

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR

GUSTAVO CALDEIRA COTTA

**GERAÇÃO DE hiPSCs *SOX17-RFP* E *PRDM1-GFP knock-in* VIA CRISPR/Cas9 PARA  
ESTUDO DA OOGÊNESE HUMANA *in vitro***

BELO HORIZONTE

2025

GUSTAVO CALDEIRA COTTA

**GERAÇÃO DE hiPSCs *SOX17-RFP* E *PRDM1-GFP knock-in* VIA CRISPR/Cas9 PARA  
ESTUDO DA OOGÊNESE HUMANA *in vitro***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Biologia Celular

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Samyra Maria dos Santos Nassif Lacerda

BELO HORIZONTE

2025

043

Cotta, Gustavo Caldeira.

Geração de hiPSCs SOX17-RFP e PRDM1-GFP knock-in VIA CRISPR/Cas9 para estudo da oogênese humana in vitro [manuscrito] / Gustavo Caldeira Cotta. – 2025.

122 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Samyra Maria dos Santos Nassif Lacerda.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular.

1. Biologia Celular. 2. Reprodução. 3. Células-Tronco Pluripotentes Induzidas. 4. Fatores de Transcrição SOX. 5. Proteína 9 Associada à CRISPR. 6. Fator 1 de Ligação ao Domínio I Regulador Positivo. I. Lacerda, Samyra Maria dos Santos Nassif. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 576



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
ICB - COLEGIADO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR - SECRETARIA

### ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

GUSTAVO CALDEIRA COTTA

Às **quatorze horas** do dia **20 de fevereiro de 2025**, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora da Dissertação, indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho final intitulado: "**GERAÇÃO DE hiPSCs SOX17-RFP E PRDM1-GFP KNOCK-IN VIA CRISPR/CAS9 PARA ESTUDO DA OOGÊNESE HUMANA IN VITRO**", requisito final para obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, **Dra. Samyra Maria dos Santos Nassif Lacerda**, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao candidato, para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do candidato. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença do candidato e do público, para julgamento e expedição de resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof./Pesq.	Instituição	Indicação
Dra. Samyra Maria dos Santos Nassif Lacerda	UFMG	Aprovado
Dr. André Lucas Caldeira-Brant	PUC-MG	Aprovado
Dra. Erika Cristina Jorge	UFMG	Aprovado

Pelas indicações, o candidato foi considerado: **APROVADO**

O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. **Belo Horizonte, 20 de fevereiro de 2025.**

Dr<sup>a</sup>. Samyra Maria dos Santos Nassif Lacerda (Orientadora) \_\_\_\_\_

Dr. André Lucas Caldeira-Brant \_\_\_\_\_

Dr<sup>a</sup>. Erika Cristina Jorge \_\_\_\_\_

Belo Horizonte, 25 de fevereiro de 2025.

Ata de defesa de Dissertação/Tese 4001962 SEI 23072.210190/2025-90 / pg. 1

Assinatura dos membros da banca examinadora:



Documento assinado eletronicamente por **André Lucas Caldeira Brant de Oliveira, Usuário Externo**, em 25/02/2025, às 12:52, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Erika Cristina Jorge, Professora do Magistério Superior**, em 25/02/2025, às 13:03, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Samyra Maria dos Santos Nassif Lacerda, Professora do Magistério Superior**, em 25/02/2025, às 13:30, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufmg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **4001962** e o código CRC **24D9C144**.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biologia Celular do Departamento de Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, utilizando financiamentos das agências de fomento CAPES, CNPq e FAPEMIG.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus e aos meus guias por me permitirem concluir este trabalho tão especial. Sem o apoio de vocês, sobretudo nos dias difíceis, eu não teria conseguido.

Gostaria de expressar minha imensa gratidão à minha orientadora, minha profe querida, Samyra Lacerda. Fico muito feliz que nossos destinos tenham se cruzado! Desde a nossa primeira reunião, eu soube que estava sob a orientação da pessoa certa. Muito obrigado por todos os ensinamentos, pelas nossas conversas, tanto sobre ciência quanto sobre a vida! Agradeço também pelos almoços, cafezinhos e chocolates. Você é uma pessoa muito especial para mim.

Agradeço também aos meus amigos do Laboratório de Biologia Celular. Cada um de vocês tornou minha caminhada mais leve e feliz. À Rachel, por confiar em mim como coorientador e por ser meu braço direito, esquerdo e até minhas pernas em muitos momentos! À Mara, por seu suporte e amizade. À Thaís, pelos incontáveis espetinhos. À Sarah e Camilla, por me acolherem e me direcionarem ao caminho das células-tronco. À Iara, pelos experimentos malucos e pela parceria. Ao André Porto, meu novo aluno de iniciação científica! A todos os meus grandes amigos do Biocell: Ana Clara, André Figueiredo, Bárbara, Caio, Carla, Francisco, Graziela, Isabela Bento, Isabela Magnani, John, Jonas, Kaio, Laís, Larissa, Lídia, Leonardo, Marcos, Natália, Pedro, Rafael, Talita Farias, Thalita Valverde, e Wanderson. Vocês tornaram os meus dias incríveis e fizeram parte de momentos que levarei para sempre comigo. Trabalhar neste laboratório foi fundamental não só para a execução deste projeto, mas também para a criação de laços e memórias muito especiais.

Agradeço aos professores Guilherme Jardim e Gleide Avelar pelas valiosas trocas de conhecimento e pelos momentos compartilhados.

À professora Erika Jorge e aos seus alunos, em especial à Jade Carceroni e Júlia Meirelles, por colaborarem diretamente com o nosso laboratório.

Ao professor Renato Santana, ao Daniel Queiróz e ao Diego Menezes, do Laboratório de Biologia Integrativa, por me auxiliarem com equipamentos e reagentes.

Ao Centro de Aquisição e Processamento de Imagens do ICB (CAPI-ICB) e ao Centro de Microscopia da UFMG (CM-UFMG) e seus funcionários, pelo auxílio fundamental na obtenção das imagens que ilustram este trabalho.

Ao LaNCE-USP e à professora Lygia da Veiga Pereira por ter nos cedido a linhagem de célula-tronco de pluripotência induzida que são as estrelas deste trabalho.

Aos meus alunos das turmas de Biologia Celular dos cursos de Medicina e Ciências Biológicas, por me permitirem realizar um grande sonho e serem o início do meu projeto maior: ser um professor responsável, atencioso e dedicado. Aproveito também para agradecer às professoras Annamaria Vago e Gleydes Parreira pelas valiosas orientações sobre a docência em Biologia Celular.

Aos meus grandes amigos da vida: Caio, Victória Rocha, Victória Pereira, Matheus Prado, Matheus Rodrigues, Fernanda, Samuel, Bruna Aquino e Bruna Roque. Obrigado por serem meu colo, apoio e companhia nestes dois anos tão intensos. Peço desculpas pelas ausências e pelos momentos difíceis, mas tudo foi por um bem maior.

À minha família, por todo o amor e carinho, e sobretudo pela compreensão nos momentos de ausência e nos momentos delicados.

Aos meus queridos pais, Paulo e Ildete, por todo o apoio para que eu realizasse meus sonhos e projetos. Por sempre acreditarem em mim, por estarem sempre presentes e atuantes, e por me ensinarem que o amor cura e liberta. Vocês me mostraram que podemos ser completos e felizes nas nossas diferenças.

À minha psiquiatra, Dra. Veronica Santos, e à minha psicóloga, Izabela Alves, pelo suporte emocional essencial para a realização deste mestrado.

Agradeço a todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular, por todo conhecimento a mim destinados.

À coordenação e à secretaria do Programa, por todo o apoio e dedicação na resolução de pendências.

À CAPES pela bolsa de estudos concedida.

À Universidade Federal de Minas Gerais, por me proporcionar a oportunidade de ter acesso a um ensino público de altíssimo nível e qualidade.

Por fim, agradeço ao Gustavo, pela sua dedicação incansável à ciência em que acredita. Você se tornou alguém grandioso, e o mais importante: manteve sua humildade, fé, gentileza, brilho nos olhos, e encanto pelo seu trabalho e profissão. Mesmo com todas as dificuldades, você conseguiu, e continuará conseguindo enquanto investir em si mesmo. Estou escrevendo

este agradecimento no dia 5 de outubro de 2024, sábado, às 18h30. Hoje foi um dia difícil no laboratório, especialmente porque minhas queridas hiPSCs, minhas "filhas", contaminaram. Voltei para casa pensando: "por que as coisas dão tão errado?". A resposta é simples: não há acerto sem tentativa, não há ciência sem testes, e não há sucesso sem luta. Terminei este processo confiante na minha capacidade de enfrentar e resolver os problemas que surgirem.

*“Light a beacon so I can navigate, through the tempest, through the madness”*

Nightwish – An Ocean of Strange Islands

## RESUMO

A geração de hiPSCs contendo alelos repórteres é uma estratégia inovadora e altamente vantajosa para o estudo aprofundado dos processos de diferenciação celular. Este trabalho teve como objetivo, em um primeiro momento, revisar a literatura científica sobre o tema e, em seguida, expandir esse conhecimento por meio da geração de linhagens de hiPSCs geneticamente modificadas pelo sistema CRISPR/Cas9, visando à expressão de proteínas fluorescentes associadas aos fatores de transcrição SOX17 e PRDM1, marcadores fundamentais do desenvolvimento de células germinativas primordiais (PGCs). Essa abordagem foi concebida para aprimorar o monitoramento de protocolos de indução à diferenciação em PGCs humanas, contribuindo para o desenvolvimento de modelos *in vitro* da oogênese. Inicialmente, realizamos uma caracterização detalhada das hiPSCs utilizadas. Essas células apresentaram morfologia típica, confirmada por microscopia de luz e eletrônica de transmissão, além de expressarem marcadores-chave de pluripotência, detectados por imunofluorescência. O cariótipo das células foi analisado, evidenciando estabilidade genômica com um padrão normal (46, XX). Ensaio de viabilidade celular determinaram as concentrações mínimas letais dos antibióticos seletivos blasticidina e puromicina, fixadas em 1,6 µg/mL e 0,8 µg/mL, respectivamente, parâmetros essenciais para garantir uma seleção eficiente das células pós-modificação. A síntese dos DNAs doadores foi otimizada por meio da técnica de *inner-outer Overlapping* PCR, que emprega pares de *primers* sobrepostos, cobrindo regiões internas e externas do amplicon. Essa abordagem demonstrou maior eficiência e precisão em comparação ao uso de *primers* convencionais longos. Ensaio de transfecção utilizando Cas9-GFP indicaram que aproximadamente 26% das hiPSCs internalizaram os complexos de edição gênica uma hora após a exposição, fornecendo uma base sólida para a integração dirigida de SOX17-RFP e PRDM1-RFP. Além disso, padronizamos um protocolo para a indução ao endoderma definitivo, com o objetivo de promover a expressão dos marcadores SOX17 e PRDM1. A validação dessa indução foi realizada por imunofluorescência e qPCR, demonstrando que o meio empregado permite uma ativação rápida e precisa dos marcadores de interesse. Essa estratégia se apresenta como uma alternativa prática e eficiente aos métodos tradicionais de indução a PGCs, que demandam maior tempo e recursos. Paralelamente, investigamos os efeitos do tratamento com ácido valproico (VPA) e AZD 7648 na viabilidade, proliferação e eficiência do reparo dirigido por homologia (HDR) em células *knock-in*. Os resultados indicaram que os fármacos melhoram a viabilidade celular, embora não necessariamente aumentem a taxa de proliferação. Além disso, os tratamentos favoreceram a obtenção de células *knock-in* para os marcadores de interesse. Como principal resultado, estabelecemos duas linhagens de hiPSCs com alelos repórteres fluorescentes: *SOX17-RFP-Blast* e *PRDM1-GFP-Puro*. A confirmação da modificação genética foi realizada por indução ao endoderma definitivo, seguida de análise em microscópio de fluorescência e reações de PCR juncional para detecção dos insertos nas extremidades 5' e 3' dos respectivos genes. Os avanços obtidos neste estudo destacam a importância da integração entre caracterizações detalhadas, técnicas moleculares otimizadas e protocolos bem definidos. A geração de linhagens de hiPSCs com alelos repórteres fluorescentes representa um avanço significativo para o estudo dos mecanismos moleculares que regem a oogênese humana. Além de aprofundar nosso entendimento sobre os estágios iniciais do desenvolvimento germinativo, essas linhagens oferecem uma plataforma promissora para futuras aplicações em pesquisa biomédica.

**Palavras-chave:** hiPSCs; SOX17; PRDM1; Reprodução Humana; CRISPR/Cas9.

## ABSTRACT

The generation of hiPSCs containing reporter alleles is an innovative and highly advantageous strategy for the in-depth study of cellular differentiation processes. This study initially aimed to review the scientific literature on the subject and subsequently expand this knowledge through the generation of genetically modified hiPSC lines using the CRISPR/Cas9 system, targeting the expression of fluorescent proteins associated with the transcription factors SOX17 and PRDM1, key markers of primordial germ cell (PGC) development. This approach was designed to enhance the monitoring of differentiation induction protocols in human PGCs, contributing to the development of in vitro models of oogenesis. Initially, we conducted a detailed characterization of the hiPSCs used. These cells exhibited typical morphology, confirmed by light and transmission electron microscopy, and expressed key pluripotency markers, detected by immunofluorescence. The karyotype analysis demonstrated genomic stability with a normal pattern (46, XX). Cell viability assays determined the minimum lethal concentrations of the selective antibiotics blasticidin and puromycin, set at 1.6  $\mu\text{g/mL}$  and 0.8  $\mu\text{g/mL}$ , respectively, which are essential parameters for ensuring efficient post-modification cell selection. The synthesis of donor DNAs was optimized using the inner-outer overlapping PCR technique, which employs pairs of overlapping primers covering internal and external regions of the amplicon. This approach demonstrated greater efficiency and precision compared to the use of long conventional primers. Transfection assays using Cas9-GFP indicated that approximately 26% of hiPSCs internalized the gene-editing complexes one hour after exposure, providing a solid foundation for the targeted integration of SOX17-RFP and PRDM1-RFP. Additionally, we standardized a protocol for definitive endoderm induction, aiming to promote the expression of SOX17 and PRDM1 markers. The validation of this induction was performed through immunofluorescence and qPCR, demonstrating that the employed medium enables rapid and precise activation of the target markers. This strategy presents itself as a practical and efficient alternative to traditional PGC induction methods, which require more time and resources. In parallel, we investigated the effects of valproic acid (VPA) and AZD 7648 treatment on viability, proliferation, and homology-directed repair (HDR) efficiency in knock-in cells. The results indicated that these drugs improve cell viability, although they do not necessarily increase proliferation rates. Moreover, the treatments facilitated the successful generation of knock-in cells for the target markers. As a key outcome, we established two hiPSC lines with fluorescent reporter alleles: *SOX17-RFP-Blast* and *PRDM1-GFP-Puro*. The genetic modification was confirmed by definitive endoderm induction, followed by fluorescence microscopy analysis and junctional PCR reactions to detect the insertions at the 5' and 3' ends of the respective genes. The advancements achieved in this study highlight the importance of integrating detailed characterizations, optimized molecular techniques, and well-defined protocols. The generation of hiPSC lines with fluorescent reporter alleles represents a significant step forward in studying the molecular mechanisms governing human oogenesis. In addition to deepening our understanding of the early stages of germ cell development, these lines provide a promising platform for future biomedical research applications.

**Keywords:** hiPSCs; SOX17; PRDM1; Human Reproduction; CRISPR/Cas9.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1:</b> Estrutura dos cassetes para <i>knock-in</i> de <i>SOX17</i> e <i>PRDMI</i> .....	p.70
<b>Figura 2:</b> Diagrama da placa utilizada no ensaio-piloto de transfecção .....	p.76
<b>Figura 3:</b> Diagrama do experimento de transfecção .....	p. 78
<b>Figura 4:</b> Representação dos cassetes genéticos <i>SOX17-C-2A-RFP-BLAST</i> e <i>PRDMI-C-2A-GFP-PURO</i> integrados e planejamento experimental para análises de PCR juncional .....	p. 81
<b>Figura 5:</b> Aspectos morfológicos da linhagem hiPSC71 em passagem #24 .....	p. 84
<b>Figura 6:</b> Perfil fenotípico e genético das hiPSC71 empregadas no projeto .....	p. 86
<b>Figura 7:</b> Resposta das hiPSCs aos antibióticos seletivos designados para selecionar, futuramente, células geneticamente modificadas .....	p. 88
<b>Figura 8:</b> Resultados quantitativos e qualitativos a respeito da viabilidade celular mediante a administração de VPA e AZD 7648 .....	p. 90
<b>Figura 9:</b> Resultados relacionados à proliferação celular após a administração de VPA e AZD 7648 .....	p. 91
<b>Figura 10:</b> Aspectos morfológicos e imunofenotípicos da diferenciação de hiPSCs em células do endoderma definitivo .....	p. 93
<b>Figura 11:</b> Resultados de qPCR para marcadores de pluripotência, de diferenciação e de endoderma definitivo .....	p. 94
<b>Figura 12:</b> Fotodocumentação da eletroforese em gel de agarose 1% das amostras de dsDNA gerados pela <i>Inner-outer Overlapping PCR</i> .....	p. 95
<b>Figura 13:</b> Resultados do ensaio piloto de transfecção após incubação de 1 hora com Cas9-GFP .....	p. 96
<b>Figura 14:</b> Achados morfológicos das hiPSCs em transfecção .....	p. 97
<b>Figura 15:</b> Detecção da RFP em células do endoderma definitivo .....	p. 99
<b>Figura 16:</b> Detecção da GFP em células do endoderma definitivo .....	p. 100
<b>Figura 17:</b> Resultados da eletroforese capilar das amostras de hiPSCs-SOX17-RFP submetidas à PCR juncional .....	p. 102

**Figura 18:** Resultados da eletroforese capilar das amostras de hiPSCs-PRDM1-GFP submetidas à PCR juncional ..... p. 103

**Figura 19:** Resultados preliminares da seleção de hiPSCs SOX17-RFP resistentes à blasticidina ..... p. 105

**Figura 20:** Resultados preliminares da seleção de hiPSCs PRDM1-GFP resistentes à puromicina ..... p. 106

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> <i>Primers</i> utilizados para qPCR .....	p.67
<b>Tabela 2:</b> Programação da ciclagem utilizada para as reações de qPCR .....	p.68
<b>Tabela 3:</b> Sequências-alvo dos sgRNAs utilizados no estudo no estudo .....	p. 69
<b>Tabela 4:</b> <i>Primers</i> de sequenciamento e de verificação para o <i>knock-in SOX17-RFP</i> .....	p. 71
<b>Tabela 5:</b> <i>Primers</i> de sequenciamento e de verificação para o <i>knock-in PRDMI-GFP</i> .....	p. 71
<b>Tabela 6:</b> Programação da ciclagem utilizada para a síntese dos dsDNA .....	p. 72
<b>Tabela 7:</b> <i>Primers</i> utilizados para a síntese dos braços de homologia desejados .....	p. 74
<b>Tabela 8:</b> Análise dos dsDNAs gerados .....	p. 95

## LISTA DE ABREVIATURAS

$\mu\text{L}$ : microlitro;

$\mu\text{g}$ : micrograma;

$\mu\text{M}$ : micromolar;

2A: espaçador de 2 aminoácidos;

$A_{260/280}$ : razão entre a absorbância a 260 nanômetros e 280 nanômetros;

ANOVA: *analysis of variance*;

ARBP: *attachment region binding protein*;

AZD 7648: *7-methyl-2-[(7-methyl-[1,2,4]triazolo[1,5-a]pyridin-6-yl)amino]-9-(oxan-4-yl)purin-8-one*;

Blast: Blastocidina;

BLIMP1: PRDM1;

BSA: albumina de soro bovino;

Cas: *CRISPR associated sequences*, sequências relacionadas à CRISPR;

Cas9: proteína endonuclease Cas9;

cDNA: DNA complementar;

cMYC: *cellular myelocytomatosis oncogene*, oncogene relacionado à mielocitomatose celular;

$\text{CO}_2$ : dióxido de carbono;

cre: Cre recombinase;

CRISPR: *clustered regular interspaced short palindromic repeats*, repetições palindrômicas intercaladas regularmente agrupadas;

Ct: *threshold cycle*;

CXCR4: *C-X-C chemokine receptor type 4*;

D: dia;

DAPI: *4',6-diamidino-2-phenylindole*;

DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*;

DMEM-F12: *Dulbecco's Modified Eagle Medium-Nutrient Mixture F12*;

DMSO: *Dimethyl sulfoxide*;

DNA: ácido desoxirribonucleico;

DNA-PK: proteína quinase dependente de DNA;

dNTPs: desoxirribonucleotídeos fosfatados;

DSB: *double strand breaks*, quebras na dupla fita;

dsDNA: *double-stranded DNA*, DNA de dupla fita;

DTT: *DL-Ditiotreitol*;

E8: *Essential 8 Medium*;

EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético;

EdU: *5-ethynyl 2'-deoxyuridine*;

Ef1 $\alpha$ : Fator de alongamento de tradução eucariótica;

EFS: Ef1 $\alpha$ ;

ESCs: *embryonic stem cells*, células-tronco embrionárias;

FISH: hibridização *in situ* fluorescente;

FokI: nuclease de restrição de *Flavobacterium okeanoikoites*;

FOXA2: *forkhead box protein A2*;

FSC: dispersão para frente;

FWD: *forward*;

g: força centrífuga relativa;

GAPDH: *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*;

GATA6: *GATA binding protein 6*;

gDNA: DNA genômico;

GFP: *green fluorescent protein*, proteína verde fluorescente;

gRNA: RNA guia;

HDAC: histona desacetilase;

HDR: *homology directed repair*, reparo dirigido por homologia;

HiFi Cas9: Cas9 de alta fidelidade;

hiPSC/hiPSCs: *human induced pluripotent stem cells*, células-tronco de pluripotência induzida humanas;

hPGCLCs: *human primordial germ cells like-cells*, células semelhantes às células da linhagem germinativa primordial;

ICB/UFMG: Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais;

IgG: imunoglobulina G;

IgM: imunoglobulina M;

iMeLCs: *incipient mesoderm like-cells*, células insipientes do mesoderma;

*Indels*: inserções e deleções;

iPSC/iPSCs: *induced pluripotent stem cells*, células tronco de pluripotência induzida;

jPCR: PCR junctional;

kb: kilobase;

KCl: cloreto de potássio;

KI67: *Kiel 67 antigen*;

KLF4: *KLF transcription factor 4*;

LaNCE-USP: Laboratório Nacional de Células-Tronco Embrionárias da Universidade de São Paulo;

LIN28: *cell lineage abnormal 28*;

log: logaritmo;

log2: logaritmo em base 2;

loxp: *locus of X-over P1*;

mA: miliamperes;

MgCl<sub>2</sub>: cloreto de magnésio;

mL: mililitro;

mM: milimolar;

mRNA: RNA mensageiro;

mTeSR: *PSC Maintenance Medium*;

n: número amostral;

NANOG: *Nanog homeobox*;

ng: nanograma;

NGS: *new generation sequencing*, sequenciamento de nova geração;

NHEJ: *non-homologous end joining*, junção de extremidades não homólogas;

nm: nanômetro;

nmol: nanomoles;

nt: nucleotídeos;

°: graus;

°C: graus Celsius;

OCT4: *POU class 5 homeobox 1, POU5F1*;

Opti-MEM: *Optimized Minimum Essential Medium*;

OsO<sub>4</sub>: tetróxido de ósmio;

*p*: valor de *p*, probabilidade de significância;

PAM: *protospacer adjacent motif*, motivo adjacente a um protoespaçador;

pb: pares de base;

PBS: tampão fosfato-salino, pH 7.4;

PCNA: *proliferating cell nuclear antigen*;

PCR: reação em cadeia da polimerase;

PDGFA: *platelet-derived growth factor subunit A*;

PFA: paraformaldeído 4% em PBS 1X;

PGCs: *primordial germ cells*, células da linhagem germinativa primordial;

pH: potencial hidrogeniônico;

PI3K: *fosfatidylinositol 3-kinase*;

PK: proteinase K;

pmol: picomoles;

Pol $\theta$ : DNA polymerase theta;

PRDM1: *PR domain zinc finger protein 1*;

PSC/PSCs: *pluripotent stem cells*, células-tronco pluripotentes;

Puro: Puromicina

qPCR: PCR quantitativa;

REV: *reverse*;

RFP: *red fluorescent protein*, proteína vermelha fluorescente

RNA: ácido ribonucleico;

RT: transcrição reversa;

S. p.: *Streptococcus pyogenes*;

SEQ: sequenciamento;

SFB: soro fetal bovino;

sgRNAs: *single guide RNA*;

SOX17: *SRY-box transcription factor 17*;

SOX2: *SRY-box transcription factor 2*;

SSC: dispersão lateral;

SSEA4: *stage-specific embryonic antigen 4*;

SV40-T: *Simian Vacuolating Virus 40 Tag*;

SYBR Green: *2-[N-(3-dimethylaminopropyl)-N-propylamino]-4-[2,3-dihydro-3-methyl-(benzo-1,3-thiazol-2-yl)-methylidene]-1-phenyl-quinolinium*;

TAE: tampão Tris-Acetato-EDTA;

TALENs: *transcription activator-like effector nuclease*, nuclease efetora semelhante a ativadores de transcrição;

TE: tampão Tris-EDTA;

TFAP2C: *transcription factor AP-2 gamma*;

TM: temperatura de *melting*;

TRA-1-60: *podocalyxin*, podocalixina, glicoproteína associada a podócitos;

U: unidade;

UFMG: Universidade Federal de Minas Gerais;

USP: Universidade de São Paulo;

UTR: *untranslated region*;

VPA: *2-propylvaleric acid*, ácido valproico;

ZFNs: zinc-finger nucleases.

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	p. 23
<b>OBJETIVOS</b> .....	p. 25
<b>CAPÍTULO 1 – Reporter Alleles in hiPSCs: Visual Cues on Development and Disease</b> .....	p. 26
<b>CAPÍTULO 2 – Geração de linhagens de hiPSC <i>SOX17-RFP</i> e <i>PRDM1-GFP</i> por meio da tecnologia CRISPR/Cas9</b> .....	p. 53
<b>1. INTRODUÇÃO E BREVE REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	p. 54
<b>2. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	p. 56
2.1. Células empregadas no projeto .....	p. 56
2.2. Cultivo de hiPSCs .....	p. 56
2.3. Microscopia Eletrônica de Transmissão .....	p. 58
2.4. Imunofluorescência para o painel de pluripotência .....	p. 59
2.5. Cariotipagem .....	p. 60
2.6. Viabilidade celular mediante a administração de diferentes drogas .....	p. 61
2.7. Avaliação da proliferação celular em células tratadas com VPA e AZD 7648 .....	p. 63
2.8. Indução à endoderma definitivo .....	p. 64
2.9. Imunofluorescência para marcadores de pluripotência e de endoderma .....	p. 65
2.10. qPCR para marcadores de endoderma definitivo .....	p. 65
2.11. Desenho de <i>primers</i> e sgRNAs empregados na edição gênica por CRISPR/Cas9 .....	p. 68
2.12. <i>Inner-outer Overlapping PCR</i> para amplificação do dsDNA .....	p. 71
2.13. Ensaio piloto de transfecção e citometria de fluxo .....	p. 74
2.14. Transfecção dos dsDNA <i>SOX17-RFP</i> e <i>PRDM1-GFP</i> .....	p. 77
2.15. Detecção da RFP e da GFP em células <i>knock-in</i> .....	p. 78
2.16. PCR juncional para detecção do <i>knock-in</i> .....	p. 79
2.17. Seleção das células geneticamente modificadas .....	p. 82
2.18. Análises estatísticas .....	p. 82
<b>3. RESULTADOS</b> .....	p. 83
3.1. Caracterização das hiPSC71: Morfologia, Ultraestrutura, Fenótipo e Perfil Genético .....	p. 83

3.2. Avaliação das Respostas Celulares à Administração de Diferentes Fármacos .....	p. 87
3.2.1. Resposta aos Antibióticos Seletivos .....	p. 87
3.2.2. Resposta ao VPA e ao AZD 7648 .....	p. 89
3.3. Otimização das Condições de Cultivo para a Expressão de SOX17 e PRDM1 .....	p. 92
3.4. Edição Gênica com CRISPR/Cas9 .....	p. 95
3.4.1. Análise dos dsDNA Gerados .....	p. 95
3.4.2. Incorporação de Complexos de Transfecção contendo Cas9-GFP .....	p. 96
3.4.3. Transfecção Celular .....	p. 97
3.4.4. Validação da expressão dos genes <i>knock-in</i> .....	p. 98
3.4.5. Detecção dos insertos por meio de PCR juncional e eletroforese capilar .....	p. 101
3.4.6. Seleção das Células Geneticamente Modificadas .....	p. 104
<b>4. DISCUSSÃO .....</b>	<b>p. 107</b>
<b>CONCLUSÕES INTEGRATIVAS .....</b>	<b>p. 114</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>p. 116</b>

## INTRODUÇÃO GERAL

As células-tronco de pluripotência induzida (iPSCs, do inglês *induced pluripotent stem cells*) são uma das maiores inovações da biologia moderna. Descritas por Shinya Yamanaka em 2006 (Takahashi & Yamanaka, 2006), as iPSCs são geradas pela reprogramação de células somáticas adultas para um estado pluripotente, utilizando fatores de transcrição específicos. Equiparáveis às células-tronco embrionárias, possuem a capacidade de se diferenciar em qualquer tipo celular humano, sendo uma fonte valiosa para estudos biológicos e aplicações terapêuticas (Takahashi & Yamanaka, 2016). Uma das principais vantagens das iPSCs é sua capacidade de contornar questões éticas associadas à obtenção de células-tronco embrionárias, ao mesmo tempo em que oferecem uma abordagem personalizada para o estudo e tratamento de doenças. Por serem derivadas de células do próprio indivíduo, permitem a modelagem precisa de condições genéticas e o desenvolvimento de terapias compatíveis com o paciente (Doss & Sachinidis, 2019).

Em biologia do desenvolvimento, essas células são modelos importantes para estudar os processos de diferenciação e formação de tecidos (Cerneckis et al., 2024), sobretudo em função das dificuldades éticas e metodológicas de estudar estes processos em embriões humanos. Essas células também têm sido utilizadas na investigação de mecanismos de doenças genéticas, como distúrbios neurodegenerativos e metabólicos, fornecendo compreensões que dificilmente seriam alcançadas com modelos animais (Imaizumi & Okano, 2014). Na medicina regenerativa, as iPSCs humanas (hiPSCs) apresentam grande potencial para reparar tecidos danificados, com avanços promissores em terapias para opacidade corneal, degeneração macular, lesões na medula espinhal e doenças cardíacas (Soma et al., 2024; Inoue et al., 2023; Turhan et al., 2021). Além disso, revolucionaram a triagem de drogas, permitindo testes personalizados em células derivadas de pacientes, acelerando o desenvolvimento de medicamentos mais eficazes e seguros (Tricot et al., 2022). A exemplo, foi desenvolvida uma plataforma de triagem baseada em hiPSCs, utilizando superdoadores homocigotos para antígeno leucocitário humano (HLA), para avaliação em larga escala de toxicidade em cardiomiócitos e neurônios, representando milhões de indivíduos globalmente (Huang et al., 2024). Isto posto, é notório e indiscutível que as hiPSCs desempenham um papel essencial na ciência moderna, tanto no avanço de novas terapias quanto na elucidação dos mecanismos biológicos.

Neste contexto, aplicações biotecnológicas avançadas, como as metodologias de edição gênica, emergem como ferramentas valiosas para oportunizar o estudo de modo aprofundado das dinâmicas celulares e moleculares envolvidas nos processos de diferenciação. Alelos repórteres, por exemplo, desempenham uma importante função na monitorização da diferenciação de hiPSCs em tipos celulares específicos, permitindo a identificação precisa e a análise dinâmica dos estágios de desenvolvimento. Esses sistemas repórteres, frequentemente associados a genes como GFP (proteína verde fluorescente) ou RFP (proteína vermelha fluorescente), têm facilitado o estudo de diversos processos celulares, uma vez que possibilitam a observação da expressão genotípica com alta sensibilidade, em tempo real e de maneira não invasiva. A inserção desses alelos é comumente realizada por meio de tecnologias de edição gênica, com o sistema CRISPR/Cas9 sendo a abordagem mais amplamente utilizada e eficiente, permitindo a edição precisa e direcionada de sequências genéticas (Puspita et al., 2024).

A dissertação apresentada, portanto, se dedicou a uma revisão aprofundada das metodologias envolvidas na geração de linhagens de hiPSCs com alelos repórteres, abordando as mais recentes tecnologias de edição gênica e suas aplicações na modelagem de processos biológicos e doenças. Essa revisão resultou em um artigo publicado no periódico *International Journal of Molecular Sciences* (Fator de Impacto = 4.9), que explora as diversas abordagens para a inserção gênica, com ênfase na utilização da tecnologia CRISPR/Cas9, e discute seus impactos em estudos de diferenciação celular e doenças humanas. O artigo está apresentado no Capítulo 1 da dissertação, oferecendo uma visão abrangente das metodologias atuais e seus desafios, além das perspectivas futuras. No Capítulo 2, a dissertação amplia seu escopo ao descrever os processos associados ao estabelecimento de duas linhagens de hiPSCs, ambas contendo repórteres fluorescentes, que serão futuramente utilizadas para o estudo da especificação de células da linhagem germinativa primordial (PGCs).

Esforços para a criação dessas linhagens de iPSCs representam marcos importante, pois viabilizam e favorecem o acompanhamento detalhado da diferenciação germinativa *in vitro*, oferecendo uma ferramenta valiosa para entender os mecanismos biológicos que regem a gametogênese humana em seus estágios mais primordiais, ainda tão pouco compreendidos. Nesse contexto, esta dissertação vai além de uma revisão das bases técnicas e científicas envolvidas na geração de hiPSCs com alelos repórteres, e traz uma contribuição significativa ao implementar etapas para a criação de novas linhagens celulares que podem enriquecer o conhecimento da biologia reprodutiva humana e impulsionar o progresso da medicina reprodutiva no tratamento da infertilidade.

## OBJETIVOS

- **Objetivo Geral**

Explorar e aplicar tecnologias de edição gênica para a geração de linhagens de células-tronco pluripotentes induzidas humanas (hiPSCs) carregando alelos repórteres, visando aprimorar ferramentas para estudos de desenvolvimento humano, com ênfase na reconstrução da oogênese *in vitro*.

- **Objetivos Específicos**

**A.** Capítulo 1 – *Reporter Alleles in hiPSCs: Visual Cues on Development and Disease*

- Apresentar as tecnologias de edição gênica disponíveis, com destaque para o CRISPR/Cas9, e suas aplicações na geração de alelos repórteres em hiPSCs;
- Avaliar a eficácia das metodologias de inserção de genes repórteres em *loci* genômicos específicos, considerando a precisão e a funcionalidade dos sistemas desenvolvidos;
- Revisar os avanços obtidos no uso de alelos repórteres em estudos sobre processos de desenvolvimento, modelagem de doenças genéticas e triagem terapêutica;
- Discutir os desafios enfrentados na implementação e no uso de alelos repórteres em hiPSCs, propondo perspectivas para o aprimoramento dessas abordagens;
- Demonstrar a relevância dos alelos repórteres em hiPSCs para a pesquisa translacional, destacando seu impacto na compreensão de mecanismos celulares, no desenvolvimento de modelos de doenças e na avaliação da eficácia de terapias.

**B.** Capítulo 2 – Geração de linhagens de hiPSC *SOX17-RFP* e *PRDMI-GFP* por meio da tecnologia CRISPR/Cas9

- Caracterizar as hiPSCs mantidas no Laboratório de Biologia Celular da UFMG, com enfoque em sua morfologia, ultraestrutura, perfil fenotípico, resposta à administração de diferentes fármacos e susceptibilidade à transfecção e edição gênica.
- Padronizar protocolos de edição gênica utilizando a tecnologia CRISPR/Cas9 para introdução de repórteres fluorescentes dirigidos pelos genes *SOX17* e *PRDMI* em hiPSCs.
- Investigar e validar as hiPSCs geradas quanto à expressão correta dos genes repórteres em diferentes condições de cultivo e diferenciação.
- Avaliar a aplicabilidade e funcionalidade dos alelos repórteres introduzidos nas hiPSCs em ensaios relacionados à diferenciação e função de células germinativas primordiais humanas.

**CAPÍTULO 1**

*Reporter Alleles in hiPSCs: Visual Cues on Development and Disease*

Review

# Reporter Alleles in hiPSCs: Visual Cues on Development and Disease

Gustavo Caldeira Cotta , Rachel Castro Teixeira dos Santos, Guilherme Mattos Jardim Costa  and Samyra Maria dos Santos Nassif Lacerda \*

Laboratory of Cellular Biology, Department of Morphology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais, 31270-901 Belo Horizonte, Brazil; gustavo-caldeira@outlook.com (G.C.C.); rachelctds@ufmg.br (R.C.T.d.S.); costagmj@gmail.com (G.M.J.C.)

\* Correspondence: samyranassif@ufmg.br or samyranassif@gmail.com; Tel.: +55-31-3409-2780

**Abstract:** Reporter alleles are essential for advancing research with human induced pluripotent stem cells (hiPSCs), notably in developmental biology and disease modeling. This study investigates the state-of-the-art gene-editing techniques tailored for generating reporter alleles in hiPSCs, emphasizing their effectiveness in investigating cellular dynamics and disease mechanisms. Various methodologies, including the application of CRISPR/Cas9 technology, are discussed for accurately integrating reporter genes into the specific genomic loci. The synthesis of findings from the studies utilizing these reporter alleles reveals insights into developmental processes, genetic disorder modeling, and therapeutic screening, consolidating the existing knowledge. These hiPSC-derived models demonstrate remarkable versatility in replicating human diseases and evaluating drug efficacy, thereby accelerating translational research. Furthermore, this review addresses challenges and future directions in refining the reporter allele design and application to bolster their reliability and relevance in biomedical research. Overall, this investigation offers a comprehensive perspective on the methodologies, applications, and implications of reporter alleles in hiPSC-based studies, underscoring their essential role in advancing both fundamental scientific understanding and clinical practice.

**Keywords:** reporter alleles; human iPSCs; disease modeling; developmental biology



**Citation:** Cotta, G.C.; Teixeira dos Santos, R.C.; Costa, G.M.J.; Lacerda, S.M.d.S.N. Reporter Alleles in hiPSCs Visual Cues on Development and Disease. *Int. J. Mol. Sci.* **2024**, *25*, 11009. <https://doi.org/10.3390/ijms252011009>

Academic Editor: Rivka Ofir

Received: 30 August 2024

Revised: 5 October 2024

Accepted: 8 October 2024

Published: 13 October 2024



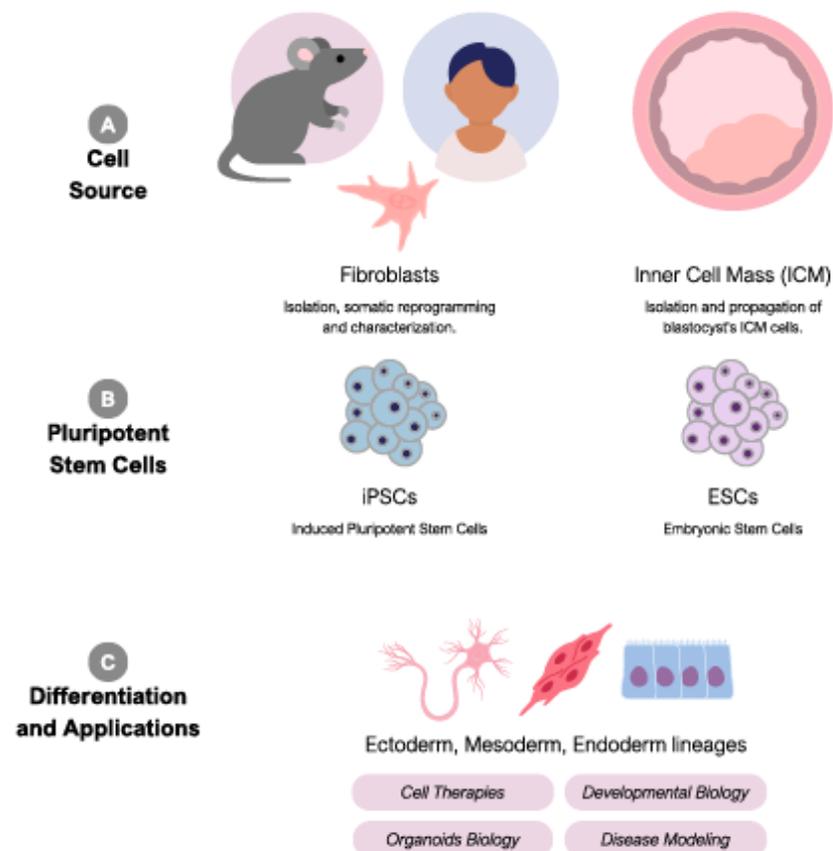
Copyright © 2024 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction: From Induced Pluripotent Stem Cells (iPSCs) to Reporter Alleles

Stem cells serve as the cellular foundation of the body, giving rise to specialized cells that perform specific functions [1]. They possess an extraordinary capacity for self-renewal and differentiation [1,2], making them essential to the formation of human organs and tissues. Stem cells come in two primary forms: pluripotent and multipotent. Multipotent stem cells, capable of transforming into differentiated cells from a single germ layer, are responsible for generating specific tissues, such as bone and cartilage, both of which originate from mesenchyme [1–3]. On the other hand, pluripotent stem cells have the remarkable ability to differentiate into cells from all three germ layers: endoderm, mesoderm, and ectoderm. This group includes embryonic stem cells (ESCs) derived from the inner cell mass of embryos and induced pluripotent stem cells (iPSCs), both demonstrating remarkable versatility [3,4].

Induced pluripotent stem cells (iPSCs), first introduced by the team of Japanese researcher Shinya Yamanaka in 2006 using mouse models [5] and in 2007 using human cells [6], represent a revolutionary advancement in stem cell research. iPSCs are derived from adult specialized cells, such as dermal fibroblasts or blood cells [6,7], which are reprogrammed into a state mimicking embryonic pluripotency, completely bypassing the need for embryos (Figure 1). This reprogramming process involves the introduction of specific genes into adult cells, enabling them to regain the ability to differentiate into various cell types. The genes in question facilitate the transient expression of four key transcription factors—OCT4, SOX2, KLF4, and c-MYC, collectively known as OSKM,

which orchestrate the pluripotency of iPSCs [6,8]. OCT4 and SOX2 are key transcription factors that uphold pluripotency and foster the development of diverse cell lineages. KLF4 regulates gene expression and aids in maintaining pluripotency, while c-MYC contributes to the reprogramming process and sustains pluripotency. These four transcription factors are sufficient to transform human fibroblasts into iPSCs [9]. Other transcription factors, like NANOG and LIN28, have also been recognized as significant regulators of pluripotency in iPSCs [10].



**Figure 1.** Acquisition and applications of pluripotent stem cells (PSCs). Pluripotent stem cells can be acquired through somatic reprogramming of animal or human cells, such as fibroblasts, or by collecting cells from the inner cell mass of blastocysts. Under very specific culture conditions, their pluripotent potential is maintained, enabling their use in differentiating into lineages of the three germ layers *in vitro*. Human PSC-derived cells have various applications, including developmental biology studies, disease modeling, organoid development, and cell therapies.

The discovery of human iPSCs (hiPSCs) marked a significant advancement by circumventing ethical concerns tied to embryonic stem cell acquisition [11]. This is chiefly because iPSCs and ESCs share numerous phenotypic markers, such as morphology and surface protein expression [12–14], as well as epigenetic landscapes [15]. Consequently, iPSCs exhibit crucial characteristics like self-renewal and the capacity to differentiate into diverse cell lineages, including germ cells, rendering them indispensable to various fields like regenerative medicine, disease modeling, drug discovery, and studies in developmental biology [16,17]. In the realm of regenerative medicine, iPSCs technology offers the potential to generate patient-specific cells and tissues for transplantation, mitigating the risk of immune rejection [18]. In this same way, hiPSCs serve as a versatile tool for disease modeling by helping investigate a wide spectrum of conditions, including neurological

and neurodegenerative diseases [19], such as Alzheimer [20], as well as heart, kidney, and lung diseases [21–23]. This enables a deeper understanding of the disease mechanisms and opens avenues for potential therapeutic interventions [24]. As for disease modeling, iPSCs play a determining role in toxicity testing and drug screening and discovery, mainly by facilitating the creation of disease-specific cell lines and allowing the assessment of new drug efficacy [25]. Furthermore, iPSCs significantly contribute to developmental biology by helping elucidate the processes occurring in early embryonic states, enabling scientists to replicate these mechanisms *in vitro* and advance research in the aforementioned areas [26].

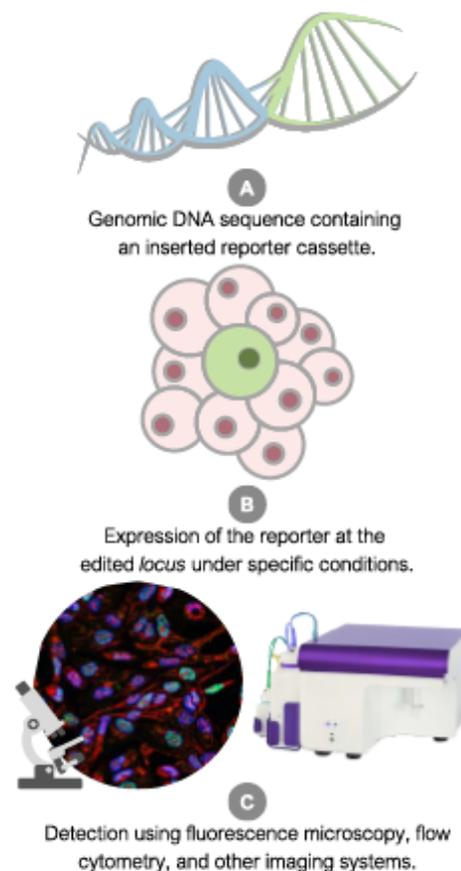
Developmental biology encompasses a range of intricate processes, including tissue patterning, tissue growth, cell differentiation, and morphogenesis. iPSCs, due to their inherent properties, serve as an ideal model system for investigating these processes *in vitro* [27]. Stem cells play a crucial role in both normal development and maintenance of adult tissues, generating diverse cell types within embryos or tissues [28]. In the context of developmental biology, iPSCs offer a valuable tool for unraveling the molecular mechanisms and signaling pathways that govern cell differentiation; scientists can direct iPSCs to differentiate into various cell types, providing insights into the complex interplay among genes, environment, and extracellular matrix components [29]. Employing iPSCs in conjunction with developmental principles enables researchers to explore the interplay between genetic and environmental factors in determining cell fate, contributing to a deeper understanding of human and animal development.

The genetic behavior of iPSCs exhibits variability under different experimental conditions, influencing the metabolic triggers and impacting nucleus dynamics, specifically in gene expression [30]. Gene expression patterns, fundamental to developmental biology, govern the processes that regulate growth, differentiation, and morphogenesis in organisms. Studying these patterns sheds light on how genes are activated or repressed during development, guiding cells to acquire distinct identities and functions [31,32]. By simultaneously examining the expression of numerous genes, researchers can identify patterns underlying cellular differentiation and tissue development. These patterns are shaped by specific combinations of transcription factors and the varied accumulation of gene products in cell subsets during development [33–36]. Understanding the gene expression patterns is essential for deciphering the intricate regulatory networks controlling the formation of functional cell types and the three-dimensional structure of tissues and organs [37,38].

Studying gene expression patterns is particularly pertinent to the subject of iPSCs. It allows researchers to track the activation and repression of specific genes during the reprogramming of adult cells into pluripotent stem cells and their subsequent differentiation into various cell lineages [39]. This understanding is essential for optimizing reprogramming and differentiation protocols, as well as uncovering molecular similarities and distinctions between iPSCs and their embryonic counterparts. In this regard, reporter alleles are invaluable tools, allowing the visualization of these dynamic processes and enhancing our comprehension of how different stimuli influence cell fate and behavior *in vitro*. Furthermore, reporter-gene-based molecular imaging offers a powerful approach to studying the physiology and fate of iPSC-derived cells *in vivo*, providing deeper insights into their functional roles in real time. Also referred to as reporter genes, these genes encode detectable products not endogenously expressed in the organism or cell type [40]. Serganova and Blasberg [41] describe the following two main types of reporter genes: constitutively expressed reporters, which provide continuous signals for long-term cell tracking, and inducible reporters, which activate in response to specific signals, allowing a detailed study of particular tissues or pathways. This work also discusses the evolution of these systems, including the use of fluorescent-, bioluminescent-, and radionuclide-based reporters, while acknowledging ongoing challenges in the field. Incorporated into DNA constructs, reporter allele products serve as visual indicators for the precise localization of specific proteins, cell types, or biological circuits [42,43].

Widely used reporter genes, such as green fluorescent protein (GFP) and luciferase, offer visual and quantifiable cues [44], providing insights into the spatial and temporal

patterns of gene activity. Reporter alleles play an essential role in monitoring pluripotency and differentiation, allowing the assessment of pluripotency and tracking iPSC differentiation into specific cell lineages by observing key markers like OSKM [45]. Integration into specific genomic loci enables the tracking of genomic stability and assessment of iPSC genome integrity [46], contributing to quality control and characterization by evaluating specificity, purity, and differentiation potential. Furthermore, reporter alleles within iPSCs function as valuable instruments for investigating regulatory mechanisms and developmental processes involved in the differentiation of tissues and organs. The incorporation of reporter genes into the target organism or cell type involves cellular and molecular biology techniques, such as transfection with cationic lipids, electroporation, or viral transduction [47]. The subsequent surveillance of fluorescent reporter gene expression employs a diverse array of methodologies, including fluorescence/confocal microscopy, luminescence assays, and flow cytometry (Figure 2). Additionally, diverse induction protocols can be applied to monitor lineage specification from iPSCs, aiming to achieve multiple objectives and tracking numerous markers relevant to the differentiation process.

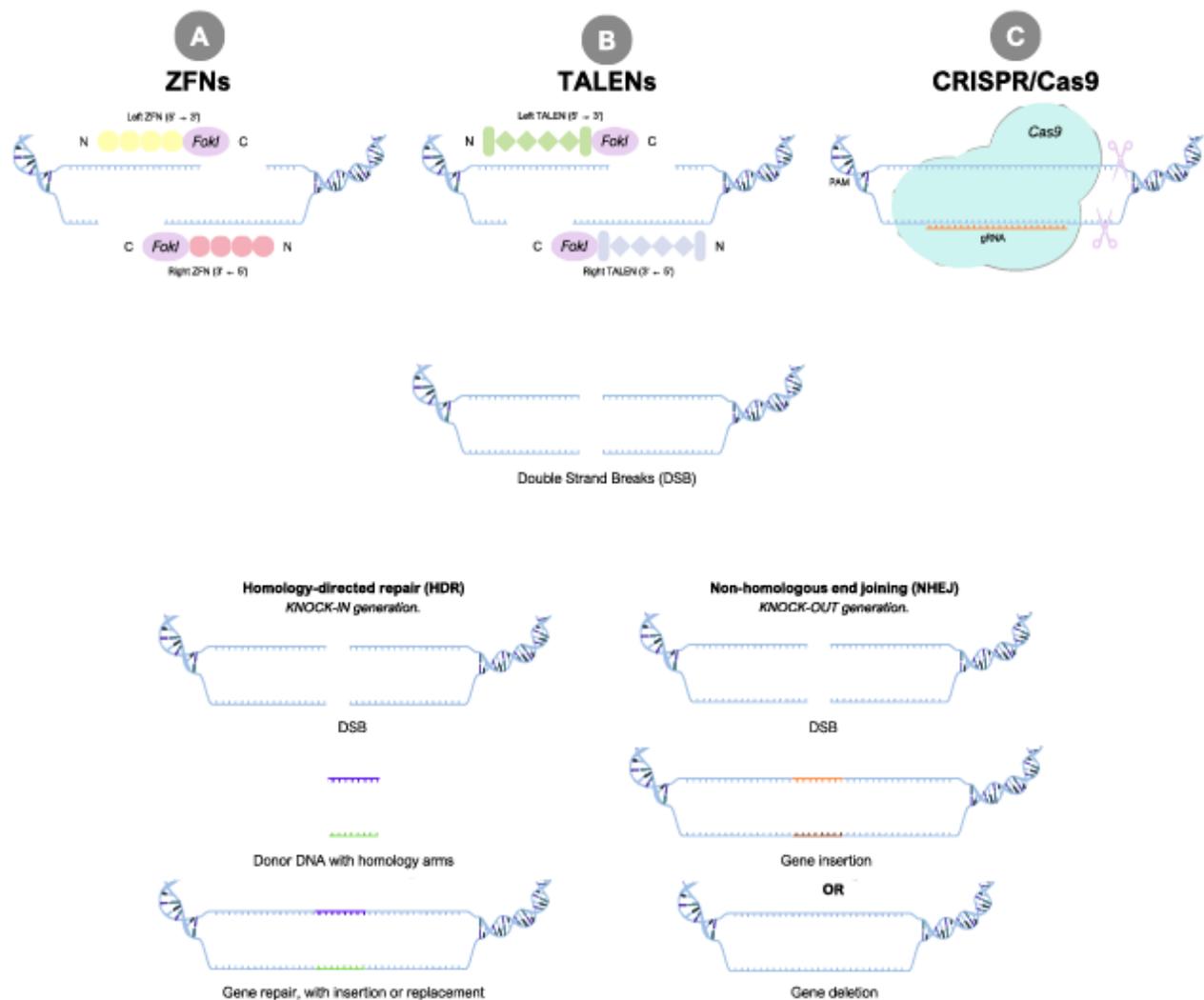


**Figure 2.** Summary of the application of fluorescent reporter alleles for the detection of specific genes (markers) using cellular imaging techniques.

Against this background, this review will highlight key methodologies for creating hiPSC lines carrying reporter alleles and explore their primary applications in developmental biology and disease development comprehension, presenting studies and potential advancements in these research areas.

## 2. Strategies for Introducing Reporter Alleles in hiPSCs

Gene editing has revolutionized the ability to precisely modify the genetic information within cells [48]. It involves the targeted addition, deletion, or modification of DNA sequences, enabling researchers to study gene functions, model diseases, and potentially develop therapeutic interventions [49]. One particularly impactful application of gene editing is the generation of cells carrying reporter genes [50], the core of our interests. This process involves integrating reporter genes—which are determined by the researcher’s direction in accordance with their objectives—into the cellular genome, providing a powerful tool for studying promoter-driven transcriptional activity, cellular responses, and various biological phenomena [51]. Several gene-editing methodologies can be applied to generate reporter cell lines, with a predominant reliance on homologous recombination (HR), a type of homology-directed repair (HDR). The double-strand DNA break (DSB), induced by an exogenous nuclease, immediately triggers the cell to activate a DNA repair pathway, such as non-homologous end joining (NHEJ) or HDR (Figure 3).



**Figure 3.** Overview of the three major gene-editing platforms. ZFNs, TALENs, and CRISPR/Cas9 rely on the HDR pathway.

The selection between NHEJ and HDR is largely influenced by DNA end resection, a nucleolytic process in which DSB ends are converted into 3' single-stranded DNA (ssDNA) overhangs. Resected DNA ends can undergo processing by fill-in or endonucleolytic cleavage, resulting in blunt ends compatible with NHEJ. These post-resection steps may introduce errors during NHEJ, such as deletions or insertions (INDELS) of ssDNA overhang fragments, which facilitate the generation of specific knock-out cell lines. Unlike NHEJ, which simply rejoins the cleaved DNA ends, the HDR pathway requires the presence of an identical or highly similar template—a fully intact sequence—to accurately repair the damaged DNA [52]. The possibility to introduce an exogenous sequence as a template (donor DNA) for use in HDR represents the key element of gene editing via the HR pathway, which is extensively explored in gene targeting. Therefore, HR plays a central role in numerous gene-editing strategies aimed at creating cells with reporter genes, utilizing the cell's intrinsic DNA repair mechanisms to achieve precise insertion or substitution of DNA sequences at specific genomic locations [47,53]. Researchers can introduce a reporter gene by delivering a DNA template with sequences homologous to the regions flanking the DNA cleavage site, enabling the HR pathway to integrate the gene of interest into a designated genomic site [51,52,54]. This approach ensures stable reporter gene expression driven by the native regulatory elements at the intended genomic locus.

HR also enables the insertion of a reporter gene cassette flanked by positive and negative selection markers. Upon introducing this cassette into cells, researchers typically apply antibiotic selection pressure, thereby ensuring the survival of cells that have successfully incorporated the cassette [55]. This efficient selection process aids in identifying cells carrying the desired reporter gene construct. Some studies opt to forgo antibiotic enrichment selection, instead employing alternative methods such as fluorescence-based or immunomagnetic selection [56,57]. Moreover, HR can be employed to create cell lines with reporter gene expression responsive to external stimuli. The precision of HR in the targeted insertion or replacement of DNA sequences minimizes unintended mutations and ensures controlled reporter gene expression. It results in stable integration into the genome, providing reliable, long-term expression suitable for the study of chronic processes [58]. The versatility of HR allows for its adaptation to various reporter gene integration strategies and selection methods, offering flexibility for diverse experimental designs.

### 2.1. Major Features of Gene-Editing Techniques

Zinc-Finger Nucleases (ZFNs), Transcription Activator-Like Endonucleases (TALENs), and Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR) represent three successive generations of nuclease-based genome-editing technologies that are applied to engineer cells with reporter alleles (Figure 3). Notably, all these methods are effective gene-editing tools for introducing reporter genes into iPSCs. ZFNs and TALENs create DSB at a specific site in the genome by using a DNA-binding domain fused to a nuclease domain. In contrast, CRISPR/Cas9 uses a guide RNA to direct a Cas9 nuclease cut on the target site [59].

Over the past 20 years, ZFNs have become crucial for genome editing by targeting specific sequences and inducing DNA breaks, which allow for precise modifications during the repair process [60]. They are composed of two primary functional domains: a customizable array of zinc finger proteins (ZFPs) that confer sequence specificity, and a non-specific cleavage domain derived from the FokI restriction enzyme (Figure 3A). Each zinc finger typically recognizes three nucleotides, allowing for the design of ZFNs that can target specific genomic sequences with high precision. Upon binding to their target DNA, ZFNs dimerize, which activates the FokI domain to cleave the DNA at the desired locus [61]. This technology has been applied across various model systems, including human cells and other organisms, facilitating accurate genomic alterations. ZFNs have revolutionized genetic engineering by offering high specificity and minimal toxicity. They are one of the earliest chimeric restriction endonucleases used for targeted genome engineering [62]. They

continue to be developed and diversified, making them adaptable for various research purposes and potential therapeutic applications.

TALENs, the second generation, surpass ZFNs in terms of efficiency and specificity, requiring less intricate design and validation [63]. They demonstrate applicability in diverse scenarios, such as gene targeting, functional genomics, and disease modeling [64–66]. TALENs are chimeric proteins that contain two functional domains: a DNA-recognition transcription activator-like effector (TAL effector) and a nuclease domain [67] (Figure 3B). They enable targeted genome cleavage, followed by gene modification during subsequent repair. TALENs were the first easy-to-use genome-editing technology and have been used in multiple species, bringing targeted genome editing to the forefront of research [68].

CRISPR/Cas9, the third-generation nuclease genome-editing tool, is widely recognized for its versatility. The system consists of two main components: the Cas9 enzyme, which acts as “molecular scissors” to cut DNA at a location specified by a guide RNA, and the guide RNA (gRNA), which binds to Cas9 and specifies the target location for DNA cleavage (Figure 3C). This technology, adapted from a naturally occurring bacterial defense system, has garnered excitement due to its cost-effectiveness, accuracy, and efficiency compared to other genome-editing methods. The high efficiency of genome editing with the CRISPR/Cas9 system makes it possible to edit multiple targets in parallel, offering an advantageous tool for a wide range of applications in human research and gene therapy [68]. However, a potential downside of the use of CRISPR/Cas9 relates to the off-target effects, a concern less pronounced with ZFNs and TALENs, which exhibit higher specificity [69]. This issue is mainly caused by the wild-type Cas9 protein properties: Cas9 has 1368 amino acids and recognizes a relatively common NGG protospacer adjacent motif (PAM), functions optimally with 20 nt spacers, and supports relatively high levels of off-target editing [70,71]. To address these limitations, researchers have developed various Cas9 variants, each with unique characteristics. Engineered variants of Cas9, such as eSpCas9, HypaCas9, and high-fidelity Cas9, have been developed to enhance specificity and reduce the off-target effects. These modifications address the challenges associated with the standard CRISPR/Cas9 system by improving fidelity without compromising cleavage activity [70,72]. For example, dead Cas9 (dCas9), a completely inactive form, has been engineered for greater precision in the context of gene targeting, silencing, and activation, while overexpressing these variants or using lower doses of Cas9 can further improve specificity [73]. Additionally, Deep SpCas9 variants and tagmentation-based tag integration site sequencing (TTISS) methods are used to assess specificity and activity, aiding in the selection of appropriate Cas9 variants for specific sequences. Other Cas9 proteins, like SaCas9, have also been engineered to offer high fidelity and a broad PAM range, minimizing the off-target effects while maintaining efficient cleavage activity [71,74]. Notably, following the gene editing of a cell population, isolation of clones is required to separate non-edited and different types of edited cells. Consequently, single-cell cloning of iPSCs can effectively address the potential low efficiency in the genome-editing procedure and also assist in identifying clones that have the intended on-target edits without any off-target mutations.

Prime editing is a revolutionary genome-editing technology that enables precise modifications without double-strand breaks or donor DNA, thereby overcoming significant limitations of the traditional CRISPR methods [75]. This platform utilizes a catalytically impaired Cas9 protein fused to reverse transcriptase (prime editor complex—PE2), guided by prime editing guide RNA (pegRNA), which facilitates the direct insertion of genetic information without the need for a donor DNA [76]. Its “search-and-replace” mechanism allows for a variety of genetic changes, making it ideal for creating reporter cell lines to monitor gene expression [77]. Recent studies highlight prime editing effectiveness in generating human reporter cell lines, particularly in challenging primary cells and specialized lines [78]. Optimized systems, like PE4 and PE5, improve editing precision and reduce byproducts [79]. Additionally, integrating reporter systems into prime editing

protocols enables the real-time monitoring of editing efficiency, essential for successful reporter line generation [80].

## 2.2. Gene-Editing Strategies in iPSCs

Since Yamanaka and colleagues first described iPSCs in 2006, various strategies have been developed for gene editing in these cells. ZFNs were used for targeted genetic editing, allowing researchers to introduce specific mutations, repair disease-associated mutations, and generate isogenic cell lines with reporter genes. For example, Pei and colleagues [81] demonstrated the effectiveness of ZFNs in achieving precise gene targeting, which enabled the creation of GFP and luciferase reporter lines in hiPSCs. Specifically designed and refined ZFN pairs were employed to target the C-terminal regions of the *GFAP* gene, an intermediate filament present in neural cells, and the *MAP2* gene, a microtubule-associated protein. In parallel, a donor vector was devised, incorporating a reporter cassette featuring a P2A peptide, a luciferase (*Nanoluc*) gene fused with a HaloTag, and a neomycin resistance gene. The positioning of this cassette was meticulously aligned with the C-terminal regions of the *GFAP* or *MAP2* genes to create lineage-specific reporters in iPSC.

On the other side, TALENs have emerged as crucial players in the development of reporter-gene-iPSC lines. The utilization of TALEN-mediated gene targeting has notably heightened the expression of transgenes and facilitated the one-step creation of dual reporter hiPSC and neural stem cell (NSC) lines, underscoring the high efficiency of TALEN-mediated HDR in generating targeted mini-gene transfer or reporter knock-in cell lines [82]. This technology stands out for its effectiveness in achieving the efficient and precise integration of reporter genes at specific loci, including the *AAVS1* and *Citrate Lyase Beta-Like (CLYBL)* safe-harbor locus. Kuhn and colleagues (2017), in their study, describe the use of TALENs to integrate a codon-optimized *CSF2RA* transgene into the *AAVS1* locus in hereditary pulmonary alveolar proteinosis (herPAP) patient-derived iPSCs. Mutations in the *CSF2RA* gene are known to impair surfactant clearance, potentially leading to the accumulation of surfactants in the alveoli, a hallmark of herPAP. The efficacy of TALEN-mediated gene editing in achieving precise knock-in modifications without compromising the differentiation potential of iPSCs was demonstrated, thereby advancing potential gene therapy applications [83]. A key advantage of TALENs and CRISPR/Cas9 is their ability to perform multiple gene edits in a single experiment, which is particularly beneficial for gene therapy applications requiring the correction of multiple mutations or the introduction of therapeutic transgenes [84]. Additionally, TALENs have played a role in generating integration-free iPSCs with reporter genes, expanding the utility of hiPSCs for disease modeling, drug testing, and the exploration of cellular differentiation [83].

The specificity and efficiency demonstrated by TALENs in mediating gene targeting render them invaluable tools for the precise and reliable creation of reporter gene iPSC lines, thereby contributing significantly to advancements in emulating various health conditions and enhancing our understanding of human and animal development [82]. However, despite their substantial contributions, the use of TALENs for generating reporter gene iPSC lines presents certain potential limitations and challenges. Firstly, TALENs, like many gene-editing techniques, carry the risk of off-target effects, resulting in unintended modifications at genomic locations similar to the target site [85,86]. This introduces inaccuracies and the possibility of unintended consequences. Efficient delivery of TALEN systems to target cells presents another challenge, with varying existing methods and certain cell types or tissues proving more resistant to successful delivery. The large size of TALENs further complicates their packaging into viral vectors for delivery, affecting the overall efficiency [87]. Limitations in the targeting range of TALENs also exist, with some genomic regions proving more challenging to access or modify compared to other gene-editing tools [88]. Achieving efficient integration of donor DNA into the target site is also a challenge, relying on the simultaneous delivery of both TALEN proteins and donor DNA into cells [89,90]. Despite these challenges, TALENs remain a valuable tool for generating reporter gene iPSC lines,

and ongoing advancements in TALEN-mediated gene editing continue to enhance the efficiency and precision of this technique.

The revolutionary CRISPR/Cas9 gene-editing tool has transformed the landscape of genetic manipulation. In the realm of reporter genes, researchers utilize guide RNAs (gRNAs) to direct the Cas9 endonuclease to specific genomic locations, and it triggers DNA repair mechanisms, creating an opportunity for the integration of reporter gene sequences [91]. However, this technology also presents off-target cuts, similar to the other technologies discussed. In the context of the wild-type Cas9 approach, ZFNs and TALENs offer higher specificity, although they require more complex design and optimizations [84].

The focused nature of this approach enables controlled placement of the reporter, optimizing both its expression and function [92]. The amalgamation of CRISPR/Cas9 technology with iPSCs further amplifies their potential, facilitating the introduction of valuable reporter genes. This synergy, exemplified by CRISPR/Cas9 iPSC reporter lines, is rapidly advancing fields, from genetic disorders to regenerative medicine and cell therapies [23,24,93]. CRISPR/Cas9 technology offers significant advantages in the development of iPSC reporter lines over conventional methods. Its targeted integration minimizes off-target effects, ensuring the precise expression of the reporter genes at the desired genomic locations. The inherent versatility of the CRISPR/Cas9 platform allows for the incorporation of various reporter genes and combinations, enabling researchers to customize iPSC lines for specific research questions. Additionally, the inclusion of selection markers alongside the reporter gene streamlines the identification and isolation of successfully edited iPSCs [94].

The practical application of CRISPR/Cas9 in generating reporter iPSC lines is exemplified by various studies with human and animal approaches. For instance, researchers have utilized CRISPR/Cas9 to create a tyrosine hydroxylase (TH) reporter hiPSC line for live imaging and isolation of dopaminergic neurons for the study of Parkinson disease. The TH-GFP iPSC line was generated by introducing a GFP reporter gene into the TH locus using CRISPR/Cas9-mediated HDR. After the induction of differentiation, researchers confirmed that GFP expression faithfully mimicked endogenous TH expression in iPSC-derived dopaminergic neurons. Calcium-imaging techniques were employed to determine the intrinsic functional differences between TH-GFP-positive and TH-GFP-negative cells. The brightness of GFP allowed direct visualization of TH-expressing cells in heterogeneous cultures and enabled the researchers to isolate live GFP-positive cells through fluorescence-activated cell sorting (FACS) for further applications [95]. An excellent example of the indirect application of reporter alleles and CRISPR-Cas9 editing is the study published by Patria et al. (2020). Using a hiPSC line with the tdTomato fluorescent protein fused to the SOX9 gene, the researchers induced heterozygous mutations at the TRPV4 locus. The TRPV4 gene is responsible for upregulating the expression of SOX9 during cartilage development. Therefore, in this study, mutant iPSC lines became a valuable tool for creating an in vitro model of human chondrodysplasia [96]. The CRISPR/Cas9 system has also been employed to generate *ATP1a1* reporter iPSC lines, enhancing genome-editing efficiency and enabling the study of cellular osmolarity maintenance. Liu and colleagues' approach involved the use of a one-step co-targeting strategy with a longer dsDNA repair template, which was found to shorten the period of the selection process and increase both HDR and INDEL rates. The Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> channel, encoded by the *ATP1A1* gene, is critical for maintaining cell osmolarity, and the disruption of its ion-exchange ability can result in various cellular dysfunctions. The study demonstrated that by co-targeting *ATP1A1* with a second locus of interest, INDEL and HDR selection efficiency was improved in two different iPSC lines [97].

Despite its transformative potential, using CRISPR/Cas9 to create iPSC reporter lines poses challenges. Concerns about off-target effects persist, necessitating thorough validation post editing. The efficiency of the technology depends on optimizing the guide RNA (gRNA) design and delivery methods [91,92]. As CRISPR/Cas9 technology continues to evolve, the potential of iPSC reporter lines will expand further. The integration of

artificial intelligence (AI) and machine learning algorithms is likely to optimize gRNA design and streamline the editing processes [98].

The use of prime editing technology has emerged as a transformative method that can be further applied to generate iPSCs with reporter alleles, enabling precise genomic modifications without double-strand breaks, unlike traditional CRISPR/Cas9 techniques. This method enhances editing precision and reduces the frequency of undesired insertions and deletions, making it suitable for pluripotent stem cells [99]; however, the effectiveness remains lower. Recent studies have highlighted the effectiveness of prime editing in creating specific reporter alleles in hPSCs. Wu et al. [17] showed a robust all-in-one prime editing system in human ESC, in which *tdTomato* gene expression reported the efficient creation of both monoallelic and biallelic disease-relevant mutations. The simultaneous introduction of pegRNA and nicking sgRNA further facilitated precise genome editing, enabling the generation of isogenic hiPSC lines. Additionally, Habib et al. [100] constructed a drug-inducible, PE2-expressing hESC line and addressed prime editing for correcting a disease-related mutation in iPSCs derived from a patient with  $\alpha$  1-antitrypsin (A1AT) deficiency. Chen et al. [79] identified cellular factors that enhance editing efficiency by manipulating DNA mismatch repair pathways, suggesting that optimizing these mechanisms could improve reporter allele generation.

### 2.3. Strategies to Favor HDR-Based Edits and Gene Targeting

Despite the great potential of gene targeting in iPSC technology, its use is still limited due to the low frequency of HDR in somatic cells. This low frequency can be attributed to the dominance of NHEJ-mediated DNA repair, as this mechanism takes place in all cell-cycle phases. To optimize HDR efficiency and inhibit NHEJ in iPSCs, some strategies have been proposed. One of the primary approaches involves the use of small molecules that can modulate the cellular repair pathways. Liu et al. [101] discuss various methodologies to improve HDR, highlighting the role of inhibitors that specifically target NHEJ components. For instance, the use of small molecule inhibitors, such as M3814, which target the DNA-PKcs protein involved in NHEJ, has been shown to significantly increase HDR rates in iPSCs by reducing the competition from NHEJ [102]. Additionally, the inclusion of histone deacetylase inhibitors, such as trichostatin A (TSA), can further enhance HDR by promoting a more favorable chromatin environment for repair [101]. Studies indicate that p53, a well-known tumor suppressor, negatively regulates HDR by inducing cell-cycle arrest and apoptosis in response to DNA damage [103]. By temporarily inhibiting p53, researchers have observed an increase in HDR efficiency in iPSCs, allowing for more successful gene-editing outcomes [103]. This strategy must be carefully controlled to avoid long-term genomic instability, but it presents a viable method for enhancing HDR during critical editing phases.

Moreover, the availability of the donor template and the precise timing of its delivery in relation to Cas9 activity are critical for optimizing HDR. Fu et al. [102] emphasize that synchronizing the introduction of donor templates with the S/G2 phases of the cell cycle, when HDR is most active, can significantly improve editing outcomes. This synchronization can be achieved through various methods, including the use of cell cycle inhibitors that can temporarily halt cells in the desired phase, thereby increasing the likelihood of HDR over NHEJ. The design of donor templates also plays a pivotal role in HDR efficiency. Utilizing longer homology arms in donor templates has been shown to enhance the likelihood of successful integration during HDR [101]. Additionally, the incorporation of specific molecules that can favor the recruitment of repair proteins to the site of the double-strand break can further improve HDR outcomes [52].

Improving the delivery of CRISPR/Cas9 components is also relevant for maximizing genome-editing efficiency. Viral vectors, particularly adeno-associated viruses (AAVs), have been extensively studied for their ability to deliver donor templates efficiently. Martin et al. demonstrated that AAV6-mediated delivery of donor templates in conjunction with CRISPR/Cas9 ribonucleoprotein (RNP) complexes led to high rates of homologous

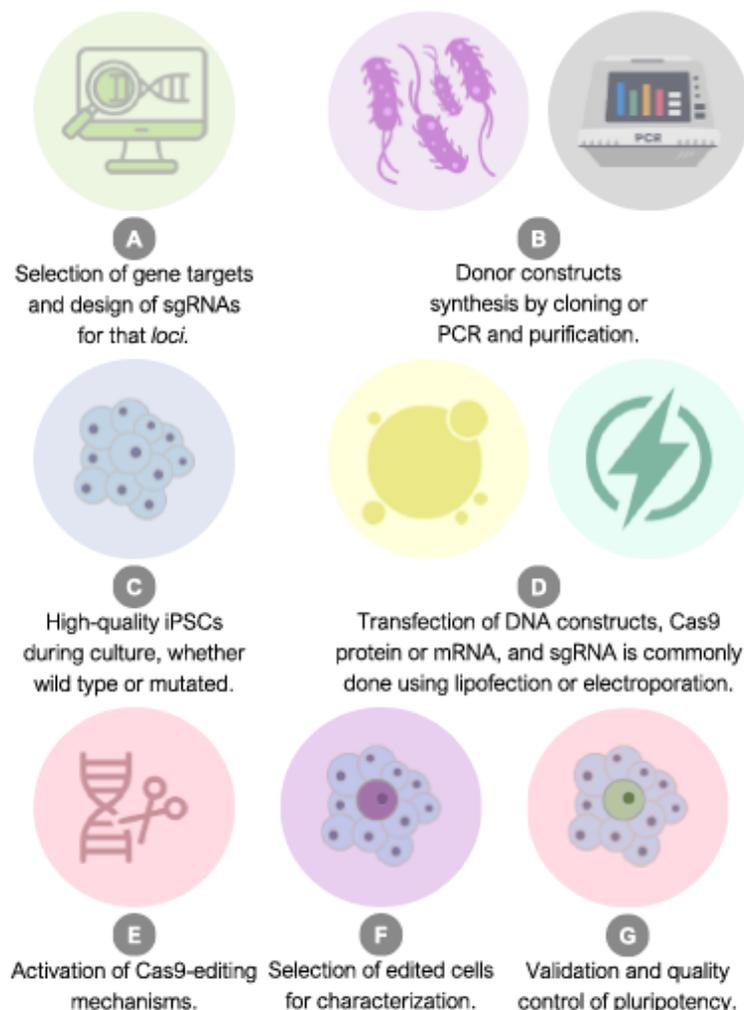
recombination in human pluripotent stem cells [104]. This method capitalizes on the natural ability of AAVs to transduce a wide range of cell types, including hiPSCs, thus facilitating the introduction of donor DNA necessary for HR. However, the reliance on viral vectors raises safety concerns, such as potential insertional mutagenesis and immune responses [105]. Liu et al. [106] highlight that the negative charge of CRISPR components can hinder their cellular uptake due to electrostatic repulsion from the negatively charged cell membrane. To overcome this barrier, various non-viral delivery systems have been developed, including cationic liposomes and nanoparticles that can encapsulate CRISPR components and facilitate their entry into cells [107]. Recent advances in lipid nanoparticles (LNPs) have shown promise in enhancing the delivery of CRISPR/Cas9 systems. These LNPs can be engineered to improve endosomal escape, thereby ensuring that the CRISPR components reach the cytosol, where they can exert their editing effects [108]. Furthermore, the use of extracellular vesicles (EVs) as delivery vehicles has gained attention due to their biocompatibility and ability to target specific cell types [109]. Although still poorly explored in hiPSCs, these novel gene delivery approaches hold significant potential for optimizing the generation of reporter lines and enhancing their application.

Recent studies have shown that delivering CRISPR/Cas9 via electroporation using RNP complexes is highly efficient in iPSCs. Electroporation, a non-viral method, improves the uptake of CRISPR components, leading to better gene-editing outcomes compared to plasmid transfection or viral vectors. RNP complexes, being transient, reduce off-target effects and increase specificity. Ruan et al. [110] found that electroporation of Cas9 RNPs resulted in significantly higher INDEL rates—27.13% in wild-type and 88.78% in patient-derived hiPSCs—while Xu et al. [111] reported efficient, low-toxicity editing using this method. Moreover, the efficiency of electroporation in delivering CRISPR components has been corroborated by studies focusing on various cell types. For instance, Smirnikhina et al. noted that the HDR efficiency in iPSCs was lower compared to other cell types when using plasmid delivery, but RNPs showed improved outcomes in terms of gene-editing precision [112]. This suggests that while electroporation is effective, the choice of the delivery method and the form of the CRISPR components—RNPs versus plasmids—can significantly influence editing efficiency. Despite the advantages, challenges remain in optimizing electroporation parameters to maximize gene-editing efficiency. For example, while electroporation has been shown to be more efficient than lentiviral transduction in other contexts [113], the specific conditions required for iPSCs can vary. Additionally, the transient expression of RNPs necessitates careful optimization of electroporation settings to ensure that a sufficient amount of the editing machinery is delivered without compromising cell viability [114].

#### 2.4. Experimental Workflow to Generate iPSC Reporter Lines

To illustrate an experimental workflow for generating iPSCs with reporter alleles using CRISPR-Cas9, we can draw upon the following hypothetical scenario based on the specific literature: First, researchers begin by designing CRISPR-Cas9 constructs targeting specific loci in the genome where the reporter alleles will be integrated (Figure 4A). This design process involves selecting appropriate guide RNAs (gRNAs) that will guide the Cas9 nuclease to the desired genomic sites [115]. The iPSCs are cultured under optimal conditions to maintain their pluripotency (Figure 4C). The CRISPR-Cas9 constructs are then introduced into the iPSCs through delivery systems, such as lipofection, electroporation, or viral transduction [116], which must be standardized for each cell line applied. The CRISPR-Cas9 system is activated within the iPSCs, leading to the generation of double-strand breaks at the target genomic loci (Figure 4D). Concurrently, oligodeoxynucleotides containing the reporter alleles (donor DNA) are provided to facilitate HDR and the insertion of the desired genetic sequences [117]. Following genome editing, the iPSCs are subjected to selection processes to enrich the cells that have successfully integrated the reporter alleles (Figure 4F). This selection step may involve the use of antibiotic resistance genes or other selectable markers to identify and isolate the edited cells [118]. Edited iPSC colonies are then

validated to confirm the precise integration of the reporter alleles at the intended genomic sites. Various molecular biology techniques, such as PCR, sequencing, and fluorescence imaging, are employed to verify the presence and expression of the reporter genes [82]. To assess the functionality of the reporter alleles, the edited iPSCs can be differentiated into specific cell lineages, such as neurons or cardiomyocytes, using appropriate induction protocols. The expression of reporter genes can be monitored during the differentiation process to longitudinally evaluate their activity [119] (Figure 4G). Throughout the workflow, quality control measures are implemented to ensure the integrity and stability of the edited iPSC lines. Off-target effects of the CRISPR-Cas9 system can be assessed using cost-effective techniques, like mismatch cleavage assays, or robust sequencing methods, like WGS or GUIDE-seq, to detect unexpected, unwanted, or even adverse alterations to the genome [120]. Finally, the generated iPSC lines with reporter alleles are thoroughly characterized to assess their pluripotency maintenance, genetic stability, and reporter gene expression profiles. Zhong, Li, and Zhou's 2020 protocol provides comprehensive tips and detailed methods for generating high-quality reporter alleles in iPSCs using CRISPR/Cas9 [121].



**Figure 4.** Experimental workflow required for the generation of iPSCs harboring reporter alleles.

### 2.5. Presumable Physiological Impacts of Gene Editing Using iPSCs

In the context of gene transfection using hiPSCs, the goal is to avoid physiological alterations in pathways dependent on the selected gene. Transfection can induce cellular stress, and endonuclease-mediated genome cleavage may lead to apoptosis, making it crucial for researchers to understand these limitations. Strategies like optimizing transfection protocols and using high-fidelity endonucleases can help mitigate these effects. Continuous monitoring of the genetically modified cells is essential for assessing stability and functionality, with routine checks recommended every ten passages, including karyotyping and microarray analysis for chromosomal integrity and gene expression [122,123].

Pluripotency can be evaluated through assays such as teratoma formation, embryoid body induction, and immunofluorescence for pluripotency markers [124–126], with the teratoma assay being particularly significant for confirming the presence of all three germ layers [127,128]. However, challenges like off-target effects and maintaining pluripotency after editing persist. CRISPR/Cas9, while powerful, can introduce unintended mutations, raising concerns about genomic integrity [129]. Ongoing research aims to improve the specificity and efficiency of gene editing to enhance the therapeutic potential of iPSCs [130].

## 3. Unveiling Developmental Processes and Disease Mechanisms with Reporter Alleles

### 3.1. hiPSCs and Reporter Alleles in Developmental Biology

The pluripotent nature of iPSCs allows researchers to delve into the mechanisms underlying cell-fate determination and tissue formation, offering valuable insights into developmental principles and lineage commitment [131,132]. By examining the differentiation potential of iPSCs into various cell types, such as neurons, cardiomyocytes, and hepatocytes, scientists can unravel the intricate pathways involved in organogenesis and tissue regeneration [133,134], making it possible to generate complex multicellular structures that mimic aspects of organ development and function [135]. These iPSC-derived structures are called organoids and serve as valuable platforms for studying organogenesis and testing potential therapeutics in a more physiologically relevant context. This whole knowledge about the iPSC developmental dynamics not only enhances our understanding of normal development but also paves the way for regenerative therapies and personalized medicine [136]. In this matter, iPSC technology has advanced the generation of disease-specific models, allowing researchers to replicate developmental defects and investigate the pathophysiology of various disorders [137,138]. By deriving patient-specific iPSCs and differentiating them into relevant cell types, researchers can explore disease mechanisms, screen therapeutics, and develop personalized treatments [119,139]. Additionally, genome editing enables the introduction of specific mutations into normal iPSCs, with the unedited cells serving as isogenic controls. This “developmental mind” guaranteed by the nature of iPSCs has significantly improved our understanding of developmental abnormalities and opened new possibilities for the study of several human conditions [140].

Ashmore-Harris et al. [141] focused on the reporter-gene engineering of hiPSCs during the differentiation process to enable the tracking of hepatocyte-like cells (HLCs) *in vivo*. The key objective was to develop a method to make the hiPSC-derived HLCs traceable in living organisms. To achieve this, a lentivirus-based gene transfer technique that was reproducible during the differentiation of hiPSCs into HLCs was employed. This approach allowed for the introduction of dual-mode fluorescent and radionuclide reporter genes into the cells, enabling them to be tracked *in vitro* and *in vivo* after xenogeneic transplantation. The introduction of the reporter genes did not negatively impact the differentiation process or the maturation of the HLCs. This finding validates the feasibility of using reporter-gene engineering to track cells without compromising their functionality or characteristics. Moreover, the study provided a proof-of-principle for the tracking of hiPSC-derived HLCs in living organisms using single-photon emission computed tomography/computed tomography (SPECT/CT) imaging. The reporter gene imaging technique allowed for the non-invasive monitoring of the labeled cells throughout the body, offering critical information on the behavior and fate of the hiPSC-derived HLCs post-transplantation.

Blöchliger and colleagues [142] published a study on endoderm lineages in 2020. They generated a novel hiPSC line that expresses an *INSULIN-H2B-Cherry* reporter gene. By introducing the H2B-Cherry fluorescent gene under the control of the *INSULIN* promoter, the researchers developed a tool that provided real-time, non-invasive monitoring of insulin expression during the differentiation of iPSCs into insulin-producing cells. This capability offers a powerful means to investigate the mechanisms underlying human pancreatic  $\beta$  cell development and dysfunction. The *INSULIN-H2B-Cherry* reporter system not only allows for the visualization of insulin-positive cells but also facilitates their quantification and characterization, which is relevant for various applications in regenerative medicine and diabetes research, opening new possibilities for studying diabetes pathophysiology, drug screening, and cell replacement therapies.

While working on the mesoderm, Gao et al. [143] explored the application of CRISPR/Cas9 technology in creating a triple-fusion reporter gene system for imaging the dynamics and function of transplanted urinary iPSC-derived cardiomyocytes. Their research delved into the use of hiPSCs, derived from renal epithelial cells, as a source for generating cardiomyocytes, aiming to develop cardiac regenerative therapies. The study focused on the development and utilization of a cell line that stably expressed monomeric red fluorescent protein for fluorescence imaging, firefly luciferase for bioluminescence imaging (BLI), and herpes simplex virus thymidine kinase for positron emission tomography (PET) imaging, enabling comprehensive monitoring of the transplanted cardiomyocytes. Beyond that, Galdos et al. [144] reported a *TBX5/MYL2* lineage tracing reporter system to track the differentiation of hiPSCs toward left ventricular cardiomyocytes, particularly from the first heart field (FHF) progenitors. This reporter system allowed for the identification of FHF progenitors and their descendants, providing insights into the predominance of the FHF in the hiPSC differentiation towards cardiomyocytes. By utilizing *TBX5* and *MYL2* to drive the expression of different fluorescent reporters, the researchers were able to trace the lineage of cells originating from the FHF and monitor their differentiation into a specific cardiac cell type, the left ventricular cardiomyocytes. This iPSC lineage tracing system will facilitate significant advances in the study of chamber-specific cardiomyocytes in the context of congenital heart diseases and in the development of novel hiPSC differentiation protocols. In a related 2021 study by Jung et al. [145], a *Brachyury-mCherry* knock-in reporter system was generated in hiPSCs using CRISPR/Cas9 technology. *Brachyury*, a key transcription factor in mesoderm formation, plays a critical role in the differentiation of mesodermal lineages, including cardiac mesoderm. The introduction of the *Brachyury-mCherry* reporter gene into hiPSCs enabled the researchers to track mesodermal differentiation, providing a real-time tool for visualizing and assessing cell-type enrichment while also shedding light on the dynamics of mesoderm specification and differentiation from hiPSCs.

The following studies focus on the pre-gastrulation process in early embryonic development, specifically the formation of primordial germ cells (PGCs). This process involves cellular commitment within the epiblast [146]. Several research groups are investigating human gametogenesis using iPSCs, often utilizing an intermediate stage known as In-cipient Mesoderm-like Cells (iMeLCs) [147]. iMeLCs serve as a transitional phase in the differentiation of hiPSCs toward the germ cell lineage, preceding the formation of human primordial germ cell-like cells (hPGCLCs). hPGCLCs are more specialized cells that closely resemble primordial germ cells. In their 2021 study [148], Kojima et al. used a reporter hiPSC line engineered with *BLIMP1/PRDM1-2A-tdTomato* and *TEAP2C-2A-EGFP* alleles to examine the expression profiles of various cell types, including hiPSCs, iMeLCs, and hPGCLCs, in xenogeneic reconstituted ovaries. This reporter cell line, developed by Sasaki and colleagues [149], enabled the researchers to track and analyze the dynamics of these cells through different developmental stages and experimental conditions. The *BLIMP1* reporter allele facilitated the visualization of cells expressing *BLIMP1*, a crucial transcription factor in germ cell development. The inclusion of the *TEAP2C-2A-EGFP* allele, which likely marks a downstream target of *BLIMP1* signaling, provided a comprehensive view of cellular dynamics and lineage relationships during the differentiation of hiPSCs into

germ cell-like cells. This approach offered valuable insights into the molecular mechanisms governing this differentiation process.

The utilization of iPSCs carrying reporter alleles to track neuroectoderm lineages, which include the neural tube and the neural crest lineages, involves specific genes and markers indicative of ectodermal differentiation. Among these markers, NESTIN and PAX6 are frequently used to denote neuroectoderm differentiation [150]. In a significant advancement, Xu and colleagues [151] developed a human embryonic stem cell (hESC) model incorporating a *td-Tomato* reporter at the *PAX6* locus. This innovative approach allows researchers to visually track *PAX6* expression, a crucial step in understanding ectodermal development. Complementing this, Lee et al. [152] generated a *NESTIN-EGFP* reporter hiPSC line, known as KSCBi005-A-1, using the CRISPR/Cas9 technique. NESTIN is a marker strongly associated with neural progenitor cells and indicates early neural differentiation. The creation of the *NESTIN-EGFP* reporter hiPSC line enables real-time monitoring of hiPSCs as they differentiate into neural lineages. The expression of *EGFP*, driven by the *NESTIN* promoter, allows for the visualization of NESTIN-positive cells, facilitating the tracking of neural progenitor cells as they develop into neurons and glial cells. Further enhancing our understanding of neuroectoderm development, Yamashita et al. [153] established a *SOX10* knock-in reporter hiPSC line to visualize neural crest cell differentiation. *SOX10* is a critical transcription factor involved in the development of neural crest cells, which differentiate into various cell types in the peripheral nervous system, including neurons, glial cells, and melanocytes. By creating a knock-in reporter system using *SOX10*, researchers can track the expression of *SOX10* and observe the differentiation of iPSCs into neural crest cells. This model offers significant insights into the dynamics of neural crest cell specification and migration during embryonic development.

Recent research has made remarkable strides in understanding the surface ectoderm domain, particularly through the work of Inomata et al. [154], who explored the *LGR6* gene function. This gene is expressed in a variety of tissues and is crucial for multiple cellular processes. In the context of skin, *LGR6* is linked to hair follicle stem cells [155] and plays a role in bone remodeling and osteogenesis [156–158]. Inomata and colleagues [154] specifically investigated *LGR6* expression in nail stem-like cells derived from hiPSCs, finding that these cells expressed both *LGR6* mRNA and protein, along with other markers typical of nail stem cells. The *LGR6-GFP* hiPSCs were made to differentiate into limb organoids, and notably, approximately 10 to 30% of these organoids exhibited green fluorescence signals, with the proportion varying depending on the differentiation period. The immunofluorescent staining of the cryosectioned digit organoids revealed co-localization of the GFP and *LGR6* proteins. GFP-expressing cells were isolated using cell sorting techniques and subsequently formed spheres, which were injected subcutaneously into the shaved back skin of mice. Twenty days post-transplantation, researchers observed relatively hard lump tissue consisting of both host- and graft-derived cells. These chimeric regions included host-derived vascular endothelial cells and red blood cells. Immunohistochemical analysis further identified cells that were double-positive for human nuclear antigen and GFP, as well as regions that were positive for both KRT17 and KRT81, isotopes of human keratin, highlighting the intricate differentiation capabilities and interactions of *LGR6*-expressing cells in the development of surface ectodermal tissues.

### 3.2. hiPSCs, Gene Editing, and Reporter Alleles in Disease Modeling

hiPSCs created by reprogramming adult somatic cells into a pluripotent state provide a valuable platform for investigating the molecular mechanisms involved in disease progression [159]. The emergence of gene-editing tools like CRISPR/Cas9 has further amplified the potential of hiPSCs by enabling precise genetic modifications to establish disease models and develop cell-based therapies [160]. Researchers can introduce mutations or correct genetic defects in hiPSCs to investigate their effects on developmental pathways and disease phenotypes [161], offering unprecedented insights into the molecular mechanisms underlying human development and disease phenotypes [162].

The establishment of curated repositories of iPSCs associated with specific diseases, such as Alpha-1 Antitrypsin Deficiency, has been crucial in capturing the phenotypic diversity of patient populations and advancing research in disease pathogenesis [163]. The integration of multi-omics approaches in studying iPSC lines has significantly advanced our understanding of the mutational burden in these cells, enabling better selection of iPSC lines for disease modeling and transplantation therapy [164]. Additionally, gene-editing technologies have enabled the correction of disease-causing mutations in patient-derived iPSCs, offering a platform for generating isogenic control cellular models for studying diseases like osteopetrosis and Huntington's disease [165,166]. These advancements have been pivotal in the development of targeted therapies.

On top of this all, reporter allele technology, an application of gene-editing platforms previously discussed, enhances the utility of hiPSCs [167]. With reporter alleles, researchers can monitor the activation of developmental pathways and pinpoint crucial stages in cell lineage specification and differentiation. In disease models, these reporters offer insights into the impact of mutations or pathogenic conditions on cellular functions and the dynamics of gene expression. This method aids in identifying potential therapeutic targets and evaluating drug efficacy under controlled, reproducible conditions. Ultimately, the integration of reporter alleles in hiPSCs facilitates a seamless connection between fundamental research and clinical applications, enriching our comprehension of intricate biological processes and disease mechanisms. To illustrate this, we trace the evolution from the early days of gene targeting in hiPSCs to recent studies.

In 2009, Hockemeyer and colleagues published one of the pioneering studies on reporter alleles in human ESCs and iPSCs [168]. Their research focused on the ZFN-mediated gene targeting of two distinct genes in these cell types. One commonly used reporter in their study is GFP expression driven by the *OCT4* promoter, which marks undifferentiated pluripotent stem cells. This system has been utilized to monitor the maintenance of pluripotency during the culture and differentiation of human ESCs. Additionally, they generated reporter cell lines of human ESCs and iPSCs for *PITX3*, a gene activated during differentiation into dopaminergic neurons. This approach demonstrated that non-expressed genes could also be targeted, which is beneficial for leveraging the differentiation capabilities of pluripotent stem cells. Zou et al. [169] conducted a trailblazing study using a virus-free system to achieve ZFN-enhanced gene targeting of the endogenous *PIG-A* gene with GFP reporter gene in both human ESCs and iPSCs. The *PIG-A* gene is crucial for the retention of multiple glycosyl-phosphatidylinositol-anchored proteins (GPI-APs) on the cell surface and is mutated in hematopoietic stem cells from patients with the blood disorder paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH). The study successfully demonstrated the gene targeting of an endogenous gene in human PSCs, underscoring the potential of this technique in disease-specific hiPSCs for both research and clinical applications.

Over the years, while maintaining a focus on disease modeling, therapeutic interventions, and the potential applications of cell therapies, Calatayud et al. [95] utilized CRISPR/Cas9 technology to develop the tyrosine hydroxylase (TH) reporter hiPSC line. These cells express *mOrange* as a fluorescent marker inserted at the last exon of the *TH* gene, enabling live imaging and isolation of dopaminergic neurons crucial for studying Parkinson disease (PD) research and other neurodegenerative disorders. By deriving iPSCs from patient-specific cells and guiding them to become TH-positive dopaminergic neurons, the study replicated disease-relevant cell types in vitro, facilitating investigations into PD pathogenesis and screening potential therapies. Unlike previous methods that often yielded mixed neuronal cultures [170], this CRISPR/Cas9 approach produces a homogeneous population of TH-positive dopaminergic neurons. The *mOrange* reporter faithfully mirrors native *TH* expression, facilitating direct visualization and isolation of TH-expressing cells in mixed cultures. Additionally, the study employed calcium imaging to distinguish functional differences between the dopaminergic and non-dopaminergic neurons in the ventral midbrain, enhancing both live-imaging capabilities and the ability to purify specific cell populations using fluorescence-activated cell sorting for further molecular and functional analyses.

Another important goal is to generate early cardiomyocytes of specific regions of the heart. The study by Bizy et al. [171] explores the use of a human ventricular myosin light chain (*MYL2*) reporter construct created using homologous recombination to identify early ventricular cardiac myocytes derived from hiPSCs. They found that *MYL2* expression is a reliable marker for hiPSCs committed to the ventricular lineage, enabling the hiPSC-derived cardiac myocytes differentiation with an early ventricular phenotype. This finding is crucial for regenerative medicine as it offers a method to specifically isolate and identify early ventricular cardiac myocytes from hiPSCs. In the same vein, Chirikian and colleagues, in 2021, utilized the CRISPR/Cas9 system to introduce fluorescent reporters into hiPSCs, enabling the isolation of atrial- and ventricular-specific cardiomyocytes (CMs) [172]. This research addresses a key challenge in current differentiation protocols, which often yield heterogeneous cell populations predominantly composed of ventricular-like CMs. To overcome this, two chamber-specific reporter hiPSC lines were developed. In the *MYL2-tdTomato* reporter line, the red fluorescent *tdTomato* was inserted just upstream of the 3' untranslated region of the *MYL2* gene, effectively labeling ventricular-like CMs without interfering with the endogenous gene function. Similarly, the *SLN-CFP* reporter line integrated Cyan Fluorescent Protein (CFP) downstream of the coding region of the atrial-specific gene Sarcoplipin (*SLN*). These modifications allowed the researchers to simultaneously purify *tdTomato*- and *CFP*+ CMs derived from a single hiPSC line using flow cytometry. This advancement is significant for cardiac research, as it provides a precise method for isolating atrial- and ventricular-specific CMs from hiPSCs, which is essential for studying heart development and disease modeling, facilitating the precise isolation and characterization of specific cardiac cell types for therapeutic applications.

Table 1 provides a concise expansion of the topics covered in the preceding paragraphs, presenting key studies in disease modeling and understanding the foundations of critical developmental processes relevant to disease contexts.

**Table 1.** Key studies utilizing reporter alleles in hiPSCs for modeling development and phenotypes of various diseases.

Purpose	Reporter Allele	Platform Used	Reference
Temporal and partial inhibition of glioma-associated oncogene 1 exerts oligodendrocyte induction.	<i>OLIG2-GFP</i>	Homologous recombination	[173,174]
Detecting the reactivation of silenced <i>FMR1</i> in cells of patients with fragile X syndrome.	<i>FMR1-Nluc</i>	CRISPR/Cas9	[175]
Track the specification of trophoblast in early embryogenesis.	<i>CDX2-Venus</i>	TALENs	[176]
Modeling amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia by tracking stress granule dynamics in <i>P525L</i> mutated cells.	<i>FUS-GFP</i>	CRISPR/Cas9	[177]
Function of $\beta$ pancreatic cells and developing motor neurons.	<i>NKX6.1-GFP</i>	CRISPR/Cas9	[178]
Purification of smooth muscle cells for the study of muscle physiology and mechanics.	<i>ACTA2-GFP</i>	CRISPR/Cas9	[179]
Cartilage tissue engineering for regenerative therapies for joint injuries and diseases.	<i>COL2A1-GFP</i>	CRISPR/Cas9	[180,181]
Function of $\alpha$ pancreatic cells.	<i>ARX-CFP</i>	CRISPR/Cas9	[182]
Development of myogenic precursors of satellite cells.	<i>PAX7-Venus</i>	CRISPR/Cas9	[183]
Modelling human chondrodysplasias caused by mutations in <i>TRPV4</i> .	<i>SOX9-tdTomato</i>	CRISPR/Cas9	[96]
Study of liver fibrosis progression using hepatic stellate cells derived from hiPSCs.	<i>ACTA2-RFP</i>	CRISPR/Cas9	[184]
Track the cardiac differentiation process.	<i>NKX2-5-GFP</i>	TALENs	[185]
Modelling myriad disorders in patients with Down syndrome.	<i>AAVS1-GFP</i>	ZFNs	[186]
Purification of serotonin-productive neurons for the study of neuropsychiatric diseases.	<i>TPH2-GFP</i>	CRISPR/Cas9	[187]
Study and therapeutic application for skeletal muscle function.	<i>ACTA1-tdTomato</i>	CRISPR/Cas9	[188]
Target insulin influence on the differentiation process of endocrine pancreatic cells.	<i>INS-Cherry</i>	CRISPR/Cas9	[189]

Another significant application of the reporter alleles in hiPSCs merges concepts and insights from developmental biology and disease pathogenesis. This application focuses on the advanced study of drugs and the identification of novel therapeutics for patients. As we previously discussed, the utility of hiPSCs in drug screening is especially notable because they favor the formation of multicellular spheroids or organoids and can produce unlimited disease-specific cells from patient-derived samples, transforming traditional drug-development methods by enabling a personalized approach to assessing drug efficacy and toxicity [190]. hiPSCs have shown to be superior to hESCs and animal models in disease modeling, drug screening, and cell replacement therapy, highlighting their effectiveness in advancing pharmacological discovery [191]. For instance, the use of patient-specific hiPSCs for *ex vivo* modeling of cardiovascular disorders has proven their potential in cardiovascular regenerative medicine, demonstrating the versatility and effectiveness of hiPSC technology in therapeutic advancements [192]. This becomes evident when we consider the numerous studies focused on cardiovascular research, as discussed in previous paragraphs. However, significant gaps remain, and the number of studies utilizing reporter alleles for drug development, toxicity testing, and other areas is still limited. Most reports on iPSC-based compound screens utilize targeted screening approaches with a limited number of known or predicted disease modulators. This likely reflects the inherent challenges in generating disease-relevant cell types at high scale and purity for larger-scale screening efforts. Therefore, more research is necessary to fully harness the potential of hiPSC reporter lines and 3D cell culture in advancing pharmacological discovery and ensuring their effective application in these fields.

#### 4. Conclusions

The integration of reporter alleles into hiPSCs using several gene-editing technologies has revolutionized developmental biology, disease modeling, and pharmaceutical research. Precisely incorporating reporter genes into specific hiPSC loci enables continuous monitoring of cellular differentiation and fate, both *in vitro* and *in vivo* post transplantation. These reporter hiPSCs maintain essential pluripotent stem cell properties, facilitating detailed investigations into the developmental processes and the effects of genetic mutations on cellular behavior. Additionally, introducing reporter alleles into hiPSCs from patients with specific disease phenotypes allows dynamic tracking of genetic corrections using CRISPR/Cas9 or other platforms, ensuring precise mutation correction and simplifying the creation of isogenic controls for disease modeling. Notably, lineage-specific reporters in hiPSCs can play a key role in enriching or isolating differentiated cells, which is particularly important in preclinical *in vivo* studies. This ensures that no uncommitted cells remain in the cell pool, which could otherwise lead to tumor development after injection or transplantation. Standardized reporter hiPSC lines, rapidly generated and validated through several protocols discussed here, form a robust foundation for creating databases that catalog drug responses and mutation effects across various cell types with consistent genetic backgrounds. This advancement significantly enhances iPSC-based drug screening and discovery efforts.

In the future, ameliorated gene-editing techniques focused on creating reporter cell lines within hiPSCs are necessary for substantial advancements. Emerging technologies, like base editing, prime editing, and CRISPR-based multiplexing, promise to fill this gap and streamline the creation of sophisticated reporter systems. These systems not only monitor gene expression dynamics but also track cellular differentiation and response to external stimuli with unprecedented accuracy. Innovations in synthetic biology, including AI and machine learning, as well as the extrapolation of CRISPR systems and advanced delivery methods, are poised to expand the repertoire of available reporter cell lines, facilitating their application across diverse research and clinical settings. As these methodologies evolve, the future of reporter cell lines in hiPSCs appears increasingly promising, steadily driving breakthroughs in both fundamental biology and therapeutic development.

**Author Contributions:** Conceptualization, G.C.C. and S.M.d.S.N.L.; investigation, G.C.C.; resources, S.M.d.S.N.L. and G.M.J.C.; writing—original draft preparation, G.C.C.; writing—review and editing, G.C.C., R.C.T.d.S., G.M.J.C. and S.M.d.S.N.L.; visualization, G.C.C.; supervision, S.M.d.S.N.L.; project administration, S.M.d.S.N.L.; funding acquisition, S.M.d.S.N.L. and G.M.J.C. All authors have read and agreed to the published version of this manuscript.

**Funding:** This research was funded by CNPq (grant number 402945/2023-9), FAPEMIG (grant number APQ-02502-23), Rede Mineira de Inteligência Artificial na Reprodução (grant number RED-00135-22), and Rede Mineira de Nanomedicina Teranóstica (grant number RED-00079-22). The G.C.C. and R.C.T.S. scholarship was funded by CAPES and CNPq.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflicts of interest.

## References

- Zakrzewski, W.; Dobrzyński, M.; Szymonowicz, M.; Rybak, Z. Stem cells: Past, present, and future. *Stem Cell Res. Ther.* **2019**, *10*, 68. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Kolios, G.; Moodley, Y. Introduction to stem cells and regenerative medicine. *Respiration* **2013**, *85*, 3–10. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Singh, V.K.; Saini, A.; Kalsan, M.; Kumar, N.; Chandra, R. Describing the stem cell potency: The various methods of functional assessment and in silico diagnostics. *Front. Cell Dev. Biol.* **2016**, *4*, 134. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Kumar, D.; Talluri, T.R.; Selokar, N.L.; Hyder, I.; Kues, W.A. Perspectives of pluripotent stem cells in livestock. *World J. Stem Cells* **2021**, *13*, 1–29. [\[CrossRef\]](#)
- Takahashi, K.; Yamanaka, S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell* **2006**, *126*, 663–676. [\[CrossRef\]](#)
- Poetsch, M.S.; Strano, A.; Guan, K. Human Induced Pluripotent Stem Cells: From Cell Origin, Genomic Stability, and Epigenetic Memory to Translational Medicine. *Stem Cells* **2022**, *40*, 546–555. [\[CrossRef\]](#)
- Hokayem, J.E.; Cukier, H.N.; Dykxhoorn, D.M. Blood Derived Induced Pluripotent Stem Cells (iPSCs): Benefits, Challenges and the Road Ahead. *J. Alzheimers Dis. Parkinsonism* **2016**, *6*, 1000275. [\[CrossRef\]](#)
- Takahashi, K.; Yamanaka, S. A decade of transcription factor-mediated reprogramming to pluripotency. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2016**, *17*, 183–193. [\[CrossRef\]](#)
- Cevallos, R.R.; Edwards, Y.J.K.; Parant, J.M.; Yoder, B.K.; Hu, K. Human transcription factors responsive to initial reprogramming predominantly undergo legitimate reprogramming during fibroblast conversion to iPSCs. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 19710. [\[CrossRef\]](#)
- Swaidan, N.T.; Salloum-Afsar, S.; Palangi, F.; Errafii, K.; Soliman, N.H.; Aboughalia, A.T.; Wali, A.H.S.; Abdulla, S.A.; Emara, M.M. Identification of potential transcription factors that enhance human iPSC generation. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 21950. [\[CrossRef\]](#)
- Sohn, Y.D.; Han, J.W.; Yoon, Y.S. Generation of induced pluripotent stem cells from somatic cells. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* **2012**, *111*, 1–26. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Trusler, O.; Huang, Z.; Goodwin, J.; Laslett, A.L. Cell surface markers for the identification and study of human naive pluripotent stem cells. *Stem Cell Res.* **2018**, *26*, 36–43. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Courtot, A.M.; Magniez, A.; Oudrhiri, N.; Féraud, O.; Bacci, J.; Gobbo, E.; Proust, S.; Turhan, A.G.; Bennaceur-Griscelli, A. Morphological analysis of human induced pluripotent stem cells during induced differentiation and reverse programming. *BioRes Open Access* **2014**, *3*, 206–216. [\[CrossRef\]](#)
- Yu, J.; Vodyanik, M.A.; Smuga-Otto, K.; Antosiewicz-Bourget, J.; Frane, J.L.; Tian, S.; Nie, J.; Jonsdottir, G.A.; Ruotti, V.; Stewart, R.; et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* **2007**, *318*, 1917–1920. [\[CrossRef\]](#)
- Liang, G.; Zhang, Y. Embryonic stem cell and induced pluripotent stem cell: An epigenetic perspective. *Cell Res.* **2013**, *23*, 49–69. [\[CrossRef\]](#)
- Singh, V.K.; Kalsan, M.; Kumar, N.; Saini, A.; Chandra, R. Induced pluripotent stem cells: Applications in regenerative medicine, disease modeling, and drug discovery. *Front. Cell Dev. Biol.* **2015**, *3*, 2. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Wu, Y.; Zhong, A.; Sidharta, M.; Kim, T.W.; Ramirez, B.; Persily, B.; Studer, L.; Zhou, T. A Robust and Inducible Precise Genome Editing via an All-in-One Prime Editor in Human Pluripotent Stem Cells. *bioRxiv* **2024**. [\[CrossRef\]](#)
- Madrid, M.; Sumen, C.; Aivio, S.; Saklayen, N. Autologous Induced Pluripotent Stem Cell-Based Cell Therapies: Promise, Progress, and Challenges. *Curr. Pract.* **2021**, *1*, e88. [\[CrossRef\]](#)
- Okano, H.; Morimoto, S. iPSC-based disease modeling and drug discovery in cardinal neurodegenerative disorders. *Cell Stem Cell* **2022**, *29*, 189–208. [\[CrossRef\]](#)
- Penney, J.; Ralvenius, W.T.; Tsai, L.H. Modeling Alzheimer's disease with iPSC-derived brain cells. *Mol. Psychiatry* **2020**, *25*, 148–167. [\[CrossRef\]](#)
- Vazquez-Armendariz, A.I.; Tata, P.R. Recent advances in lung organoid development and applications in disease modeling. *J. Clin. Investig.* **2023**, *133*, e170500. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Lee, J.J.; Lin, C.Y.; Chen, H.C.; Hsieh, P.C.H.; Chiu, Y.W.; Chang, J.M. Opportunities and Challenges of Human iPSC Technology in Kidney Disease Research. *Biomedicines* **2022**, *10*, 3232. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Hnatuk, A.P.; Briganti, F.; Staudt, D.W.; Mercola, M. Human iPSC modeling of heart disease for drug development. *Cell Chem. Biol.* **2021**, *28*, 271–282. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

24. Doss, M.X.; Sachinidis, A. Current challenges of iPSC-based disease modeling and therapeutic implications. *Cells* **2019**, *8*, 403. [[CrossRef](#)]
25. Christensen, K.; Roudnicky, F.; Patsch, C.; Burcin, M. Requirements for using iPSC-based cell models for assay development in drug discovery. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **2018**, *163*, 207–220. [[CrossRef](#)]
26. Nelson, T.J.; Martinez-Fernandez, A.; Terzic, A. Induced pluripotent stem cells: Developmental biology to regenerative medicine. *Nat. Rev. Cardiol.* **2010**, *7*, 700–710. [[CrossRef](#)]
27. Gilbert, S.F. Developmental biology, the stem cell of biological disciplines. *PLoS Biol.* **2017**, *15*, e2003691. [[CrossRef](#)]
28. de Moræe, A.; Rando, T.A. Regulation of adult stem cell quiescence and its functions in the maintenance of tissue integrity. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2023**, *24*, 334–354. [[CrossRef](#)]
29. Zhu, Z.; Huangfu, D. Human pluripotent stem cells: An emerging model in developmental biology. *Development* **2013**, *140*, 705–717. [[CrossRef](#)]
30. Serrano, L.; Vazquez, B.N.; Tischfield, J. Chromatin structure, pluripotency and differentiation. *Exp. Biol. Med.* **2013**, *238*, 259–270. [[CrossRef](#)]
31. Peter, I.S.; Davidson, E.H. Implications of Developmental Gene Regulatory Networks Inside and Outside Developmental Biology. *Curr. Top. Dev. Biol.* **2016**, *117*, 237–251. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Bickmore, W.A.; Zaret, K.S. Altered states: How gene expression is changed during differentiation. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **2010**, *20*, 467–469. [[CrossRef](#)]
33. Ding, J.; Sharon, N.; Bar-Joseph, Z. Temporal modelling using single-cell transcriptomics. *Nat. Rev. Genet.* **2022**, *23*, 355–368. [[CrossRef](#)]
34. Hansberg, W. A critical analysis on the conception of “Pre-existent gene expression programs” for cell differentiation and development. *Differentiation* **2022**, *125*, 1–8. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Zhang, X.; Zhang, S.; Wang, T. How the mechanical microenvironment of stem cell growth affects their differentiation: A review. *Stem Cell Res. Ther.* **2022**, *13*, 1. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Godoy, P.; Schmidt-Heck, W.; Hellwig, B.; Nell, P.; Feuerborn, D.; Rahnenführer, J.; Kattler, K.; Walter, J.; Blüthgen, N.; Hengstler, J.G. Assessment of stem cell differentiation based on genome-wide expression profiles. *Philos. Trans. R. Soc. B* **2018**, *373*, 1750. [[CrossRef](#)]
37. Armingol, E.; Officer, A.; Harismendy, O.; Lewis, N.E. Deciphering cell–cell interactions and communication from gene expression. *Nat. Rev. Genet.* **2021**, *22*, 71–88. [[CrossRef](#)]
38. Goldman, J.A.; Poss, K.D. Gene regulatory programmes of tissue regeneration. *Nat. Rev. Genet.* **2020**, *21*, 511–525. [[CrossRef](#)]
39. Meir, Y.J.; Li, G. Somatic reprogramming—Above and beyond pluripotency. *Cells* **2021**, *10*, 1288. [[CrossRef](#)]
40. Lewis, J.C.; Feltus, A.; Ensor, C.M.; Ramanathan, S.; Daunert, S. Applications of reporter genes. *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 579A–585A. [[CrossRef](#)]
41. Serganova, I.; Blasberg, R.G. Molecular Imaging with Reporter Genes: Has Its Promise Been Delivered? *J. Nucl. Med.* **2019**, *60*, 1665–1681. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Youn, H.; Chung, J.K. Reporter gene imaging. *Am. J. Roentgenol.* **2013**, *201*, 2. [[CrossRef](#)]
43. Jurgielewicz, P.; Harmsen, S.; Wei, E.; Bachmann, M.H.; Ting, R.; Aras, O. New imaging probes to track cell fate: Reporter genes in stem cell research. *Cell Mol. Life Sci.* **2017**, *74*, 4455–4469. [[CrossRef](#)]
44. Wilson, T.; Hastings, J.W. Bioluminescence. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **1998**, *14*, 197–230. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Moauro, A.; Kruger, R.E.; O’hagan, D.; Ralston, A. Fluorescent Reporters Distinguish Stem Cell Colony Subtypes During Somatic Cell Reprogramming. *Cell. Reprogramming* **2022**, *24*, 353–362. [[CrossRef](#)]
46. Solari, C.; Echegaray, C.V.; Coentino, M.S.; Petrone, M.V.; Waisman, A.; Luzzani, C.; Francia, M.; Villodre, E.; Lenz, G.; Miriuka, S.; et al. Manganese superoxide dismutase gene expression is induced by Nanog and Oct4, essential pluripotent stem cells’ transcription factors. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0144336. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Fus-Kujawa, A.; Prus, P.; Bajdak-Rusinek, K.; Teper, P.; Gawron, K.; Kowalczyk, A.; Sieron, A.L. An Overview of Methods and Tools for Transfection of Eukaryotic Cells in vitro. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2021**, *9*, 701031. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Bak, R.O.; Gomez-Ospina, N.; Porteus, M.H. Gene Editing on Center Stage. *Trends Genet.* **2018**, *34*, 600–611. [[CrossRef](#)]
49. Li, G.; Li, X.; Zhuang, S.; Wang, L.; Zhu, Y.; Chen, Y.; Sun, W.; Wu, Z.; Zhou, Z.; Chen, J.; et al. Gene editing and its applications in biomedicine. *Sci. China Life Sci.* **2022**, *65*, 660–700. [[CrossRef](#)]
50. Joo, H.K.; Chung, J.K. Molecular-genetic imaging based on reporter gene expression. *J. Nucl. Med.* **2008**, *49* (Suppl. S6), 164S–179S. [[CrossRef](#)]
51. Li, S.; Chen, L.X.; Peng, X.H.; Wang, C.; Qin, B.Y.; Tan, D.; Han, C.X.; Yang, H.; Ren, X.N.; Liu, F.; et al. Overview of the reporter genes and reporter mouse models. *Anim. Models Exp. Med.* **2018**, *1*, 29–35. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Shams, F.; Bayat, H.; Mohammadian, O.; Mahboudi, S.; Vahidnezhad, H.; Soosanabadi, M.; Rahimpour, A. Advance trends in targeting homology-directed repair for accurate gene editing: An inclusive review of small molecules and modified CRISPR-Cas9 systems. *Biolmpacts* **2022**, *12*, 371–391. [[CrossRef](#)]
53. Lanigan, T.M.; Kopera, H.C.; Saunders, T.L. Principles of genetic engineering. *Genes* **2020**, *11*, 291. [[CrossRef](#)]
54. Li, X.; Heyer, W.D. Homologous recombination in DNA repair and DNA damage tolerance. *Cdl Res.* **2008**, *18*, 99–113. [[CrossRef](#)]
55. Mikkelsen, N.S.; Bak, R.O. Enrichment strategies to enhance genome editing. *J. Biomed. Sci.* **2023**, *30*, 1. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

56. Ramachandran, H.; Martins, S.; Kontarakis, Z.; Krutmann, J.; Rossi, A. Fast but not furious: A streamlined selection method for genome-edited cells. *Life Sci. Alliance* **2021**, *4*, 6. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Grav, L.M.; Lee, J.S.; Gerling, S.; Kallehauge, T.B.; Hansen, A.H.; Kol, S.; Lee, G.M.; Pedersen, L.E.; Kildegaard, H.F. One-step generation of triple knockout CHO cell lines using CRISPR/Cas9 and fluorescent enrichment. *Biotechnol. J.* **2015**, *10*, 1446–1456. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Porteus, M. Using homologous recombination to manipulate the genome of human somatic cells. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* **2007**, *24*, 195–212. [[CrossRef](#)]
59. Doroftei, B.; Ilie, O.; Puiu, M.; Ciobică, A.; Ilea, C. Mini-review regarding the applicability of genome editing techniques developed for studying infertility. *Diagnostics* **2021**, *11*, 246. [[CrossRef](#)]
60. Urnov, F.D.; Rebar, E.J.; Holmes, M.C.; Zhang, H.S.; Gregory, P.D. Genome editing with engineered zinc finger nucleases. *Nat. Rev. Genet.* **2010**, *11*, 636–646. [[CrossRef](#)]
61. Gaj, T.; Gersbach, C.A.; Barbas, C.F. ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-Based Methods for Genome Engineering. *Trends Biotechnol.* **2013**, *31*, 397–405. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Porteus, M.H.; Carroll, D. Gene targeting using zinc finger nucleases. *Nat. Biotechnol.* **2005**, *23*, 967–973. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Gupta, R.M.; Musunuru, K. Expanding the genetic editing tool kit: ZFNs, TALENs, and CRISPR-Cas9. *J. Clin. Investig.* **2014**, *124*, 4154–4161. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Liu, S.; Liu, X.; Lin, X.; Chen, H. Zinc Finger Proteins in the War on Gastric Cancer: Molecular Mechanism and Clinical Potential. *Cells* **2023**, *12*, 1314. [[CrossRef](#)]
65. Li, H.; Zou, J.; Yu, X.H.; Ou, X.; Tang, C.K. Zinc finger E-box binding homeobox 1 and atherosclerosis: New insights and therapeutic potential. *J. Cell. Physiol.* **2021**, *236*, 4216–4230. [[CrossRef](#)]
66. Hartwig, A. Zinc Finger Proteins as Potential Targets for Toxic Metal Ions: Differential Effects on Structure and Function. *Antioxid. Redox Signal.* **2001**, *3*, 625–634. [[CrossRef](#)]
67. Becker, S.; Boch, J. TALE and TALEN genome editing technologies. *Gene Genome Edit.* **2021**, *2*, 100007. [[CrossRef](#)]
68. Hu, Y.; Patra, P.; Pisanty, O.; Shafir, A.; Belew, Z.M.; Binenbaum, J.; Ben Yaakov, S.; Shi, B.; Charrier, L.; Hyams, G.; et al. Multi-Knock—A multi-targeted genome-scale CRISPR toolbox to overcome functional redundancy in plants. *Nat. Plants* **2023**, *9*, 572–587. [[CrossRef](#)]
69. Höjter, I.; Emmanouilidou, A.; Östlund, R.; van Schendel, R.; Bozorgpana, S.; Tijsterman, M.; Feuk, L.; Gyllenstein, U.; den Hoed, M.; Ameer, A. CRISPR-Cas9 induces large structural variants at on-target and off-target sites in vivo that segregate across generations. *Nat. Commun.* **2022**, *13*, 28244. [[CrossRef](#)]
70. Guo, C.; Ma, X.; Gao, F.; Guo, Y. Off-target effects in CRISPR/Cas9 gene editing. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2023**, *11*, 1143157. [[CrossRef](#)]
71. Huang, X.; Yang, D.; Zhang, J.; Xu, J.; Chen, Y.E. Recent Advances in Improving Gene-Editing Specificity through CRISPR–Cas9 Nuclease Engineering. *Cells* **2022**, *11*, 2186. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
72. Leal, A.F.; Herrero-Pachón, A.M.; Benincore-Flórez, E.; Karunathilaka, A.; Tomatsu, S. Current Strategies for Increasing Knock-In Efficiency in CRISPR/Cas9-Based Approaches. *Int. J. Mol. Sci.* **2024**, *25*, 2456. [[CrossRef](#)]
73. Kanafi, M.M.; Tavallaei, M. Overview of Advances in CRISPR/DeadCas9 Technology and Its Applications in Human Diseases. *Gene* **2022**, *830*, 146518. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Yip, B.H. Recent advances in CRISPR/Cas9 delivery strategies. *Biomolecules* **2020**, *10*, 839. [[CrossRef](#)]
75. Huang, Z.; Liu, G. Current advancement in the application of prime editing. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2023**, *11*, 1039315. [[CrossRef](#)]
76. Arzalone, A.; Randolph, P.; Davis, J.; Sousa, A.; Koblan, L.; Levy, J.; Liu, D. Search-and-Replace Genome Editing Without Double-Strand Breaks or Donor DNA. *Nature* **2019**, *576*, 149–157. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
77. Kim, D.; Moon, S.; Ko, J.; Kim, Y.; Kim, D. Unbiased investigation of specificities of prime editing systems in human cells. *Nucleic Acids Res.* **2020**, *48*, 10576–10589. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
78. George, A.; Ravi, N.S.; Prasad, K.C.; Panigrahi, L.; Koikkara, S.; Rajendiran, V.; Mohankumar, K.M. Efficient and Error-Free Correction of Sickle Mutation in Human Erythroid Cells Using Prime Editor-2. *Front. Genome Edit.* **2022**, *4*, 1085111. [[CrossRef](#)]
79. Chen, P.; Hussmann, J.; Yan, J.; Knipping, F.; Ravisankar, P.; Chen, P.; Liu, D. Enhanced Prime Editing Systems by Manipulating Cellular Determinants of Editing Outcomes. *Cell* **2021**, *184*, 5635–5652. [[CrossRef](#)]
80. Schene, I.; Joone, I.; Baijens, J.; Stevelink, R.; Kok, G.; Shehata, S.; Fuchs, S. Mutation-Specific Reporter for Optimization and Enrichment of Prime Editing. *Nat. Commun.* **2022**, *13*, 1. [[CrossRef](#)]
81. Pei, Y.; Sierra, G.; Sivapatham, R.; Swistowski, A.; Rao, M.S.; Zeng, X. A platform for rapid generation of single and multiplexed reporters in human iPSC lines. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 9205. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
82. Cerbini, T.; Funahashi, R.; Luo, Y.; Liu, C.; Park, K.; Rao, M.; Malik, N.; Zou, J. Transcription activator-like effector nuclease (TALEN)-mediated CLYBL targeting enables enhanced transgene expression and one-step generation of dual reporter human induced pluripotent stem cell (iPSC) and neural stem cell (NSC) lines. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0116032. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
83. Kuhn, A.; Ackermann, M.; Mussolino, C.; Cathomen, T.; Lachmann, N.; Moritz, T. TALEN-mediated functional correction of human iPSC-derived macrophages in context of hereditary pulmonary alveolar proteinosis. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 14566. [[CrossRef](#)]
84. Bhardwaj, A.; Nair, V. TALENs—An indispensable tool in the era of CRISPR: A mini review. *J. Genet. Eng. Biotechnol.* **2021**, *19*, 125. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

85. Zheng, Y.; Li, Y.; Zhou, K.; Li, T.; VanDusen, N.J.; Hua, Y. Precise genome-editing in human diseases: Mechanisms, strategies and applications. *Signal Transduct. Target. Ther.* **2024**, *9*, 47. [[CrossRef](#)]
86. Cox, D.; Platt, R.; Zhang, F. Therapeutic genome editing: Prospects and challenges. *Nat. Med.* **2015**, *21*, 121–131. [[CrossRef](#)]
87. Bhushan, K.; Pratap, D.; Sharma, P. Transcription activator-like effector nucleases (TALENs): An efficient tool for plant genome editing. *Eng. Life Sci.* **2016**, *16*, 330–337. [[CrossRef](#)]
88. Nakade, S.; Tsubota, T.; Sakane, Y.; Kume, S.; Sakamoto, N.; Obara, M.; Daimon, T.; Sezutsu, H.; Yamamoto, T.; Sakuma, T.; et al. Microhomology-mediated end-joining-dependent integration of donor DNA in cells and animals using TALENs and CRISPR/Cas9. *Nat. Commun.* **2014**, *5*, 5560. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
89. Kawahara, A.; Hisano, Y.; Ota, S.; Taimatsu, K. Site-Specific Integration of Exogenous Genes Using Genome Editing Technologies in Zebrafish. *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, *17*, 727. [[CrossRef](#)]
90. Siles, L.; Gaudó, P.; Pomares, E. High-efficiency CRISPR/Cas9-mediated correction of a homozygous mutation in achromatopsia-patient-derived iPSCs. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 3655. [[CrossRef](#)]
91. Xu, Y.; Li, Z. CRISPR-Cas systems: Overview, innovations and applications in human disease research and gene therapy. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* **2020**, *18*, 2401–2415. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
92. Naem, M.; Majeed, S.; Hoque, M.Z.; Ahmad, I. Latest Developed Strategies to Minimize the Off-Target Effects in CRISPR-Cas-Mediated Genome Editing. *Cells* **2020**, *9*, 1608. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
93. Pierson Smela, M.D.; Kramme, C.C.; Fortuna, P.R.J.; Adams, J.L.; Su, R.; Dong, E.; Kobayashi, M.; Brixi, G.; Kavirayuni, V.S.; Tysinger, E.; et al. Directed differentiation of human iPSCs to functional ovarian granulosa-like cells via transcription factor overexpression. *ELife* **2023**, *12*, e83291. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
94. Vojnits, K.; Nakanishi, M.; Porras, D.; Kim, Y.; Feng, Z.; Golubeva, D.; Bhatia, M. Developing CRISPR/Cas9-Mediated Fluorescent Reporter Human Pluripotent Stem-Cell Lines for High-Content Screening. *Molecules* **2022**, *27*, 2434. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
95. Calatayud, C.; Carola, G.; Fernández-Carasa, I.; Valtorta, M.; Jiménez-Delgado, S.; Díaz, M.; Soriano-Fradera, J.; Cappelletti, G.; García-Sancho, J.; Raya, Á.; et al. CRISPR/Cas9-mediated generation of a tyrosine hydroxylase reporter iPSC line for live imaging and isolation of dopaminergic neurons. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 6811. [[CrossRef](#)]
96. Nur Patria, Y.; Stenta, T.; Lilianty, J.; Rowley, L.; Stanley, E.G.; Elefanti, A.G.; Bateman, J.F.; Lamandé, S.R. CRISPR/Cas9 gene editing of a SOX9 reporter human iPSC line to produce two TRPV4 patient heterozygous missense mutant iPSC lines, MCRli001-A-3 (TRPV4 p.F273L) and MCRli001-A-4 (TRPV4 p.P799L). *Stem Cell Res.* **2020**, *48*, 101942. [[CrossRef](#)]
97. Liu, J.T.; Corbett, J.L.; Heslop, J.A.; Duncan, S.A. Enhanced genome editing in human iPSCs with CRISPR-Cas9 by co-targeting ATP1a1. *PeerJ* **2020**, *8*, e9060. [[CrossRef](#)]
98. Dixit, S.; Kumar, A.; Srinivasan, K.; Vincent, P.M.D.R.; Ramu Krishnan, N. Advancing genome editing with artificial intelligence: Opportunities, challenges, and future directions. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2023**, *11*, 1335901. [[CrossRef](#)]
99. Zhong, A.; Wu, Y.; Sidharta, M.; Beaury, M.; Zhao, X.; Studer, L.; Zhou, T. Transient Inhibition of p53 Enhances Prime Editing and Cytosine Base-Editing Efficiencies in Human Pluripotent Stem Cells. *Nat. Commun.* **2022**, *13*, 1. [[CrossRef](#)]
100. Habib, O.; Habib, G.; Hwang, G.; Bae, S. Comprehensive Analysis of Prime Editing Outcomes in Human Embryonic Stem Cells. *Nucleic Acids Res.* **2022**, *50*, 1187–1197. [[CrossRef](#)]
101. Liu, M.; Rehman, S.; Tang, X.; Gu, K.; Fan, Q.; Chen, D.; Ma, W. Methodologies for Improving HDR Efficiency. *Front. Genet.* **2019**, *9*, 69. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
102. Fu, Y.; Dai, X.; Wang, W.; Yang, Z.; Zhao, J.; Zhang, J.; Wen, W.; Zhang, E.; Oberg, K.C.; Zhang, L.; et al. Dynamics and Competition of CRISPR–Cas9 Ribonucleoproteins and AAV Donor-Mediated NHEJ, MMEJ and HDR Editing. *Nucleic Acids Res.* **2021**, *49*, 969–985. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
103. Ihry, R.J.; Worringer, K.A.; Salick, M.R.; Frias, E.; Ho, D.; Theriault, K.; Kommineni, S.; Chen, J.; Sondey, M.; Ye, C.; et al. P53 Inhibits CRISPR–Cas9 Engineering in Human Pluripotent Stem Cells. *Nat. Med.* **2018**, *24*, 939–946. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
104. Martin, R.; Ikeda, K.; Cromer, M.; Uchida, N.; Nishimura, T.; Romano, R.; Porteus, M. Highly Efficient and Marker-Free Genome Editing of Human Pluripotent Stem Cells by CRISPR-Cas9 RNP and AAV6 Donor-Mediated Homologous Recombination. *Cell Stem Cell* **2019**, *24*, 821–828. [[CrossRef](#)]
105. Cao, Y.; Li, L.; Ren, X.; Mao, B.; Yang, Y.; Mi, H.; Zhao, X. CRISPR/Cas9 Correction of a Dominant Cis-Double-Variant in COL1A1 Isolated from a Patient with Osteogenesis Imperfecta Increases the Osteogenic Capacity of Induced Pluripotent Stem Cells. *J. Bone Miner. Res.* **2020**, *38*, 719–732. [[CrossRef](#)]
106. Liu, Q.; Yang, J.; Xing, Y.; Zhao, Y.; Liu, Y. Development of Delivery Strategies for CRISPR-Cas9 Genome Editing. *Bmemat* **2023**, *1*, 3. [[CrossRef](#)]
107. Li, D.; Ouyang, K.; Xu, X.; Xu, L.; Wen, C.; Zhou, X.; Qin, Z.; Xu, Z.; Sun, W.; Liang, Y. Nanoparticle Delivery of CRISPR/Cas9 for Genome Editing. *Front. Genet.* **2021**, *12*, 673286. [[CrossRef](#)]
108. Rosenblum, D.; Gutkin, A.; Kedmi, R.; Ramishetti, S.; Veiga, N.; Jacobi, A.; Schubert, M.S.; Friedmann-Morvinski, D.; Cohen, Z.R.; Behlke, M.A.; et al. CRISPR-Cas9 Genome Editing Using Targeted Lipid Nanoparticles for Cancer Therapy. *Sci. Adv.* **2020**, *6*, 47. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
109. Zhu, X.; Gao, M.; Yang, Y.; Li, W.; Bao, J.; Li, Y. The CRISPR/Cas9 System Delivered by Extracellular Vesicles. *Pharmaceutics* **2023**, *15*, 984. [[CrossRef](#)]
110. Ruan, J.; Hirai, H.; Yang, D.; Ma, L.; Hou, X.; Jiang, H.; Xu, J. Efficient Gene Editing at Major CFTR Mutation Loci. *Mol. Ther. Nucleic Acids* **2019**, *16*, 73–81. [[CrossRef](#)]

111. Xu, X.; Gao, D.; Wang, P.; Chen, J.; Ruan, J.; Xu, J.; Xia, X. Efficient Homology-Directed Gene Editing by CRISPR/Cas9 in Human Stem and Primary Cells Using Tube Electroporation. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 1. [CrossRef] [PubMed]
112. Smirnikhina, S.A.; Kondrateva, E.V.; Adilgereeva, E.P.; Anuchina, A.A.; Zaynitdinova, M.I.; Slesarenko, Y.S.; Ershova, A.S.; Ustinov, K.D.; Yasinovsky, M.I.; Amelina, E.L.; et al. PF508del Editing in Cells from Cystic Fibrosis Patients. *PLoS ONE* **2020**, *15*, e0242094. [CrossRef] [PubMed]
113. Du, X. Lentiviral Transduction-Based CRISPR/Cas9 Editing of *Schistosoma mansoni* Acetylcholinesterase. *Curr. Genom.* **2023**, *24*, 155–170. [CrossRef]
114. Rathbone, T.; Ates, I.; Fernando, L.; Addlestone, E.; Lee, C.; Richards, V.; Cottle, R. Electroporation-Mediated Delivery of Cas9 Ribonucleoproteins Results in High Levels of Gene Editing in Primary Hepatocytes. *CRISPR J.* **2022**, *5*, 397–409. [CrossRef]
115. Sung, J.J.; Park, C.Y.; Leem, J.W.; Cho, M.S.; Kim, D.W. Restoration of FVIII expression by targeted gene insertion in the FVIII locus in hemophilia A patient-derived iPSCs. *Exp. Mol. Med.* **2019**, *51*, 1–9. [CrossRef]
116. Jia, J.; Bai, F.; Jin, Y.; Santostefano, K.E.; Ha, U.-H.; Wu, D.; Wu, W.; Terada, N.; Jin, S. Efficient Gene Editing in Pluripotent Stem Cells by Bacterial Injection of Transcription Activator-Like Effector Nuclease Proteins. *Stem Cells Transl. Med.* **2015**, *4*, 913–926. [CrossRef] [PubMed]
117. Wang, X.; Wang, Y.; Huang, H.; Chen, B.; Chen, X.; Hu, J.; Chang, T.; Lin, R.J.; Yee, J.K. Precise gene modification mediated by TALEN and single-stranded oligodeoxynucleotides in human cells. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e93575. [CrossRef]
118. Cerbini, T.; Luo, Y.; Rao, M.S.; Zou, J. Transfection, selection, and colony-picking of human induced pluripotent stem cells TALEN-targeted with a GFP gene into the AAVS1 safe Harbor. *J. Vis. Exp.* **2015**, *96*, e52504. [CrossRef]
119. Fernandopulle, M.S.; Prestil, R.; Grunseich, C.; Wang, C.; Gan, L.; Ward, M.E. Transcription Factor-Mediated Differentiation of Human iPSCs into Neurons. *Curr. Protoc. Cell Biol.* **2018**, *79*, e51. [CrossRef]
120. Shankar, S.; Sree Kumar, A.; Prasad, D.; Das, A.V.; Pillai, M.R. Genome editing of oncogenes with ZFNs and TALENs: Caveats in nuclease design. *Cancer Cell Int.* **2018**, *18*, 169. [CrossRef]
121. Zhong, A.; Li, M.; Zhou, T. Protocol for the Generation of Human Pluripotent Reporter Cell Lines Using CRISPR/Cas9. *STAR Protoc.* **2020**, *1*, 100052. [CrossRef] [PubMed]
122. Sheridan, S.; Surampudi, V.; Rao, R. Analysis of Embryoid Bodies Derived from Human Induced Pluripotent Stem Cells as a Means to Assess Pluripotency. *Stem Cells Int.* **2012**, *2012*, 1–9. [CrossRef] [PubMed]
123. Osada, N.; Kikuchi, J.; Umehara, T.; Sato, S.; Urabe, M.; Abe, T.; Furukawa, Y. Lysine-Specific Demethylase 1 Inhibitors Prevent Teratoma Development from Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Oncotarget* **2018**, *9*, 6450–6462. [CrossRef] [PubMed]
124. Deng, Y.; Zhou, Z.; Ji, W.; Lin, S.; Wang, M. METTL1-Mediated m7G Methylation Maintains Pluripotency in Human Stem Cells and Limits Mesoderm Differentiation and Vascular Development. *Stem Cell Res. Ther.* **2020**, *11*, 1. [CrossRef] [PubMed]
125. Feng, Q.; Lu, S.; Klimanskaya, I.; Gomes, I.; Kim, D.; Chung, Y.; Larza, R. Hemangioblastic Derivatives from Human Induced Pluripotent Stem Cells Exhibit Limited Expansion and Early Senescence. *Int. J. Cell Cloning* **2010**, *28*, 704–712. [CrossRef]
126. Parr, C.; Katayama, S.; Miki, K.; Kuang, Y.; Yoshida, Y.; Morizane, A.; Saito, H. MicroRNA-302 Switch to Identify and Eliminate Undifferentiated Human Pluripotent Stem Cells. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 1. [CrossRef]
127. Narsinh, K.; Sun, N.; Sánchez-Freije, V.; Lee, A.; Almeida, P.; Hu, S.; Wu, J. Single Cell Transcriptional Profiling Reveals Heterogeneity of Human Induced Pluripotent Stem Cells. *J. Clin. Investig.* **2011**, *121*, 1217–1221. [CrossRef]
128. Zhao, T.; Zhang, Z.; Westenskow, P.; Todorova, D.; Hu, Z.; Lin, T.; Xu, Y. Humanized Mice Reveal Differential Immunogenicity of Cells Derived from Autologous Induced Pluripotent Stem Cells. *Cell Stem Cell* **2015**, *17*, 353–359. [CrossRef]
129. Liu, Y.; Yang, Y.; Kang, X.; Lin, B.; Qian, Y.; Song, B.; Fan, Y. One-Step Biallelic and Scarless Correction of a  $\beta$ -Thalassemia Mutation in Patient-Specific iPSCs without Drug Selection. *Mol. Ther. Nucleic Acids* **2017**, *6*, 57–67. [CrossRef]
130. Hamad, R. Cas12a Ultra Enables Efficient Genome Editing in Human Multipotent and Pluripotent Stem Cells. **2023**. Available online: <https://www.researchsquare.com/article/rs-3403204/v1> (accessed on 22 September 2024).
131. Zahumenska, R.; Nosál, V.; Smolár, M.; Okajčeková, T.; Škovierová, H.; Strnádel, J.; Halašová, E. Induced pluripotency: A powerful tool for in vitro modeling. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 8910. [CrossRef]
132. Qiao, Y.; Agboola, O.; Hu, X.; Wu, Y.; Lei, L. Tumorigenic and immunogenic properties of induced pluripotent stem cells: A promising cancer vaccine. *Stem Cell Rev. Rep.* **2020**, *16*, 1049–1061. [CrossRef] [PubMed]
133. Scarfone, R.; Pena, S.; Russell, K.; Betts, D.; Koch, T. The use of induced pluripotent stem cells in domestic animals: A narrative review. *BMC Vet. Res.* **2020**, *16*, 477. [CrossRef] [PubMed]
134. Erharter, A.; Rizzi, S.; Mertens, J.; Edenhofer, F. Take the shortcut—Direct conversion of somatic cells into induced neural stem cells and their biomedical applications. *FEBS Lett.* **2019**, *593*, 3353–3369. [CrossRef]
135. Imamura, M.; Hikabe, O.; Lin, Z. Generation of germ cells in vitro in the era of induced pluripotent stem cells. *Mol. Reprod. Dev.* **2013**, *81*, 2–19. [CrossRef]
136. Buganim, Y.; Faddah, D.A.; Jaenisch, R. Mechanisms and models of somatic cell reprogramming. *Nat. Rev. Genet.* **2013**, *14*, 427–439. [CrossRef]
137. Ouchi, R.; Koike, H. Modeling human liver organ development and diseases with pluripotent stem cell-derived organoids. *Front. Cell Dev. Biol.* **2023**, *11*, 1133534. [CrossRef]
138. Chen, H.; Zhang, M.; Zhang, J.; Chen, Y.; Zuo, Y.; Xie, Z.; Chen, Y. Application of induced pluripotent stem cell-derived models for investigating microRNA regulation in developmental processes. *Front. Genet.* **2022**, *13*, 899831. [CrossRef]

139. Zywitza, V.; Rusha, E.; Shaposhnikov, D.; Ruiz-Orera, J.; Telugu, N.; Rishko, V.; Drukker, M. Naïve-like pluripotency to pave the way for saving the northern white rhinoceros from extinction. *Sci. Rep.* **2022**, *12*, 3100. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
140. Kotton, D.; Nilsson, M. Editorial: Progenitors and stem cells in thyroid development, disease, and regeneration. *Front. Endocrinol.* **2022**, *13*, 848559. [[CrossRef](#)]
141. Ashmore-Harris, C.; Blackford, S.J.; Grimsdell, B.; Kurtys, E.; Glatz, M.C.; Rashid, T.S.; Fruhwirth, G.O. Reporter gene-engineering of human induced pluripotent stem cells during differentiation renders in vivo traceable hepatocyte-like cells accessible. *Stem Cell Res.* **2019**, *41*, 101599. [[CrossRef](#)]
142. Blöching, A.K.; Siehler, J.; Wißmiller, K.; Shahryari, A.; Burtscher, I.; Lickert, H. Generation of an INSULIN-H2B-Cherry reporter human iPSC line. *Stem Cell Res.* **2020**, *45*, 101797. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
143. Gao, Y.; Wu, S.; Pan, J.; Zhang, K.; Li, X.; Xu, Y.; Jin, C.; He, X.; Shi, J.; Ma, L.; et al. CRISPR/Cas9-edited triple-fusion reporter gene imaging of dynamics and function of transplanted human urinary-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2021**, *48*, 708–720. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
144. Galdos, E.X.; Lee, C.; Lee, S.; Paige, S.; Goodyer, W.; Xu, S.; Samad, T.; Escobar, G.V.; Darsha, A.; Beck, A.; et al. Combined lineage tracing and scRNA-seq reveals unexpected first heart field predominance of human iPSC differentiation. *Elife* **2023**, *12*, e80075. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
145. Jung, J.; Hwang, S.; Seol, H.; Kim, A.H.; Lee, H.M.; Sung, J.J.; Jeong, S.M.; Choi, Y.M.; Jun, J.K.; Kim, D.W.; et al. Generation of Brachyury-mCherry knock-in reporter human pluripotent stem cell line (SNUe003-A-2) using CRISPR/Cas9 nuclease. *Stem Cell Res.* **2021**, *53*, 102321. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
146. Coxir, S.A.; Costa, G.M.J.; Santos, C.F.D.; Alvarenga, R.L.L.S.; Lacerda, S.M.D.S.N. From in vivo to in vitro: Exploring the key molecular and cellular aspects of human female gametogenesis. *Hum. Cell* **2023**, *36*, 1283–1311. [[CrossRef](#)]
147. Yamashiro, C.; Sasaki, K.; Yabuta, Y.; Kojima, Y.; Nakamura, T.; Okamoto, I.; Yokobayashi, S.; Murase, Y.; Ishikura, Y.; Shirane, K.; et al. Generation of human oogonia from induced pluripotent stem cells in vitro. *Science* **2018**, *362*, 356–360. [[CrossRef](#)]
148. Kojima, Y.; Yamashiro, C.; Murase, Y.; Yabuta, Y.; Okamoto, I.; Iwatani, C.; Tsuchiya, H.; Nakaya, M.; Tsukiyama, T.; Nakamura, T.; et al. GATA transcription factors, SOX17 and TFAP2C, drive the human germ-cell specification program. *Life Sci. Alliance* **2021**, *4*, e202000974. [[CrossRef](#)]
149. Sasaki, K.; Yokobayashi, S.; Nakamura, T.; Okamoto, I.; Yabuta, Y.; Kurimoto, K.; Ohta, H.; Moritoki, Y.; Iwatani, C.; Tsuchiya, H.; et al. Robust in vitro induction of human germ cell fate from pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* **2015**, *17*, 178–194. [[CrossRef](#)]
150. Kuang, Y.; Muñoz, A.; Nalula, G.; Santostefano, K.; Sanghez, V.; Sánchez, G.; Medina, M. Evaluation of commonly used ectoderm markers in iPSC trilineage differentiation. *Stem Cell Res.* **2019**, *37*, 101434. [[CrossRef](#)]
151. Xu, X.; Du, Y.; Ma, L.; Zhang, S.; Shi, L.; Chen, Z.; Zhang, X. Mapping germ-layer specification preventing genes in hPSCs via genome-scale CRISPR screening. *iScience* **2021**, *24*, 101926. [[CrossRef](#)]
152. Lee, Y.; Choi, H.Y.; Kwon, A.; Park, H.; Park, M.; Kim, Y.; Koo, S.K. Generation of a Nestin-EGFP reporter human induced pluripotent stem cell line, KSCBi005-A-1, using CRISPR/Cas9 nuclease. *Stem Cell Res.* **2019**, *40*, 101554. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
153. Yamashita, T.; Kamiya, D.; Kawaraichi, N.; Toyokawa, H.; Akaboshi, T.; Ikeya, M.; Toyooka, Y. Generation of a human SOX10 knock-in reporter iPSC line for visualization of neural crest cell differentiation. *Stem Cell Res.* **2022**, *60*, 102696. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
154. Inomata, Y. Lgr6-expressing functional nail stem-like cells differentiated from human-induced pluripotent stem cells. *PLoS ONE* **2024**, *19*, e0303260. [[CrossRef](#)]
155. Müller, M.; Czarnicka, J.; Brzeziński, M.; Prus, J.; Kulak, B.; Holubowski, A.; Dyszkiewicz-Konwińska, M. Current stem cell technologies used in medicine. *Med. J. Cell Biol.* **2020**, *8*, 124–138. [[CrossRef](#)]
156. Doherty, L.; Wan, M.; Peterson, A.; Youngstrom, D.W.; King, J.S.; Kalajzic, I.; Hankenson, K.D.; Sanjay, A. Wnt-associated adult stem cell marker Lgr6 is required for osteogenesis and fracture healing. *Bone* **2023**, *169*, 116681. [[CrossRef](#)]
157. Khedgikar, V.; Charles, J.F.; Lehoczy, J.A. Mouse LGR6 Regulates Osteogenesis in Vitro and In Vivo Through Differential Ligand Use. *Bone* **2022**, *155*, 116267. [[CrossRef](#)]
158. Doherty, L.; Sanjay, A. LGRs in skeletal tissues: An emerging role for WNT-associated adult stem cell markers in bone. *JBMR Plus* **2020**, *4*, 10380. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
159. Cerneckis, J.; Cai, H.; Shi, Y. Induced pluripotent stem cells (iPSCs): Molecular mechanisms of induction and applications. *Sig Transduct. Target. Ther.* **2024**, *9*, 112. [[CrossRef](#)]
160. Park, J.; Park, M.; Lee, S.; Kim, D.; Kim, K.; Jang, H.; Cha, H. Gene editing with ‘pencil’ rather than ‘scissors’ in human pluripotent stem cells. *Stem Cell Res. Ther.* **2023**, *14*, 1. [[CrossRef](#)]
161. Mianné, J.; Nasri, A.; Van, C.; Bourguignon, C.; Fieldès, M.; Ahmed, E.; Vos, J. Crispr/cas9-mediated gene knockout and interallelic gene conversion in human induced pluripotent stem cells using non-integrative bacteriophage-chimeric retro-virus-like particles. *BMC Biol.* **2022**, *20*, 1. [[CrossRef](#)]
162. Sguazzi, G.; Muto, V.; Tartaglia, M.; Bertini, E.; Compagnucci, C. Induced pluripotent stem cells (iPSCs) and gene therapy: A new era for the treatment of neurological diseases. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 13674. [[CrossRef](#)]
163. Kaserman, J.; Hurley, K.; Dodge, M.; Villacorta-Martin, C.; Vedaie, M.; Jean, J.; Wilson, A. A highly phenotyped open access repository of alpha-1 antitrypsin deficiency pluripotent stem cells. *Stem Cell Rep.* **2020**, *15*, 242–255. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
164. D’Antonio, M.; Benaglio, P.; Jakubosky, D.; Greenwald, W.; Matsui, H.; Donovan, M.; Frazer, K. Insights into the mutational burden of human induced pluripotent stem cells from an integrative multi-omics approach. *Cell Rep.* **2018**, *24*, 883–894. [[CrossRef](#)]

165. Li, D. CRISPR/Cas9-mediated gene correction in osteopetrosis patient-derived iPSCs. *Front Biosci-Landmark* **2023**, *28*, 131. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
166. Alkanli, S.; Alkanli, N.; Ay, A.; Albeniz, I. CRISPR/Cas9 mediated therapeutic approach in Huntington's disease. *Mol. Neurobiol.* **2022**, *60*, 1486–1498. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
167. Birling, M.C.; Yoshiki, A.; Adams, D.J.; Ayabe, S.; Beaudet, A.L.; Bottomley, J.; Bradley, A.; Brown, S.D.; Bürger, A.; Bushell, W.; et al. A resource of targeted mutant mouse lines for 5,061 genes. *Nat. Genet.* **2021**, *53*, 416–419. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
168. Hockemeyer, D.; Soldner, F.; Beard, C.; Gao, Q.; Mitalipova, M.; DeKever, R.C.; Katibah, G.E.; Amora, R.; Boydston, E.A.; Zeitler, B.; et al. Efficient targeting of expressed and silent genes in human ESCs and iPSCs using zinc-finger nucleases. *Nat. Biotechnol.* **2009**, *27*, 851–857. [[CrossRef](#)]
169. Zou, J.; Maeder, M.L.; Mali, P.; Pruetz-Miller, S.M.; Thibodeau-Beganny, S.; Chou, B.K.; Chen, G.; Ye, Z.; Park, I.H.; Daley, G.Q.; et al. Gene targeting of a disease-related gene in human induced pluripotent stem and embryonic stem cells. *Cell Stem Cell* **2009**, *5*, 97–110. [[CrossRef](#)]
170. Sánchez-Danés, A.; Consiglio, A.; Richaud, Y.; Rodríguez-Pizà, I.; Dehay, B.; Edel, M.; Bove, J.; Memo, M.; Vila, M.; Raya, A.; et al. Efficient Generation of A9 Midbrain Dopaminergic Neurons by Lentiviral Delivery of LMX1A in Human Embryonic Stem Cells and Induced Pluripotent Stem Cells. *Hum. Gene Ther.* **2012**, *23*, 56–69. [[CrossRef](#)]
171. Bizy, A.; Guerrero-Serna, G.; Hu, B.; Ponce-Balbuena, D.; Willis, B.; Zarzoso, M.; Ramirez, R.J.; Sener, M.F.; Mundada, L.V.; Klos, M.; et al. Myosin Light Chain 2-Based Selection of Human iPSC-Derived Early Ventricular Cardiac Myocytes. *Stem Cell Res.* **2013**, *11*, 1335–1347. [[CrossRef](#)]
172. Chirikian, O.; Goodyer, W.; Dzilić, E.; Serpooshan, V.; Buikema, J.; McKeithan, W.; Wu, H.; Li, G.; Lee, S.; Merk, M.; et al. CRISPR/Cas9-Based Targeting of Fluorescent Reporters to Human iPSCs to Isolate Atrial and Ventricular-Specific Cardiomyocytes. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 81860. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
173. Liu, Y.; Jiang, P.; Deng, W. Olig Gene Targeting in Human Pluripotent Stem Cells for Motor Neuron and Oligodendrocyte Differentiation. *Nat. Protoc.* **2011**, *6*, 640–655. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
174. Namchaitw, P.; Han, W.; Mayrhofer, F.; Chelneva, O.; Biswas, S.; Deng, W. Temporal and Partial Inhibition of GLI1 in Neural Stem Cells (NSCs) Results in the Early Maturation of NSC Derived Oligodendrocytes in Vitro. *Stem Cell Res. Ther.* **2019**, *10*, 1374. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
175. Li, M.; Zhao, H.; Ananiev, G.; Musser, M.; Ness, K.; Maglaque, D.; Zhao, X. Establishment of Reporter Lines for Detecting Fragile X Mental Retardation (FMR1) Gene Reactivation in Human Neural Cells. *Int. J. Cell Cloning* **2016**, *35*, 158–169. [[CrossRef](#)]
176. Malysheva, S.; Wunderlich, S.; Haase, A.; Göhring, G.; Merkert, S. Generation of a Human CDX2 Knock-In Reporter iPSC Line (MHH1007-A-1) to Model Human Trophoblast Differentiation. *Stem Cell Res.* **2018**, *30*, 117–121. [[CrossRef](#)]
177. Marrone, L.; Poser, I.; Casci, I.; Japtok, J.; Reinhardt, P.; Janosch, A.; Andree, C.; Lee, H.O.; Moebius, C.; Koerner, E.; et al. Isogenic FUS-EGFP iPSC Reporter Lines Enable Quantification of FUS Stress Granule Pathology That Is Rescued by Drugs Inducing Autophagy. *Stem Cell Rep.* **2018**, *10*, 375–389. [[CrossRef](#)]
178. Gupta, S.; Wesolowska-Andersen, A.; Ringgaard, A.; Jaiswal, H.; Song, L.; Hastoy, B.; Honoré, C. NKX6.1 Induced Pluripotent Stem Cell Reporter Lines for Isolation and Analysis of Functionally Relevant Neuronal and Pancreas Populations. *Stem Cell Res.* **2018**, *29*, 220–231. [[CrossRef](#)]
179. Kwong, G.; Márquez, H.; Yang, C.; Wong, J.Y.; Kotton, D.N. Generation of a Purified iPSC-Derived Smooth Muscle-Like Population for Cell Sheet Engineering. *Stem Cell Rep.* **2019**, *13*, 499–514. [[CrossRef](#)]
180. Adkar, S.S.; Wu, C.-L.; Willard, V.P.; Dicks, A.; ETTYREDDY, A.; Steward, N.; Bhutani, N.; Gersbach, C.A.; Guilak, F. Step-Wise Chondrogenesis of Human Induced Pluripotent Stem Cells and Purification Via a Reporter Allele Generated by CRISPR-Cas9 Genome Editing. *Stem Cells* **2018**, *37*, 65–76. [[CrossRef](#)]
181. Dicks, A.; Wu, C.-L.; Steward, N.; Adkar, S.S.; Gersbach, C.A.; Guilak, F. Prospective Isolation of Chondroprogenitors from Human iPSCs Based on Cell Surface Markers Identified Using a CRISPR-Cas9-Generated Reporter. *Stem Cell Res. Ther.* **2020**, *11*, 1597. [[CrossRef](#)]
182. Moya, N.; Shahryari, A.; Burtscher, I.; Beckenbauer, J.; Bakhti, M.; Lickert, H. Generation of a Homozygous ARX Nuclear CFP (ARX) Reporter Human iPSC Line (HMGU1001-A-4). *Stem Cell Res.* **2020**, *46*, 101874. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
183. Tanoury, Z.; Rao, J.; Tassy, O.; Gobert, B.; Gapon, S.; Garnier, J.; Pourquié, O. Differentiation of the Human PAX7-Positive Myogenic Precursors/Satellite Cell Lineage In Vitro. *Development* **2020**, *147*, dev187344. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
184. Kou, Y.; Himeno, M.; Mori, Y.; Nakano, Y.; Saijou, E.; Tanimizu, N.; Kamiya, Y.; Anzai, H.; Maeda, N.; Wang, L.; et al. Development of Human iPSC-Derived Quiescent Hepatic Stellate Cell-Like Cells for Drug Discovery and In Vitro Disease Modeling. *Stem Cell Rep.* **2021**, *16*, 3050–3063. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
185. Zhou, M.; Wei, R.; Yu, J.; Fu, J.; Liu, Y.; Yang, B.; Yu, B.; Liu, Y.; Ran, X.; Lai, W.H.; et al. Generation of a Human iPSC Line GIBHI002-A-2 with a Dual-Reporter for NKX2-5 Using TALENs. *Stem Cell Res.* **2021**, *50*, 102120. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
186. Sharma, V.; Nehra, S.; Singhal, N. Generation of AAVS1-EGFP Reporter Cell Lines from an Isogenic Pair of Trisomy 21 and Euploid Human iPSCs. *Stem Cell Res.* **2022**, *64*, 102890. [[CrossRef](#)]
187. Xu, T.; Duan, J.; Li, Y.; Wang, G.; Li, S.; Li, Y.; Lu, W.; Yan, X.; Ren, Y.; Guo, F.; et al. Generation of a TPH2-EGFP Reporter Cell Line for Purification and Monitoring of Human Serotonin Neurons In Vitro and In Vivo. *Stem Cell Rep.* **2022**, *17*, 2365–2379. [[CrossRef](#)]
188. Houweling, P. Generation of a Human ACTA1-TDTomato Reporter iPSC Line Using CRISPR/Cas9 Editing. *Stem Cell Res.* **2024**, *75*, 103313. [[CrossRef](#)]

189. Cota, P.; Caliskan, Ö.S.; Bastidas-Ponce, A.; Jing, C.; Jaki, J.; Saber, L.; Czarnecki, O.; Taskin, D.; Blöchliger, A.K.; Kurth, T.; et al. Insulin Regulates Human Pancreatic Endocrine Cell Differentiation In Vitro. *Mol. Metab.* **2024**, *79*, 101853. [[CrossRef](#)]
190. Li, W.; Jiao, H.; Walczak, B. Emerging Opportunities for Induced Pluripotent Stem Cells in Orthopaedics. *J. Orthop. Transl.* **2019**, *17*, 73–81. [[CrossRef](#)]
191. Barrett, R.; Ornelas, L.; Yeager, N.; Mandefro, B.; Sahabian, A.; Lenaeus, L.; Sørensen, D. Reliable generation of induced pluripotent stem cells from human lymphoblastoid cell lines. *Stem Cells Transl. Med.* **2014**, *3*, 1429–1434. [[CrossRef](#)]
192. Ji, H.; Gao, S.; Yang, X.; Cai, J.; Zhao, W.; Sun, H.; Geng, Y.J. Clinical Application of Induced Pluripotent Stem Cells in Cardiovascular Medicine. *Cardiology* **2015**, *131*, 236–244. [[CrossRef](#)]

**Disclaimer/Publisher's Note:** The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

## **CAPÍTULO 2**

Geração de linhagens de hiPSC *SOX17-RFP* e *PRDMI-GFP* por meio da tecnologia CRISPR/Cas9

## 1. INTRODUÇÃO E BREVE REVISÃO DE LITERATURA

O emprego de células-tronco em pesquisas relacionadas à reprodução humana avança de maneira consistente ao longo dos anos. Existem diversos estudos que procuram encontrar alternativas para geração de gametas e células de suporte aos gametas *in vitro*, visando auxiliar, sobretudo, pacientes que enfrentam problemas de fertilidade. Em modelos murinos, há uma miríade de estudos que fornecem protocolos eficientes para a geração de gametas funcionais a partir de células-tronco embrionárias (ESCs, do inglês *embryonic stem cells*) ou células-tronco de pluripotência induzida (iPSCs,) (Zhang et al., 2020), havendo, inclusive, confirmação da produção de proles viáveis e férteis obtidas a partir da fertilização destes gametas gerados *in vitro* (Li Z. et al., 2018). Por consequência, diversos grupos de pesquisa procuram estabelecer estratégias semelhantes para gerar gametas humanos em laboratório.

Embora já existam relatos da geração de células humanas semelhantes às células da linhagem germinativa, tanto para indivíduos do sexo feminino quanto masculino (Saitou, 2021), ainda existem limitações que residem, sobretudo, no estabelecimento de células comprometidas com a divisão meiótica (Yamashiro et al., 2018). Esse comprometimento se dá, em especial, pela associação das células da linhagem germinativa com as células somáticas das gônadas (Piprek et al., 2016). Em indivíduos do sexo masculino, as células de Sertoli fornecem o suporte estrutural e metabólico para o comprometimento e a diferenciação de gonócitos em espermatogônias e a subsequente especialização em espermatozoides (O'Donnell et al., 2022). Nos indivíduos do sexo feminino, as células da granulosa estabelecem contato mútuo e direto com as oogônias a fim de coordenar o desenvolvimento e a capacitação do gameta para a meiose e a subsequente especialização em oócitos ao longo da gametogênese feminina (Coxir et al., 2023).

Yamashiro et al., 2018 reportaram a geração, em cultura, de células semelhantes às células germinativas primordiais humanas (hPGCLCs, do inglês *human primordial germ cells like-cells*) a partir de hiPSCs derivadas da linhagem hematopoiética: induziram inicialmente a formação de células incipientes semelhantes a mesoderma (iMeLCs, do inglês *incipient mesoderm like-cells*) e, posteriormente, promoveram a diferenciação de iMeLCs em hPGCLCs por meio da formação de esferoides, em um sistema de cultura tridimensional. Essas células foram co-cultivadas, em sequência, com células da granulosa obtidas de ovários de embriões de camundongos, em um protocolo com baixa eficiência de geração de células comprometidas com a meiose – presumíveis oócitos primários – conforme os próprios autores reportam neste

e em estudo subsequente (Yamashiro et al., 2020). Hipotetiza-se que essa limitação reside, sobretudo, na falta de compatibilidade entre células da granulosa murinas e as células semelhantes às células germinativas primordiais humanas geradas. Além disso, esta é uma alternativa controversa para a geração de um futuro tratamento aplicado, uma vez que cultivos xenogênicos não se concretizam como padrão-ouro para terapias celulares voltadas à medicina humana.

Uma etapa essencial para facilitar e aprimorar protocolos de geração de hPGCLCs é o uso de linhagens carreando alelos repórteres em genes chaves das vias de diferenciação, permitindo a detecção rápida e precisa de células de interesse. O gene *SOX17*, localizado no cromossomo 8 humano, codifica uma proteína essencial para a especificação e manutenção de células germinativas primordiais humanas (PGCs), em associação à proteína *PRDMI* (Luo et al., 2023; Kojima et al., 2021; Irie et al., 2015). *SOX17* é crucial para a ativação da expressão de *PRDMI* e atua em conjunto com *TFAP2C* para prevenir a diferenciação em linhagens mesodérmicas e neurais (Gkountela et al., 2015). Durante a especificação de PGCs humanas, *SOX17* promove a expressão de genes endodérmicos enquanto reprime genes somáticos, garantindo a adoção do destino germinativo (Jostes et al., 2020; Nettersheim et al., 2016). Essa interação é caracterizada por uma relação exclusiva com *SOX2*, que precisa ser reprimido para a diferenciação eficiente de PGCs (Yao et al., 2022). A dinâmica entre *SOX17* e *PRDMI* participa também da transição de células-tronco pluripotentes para endoderma definitivo, além da indução da especificação de PGCs (Irie et al., 2024; Landshammer et al., 2023; Tang et al., 2022).

Dada a relevância dessas interações, propomos o desenvolvimento de linhagens com repórteres fluorescentes para *SOX17* e *PRDMI*, visando monitorar em tempo real a diferenciação e comportamento de hPGCLCs. Essas ferramentas possibilitarão análises detalhadas de interações celulares, comportamento dinâmico e padrões de expressão em diferentes condições experimentais, promovendo o refinamento de protocolos para a geração de gametas humanos *in vitro*.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1. Células empregadas no projeto

A linhagem de hiPSCs (hiPSC71 46, XX) foi cedida pelo LaNCE-USP, e foi derivada de eritroblastos. A indução à pluripotência foi desempenhada por meio do uso de vetores episomais contendo os genes *OCT4*, *SOX2*, *KLF4*, *cMYC* e *LIN28*, além do adjuvante *SV40-T*, que foram nucleoporados aos eritroblastos seguindo procedimentos padronizados pela equipe do LaNCE-USP. Todo o procedimento de caracterização foi conduzido por profissionais do LaNCE-USP, assim como todas as diretrizes éticas foram tramitadas no âmbito da USP.

### 2.2. Cultivo de hiPSCs

O cultivo de hiPSCs segue protocolos rigorosos para assegurar a viabilidade celular e a manutenção da pluripotência. Nossa abordagem incorpora adaptações de técnicas estabelecidas, permitindo a realização de experimentos consistentes e reproduzíveis. Todos os procedimentos de cultivo das hiPSCs são feitos utilizando o meio E8<sup>®</sup> (Gibco) suplementado com 10% de meio mTeSR<sup>®</sup> (StemCell Technologies). A este meio damos o nome de meio E8 completo. Esta formulação foi sugerida pelos pesquisadores do LaNCE-USP, assim como todos os demais procedimentos de cultivo relatados nos próximos tópicos.

Os volumes utilizados para o cultivo em diferentes formatos de placas variam conforme o número de poços. Em placas de 6 poços, utiliza-se 1 mL por poço; em placas de 12 poços, 500  $\mu$ L por poço; em placas de 24 poços, 500  $\mu$ L por poço; em placas de 48 poços, 200  $\mu$ L por poço; e em placas de 96 poços, 100  $\mu$ L por poço. Na maioria dos experimentos, utilizamos placas de 35  $\times$  10 mm suportadas por uma placa de petri de 100  $\times$  20 mm. Essa configuração reduz a manipulação direta das placas onde as hiPSCs são cultivadas, minimizando riscos de contaminação. As placas de cultivo são tratadas previamente com Geltrex 1% (Gibco) diluído em meio E8 base ou DMEM-F12 (Gibco). A solução é distribuída nas placas e incubada por pelo menos 1 hora em incubadora a 37 °C 5% CO<sub>2</sub>.

O suplemento RevitaCell<sup>™</sup> 100X (Gibco) é utilizado para melhorar a viabilidade das hiPSCs, sendo especialmente eficaz em passagens, centrifugações diversas e na recuperação pós-descongelamento. Ele contém um inibidor seletivo da via Rho-cinase e moléculas antioxidantes que minimizam o estresse celular e melhoram a adesão das células às placas, inibindo, por consequência, a apoptose. Este suplemento é composto por materiais quimicamente definidos e livres de origem animal, garantindo consistência e segurança no

cultivo *feeder-free*. Basicamente, utilizamos 10  $\mu$ L de RevitaCell a cada mL de meio E8 completo, guardando as proporções para diferentes volumes empregados em experimentos.

Para descongelar as hiPSCs, o criotubo é retirado do nitrogênio líquido e mantido em temperatura ambiente até iniciar o descongelamento. Adiciona-se 1 mL de meio E8 completo suplementado com RevitaCell, utilizando uma pipeta sorológica. O conteúdo do criotubo é suavemente transferido para 2 mL adicionais de meio E8 completo + RevitaCell em um tubo cônico de 15 mL. O criotubo é lavado com 1 mL extra de meio E8 completo + RevitaCell, e o conteúdo é adicionado ao mesmo tubo. A suspensão é centrifugada a 200 \* g por 4 minutos. O sobrenadante é descartado e o pellet é ressuspensão em 1 mL de meio E8 completo + RevitaCell. As células são plaqueadas e incubadas a 37 °C 5% CO<sub>2</sub>.

O meio E8 completo é renovado diariamente. As trocas de meio consistem na remoção do meio metabolizado, lavagem com PBS 1X aquecido a 37 °C e subsequente remoção do conteúdo da placa. Em seguida, o meio E8 completo fresco é adicionado ao poço.

Para a passagem das células, utilizamos três metodologias distintas, escolhidas conforme a finalidade do experimento. Durante os períodos de expansão das hiPSCs, adotamos o método com Versene 0.5X (Gibco) (EDTA 0,24 mM em PBS 1X). Esse procedimento é ideal para preservar pequenos grupos de células, garantindo a comunicação célula-célula, crucial para a manutenção da pluripotência e da viabilidade celular. Para este propósito, remove-se o meio metabolizado e lava-se com PBS 1X aquecido. Adiciona-se 1 mL de Versene 0.5X, seguido de incubação a 37 °C 5% CO<sub>2</sub> por 3 minutos. O Versene é removido, e o meio E8 completo é adicionado em volume dobrado por gotejamento. As colônias são raspadas suavemente com pipeta sorológica de 5 mL e transferidas para uma nova placa. Adiciona-se RevitaCell aos poços após o procedimento.

A passagem com StemPro<sup>®</sup> Accutase (Gibco) é feita com o intuito de obter suspensões de células individualizadas, o que é essencial para procedimento como contagem de células para plaqueamento. Para isso, remove-se o meio metabolizado, lava-se com PBS 1X e adiciona-se 500  $\mu$ L de Accutase, incubando por 6 minutos a 37 °C 5% CO<sub>2</sub>. A Accutase é inativada com o dobro do volume de meio E8 completo. A suspensão é então transferida para um tubo cônico de 15 mL. Neste momento, adicionamos RevitaCell à suspensão antes da centrifugação, visando a sobrevivência destas células. A suspensão é centrifugada a 200 \* g, por 4 minutos e o pellet é ressuspensão em 1 mL de meio E8 completo. As células são homogeneizadas suavemente, contadas, plaqueadas e suplementadas com RevitaCell.

A passagem com ReLeSR<sup>®</sup> (StemCell Technologies) visa a passagem seletiva de células de fato pluripotentes, sobretudo quando se nota a presença de áreas de diferenciação espontânea nas placas, fato comumente relatado em cultivos de hiPSCs, porém raro em nosso laboratório. Para isso, remove-se o meio metabolizado, lava-se com PBS 1X e adiciona-se 1 mL de ReLeSR. Incuba-se por 1 minuto à temperatura ambiente. O ReLeSR é removido e a placa é mantida assim por 8 minutos. Adiciona-se meio E8 completo por gotejamento, agitam-se as placas e as colônias que se soltam neste processo são coletadas e transferidas para novas placas. Após este procedimento, é feita a suplementação com RevitaCell.

Para criopreservar as hiPSCs, procedemos de forma semelhante a passagem com Versene. Remove-se o meio metabolizado, lava-se com PBS 1X e adiciona-se 1 mL de Versene e as placas são incubadas por 3 minutos a 37 °C. O Versene é descartado, e o meio E8 completo é adicionado para soltar as colônias. As células são raspadas, transferidas para um tubo cônico de 15 mL e centrifugadas a 200 \* g por 4 minutos. O pellet é então ressuspensão em meio de congelamento composto por 90% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco) e 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma) resfriado. Aliquotas de 1 mL são transferidas para criotubos, que são colocados em recipiente Mr. Frosty (Nalgene) e mantidos a -80 °C por 48 horas. Posteriormente, os criotubos são transferidos para nitrogênio líquido.

### **2.3. Microscopia Eletrônica de Transmissão**

A análise da ultraestrutura das hiPSCs foi realizada utilizando microscopia eletrônica de transmissão, seguindo orientações do Centro de Microscopia da UFMG. As células foram cultivadas conforme as condições descritas na seção 2.2, e se encontravam em passagem #24. No dia da fixação, o meio utilizado para lavar as células foi previamente aquecido a 37 °C em incubadora de CO<sub>2</sub> para garantir um tamponamento adequado. Para a fixação primária, as células, ainda aderidas à superfície de cultivo, foram tratadas com fixador de Karnovsky modificado, composto por 2% de paraformaldeído e 2,5% de glutaraldeído em tampão fosfato, por 45 minutos em temperatura ambiente. Após esse período, o fixador foi removido e as hiPSCs armazenadas em tampão fosfato a 4 °C até a próxima etapa. A fixação secundária foi realizada diretamente nas placas de cultivo, utilizando tetróxido de ósmio (OsO<sub>4</sub>) a 2% por 2 horas em temperatura ambiente. Em seguida, as células foram raspadas das placas de cultura com uma espátula estéril, transferidas para microtubos e centrifugadas até a formação de um pellet.

O contraste inicial foi realizado no pellet celular com acetato de uranila a 2% em uma solução aquosa contendo 13,3% de sacarose. As amostras permaneceram nessa solução a 4 °C durante a noite, garantindo um contraste eficiente. Após o contraste, as amostras foram lavadas e desidratadas gradualmente com etanol em concentrações de 70%, 80%, 90%, 95% e 100%, com imersões de 10 minutos em cada concentração. A desidratação foi finalizada com tratamento de 20 minutos com acetona pura para remover a água residual. O pellet desidratado foi embebido em resina de baixa viscosidade Spurr® (EMS), processo realizado em várias etapas para assegurar a infiltração uniforme ao material celular. As amostras foram polimerizadas em estufa a 60 °C por 24 horas, formando blocos rígidos prontos para corte.

Os blocos de resina foram submetidos à semifinagem para identificar as áreas de interesse, e cortes ultrafinos de 70 nm de espessura foram obtidos utilizando um ultramicrotomo Leica EM UC7. Os cortes foram colocados em grades de cobre e contrastados com citrato de chumbo a 0,02 M para proporcionar maior definição estrutural. As amostras contrastadas foram analisadas em microscópio eletrônico de transmissão Tecnai G2-12 (Thermo Fisher Scientific), e as imagens foram capturadas para avaliação detalhada da ultraestrutura das hiPSCs utilizadas.

#### **2.4. Imunofluorescência para o painel de pluripotência**

Para a caracterização fenotípica das hiPSCs utilizadas neste estudo, essas foram submetidas à marcação de proteínas reconhecidas como marcadores-chave de pluripotência. As hiPSCs, em passagem #25, foram cultivadas em placas de 48 poços em condições padrões e, posteriormente, submetidas a protocolo de imunofluorescência utilizando-se o *Embryonic Stem Cell Marker Panel* (Abcam). Inicialmente, o meio de cultura foi removido, e as células foram lavadas com PBS 1X. Em seguida, as células foram fixadas com solução de paraformaldeído (PFA) a 4% em PBS 1X por 20 minutos à temperatura ambiente. Após a fixação, o PFA foi removido, e as células foram lavadas três vezes com PBS 1X, com intervalos de 5 minutos.

Para a permeabilização, foi utilizada uma solução de Triton X-100 (Sigma) a 0,3% (30 µL de Triton X-100 diluídos em 10 mL de PBS 1X), incubando as células por 30 minutos à temperatura ambiente. A solução de permeabilização foi removida, seguida de três lavagens com PBS 1X por 5 minutos cada. O bloqueio antigênico foi realizado com PBS 1X contendo Tween 20 (Sigma) a 0,1% suplementado com 1% de albumina de soro bovino (BSA) (Sigma). As células foram incubadas nessa solução por 1 hora à temperatura ambiente. Após o bloqueio, a solução foi removida, e as células foram lavadas três vezes com PBS 1X por 5 minutos.

A marcação com os anticorpos primários anti-OCT4 (*rabbit IgG*, 1:500), anti-NANOG (*rabbit IgG*, 1:500), anti-TRA-1-60 (*mouse IgM*, 1:250), anti-SOX2 (*rabbit IgG*, 1:250), anti-SSEA4 (*mouse IgG*, 1:100) foi realizada em cada um dos poços selecionados para o experimento. Nos poços controles, foi adicionada apenas a solução de bloqueio, sem o anticorpo primário, para controle por omissão. As diluições dos anticorpos foram realizadas conforme padronizações prévias em nosso laboratório. As células foram incubadas *overnight* a 4 °C. No dia seguinte, o anticorpo primário foi removido, e as células foram lavadas três vezes com PBS 1X por 5 minutos.

Em seguida, foi realizada a marcação com anticorpos secundários específicos às origens de cada anticorpo primário, utilizando uma diluição de 1:375 em solução de bloqueio. As células foram incubadas com o anticorpo secundário por 2 horas à temperatura ambiente. Foram utilizados os anticorpos Alexa Fluor™ 488 *donkey anti-rabbit* (Invitrogen) e Alexa Fluor™ 633 *goat anti-mouse* (Invitrogen). Após a incubação, o anticorpo secundário foi removido, seguido de três lavagens com PBS 1X por 5 minutos. A coloração nuclear foi feita com DAPI (1 µg/mL), incubando as células por 5 minutos. Após a coloração, o DAPI foi removido, e as células foram lavadas três vezes com PBS 1X por 5 minutos. Finalmente, as células foram montadas utilizando 200 µL do meio de montagem Fluoromount G (Invitrogen). Para obter as imagens, utilizamos o equipamento Cytation 5 (Biotek), que possui filtros para todos os fluoróforos empregados neste experimento.

## 2.5. Cariotipagem

A fim de atestar a estabilidade genética das células empregadas no estudo, realizamos a cariotipagem das mesmas. As hiPSCs, em passagem #25, foram cultivadas conforme os padrões até aqui indicados por 3 dias até atingirem 70-80% de confluência, garantindo uma proporção ideal de células em proliferação. No dia da coleta, as placas de cultura foram lavadas com PBS 1X estéril a 37 °C para remover resíduos e manter a integridade do cultivo. Para interromper as células na fase de metáfase, foi adicionado o reagente KaryoMAX™ Colcemid™ (Gibco) (2 µL/mL de meio de cultura) diretamente às placas. As células foram incubadas por 18 minutos a 37 °C 5% CO<sub>2</sub>. Esse período foi cuidadosamente monitorado para evitar contração excessiva dos cromossomos, garantindo visualização clara dos cromossomos. O meio contendo a Colcemida foi transferido para tubos cônicos de 15 mL. As hiPSCs foram liberadas utilizando StemPro® Accutase (Gibco), coletadas e centrifugadas a 300 \* g por 10 minutos para formação de um pellet.

Após descartar o sobrenadante, as células foram submetidas a uma solução hipotônica de KCl 0,075 M (pré-aquecida a 37 °C), sendo incubadas por 15 minutos para promover o ingurgitamento das células e facilitar a separação dos cromossomos. As hiPSCs foram então fixadas utilizando fixador de Carnoy (3:1, metanol:ácido acético), adicionado gota a gota para evitar choque osmótico. O processo de fixação foi repetido três vezes, com lavagens e homogeneização suaves entre cada etapa, para eliminar células não metafásicas e garantir uma preparação cromossômica de qualidade. A suspensão celular foi cuidadosamente dispensada em lâminas de vidro, deixando-a cair em gotas de uma altura de aproximadamente 10 cm visando promover o espalhamento dos cromossomos. As lâminas foram aquecidas a 60 °C por 1 hora para secagem completa. Em seguida, foram submetidas ao processo de bandeamento G.

Para o bandeamento G, as lâminas foram envelhecidas por 24 horas em estufa a 60 °C. As lâminas envelhecidas foram tratadas com tripsina a 0,025% por 15 segundos, seguida de neutralização em meio DMEM (Gibco) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco) e coradas com Giemsa a 2% por 1 minuto. Após enxágue em água corrente e secagem ao ar, as lâminas foram montadas com Entellan e lamínulas, e seguiram para avaliação. Os cromossomos foram analisados sob microscópio óptico Apotome 2.0 (Zeiss) com lente de imersão 100X. Para identificação do cariótipo, os padrões de bandeamento foram avaliados e comparados com as descrições presentes na literatura acadêmica, permitindo a identificação de possíveis anomalias estruturais ou numéricas. Uma metáfase foi selecionada para montagem do cariógrama.

## **2.6. Viabilidade celular mediante a administração de diferentes drogas**

Os ensaios de viabilidade celular empregados neste estudo foram feitos utilizando o reagente *CellTiter-Blue*<sup>®</sup> *Cell Viability Assay* (Promega). O método baseia-se na capacidade das células vivas de converter o corante redox resazurina em resorufina, que emite fluorescência. Células inviáveis perdem rapidamente sua capacidade metabólica e, portanto, não geram sinal fluorescente.

Inicialmente, investigamos o comportamento da nossa linhagem de hiPSCs por meio da análise da curva de morte celular após a administração de antibióticos seletivos, visando sua posterior utilização na seleção de células geneticamente modificadas. Para esse experimento, hiPSCs na passagem #24 foram subcultivadas em placas de 96 poços previamente recobertas com Geltrex<sup>®</sup> (Gibco) e cultivadas em meio E8 completo, suplementado com RevitaCell<sup>™</sup> (Gibco). Após a contagem celular utilizando azul de Trypan (Nova Biotecnologia), foram

semeadas  $10^4$  células por poço, em um volume total de 100  $\mu\text{L}$  por poço, que foram e incubadas por 24 horas

Os fármacos blasticidina (Invitrogen) e puromicina (Sigma) foram dissolvidos em PBS 1X, para obter uma solução estoque a 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Diluições seriadas dos antibióticos foram preparadas em meio E8 completo, resultando em concentrações finais variando de 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  a 0,1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Cada diluição foi adicionada aos respectivos poços da placa, seguida de incubação por 48 horas. Os experimentos foram conduzidos em quatro replicatas técnicas para cada concentração de antibiótico. Foram incluídos dois grupos controle: um sem exposição a fármacos e outro sem células, permitindo a determinação do ruído de fluorescência do meio na placa. Após esse período inicial, o meio foi renovado, e a administração das diferentes concentrações de blasticidina e puromicina foi repetida a cada 48 horas, por um total de 8 dias.

Para avaliar a viabilidade celular após este período, foram adicionados 10  $\mu\text{L}$  de CellTiter-Blue<sup>®</sup> a cada poço, com agitação da placa para homogeneização, seguida de incubação por 4 horas, protegendo a placa da luz. A fluorescência foi então medida utilizando o equipamento Cytation 5 (Biotek) com excitação em 560 nm e emissão em 590 nm. Os resultados obtidos foram analisados para determinar a concentração letal de blasticidina e puromicina, servindo como guia para a futura aplicação nas hiPSCs editadas para genes de resistência aos antimicrobianos.

Em outra vertente, realizou-se ensaios de viabilidade celular em hiPSCs expostas a dois fármacos reconhecidos como adjuvantes no processo de inserção gênica sítio-dirigida: o Ácido Valproico (VPA) e o AZD 7648. O VPA é um inibidor conhecido de histona desacetilase (HDAC) que desempenha um papel importante na remodelação da cromatina, aumentando a acessibilidade do DNA às nucleases, como as utilizadas pelo sistema CRISPR/Cas9. Esse fármaco tem sido amplamente utilizado para melhorar a eficiência e precisão das modificações genéticas, principalmente em células pluripotentes. O AZD 7648 é um inibidor seletivo da via PI3K que regula processos celulares críticos, como crescimento, sobrevivência e resposta ao estresse. A inibição da via PI3K pelo AZD 7648 foi associada a uma redução do estresse celular e da ativação de mecanismos de reparo imprecisos, o que pode beneficiar a eficiência da edição gênica ao favorecer o reparo dirigido por homologia (HDR). A combinação desses dois fármacos visa potencializar os efeitos benéficos de ambos os mecanismos, otimizando protocolos de edição gênica em hiPSCs (Leal et al., 2024).

Para avaliar os impactos dessas drogas na viabilidade celular, hiPSCs foram plaqueadas em densidade de  $10^4$  células por poço em placas de 96 poços, totalizando três placas em passagem #32 para os experimentos. Cada grupo experimental foi submetido a condições idênticas no início do experimento, com os seguintes tratamentos: controle (sem fármacos), VPA (10  $\mu$ M) (Sigma), AZD 7648 (0,5  $\mu$ M) (Tocris) e a combinação de VPA e AZD 7648 (10  $\mu$ M e 0,5  $\mu$ M, respectivamente). Essas concentrações foram estabelecidas conforme os trabalhos de Takayama et al., 2017 e Selvaraj et al., 2024, respectivamente. Para cada condição experimental, foram realizadas oito replicatas técnicas por tempo de análise. Além disso, em cada placa experimental, uma fileira de poços sem células foi incluída como controle de fluorescência de fundo.

Os fármacos foram administrados no Dia 1 do experimento, após a adesão celular, e a viabilidade celular foi avaliada em três tempos distintos: 24, 48 e 72 horas após a exposição às drogas. Para a mensuração da viabilidade, também utilizamos o *CellTiter-Blue<sup>®</sup> Cell Viability Assay* (Promega). A fluorescência foi lida por meio do equipamento Cytation 5 (Biotek) com excitação em 560 nm e emissão em 590 nm, sendo os valores obtidos corrigidos pelo ruído de fundo dos poços sem células. Essa abordagem nos forneceu dados quantitativos sobre a capacidade de sobrevivência e metabolismo das hiPSCs em cada condição experimental, possibilitando comparar os efeitos farmacodinâmicos do VPA e AZD 7648 e sua combinação.

## **2.7. Avaliação da proliferação celular em células tratadas com VPA e AZD 7648**

Para avaliar a proliferação celular após a administração do VPA e do AZD 7648, utilizou-se o kit *Click-iT<sup>®</sup> EdU Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 Imaging* (Invitrogen). Este kit permite a detecção precisa de células em fase de síntese de DNA por meio da incorporação do nucleosídeo análogo EdU (5-etinil-2'-desoxiuridina). As hiPSCs em passagem #32 foram cultivadas em placas de 12 poços, com um volume total de 500  $\mu$ L de meio em todas as etapas experimentais. No dia 0 do experimento, as células foram plaqueadas a uma densidade inicial de  $10^5$  células por poço. Foram incluídos quatro grupos experimentais: controle (sem fármacos), tratamento com VPA, tratamento com AZD 7648, e tratamento combinado (VPA + AZD 7648), utilizando as mesmas concentrações previamente determinadas no experimento de viabilidade celular. A proliferação celular foi avaliada em três tempos distintos: 24, 48 e 72 horas após a administração dos tratamentos. Nos tempos estabelecidos, as células receberam uma solução de EdU à concentração final de 10  $\mu$ M preparada em meio E8 completo. Para tal, metade do volume de meio no poço (250  $\mu$ L) foi removida e substituída por 250  $\mu$ L da solução de EdU em E8,

totalizando novamente 500  $\mu$ L por poço. As células foram incubadas por 4 horas em incubadora a 37 °C 5% de CO<sub>2</sub>.

Após a incubação, as células foram fixadas com PFA a 4% em PBS 1X por 15 minutos, seguidas de duas lavagens com PBS 1X contendo 3% de BSA. Em seguida, a permeabilização foi realizada utilizando Triton<sup>®</sup> X-100 a 0,5% em PBS 1X por 20 minutos. As células foram novamente lavadas com PBS 1X + 3% BSA antes da etapa de detecção. O EdU incorporado foi detectado por meio do coquetel de reação fornecido pelo kit, preparado conforme as instruções do fabricante. Para isso, 500  $\mu$ L do coquetel de reação foram adicionados a cada poço, e as células foram incubadas por 30 minutos à temperatura ambiente, protegidas da luz. Após essa etapa, as células foram lavadas com PBS 1X + 3% BSA e incubadas com 500  $\mu$ L de solução de Hoechst diluído em PBS 1X (1:2000) por 30 minutos, visando a marcação nuclear. Após a marcação, as hiPSCs foram lavadas duas vezes com PBS 1X, e 500  $\mu$ L de PBS 1X foram adicionados a cada poço para preservação antes da análise. A fluorescência foi avaliada utilizando o equipamento Cytation 5 (Biotek), com excitação/emissão nos comprimentos de onda específicos do fluoróforo Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 (495/519 nm). Imagens representativas foram capturadas, e a intensidade de fluorescência foi quantificada para avaliar e comparar os níveis de proliferação celular entre os diferentes grupos experimentais e períodos de análise.

## **2.8. Indução à endoderma definitivo**

A indução ao endoderma definitivo foi realizada com o objetivo de estabelecer condições de cultivo que promovam a ativação da expressão dos genes *SOX17* e *PRDMI*. Embora o foco principal de nossas pesquisas seja o uso de linhagens repórteres para o estudo da oogênese *in vitro*, protocolos comerciais já disponíveis permitem a indução simultânea desses marcadores durante a diferenciação de hiPSCs em células do endoderma. Essa abordagem oferece uma alternativa prática para visualizar a expressão dos genes de interesse, evitando a necessidade de induzir as hiPSCs a hPGCLCs, um processo significativamente mais caro e laborioso em comparação à indução a endoderma.

Para padronizar a indução ao endoderma definitivo, foram utilizadas hiPSCs não modificadas geneticamente na passagem #29. As células foram cultivadas em condições otimizadas até atingirem a confluência ideal para subcultivo. A dissociação celular foi realizada utilizando Accutase, e as células foram contadas para plaqueamento. As hiPSCs foram semeadas em 16 poços de uma placa de 48 poços, com densidade de  $4 \times 10^4$  células por poço. 8 poços foram destinados à indução ao endoderma (grupo de indução) e os outros 8

permaneceram como hiPSCs (grupo controle). No dia seguinte ao plaqueamento (Dia 0), poços representativos de ambos os grupos foram fotografados. Em seguida, iniciamos o processo de indução ao endoderma utilizando o *PSC Definitive Endoderm Induction Kit* (Gibco), composto por dois Meios de Indução, A e B. O meio E8 foi removido de todos os poços, as células foram lavadas com PBS 1X, e 200 µL do Meio de Indução A foram adicionados aos poços do grupo de indução. Paralelamente, os poços do grupo controle receberam 200 µL de meio E8 completo. Após 24 horas (Dia 1), as células foram novamente fotografadas. O meio de indução A foi cuidadosamente substituído pelo Meio de Indução B nos poços do grupo de indução, enquanto os poços do grupo controle receberam E8 fresco. Após mais 24 horas (Dia 3), as células foram fotografadas uma última vez e, em seguida, fixadas em PFA 4% para caracterização imunofenotípica.

## **2.9. Imunofluorescência para marcadores de pluripotência e de endoderma**

Neste ponto, seguimos o protocolo de imunofluorescência descrito na seção 2.4. Os anticorpos anti-NANOG (*rabbit* IgG, 1:500) e anti-TRA-1-60 (*mouse* IgM, 1:250), ambos da Abcam, foram utilizados como marcadores positivos de células-tronco pluripotentes, e anti-SOX17 (*mouse* IgG, 1:100) (Invitrogen) e anti-PRDM1 (*goat* IgG, 1:50) (Abcam) como marcadores positivos de células endodérmicas. A detecção das marcações dos anticorpos primários foi realizada utilizando os anticorpos secundários Alexa Fluor™ 488 donkey anti-rabbit (Invitrogen), Alexa Fluor™ 546 donkey anti-goat (Invitrogen) e Alexa Fluor™ 633 goat anti-mouse (Invitrogen), todos diluídos na proporção de 1:375. O controle negativo por omissão do anticorpo primário também foi adotado nesta etapa, assim como a coloração nuclear utilizando DAPI (1 µg/ mL) e a montagem com Fluoromount G. As imagens foram registradas utilizando o equipamento Cytation 5 (Biotek).

## **2.10. qPCR para marcadores de endoderma definitivo**

Para uma caracterização mais detalhada das células endodérmicas derivadas de hiPSCs, realizamos a análise dos níveis de expressão gênica de genes relacionados à pluripotência e ao endoderma. Para a análise, cultivamos hiPSCs na passagem #29 em seis poços de uma placa de 6 poços, enquanto quatro placas de 6 poços foram induzidas à diferenciação, conforme a metodologia descrita na seção anterior. Essa diferença no número de placas foi necessária, pois a indução ao endoderma é eficaz apenas em placas com até 30% de confluência. Assim, enquanto um poço completamente confluyente foi suficiente para compor uma amostra de hiPSCs, foram necessários quatro poços com aproximadamente 25% de

confluência para gerar uma amostra de células endodérmicas. Dessa forma, trabalhamos com seis amostras de hiPSCs e seis amostras de células endodérmicas para a análise.

As amostras celulares foram coletadas utilizando Accutase, centrifugadas, ressuspensas em RNALater (Sigma) e armazenadas a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  até o momento da extração de RNA. Para a extração de RNA, utilizamos o kit *Quick-RNA<sup>TM</sup> Miniprep Plus* (Zymo Research). As amostras foram centrifugadas a  $500 \times g$  por 5 minutos, o RNALater foi descartado, e as células foram ressuspensas em  $300\text{ }\mu\text{L}$  de *RNA Lysis Buffer*. O lisado foi transferido para a coluna *Spin-Away<sup>TM</sup> Filter*, posicionada em um tubo coletor, e centrifugado a  $12000 \times g$  por 30 segundos. A coluna contendo o DNA genômico foi descartada, e o filtrado foi transferido para a coluna *Zymo-Spin<sup>TM</sup> IIIICG*, posicionada em um novo tubo coletor. Após nova centrifugação nas mesmas condições, o filtrado foi descartado, e a coluna foi lavada com  $400\text{ }\mu\text{L}$  de *RNA Wash Buffer*. Essa etapa foi seguida de um tratamento com  $80\text{ }\mu\text{L}$  de solução de DNase I ( $0,0625\text{ U}/\mu\text{L}$ ) por 15 minutos à temperatura ambiente. Em sequência, a coluna recebeu  $400\text{ }\mu\text{L}$  de *RNA Prep Buffer*, foi centrifugada novamente, e lavada duas vezes com *RNA Wash Buffer* ( $700\text{ }\mu\text{L}$  e  $400\text{ }\mu\text{L}$ , respectivamente). Finalmente, o RNA foi eluído em  $150\text{ }\mu\text{L}$  de água livre de nucleases e centrifugado a  $12000 \times g$  por 30 segundos.

As amostras foram então mantidas em gelo e quantificadas no espectrofotômetro Nanodrop<sup>®</sup> 2000 (Thermo Fisher Scientific). Para a síntese de cDNA, utilizamos  $160\text{ ng}$  de RNA de cada amostra, aplicando o kit *SuperScript<sup>®</sup> III First-Strand Synthesis System for RT-PCR* (Invitrogen). Inicialmente, o RNA foi incubado a  $65\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 5 minutos com  $50\text{ ng}$  de hexâmeros randômicos,  $10\text{ mM}$  de dNTP mix e água livre de nucleases, sendo posteriormente resfriado em gelo por 1 minuto. Em seguida, preparamos a mix de síntese de cDNA para 12 reações, contendo  $2\text{ }\mu\text{L}$  de *10X RT Buffer*,  $4\text{ }\mu\text{L}$  de  $25\text{ mM MgCl}_2$ ,  $2\text{ }\mu\text{L}$  de  $0,1\text{ M DTT}$ ,  $1\text{ }\mu\text{L}$  de *RNaseOUT<sup>TM</sup>* e  $1\text{ }\mu\text{L}$  de *SuperScript<sup>®</sup> III RT* por reação.  $10\text{ }\mu\text{L}$  dessa mix foram adicionados a cada amostra, seguidos de incubação a  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 5 minutos, a  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 50 minutos e finalizados a  $85\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 5 minutos. Após resfriamento em gelo,  $1\text{ }\mu\text{L}$  de RNase H foi adicionado a cada amostra, seguido de incubação a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 20 minutos. As amostras de cDNA foram então armazenadas a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  até a realização das qPCRs.

Utilizamos 10 genes para investigar a dinâmica de expressão gênica entre hiPSCs e células diferenciadas ao endoderma definitivo (Tabela 1). *GAPDH* (*glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*) e *ARBP* (*attachment region binding protein*) foram utilizados como genes endógenos. *NANOG* (*Nanog homeobox*) e *SOX2* (*SRY-Box transcription factor 2*) foram

utilizados como marcadores de pluripotência. *PDGFA* (*platelet-derived growth factor subunit A*) foi utilizado para acompanhar a perda do estado indiferenciado das hiPSCs, enquanto *SOX17* (*SRY-Box transcription factor 17*), *PRDM1* (*PR domain zinc finger protein 1*), *CXCR4* (*C-X-C chemokine receptor type 4*), *GATA6* (*GATA binding protein 6*) e *FOXA2* (*forkhead box protein A2*) foram utilizados como marcadores de endoderma.

**Tabela 1:** *Primers* utilizados para qPCR.

<i>Primer</i>	Sequência (5'-3')	Classe	Amplicom (pb)	TM (°C)	Referência
<i>GAPDH</i> FWD	GAAGGTCGGAGTCAACGGATTT	Gene endógeno	148	57.1	(Cai et al., 2013)
<i>GAPDH</i> REV	ATGGGTGGAATCATATTGGAAC			52.8	
<i>ARBP</i> FWD	GAAACTCTGCATTCTCGCTTCC	Gene endógeno	119	55.9	(Sakata et al., 2022)
<i>ARBP</i> REV	ACTCGTTTGTACCCGTTGATGA			56.3	
<i>NANOG</i> FWD	AGAGGTCTCGTATTTGCTGCAT	Marcador de pluripotência	120	56.3	(Yamashiro et al., 2018)
<i>NANOG</i> REV	AAACACTCGGTGAAATCAGGGT			56.7	
<i>SOX2</i> FWD	TGAATCAGTCTGCCGAGAATCC	Marcador de pluripotência	104	56.7	(Yamashiro et al., 2018)
<i>SOX2</i> REV	TCTCAAACCTGTGCATAATGGAGT			54.3	
<i>PDGFA</i> FWD	GGTGGTCACAGGTGCTTTT	Marcador de diferenciação	197	56	(Sriram et al., 2017)
<i>PDGFA</i> REV	AAACCACTTAAGGCTCTCAGGA			55.8	
<i>SOX17</i> FWD	TTCGTGTGCAAGCCTGAGAT	Marcador de endoderma	119	57	(Yamashiro et al., 2018)
<i>SOX17</i> REV	TAATATACCGCGGAGCTGGC			56.9	
<i>PRDM1</i> FWD	AAACCAAAGCATCACGTTGACA	Marcador de endoderma	133	55.7	(Yamashiro et al., 2018)
<i>PRDM1</i> REV	GGATGGATGGTGAGAGAAGCAA			56.9	
<i>CXCR4</i> FWD	CAGCAGGTAGCAAAGTGACG	Marcador de endoderma	208	56.2	(T. Li et al., 2011)
<i>CXCR4</i> REV	GTAGATGGTGGCAGGAAGA			56.4	
<i>GATA6</i> FWD	ACAGGGCGATTTCCTTTTCAGTT	Marcador de endoderma	92	57	(Wang X. et al., 2021)
<i>GATA6</i> REV	CTTCTGTTGGGGTAACGTCTG			57.6	
<i>FOXA2</i> FWD	ACCCGGTTTTATCCCTTGAATC	Marcador de endoderma	127	55	(Kang et al., 2024)
<i>FOXA2</i> REV	ATACAACCTGCAACCAGACAGG			57.2	

As reações de qPCR foram realizadas com 4 ng de cDNA e 500 nM de *primers forward* e *reverse*, utilizando a *GoTaq<sup>®</sup> qPCR Master Mix* (Promega). Cada reação foi conduzida em um volume total de 20 µL, composto por 10 µL de *GoTaq<sup>®</sup> qPCR Master Mix (2X)*, 1 µL de *primer forward* (10 µM), 1 µL de *primer reverse* (10 µM), 1 µL de cDNA ([ ] 4 ng) e 7 µL de água livre de nucleases. As reações foram realizadas em três replicatas técnicas, utilizando placas de qPCR (Biorad) seladas com filme óptico (Biorad). As qPCRs foram conduzidas no

termociclador Qiaquant 96 5 Plex (Qiagen), com leitura de fluorescência do corante *BRYT Green*<sup>®</sup> nas fases de extensão e na curva de dissociação (curva de *melting*). O programa do termociclador foi configurado com os parâmetros detalhados na Tabela 2.

**Tabela 2:** Programação da ciclagem utilizada para as reações de qPCR.

Passo do Ciclo	Temperatura	Tempo	Ciclos
Ativação da Polimerase	95 °C	2 minutos	1
Desnaturação	95 °C	15 segundos	40
Anelamento e Extensão	60 °C	1 minuto	
<i>Melting</i>	72-95 °C	15 minutos	1

Após a conclusão das reações, os valores de Ct foram obtidos e organizados em uma planilha do Excel (Microsoft) para posterior análise. A expressão média de cada gene-alvo nas diferentes populações celulares foi determinada por meio do método  $2^{-\Delta Ct}$ .

### 2.11. Desenho de *primers* e sgRNAs empregados na edição gênica por CRISPR/Cas9

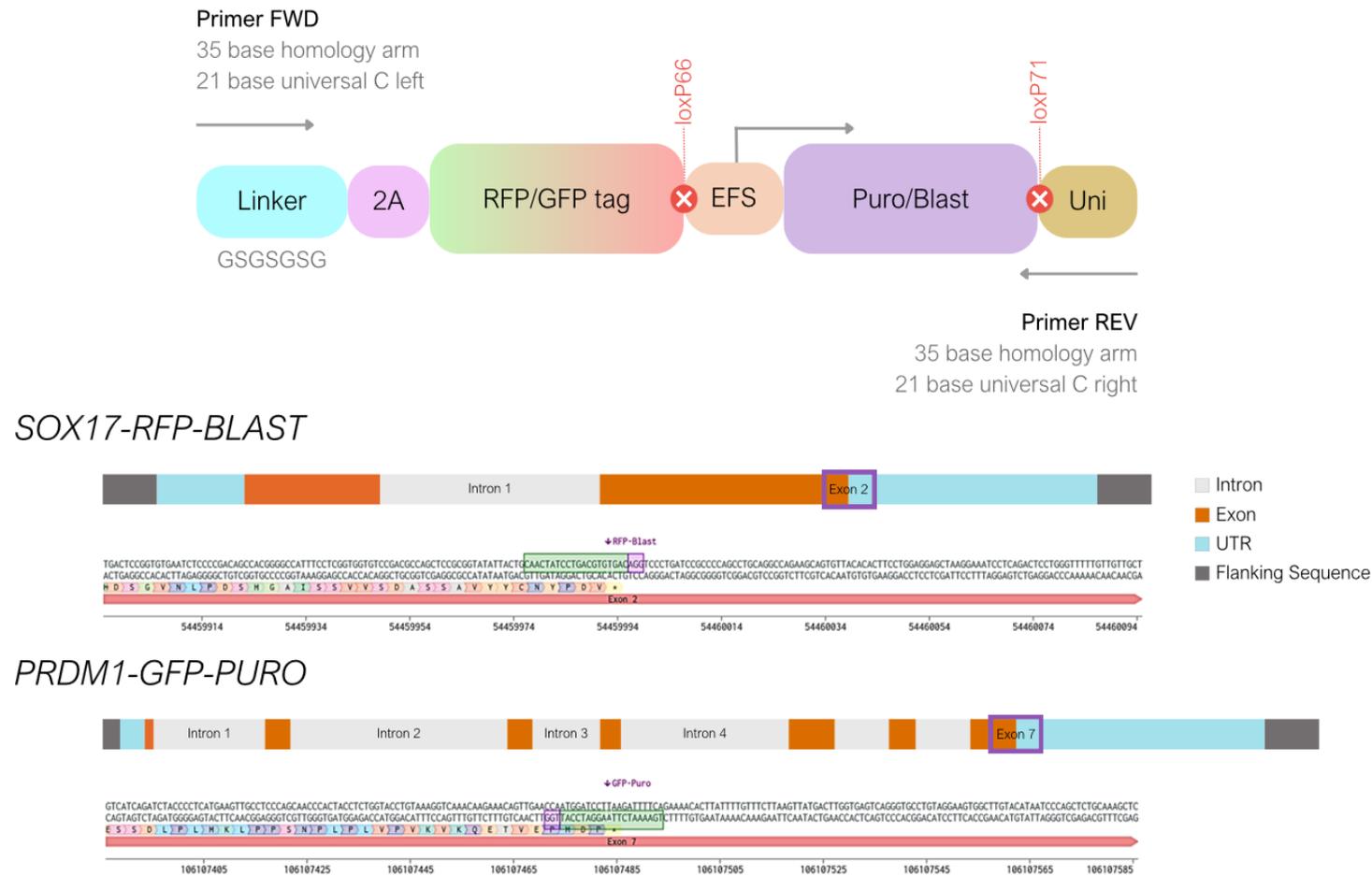
A maquinaria do reparo dirigido por homologia (HDR, do inglês *homology-directed repair*), que utiliza um modelo homólogo (DNA doador) para guiar o processo de reparo de quebras de fita dupla no DNA genômico, é essencial para os objetivos desse estudo. Para isso, sintetizamos *in vitro* um DNA doador de fita dupla (dsDNA) contendo braços de homologia específicos para nossos genes-alvo. Este dsDNA também possui, a jusante do último éxon, éxon 2 para o gene *SOX17* e do éxon 7 para o gene *PRDM1*, sequências genéticas que codificam proteínas fluorescentes, permitindo a detecção da expressão por meio da fluorescência gerada (Figura 1). Optamos por não fusionar diretamente as sequências das proteínas fluorescentes às sequências dos genes-alvo para garantir a expressão eficiente e a coexpressão independente, minimizando possíveis interferências na funcionalidade da proteína de interesse. Para isso, incluímos dois espaçadores aminoacídicos entre a sequência-alvo e a do gene repórter. Além disso, visando a purificação e seleção das hiPSCs geneticamente modificadas, incorporamos genes de resistência a antibióticos seletivos, cuja expressão é regulada pelo promotor ubíquo *EFS* (*elongation factor-1a short*). Assim, mesmo na ausência de expressão do gene repórter em células indiferenciadas, o gene de resistência é expresso. O construto também inclui as sequências *loxP66* e *loxP71*, possibilitando a remoção opcional dos genes de resistência por meio de recombinação sítio-específica mediada pela Cre-recombinase (Figura 1).

O design das sequências para síntese dos braços de homologia, a seleção dos alvos e o desenho dos gRNAs específicos foram realizados utilizando a plataforma *Invitrogen™ TrueDesign™ Genome Editor*. Após fornecermos os genes-alvo, o *software* gerou oligos para a síntese dos dsDNA, *primers* para sequenciamento e detecção do construto inserido no DNA genômico por HDR, além de prever incorporações *off-target* e estimar a eficiência do corte pela Cas9 nos sítios-alvo. Seguindo o fluxo de trabalho sugerido pela plataforma, selecionamos inicialmente o experimento de edição genética desejado, no caso, o *gene tagging*. Em seguida, indicamos a espécie (*Homo sapiens* hg38) e os genes-alvo: *SOX17* (NM\_022454.4) e *PRDMI*(NM\_001198.4). Após essa etapa, escolhemos adicionar *tags* fluorescentes a genes não expressos, considerando que ambos os genes permanecem inativos no estado indiferenciado das hiPSCs. Para minimizar possíveis impactos na funcionalidade do transcrito, as *tags* foram estrategicamente posicionadas na porção carboxi (C)-terminal dos genes.

Para o gene *SOX17*, selecionamos a proteína fluorescente vermelha (*red fluorescent protein*, RFP) como repórter, enquanto, para *PRDMI*, escolhemos a proteína fluorescente verde (*green fluorescent protein*, GFP). Quanto aos genes de resistência a antibióticos, utilizamos blasticidina para a linhagem *SOX17-RFP* e puromicina para a linhagem *PRDMI-GFP*. Como resultado, gerou-se pela plataforma as sequências dos gRNAs específicos para os alvos (Tabela 3), *primers* para sequenciamento, *primers* para verificação da integração do construto ao DNA genômico (PCR junctional e sequenciamento) e *primers* para a síntese dos braços de homologia no DNA doador via PCR convencional. Também foram fornecidas informações sobre a metodologia de entrega dos complexos de edição, que emprega o TrueTag™ *Donor DNA* (Invitrogen) em associação com os gRNAs específicos (sgRNAs) e proteína Cas9 de alta fidelidade (*TrueCut™ HiFi Cas9 protein*).

**Tabela 3:** Sequências-alvo dos sgRNAs utilizados no estudo no estudo.

sgRNA	Sequência-alvo	PAM	Eficiência (%)	Off-targets
<i>SOX17</i>	CAACTATCCTGACGTGTGAC	AGG	99,41	1
<i>PRDMI</i>	TGAAAATCTTAAGGATCCAT	TGG	95,09	9



**Figura 1: Estrutura dos cassetes para *knock-in* de *SOX17* e *PRDM1*.** O cassete genético apresenta uma organização modular composta por diferentes elementos funcionais: um *linker*, que consiste em um pequeno segmento de aminoácidos atuando como uma ponte entre os elementos traduzidos; a sequência 2A, que possibilita a tradução policistônica, permitindo a expressão das proteínas fluorescentes RFP/GFP de modo não fusionado aos produtos dos genes; o promotor *EFS*, que dirige a expressão do gene de resistência; os genes *Puro/Blast*, que conferem resistência a antibióticos (puromicina ou blasticidina) para seleção positiva; e a região Uni, que representa o final do cassete. O cassete também inclui as sequências *loxP66* e *loxP71*, utilizadas para remoção do cassete por recombinação mediada por Cre-recombinase. Além disso, os *primers* FWD e REV possuem uma região de homologia de 35 bases (*homology arm*) e uma sequência universal de 21 bases (*Universal C*), necessárias para a amplificação e integração do cassete no genoma por meio do reparo dirigido por homologia. Para *SOX17-RFP-BLAST*, o cassete contendo o marcador fluorescente vermelho (*RFP*) e o gene de seleção (*Blast*) é integrado no ponto específico localizado no éxon 2. A sequência detalhada apresenta a região ao redor do local de integração, com as regiões codificantes representadas em laranja e os íntrons em azul-claro. Já para *PRDM1-GFP-PURO*, o marcador fluorescente verde (*GFP*) e o gene de resistência à puromicina (*Puro*) são inseridos no éxon 7. A sequência detalhada segue a mesma lógica visual, exibindo éxons, íntrons e as sequências flanqueadoras.

**Tabela 4:** *Primers* de sequenciamento e de verificação para o *knock-in SOX17-RFP*.

<i>Primer</i>	Sequência (5'-3')
SOX17 SEQ FWD P1	GCATGACTCCGGTGTGAATC
SOX17 SEQ FWD P2	CCGCACGGAATTTGAACAGT
SOX17 SEQ REV P1	TGGAGGAAGCTGTTTTGGGA
SOX17 SEQ REV P2	CCCAAAGTGTTCAGTGGCA
TRUETAG C-2A-RFP-BLAST F2	TGCGGACGGTGCCGACAGGTGC
TRUETAG C-2A-RFP-BLAST R2	GGCTTGCCTTCGCCCTCGGATG

**Tabela 5:** *Primers* de sequenciamento e de verificação para o *knock-in PRDM1-GFP*.

<i>Primer</i>	Sequência (5'-3')
PRDM1 SEQ FWD P1	AGGGTGCAGCCTTTATGAGT
PRDM1 SEQ FWD P2	GGCCTGAAAGTGTCTTTGCA
PRDM1 SEQ FWD P3	AGGACGTGGAGGATGACATC
PRDM1 SEQ REV P1	CTTTGCCTTGTTTCATGCCCT
PRDM1 SEQ REV P2	TTCCAGAGGTGAGGGGAAAC
PRDM1 SEQ REV P3	TGTCGAGAGAGCTTTGCAGA
TRUETAG C-2A-GFP-PURO F2	GCCCTAGAACCTGGTGCATGAC
TRUETAG C-2A-GFP-PURO R2	CTTGTGGCCGTTTACGTCGCCG

### 2.12. *Inner-outer Overlapping PCR para amplificação do dsDNA*

Para a síntese dos dsDNA desejados, utilizamos o *template* fornecido pelos kits *TrueTag™ Donor DNA RFP/GFP Stem* (Invitrogen) e *primers* adaptadores especificamente desenhados para cada gene de interesse. Durante a execução dos experimentos, verificamos que os *primers* inicialmente fornecidos apresentavam extensões excessivas, o que frequentemente comprometia a eficiência das reações. Com base em nossas observações e em conformidade com sugestões do fabricante, implementamos uma abordagem otimizada, segmentando os *primers* em dois grupos distintos: *primers* internos e externos, denominados aqui como *inner* e *outer*, respectivamente. Os *primers outer* foram modificados com fosforotioato nas extremidades 5', com o objetivo de aumentar a eficiência de ligação aos alvos do *template*. Para montar as reações de PCR utilizou-se 25 µL da master mix 2X *Phusion™ Flash High Fidelity PCR Master Mix* (Applied Biosystems), 1 µL do *primer inner forward* a 0.5 µM, 1 µL do *primer inner reverse* a 0.5 µM, 1 µL do *primer outer forward* a 10 µM, 1 µL do *primer outer reverse* a 10 µM, 1 µL do *template* do DNA doador a 20 ng/µL, e 20 µL água livre de nucleases,

totalizando reações de 50  $\mu$ L. Foram feitas duas reações para cada gene. As reações de PCR para a síntese dos DNAs doadores foram realizadas utilizando o termociclador *Veriti™ 96-Well Thermal Cycler* (Applied Biosystems), seguindo o protocolo de ciclos descrito na Tabela 6.

Após a conclusão das reações, amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1% (Uniscience), preparado em tampão TAE 1X e corado com 0,0001% SYBR Safe (Invitrogen). 1  $\mu$ L da amostra foi coletado, misturado a 1  $\mu$ L de *Loading Buffer* (Phoneutria Biotecnologia e Serviços) e diluído em 8  $\mu$ L de água livre de nucleases. As amostras foram então carregadas nas cavidades do gel, previamente posicionadas na cuba de eletroforese contendo tampão TAE 1X. Para estimativa do tamanho dos fragmentos amplificados, utilizou-se o padrão de peso molecular *1 Kb Plus DNA Ladder* (Invitrogen). A eletroforese foi conduzida sob uma voltagem de 80 mV e corrente de 92 mA por 45 minutos. Em seguida, os géis foram analisados no transiluminador *BioDoc-It Imaging System* (UVP), e as imagens foram capturadas para posterior avaliação. Bandas específicas com tamanhos entre 1,4 e 1,8 kb foram consideradas satisfatórias, de acordo com as especificações do fabricante.

**Tabela 6:** Programação da ciclagem utilizada para a síntese dos dsDNA.

<b>Passo do Ciclo</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tempo</b>	<b>Ciclos</b>
Desnaturação Inicial	98 °C	10 segundos	1
Desnaturação	98 °C	1 segundo	
Anelamento	56 °C	5 segundos	35
Extensão	72 °C	45 segundos	
Extensão Final	72 °C	2 minutos	1
<i>Hold</i>	4 °C	$\infty$	1

Para realizar a purificação do DNA produzido, utilizamos o módulo *TrueTag™ PCR Purification* (Invitrogen), seguindo as etapas recomendadas. Todos os passos de centrifugação foram realizados em temperatura ambiente a 12.000 \* g. Antes do uso inicial do módulo de purificação, o *Wash Buffer* concentrado foi diluído com 9 mL de etanol 100%. Para a purificação, combinamos as duas reações de PCR concluídas, totalizando volume de 100  $\mu$ L em um único tubo. Em seguida, adicionamos 100  $\mu$ L de *Binding Buffer* ao produto de PCR, em uma proporção de 1:1, homogeneizando bem.

O volume de 200  $\mu$ L foi transferido para a coluna de purificação *GeneJET™*, e foi centrifugado por 60 segundos. O filtrado foi descartado, a base da coluna foi limpa em papel

toalha autoclavado, e 700  $\mu$ L de *Wash Buffer* diluído em etanol foram adicionados à coluna. Após nova centrifugação de 60 segundos, o filtrado foi descartado, as colunas foram secas em papel toalha autoclavado e reposicionadas no tubo de coleta. A coluna foi então centrifugada novamente, por mais 1 minuto, para garantir a remoção completa do *buffer* residual. Depois disso, a coluna foi transferida para um tubo livre de nucleases autoclavado de 1,5 mL. Foram adicionados 50  $\mu$ L de *Elution Buffer* (10 mM Tris-HCl, pH 8,5) ao centro da membrana, seguidos de centrifugação por 1 minuto. Após a eluição, a coluna foi descartada, e o DNA purificado foi quantificado em espectrofotômetro Nanodrop<sup>®</sup> 2000 (Thermo Fisher Scientific), a fim de estimar a concentração e a pureza dos dsDNA produzidos nesta etapa. Após a quantificação, o material foi mantido a -80 °C até o dia das transfecções.

**Tabela 7:** *Primers* utilizados para a síntese dos braços de homologia desejados. Os *primers* sombreados de laranja e verde demonstram os *primers* que serviram como modelo para elaboração das sequências *inner* e *outer*. Os asteriscos denotam as modificações fosforotioato nos *primers* *outer*.

<i>Primer</i>	Sequência (5'-3')
SOX17 C1 TRUETAG FWD	GCTCCGCGGTATATTACTGCAACTATCCTGACGTGGGAAGTGGCTCAGGTTCTGGA
SOX17 C1 TRUETAG REV	TCTGGCCTGCAGGCTGGGGCGGATCAGGGACCTGTCACTTGGCCGATCGCATACAGAG
SOX17 INNER FWD	TACTGCAACTATCCTGACGTGGGAAGTGGCTCAGGTTCTGGA
SOX17 INNER REV	GGGCGGATCAGGGACCTGTCACTTGGCCGATCGCATACAGAG
SOX17 OUTER FWD	G*C*TCCGCGGTATATTACTGCAACTATCCTGACGTG
SOX17 OUTER REV	T*C*TGGCCTGCAGGCTGGGGCGGATCAGGGACCTGTCA
PRDM1 C1 TRUETAG FWD	CTGTAAAGGTCAAACAAGAAACAGTTGAACCAATGGATCCTGGAAGTGGCTCAGGTTCTGGA
PRDM1 C1 TRUETAG REV	TTAAGAAACAAAATAAGTGTTTTCTGAAAATCTTACTTGGCCGATCGCATACAGAG
PRDM1 INNER FWD	ACAGTTGAACCAATGGATCCTGGAAGTGGCTCAGGTTCTGGA
PRDM1 INNER REV	AAGTGTTTTCTGAAAATCTTACTTGGCCGATCGCATACAGAG
PRDM1 OUTER FWD	C*T*GTAAAGGTCAAACAAGAAACAGTTGAACCAATGGATCCT
PRDM1 OUTER REV	T*T*AAGAAACAAAATAAGTGTTTTCTGAAAATCTTA

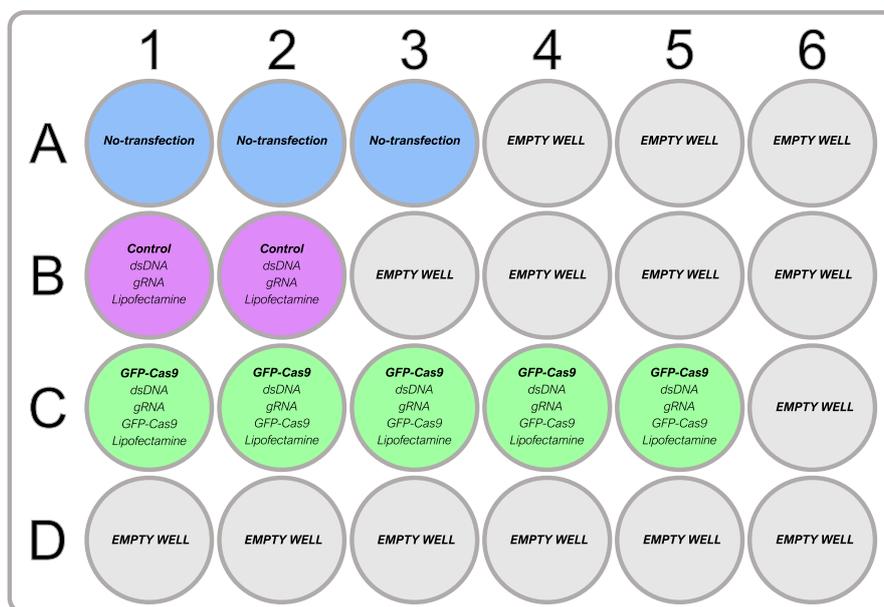
### 2.13. Ensaio piloto de transfecção e citometria de fluxo

Com o objetivo de padronizar as condições ideais de transfecção e avaliar a eficiência da entrega do complexo de edição, realizamos um ensaio piloto de transfecção celular utilizando uma variante da proteína Cas9 conjugada à GFP. Para isso, foram plaqueadas  $3 \times 10^4$  hiPSCs em passagem #25 em 10 poços de uma placa de 24 poços. Neste momento, estabelecemos que 3 poços seriam destinados à setagem do citômetro de fluxo, 2 seriam poços de controle da transfecção, em que há a omissão da Cas9-GFP no complexo de transfecção, e que 5 poços seriam destinados à transfecção com a Cas9-GFP (Figura 2). No dia seguinte ao plaqueamento, as células foram transfectadas de acordo com diretrizes estabelecidas pelo manual de uso do kit *TrueTag™ Donor DNA*. Antes da transfecção, os poços foram lavados com PBS 1X a fim de remover células mortas e debris decorrentes da passagem.

Para o grupo controle (gRNA + dsDNA), foi preparado o tubo 1 contendo 50  $\mu$ L de meio Opti-MEM (Gibco), 0,2  $\mu$ L de gRNA *SOX17* a 100 pmol/ $\mu$ L (Invitrogen), 600 ng de dsDNA *SOX17* e 5  $\mu$ L de *Lipofectamine Cas9 Plus Reagent* (Invitrogen). O tubo 2 foi preparado com 50  $\mu$ L de Opti-MEM e 3  $\mu$ L de *Lipofectamine CRISPRMAX Reagent* (Invitrogen). Após incubação do tubo 2 por 1 minuto, seu conteúdo foi adicionado ao tubo 1, seguido de homogeneização cuidadosa e incubação do complexo de transfecção a temperatura ambiente por 15 minutos. Em seguida, 50  $\mu$ L da mistura final foram distribuídos por gotejamento nos dois poços de controle negativo. Para o grupo GFP-Cas9 (gRNA + dsDNA + Cas9-GFP), foi preparado o tubo 1 contendo 125  $\mu$ L de meio Opti-MEM, 1,5  $\mu$ L de *Alt-R™ S.p. Cas9-GFP V3* (IDT), 0,5  $\mu$ L de gRNA *SOX17* a 100 pmol/ $\mu$ L, 1500 ng de dsDNA *SOX17* e 12,5  $\mu$ L de *Lipofectamine Cas9 Plus Reagent*. O tubo 2 foi preparado com 125  $\mu$ L de Opti-MEM e 7,5  $\mu$ L de *Lipofectamine CRISPRMAX Reagent*. Após incubação do tubo 2 por 1 minuto, seu conteúdo foi adicionado ao tubo 1, seguido de homogeneização cuidadosa e incubação do complexo de transfecção a temperatura ambiente por 15 minutos. Por fim, 50  $\mu$ L da mistura final foram distribuídos por gotejamento nos cinco poços experimentais. Neste momento, incubamos a placa por 1 hora a 37 °C 5% CO<sub>2</sub>. Após transcorrido este período, 450  $\mu$ L de meio E8 completo foi adicionado a cada poço, e as placas foram então analisadas no equipamento Cytation 5 (Biotek), em que se mensurou a intensidade de fluorescência dos poços utilizando filtro GFP.

Após esta etapa, procedemos com o preparo para citometria de fluxo para quantificar o número de hiPSC-GFP positivas. Para isso, o meio foi removido de cada poço, as células

foram lavadas com PBS 1X e em seguida foi aplicado 100  $\mu$ L de Accutase a cada poço. As placas foram então incubadas por 6 minutos a 37 °C 5% CO<sub>2</sub>, e em seguida, a enzima foi inativada com 200  $\mu$ L de meio E8 completo. As hiPSCs foram então transferidas para microtubos de 1,5 mL com fundo cônico e centrifugadas a 300 \* g por 8 minutos a 4 °C, a fim de favorecer a formação de pellets. O sobrenadante foi descartado e os pellets foram ressuspensos em 200  $\mu$ L de PBS 1X + 2% BSA + 0.024 mM EDTA. As células de poços não-transfectados foram então reunidas em um único tubo de citometria para serem utilizados na setagem do citômetro *FACScan* (B&D). As células provenientes dos poços-controle compuseram uma única amostra, e cada um dos 5 poços experimentais expostos à transfecção com gRNA, dsDNA e Cas9-GFP foram tratados como amostras individuais.



**Figura 2:** Diagrama da placa utilizada no ensaio-piloto de transfecção.

Um gráfico de dispersão FSC-A vs. SSC-A foi utilizado para separar as hiPSCs de detritos e agregados através do estabelecimento de um *gate*. As células não transfectadas foram utilizadas para definir o limiar da fluorescência basal. Para isso, um histograma GFP (canal FL1) vs. contagem de eventos foi utilizado para estabelecer um *threshold* de fluorescência, acima do qual as hiPSCs foram consideradas positivas para GFP. A porcentagem de células GFP positivas foi determinada com base no número de eventos dentro do *gate* GFP<sup>+</sup> em relação ao total de células viáveis analisadas, indicando eficiência de internalização do complexo gRNA-Cas9 e dsDNA. *Dot plots* representativos de SSC vs. fluorescência (GFP) foram gerados para ilustrar a distinção entre hiPSCs não transfectadas daquelas eficientemente transfectadas.

#### 2.14. Transfecção dos dsDNA SOX17-RFP e PRDM1-GFP

Com todo o procedimento devidamente delineado, o DNA doador sintetizado, a padronização da transfecção concluída e a metodologia de detecção estabelecida, iniciamos a transfecção definitiva. Neste estágio, foram incluídas administrações dos fármacos ácido valproico (VPA) e AZD 7648 (inibidor da DNA-PK), com o objetivo de avaliar seus possíveis efeitos na eficiência do *knock-in*.

No Dia 0, hiPSCs saudáveis em cultivo (passagem #32) foram plaqueadas na densidade de  $3 \times 10^4$  células por poço em duas placas de 24 poços previamente tratadas com Geltrex: uma destinada à geração do *knock-in SOX17-RFP* e outra à geração do *knock-in PRDM1-GFP*. No Dia 1, em cada placa, foram estabelecidos quatro grupos experimentais (n = 6 replicatas): Grupo controle, Grupo sem fármacos, Grupo VPA, que recebeu tratamento com 10  $\mu$ M do composto 24 horas antes da transfecção e Grupo AZD 7648, que recebeu tratamento com 0,5  $\mu$ M do composto 24 horas antes da transfecção (Figura 3). No Dia 2, transcorridas 24 horas após a administração dos fármacos, foi realizada a lipofecção para ambos os genes-alvos. Para o grupo controle negativo (gRNA + dsDNA), iniciamos o preparo do Tubo 1, em que foram adicionados 150  $\mu$ L de meio Opti-MEM (Gibco), 0,6  $\mu$ L de gRNA *SOX17/PRDM1* a 100 pmol/ $\mu$ L (Invitrogen), 1800 ng de dsDNA *SOX17/PRDM1* e 5  $\mu$ L de *Lipofectamine Cas9 Plus Reagent* (Invitrogen). Seguimos com o preparo do tubo 2, com a adição de 150  $\mu$ L de Opti-MEM e 9  $\mu$ L de *Lipofectamine CRISPRMAX Reagent* (Invitrogen), seguido de incubação por 1 minuto. O conteúdo do tubo 2 foi adicionado ao tubo 1, com homogeneização cuidadosa e incubação à temperatura ambiente por 15 minutos. Por fim, 50  $\mu$ L da mistura final foram distribuídos, por gotejamento, nos seis poços destinados ao controle negativo.

Para os grupos sem fármacos, VPA e AZD 7648, estabelecidos como grupos teste (gRNA + dsDNA + Cas9), o preparo foi realizado de forma similar. O tubo 1 recebeu 450  $\mu$ L de meio Opti-MEM, 5,4  $\mu$ L de *TrueCut™ HiFi Cas9* (Invitrogen), 1,8  $\mu$ L de gRNA *SOX17/PRDM1* a 100 pmol/ $\mu$ L (Invitrogen), 5400 ng de dsDNA *SOX17/PRDM1* e 45  $\mu$ L de *Lipofectamine Cas9 Plus Reagent*. Adiante, o tubo 2 foi preparado com a adição de 450  $\mu$ L de Opti-MEM e 27  $\mu$ L de *Lipofectamine CRISPRMAX Reagent*, seguido de incubação por 1 minuto. O conteúdo do tubo 2 foi adicionado ao tubo 1, com homogeneização cuidadosa e incubação à temperatura ambiente por 15 minutos. Por fim, 50  $\mu$ L da mistura final foram distribuídos, por gotejamento, nos 18 poços experimentais.



**Figura 3:** Diagrama do experimento de transfecção. Foram utilizadas 2 placas de 24 poços, uma para cada gene.

As placas foram incubadas por 1 hora a 37 °C 5% CO<sub>2</sub>. Após esse período, foram adicionados 450 µL de meio E8 completo em cada poço, e as placas retornaram à incubadora. O cultivo prosseguiu com trocas diárias de meio até que as hiPSCs se recuperassem da transfecção. Duas passagens sequenciais foram realizadas utilizando ReLeSR, com o objetivo de remover possíveis células diferenciadas e expandir a população celular para sua utilização em experimentos subsequentes. Após a propagação das hiPSCs provenientes dos diferentes grupos experimentais, uma fração das células foi criopreservada, enquanto outra foi submetida à indução à endoderma para avaliação visual da inserção (*knock-in*) dos repórteres fluorescentes. Além disso, uma parte das células obtidas foi destinada à extração de DNA genômico (gDNA) para a realização dos experimentos de PCR juncional, visando confirmar a integração dos construtos no genoma.

### 2.15. Detecção da RFP e da GFP em células *knock-in*

As células transfectadas, já em passagem #34, foram plaqueadas em 2 placas de 24 poços: uma contendo as presumíveis hiPSCs-*SOX17-RFP*, e outra contendo as presumíveis hiPSCs-*PRDMI-GFP*. Os grupos experimentais adotados no experimento de transfecção foram mantidos neste experimento. Portanto, para cada placa, haviam 6 poços do grupo controle, 6 poços do grupo sem fármacos, 6 poços do grupo VPA e 6 poços do grupo AZD 7648. Foram plaqueadas  $3 \times 10^4$  células por poço. Após as primeiras 24 horas de cultivo, empregou-se a indução à endoderma definitivo, seguindo as etapas mencionadas na seção 2.11. No terceiro dia de indução, as placas foram levadas para o equipamento Cytation 5 (Biotek), onde foram examinadas e capturadas sob o campo claro, filtro RFP, no caso das presumíveis hiPSCs-*SOX17-RFP* e filtro GFP no caso das presumíveis hiPSCs-*PRDMI-GFP*.

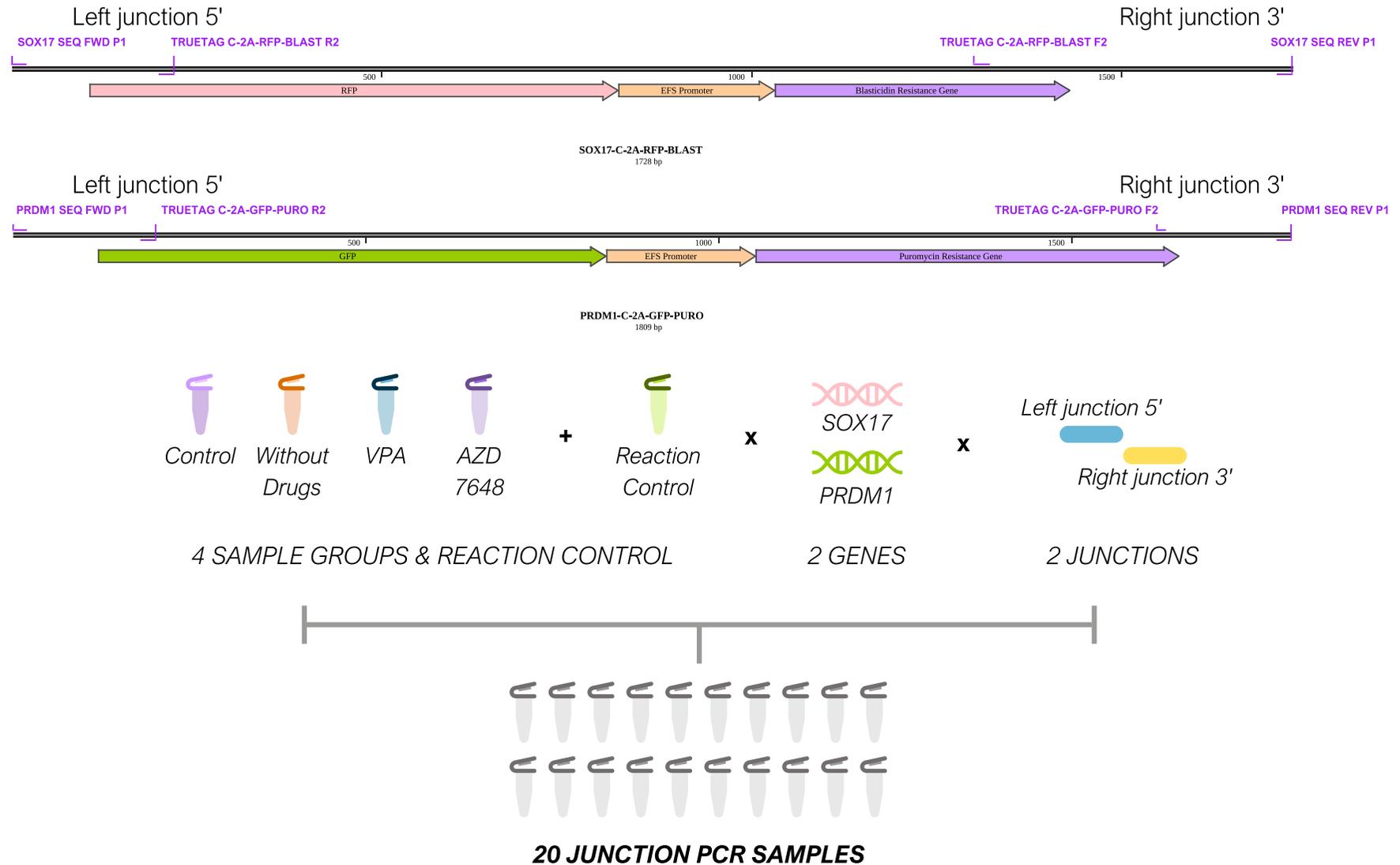
## 2.16. PCR juncional para detecção do *knock-in*

Para realizar a extração de gDNA das células transfectadas e proceder à análise das junções entre os genes-alvo e o inserto da sequência codificadora de proteínas fluorescentes e genes de resistência, utilizou-se o Kit de Extração de *DNA/RNA Sample Flex* (Phoneutria Biotecnologia e Serviços). Primeiramente, as células foram coletadas com Accutase seguindo os procedimentos mencionados em seções anteriores. Em seguida, os tubos com as células foram centrifugados a 500 \* g por 7 minutos a 4 °C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado, e o pellet de células foi ressuscitado em 140 µL de PBS 1X, sendo posteriormente transferido para um tubo de lise. No tubo de lise, adicionaram-se 4 µL de Proteinase K (PK) reconstituída e 200 µL de tampão ALR-PK. Os tubos foram misturados brevemente em vórtex e incubados a 56 °C por 1 hora e 30 minutos. Após o período de incubação, 400 µL de solução de lise foram acrescentados a cada tubo, com subsequente homogeneização utilizando micropipeta de 1000 µL. Os tubos foram mantidos à temperatura ambiente por 10 minutos. Em sequência, adicionaram-se 2 µL de carreador e 100 µL de etanol 100% a cada tubo de lise, com nova homogeneização. O volume total de cada tubo, foi transferido para uma coluna de sílica acoplada a um tubo coletor. Os tubos foram centrifugados por 3 minutos a 6000 \* g. Após a centrifugação, as colunas foram transferidas para novos tubos coletores e receberam 350 µL de solução A, sendo centrifugadas novamente a 10000 \* g por 30 segundos. Em seguida, 400 µL de solução B foram adicionados às colunas, que foram centrifugadas novamente sob as mesmas condições. Posteriormente, as colunas foram realocadas para novos tubos coletores e submetidas a mais uma centrifugação a 10000 \* g por 3 minutos. Após essa etapa, as colunas foram transferidas para tubos de eluição, onde permaneceram à temperatura ambiente, com as tampas abertas, por 10 minutos. Em seguida, 50 µL de tampão de eluição foram aplicados diretamente no centro de cada coluna, e as amostras foram incubadas à temperatura ambiente, com as tampas fechadas, por 3 minutos. Finalmente, realizou-se uma última centrifugação a 10000 \* g por 3 minutos para recuperar o gDNA adsorvido à membrana de sílica. Conforme as recomendações do fabricante, o gDNA extraído e purificado foi armazenado a -20 °C. Além disso, as colunas de sílica foram identificadas e também armazenadas na mesma temperatura, permitindo uma nova eluição, caso necessário. Após este processo, as amostras foram quantificadas em Nanodrop® 2000 (Thermo Fisher Scientific).

As reações de PCR juncional foram realizadas para detectar a presença dos construtos projetados pela plataforma *TrueDesign*™, sendo conduzidas a partir dos procedimentos destacados por (Chaudhari et al., 2020) com adaptações: para a junção 5' das presumíveis

hiPSCs *SOX17-RFP*, as reações foram configuradas com o *primer forward* de sequenciamento (SOX17 SEQ FWD P1: 5'-GCATGACTCCGGTGTGAATC-3') e o *primer reverse* específico para a porção C-2A-RFP-Blast (TRUETAG C-2A-RFP-BLAST R2: 5'-GGCTTGCCTTCGCCCTCGGATG-3'). Para a junção 3', utilizamos o *primer forward* para a porção C-2A-RFP-Blast (TRUETAG C-2A-RFP-BLAST F2: 5'-TGCGGACGGTGCCGACAGGTGC-3') e o *primer reverse* de sequenciamento (SOX17 SEQ REV P1: 5'-TGGAGGAAGCTGTTTTGGGA-3') (Figura 4). Para as presumíveis hiPSCs *PRDMI-GFP*, a PCR da junção 5' foi conduzida com o *primer forward* de sequenciamento (PRDMI SEQ FWD P1: 5'-AGGGTGCAGCCTTTATGAGT-3') e o *primer reverse* para a porção C-2A-GFP-Puro (TRUETAG C-2A-GFP-PURO R2: 5'-CTTGTGGCCGTTTACGTCGCCG-3'). Para a junção 3', utilizamos o *primer forward* para a porção C-2A-GFP-Puro (TRUETAG C-2A-GFP-PURO F2: 5'-GCCCTAGAACCTGGTGCATGAC-3') e o *primer reverse* de sequenciamento (PRDMI SEQ REV P1: 5'-CTTTGCCTTGTTTCATGCCCT-3') (Figura 4).

Com duas reações de PCR para cada amostra, realizamos cinco reações para a PCR da junção 5' das hiPSCs *SOX17-RFP*, abrangendo as amostras SOX17 Controle, SOX17 Sem Fármacos, SOX17 VPA, SOX17 AZD 7648 e um controle da reação em que água foi utilizada no lugar do DNA genômico. De modo semelhante, cinco reações foram realizadas para a PCR da junção 3'. Para as hiPSCs *PRDMI-GFP*, também realizamos cinco reações para cada junção, seguindo os mesmos grupos de amostras mencionados (Figura 4). As reações foram preparadas com 25 µL da *mastermix 2X Phusion™ Flash High Fidelity PCR Master Mix* (Applied Biosystems), 1 µL de *primer forward* a 20 µM, 1 µL de *primer reverse* a 20 µM, 50 ng de DNA genômico e água para completar 50 µL. A amplificação foi realizada em termociclador *Veriti™ 96-Well Thermal Cycler* (Applied Biosystems), seguindo os parâmetros de ciclagem apresentados na Tabela 6. Após a PCR, as amostras foram analisadas por eletroforese capilar utilizando o equipamento *TapeStation 4150* (Agilent) e a *High Sensitivity D1000 ScreenTape* (Agilent). Para a preparação, 2 µL de cada amostra, ajustadas para uma concentração de 1000 pg, foram misturados com 2 µL de tampão de amostra fornecido pelo fabricante. O eletroferograma e os tamanhos em pares de bases dos picos foram utilizados para interpretar os resultados. Conforme o desenho de nossos construtos, consideramos como *knock-in* positivas as hiPSCs *SOX17-RFP* que apresentassem amplicons de aproximadamente 219 pb na junção 5' e 429 pb na junção 3'. Para as hiPSCs *PRDMI-GFP*, os amplicons esperados foram de aproximadamente 202 pb na junção 5' e 197 pb na junção 3'.



**Figura 4: Representação dos cassetes genéticos *SOX17-C-2A-RFP-BLAST* e *PRDM1-C-2A-GFP-PURO* integrados e planejamento experimental para análises de PCR junctional.** Na parte superior, o cassete *SOX17-C-2A-RFP-BLAST* é representado. As junções de integração 5' e 3' são destacadas com os *primers* específicos usados para amplificação de cada junção. Da mesma forma, o cassete *PRDM1-C-2A-GFP-PURO* é mostrado com as junções de integração 5' e 3' indicadas e os respectivos *primers*. Na parte inferior, o planejamento experimental de PCR Junctional é apresentado, abrangendo quatro grupos experimentais (controle, sem fármacos, VPA e AZD 7648) e um controle de reação. Dois genes são avaliados (*SOX17* e *PRDM1*), e duas junções são analisadas para cada gene (5' e 3'), totalizando 20 amostras de PCR obtidas a partir do cruzamento entre as condições experimentais, os genes e as junções.

### 2.17. Seleção das células geneticamente modificadas

Para iniciar o processo de seleção das células geneticamente modificadas, seguimos as condições descritas no tópico 2.6. Inicialmente, as hiPSCs *SOX17-RFP* e *PRDMI-GFP*, provenientes dos quatro grupos experimentais, foram plaqueadas em poços individuais de 35 × 10 mm. As células foram cultivadas até atingirem aproximadamente 50% de confluência. Nesse estágio, iniciou-se a administração dos antibióticos: blasticidina, na concentração de 1,6 µg/mL, para as hiPSCs *SOX17-RFP*, e puromicina, na concentração de 0,8 µg/mL, para as hiPSCs *PRDMI-GFP*. Os antibióticos foram adicionados ao meio de cultura a cada dois dias, correspondendo à frequência de troca do meio. As hiPSCs foram mantidas sob essas condições por um período de 8 dias. Durante esse intervalo, registros fotográficos representativos dos poços foram realizados nos dias 0, 2, 4, 6 e 8 de seleção com os antibióticos.

### 2.18. Análises estatísticas

As curvas de morte celular em resposta à administração de antibióticos seletivos foram geradas a partir da transformação logarítmica das intensidades de fluorescência registradas durante o experimento. Em seguida, realizou-se uma regressão não linear desses valores para obter a curva de morte celular em função das drogas. As análises estatísticas para comparações entre grupos foram conduzidas utilizando ANOVA unidirecional (*One-Way ANOVA*), considerando-se diferenças estatisticamente significativas para  $p < 0,05$ . Nos experimentos de qPCR, os níveis médios de expressão dos genes-alvo em hiPSCs e células do endoderma definitivo foram determinados pelo método  $2^{-\Delta Ct}$  e expressos em escala log<sub>2</sub>, conforme recomendado por Schmittgen e Livak (2008). Para a comparação entre os dois grupos, foi aplicado o teste t de Student. Todas as análises estatísticas foram feitas utilizando o software GraphPad Prism V.8. O programa também foi utilizado para plotar os gráficos presentes no estudo.

### 3. RESULTADOS

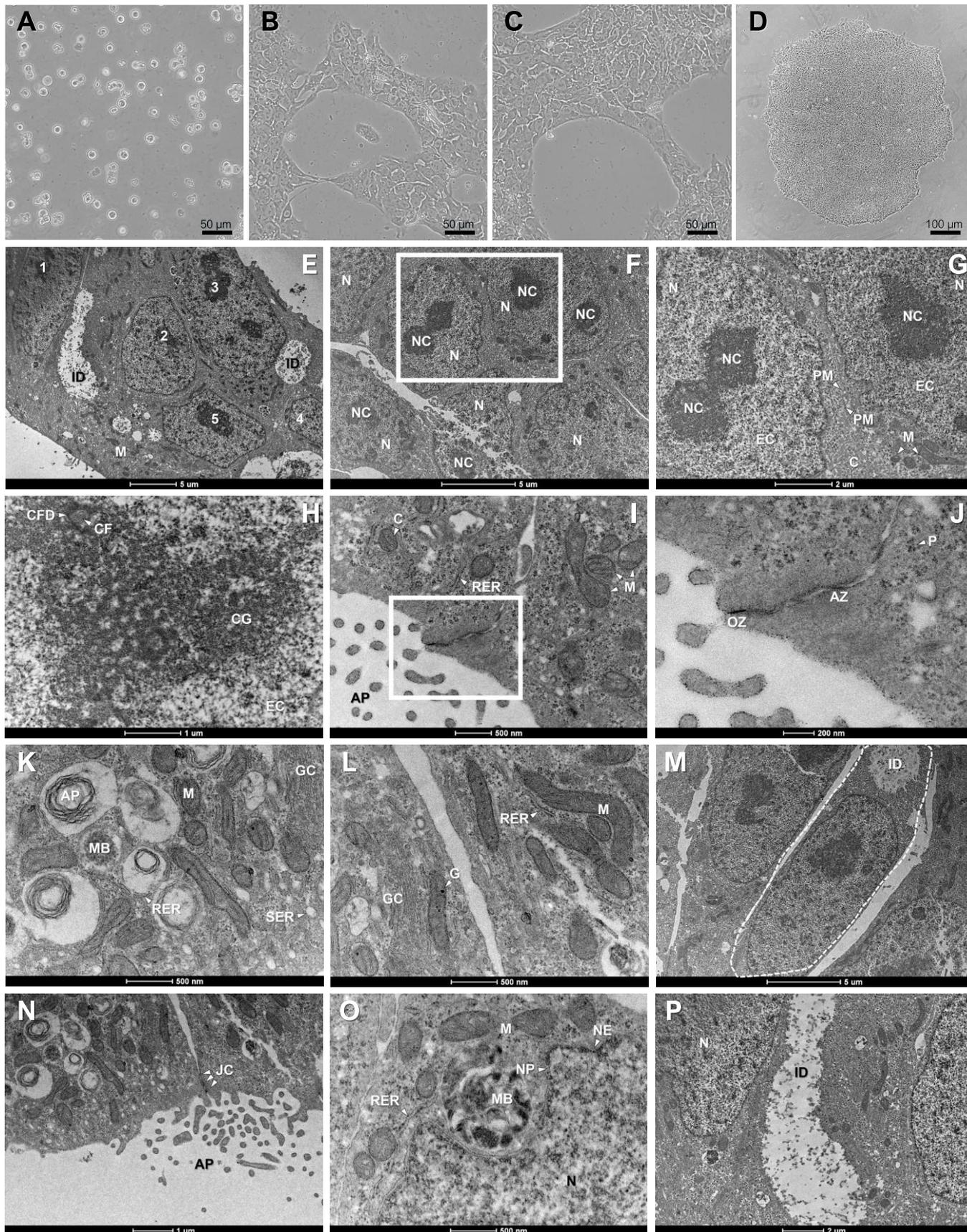
#### 3.1. Caracterização das hiPSC71: Morfologia, Ultraestrutura, Fenótipo e Perfil Genético

Nas observações de rotina, as células analisadas (hiPSC71, passagem #24). exibiam características típicas de hiPSCs, confirmando sua identidade e qualidade do cultivo. As colônias apresentam morfologia compacta e arredondada, com bordas bem definidas, características clássicas de hiPSCs saudáveis (Figura 5D). As células também demonstram altas taxas de proliferação, formando colônias densas em curto intervalo de tempo. Além disso, possuem excelente capacidade de recuperação após passagens e ciclos de descongelamento, mantendo sua integridade morfológica e viabilidade. A morfologia nuclear é consistente com o perfil pluripotente, exibindo núcleos grandes, com proporção núcleo-citoplasma elevada, e eucromatina predominante. Outro aspecto relevante é a ausência de diferenciação espontânea, mesmo após sucessivas passagens, o que destaca a estabilidade do cultivo e a excelência das condições de manutenção utilizadas.

Aprofundando essas observações, quanto à ultraestrutura, as células analisadas apresentaram características ultraestruturais bastante consistentes. A fixação realizada diretamente na superfície de cultura preservou bem a morfologia das colônias de hiPSC, permitindo a observação de um agrupamento de células intimamente associadas (Figura 5E) com diversos complexos juncionais (Figuras 5I, 5J, 5N). As células na periferia da colônia exibem uma morfologia semelhante à de células epiteliais (Figura 5M), conforme previamente relatado na literatura. Também foi observada uma complexa rede de comunicação intercelular formada por projeções de actina, conhecidas como ductos internos (Figuras 5E e 5P).

As hiPSCs analisadas apresentam uma abundância de mitocôndrias alongadas, refletindo seu elevado metabolismo energético (Figura 5L). Além disso, foram identificados numerosos polissomos livres e uma presença significativa de cisternas do retículo endoplasmático rugoso, indicando alta atividade de síntese proteica (Figuras 5J, 5K). O núcleo, que ocupa grande parte do volume celular, apresenta predominância de eucromatina com dois ou mais nucléolos bem definidos, onde as três regiões ultraestruturais são claramente distinguíveis (Figura 5H). Outros compartimentos, como endossomos, corpos multivesiculares, o complexo de Golgi e o retículo endoplasmático liso, também são facilmente observados (Figura 5K, 5L, 5O). A presença de componentes associados a vias de degradação é considerada

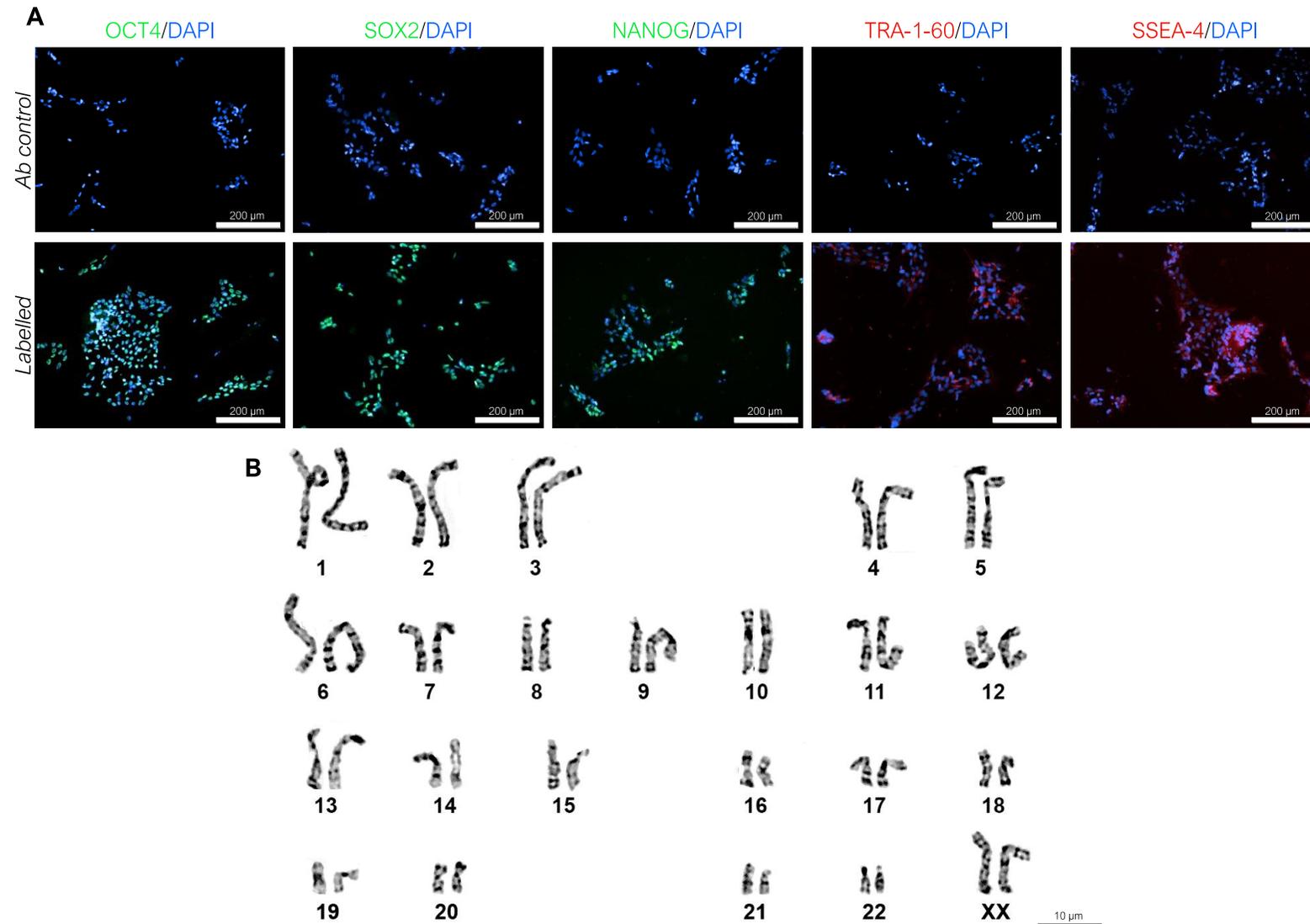
padrão normal, visto que não abrange todas as células observadas. Relacionamos estes achados ao cultivo a longo termo, dado que estas células se encontravam em passagem #24.



**Figura 5: Aspectos morfológicos da linhagem hiPSC71 em passagem #24.** As figuras A-D representam a morfologia das células ao microscópio óptico após descongelamento, 24, 48 horas após o descongelamento e em 1 semana de cultivo. Painéis de E-P apresentam a ultraestrutura das hiPSCs utilizadas na pesquisa. O polígono destacado em F foi ampliado em G, assim como o polígono presente em I é ampliado em J. **ID** = ductos internos, **N** = núcleo, **NC** = nucléolo, **PM** = membrana plasmática, **EC** = eucromatina, **CFD** = centro fibrilar denso, **CF** = componente fibrilar, **CG** = componente granular, **C** = cisternas mitocondriais, **RER** = retículo endoplasmático rugoso, **M** = figuras mitocondriais, **AP** = projeções de actina, **OZ** = junção oclusiva, **AZ** = zônula de adesão, **P** = polissomos livres, **AP** = autofagossomos, **MB** = corpos multivesiculares, **GC** = complexo de Golgi, **SER** = retículo endoplasmático liso, **G** = grânulo de glicogênio, **JC** = complexos juncionais, **NE** = envelope nuclear. Escalas estão discriminadas em cada painel.

As hiPSCs empregadas nesta pesquisa também demonstraram marcação positiva para todos os anticorpos do painel de pluripotência utilizado. A expressão desses marcadores foi confirmada por imunofluorescência, revelando sua localização nuclear para os fatores de transcrição OCT4, NANOG e SOX2, reguladores da pluripotência, e sua distribuição na superfície celular para os receptores TRA-1-60 e SSEA-4, característicos de células pluripotentes (Figura 6A). Esses resultados corroboram a manutenção do fenótipo pluripotente nas condições de cultura utilizadas, assegurando que as hiPSCs permanecem aptas a serem diferenciadas em diversos tipos celulares e válidas para os experimentos subsequentes.

Por fim, a análise cariotípica confirmou que as células analisadas apresentam um cariótipo normal, sem alterações cromossômicas detectáveis. O cariótipo identificado foi 46, XX, consistente com o padrão cromossômico esperado para células humanas femininas, indicando a estabilidade genômica (Figura 6B). Todos esses resultados indicam a qualidade das hiPSCs utilizadas, reforçando sua adequação para estudos subsequentes e garantindo a confiabilidade dos dados obtidos nos experimentos conduzidos.

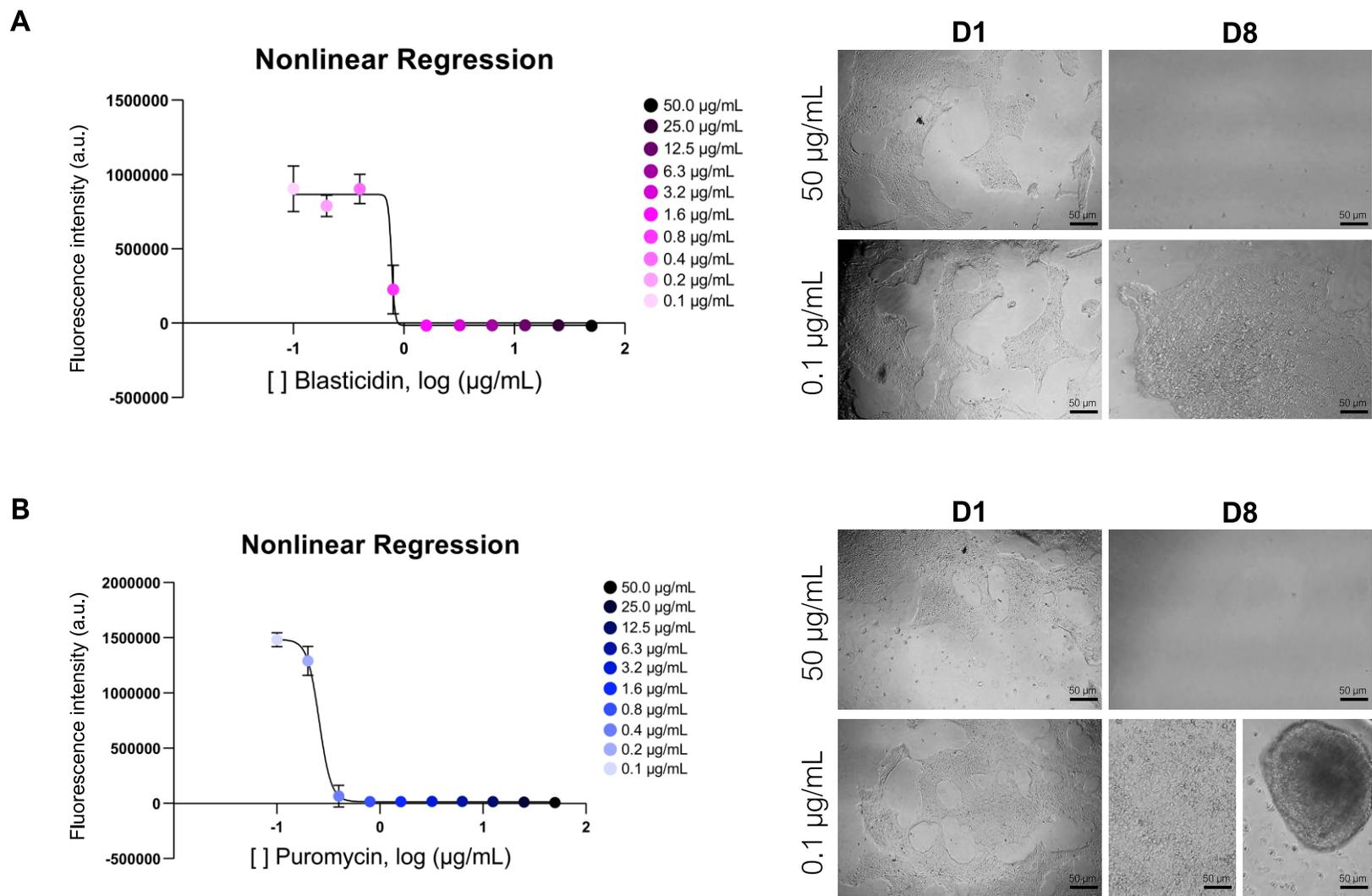


**Figura 6: Perfil fenotípico e genético das hiPSC71 empregadas no projeto.** Em **A**, observa-se a marcação positiva para 3 marcadores nucleares de pluripotência, *i.e.*, OCT4, SOX2 e NANOG. Todos eles foram detectados utilizando o anticorpo secundário conjugado com Alexa Fluor™ 488 (em verde). As células também apresentaram marcação positiva para receptores de superfície associados às células-tronco pluripotentes (TRA-1-60 e SSEA-4). Ambos marcadores foram detectados por meio do anticorpo secundário conjugado com Alexa Fluor™ 633 (em vermelho). Controles negativos por omissão do anticorpo primário encontram-se na fileira superior, enquanto as células marcadas com o anticorpo primário encontram-se na fileira inferior. Coloração nuclear realizada com DAPI (azul) em todas as imagens. Em **B**, cariógrama representativo que atesta a estabilidade genética das células, que apresentam genótipo 46, XX.

## **3.2. Avaliação das Respostas Celulares à Administração de Diferentes Fármacos**

### **3.2.1. Resposta aos Antibióticos Seletivos**

Os resultados de viabilidade celular, obtidos após 8 dias de exposição aos antibióticos seletivos, demonstram que a dose mínima letal de blasticidina é de 1,6  $\mu\text{g/mL}$ , enquanto a de puromicina é de 0,8  $\mu\text{g/mL}$ . Esses valores foram determinados com base em análises de regressão não linear apresentadas na Figura 7. Os dados obtidos estão em concordância com informações previamente relatadas na literatura para hiPSCs, confirmando a sensibilidade esperada dessas células aos antibióticos testados. Interessantemente, a exposição prolongada das hiPSCs à puromicina, em concentração mais baixa, resultou na formação de corpos embrioides (Figura 7B), fenômeno que também foi descrito em estudos anteriores (Zhong et al., 2020). Esse efeito pode estar relacionado à resposta celular ao estresse causado pela presença do fármaco, que promove a agregação e diferenciação espontânea em determinadas condições de cultivo. Essa observação destaca a importância de ajustar cuidadosamente as condições experimentais ao utilizar puromicina para seleção, especialmente em protocolos de manutenção ou expansão de células pluripotentes modificadas.

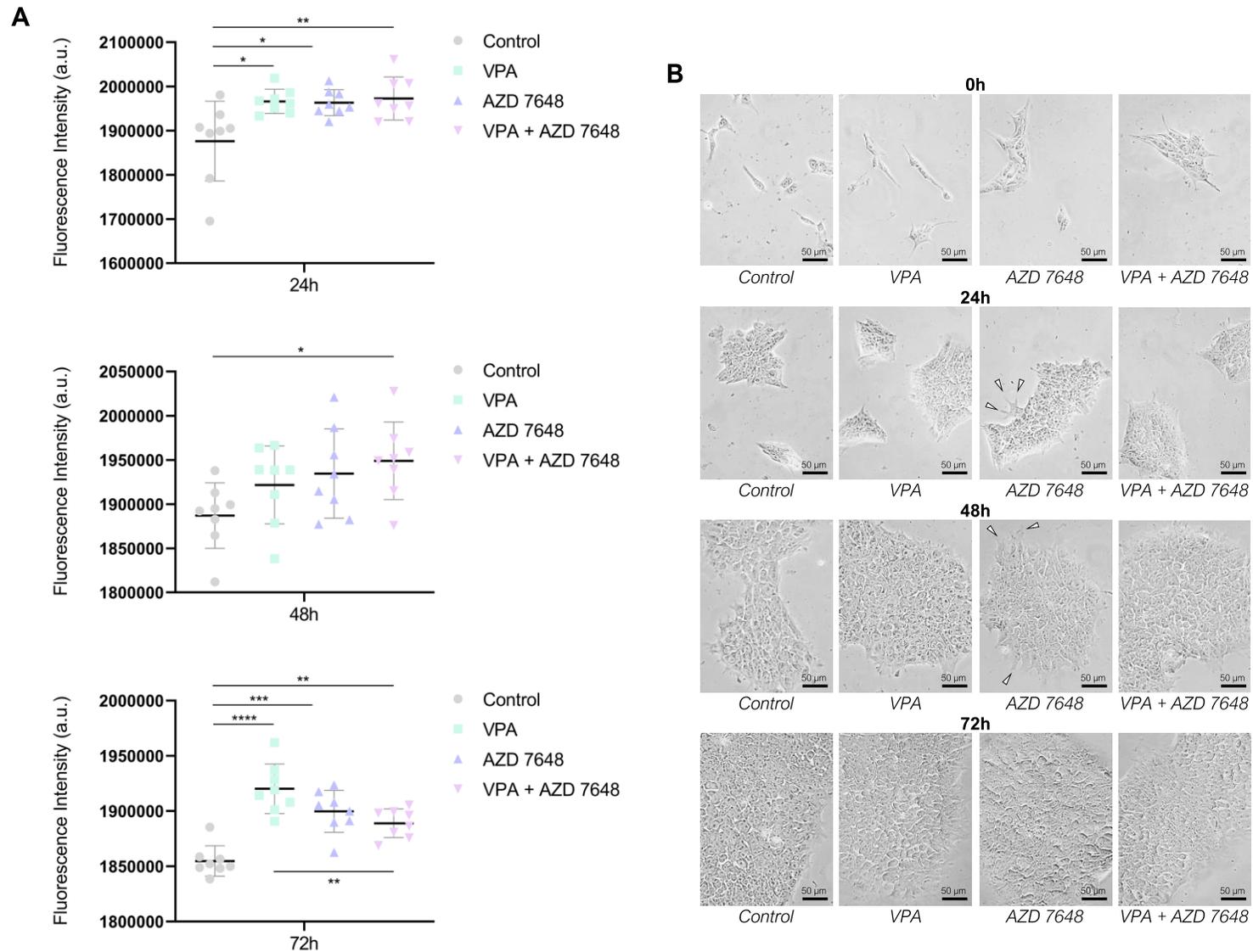


**Figura 7: Resposta das hiPSCs aos antibióticos seletivos designados para selecionar, futuramente, células geneticamente modificadas.** Em **A**, respostas relativas à blasticidina, enquanto em **B**, respostas relativas à puromicina. Baseado nas concentrações que tocam o eixo X dos gráficos, chegamos às concentrações de 1,6 µg/mL para blasticidina e 0,8 µg/mL para a puromicina. Nos painéis da direita, representações da concentração mais alta e mais baixa de antibiótico nos dias 1 e de exposição aos antibióticos. É possível notar que com 8 dias de exposição à puromicina, houve formação de corpos embrioides nas placas. n amostral de cada grupo = 4/dose. Barras correspondem a 50 µm.

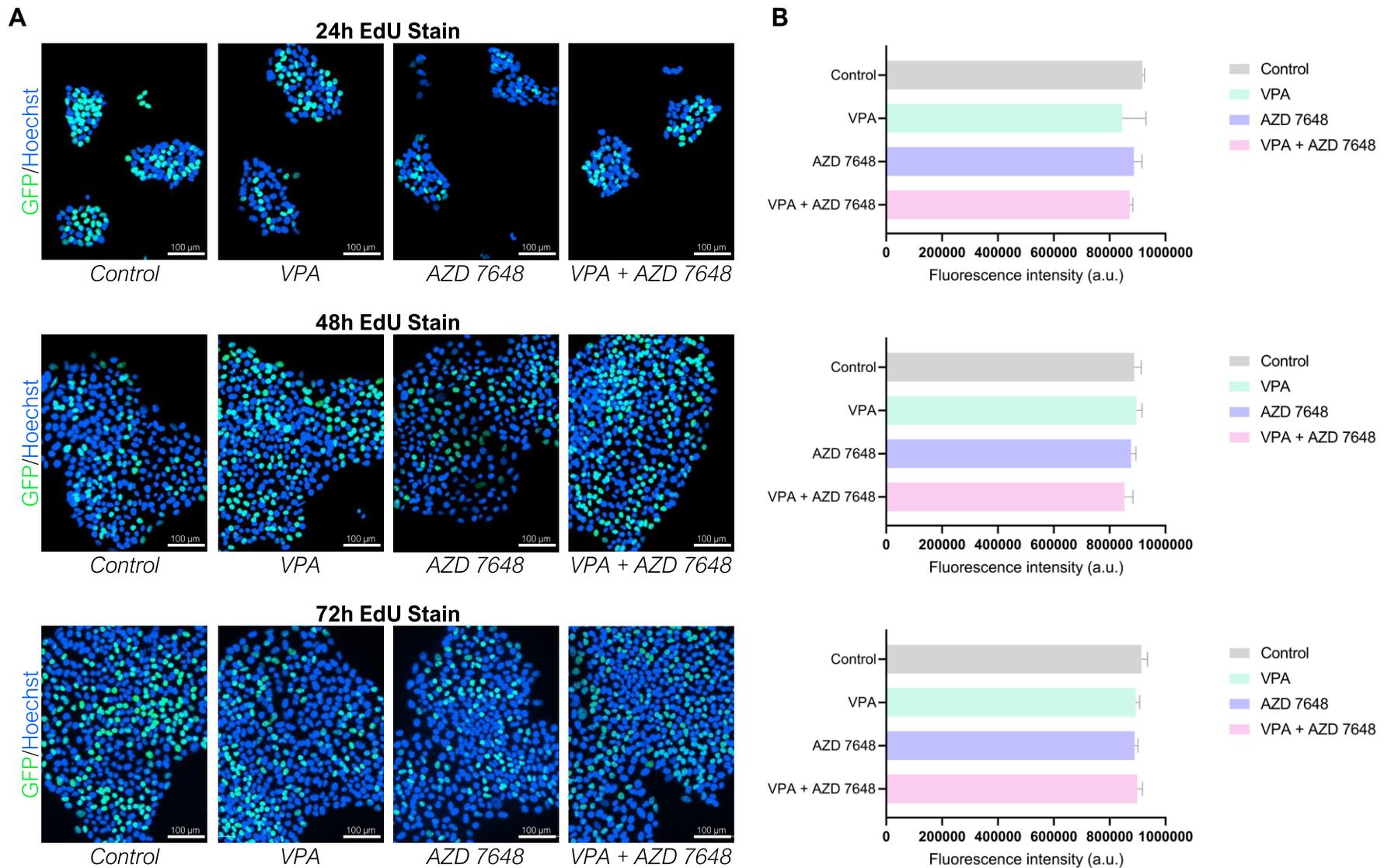
### 3.2.2. Resposta ao VPA e ao AZD 7648

Após 24 horas de tratamento, a análise pelo ensaio *CellTiter-Blue* revelou que todos os grupos experimentais apresentaram um índice de fluorescência significativamente maior em comparação ao grupo controle, indicando diferenças na atividade metabólica das hiPSCs. No entanto, 48 horas após a administração dos fármacos, apenas o grupo tratado com a combinação de VPA e AZD 7648 mostrou diferença significativa em comparação ao controle. Na análise final, realizada 72 horas pós-exposição aos fármacos, observaram-se diferenças significativas na viabilidade celular entre todos os grupos experimentais em relação ao grupo controle. Além disso, houve uma diferença relevante entre o tratamento isolado com VPA e a combinação de VPA e AZD 7648, sugerindo um possível efeito antagônico a longo prazo (Figura 8A). Morfologicamente, as células submetidas aos três tratamentos apresentaram colônias mais arredondadas e bem delimitadas, possivelmente devido à melhora na viabilidade celular. No grupo tratado com AZD 7648, foi observada uma quantidade expressiva de lamelipódios 24 e 48 horas após a administração do fármaco (Figura 8B).

A análise de proliferação celular por meio do ensaio EdU indicou que não houve diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos e o grupo controle (Figura 9B). No entanto, visualmente, foi possível perceber que, nas primeiras 24 horas de tratamento, o grupo controle apresentava uma ligeira maior proporção de células EdU+ em comparação aos grupos tratados. Nos tempos posteriores, o tratamento com AZD 7648 demonstrou uma redução na quantidade de células proliferativas (Figura 9A). Combinando os resultados do experimento de viabilidade celular com as observações sobre a proliferação, inferimos que a menor taxa de proliferação no grupo tratado com AZD 7648 está associada à melhora na viabilidade celular. Esse efeito parece estar relacionado a um sensoriamento ambiental mais eficiente, evidenciado pela presença de lamelipódios, como observado na Figura 8B. Assim, concluímos que os fármacos avaliados atuam predominantemente na manutenção da viabilidade celular, em vez de influenciar diretamente a proliferação. Com base nesses achados, decidimos aplicar VPA e AZD 7648 de forma individual nos experimentos de transfecção celular.



**Figura 8: Resultados quantitativos e qualitativos a respeito da viabilidade celular mediante a administração de VPA e AZD 7648.** Após 24 horas, diferenças estatisticamente significativas foram observadas entre o controle e VPA ( $p = 0,0142$ , \*), controle e AZD 7648 ( $p = 0,0184$ , \*), e controle e VPA + AZD 7648 ( $p = 0,0079$ , \*\*). Após 48 horas, uma diferença significativa foi encontrada entre o controle e VPA + AZD 7648 ( $p = 0,0422$ , \*). Após 72 horas, diferenças altamente significativas foram observadas entre o controle e VPA ( $p < 0,0001$ , \*\*\*\*), controle e AZD 7648 ( $p = 0,0001$ , \*\*\*), controle e VPA + AZD 7648 ( $p = 0,0029$ , \*\*), e também entre VPA e VPA + AZD 7648 ( $p = 0,0068$ , \*\*). Os resultados morfológicos em **B** demonstram importantes achados morfológicos nos tratamentos propostos. Pontas de seta no grupo AZD 7648 demonstram a formação de lamelipódios nas imediações das colônias tratadas com o fármaco.  $n$  amostral de cada grupo = 8/tempo. Barras correspondem a 50  $\mu\text{m}$ .



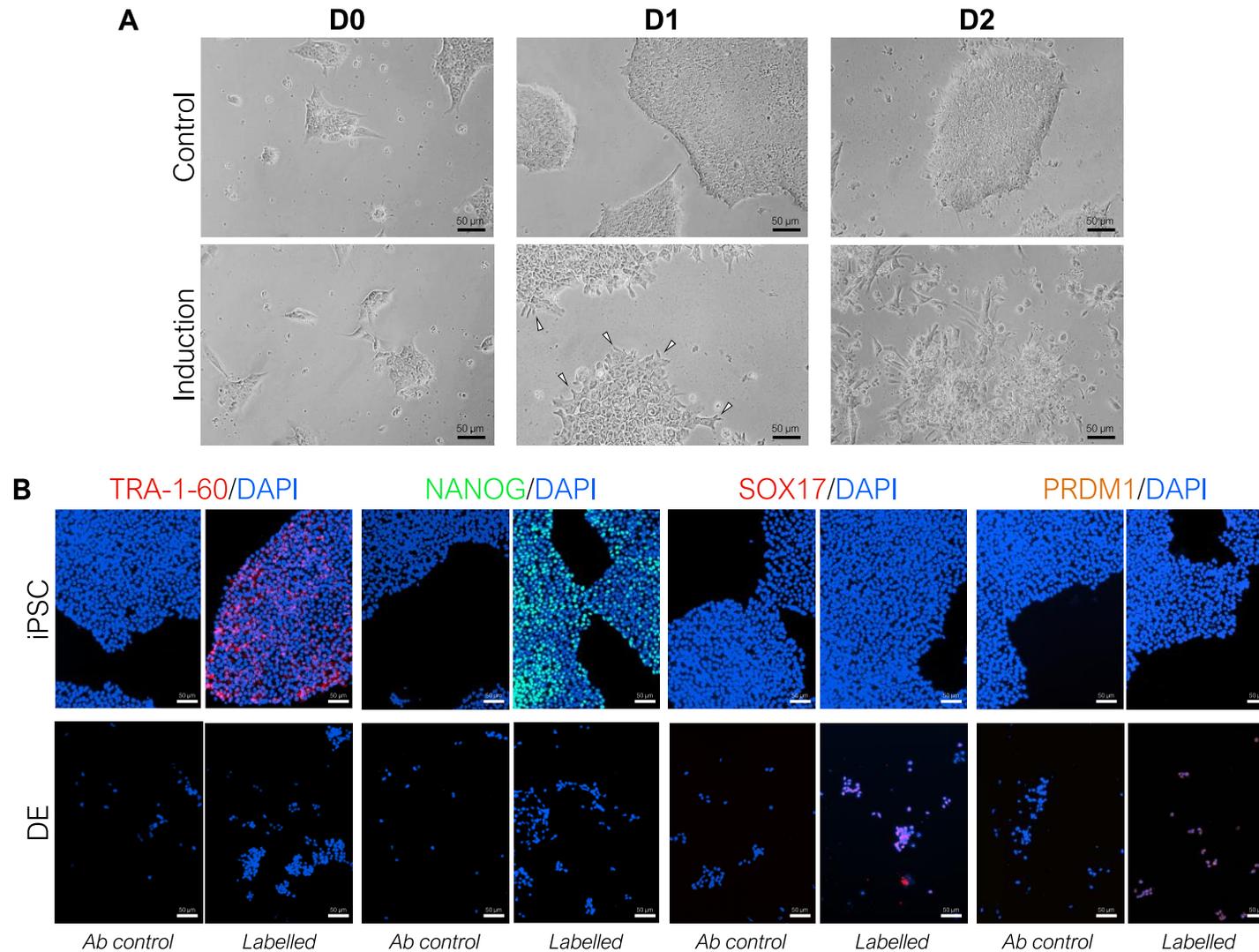
**Figura 9: Resultados relacionados à proliferação celular após a administração de VPA e AZD 7648.** Na figura A, imagens de fluorescência ilustram a incorporação de EdU pelas hiPSCs, evidenciando diferenças visuais entre os tratamentos. Em todos os tempos analisados, foi observada uma redução no número de células GFP positivas nos grupos tratados, com exceção do grupo tratado com VPA após 48 horas do tratamento. Apesar de os valores absolutos de intensidade de fluorescência nos grupos tratados terem sido ligeiramente inferiores ao do controle, a comparação entre os grupos não revelou diferenças estatisticamente significativas, como demonstrado em B. n amostral de cada grupo = 3/tempo. Barras correspondem a 100  $\mu$ m.

### 3.3. Otimização das Condições de Cultivo para a Expressão de SOX17 e PRDM1

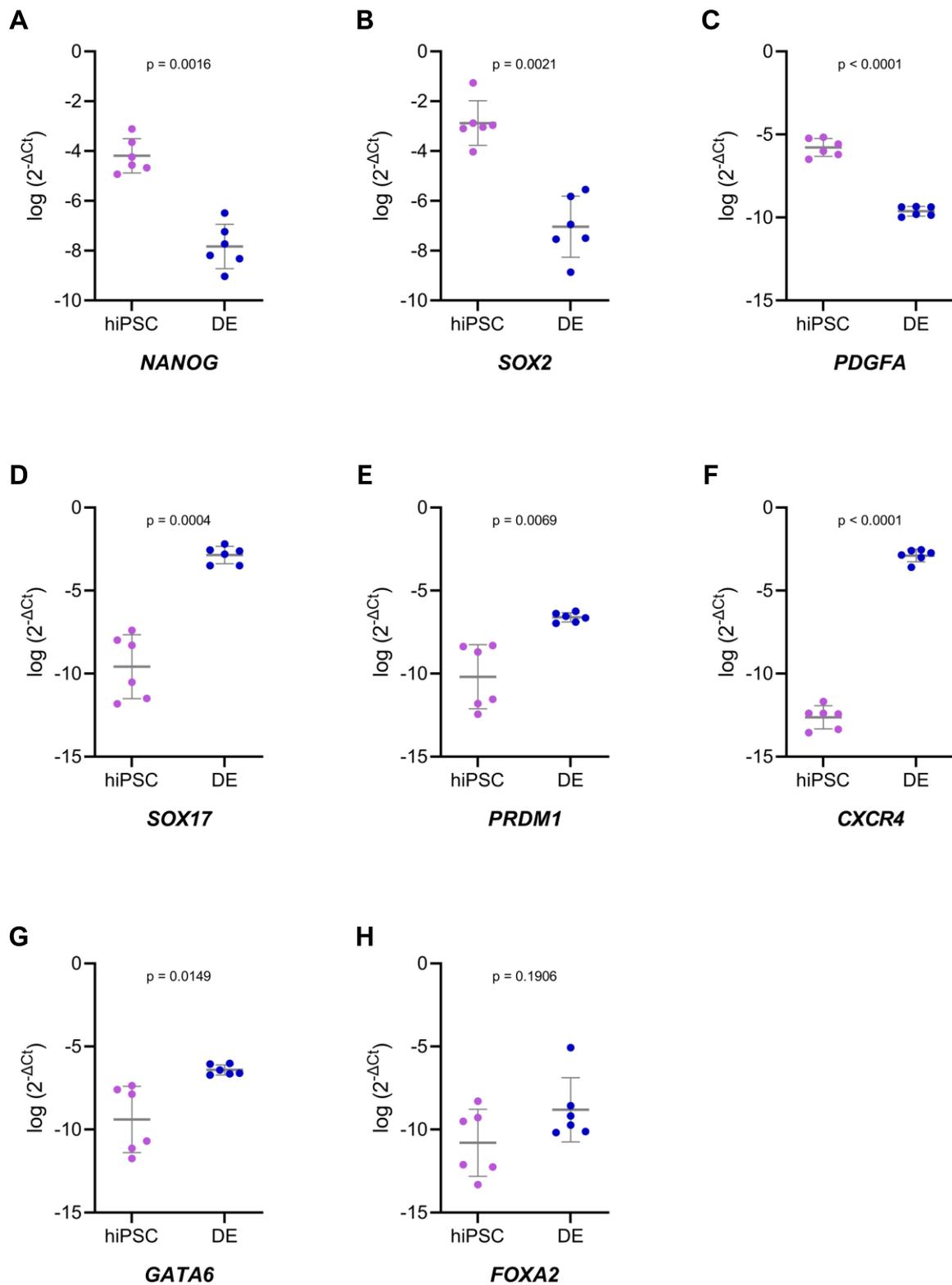
A indução ao endoderma definitivo revelou alterações morfológicas significativas nas células submetidas ao processo de diferenciação (Figura 10A). Após o primeiro dia de indução, as colônias passaram a exibir uma morfologia mais próxima de um formato cuboide, semelhante à aparência de queratinócitos. Além disso, foram observados numerosos prolongamentos celulares e uma quantidade moderada de debris. No segundo dia de indução, as células assumiram uma morfologia característica de células epiteliais, deixando de formar colônias coesas e bem delimitadas, como observado nas hiPSCs (Figura 10A). Esses achados morfológicos foram considerados indicativos importantes da diferenciação de hiPSCs em células do endoderma definitivo.

Para uma análise mais detalhada, foi realizada imunofluorescência para a detecção de marcadores de pluripotência e endoderma, permitindo comparação entre as células presumidamente diferenciadas em endoderma definitivo e hiPSCs. As hiPSCs apresentaram marcação positiva para marcadores de pluripotência, tanto de superfície (TRA-1-60) quanto nuclear (NANOG), enquanto aquelas induzidas a endoderma definitivo não exibiram marcação detectável para esses marcadores. Em contrapartida, as células diferenciadas apresentaram marcação positiva para SOX17 e PRDM1, fatores característicos do endoderma definitivo, corroborando a eficácia do protocolo de indução, e validando a ativação da expressão dos genes de interesse para o *knock-in*. Como esperado, as hiPSCs não apresentaram marcação positiva para essas proteínas (Figura 10B).

A diferenciação celular também foi evidenciada por análise comparativa da expressão gênica entre as hiPSCs e as células do endoderma definitivo. As hiPSCs apresentaram regulação positiva de genes associados à pluripotência (*NANOG*, *SOX2*) (Figura 11A, 11B), enquanto as células do endoderma definitivo mostraram expressão aumentada de genes relacionados ao endoderma (*SOX17*, *PRDM1*, *CXCR4* e *GATA6*) (Figuras 11D, 11E, 11F, 11G). O gene *PDGFA*, tipicamente reprimido em células em diferenciação, manteve o nível elevado de transcritos nas hiPSCs e reduzido nas células do endoderma definitivo (Figura 11C). *FOXA2* foi o único gene cuja expressão não diferiu significativamente entre os grupos (Figura 11H).



**Figura 10: Aspectos morfológicos e imunofenotípicos da diferenciação de hiPSCs em células do endoderma definitivo.** Em **A**, nota-se a mudança na morfologia das células em diferenciação, que no primeiro dia da indução apresentam inúmeros prolongamentos (pontas de seta). No segundo dia, as células passam a demonstrar morfologia epitelial e perde-se o aspecto de colônias bem delimitadas tipicamente apresentado pelas hiPSCs. Em **B**, marcações positivas para marcadores de pluripotência em hiPSCs e não detectada em células do endoderma definitivo (DE). Em paralelo, células do endoderma definitivo apresentam marcação positiva para os marcadores-chave do estudo, enquanto as hiPSCs não apresentam marcação para os mesmos. Proteínas TRA-1-60 e SOX17 foram detectadas por meio do anticorpo conjugado com Alexa Fluor™ 633 (vermelho), NANOG foi detectada com anticorpo conjugado com Alexa Fluor 488™ (verde) e PRDM1 foi detectado com anticorpo conjugado com Alexa Fluor 546™ (laranja). Barras de todas as imagens correspondem a 50 µm.



**Figura 11: Resultados de qPCR para marcadores de pluripotência, de diferenciação e de endoderma definitivo.** Os dados foram plotados como funções  $\log(2^{-\Delta C_t})$ . É possível observar maior expressão de *SOX2*, *NANOG* e *PDGFA* no grupo das hiPSCs, reforçando a natureza pluripotente das células indiferenciadas. *SOX17*, *PRDM1*, *CXCR4* e *GATA6*, marcadores do comprometimento com a linhagem endodérmica, mostraram-se positivamente regulados nas células induzidas ao endoderma definitivo. O único gene com resultados inconclusivos, devido ao alto desvio padrão entre as amostras, foi *FOXA2*, marcador de endoderma, que apresentou tendência a uma maior expressão nas células endodérmicas.  $n$  amostral = 6/grupo. Valores individuais dos Cts das amostras foram obtidos por meio da média aritmética entre 3 replicatas de cada amostra. Valores de  $p$  indicados nos gráficos.

### 3.4. Edição Gênica com CRISPR/Cas9

#### 3.4.1. Análise dos dsDNA Gerados

Diversas padronizações foram realizadas para otimizar o processo de síntese dos braços de homologia nos DNA doadores, incluindo testes com *primers* originalmente fornecidos pela fabricante do kit e ajustes nos parâmetros da PCR, como temperatura de anelamento, a duração da extensão e o número de ciclos. Entretanto, só obtivemos os resultados satisfatórios ao realizar a *Inner-outer Overlapping PCR*, que se demonstrou eficiente na amplificação dos dsDNAs correspondentes aos genes *SOX17* e *PRDM1*, gerando produtos com tamanhos compatíveis, que especificam um intervalo de 1,4 a 1,8 kb (Figura 12). A quantificação após a purificação dos produtos demonstrou concentrações adequadas para o estudo e razão  $A_{260/280}$  entre 1.8 e 2.0, indicando bons níveis de pureza relativa, conforme explicitado na tabela 8.



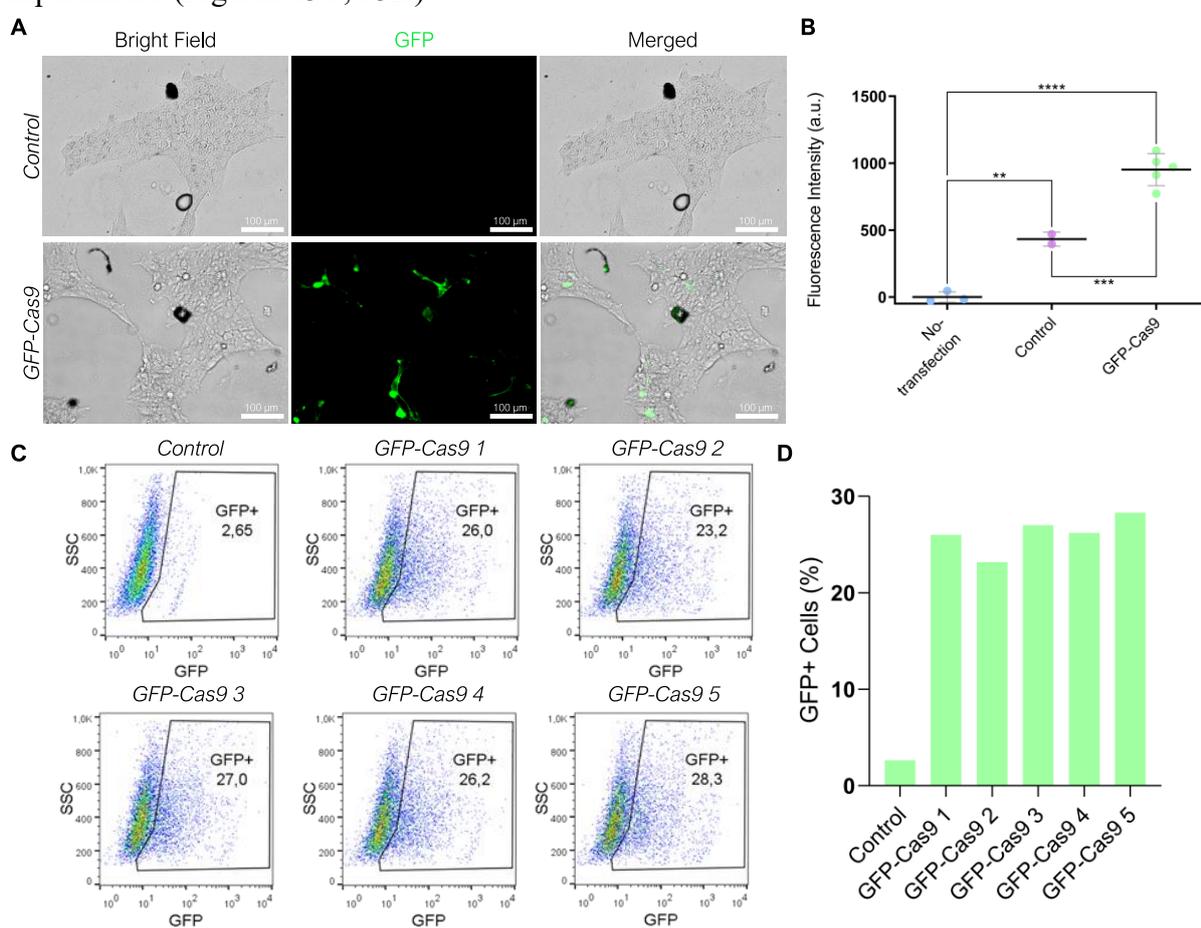
**Figura 12:** Fotodocumentação da eletroforese em gel de agarose 1% das amostras de dsDNA gerados pela *Inner-outer Overlapping PCR*. Ambas as amostras apresentam produtos próximos a 1500 pb, o que foi considerado como satisfatório, baseando-nos pelo tamanho esperado fornecido pelo fabricante do kit e pelo tamanho de nossos construtos, indicados na Figura 4.

**Tabela 8:** Análise dos dsDNAs gerados.

Amostra	[ ] ng/ $\mu$ L	$A_{260/280}$
SOX17 dsDNA (1+2)	75,3	1,89
PRDM1 dsDNA (1+2)	120,4	1,85

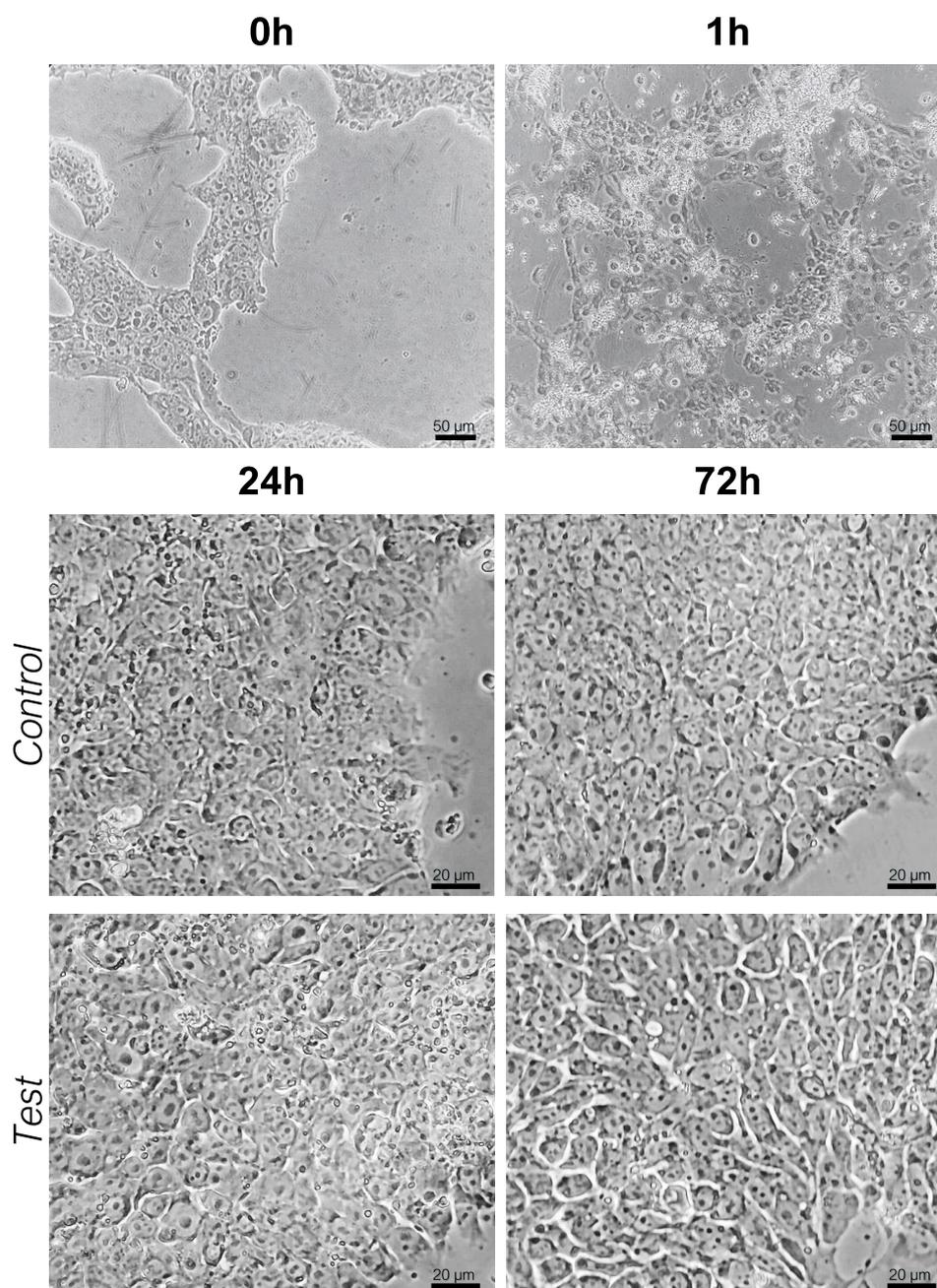
### 3.4.2. Incorporação de Complexos de Transfecção contendo Cas9-GFP

Em ensaio piloto, observamos que os poços transfectados com o complexo contendo gRNA, dsDNA e Cas9-GFP apresentaram hiPSCs-GFP positivas, enquanto os poços não transfectados e os poços transfectados apenas com gRNA e dsDNA não exibiram sinal detectável por microscopia de fluorescência (Figura 13A). A análise da intensidade de fluorescência confirmou diferenças significativas entre os grupos, evidenciando a eficiência do complexo de transfecção contendo Cas9-GFP (Figura 13B). Nas análises por citometria de fluxo, cerca de 26% das células transfectadas exibiram incorporação do complexo de transfecção, indicando que, mesmo em um curto período de incubação, o protocolo adotado foi capaz de gerar detecção de GFP intracelular em ao menos um quarto das hiPSCs utilizadas no experimento (Figuras 13C, 13D).



**Figura 13: Resultados do ensaio piloto de transfecção após incubação de 1 hora com Cas9-GFP.** Em **A**, análise qualitativa realizada em microscópio de fluorescência que evidenciou a expressão de GFP. A intensidade de fluorescência foi quantificada nos grupos não transfectado, controle e Cas9-GFP, com  $n = 3, 2$  e  $5$ , respectivamente, evidenciando, em **B**, diferenças estatísticas na fluorescência entre os grupos não transfectado e controle ( $p = 0,0040$ , \*\*), não transfectado e Cas9-GFP ( $p < 0,0001$ , \*\*\*\*) e controle e Cas9-GFP ( $p = 0,0008$ , \*\*\*). Os dados de citometria de fluxo apresentados em **C** mostraram a detecção de GFP em células transfectadas, enquanto a análise das porcentagens obtidas pela citometria, exibidas em **D**, revelou uma média de 26,14% de hiPSCs GFP-positivas. Para a citometria de fluxo,  $n = 1$ /controle e  $n = 5$ /Cas9-GFP. Escalas correspondem a 100  $\mu$ m.

### 3.4.3. Transfecção Celular



**Figura 14: Achados morfológicos das hiPSCs em transfecção.** Aspecto imediatamente após a aplicação dos complexos de transfecção (0h) e após a adição de 450  $\mu$ L de meio E8 completo (1h). Estruturas nucleares se tornam bastante proeminentes, assim como a presença de debris. Após 24 e 72hs da transfecção, as células não apresentam grandes diferenças entre o grupo transfectado com o complexo de transfecção contendo a Cas9 e o grupo controle, em que a presença de Cas9 é omitida. Nos painéis superiores, escalas representam 50  $\mu$ m, enquanto nos painéis inferiores representam 20  $\mu$ m.

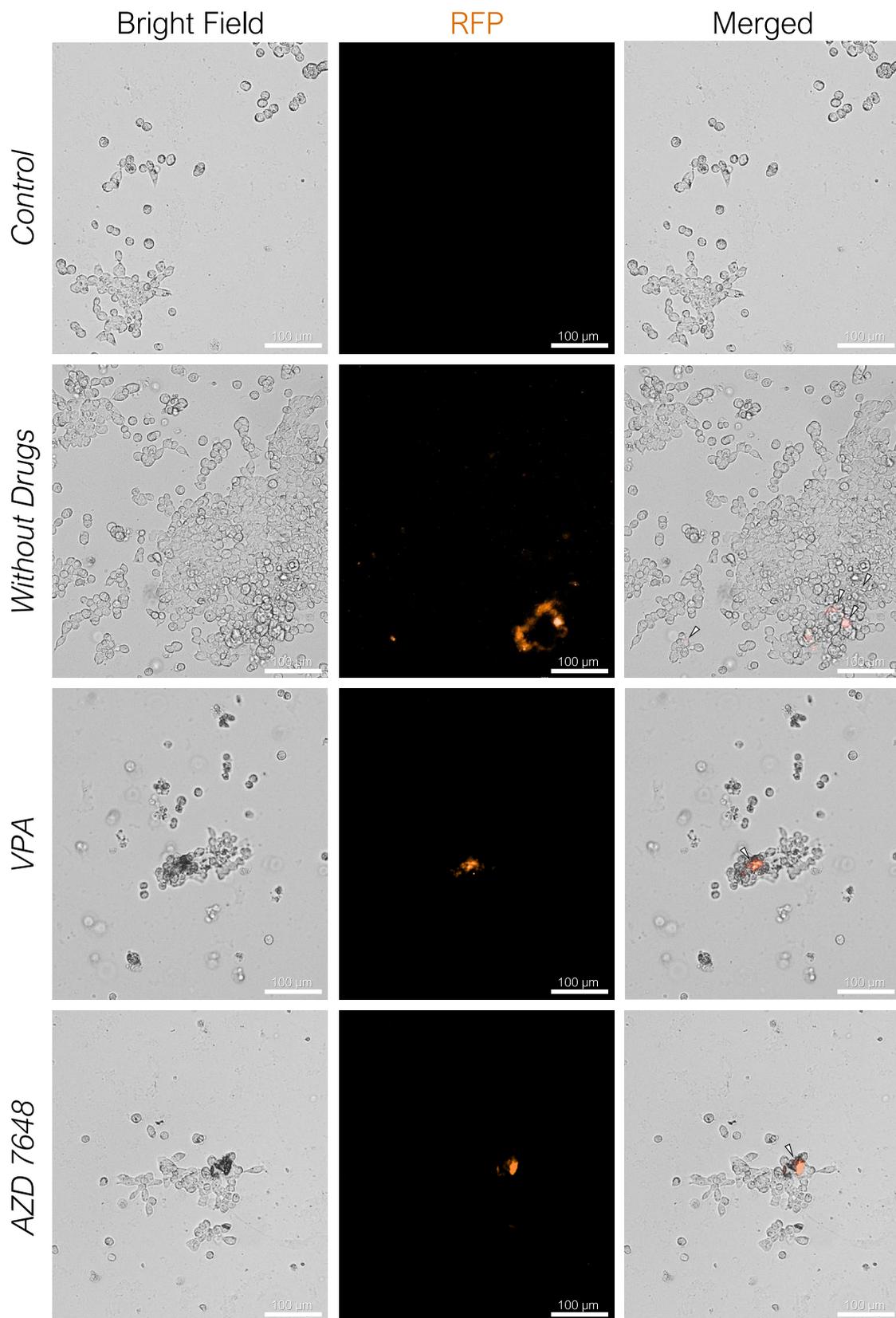
A transfecção celular revelou achados morfológicos importantes nas hiPSCs utilizadas no experimento. Independentemente do grupo experimental, as células exibiram, imediatamente após a administração dos complexos de transfecção, um aspecto birrefringente nas bordas das colônias, o que atribuímos à metodologia de lipofecção (Figura 14). Uma hora após a incubação com os complexos de transfecção, as células passaram a apresentar núcleos

extremamente proeminentes, além de uma quantidade significativa de debris, fenômeno possivelmente associado à toxicidade da lipofectamina. Após 24 horas da transfecção, não foram observadas diferenças morfológicas notáveis entre as células do grupo controle e do grupo experimental. No entanto, 72 horas após a transfecção, as células do grupo controle exibiram colônias com maior nível de compactação em comparação ao grupo experimental. Atribuímos esse achado ao fato de que o processo de modificação gênica provavelmente gera estresse celular, o que resulta em um maior nível de descompactação das colônias no grupo expostos aos complexos de transfecção contendo a endonuclease Cas9.

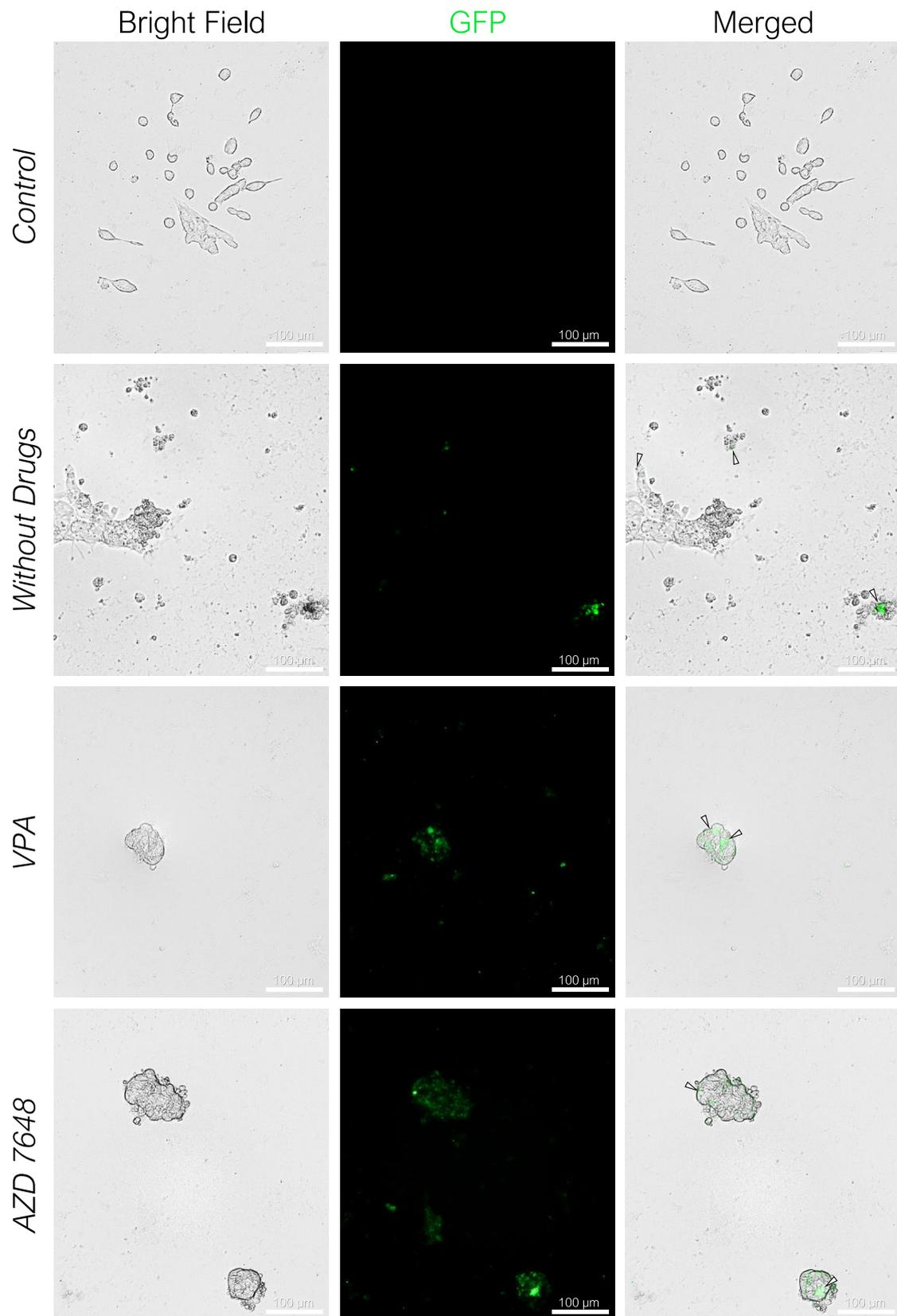
#### **3.4.4. Validação da expressão dos Genes *knock-in***

A indução ao endoderma definitivo nas células submetidas a edição gênica resultou em achados promissores, evidenciando a expressão dos genes repórteres ligados a *SOX17* e *PRDM1* em todos os grupos experimentais, independentemente da presença dos adjuvantes VPA e AZD 7648. Essa observação foi feita através da análise das fluorescências RFP (para *SOX17*, Figura 15) e GFP (para *PRDM1*, Figura 16), que confirmaram a presença de células positivas para ambos os marcadores nos diferentes grupos analisados. Nenhum sinal de fluorescência foi detectado nas células do grupo controle (transfectadas na ausência de Cas9). Devido à ausência de um processo de seleção prévio das hiPSCs submetidas a edição gênica, foi possível identificar muitas células endodérmicas que não expressavam os repórteres fluorescentes, possivelmente representando uma subpopulação não modificada ou não completamente diferenciada. Apesar disso, a expressão consistente dos marcadores fluorescentes nas amostras foi considerada satisfatória e indicativa de que as estratégias de *knock-in* e indução ao endoderma definitivo foram eficazes para gerar hiPSCs repórteres e ativar a coexpressão dos genes de interesse.

Além disso, assim como observado nas etapas anteriores de indução ao endoderma definitivo, constatamos uma quantidade significativa de células soltas no fundo das placas de cultura. Esse fenômeno é uma característica reconhecida e frequentemente reportada pelo fabricante do kit de indução, possivelmente refletindo a morte celular seletiva de populações que não completaram a transição eficiente para o fenótipo de endoderma definitivo. Apesar dessa limitação, a presença de células fluorescentes nos grupos experimentais reforça o sucesso do protocolo de indução em demonstrar a funcionalidade dos genes repórteres introduzidos, sendo um passo importante para validar o modelo proposto.

**SOX17-RFP-BLAST**

**Figura 15: Detecção da RFP em células do endoderma definitivo.** Foi possível identificar a presença de sinal fluorescente RFP em células de todos os grupos experimentais, exceto no grupo controle. Pontas de seta indicam células SOX17-RFP positivas. Escalas correspondem a 100 µm.

**PRDM1-GFP-PURO**

**Figura 16: Detecção da GFP em células do endoderma definitivo.** Foi possível identificar a presença de sinal fluorescente GFP em células de todos os grupos experimentais, exceto no grupo controle. Pontas de seta indicam células PRDM1-GFP positivas. Escalas correspondem a 100 μm.

### 3.4.5. Detecção dos insertos por meio de PCR juncional e eletroforese capilar

Os resultados obtidos por meio da PCR juncional confirmaram molecularmente o sucesso da inserção dos construtos nos *loci*-alvo, validando a eficácia do procedimento.

Nas hiPSCs *SOX17-RFP*, os grupos experimentais sem fármacos, tratados com VPA e com AZD 7648, apresentaram amplicons na junção 5' variando entre 200 e 300 pb, com valores próximos ao esperado de 219 pb (Figura 17). Destacou-se a amostra do grupo tratado com VPA, que apresentou amplicons mais próximos do tamanho esperado. O grupo controle, por sua vez, não revelou nenhum amplicon detectável nessa faixa de tamanho. Na junção 3', os mesmos grupos experimentais exibiram amplicons próximos ao valor esperado de 429 pb, sendo que a amostra tratada com AZD 7648 apresentou o pico mais próximo desse tamanho. Apesar do grupo controle apresentar algum grau de arraste, possivelmente indicando degradação do DNA amplificado, não foram observados picos próximos ao tamanho esperado.

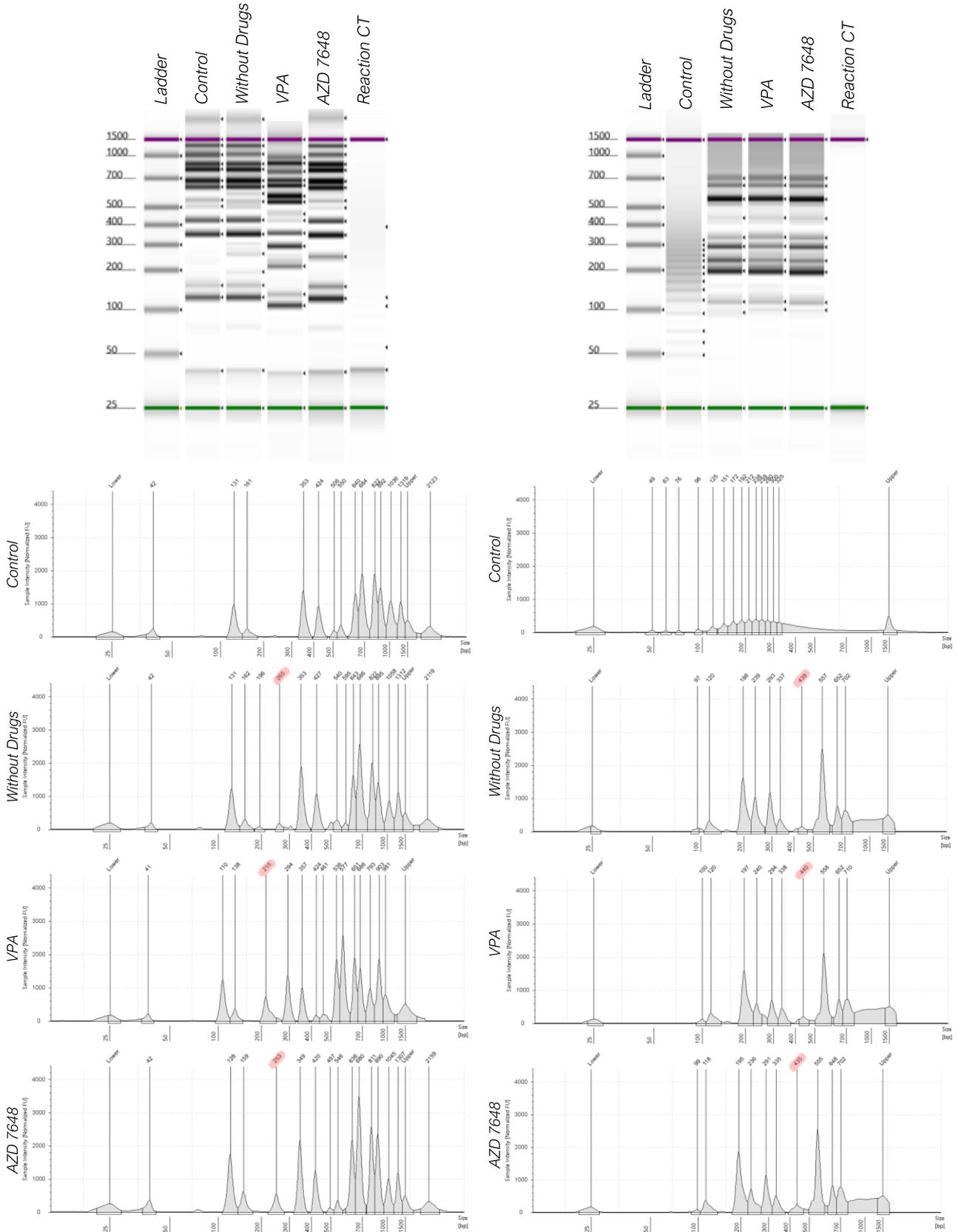
Nas hiPSCs *PRDMI-GFP*, as amostras dos grupos sem fármacos e tratadas com VPA exibiram amplicons entre 200 e 300 pb na junção 5', com o grupo sem fármacos revelando um pico em torno de 202 pb, valor esperado (Figura 18). Em contraste, nenhum pico próximo ao tamanho esperado foi detectado na amostra tratada com AZD 7648, ainda que a fluorescência tenha sido confirmada nos experimentos anteriores. O grupo controle também não apresentou amplicons detectáveis na faixa esperada para a junção 5'. Já na junção 3', todos os grupos experimentais, exceto o controle, apresentaram amplicons próximos ao valor esperado de 197 pb. O grupo sem fármacos novamente se destacou, com um pico próximo a 206 pb.

A presença de múltiplos picos e amplicons nas amostras reflete a ausência de uma padronização propriamente dita para as condições ideais da reação de PCR juncional. Esses resultados indicam a necessidade de otimização de parâmetros como temperatura de anelamento, e concentração de gDNA, para melhorar a especificidade e a consistência dos produtos amplificados. No entanto, consideramos esses resultados positivos, especialmente porque foram obtidos utilizando gDNA de hiPSCs submetidas à edição gênica, mas que ainda não passaram por processos de seleção. Isso reforça a robustez do sistema empregado e fornece uma base importante para passos futuros, que poderão incluir a seleção clonal, o estabelecimento das condições ótimas de amplificação, e sequenciamento.

# SOX17 Junction PCR

Left Junction PCR (5')

Right Junction PCR (3')

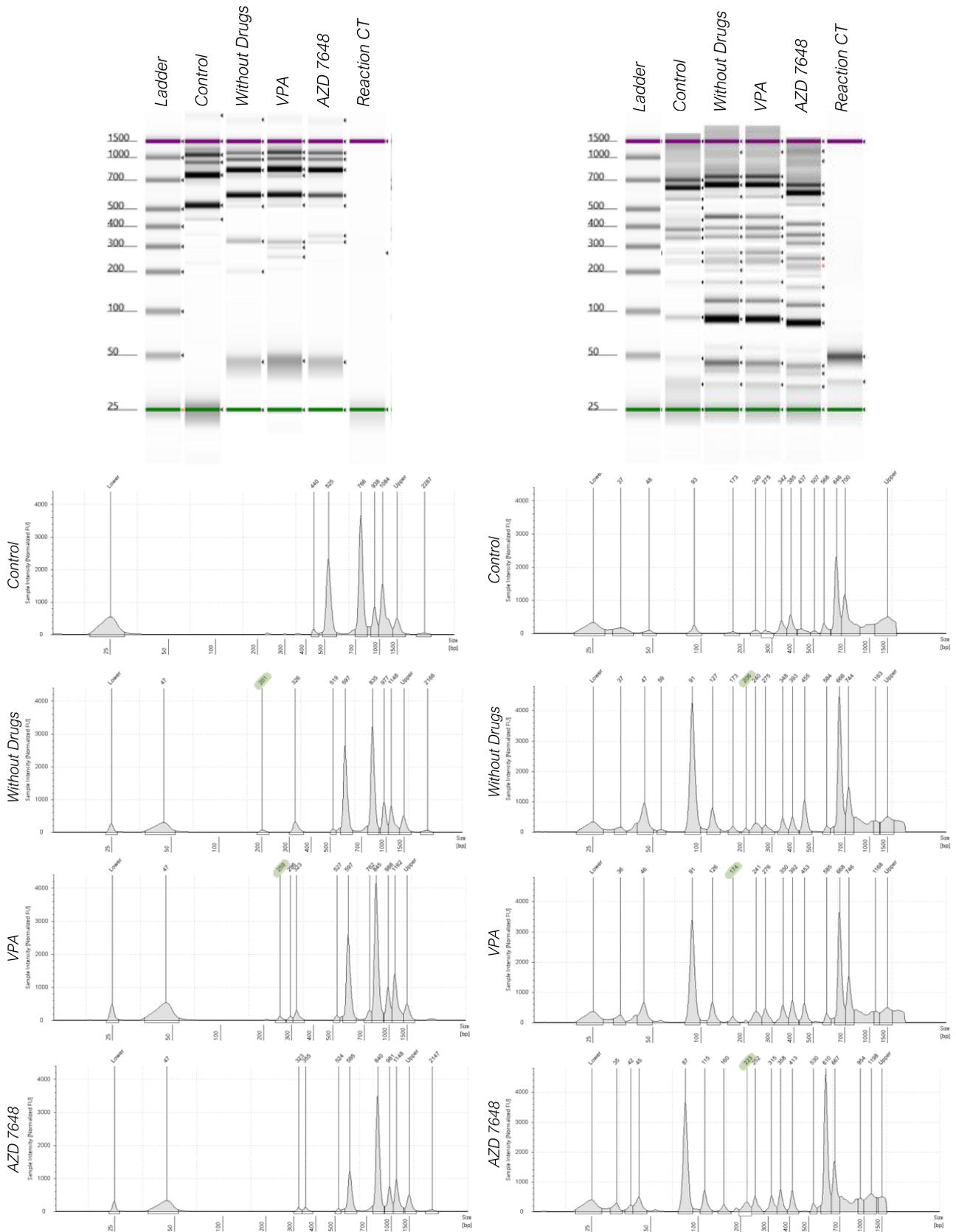


**Figura 17: Resultados da eletroforese capilar das amostras de hiPSCs-SOX17-RFP submetidas à PCR juncional.** Todos os grupos experimentais apresentaram bandas próximas aos valores estipulados para as junções 5' (219 pb) e 3' (429 pb), indicadas pelo grifo vermelho.

# PRDM1 Junction PCR

Left Junction PCR (5')

Right Junction PCR (3')



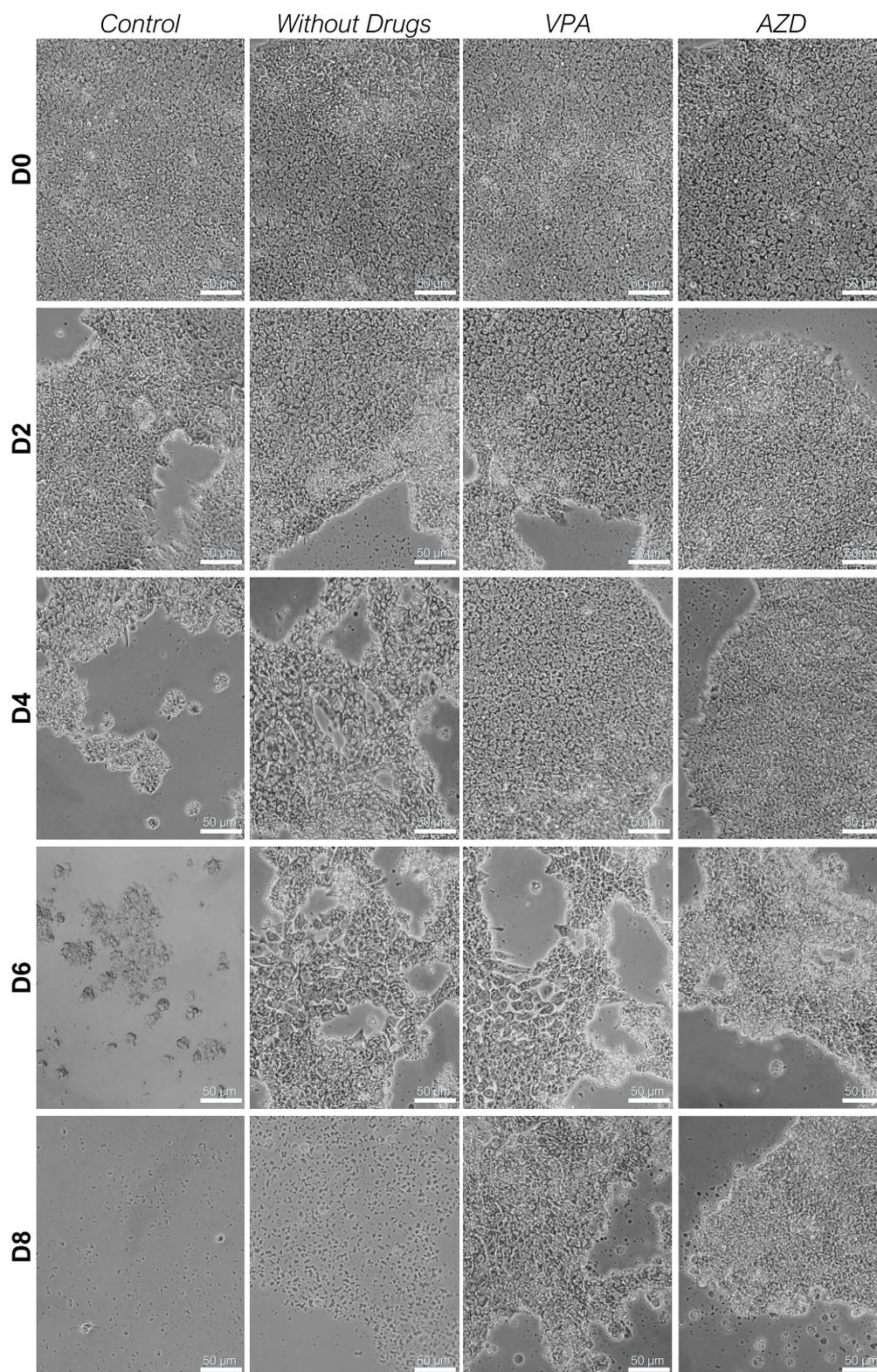
**Figura 18: Resultados da eletroforese capilar das amostras de hiPSCs-PRDM1-GFP submetidas à PCR junctional.** O grupo sem fármacos e VPA apresentaram bandas próximas ao valor estipulado para a junção 5' (202 pb), enquanto todas apresentaram bandas próximas ao estipulado para a junção 3' (197 pb), indicadas pelo grifo verde.

### 3.4.6. Seleção das células geneticamente modificadas

Realizamos testes de seleção das células utilizando antibióticos seletivos nas concentrações estabelecidas pelas curvas de morte: 1,6 µg/mL de blasticidina e 0,8 µg/mL de puromicina. Esses tratamentos foram aplicados às hiPSCs submetidas aos *knock-in SOX17-RFP* e *PRDMI-GFP* respectivamente. As células dos grupos experimentais sem fármacos, tratadas com VPA e AZD 7648, demonstraram, morfológicamente, maior resistência aos antibióticos em comparação ao grupo controle, mantendo-se viáveis até pelo menos o sexto dia de tratamento em ambas as linhagens (Figura 19 e Figura 20). No entanto, no oitavo dia, observou-se uma alta taxa de mortalidade celular na grande maioria das amostras, com exceção de um pequeno número de células sobreviventes nos grupos tratados com VPA e AZD 7648 das hiPSCs *SOX17-RFP*.

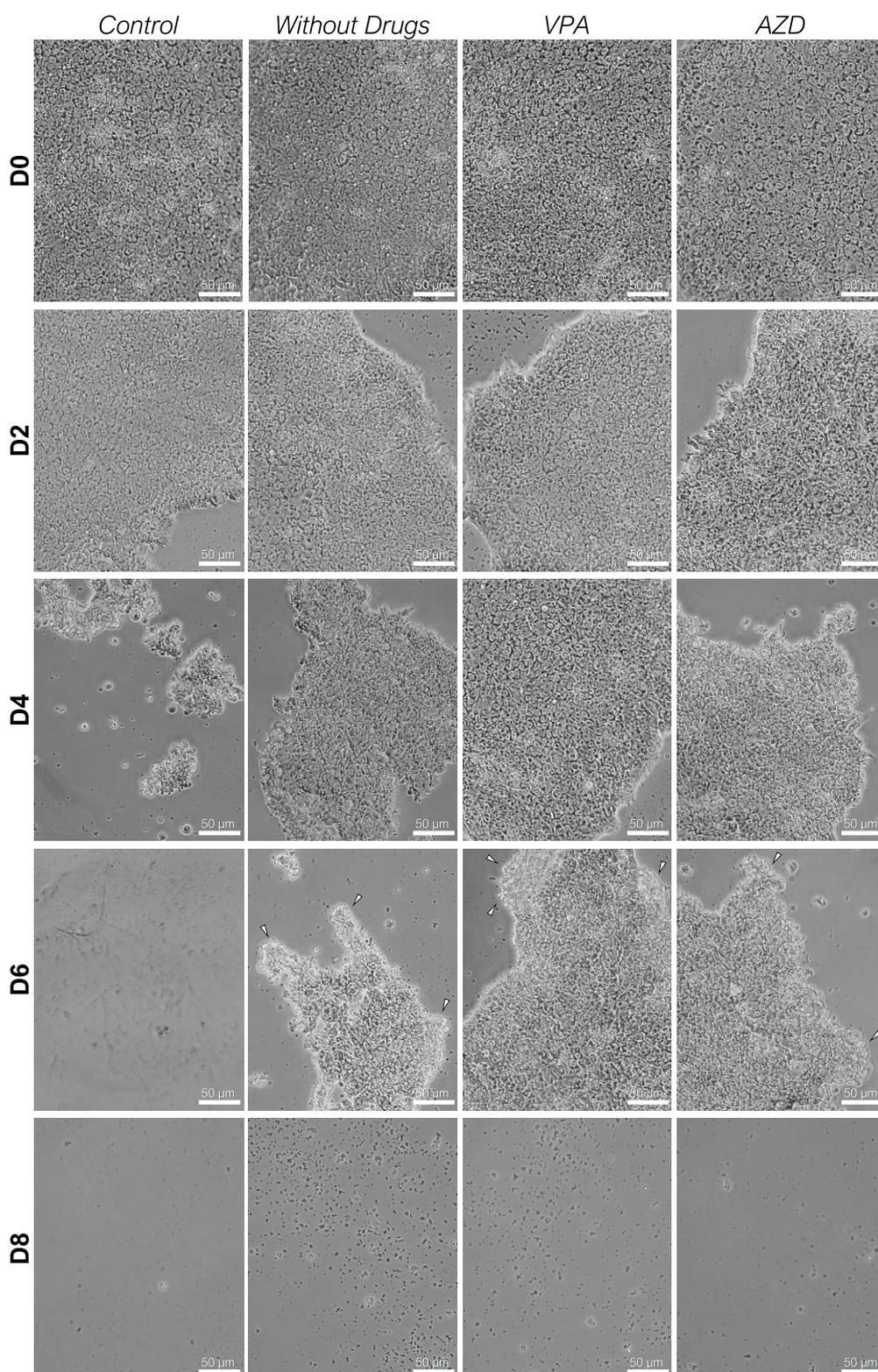
Durante o tratamento com puromicina, áreas de diferenciação espontânea tornaram-se evidentes no sexto dia em todos os poços, embora a exposição ao antibiótico não tenha resultado na formação de corpos embrioides nesse experimento (Figura 20). Nas condições de controle de ambas as linhagens, a maioria das células foi eliminada até o sexto dia, confirmando a eficácia das concentrações de seleção empregadas. Esses resultados destacaram a influência dos tratamentos com VPA e AZD 7648 na resistência das hiPSCs submetidas a edição gênica e nos levaram a deduzir a necessidade de ajustes na duração ou nos parâmetros dos protocolos de seleção para otimizar a sobrevivência das células geneticamente editadas.

## SOX17-RFP Blastocidin Selection



**Figura 19: Resultados preliminares da seleção de hiPSCs SOX17-RFP resistentes à blastocidina.** No 4º dia de exposição ao antibiótico seletivo, é possível observar diferenças qualitativas entre o grupo controle e os demais tratamentos. No 6º dia, as células do grupo controle já apresentavam altas taxas de mortalidade, enquanto no 8º dia somente células tratadas com VPA e AZD 7648 apresentavam células resistentes. Escalas correspondem a 50 µm.

## PRDM1-GFP Puromycin Selection



**Figura 20: Resultados preliminares da seleção de hiPSCs PRDM1-GFP resistentes à puromicina.** No 4º dia de exposição ao antibiótico seletivo, é possível observar diferenças qualitativas entre o grupo controle e os demais tratamentos. No 6º dia, as células do grupo controle já apresentavam altas taxas de mortalidade, enquanto nos demais grupos foi possível observar a presença de áreas de diferenciação espontânea, indicadas pelas pontas de seta. Já no 8º dia, todos os grupos não apresentavam células viáveis. Escalas correspondem a 50 µm.

#### 4. DISCUSSÃO

A geração de iPSCs humanas carregando alelos repórteres funcionais é uma estratégia sofisticada e altamente relevante para estudos que investigam mecanismos celulares e moleculares. Essas linhagens permitem um acompanhamento mais preciso da expressão gênica em tempo real, viabilizando análises dinâmicas da diferenciação celular e do desenvolvimento humano (Cotta et al., 2024; Puspita et al., 2024). Além disso, no contexto brasileiro, a implementação dessa metodologia representa um avanço significativo para a autonomia científica do país. Reduzir a dependência de tecnologias e linhagens importadas não apenas fortalece a pesquisa local, mas também estabelece uma base para colaborações internacionais mais equitativas.

O estudo alcançou avanços significativos no campo da biologia celular e da edição gênica aplicada, focando na identificação e geração de linhagens modificadas de iPSCs humanas. Nossos resultados, além de contribuir para a biologia básica, têm implicações diretas em potenciais aplicações biotecnológicas e biomédicas. Primeiramente, as hiPSCs foram extensivamente caracterizadas, o que assegurou a robustez da linhagem utilizada. Essa caracterização, realizada em diferentes momentos de cultivo, revelou informações cruciais sobre viabilidade celular, proliferação e marcadores específicos de pluripotência. Tais análises reforçam a necessidade de um controle rigoroso da qualidade das linhagens para garantir a reprodutibilidade e confiabilidade dos experimentos subsequentes.

Um aspecto central deste trabalho foi a avaliação do impacto dos fármacos, VPA e AZD 7648, nas condições de cultivo das hiPSCs. Uma das principais aplicações do VPA em iPSCs é sua capacidade de aumentar a eficiência da reprogramação de células somáticas para estados pluripotentes. Pesquisas demonstraram que o VPA pode melhorar significativamente a eficiência de indução de iPSCs ao promover a expressão de genes associados à pluripotência, como *OCT4*, *SOX2* e *NANOG* (Aguirre-Vázquez et al., 2021). Esse efeito é atribuído ao papel do VPA como um inibidor de HDAC, que altera o *landscape* da cromatina, facilitando um ambiente mais favorável para a ativação dos genes de pluripotência durante o processo de reprogramação (Ahmed et al., 2022). Por outro lado, o AZD 7648 se destaca como um potente inibidor de DNA-PK, uma proteína que desempenha um papel crucial na resposta ao dano e nos mecanismos de reparo do DNA (Lapa et al., 2023). Um dos principais mecanismos pelos quais o AZD 7648 melhora a edição gênica é a inibição da junção de extremidades não homólogas (NHEJ), uma via de reparo de DNA concorrente que frequentemente leva a

resultados indesejáveis em aplicações de CRISPR/Cas9. Estudos demonstraram que o uso do AZD 7648 desloca significativamente o equilíbrio em direção ao reparo dirigido por homologia (HDR), aumentando assim a eficiência de inserções gênicas precisas. Por exemplo, Wimberger et al. destacaram que a inibição simultânea de DNA-PK e Pol $\Theta$  não apenas melhora a eficiência de integração, mas também aumenta a precisão da edição do genoma, confirmando o papel crítico de DNA-PK nesse contexto (Wimberger et al., 2023). De forma semelhante, Kanke et al. relataram que a presença do AZD 7648 foi essencial para alcançar *knock-ins* eficientes utilizando moldes de DNA de fita simples em células primárias, ressaltando ainda mais sua importância na facilitação do HDR (Kanke et al., 2024). Embora ambos os compostos fossem inéditos em nossas práticas, eles demonstraram melhorar a viabilidade celular, mesmo sem aumentos significativos na taxa de proliferação. Esse comportamento pode ser atribuído aos mecanismos potencialmente distintos de ação dos fármacos, envolvendo modificações na cromatina e alterações na dinâmica do ciclo celular. Esses achados são particularmente importantes em contextos em que a viabilidade celular desempenha um papel crítico, sugerindo que esses fármacos podem ser ferramentas valiosas para a edição gênica em hiPSCs.

Além disso, a implementação de uma abordagem alternativa para induzir a expressão de *SOX17* e *PRDMI* durante a indução ao endoderma constituiu um avanço importante dentro do estudo. A estratégia, baseada em análises morfológicas, fenotípicas e moleculares, demonstrou eficácia na modulação da diferenciação celular. Em consonância com outros trabalhos, um achado relevante foi a repressão de *SOX2* e a suprrregulação de *SOX17* nas células do endoderma definitivo. Esse fenômeno ocorre porque *SOX17* e *SOX2* compartilham semelhanças moleculares e competem entre si, o que leva *SOX17* a favorecer a transcrição de genes associados à pluripotência no momento da diferenciação (Jostes et al., 2020). A regulação negativa de PDGFA também reforça esse comprometimento com a diferenciação (Wang S. et al., 2019). Esses resultados destacam a importância das vias de *SOX17* e *PRDMI* no processo de indução ao endoderma e abrem novas perspectivas para investigações futuras, especialmente na diferenciação de hPGCLCs, em que a indução a endoderma ainda não foi investigada como etapa intermediária entre a transição de hiPSCs para hPGCLCs (Frost & Gilchrist, 2024). O impacto dessa abordagem vai além dos nossos objetivos iniciais, e oferece uma base promissora para estudos mais amplos sobre o desenvolvimento humano.

Adicionalmente, este trabalho implementou a tecnologia CRISPR/Cas9 para a geração de linhagens *knock-in* de hiPSCs humanas com alelos repórteres, um esforço que resultou na criação de linhagens expressando marcadores fluorescentes para *SOX17* e *PRDMI*. Essas

linhagens estabelecem uma plataforma robusta para futuros experimentos focados na indução à formação de células germinativas primordiais humanas. Essa conquista é especialmente significativa, pois representa um marco pioneiro no Brasil, já que nenhum outro grupo no país se dedicou à geração de linhagens de hiPSCs com alelos repórteres funcionais até o momento. Esse avanço não só evidencia a capacidade científica do grupo de pesquisa, mas também reforça a importância de investir em abordagens inovadoras no campo da biologia celular e molecular em território nacional. Além disso, destaca a aplicabilidade de tecnologias como a CRISPR/Cas9 para a geração de ferramentas poderosas para estudos de desenvolvimento humano *in vitro*, como a oogênese humana. As linhagens de hiPSCs repórteres empregadas em estudos anteriores para a reconstrução desse processo biológico foram geradas por plataformas distintas do CRISPR/Cas9, o que reforça a originalidade desta pesquisa (Cotta et al., 2024).

Os resultados obtidos neste trabalho são consistentes com dados previamente descritos na literatura, o que fortalece tanto a validade quanto a robustez dos protocolos adotados. Tal congruência não só reforça a credibilidade científica do trabalho, mas também atesta o alinhamento das metodologias empregadas com as práticas internacionais, consolidando a relevância dessas abordagens. As hiPSCs analisadas apresentaram características morfológicas, ultraestruturais e de estabilidade genética que estão em total conformidade com o esperado para células-tronco de pluripotência induzida. Em particular, este estudo fez uma contribuição significativa ao caracterizar a ultraestrutura da linhagem proveniente do LaNCE-USP, um aspecto ainda não explorado para essa linhagem específica. As observações feitas corroboraram as descrições clássicas de hiPSCs, evidenciando uma organização celular bem definida, com núcleos grandes e nucléolos proeminentes, além de mitocôndrias e retículo endoplasmático organizados de forma típica (Tobias et al., 2018; Matz et al., 2017; Courtot et al., 2014).

Adicionalmente, as respostas obtidas com a aplicação de antibióticos seletivos mostraram-se compatíveis com os dados encontrados na literatura, demonstrando que as células responderam de maneira previsível (Alić et al., 2021; Sluch et al., 2018). Este aspecto é especialmente relevante, pois comprova a funcionalidade dos sistemas de seleção empregados, um ponto crucial para o sucesso da metodologia. Quanto ao uso de VPA e AZD 7648, as doses aplicadas neste estudo estão alinhadas com as concentrações descritas por outros grupos de pesquisa que utilizam hiPSCs. Esse alinhamento metodológico assegura a reprodutibilidade e comparabilidade dos dados obtidos, além de reforçar a relevância dessas doses para promover a edição gênica eficiente e influenciar a dinâmica celular sem comprometer a viabilidade das células.

Em relação à análise de proliferação celular, o tempo de incorporação do EdU em hiPSCs foi adequado, fornecendo dados relevantes sobre a taxa de replicação do DNA. Esses resultados confirmam que o protocolo utilizado está ajustado às necessidades do estudo, ao mesmo tempo em que abrem possibilidades para refinamentos futuros. Por exemplo, a inclusão de análises complementares, como a imunomarcação de marcadores de proliferação celular (KI67 e PCNA), poderia fornecer informações mais detalhadas sobre a dinâmica do ciclo celular nas hiPSCs. Além disso, a utilização de citometria de fluxo para quantificar a porcentagem de células EdU+ nos ensaios de proliferação celular representaria um avanço metodológico significativo, permitindo a obtenção de dados quantitativos mais precisos sobre esse processo em hiPSCs.

Os resultados obtidos com a aplicação da tecnologia CRISPR/Cas9 para *knock-in* nas hiPSCs, como descrito anteriormente, são promissores, demonstrando a viabilidade da estratégia adotada. No entanto, algumas etapas ainda exigem otimizações e análises adicionais para consolidar plenamente os dados obtidos até o momento. A quantificação precisa da porcentagem de células RFP e GFP positivas após a indução ao endoderma em células não selecionadas é um passo essencial para validar a funcionalidade dos alelos repórteres gerados, sobretudo por conta da possibilidade de avaliar qual tratamento é mais adequado para melhorar a eficiência do *knock-in*. Para isso, a citometria de fluxo surge novamente como uma técnica relevante, oferecendo uma avaliação quantitativa robusta da porcentagem de células RFP e GFP positivas em cada tratamento. Complementarmente, será necessário realizar a clonagem de células únicas (*single cell cloning*) das hiPSCs resistentes aos antibióticos seletivos, o que possibilitará uma caracterização genética completa por meio de sequenciamento de nova geração (NGS) e a geração de uma população celular geneticamente idêntica. Esse passo será crucial para confirmar a localização e integridade das inserções genéticas, bem como para avaliar a ausência de inserções *off-target* e possíveis mutações indesejadas.

Adicionalmente, a análise da estabilidade genômica das células deve ser aprofundada, com a realização de cariótipo nas linhagens modificadas, o que assegurará que o processo de edição não comprometeu a estabilidade cromossômica. A aplicação de técnicas como hibridização *in situ* fluorescente (FISH) com sondas específicas para os construtos inseridos, mapeamento óptico do genoma, LiveFISH e CasFISH permitirá a confirmação visual da presença dos segmentos de DNA no genoma, além da identificação de possíveis integrações ectópicas (Gallego Villarejo et al., 2024; Wang H. et al., 2019). A validação funcional das células geneticamente modificadas também é um passo essencial e envolverá a quantificação

da expressão de marcadores de pluripotência e endoderma, tanto a nível transcricional quanto proteico. Essas análises, realizadas por qPCR e imunofluorescência, devem ser conduzidas tanto em células indiferenciadas quanto diferenciadas, fornecendo uma compreensão abrangente sobre o impacto da modificação genética no estado funcional das células, *i.e.*, a manutenção da alta capacidade de diferenciação.

Embora estes passos adicionais ainda sejam necessários, os dados aqui apresentados indicam que a estratégia de *knock-in* adotada é promissora para a geração de linhagens de hiPSC repórteres. Com a implementação das etapas futuras, será possível consolidar a utilidade das linhagens desenvolvidas, contribuindo significativamente para o avanço de estudos sobre diferenciação celular e desenvolvimento *in vitro*. No entanto, apesar dos resultados significativos e promissores, o processo foi marcado por uma série de dificuldades técnicas e logísticas que impactaram o andamento dos experimentos e a obtenção de alguns dados. Uma das principais dificuldades foi a síntese dos braços de homologia via amplificação dos dsDNA utilizados no processo de *knock-in*. A ausência de informações claras sobre a utilização dos *primers* fornecidos com o kit dificultou a etapa inicial de preparo dos reagentes, exigindo esforços adicionais para padronizar as condições de amplificação. Além disso, a falta de esclarecimento quanto à estratégia de *Inner-outer Overlapping PCR* resultou em diversos equívocos, como o uso inadequado de *primers* de verificação para amplificação dos dsDNAs, o que gerou incertezas ao longo do processo. Por fim, tornou-se necessário o redesenho dos *primers* e otimização das reações de PCR, impactando significativamente a progressão contínua dos ensaios.

Paralelamente, a recuperação das hiPSCs após os processos de edição e criopreservação também foi um ponto crítico, com perdas celulares consideráveis que limitaram a continuidade dos experimentos em várias ocasiões. Inúmeras tentativas de transfecção foram realizadas desde dezembro de 2023, mas sempre ocorreram percalços: ou as hiPSCs morriam após a transfecção, ou não suportavam a criopreservação e apresentavam viabilidade nula no momento do descongelamento. Em função disso, adotamos a estratégia de realizar ao menos duas passagens sequenciais após esses experimentos mais estressantes. Outro desafio significativo foi a seleção de células geneticamente modificadas: já em 2024, conseguimos selecionar colônias resistentes aos antibióticos seletivos, mas, inesperadamente, as células não sobreviveram a longo prazo. As estratégias adotadas apresentaram, portanto, limitações para isolar eficientemente as hiPSCs de interesse, o que nos levou a desenvolver abordagens alternativas que ainda precisam ser refinadas.

Além desses obstáculos, problemas técnicos com equipamentos laboratoriais, quedas de energia e atrasos na entrega de insumos essenciais, como o meio E8 e os kits *TrueTag™ Donor DNA RFP/GFP Stem*, atrasaram a execução de experimentos críticos. Adicionalmente, contaminações recorrentes durante as induções ao endoderma representaram um desafio frequente. Apesar das práticas assépticas e da revisão constante das condições de cultura, essas contaminações interferiram na obtenção de dados consistentes, exigindo reinícios de experimentos e limitando o tempo disponível. Manter culturas de hiPSCs sem o uso de antibióticos em um ambiente compartilhado com outros pesquisadores, que manipulavam diferentes linhagens celulares, incluindo culturas primárias, representou um desafio adicional, exigindo um controle rigoroso das boas práticas de cultura.

Outro aspecto relevante que impactou a execução dos experimentos foi a dificuldade em padronizar os parâmetros da PCR juncional. A limitação de tempo para otimizar adequadamente o anelamento de cada *primer*, as concentrações de DNA genômico, os tempos de extensão e outros fatores comprometeu a obtenção de resultados consistentes nessa análise. Para contornar essa limitação, optamos pela eletroforese capilar, um método mais sensível do que a eletroforese em gel de agarose, que nos permitiu localizar as bandas de tamanho esperado de maneira mais precisa. Da mesma forma, a restrição de tempo impossibilitou no presente estudo a seleção e expansão de clones individuais para posterior sequenciamento, um passo essencial para validar a integridade das edições genéticas.

Embora essas dificuldades tenham atrasado algumas etapas, elas proporcionaram aprendizados importantes que servirão para a otimização de protocolos em experimentos futuros. A experiência acumulada ao longo deste estudo estabelece uma base sólida para superar esses desafios com maior eficiência em trabalhos subsequentes. Além disso, as limitações encontradas ressaltam a importância do planejamento estratégico e da alocação adequada de tempo para etapas críticas, especialmente em projetos de natureza tão complexa e inovadora como o presente. As hiPSCs geradas e criopreservadas durante este trabalho representam um recurso valioso para estudos futuros. Todas as linhagens, originadas de diferentes grupos experimentais, estão agora disponibilizadas para a continuidade das análises e para o desenvolvimento de novos experimentos. Isso amplia significativamente o potencial de aplicação das metodologias desenvolvidas até o momento.

Uma das primeiras etapas a ser considerada é a repetição do processo de seleção, utilizando, inicialmente, doses mais baixas de antibióticos seletivos. Esse ajuste gradual

permitirá otimizar a eficiência na seleção de células geneticamente modificadas, minimizando impactos negativos sobre a viabilidade celular e, assim, aumentando a reprodutibilidade dos resultados. Além disso, as linhagens estabelecidas poderão ser aplicadas diretamente em protocolos de indução a hPGCLCs, consolidando o uso dessas ferramentas em modelos de estudos da especificação e oogênese inicial. Isso permitirá explorar aspectos-chave do desenvolvimento celular e dos mecanismos regulatórios envolvidos na formação de células germinativas humanas, avançando na área de biologia reprodutiva.

Perspectivas ainda mais amplas, incluem a integração dessas células em sistemas de microfluídica, com o objetivo de criar modelos mais sofisticados, como *organ-on-a-chip* de ovário, uma abordagem inédita na biologia reprodutiva humana. Essa estratégia inovadora possibilitará simular de maneira mais precisa o microambiente de diferenciação celular, permitindo realizar estudos dinâmicos e complexos sobre a interação entre hPGCLCs e outros tipos celulares, como as células da granulosa, em condições controladas. Essas perspectivas não apenas garantem a continuidade do trabalho iniciado, mas também ampliam sua relevância, conectando-o a avanços tecnológicos e científicos que têm o potencial de impactar significativamente a compreensão dos processos celulares e o desenvolvimento de novas terapias.

## CONCLUSÕES INTEGRATIVAS

Os resultados apresentados nos capítulos desta dissertação evidenciam tanto a relevância científica quanto o potencial das tecnologias de edição gênica na geração de linhagens de hiPSCs com alelos repórteres. Além disso, destacam os desafios enfrentados e os avanços possibilitados por essas ferramentas.

No Capítulo 1, foi realizada uma revisão abrangente sobre as tecnologias de edição gênica, com ênfase na CRISPR/Cas9, demonstrando sua eficácia e versatilidade na criação de alelos repórteres para estudos do desenvolvimento humano, modelagem de doenças e terapias terapêuticas. A literatura analisada destacou o potencial desses alelos como marcadores visuais confiáveis, que fornecem insights valiosos sobre processos celulares complexos e contribuem para o avanço do conhecimento em biologia celular e translacional. Ao mesmo tempo, foram discutidos os desafios técnicos, como a precisão na inserção de genes, a funcionalidade das linhagens geradas e as limitações metodológicas, proporcionando uma base teórica fundamental para os experimentos desenvolvidos no Capítulo 2. Particularmente, revisamos a aplicação de moduladores epigenéticos e inibidores de reparo do DNA em células-tronco pluripotentes, explorando as bases moleculares de compostos como o VPA e o AZD 7648 na edição gênica por CRISPR/Cas9. Esse embasamento foi fundamental para estruturar nossa abordagem experimental e orientar as estratégias adotadas para alcançar os objetivos estabelecidos.

O Capítulo 2 detalhou os esforços experimentais que resultaram na geração de linhagens de hiPSCs editadas para expressar os alelos repórteres *SOX17-RFP* e *PRDMI-GFP*. Utilizando protocolos adaptados à realidade do laboratório, as linhagens de hiPSCs utilizadas foram rigorosamente caracterizadas em termos de morfologia, ultraestrutura, estabilidade genética e funcionalidade, com comportamentos consistentes com as expectativas descritas na literatura. A validação dos alelos repórteres em condições de cultivo e diferenciação confirmou seu potencial para estudos de diferenciação e função de células germinativas primordiais humanas, fornecendo uma ferramenta valiosa para a reconstrução da gametogênese humana *in vitro* num futuro próximo.

Esses resultados integram os avanços teóricos e experimentais, destacando o impacto das tecnologias de edição gênica, não apenas no aprofundamento do conhecimento científico, mas também na aplicação prática para resolver questões biológicas complexas. A combinação das abordagens descritas nos dois capítulos representa um marco pioneiro no Brasil,

posicionando esta pesquisa como um modelo para futuros estudos que busquem aplicar hiPSCs editadas no entendimento de processos fundamentais do desenvolvimento humano.

Ao longo deste trabalho, ficou evidente o valor das estratégias integrativas, que combinam uma revisão bibliográfica abrangente com experimentação prática. Tais estratégias foram essenciais para superar os desafios impostos pela inovação no uso de edição gênica em hiPSCs. A geração das linhagens *SOX17-RFP* e *PRDMI-GFP* não apenas amplia as possibilidades de investigação na biologia do desenvolvimento, mas também estabelece uma base para projetos futuros, como o desenvolvimento de modelos organoides avançados. Isso consolida a pesquisa nacional, posicionando o grupo de pesquisa como um participante relevante no cenário científico internacional.

Embora desafiador, o trabalho com uma abordagem inovadora resultou em aprendizados valiosos. Foi necessário ajustar protocolos, realizar adaptações e dedicar intensos esforços para superar obstáculos inerentes à introdução de novas tecnologias, especialmente em um cenário com limitações logísticas e recursos mais restritos se comparados a centros de pesquisa de países mais desenvolvidos. Contudo, a experiência adquirida durante este processo nos capacitou a refinar as técnicas utilizadas e a explorar suas aplicações futuras com maior segurança e eficiência. A geração dessas linhagens vai além de construir ferramentas para as próximas etapas da pesquisa; ela também pode, a longo prazo, contribuir para posicionar o Brasil como um ator relevante no cenário global da biologia de células-tronco. Estabelecer expertise local em tecnologias de edição gênica e modelagem celular é fundamental para fomentar a inovação científica no país e atender às demandas específicas da nossa realidade, seja na pesquisa básica, no desenvolvimento de modelos de doenças ou na medicina regenerativa.

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- Aguirre-Vázquez, A., Salazar-Olivo, L. A., Flores-Ponce, X., Arriaga-Guerrero, A. L., Garza-Rodríguez, D., Camacho-Moll, M. E., Velasco, I., Castorena-Torres, F., Dadheech, N., & de León, M. B. (2021). 5-aza-2'-deoxycytidine and valproic acid in combination with chir99021 and a83-01 induce pluripotency genes expression in human adult somatic cells. *Molecules*, 26(7). <https://doi.org/10.3390/molecules26071909>
- Ahmed, M. F., El-Sayed, A. K., Ahmed, E. A., Zhang, Y., & Li, B. (2022). Induced pluripotent stem cell generation using mRNAs: the effect of valproic acid, 5-azacytidine and ascorbic acid. *Veterinarski Arhiv*, 92(1), 73–85. <https://doi.org/10.24099/vet.arhiv.1328>
- Alić, I., Goh, P. A., Murray, A., Portelius, E., Gkanatsiou, E., Gough, G., Mok, K. Y., Koschut, D., Brunmeir, R., Yeap, Y. J., O'Brien, N. L., Groet, J., Shao, X., Havlicek, S., Dunn, N. R., Kvartsberg, H., Brinkmalm, G., Hithersay, R., Startin, C., ... Nižetić, D. (2021). Patient-specific Alzheimer-like pathology in trisomy 21 cerebral organoids reveals BACE2 as a gene dose-sensitive AD suppressor in human brain. *Molecular Psychiatry*, 26(10), 5766–5788. <https://doi.org/10.1038/s41380-020-0806-5>
- Cai, L., Ma, X., Liu, S., Liu, J., Wang, W., Cui, Y., Ding, W., Mao, Y., Chen, H., Huang, J., Zhou, Z., & Liu, J. (2013). Effects of upregulation of Hsp27 expression on oocyte development and maturation derived from polycystic ovary syndrome. *PLoS ONE*, 8(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0083402>
- Cerneckis, J., Cai, H., & Shi, Y. (2024). Induced pluripotent stem cells (iPSCs): molecular mechanisms of induction and applications. In *Signal Transduction and Targeted Therapy* (Vol. 9, Issue 1). Springer Nature. <https://doi.org/10.1038/s41392-024-01809-0>
- Chaudhari, N., Rickard, A. M., Roy, S., Dröge, P., & Makhija, H. (2020). A non-viral genome editing platform for site-specific insertion of large transgenes. *Stem Cell Research and Therapy*, 11(1). <https://doi.org/10.1186/s13287-020-01890-6>
- Cotta, G. C., Teixeira dos Santos, R. C., Costa, G. M. J., & Lacerda, S. M. dos S. N. (2024). Reporter Alleles in hiPSCs: Visual Cues on Development and Disease. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 25, Issue 20). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/ijms252011009>
- Courtot, A. M., Magniez, A., Oudrhiri, N., Féraud, O., Bacci, J., Gobbo, E., Proust, S., Turhan, A. G., & Bennaceur-Griscelli, A. (2014). Morphological analysis of human induced

- pluripotent stem cells during induced differentiation and reverse programming. *BioResearch Open Access*, 3(5), 206–216. <https://doi.org/10.1089/biores.2014.0028>
- Coxir, S. A., Costa, G. M. J., Santos, C. F. dos, Alvarenga, R. de L. L. S., & Lacerda, S. M. dos S. N. (2023). From in vivo to in vitro: exploring the key molecular and cellular aspects of human female gametogenesis. In *Human Cell*. Springer. <https://doi.org/10.1007/s13577-023-00921-7>
- Doss, M. X., & Sachinidis, A. (2019). Current challenges of iPSC-based disease modeling and therapeutic implications. In *Cells* (Vol. 8, Issue 5). MDPI. <https://doi.org/10.3390/cells8050403>
- Frost, E. R., & Gilchrist, R. B. (2024). Making human eggs in a dish: are we close? In *Trends in Biotechnology* (Vol. 42, Issue 2, pp. 168–178). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2023.07.007>
- Gallego Villarejo, L., Gerding, W. M., Bachmann, L., Hardt, L. H. I., Bormann, S., Nguyen, H. P., & Müller, T. (2024). Optical Genome Mapping Reveals Genomic Alterations upon Gene Editing in hiPSCs: Implications for Neural Tissue Differentiation and Brain Organoid Research. *Cells*, 13(6). <https://doi.org/10.3390/cells13060507>
- Gkoutela, S., Zhang, K. X., Shafiq, T. A., Liao, W. W., Hargan-Calvopiña, J., Chen, P. Y., & Clark, A. T. (2015). DNA demethylation dynamics in the human prenatal germline. *Cell*, 161(6), 1425–1436. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.05.012>
- Huang, C. Y., Nicholson, M. W., Wang, J. Y., Ting, C. Y., Tsai, M. H., Cheng, Y. C., Liu, C. L., Chan, D. Z. H., Lee, Y. C., Hsu, C. C., Hsu, Y. H., Yang, C. F., Chang, C. M. C., Ruan, S. C., Lin, P. J., Lin, J. H., Chen, L. L., Hsieh, M. L., Cheng, Y. Y., ... Hsieh, P. C. H. (2024). Population-based high-throughput toxicity screen of human iPSC-derived cardiomyocytes and neurons. *Cell Reports*, 43(9), 114748. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2024.114748>
- Imaizumi, Y., & Okano, H. (2014). Modeling human neurological disorders with induced pluripotent stem cells. In *Journal of Neurochemistry* (Vol. 129, Issue 3, pp. 388–399). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/jnc.12625>
- Inoue, M., Yamaguchi, R., He, C. C. J., Ikeda, A., Okano, H., & Kohyama, J. (2023). Current status and prospects of regenerative medicine for spinal cord injury using human induced pluripotent stem cells: a review. In *Stem Cell Investigation* (Vol. 10, Issue 6). AME Publishing Company. <https://doi.org/10.21037/sci-2022-037>

- Irie, N., Weinberger, L., Tang, W. W. C., Kobayashi, T., Viukov, S., Manor, Y. S., Dietmann, S., Hanna, J., & Surani, M. A. (2015). SOX17 Is a Critical Specifier of Human Primordial Germ Cell Fate. *Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.12.013>
- Irie Naoko and Kobayashi, T. and A. S. M. (2024). Human Primordial Germ Cell-Like Cell Induction from Pluripotent Stem Cells by SOX17 and PRDM1 Expression. In M. Barchi Marco and De Felici (Ed.), *Germ Cell Development: Methods and Protocols* (pp. 87–97). Springer US. [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-3698-5\\_7](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-3698-5_7)
- Jostes, S. V., Fellermeier, M., Arévalo, L., Merges, G. E., Kristiansen, G., Nettersheim, D., & Schorle, H. (2020). Unique and redundant roles of SOX2 and SOX17 in regulating the germ cell tumor fate. *International Journal of Cancer*, *146*(6), 1592–1605. <https://doi.org/10.1002/ijc.32714>
- Kang, Y., Liang, S., Gao, S., & Chen, J. (2024). Generation of a hiPSC line (TONGJII001-A) from a 46,XX,ins(1;15)(p13.3; q22.31q26.1),inv(2)(p22.1p16.3),t(2;14)(q34;q12) infertility patient. *Stem Cell Research*, *81*. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2024.103561>
- Kanke, K. L., Rayner, R. E., Bozik, J., Abel, E., Venugopalan, A., Suu, M., Nouri, R., Stack, J. T., Guo, G., Vetter, T. A., Cormet-Boyaka, E., Hester, M. E., & Vaidyanathan, S. (2024). Single-stranded DNA with internal base modifications mediates highly efficient knock-in in primary cells using CRISPR-Cas9. *Nucleic Acids Research*, *52*(22), 13561–13576. <https://doi.org/10.1093/nar/gkae1069>
- Kojima, Y., Yamashiro, C., Murase, Y., Yabuta, Y., Okamoto, I., Iwatani, C., Tsuchiya, H., Nakaya, M., Tsukiyama, T., Nakamura, T., Yamamoto, T., & Saitou, M. (2021). GATA Transcription Factors, SOX17 and TFAP2C, Drive the Human Germ-Cell Specification Program. *Life Science Alliance*. <https://doi.org/10.26508/lsa.202000974>
- Landshammer, A., Bolondi, A., Kretzmer, H., Much, C., Buschow, R., Rose, A., Wu, H. J., Mackowiak, S. D., Braendl, B., Giesselmann, P., Tornisiello, R., Parsi, K. M., Huey, J., Mielke, T., Meierhofer, D., Maehr, R., Hnisz, D., Michor, F., Rinn, J. L., & Meissner, A. (2023). T-REX17 is a transiently expressed non-coding RNA essential for human endoderm formation. *ELife*, *12*. <https://doi.org/10.7554/eLife.83077>
- Lapa, B. S., Costa, M. I., Figueiredo, D., Jorge, J., Alves, R., Monteiro, A. R., Serambeque, B., Laranjo, M., Botelho, M. F., Carreira, I. M., Sarmiento-Ribeiro, A. B., & Gonçalves, A. C. (2023). AZD-7648, a DNA-PK Inhibitor, Induces DNA Damage, Apoptosis, and Cell

- Cycle Arrest in Chronic and Acute Myeloid Leukemia Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(20). <https://doi.org/10.3390/ijms242015331>
- Leal, A. F., Herreno-Pachón, A. M., Benincore-Flórez, E., Karunathilaka, A., & Tomatsu, S. (2024). Current Strategies for Increasing Knock-In Efficiency in CRISPR/Cas9-Based Approaches. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 25, Issue 5). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/ijms25052456>
- Li, T., Li, H., Wang, Y., Harvard, C., Tan, J. L., Au, A., Xu, Z., Jablons, D. M., & You, L. (2011). The expression of CXCR4, CXCL12 and CXCR7 in malignant pleural mesothelioma. *Journal of Pathology*, 223(4), 519–530. <https://doi.org/10.1002/path.2829>
- Li, Z. K., Wang, L. Y., Wang, L. Bin, Feng, G. H., Yuan, X. W., Liu, C., Xu, K., Li, Y. H., Wan, H. F., Zhang, Y., Li, Y. F., Li, X., Li, W., Zhou, Q., & Hu, B. Y. (2018). Generation of Bimaternal and Bipaternal Mice from Hypomethylated Haploid ESCs with Imprinting Region Deletions. *Cell Stem Cell*, 23(5), 665-676.e4. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2018.09.004>
- Luo, Y. Y., Jie, H. Y., Huang, K. J., Cai, B., Zhou, X., Liang, M. Y., Zhou, C. Q., & Mai, Q. Y. (2023). The dynamic expression of SOX17 in germ cells from human female foetus and adult ovaries after specification. *Frontiers in Endocrinology*, 14. <https://doi.org/10.3389/fendo.2023.1124143>
- Matz, P., Wruck, W., Fauler, B., Herebian, D., Mielke, T., & Adjaye, J. (2017). Footprint-free human fetal foreskin derived iPSCs: A tool for modeling hepatogenesis associated gene regulatory networks. *Scientific Reports*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-06546-9>
- Nettersheim, D., Arndt, I., Sharma, R., Riesenberger, S., Jostes, S., Schneider, S., Hölzel, M., Kristiansen, G., & Schorle, H. (2016). The cancer/testis-antigen PRAME supports the pluripotency network and represses somatic and germ cell differentiation programs in seminomas. *British Journal of Cancer*, 115(4), 454–464. <https://doi.org/10.1038/bjc.2016.187>
- O'Donnell, L., Smith, L. B., & Rebourcet, D. (2022). Sertoli cells as key drivers of testis function. In *Seminars in Cell and Developmental Biology* (Vol. 121, pp. 2–9). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2021.06.016>

- Piprek Editor, R. P. (n.d.). *Results and Problems in Cell Differentiation 58 Molecular Mechanisms of Cell Differentiation in Gonad Development*. <http://www.springer.com/series/400>
- Puspita, L., Juwono, V. B., & Shim, J. (2024). Advances in human pluripotent stem cell reporter systems. *IScience*, 27(9), 110856. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2024.110856>
- Saitou, M. (2021). Mammalian Germ Cell Development: From Mechanism to In Vitro Reconstitution. In *Stem Cell Reports* (Vol. 16, Issue 4, pp. 669–680). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2021.01.008>
- Sakata, Y., Cheng, K., Mayama, M., Seita, Y., Detlefsen, A. J., Mesaros, C. A., Penning, T. M., Shishikura, K., Yang, W., Auchus, R. J., Strauss, J. F., & Sasaki, K. (2022). Reconstitution of human adrenocortical specification and steroidogenesis using induced pluripotent stem cells. *Developmental Cell*, 57(22), 2566-2583.e8. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2022.10.010>
- Schmittgen, T. D., & Livak, K. J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature Protocols*, 3(6), 1101–1108. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.73>
- Selvaraj, S., Feist, W. N., Viel, S., Vaidyanathan, S., Dudek, A. M., Gastou, M., Rockwood, S. J., Ekman, F. K., Oseghale, A. R., Xu, L., Pavel-Dinu, M., Luna, S. E., Cromer, M. K., Sayana, R., Gomez-Ospina, N., & Porteus, M. H. (2024). High-efficiency transgene integration by homology-directed repair in human primary cells using DNA-PKcs inhibition. *Nature Biotechnology*, 42(5), 731–744. <https://doi.org/10.1038/s41587-023-01888-4>
- Sluch, V. M., Chamling, X., Wenger, C., Duan, Y., Rice, D. S., & Zack, D. J. (2018). Highly efficient scarless knock-in of reporter genes into human and mouse pluripotent stem cells via transient antibiotic selection. *PLoS ONE*, 13(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0201683>
- Sriram, S., Tran, J. A., Guo, X., Hutcheon, A. E. K., Lei, H., Kazlauskas, A., & Zieske, J. D. (2017). PDGFR $\alpha$  is a key regulator of T1 and T3's differential effect on SMA expression in human corneal fibroblasts. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 58(2), 1179–1186. <https://doi.org/10.1167/iovs.16-20016>

- Takahashi, K., & Yamanaka, S. (2006). Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell*, *126*(4), 663–676. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.024>
- Takahashi, K., & Yamanaka, S. (2016). A decade of transcription factor-mediated reprogramming to pluripotency. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 17, Issue 3, pp. 183–193). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrm.2016.8>
- Takayama, K., Igai, K., Hagihara, Y., Hashimoto, R., Hanawa, M., Sakuma, T., Tachibana, M., Sakurai, F., Yamamoto, T., & Mizuguchi, H. (2017). Highly efficient biallelic genome editing of human ES/iPS cells using a CRISPR/Cas9 or TALEN system. *Nucleic Acids Research*, *45*(9), 5198–5207. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx130>
- Tang, W. W., Castillo-Venzor, A., Gruhn, W. H., Kobayashi, T., Penfold, C. A., Morgan, M. D., Sun, D., Irie, N., & Azim Surani, M. (n.d.). *Sequential enhancer state remodelling defines human germline competence and 2 specification Author list.*
- Tobias, I. C., Khazaei, R., & Betts, D. H. (2018). Analysis of Mitochondrial Dimensions and Cristae Structure in Pluripotent Stem Cells Using Transmission Electron Microscopy. *Current Protocols in Stem Cell Biology*, *47*(1). <https://doi.org/10.1002/cpsc.67>
- Tricot, T., Verfaillie, C. M., & Kumar, M. (2022). Current Status and Challenges of Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Liver Models in Drug Discovery. In *Cells* (Vol. 11, Issue 3). MDPI. <https://doi.org/10.3390/cells11030442>
- Turhan, A. G., Hwang, J. W., Chaker, D., Tasteyre, A., Latsis, T., Griscelli, F., Desterke, C., & Bennaceur-Griscelli, A. (2021). iPSC-Derived Organoids as Therapeutic Models in Regenerative Medicine and Oncology. In *Frontiers in Medicine* (Vol. 8). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fmed.2021.728543>
- Wang, H., Nakamura, M., Abbott, T. R., Zhao, D., Luo, K., Yu, C., Nguyen, C. M., Lo, A., Daley, T. P., Russa, M. La, Liu, Y., & Qi, L. S. (2019). CRISPR-mediated live imaging of genome editing and transcription. *Science*, *365*(6459), 1301–1305. <https://doi.org/10.1126/science.aax7852>
- Wang, S. M., Lin, H. Y., Chen, Y. L., Hsu, T. I., Chuang, J. Y., Kao, T. J., & Ko, C. Y. (2019). CCAAT/enhancer-binding protein delta regulates the stemness of glioma stem-like cells through activating PDGFA expression upon inflammatory stimulation. *Journal of Neuroinflammation*, *16*(1). <https://doi.org/10.1186/s12974-019-1535-z>

- Wang, X., Veerapandian, V., Yang, X., Song, K., Xu, X., Cui, M., Yuan, W., Huang, Y., Xia, X., Yao, Z., Wan, C., Luo, F., Song, X., Wang, X., Zheng, Y., Hutchins, A. P., Jauch, R., Liang, M., Wang, C., ... Zhao, X. Y. (2021). The chromatin accessibility landscape reveals distinct transcriptional regulation in the induction of human primordial germ cell-like cells from pluripotent stem cells. *Stem Cell Reports*, *16*(5), 1245–1261. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2021.03.032>
- Wimberger, S., Akrap, N., Firth, M., Brengdahl, J., Engberg, S., Schwinn, M. K., Slater, M. R., Lundin, A., Hsieh, P. P., Li, S., Cerboni, S., Sumner, J., Bestas, B., Schiffthaler, B., Magnusson, B., Di Castro, S., Iyer, P., Bohlooly-Y, M., Machleidt, T., ... Maresca, M. (2023). Simultaneous inhibition of DNA-PK and Pol $\Theta$  improves integration efficiency and precision of genome editing. *Nature Communications*, *14*(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-023-40344-4>
- Yamashiro, C., Sasaki, K., Yabuta, Y., Kojima, Y., Nakamura, T., Okamoto, I., Yokobayashi, S., Murase, Y., Ishikura, Y., Shirane, K., Sasaki, H., Yamamoto, T., & Saitou, M. (2018a). Generation of Human Oogonia From Induced Pluripotent Stem Cells in Vitro. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.aat1674>
- Yamashiro, C., Sasaki, K., Yokobayashi, S., Kojima, Y., & Saitou, M. (2020). Generation of human oogonia from induced pluripotent stem cells in culture. *Nature Protocols*, *15*(4), 1560–1583. <https://doi.org/10.1038/s41596-020-0297-5>
- Yao, C., Yao, R., Luo, H., & Shuai, L. (2022). Germline specification from pluripotent stem cells. In *Stem Cell Research and Therapy* (Vol. 13, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s13287-022-02750-1>
- Zhang, P. Y., Fan, Y., Tan, T., & Yu, Y. (2020). Generation of Artificial Gamete and Embryo From Stem Cells in Reproductive Medicine. In *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* (Vol. 8). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00781>
- Zhong, A., Li, M., & Zhou, T. (2020). Protocol for the Generation of Human Pluripotent Reporter Cell Lines Using CRISPR/Cas9. *STAR Protocols*, *1*(2). <https://doi.org/10.1016/j.xpro.2020.100052>