagnostic methods in stem cell research: a concise review. **Cell biology international**, v. 31, n. 9, p. 861-9, 2007.

CATALINA, P. et al. Human ESCs predisposition to karyotypic instability: Is a matter of culture adaptation or differential vulnerability among hESC lines due to inherent properties? **Molecular cancer**, v. 7, p. 76, 2008. doi:10.1186/1476-4598-7-76.

CHEN, G. et al. Human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells do not undergo malignant transformation during long-term culturing in serum-free medium. **Plos One**, v. 9, n. 6, 2014.

CHEN, J. Y. et al. Comparative analysis of biological characteristics of adult mesenchymal stem cells with different tissue origins. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 8, n. 9, p. 739-746, 2015.

CHO, S. H.; GUENGERICH, F. P. In vivo roles of conjugation with glutathione and O6-alkylguanine DNA-alkyltransferase in the mutagenicity of the bis-electrophiles 1,2-dibromoethane and 1,2,3,4-diepoxibutane in mice. **Chemical Research in Toxicology**, Washington, v. 26, n. 11, nov. 2013. doi: 10.1021/tx4003534. Acesso em: 07 dez. 2015.

CIOLINO, A. L.; TANG, M. E.; BRYANT, R. Statistical treatment of fluorescence in situ hybridization validation data to generate normal reference ranges using excel functions. **Journal of Molecular Diagnostics**, Amsterdam, v. 11, n. 4, p. 330-333, 2009.

DAHLÉN, A. et al. Clustering of deletions on chromosome 13 in benign and low-malignant lipomatous tumors. **International Journal of Cancer**, v. 103, n. 5, p. 616-623, 2003.

DOMINICI, M. et al. Minimal Criteria For Defining Multipotent Mesenchymal Stromal Cells. The International Society For Cellular Therapy Position Statement. **Cytotherapy**, Bethesda v.8, n.4, p.315-317, 2006.

DUARTE, D.M. et al. Chromosomal characterization of cryopreserved mesenchymal stem cells from the human subendothelium umbilical cord vein. **Regenerative Medicine**, v. 7, n.2, p.1-11, 2012.

ESTRADA, J. C. et al. Human mesenchymal stem cell-replicative senescence and oxidative stress are closely linked to aneuploidy. **Cell Death and Disease**, v. 4, n. 691. doi: 10.1038/cddis.2013.211. Acesso em: 12 fev. 2016.

FAN, Y. Molecular Cytogenetics: Protocols and Applications. In: **Methods in Molecular Biology**. Totowa: Humana Press Inc, v. 204, 2005.

FOUDAH, D. et al. Monitoring the genomic stability of in vitro cultured rat bone-marrow-derived mesenchymal stem cells. **Chromosome research: an international journal on the molecular, supramolecular and evolutionary aspects of chromosome biology**, v. 17, n. 8, p. 1025-1039, 2009.

GATZ, S. A.; WIESMÜLLER, L. p53 in recombination and repair. **Cell Death and Differentiation**, v. 13, p. 1003-1016, 2006. doi:10.1038/sj.cdd.4401903. Acesso em 12 jan.2016.

GECAI, C. et al. Human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells do not undergo malignant transformation during long-term culture in serum-free medium. **Plos One**, San Francisco, v. 9, n. 6, jun. 2014. doi: 10.1371/journal.pone.0098565. Acesso em: 08 dez. 2015.

GHHEREZGHIHER, T. B. et al. 1,2,3,4-Diepoxybutane-induced DNA-protein cross-linking in human fibrosarcoma (HT1080) cells. **Journal of Proteome Research**, Washington, v. 12, n. 5, 18 mar. 2013. doi: 10.1021/pr3011974. Acesso em: 07 dez. 2015.

GIROLAMO, L. et al. Mesenchymal stem/stromal cells: a new "cells as drugs" paradigm. Efficacy and Critical Aspects in Cell Therapy. **Current Pharmaceutical Design**, v.19, p. 2459-2473, 2013.

GISSELSSON, D. et al. Mitotic instability associated with late genomic changes in bone and soft tissue tumours. **Cancer Letters**, v. 206, n. 69-76, 2004.

GRIMES, B. R. et al. Interphase FISH demonstrates that human adipose stromal cells maintain a high level of genomic stability in long-term culture. **Stem Cells and Developments**, v. 18, n. 5, p. 717-724, 2009.

HASTINGS, R. Guidelines and Quality Assurance for Acquired Cytogenetics da European Cytogeneticists Association (2013). **E.C.A. - European Cytogeneticists Association Newsletter**. n. 31, p. 7-21. 2013. Disponível em : http://www.e-c-a.eu/files/downloads/Guidelines/NL31_Acquired_Guidelines.pdf. Acesso em 21 fev.2016.

HECHT, F. Fragile sites, cancer chromosome breakpoints, and oncogenes all cluster in light G bands. **Cancer Genetics and Cytogenetics**. v. 31, n.1, p.17-24, 1988.

HENG, H. H. et al. Stochastic cancer progression driven by non-clonal chromosome aberrations. **Journal of Cellular Physiology**, v. 208, n. 2, p. 461-472, 2006.

HERBERTS, C. A.; KWA, M. S.; HERMSEN, H. P. Risk factors in the development of stem cell therapy. **Journal of Translational Medicine**, v. 9, n. 1, p. 29, 2011.

HESLOP, J. A. et al. Concise review: workshop review: understanding and assessing the risks of stem cell-based therapies. **Stem Cells Translational Medicine**, v. 4, p. 1-12, 2015.

HEO, J. S. et al. Comparison of molecular profiles of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, umbilical cord blood, placenta and adipose tissue. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 37, p. 115-125, 2016.

HORWITZ, E. et al. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v.7, n.5, p. 393-405, 2005.

INZUNZA, J. et al. Comparative genomic hybridization and karyotyping of human embryonic stem cells reveals the occurrence of an isodicentric X chromosome after long-term cultivation. **Molecular human reproduction**, v. 10, n. 6, p. 461-6, 2004.

ISCN (2013): **An International System For Human Cytogenetic Nomenclature**. L.G. Shaffer, J. McGowan-Jordan, M. Schmid (eds); Basel: S.Karger, 2013.

KHANDELWAL, N.; ABRAHAM, S.K. Intake of anthocyanidin spelargonidin and cyanidin reduces genotoxic stress in mice induced by diepoxybutane, urethane and endogenous nitrosation. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, Amsterdam, v. 37, n. 2, mar. 2014. doi: 10.1016/j.etap.2014.02.012. Acesso em: 07 dez. 2015.

KOSULL, H & AULA, P. Nonrandom distribution of chromosome breaks in Fanconi's anaemia. **Cytogenetics and Cell Genetics**, v.12, p. 423-434, 1973.

LAURENT, L. C. et al. Dynamic changes in the copy number of pluripotency and cell proliferation genes in human ESCs and iPSCs during reprogramming and time in culture. **Cell Stem Cell**, Cambridge, v. 8, n. 1, p. 106-118, 2011.

LEMISCHKA, I. R. Stem cell biology: a view toward the future. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v. 1044, p. 132-138, 2005.

LENGAUER, C.; KINZLER, K.W.; VOGELSTEIN, B. Genetic instabilities in human cancer. **Nature**, v.396, p.643-649, 1998.

MALUF, S. W. et al. **Citogenética Humana**. São Paulo: Artmed, 2011.

MARTINO, S. et al. Stem cell-biomaterial interactions for regenerative medicine. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 1, p. 338-351, 2012.

MARTINS-TAYLOR, K.; XU, R. Concise review: Genomic stability of human induced pluripotent stem cells. **Stem Cells**, v. 30, p. 22-27, 2012.

MAYSHAR, Y. et al. Identification and classification of chromosomal aberrations in human induced pluripotent stem cells. **Cell Stem Cell**, v. 7, p. 521-531, 2010.

MEISNER, L. F.; JOHNSON, J. A. Protocols for cytogenetic studies of human embryonic stem cells. **Methods**, San Diego, v. 45, n. 2, p. 133-41, 2008.

MESQUITA, F.C.P. et al. Generation of human ips cell line ihfib3.2 from dermal fibroblasts. **Stem Cell Research**, v.15, n.3, p. 445-448, 2015.

MEZA-ZEPEDA, L. A. et al. High-resolution analysis of genetic stability of human adipose tissue stem cells cultured to senescence. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 12, n. 2, p. 553-563, 2008.

MITELMAN, F.; JOHANSSON, B.; MERTENS, F. Cancer Cytogenetics Update 2016. **E.C.A. - European Cytogeneticists Association Newsletter**. n. 37, p. 9-19. 2016.

MITELMAN, F.; JOHANSSON, B.; MERTENS, F. Mitelman Database of Chromosome Aberrations and Gene Fusions in Cancer. Cancer Genome Anatomy Project. **National Cancer Institute**, 2016. Disponível em: <<http://cgap.nci.nih.gov/Chromosomes/Mitelman>>. Acesso em: 19 fev.2016.

MITELMAN, F.; JOHANSSON, B.; MERTENS, F. The impact of translocations and gene fusions on cancer causation. **Nature reviews. Cancer**, v. 7, n. 4, p. 233-45, 2007.

MÜHLBACHER, V. et al. Acute lymphoblastic leukemia with low hypodiploid/near triploid karyotype is a specific clinical entity and exhibits a very high TP53 mutation frequency of 93%. **Genes, Chromosomes and Cancer**, Munich, v. 53, n. 6, jun. 2014. doi: 10.1002/gcc.22163. Acesso em: 01 dez. 2015.

MUNTION, S. et al. Optimization of mesenchymal stromal cells karyotyping analysis: implication for clinical use. **Transfusion Medicine**, v. 22, p. 122-127, 2012.

NÄRVÄ, E.; AUTIO, R.; RAHKONEN, N. et al. High-resolution DNA analysis of human embryonic stem cell lines reveals culture-induced copy number changes and loss of heterozygosity. **Nature biotechnology**, v. 28, n. 4, p. 371-7, 2010.

NATARAJAN, A.T.; BOEI, J.J.W.A. Formation of chromosome aberrations: insights from FISH. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, Amsterdam, v. 544, n. 2-3, p. 299-304, 2003.

OWEN, J.; FROHNMAYER, L.; EILER, M. E. **Fanconi Anemia: standards for clinical care**. 2 ed. Philadelphia: Pennsylvania State University, 2003.184p.

PAMPALONA, J. et al. Progressive telomere dysfunction causes cytokinesis failure and leads to the accumulation of polyploid cells. **Plos Genetics**, v. 8, p. 1-10, 2012.

PAN, Q. et al. Detection of spontaneous tumorigenic transformation during culture expansion of human mesenchymal stromal cells. **Experimental Biology and Medicine**, Maywood, v. 239, n. 1, p. 105-115, 2014.

PAYÃO, S.L.M.; SEGATO, R.; SANTOS, R.R. Genetic control of cultivated human stem cells. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, São José do Rio Preto, v.31, n.1, p.15-18, 2009.

POLONI, A. et al. Human mesenchymal stem cells from chorionic villi and amniotic fluid are not susceptible to transformation after extensive in vitro expansion. **Cell transplantation**, v. 20, n. 5, p. 643-54, 2011.

PROCKOP, D. Defining the probability that a cell therapy will produce a malignancy. **Molecular Therapy**, v.18, n.7, p.1249-1250, 2010.

REBELATTO, C. L. K. et al. Dissimilar differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, and adipose tissue. **Experimental Biology and Medicine**, Maywood, v. 233, p. 901-913, 2008.

RODRIGUEZ, R. et al. Expression of FUS-CHOP fusion protein in immortalized/transformed human mesenchymal stem cells drives mixoid liposarcoma formation. **Stem Cells**, Oviedo, v. 31, n. 10, out. 2013. doi: 10.1002/stem.1472. Acesso em: 08 dez. 2015.

RODRIGUEZ, R. et al. Human bone marrow stromal cells lose immunosuppressive and anti-inflammatory properties upon oncogenic transformation. **Stem Cell Reports**, v. 3, p. 606-619. 2014.

ROEMELING-VAN RHIJN, M. et al. Culture expansion induces non-tumorigenic aneuploidy in adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells. **Cytotherapy**, v. 15, p. 1352-1361, 2013.

ROSCHKE, A. V. et al. Karyotypic “state” as a potential determinant for anticancer drug discovery. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 102, n. 8, p. 2964–2969, 2005. doi: 10.1073/pnas.0405578102. Acesso em: 13 jan.2016.

SABHNANI, T. V. et al. Increased incidence of mosaicism detected by FISH in murine blastocyst cultured *in vitro*. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 22, n. 6, p. 621-631, 2011. doi:10.1016/j.rbmo.2011.01.011. Acesso em 25 fev.2016.

SALEM, H.K.; THIEMERMANN, C. Mesenchymal stromal cells: current understanding and clinical status. **Stem cells**, Dayton, v. 28, n. 3, p. 585-96, 2010.

SÁNCHEZ-CASTRO, J. et al. Fluorescence in situ hybridization of tp53 for the detection of chromosome 17 abnormalities in myelodysplastic syndromes. **Leukemia and Lymphoma**, v. 56, n. 11, nov. 2015. doi: 10.3109/10428194.2015.1028053. Acesso em: 12 maio 2015.

SAXE, D. F. et al. Validation of Fluorescence *in situ* Hybridization using an analyte-specific reagent for detection of abnormalities involving the Mixed Lineage Leukemia gene. **Archives of Pathology and Laboratory Medicine**, v. 136, n. 1, p. 47-52, 2012.

SEMMER, C. L. et al. Validação pré clínica da técnica de hibridização *in situ* com fluorescência –sondas TP53 e RB1. In: **Seminário de Iniciação Científica - SEMIC**, 23, Curitiba: PUCPR, 2015. p. GENE9. ISSN 2176-1930. Disponível em: <https://cip.pucpr.br/semic/index.php/semic/view/0008047>. Acesso em: 19 fev.2016.

SENEVIRATNE, U. et al. DNA oligomers containing site-specific and stereospecific exocyclic deoxyadenosine adducts of 1,2,3,4-diepoxybutane: synthesis, characterization, and effects on DNA structure. **Chemical Research in Toxicology**, Washington, v. 23, n. 10, p. 1556-1567, 2010.

SENSEBÉ, L. et al. Limited acquisition of chromosomal aberrations in human adult mesenchymal stromal cells. **Cell Stem Cell**, v.10, p 9-10, 2012.

SENSEBÉ, L. Beyond genetic stability of mesenchymal stromal cells. **Cytotherapy**, v. 15, p. 1307-1308, 2013.

SENSEBÉ, L.; BOURIN, P. Mesenchymal stem cells for therapeutic purposes. **Transplantation**, v. 87, suppl. 9, S49-53, 2009.

SHARMA, R. R. et al. Mesenchymal stem or stromal cells: a review of clinical applications and manufacturing practices. **Transfusion**, v. 54, p.1418-1437, 2014.

SHERR, C. J.; McCORMICK, F. The RB and p53 pathways in câncer. **Cancer Cell**, Cambridge, v. 2, n. 2, p. 103-112, 2002.

SHI, Q.; KING, R. W. Chromosome nondisjunction yields tetraploid rather than aneuploid cells in human cell lines. **Nature**, v. 437, n. 7061, p. 1038-1042, 2005.

SPITS, C. et al. Recurrent chromosomal abnormalities in human embryonic stem cells. **Nature biotechnology**, v. 26, n. 12, p. 1361-3, 2008.

STEPANENKO, A. et al. Step-wise and punctuated genome evolution drive phenotype changes of tumor cells. **Mutation Research**, v. 771, p. 56-69, 2015.

STRATTON, M. R. Exploring the genomes of cancer cells: progress and promise. **Science**, Cambridge, v. 331, n. 6024, p. 1553-1558, 2011.

TARTE, K. et al. Clinical-grade production of human mesenchymal stromal cells: occurrence of aneuploidy without transformation. **Blood**, v. 115, n. 8, 2010.

THERMAN, E.; SUSMAN, M. **Cromosomas Humanos**. 3.ed. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1996.

TOLAR, J. *et al.* Sarcoma derived from cultured mesenchymal stem cells. **Stem Cells**, v. 25, p. 371-379, 2007.

TOMASSETTI, P. *et al.* Chromosomal instability in multiple endocrine neoplasia type 1. Cytogenetic evaluation with DEB test. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, v. 79, n. 2, p. 123-126, 1995.

TORRE, M. L. *et al.* Ex vivo expanded mesenchymal stromal cell minimal quality requirements for clinical application. **Stem Cells and Development**, v. 24, n. 6, p. 677-685, 2015.

TZANETAKOU, I. P. *et al.* Is obesity linked to aging?: adipose tissue and the role of telomeres. **Ageing Research Reviews**, v. 11, n. 2, apr. 2012. doi: 10.1016/j.arr.2011.12.003. Acesso em: 13 dez. 2011.

VAZ, I. M.; BORGONOVO, T.; BROFMAN, P. R. S. Padronização da técnica de citogenética convencional por bandeamento G para células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea. **Caderno de resumos do XIX Seminário de Iniciação Científica da PUCPR**, Curitiba, 2011. Disponível em: <<http://www2.pucpr.br/reol/index.php/SEMIC19?dd1=5558&dd99=view>>. Acesso em: 07 dez. 2015.

VERMAS, R.S.; BABU A. **Human Chromosomes - Principles and Techniques**. 2.ed. New York: McGraw-Hill, 1995.

VOLPI, E. V.; BRIDGER, J. M. FISH glossary: an overview of the fluorescence in situ hybridization technique. **Biotechniques**, New York, v. 45, n. 4, 2008. doi: 10.2144/000112811. Acesso em: 01 dez. 2015.

WANG X.; D'ANDREA A. D. The interplay of Fanconi anemia proteins in the DNA damage response. **DNA Repair**, Amsterdam, v. 3, n. 8-9, p. 1063-1069, 2004.

WANG, Y. *et al.* Outgrowth of a transformed cell population derived from normal human BM mesenchymal stem cell culture. **Cytotherapy**, Bethesda, v. 7, n. 6, p. 509-519, 2005.

WANG, Y. *et al.* Safety of mesenchymal stem cells for clinical application. **Stem cells international**, v. 2012, p. 6520-34, 2012.

WEISSBEIN, U.; BENVENISTY, N.; BEN-DAVID, U. Genome maintenance in pluripotent stem cells. **The Journal of Cell Biology**, New York, v. 204, n. 2, p. 153-163, 2014.



WIKTOR, A. E. et al. Preclinical validation of fluorescence *in situ* hybridization assays for clinical practice. **Genetics in Medicine**, Rochester, v. 8, n. 1, p. 16-23, 2006.

WOLFF, D. J. et al. Guidance for fluorescence *in situ* hybridization testing in hematologic disorders. **Journal of Molecular Diagnostics**, Amsterdam, v.9, n.2, p. 134-143, 2007.

ZHANG, Z. X. et al. Cytogenetic analysis of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells passaged in vitro. **Cell Biology International**, Amsterdam, v. 31, n. 6, p. 645-648, 2007.

8 ANEXOS

ANEXO 1

 Comitê de Ética em Pesquisa da PUCPR	ASSOCIAÇÃO PARANAENSE DE CULTURA - PUCPR	
---	---	---

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: INSTABILIDADE GENÉTICA EM CELULAS TRONCO CULTIVADAS

Pesquisador: TAMARA BORGONOVO

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 15202113.0.0000.0020

Instituição Proponente: Pontifícia Universidade Católica do Parana - PUCPR

Patrocinador Principal: BANCO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO ECONOMICO E SOCIAL

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 306.197

Data da Relatoria: 12/06/2013

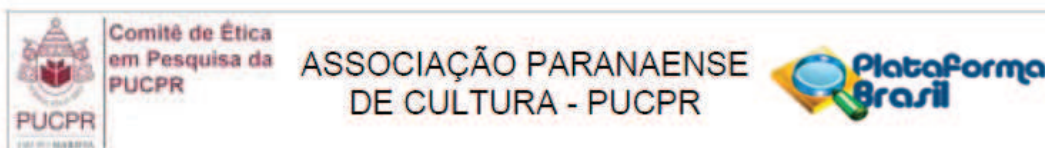
Apresentação do Projeto:

realização de testes citogenéticos em 60 amostras de células-tronco mesenquimais humanas, com a finalidade de avaliar a manutenção da estabilidade genética pós cultivo, possibilitando o uso deste resultado como critério de liberação para uso em transplantes humanos, dentro dos parâmetros de controle de qualidade estabelecidos pela ANVISA, RDC09/2011, que dispõe sobre o funcionamento de Centros de Tecnologia Celular (CTCs). Três metodologias serão comparadas: Cariotipagem com bandeamento GTG, teste de Hibridização in situ por Fluorescência (FISH) e teste para instabilidade cromossômica com exposição ao Diepoxibutano (DEB).

Objetivo da Pesquisa:

- Estudar a instabilidade genética em CT cultivadas Objetivo Secundário:
- Avaliar a manutenção da estabilidade genética em CT cultivadas, comparando, por meio do teste de CARIOTIPAGEM, células antes e após cultivo (CTMs derivadas de medula óssea em P2)- Avaliar a manutenção da estabilidade genética em CT cultivadas, comparando, por meio do teste de FISH, células antes e após cultivo (CTMs derivadas de medula óssea em P2)- Avaliar a manutenção da estabilidade genética em CT cultivadas, comparando, por meio do teste de DEB, CTMs derivadas de medula óssea em P2, na presença e na ausência do agente alquilante.- Verificar a diferença entre os métodos: CARIOTIPAGEM, FISH e teste DEB, quanto à sensibilidade para detecção de anormalidades, usando as mesmas amostras de medula óssea e CT mesenquimais derivadas de

Endereço: Rua Imaculada Conceição 1155		CEP: 80.215-901
Bairro: Prado Velho		
UF: PR	Município: CURITIBA	
Telefone: (41)3271-2292	Fax: (41)3271-2292	E-mail: nep@pucpr.br



Continuação do Parecer: 306.197

medula óssea- Verificar a diferença entre as diversas origens de CT mesenquimais: medula óssea e tecido adiposo, usando o mesmo método: CARIOTIPAGEM- Avaliar a manutenção da estabilidade durante o cultivo a longo prazo, verificando o resultado da CARIOTIPAGEM ao longo das passagens, de P0 a P20 , em CTMs derivadas de medula óssea- Avaliar a manutenção da estabilidade durante o cultivo a longo prazo, verificando o resultado do teste FISH ao longo das passagens, de P0 a P20, em CTMs derivadas de medula óssea.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

O participante não tem benefício direto na pesquisa.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa é relevante e tem boas condições de execução, porém é necessário algumas informações complementares que não estão descritas no projeto.

A metodologia da pesquisa aborda somente os procedimentos técnicos, não explicando como será a seleção dos sujeitos, a forma de abordagem, os procedimentos de coleta e os possíveis acompanhamentos da pesquisa para os participantes.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O termos estão claros e presentes.

Recomendações:

sem recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O projeto de pesquisa atende a resolução 196/96 em suas questões éticas.

Situação do Parecer:

Aprovado

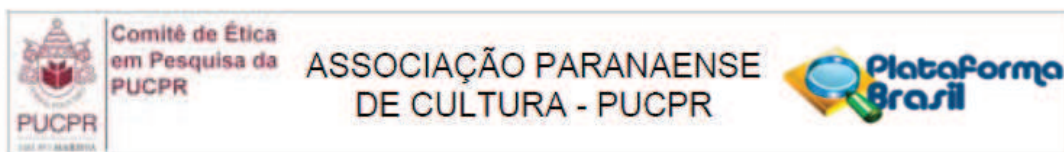
Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Lembramos aos senhores pesquisadores que, no cumprimento da Resolução

Endereço: Rua Imaculada Conceição 1155
 Bairro: Prado Velho CEP: 80.215-901
 UF: PR Município: CURITIBA
 Telefone: (41)3271-2292 Fax: (41)3271-2292 E-mail: nep@pucpr.br



Continuação do Parecer: 308.197

196/96, o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) deverá receber relatórios anuais sobre o andamento do estudo, bem como a qualquer tempo e a critério do pesquisador nos casos de relevância, além do envio dos relatos de eventos adversos, para conhecimento deste Comitê. Salientamos ainda, a necessidade de relatório completo ao final do estudo.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEPPUCPR de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificado e as suas justificativas.

Se a pesquisa, ou parte dela for realizada em outras instituições, cabe ao pesquisador não iniciá-la antes de receber a autorização formal para a sua realização. O documento que autoriza o início da pesquisa deve ser carimbado e assinado pelo responsável da instituição e deve ser mantido em poder do pesquisador responsável, podendo ser requerido por este CEP em qualquer tempo.

CURITIBA, 17 de Junho de 2013

Assinador por:
NAIM AKEL FILHO
(Coordenador)

ANEXO 2

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Página 1 de 3

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu estou sendo convidado(a) para participar, como voluntário, em uma pesquisa científica. Após ser esclarecido(a) sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte do estudo, assino ao final deste documento, que está em três vias. Uma delas é minha, a outra do pesquisador responsável e a terceira ficará arquivada na instituição (PUCPR/ISCMC). Em caso de recusa eu não serei penalizado(a) de forma alguma.

Eu, _____,
 RG _____, nacionalidade _____, idade _____,
 estado civil _____, profissão _____,
 endereço _____

entendo que estou sendo convidado a participar do projeto chamado: "INSTABILIDADE GENÉTICA EM CÉLULAS -TRONCO CULTIVADAS", que terá uma duração de 4 anos. Eu entendo que a minha participação neste projeto é voluntária e não me dá direito a qualquer tipo de remuneração.

1. Eu entendo que este projeto está sendo desenvolvido por médicos e pesquisadores empenhados na pesquisa e tratamento com células tronco, e que os resultados serão publicados sem a devida identificação dos participantes.
2. Eu entendo que uma amostra das células-tronco que já foram coletadas quando participei do projeto

deve ser usada para fazer todos os testes de controle de qualidade cabíveis, cumprindo rigorosamente a legislação existente para assegurar a qualidade das células a serem infundidas, incluindo testes genéticos que avaliam a manutenção da estabilidade destas células.

3. Eu entendo que ao autorizar o uso de uma amostra desta células para fazer os testes cabíveis, eu não precisarei fazer nova coleta de células.
4. Eu entendo que a recusa de minha participação nesta pesquisa em qualquer momento durante o estudo ocorrerá sem penalidades e que receberei o tratamento médico correto e adequado.

RUBRICA DO SUJEITO DE PESQUISA

RUBRICA DO PESQUISADOR

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Página 2 de 3

5. É assegurada a assistência durante toda pesquisa, bem como me é garantido o livre acesso a todas as informações e esclarecimentos adicionais sobre o estudo e suas consequências, enfim, tudo o que eu queira saber antes, durante e depois da minha participação.
6. Tenho conhecimento de que poderei a qualquer momento, antes, durante e depois, abandonar a pesquisa sem que com isso acarrete algum problema a minha pessoa, quanto a danos físicos, morais, sociais, éticos, de origem religiosa e financeiros.
7. Terei os meus direitos preservados e a garantia do sigilo, quanto ao meu nome, endereço e atividade profissional, sendo-me assegurada a privacidade quanto a todos os dados envolvidos na pesquisa.
8. O pesquisador responsável do referido projeto é: Tamara Borgonovo – PUCPR (pesquisador responsável CRBio nº09638- 041 32711858, 041 96436163); e com ele poderei manter contato pelos telefones acima relacionados.
9. Sendo assim, não havendo quaisquer dúvidas, dou-me por esclarecido quanto aos objetivos, importância e resultados desta pesquisa, dos meus direitos, riscos, danos e benefícios, em participar desta pesquisa. Portanto, concordo de livre e espontânea vontade com a minha participação na realização desta pesquisa.
10. Enfim, tendo sido orientado quanto ao teor de todo o aqui mencionado e compreendido a natureza e o objetivo do já referido estudo, manifesto meu livre consentimento em participar, estando totalmente ciente de que não há nenhum valor econômico, a receber ou a pagar, por minha participação.
11. Reafirmo, portanto, que li o texto acima e compreendi a natureza e o objetivo do estudo do qual fui convidado a participar e concordo voluntariamente em participar.

"Em caso de reclamação ou qualquer tipo de denúncia sobre este estudo devo ligar para o CEP PUCPR (41) 3271-2292 ou mandar um email para nep@pucpr.br".

ASSINATURA DO SUJEITO DE PESQUISA

ASSINATURA DO PESQUISADOR

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Página 3 de 3

Curitiba, ____ de ____ de 20__.

Nome do sujeito da pesquisa = _____

Assinatura do sujeito da pesquisa = _____

Nome do pesquisador responsável = _____

Assinatura do pesquisador responsável = _____

assinatura do sujeito da pesquisa	assinatura do pesquisador
-----------------------------------	---------------------------

ANEXO 3


TERMO DE COMPROMISSO DE UTILIZAÇÃO DE DADOS

Eu TAMARA BORGONOV, abaixo assinada, pesquisadora envolvida no projeto de título: INSTABILIDADE GENÉTICA EM CÉLULAS-TRONCO CULTIVADAS, me comprometo a manter a confidencialidade sobre os dados coletados nos arquivos do setor administrativo e do laboratório de Citogenética do Núcleo de Tecnologia Celular da PUCPR, bem como a privacidade de seus conteúdos, como preconizam os Documentos Internacionais e a Res. 196/96 do Ministério da Saúde.

Informo que os dados a serem coletados dizem respeito aos testes genéticos que foram realizados como parte do controle de qualidade, para a Qualificação da Amostra, realizados após o cultivo celular, em amostras de pacientes que participaram de projetos de Terapia Celular no período de janeiro de 2010 a maio de 2013.

Curitiba, 03 de junho de 2013

Pesquisadores autorizados para terem acesso aos documentos acima mencionados:

Nome	R.G.	Assinatura
Tamara Borgonovo	2091252-9	

Será vedado o acesso aos documentos a pessoas cujo nome e assinatura não constarem neste documento.

ANEXO 4

Ficha de Validação – sonda TP53

FICHA DE VALIDAÇÃO TP53

DESCRIÇÃO DA SONDA	Vermelho (Red)	Verde (Green)
<i>Cytocell</i> LPH017 TP53 deletion	Localização:17p13.1	Localização:17c(D17Z1)

SINAIS	CUT OFF	Score 1	Score 2	%
2G 2R	-	81,8	86,3	84,1
2G 1R	6,3	1,7	2,7	2,2
1G 2R	13,4	8,3	5,8	7,1
2G 3R	6,8	2,3	1,5	1,9
1G 3R	2,3	0,2	0	0,1
1G 1R	6,8	1,8	1,3	1,6
4G 4R	3,1	0,2	0,3	0,3
4G 2R	2,3	0,2	0	0,1
2G 4R	3,1	0,2	0,2	0,2
2G 5R	3,1	0	0,3	0,2
3G 2R	4,4	0,5	0,3	0,4
0G 2R	7,4	1,5	1,2	1,3
0G 1R	3,8	0,5	0,2	0,3
0G 0R	2,3	0,2	0	0,1

	Normais (2G2R)	Outras (1G2R;0G2R)
Metáfases	98,22%	1,78% 1G2R(0,89%) 0G2R(0,89%)

Qualidade da hibridização: (x) Boa () Adequada () Ruim

Observações: Esta ficha de validação foi elaborada com base em uma ficha de análise, aonde foram analisadas 6 amostras de sangue periférico, sendo que em cada amostra foram observados 200 núcleos interfásicos, 100 por cada observadora. Foram observadas 112 metáfases.

Examinadora 1: _____

Examinadora 2: _____

ANEXO 5

Ficha de Validação – sonda *RB1*FICHA DE VALIDAÇÃO *RB1*

DESCRIÇÃO DA Sonda	Vermelho (Red)	Verde (Green)
<i>Cytocell LPH013 RB1 deletion</i>	Localização:13q14.2	Localização:13qter,13q34

SINAIS	CUT OFF	Score 1	Score 2	%
2G 2R	-	93,5	90	91,8
2G 1R	5,7	1,5	4	2,75
1G 2R	5,7	1,5	2,5	2
2G 3R	6,8	3	2	2,5
1G 1R	2,3	1	0	0,5
4G 4R	2,3	0,5	0	0,25
2G 5R	2,3	0	0,5	0,25
2G 0R	2,3	0	0,5	0,25

	Normais (2G2R)	Outras
Metáfases	100%	0%

Qualidade da hibridização: (x) Boa () Adequada () Ruim


Observações: Esta ficha de validação foi elaborada com base em uma ficha de análise, aonde foram analisadas 2 amostras de sangue periférico, sendo que em cada amostra foram observados 200 núcleos interfásicos, 100 por cada observadora. Foram observadas 31 metáfases.

Examinadora 1: _____

Examinadora 2: _____

ANEXO 6

Ficha de Análise- FISH

 PUCPR	FICHA DE ANALISE CITOGENÉTICA - FISH	CTC.LCM.FOR.005
PACIENTE: _____		
CODIGO: _____		DATA: _____
AMOSTRA: _____		
SONDA: _____		RESULTADO ESPERADO: (para células normais)

Data	Nº Sistema	Célula	Green	Red	Yellow
		1			
		2			
		3			
		4			
		5			
		6			
		7			
		8			
		9			
		10			
		11			
		12			
		13			
		14			
		15			
		16			
		17			
		18			
		19			
		20			
		21			
		22			
		23			
		24			
		25			
		26			
		27			
		28			
		29			
		30			
		31			
		32			
		33			
		34			
		35			
		36			
		37			
		38			
		39			
		40			
		41			
		42			
		43			
		44			
		45			
		46			
		47			
		48			
		49			
		50			

Data	Nº Sistema	Célula	Green	Red	Yellow
		51			
		52			
		53			
		54			
		55			
		56			
		57			
		58			
		59			
		60			
		61			
		62			
		63			
		64			
		65			
		66			
		67			
		68			
		69			
		70			
		71			
		72			
		73			
		74			
		75			
		76			
		77			
		78			
		79			
		80			
		81			
		82			
		83			
		84			
		85			
		86			
		87			
		88			
		89			
		90			
		91			
		92			
		93			
		94			
		95			
		96			
		97			
		98			
		99			
		100			

METAFASES NORMAIS:	
RESULTADO: _____	ANALISTA: _____
CONCLUSÃO: _____	

ANEXO 7

Resumos apresentados em congressos nacionais e internacionais

64ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência – SBPC, São Luis do Maranhão, 2012.

Padronização da técnica de citogenética convencional por bandeamento G para células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea.

Isadora May Vaz ¹, Tamara Borgonovo ¹, Paulo Roberto Slud Brofman ¹
Núcleo de Tecnologia Celular - PUCPR

INTRODUÇÃO: A análise citogenética é crucial para avaliação do potencial uso terapêutico de células tronco devido à possibilidade de transformação tumorigênica destas células quando cultivadas. Citogenética convencional com bandeamento G é considerada padrão-ouro para avaliação de uma linhagem celular e tem como objetivo tornar visível as bandas de cada cromossomo, permitindo assim identificá-los e avaliar possíveis aberrações. **METODOLOGIA:** Para este estudo foram utilizadas células tronco mesenquimais (CTMs) cultivadas a partir da medula óssea, de oito pacientes. Após o isolamento e cultivo das células o crescimento das CTMs foi interrompido com inibidor mitótico (colchicina ou colcemid). As células foram ressuspensas em 6ml de KCl aquecido a 37°C por 15 minutos. Depois de outra centrifugação e retirada de sobrenadante, foram adicionados q.s.p. 5ml de fixador 3:1 (metanol/ácido acético), gelado, mantido por 2 a 16 horas em geladeira. Mais duas lavagens foram feitas com fixador 2:1. As lâminas foram preparadas em ambiente úmido (banho-maria a 65°C) e submetidas às quatro etapas que compõem o bandeamento. A primeira é a imersão em solução de tripsina, a segunda, lavagem em solução fisiológica (NaCl) com soro bovino fetal, seguidas por lavagem em água destilada e por fim imersão em corante. Vários testes foram realizados comparando diferentes concentrações de soluções e tempos, para se alcançar um protocolo ideal. **RESULTADOS:** Em todos os casos foram obtidas metáfases adequadas para análise. O índice mitótico e o padrão de bandeamento foram satisfatórios. Observou-se que para obter cromossomos com boa qualidade as amostras deveriam ser colhidas quando estavam com aproximadamente 80% de confluência, terem seu crescimento interrompido com a adição de colcemid (0,1 µg/mL) por 3 a 6 horas, depois ser mantidas com solução hipotônica tamponada por 20 minutos a 37°C em seguida fixadas com fixador metanol/ác. acético 2:1 e 3:1. Para o bandeamento a solução de tripsina (0,015g/mL de NaCl) deve ser aquecida para então mergulhar as lâminas, que depois devem ser lavadas em solução com soro bovino fetal e posteriormente lavadas em água. Para uma boa coloração com Giemsa, foram necessários pelo menos 7 minutos. **CONCLUSÃO:** Um protocolo para Citogenética Convencional por bandeamento G pôde ser padronizado para CTMs de medula óssea, estabelecendo as condições ideais para obter cromossomos de boa qualidade, permitindo assim uma análise confiável.

7th Brazilian Congress on Stem Cells and Cell Therapy, São Paulo, 2012

STANDARDIZATION OF FISH (FLUORESCENCE IN SITU HIBRIDIZATION) TECHNIQUE TO MESENCHYMAL STEM CELLS BONE MARROW-DERIVED

Vaz, I.M.; Borgonovo, T.; Senegaglia, A.C.; Rebelatto, C.L.K.; Brofman, PRS.

Introduction: The FISH technique permit the observation of a specific chromosome or a gene according to the probe which was used, and it's recommended as a complementary

exam to the conventional cytogenetic, since it allows explain a lot of structural changes as translocations and small deletions. **Objectives:** Standardize the FISH (fluorescence in situ hybridization) technique to mesenchymal stem cells bone marrow-derived. **Method:** 25 experiments were done using 5 a 10µl of a commercial probe. The technique was done in two days. First day: the slide was done with Carnoy fixative solution and immerse in 2xSSC solution (37°C) for 2 minutes, then it's immerse in a sequence of ethanol solution 70%, 85% and 100% for 2 minutes. After the probe preparation, it was apply in a particular place in the slide and a coverslip was put and sealed, then the sample and probe were co-denatured at 75°C, then, were hybridized in a humid, lightproof container at 37°C. Second day: the coverslip was removed and the slide was immersed in a warm 0,4xSSC solution. Then, immerse in a transport solution for 30 seconds. After that, the slide was drained and 5µl of DAPI antifade solution was applied. That place was covered with a coverslip, the bubbles were removed and stayed in the dark for 10 minutes. The slides were analyzed in a fluorescence microscope with filters cubes to blue, red and green colors. **Results:** The results were successfully obtained. The number of signals displayed corresponds to the expected for normal cells. The results allowed concluding what is the ideal condition to obtain good slides to analyze. **Conclusion:** A protocol was created for genetic evaluation by the FISH (fluorescent in situ hybridization) technique to mesenchymal stem cells bone marrow-derived allowing a reliable analysis to be implemented in the Núcleo de Tecnologia Celular-PUCPR. Moreover, this protocol proved to be efficient for stem cells from other sources as induced pluripotent stem cells and mesenchymal stem cells from umbilical cord blood and adipose tissue.

9th European Cytogenetics Conference - Convention Centre Dublin, from 29 June to 2 July 2013.

G-banding for genetic instability study in adult stem cells

Tamara Borgonovo ¹, Isadora May Vaz ¹, Alexandra Cristina Senegaglia¹, Carmen Lúcia Kuniyoshi Rebelatto¹ and Paulo Slud Brofman¹

Centro de Tecnologia Celular da Pontifícia Universidade Católica do Paraná –
PUCPR – Curitiba – Brazil

tamaraborgonovo@yahoo.com.br

Stem Cell (SC) cultivation can lead to the accumulation of genetic and epigenetic alterations, characterizing an instability that can explain, at least partly, its *in vivo* tumorigenic potential. For this reason, in order to use SC in a therapeutic context, they must require guarantee of their quality and safety, with the implementation of exhaustive quality control programs, including chromosomal instability analysis. Unlike the embryonic stem cells, the adult stem cells, like as mesenchymal stem cells (MSCs), have been maintaining genomic stability in culture.

In Brazil, the Ministry of Health created in 2008 eight Cell Technology Centers (CTC) where the main goal is the SC isolation and cultivation. One of the requirements of the National Agency of Sanitary Vigilance (ANVISA) is the realization of a genetic testing as a release criterion for use of these cells in humans.

The aim of this work is to show how the chromosomal instability is evaluated in our CTC. We analyzed MSCs bone marrow-derived from 21 patients (median age = 53,4 years). To the G-banding karyotype, 710 metaphases were analyzed from 57 samples, before (bone marrow) and after (MSCs) cultivation, until the fourth passage. We used LUCIA image analysis systems for cytogenetic and the results were described following the guidelines to International System for Human Cytogenetic Nomenclature (2013).

Metaphases were successfully obtained in all the cases. We observed non-clonal aneuploidy and instability chromosomal signs: cromatidic gaps, chromosome breaks and

tetraploidy, which could indicate an intermediate step for tumorigenesis. No clonal chromosomal rearrangements were detected. All the samples were approved to autologous therapeutic use.

Our results confirm the importance of G-banding cytogenetic study, once this technique is able to detect both numeric and structural alteration, including balanced rearrangements and mosaicism, other than evidencing instability chromosomal signs.

3º RBC - Reunião Brasileira de Citogenética e IV SLACE - Simpósio Latino Americano de Citogenética e Evolução, 26 a 29 de maio de 2013, Centro de Convenções Casa Grande Hotel Resort, Guarujá-SP.

Cytogenetic analysis of human mesenchymal stem cells (hMSCs) derived from bone marrow and adipose tissue.

Pedroso GA¹, Solarewicz MM¹, Vaz IM¹, Borgonovo T¹, Rebelatto CLK¹, Senegaglia AC¹, Brofman PRS¹.

¹*Centro de Terapia Celular – Pontifícia Universidade Católica do Paraná – Curitiba-PR.*

INTRODUCTION: The use of human mesenchymal stem cells (hMSCs) has proven to be a promising in cell therapy for recovery of damaged tissues, including the treatment of heart diseases due to its effectiveness in restoring myocardial tissue. This particular cell type, isolated from bone marrow or adipose tissue, has a high capacity for self-regeneration, and the release of factors which contribute to the formation of a favorable environment for the recovery of endogenous cardiac tissue. However, it has been reported that *in vitro* hMSCs can acquire genetic changes and therefore would be more likely to undergo neoplastic transformation. In the specific case of hMSCs derived from adipose tissue, this propensity could be intensified due to the increased oxidative stress observed in this tissue. Thus, the application of cytogenetic techniques is needed to evaluate and ensure the integrity of the genetic material in hMSCs to be used in cell therapy. **OBJECTIVES:** Using the cytogenetic analysis, this study aimed to assess possible chromosomal abnormalities, numerical and/or structural, in hMSCs derived from adipose tissue and bone marrow, cultivate in the laboratory and used in cellular therapy programs. **MATERIALS AND METHODS:** hMSCs samples were separated into two groups derived from adipose tissue and bone marrow, which were isolated and expanded *in vitro*. In total twenty-one samples were investigated, three adipose tissue stem cells and eighteen bone marrow stem cells. The karyotype analysis was performed by GTG banding in initials passages (P2, P3), at which stage the cell transplantation is performed. The karyotype analysis was performed following orientations of International System Cytogenetics Nomenclature (ISCN) 2013. **RESULTS AND DISCUSSION:** We detected a normal karyotype in all twenty-one samples of hMSCs obtained from bone marrow and adipose tissue. However, in the 415 metaphases analyzed, occasional structural and numerical abnormalities were found in seven samples, all these derived from bone marrow. However, in none of the analyzes was observed the presence of clonal chromosomal abnormalities, and there is therefore no statistically significant difference between the two strains of hMSCs. **CONCLUSION:** These results indicate that both hMSCs lineages are able to maintain their chromosomal stability preserved *in vitro* until third passage.

3º RBC - Reunião Brasileira de Citogenética e IV SLACE - Simpósio Latino Americano de Citogenética e Evolução, 26 a 29 de maio de 2013, Centro de Convenções Casa Grande Hotel Resort, Guarujá-SP.

Evaluation of genetic stability of human mesenchymal stem cells through fluorescence *in situ* hybridization – FISH

Vieira SR¹, Vaz IM¹, Borgonovo T¹, Senegaglia AC¹, Rebelatto CLK¹, Brofman PRS¹

¹*Centro de Tecnologia Celular – Pontifícia Universidade Católica do Paraná – Rua Imaculada Conceição, 1155, 80.215-901 Curitiba-PR, Brasil*

Introduction: The FISH technique is a complementary test to conventional cytogenetics, which enables to check and detect specific nucleic acid sequences in interphases and metaphase cells using a cytochemical procedure. Because it is a more sensitive technique than karyotyping, it can detect small changes even at low frequency, in various cell types, such as adult human mesenchymal stem cells (hMSC). **Objective:** To evaluate the maintenance of genetic stability of hMSC, until the second passage, searching genes MYC, TP53, MLL, IGH, CCND1, TEL, AML1 and chromosome 7. **Materials and method:** We performed 24 experiments with 8 bone marrow samples, 3 peripheral blood samples and 13 samples of hMSC. The technique is performed in two steps. In the first day (first step), the slides were prepared using fixed samples with Carnoy fixative solution, washed with 2XSSC and then dehydrated in ethanol series (70%, 85% and 100%). After preparation of the probe, it was applied at the position previously marked on the slide carefully covered with cover slip sealed with rubber solution. The slides were co-denatured at 75°C for 2 minutes and incubated overnight at 37°C, lightproof and humid, to allow the hybridization. In the second day (second step), the coverslip was removed and the slides were dipped in heated washing solution. Then 5 µl of DAPI Antifade solution was applied. The slides were covered with another coverslip, and they were stored overnight in the fridge, prior to reading the fluorescence microscope. **Results:** All samples showed the expected signals to normal cells. **Conclusion:** The results show the possibility of using this test to evaluate chromosomal stability in hMSC, however, future studies with larger samples are needed to confirm the maintenance of the stability of these cells to the second passage.

3º RBC - Reunião Brasileira de Citogenética e IV SLACE - Simpósio Latino Americano de Citogenética e Evolução, 26 a 29 de maio de 2013, Centro de Convenções Casa Grande Hotel Resort, Guarujá-SP.

Use of diepoxybutane test in mesenchymal stem cell to evaluate the genetic instability

Vaz IM¹; Borgonovo T¹; Rebelatto CLK¹; Senegaglia AC¹; Brofman PRS¹

¹*Centro de Tecnologia Celular – Pontifícia Universidade Católica do Paraná – Rua Imaculada Conceição, 1155, 80.215-901 Curitiba-PR, Brasil*

Introduction: The culture of mesenchymal stem cells (MSCs) must be followed by a periodic evaluation, because genetics instabilities can arise during the culture and it can explain, partly, the possibility of these cells become tumorigenic cells. One of the techniques used to evaluate this instability is the chromosomal instability test induced by alkylating

agents, as the Diepoxybutane. This test exposes the fragility chromosome by increasing of chromosomal or chromatid breaks in cultured cells in the presence of these agents. Objective: Evaluate if the MSCs could develop genetic instability during the culture. Materials and methods: For this study four samples of MSCs had been used. Approximately 2×10^5 cells were plated in T-25 flasks at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂, when culture reached a confluence of 80%, it was subcultured and were replated to new flasks (passage 1). In the second passage, the DEB solution was add to the culture, in the 0,01 and 0,001 dilutions in different flasks. After 48 hours in 37 °C, was add arresting solution and the culture was detached with 0.25% trypsin and the cells were transferred to a 15ml tube and centrifuged, and resuspended in warm hypotonic solution. After, the cells were washed twice with 3:1 fixative solution (methanol/glacial acetic acid) and with fixative solution (2:1). The slides were done in a humid and warm place and the cells were stained using a Giemsa solution and buffer solution (potassium and sodium). The metaphases analyzed were found and captured, noting the frequency of breaks, gaps, fragments and figures found in each cell. To calculate the rate of breakage and radial figures it was used the formula: total number of failures/ total number of cells analyzed. Results: 240 metaphases were analyzed, 3 of these showed the presence of gaps and 3 breaks, but none showed above the average of 1.06 breaks per cell, which would indicate a positive DEB test result. Conclusion: The results show the possibility to use this test to evaluate chromosomal instability in MSCs. Further tests are needed with a larger number of samplesto confirm the stability of these cells until the second passage.

30º Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica, 2013, Aguas de Lindoia. Braz Oral Res, 2013. v. 27. p. 301-333.

ESTABILIDADE CROMOSSÔMICA EM CÉLULAS-TRONCO ISOLADAS DE FOLÍCULO DENTAL
 MOURA, S. A. B. ; LEITE, L. M. B. ; SENEGAGLIA, A.C. ; REBELATTO, C.L.K. ; BORGONOV, T.;
 VAZ, I. M. ; LIMA, A. A. S. ; BROFMAN, P.R.S.
 sergioabm@gmail.com

O folículo dental (FD) é uma estrutura que reveste o dente em desenvolvimento e se diferencia em ligamento periodontal, além disso, ele pode ser precursor de outras células do periodonto, incluindo cementoblastos e osteoblastos. O trabalho objetivou avaliar a estabilidade cromossômica em células-tronco oriundas de folículo dental humano e cultivadas por 15 passagens. Foram isoladas, expandidas e caracterizadas células-tronco a partir de folículo dental que envolvia terceiro molar incluso com indicação de remoção cirúrgica. As células- tronco foram caracterizadas por meio de adesão ao plástico, imunofenotipagem e diferenciação. A estabilidade genética foi avaliada durante diversas passagens, até a passagem 15 (P15), por cariotipagem com bandeamento GTG (banda G com Tripsina e Giemsa). Os resultados foram normais em todas as amostras, com ausência de aberrações cromossômicas clonais, confirmando a manutenção da estabilidade durante o cultivo, embora várias células tenham apresentado alguns sinais de instabilidade: falhas e quebras cromossômicas. Esse estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (Parecer 96.328, 12/09/2012, CAAE 04166512.7.0000.0020). Na amostra estudada, o número de passagens (até P15) não comprometeu a estabilidade genética de células-tronco obtidas a partir de folículo dental humano.

I Latin American, VIII Brazilian and I Argentine Congresso on Stem Cell and Cell Therapy, 15 a 17 de outubro de 2014, Centro de Convenções do Bourbon Cataratas Hotel, Foz do Iguaçu, Paraná.

Genetic evaluation of mesenchymal stem cells by G-band Karyotyping in Cell a Technology Center

Maria M. Solarewicz; TamaraBorgonovo ;Gabriele A. Pedroso;Isadora M. Vaz; Alexandra C.Senegaglia;Carmen L. Rebelatto; and Paulo R. S.Brofman

Cell Technology Center of Pontifícia Universidade Católica do Paraná – CTC - PUCPR – Curitiba – Brazil

INTRODUCTION: Cultured stem cells (SC) have shown great potential for use in several areas of cell therapy, however it has been reported that they can acquire genetic changes and therefore would be more likely to undergo neoplastic transformation. For this reason, in order to use SC in a therapeutic context, they must require guarantee of their quality and safety, with the implementation of exhaustive quality control programs, including chromosomal instability analysis. Unlike the embryonic SC, the adult SC, like mesenchymal stem cells (MSCs), have been maintaining genomic stability in culture. In Brazil, the Ministry of Health created in 2008 eight Cell Technology Centers (CTC) where the main goal is the provide stem cells under conditions of GMP, to the National Network for Cellular Therapy. One of the requirements of the Brazilian National Health Surveillance Agency (ANVISA) is the implementation of genetic control as a release criterion for use of these cells in humans.

OBJECTIVE: The aim of this work is to show how the quality control by G-banding karyotyping is performed and evaluated in our CTC.

MATERIAL AND METHOD: We analyzed bone marrow-derived MSCs from 33 patients (mean age = 51,9 ±9,9 years). To the G-band karyotype, metaphases were analyzed before (bone marrow) and after (MSCs) cultivation, until the second passage (P2). We used LUCIA image analysis systems for cytogenetic and the results were described following the guidelines to International System for Human Cytogenetic Nomenclature (2013).

RESULTS: Metaphases were successfully obtained in 32 cases. Twenty two (68.75%) presented instability chromosomal signs: cromatidic gaps, chromosome breaks, cromatidic breaks and tetraploidy, which could indicate an intermediate step for tumorigenesis. A total of 1.414 metaphases analyzed, 57 (4.03%) presented some of these signs. No clonal chromosomal rearrangements were detected. All the samples were approved by the cytogenetic quality control to therapeutic use.

CONCLUSION: Our results confirm the importance of G-band cytogenetic study, since this technique is able to detect both numeric and structural alteration, including balanced rearrangements and mosaicism, other than evidencing instability chromosomal signs.

I Latin American, VIII Brazilian and I Argentine Congresso on Stem Cell and Cell Therapy, 15 a 17 de outubro de 2014, Centro de Convenções do Bourbon Cataratas Hotel, Foz do Iguaçu, Paraná.

EVALUATION OF GENETIC STABILITY OF HUMAN MESENCHYMAL STEM CELLS BY FLUORESCENCE *IN SITU* HYBRIDIZATION – FISH

Gabrielle A. Pedroso; Tamara Borgonovo; Isadora M. Vaz; Silvana R. Vieira; Maria M. Solarewicz; Alexandra C. Senegaglia; Carmen L.K. Rebelatto; Paulo R.S. Brofman*

*Cell Technology Center of Pontifícia Universidade Católica do Paraná – CTC – Curitiba/Brazil

Introduction: The use of human mesenchymal stem cells (MSC) has been shown to be a promising strategy for cell therapy in recovery of injured tissues. However, it has been described in the literature that MSCs cultured *in vitro* can acquire genetic changes and therefore would be more likely to undergo neoplastic transformation. Thus, the application of cytogenetic techniques is needed to evaluate and ensure the integrity of the genetic material of MSCs used in cell therapy. The FISH technique is able to detect low frequency genetic changes, allowing the identification of specific sequences in the DNA molecule. A recurring change in tumoral cells is the loss of one allele of TP53 and RB genes. These genes are in the center of two major tumor suppressor pathways that control cellular responses to potentially oncogenic stimuli. Therefore, alterations associated with these genes are closely related to the development of the cancerous process.

Objective: To evaluate the maintenance of genetic stability MSCs kept in culture, through the investigation of the presence of TP53 and RB genes.

Materials and methods: In total 14 experiments were performed, with 8 MSCs samples evaluated for the presence of TP53 and 6 evaluated regarding the presence of the RB gene. The FISH technique was performed in two steps. In the first stage was added RB and TP53 probes (Cytocell-Aquarius, LPS011 and LPH017) in slide preparation, which were co-denatured at 75 °C for 2 minutes. In the second step, after incubation at 37 °C and washing the slides, the DAPI antifade solution was added.

Results: All samples showed the expected signals for normal cells, it was possible to identify the presence of both alleles, maternal and paternal, of both genes, TP53 and RB. The frequency of the signals expected (2 reds and 2 greens) was 91,53% and 87,42%, for the TP53 and RB genes, respectively. Some of the cells showed signs corresponding to monosomies and tetraploids, confirming what had been detected on conventional cytogenetic. The importance of detecting these cells lies in the fact that they may represent the loss of genetic stability, expected for long-term cultured cells.

Conclusion: The test detected the presence of TP53 and RB genes in all samples. All samples showed the expected for normal cells. These results demonstrate the possibility of using this test to assess the genetic stability in MSC, complementing conventional cytogenetics.

I Latin American, VIII Brazilian and I Argentine Congresso on Stem Cell and Cell Therapy, 15 a 17 de outubro de 2014, Centro de Convenções do Bourbon Cataratas Hotel, Foz do Iguaçu, Paraná.

GENETIC INSTABILITY TEST IN MESENCHYMAL STEM CELLS

Isadora M. Vaz; Tamara Borgonovo, Alexandra C. Senegaglia, Carmem L. K. Rebelatto, Paulo R. S. Brofman

Introduction: The mesenchymal stem cells (MSC) cultivation must be followed by a periodic cytogenetic evaluation, because instabilities can arise during cultivation and can explain, at least partially, the possibility that these cells become tumorigenic. One of the techniques to evaluate the genetic instability is the test of chromosomal instability

induced by alkylating agents, for example, diepoxybutane (DEB, 1,3-Butadiene Diepoxide). This test exposes the chromosome fragility inducing chromatid or chromosome breaks in cells cultured in the presence of these agents.

Objectives: To evaluate the genetic instability of MSCs using the DEB test

Methods: For this study we used 7 samples of human bone marrow-derived MSCs. Approximately 2×10^5 mononuclear cells were plated in T-25 flasks at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂. When culture reached a confluence of 80% it was subcultured and were replaced to new flasks (passage 1). In the second passage, the DEB solution was added to the culture, in the 0,01 and 0,001 µl/mL dilutions in different flasks. After 48 hours in 37°C, was added arresting solution, the culture was detached with 0.25% trypsin/EDTA, the cells were transferred to a 15ml tube, centrifuged and resuspended in warm hypotonic solution. After that cells were fixed with 3:1 fixative solution (methanol/glacial acetic acid) and washed twice with 2:1 fixative solution. The slides were prepared in a humid and warm place and the cells were stained using a Giemsa solution. The metaphases analyzed were found and captured, noting the frequency of breaks, gaps, acentric fragments and figures in each cell. To calculate the rate of breakage and radial figures it was used the formula: total number of failures/total number of cells analyzed. 330 metaphases of MSCs were evaluated, analyzing 20 metaphases whenever it possible of each sample (without and with DEB at different dilutions).

Results: Where observed only 7 breaks in the samples without DEB, while the samples exposes to the DEB showed 19 breaks, 8 fails and 1 ring chromosome, but any of them reached the index of 1.06 breaks per cell, which would indicate a positive DEB result.

Conclusions: There is possibility to evaluate chromosomal instability in CTMs using the DEB test. Even without reaching the index, the fact that they show breaks and gaps demonstrates the importance of this test as a complement to conventional cytogenetic examination.

I Latin American, VIII Brazilian and I Argentine Congresso on Stem Cell and Cell Therapy, 15 a 17 de outubro de 2014, Centro de Convenções do Bourbon Cataratas Hotel, Foz do Iguaçu, Paraná.

GENERATION AND CARDIAC DIFFERENTIATION OF FEEDER FREE INDUCED PLURIPOTENT STEM CELLS

Mesquita FCP¹, Kasai-Brunswick TH¹, Gubert F², dos Santos DS¹, Borgonovo T³, Carvalho AB¹, Carvalho ACC¹

¹Laboratório de Cardiologia Celular e Molecular, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, UFRJ, Rio de Janeiro – RJ.

²Laboratório de Neurobiologia Celular e Molecular Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, UFRJ, Rio de Janeiro – RJ.

³Laboratório de Citogenética do Núcleo de Tecnologia Celular da PUCPR, Curitiba – PR.

Objectives: The aim of this work was to generate induced pluripotent stem cells (iPS) from human dermal fibroblasts (HDF) using the STEMCCA system and to differentiate these cells into cardiomyocytes.

Methods: Lentiviral particles were generated by transfecting the HEK293FT cells with polycistronic plasmid STEMCCA (OCT4, SOX2, KLF4 and c-MYC), VSV-G, Tat, Rev and Gag/Pol. HDF in the 4th passage were transduced (MOI1) and the cells were transferred to plates treated with Matrigel™ and cultivated in mTeSR1. G-banded karyotyping was

performed and iPS were characterized by RT-PCR, flow cytometry, immunofluorescence and spontaneous differentiation. iPS were differentiated into cardiac lineage following 12 days of induction. In day 0-1 the cells were aggregated and cultivated with STEMPRO34, transferrin, ascorbic acid, monothioglycerol (basal medium) and BMP4. In days 1-4, mesoderm differentiation was induced with basal medium with the addition of BMP4/ActivinA in the following concentrations: 3/2, 10/6 and 30/10 ng/mL. The evolution of CD56 and PDGFR α expression was analyzed by flow cytometry. For the differentiation in cardiac mesoderm (days 3-8), cells were cultivated with basal medium with the addition of VEGF 10 ng/mL and XAV 939 (10 μ M). In days 8-12 the cells were cultivated with a basal medium. In day 15, cells were evaluated for the troponin T expression.

Results: Our results demonstrated that virus production was efficient, with 11.6% of the cells transduced being positive for OCT4 after 72 hours. iPS emerged during days 12-18 and were selected manually for expansion. iPS had a normal karyotype (46, XX) and expressed OCT4, SOX2, NANOG, REX1, KLF4, DNMT3B, TDGF, TERT, GDF3, LIN28 and NODAL by RT-PCR. By flow cytometry and immunofluorescence, we observed expression and characteristic staining of OCT4 (90.7%), SOX2 (84.7%), NANOG (97.7%), SSEA4 (78.5%), TRA1-60 (98.2%), TRA1-81 (79.2%). Cells also had a positive staining for c-MYC and LIN28. iPS showed spontaneous differentiation and expressed by RT-PCR Nestin, TUBB3 (ectoderm), MSX-1, Brachyury, BMP4 (mesoderm), Gata6 and Sox17 (endoderm) and had positive staining for Nestin and Brachyury. On day 2 of the cardiac differentiation, the cells did not express CD56 and PDGFR α in any conditions. On days 3 and 4, the 10/6 condition expressed CD56 (44.7% and 52.6%) and had a discrete expression of PDGFR α , inducing the cardiac mesoderm. On day 8 beating cells in all conditions were observed and on day 15 flow cytometry for Troponin T demonstrated that the best condition was 10/6 with induction of cardiac mesoderm on day 3: 3/2 (32.1%), 10/6 (41.7%), 30/10 (36.3%).

Conclusion: The viral production was efficient and the generated iPS had normal karyotype with pluripotent characteristics. These iPS cells were able to differentiate into cardiomyocytes.

VIII Curso De Inverno De Genética Da Universidade Federal Do Paraná, 13 A 17 De Julho De 2015, Curitiba, Paraná.

VALIDAÇÃO PRÉ CLÍNICA DA TÉCNICA DE HIBRIDIZAÇÃO *IN SITU* COM FLUORESCÊNCIA (FISH) – SONDAS TP53 E RB1

Camile L. Semmer¹; Tamara Borgonovo¹; Isadora M. Vaz¹; Maria M. Solarewicz¹;
Alexandra C. Senegaglia¹; Carmen L.K. Rebelatto¹; Paulo R.S. Brofman¹

¹Centro de Tecnologia Celular Pontifícia Universidade Católica do Paraná – CTC

Introdução: A técnica de FISH é de bastante interesse no campo de citogenética humana, especialmente para o diagnóstico de doenças neoplásicas. Nela são utilizadas sondas de DNA específicas e complementares a alguma sequência de interesse, porém, antes de iniciar um teste clínico, elas devem ser validadas para que assim a sensibilidade analítica, acurácia, especificidade e a faixa de corte sejam estabelecidas. **Objetivo:** Validar as sondas de DNA, TP53 e RB1, visando uma futura aplicação clínica deste teste. **Metodologia:** Foram realizados 16 experimentos em células humanas de sangue periférico e células-tronco mesenquimais, 10 avaliados quanto a presença do gene TP53 e 6 quanto ao gene RB1. Após a coleta, cultivo e colheita das amostras, foi realizada a preparação das lâminas, adição das sondas, desnaturação a 75°C, hibridização a 37°C,

aplicação de DAPI *antifade* e, no microscópio de fluorescência, 200 núcleos de cada amostra foram avaliados. Resultados: Todas as amostras apresentaram os sinais esperados para as sondas utilizadas. O valor de corte, calculado através da função Beta Inv (Microsoft Excel), foi 6,3% e 5,7% para os genes TP53 e RB1 respectivamente. Isto significa que é necessário um mínimo de 13 das 200 células para que uma amostra seja considerada anormal quando avaliada para a presença do gene TP53, e um mínimo de 12 das 200 células para o gene RB1. Conclusão: Esta importante etapa possibilita, a partir deste momento, a aplicação clínica deste teste em nosso laboratório, oferecendo um exame seguro e preciso para investigar anormalidades relacionadas a presença destes genes.

10th European Cytogenetics Conference - Strasbourg Convention & Exhibition Centre, Strasbourg, France, from 4 to 7 July 2015.

Clonal chromosomal alterations during the mesenchymal stem cell cultivation-case report

Tamara Borgonovo ¹, Maria Marlene Solarewicz¹, Isadora May Vaz ¹, Carmen Lúcia Kuniyoshi Rebelatto¹, Alexandra Cristina Senegaglia¹, Debora Daga¹, Enilze Ribeiro², Iglénir João Cavalli² and Paulo Slud Brofman¹

¹ Centro de Tecnologia Celular da Pontifícia Universidade Católica do Paraná CTC-PUCPR – Curitiba – Brazil

² Departamento de Genética da Universidade Federal do Paraná UFPR - Curitiba- Brazil
tamaraborgonovo@yahoo.com.br

The use of human mesenchymal stem cells (MSC) has been shown to be a promising strategy for cell therapy in injured tissues recovery. However, it has been described that MSCs can acquire genetic changes when cultivated *in vitro* and they would be more susceptible to undergo neoplastic transformation. Thus, the application of cytogenetic techniques is needed to evaluate the integrity of MSC genetic material used in cell therapy. As quality control of the cells, at the Center for Cell Technology (CTC-PUCPR), we performed regularly cytogenetic analyses (G-banding karyotyping). We report on a 67-year-old patient, male, selected to join the project: Autologous transplantation of mesenchymal cells for treatment of severe and refractory ischemic cardiomyopathy. To evaluate chromosomal alterations, one bone marrow and five MSC samples in different passages (P) were used. The bone marrow sample showed a normal karyotype: 46,XY[20], however, the MSC at P2 showed a hyperdiploid clone, with composite karyotype: 43~52,XY,+X,+4,+5,+10[cp4] and non-clonal trisomies: +2, +12, +20. Following pre-established criteria in CTC-PUCPR, this sample was not approved for infusion. After that, the cells showed normal karyotype at P4 and P5. A mononuclear cells sample of the same patient, which had been frozen for backup, was cultivated, and at P3 showed a clonal translocation t(9;18)(p24;q11)[8]. At P5 the karyotype was normal. At this moment, from all cytogenetic analysis performed in CTC-PUCPR (152 samples), this was the only case to show a clonal cytogenetic abnormality, and it was discarded. There is controversy about the use of cells with cytogenetic abnormality for therapy, because of their tumorigenic doubtful capacity. Despite this, we decided, like Muntion *et al* (2012), not to use these cells for regenerative medicine purposes.

ANEXO 8

NÚMERO DE METÁFASES ANALISADAS

Fase do cultivo	Fases iniciais						Fases intermediárias										Fases tardias												
	P0	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11	P12	P13	P14	P15	P16	P17	P18	P19	P20	P21	P22	P23	P24	P25	P26	P27	
Pacientes	P0	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11	P12	P13	P14	P15	P16	P17	P18	P19	P20	P21	P22	P23	P24	P25	P26	P27	TOTAL
4	8	5	0	4	0		2	0			0	1	2	0			2	1	0	0	0								30
5	5	0		15	5	0				0	5	0	0																30
6						2	2	3	8	10																			25
7						5	10	8	0	4		0	15	12	3														57
16			20		11	2	10	0	0																				43
25			25	20	6	0	0		2	0	0		2		6	11		0	0	0									72
35					14	20	2	12	11		12	3	20	20	2	10	2		3										141
40		20												12	0		20		9	20	0	4	0	0	0				85
41							20	0	3		20	5		2	0														55
42																		0		20			2		8	0	0		35
43																	6	0			0								6
44																	17			18		1		0					36
47						13			10		4		20		3	20													90

Espaços em branco significam passagens que não foram avaliadas

ANEXO 9

NÚMERO DE QUEBRAS CROMOSSÔMICAS E CROMATÍDICAS (chrb ou chtb)

Fase do cultivo	Fases iniciais				Fases intermediárias										Fases tardias														
	P0	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11	P12	P13	P14	P15	P16	P17	P18	P19	P20	P21	P22	P23	P24	P25	P26	P27	
Pacientes																													
4	0	0		0			0	0				0	0				0	0											
5	0			0							0																		
6							0	0	0	0																			
7							0	0	0	0			0	0	0														
16			0			0	0	0																					
25			0	0	0				0				0		0	0													
35					0	0	0	0	2/11		0	0	0	3/20	0	0	0		0										
40			1/20											0			1/20		1/9	0		0							
41							0		0	5/20		0		0															
42																				0			0		0				
43																	0												
44																				0									
47													2/20		1/3	1/20													

Espaços em branco significam passagens que não foram avaliadas e aquelas que não apresentaram metáfases (valor 0 no anexo 8)

ANEXO 10
NÚMERO DE FALHAS CROMOSSÔMICAS E CROMATÍDICAS (chrg ou chtg)

Fase do cultivo	Fases iniciais				Fases intermediárias								Fases tardias															
	P0	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11	P12	P13	P14	P15	P16	P17	P18	P19	P20	P21	P22	P23	P24	P25	P26	P27
pacientes																												
4	0	0	0	0			0	0				0	0				3/7	0										
5	0			0	0					0																		
6						0	0	0	0	0																		
7						0	0	0	0	0		0	0	0	0													
16		0			1/11	0	0																					
25		0	0	0	0				0			0	0		0	0												
35					1/14	0	0	0	0	1/12	0	0	0	0	0	0	0		0									
40		0												0			0		1/9	0		0						
41						0	0		0		0	0		0														
42																				0	0		0		0			
43																	0											
44																	2/18			0	0	0						
47				0		0			0		0		0		0	1/20												

Espaços em branco significam passagens que não foram avaliadas e aquelas que não apresentaram metáfases (valor 0 no anexo 8)

ANEXO 11

NÚMERO DE CÉLULAS TETRAPLOIDES

Fase do cultivo	Fases iniciais				Fases intermediárias							Fases tardias																
	P0	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11	P12	P13	P14	P15	P16	P17	P18	P19	P20	P21	P22	P23	P24	P25	P26	P27
pacientes																												
4	0	0	0	0			1/3	0				0	0				0	0										
5	0			1/16	0					1/6																		
6						0	0	0	2/10	1/11																		
7						0	1/11	0		0		0	2/14	0														
16		0			0	0	0																					
25		0	0	0	0				0			0			0	1/11												
35					1/14	0	0	1/13	0		0	1/4	0	1/20	0	0	0		1/4									
40			3/23											0			0	0	0	0								
41							0		0		0	1/6		0														
42																			0	0			0		0			
43																	2/8											
44																	0		0	0								
47				0		0			0		0		0		0	0												

Espaços em branco significam passagens que não foram avaliadas e aquelas que não apresentaram metáfases (valor 0 no anexo 8)

ANEXO 12

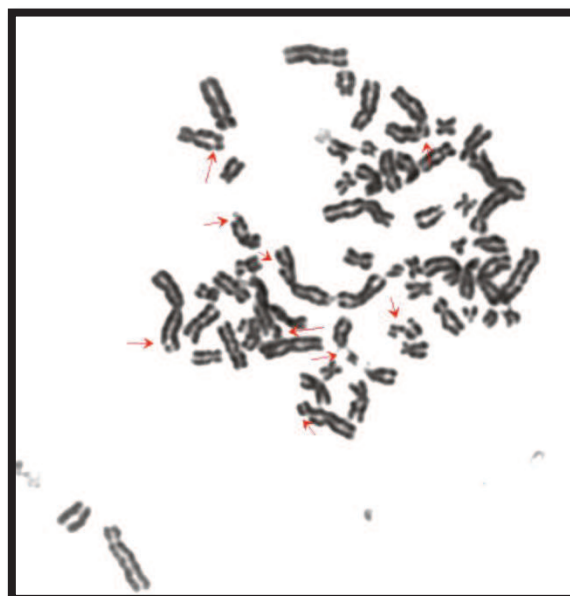
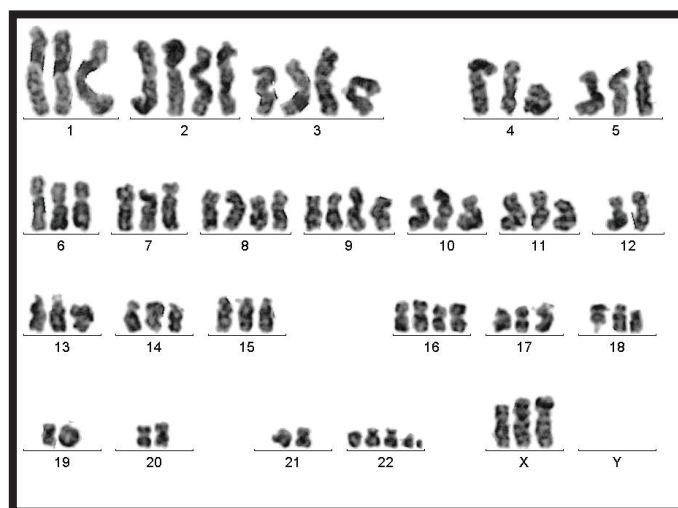
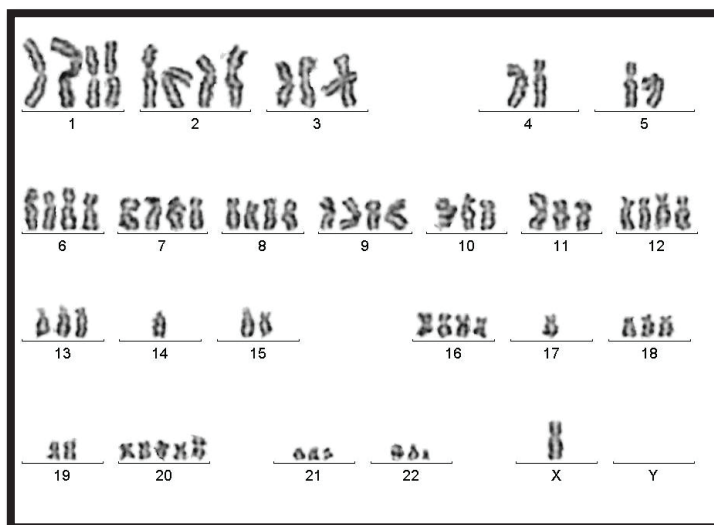
Localização das **quebras e falhas** (T1 +T2+T3)

Pacientes	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	X	Y
4				p									q			q								
5																								
6																								
7																								
16							q																	
25																								
35	p			q		p	p					q												
40	p			q		p		q																
41		q					p					q												
42																								
43																								
44				q					q															
47								q	q		q				q									
Soma "p"	2	0	0	1	0	3	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Soma "q"	0	1	0	4	1	0	1	2	2	0	2	2	2	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
TOTAL	2	1	0	5	1	3	3	2	2	0	2	2	2	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0

Espaços em branco significam passagens que não foram avaliadas e aquelas que não apresentaram metáfases (valor 0 no anexo 8)

ANEXO 13

Exemplos de kariogramas e metáfase mostrando cariótipo complexo das primeiras amostras de célula-tronco pluripotentes induzidas (IP001, IP002 e IP003)



ANEXO 14

DETALHAMENTO DOS PARÂMETROS DA CAPTURA DE IMAGEM DE FISH

Image:

Experiment type:

File name:

Size:

Start Time:

End Time:

Total Exposures:

ME109 TP53 201r

xy


D:\Users\NTC\Documents\TamaratME109 TP53 14.01.15.tif

11.52 MB

04/03/2015 12:23:32.371

04/03/2015 12:23:45.527

3 (3 channels, 1 frames)



Dimension	Logical Size	Physical Length	Physical Origin	Voxel Size
X	1600 pixels	70.36 µm	0.00 µm	0.044 µm
Y	1200 pixels	52.76 µm	0.00 µm	0.044 µm

Channels used : 3	Name	Cube	Contrast Method	Intensity	Peak Emission	Peak Excitation
Channel 0	Acu	A4	FLUO	5	0 nm	500 nm
Channel 1	Verde	S5	FLUO	5	0 nm	400 nm
Channel 2	Vermelho	N21	FLUO	5	0 nm	400 nm

Channel Name	LUT Name	Exposure Time	Gain
Channel 0	Blue	2397 ms	1.0
Channel 1	Green	4173 ms	1.0
Channel 2	Red	7250 ms	1.0

Camera Settings

System Number	AF 8000 UK
Camera	DPC345FX-454681610
Gamma	1
Binning	1 x 1
Resolution	12 bits
Black-Value	0
White-Value	4095

Microscope Settings

Objective	MCK FL PLAN 100.0x1.25 OIL
Numerical aperture (Obj.)	1.25
Refraction index	1.52

ANEXO 15

MODELO DE LAUDO DE CARIOTIPAGEM



ASSOCIAÇÃO PARANAENSE DE CULTURA
PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ
NÚCLEO DE TECNOLOGIA CELULAR

CITOGENÉTICA

TÉCNICA: CARIOTIPAGEM POR BANDEAMENTO GTG

NOME: PC-22

MATERIAL: CT mesenquimal derivada de placa coriônica de placenta humana

DATA DA COLETA: 15.06.12

MÉDICO: Renato Sá

RESULTADO: Vinte metáfases foram completamente analisadas neste estudo e não foram encontradas aberrações cromossômicas clonais.

CARIOGRAMA REPRESENTATIVO



CARIÓTIPO: 46,XY [20]

CÓDIGO: ME031

DATA DO LAUDO: 29.06.12

Tamara Borgonovo
 CITOGENETICISTA
 CRBio 09638/07

Em concordância com critérios pré estabelecidos pelo Núcleo de Tecnologia Celular da PUC-PR o resultado de Citogenética é considerado elegível para infusão nos pacientes, na ausência de alterações cromossômicas clonais associadas à neoplasias.

9 ARTIGOS PUBLICADOS

[Emergence of clonal chromosomal alterations during the mesenchymal stromal cell cultivation.](#)

Borgonovo T, Solarewicz MM, Vaz IM, Daga D, Rebelatto CL, Senegaglia AC, Ribeiro E, Cavalli IJ, Brofman PS.

Mol Cytogenet. 2015 Dec 1;8:94. doi: 10.1186/s13039-015-0197-5. eCollection 2015.

PMID:26628918

[Generation of human iPS cell line ihFib3.2 from dermal fibroblasts.](#)

Mesquita FC, Kasai-Brunswick TH, Gubert FM, **Borgonovo T**, Silva-Dos-Santos D, Araújo DS, Campos-de-Carvalho AC, Carvalho AB.

Stem Cell Res. 2015 Sep 10;15(3):445-448. doi: 10.1016/j.scr.2015.09.001. [Epub ahead of print]

PMID:26413783

[Genetic evaluation of mesenchymal stem cells by G-banded karyotyping in a Cell Technology Center.](#)

Borgonovo T, Vaz IM, Senegaglia AC, Rebelatto CL, Brofman PR.

Rev Bras Hematol Hemoter. 2014 May-Jun;36(3):202-7. doi: 10.1016/j.bjhh.2014.03.006. Epub 2014 Apr 3.

PMID:25031060