

Título do estudo

Detecção dos genes virais SEV, SEV-KOS, SEV-KLF4 e L-Myc em 4 amostras de células-tronco de pluripotência induzida (iPSCs).

Identificação do laboratório teste

CROP Biolabs

Prudenciatti e Ribeiro Pesquisa e Desenvolvimento LTDA

38.286.342/0001-92

Av. Professor Mário Rubens Guimarães Montenegro, s/n, Bloco V, Unipex, Segundo Andar – UNESP Câmpus Botucatu (SP) CEP 18618-687

Instalação teste habilitada na Rede Brasileira de Laboratórios Analíticos em Saúde (REBLAS) RESOLUÇÃO-RE Nº 4.182, DE 15 DE DEZEMBRO DE 2022

Identificação do cliente

Razão Social: **HemoCord Clínica Médica LTDA**

CNPJ: **24.797.131/0001-00**

Endereço: **Av. SAP, 151/114 – TECNOSINOS – Prédio UNITEC 3 - São Leopoldo (RS) CEP: 93022-718**

Telefone: **(51) 3019-3450**

E-mail: **liziane.raquel@hemocord.com.br**

Gerente da Instalação de Teste

Dr. Lucas Gabriel Ribeiro

CRQIV: 04368883

Av. Dr Vital Brasil, nº 1410, Jardim Bom Pastor, Botucatu/SP, CEP 18607-660, Brasil

Telefone: +55 19 99986-9383

E-mail: **lucas@cropBiolabs.com**

Metodologia de estudo

Técnica de amplificação de cDNA por RT-PCR (*Reverse transcription polymerase chain reaction*).

Declaração do Programa da Garantia da Qualidade

Este relatório técnico teve averiguação da garantia da qualidade da Prudenciatti e Ribeiro P&D LTDA (Crop Biolabs) para a verificação da conformidade. Os resultados declarados nesse relatório apresentam os dados brutos do estudo. O cronograma de inspeções do projeto está descrito abaixo:

Tipos de inspeções	Registro de inspeções
Descrição	Data de inspeção/relato
Início do experimento	01/04/2023
Término do experimento	01/04/2023
Início do estudo	30/03/2023
Término do estudo	02/04/2023

Lucas Gabriel Ribeiro

Gerente da Instalação de Teste

Responsável pelo Programa da Garantia da Qualidade

Prudenciatti e Ribeiro P&D LTDA

Instalação teste habilitada na Rede Brasileira de Laboratórios Analíticos em Saúde (REBLAS)

RESOLUÇÃO-RE Nº 4.182, DE 15 DE DEZEMBRO DE 2022

Crop Biolabs - Av. Professor Mário Rubens Guimarães Montenegro | s/n | Bloco V, Unipex, Sala 208 | Botucatu/SP | Brasil | CEP 18618-687 | + 55 16 999758-1616 | Email: arua@cropbiolabs.com | Site: www.cropbiolabs.com.br



Sumário

Declaração do Programa da Garantia da Qualidade	2
1. Introdução.....	5
1.1 Objetivos.....	5
1.2 Instalação teste e período de execução experimental	5
1.3 Pessoal envolvido no estudo	5
1.4 Armazenamento e retenção de registros e materiais	6
2. Materiais e métodos	6
2.1 Identificação das amostras (item teste).....	6
2.2 Informações do item de referência	6
2.3 Equipamentos, reagentes e soluções.....	7
2.4 Seleção do sistema teste	7
2.5 Justificativa da escolha do sistema teste.....	8
2.6 Origem do sistema teste.....	8
2.7 Metodologia de estudo	8
2.7.1 Método RT-PCR - Ensaio TaqMan	8
2.7.3 Condições de termociclagem e detecção de fluorescência	9
2.7.4 Controles experimentais	10
3. Método de Análise dos resultados.....	10
4. Resultados	10
5. Conclusão.....	12

Prudenciatti e Ribeiro P&D LTDA

Instalação teste habilitada na Rede Brasileira de Laboratórios Analíticos em Saúde (REBLAS)

RESOLUÇÃO-RE Nº 4.182, DE 15 DE DEZEMBRO DE 2022

Crop Biolabs - Av. Professor Mário Rubens Guimarães Montenegro | s/n | Bloco V, Unipex, Sala 208 | Botucatu/SP |
Brasil | CEP 18618-687 | + 55 16 999758-1616 | Email: arua@cropbiolabs.com | Site: www.cropbiolabs.com.br



Resumo

O projeto em questão visa a detecção dos genes SEV, SEV–KOS, SEV–KLF4, L–Myc, e NANOG (controle endógeno) em 4 amostras de células-tronco de pluripotência induzida (iPSCs), através da técnica de amplificação do cDNA pela RT–PCR (Reverse transcription polymerase chain reaction). Inicialmente, foi realizado a extração do material genético RNA, sua quantificação e a verificação de contaminação por solventes orgânicos e proteínas, utilizando um espectrofotômetro. Para eliminar possíveis interferências causadas por DNA remanescente, as amostras de RNA foram submetidas a tratamento por DNase. Em seguida, a detecção dos transcritos dos genes alvos, foi realizada utilizando método RT–qPCR – TaqMan. A análise dos resultados foi realizada com base na fluorescência detectada e respeitando a fase exponencial da amplificação, para todos os genes em análise, sendo considerados amplificados os genes que apresentaram Ct (ciclo threshold) < 40, que ultrapassaram o valor de threshold e apresentaram amplificação exponencial. Os ensaios foram específicos para detecção dos alvos de acordo com os controles positivo e negativos utilizados e as amostras testadas foram negativas para os genes virais SEV, SEV–KOS, SEV–KLF4 e L–Myc.

Prudenciatti e Ribeiro P&D LTDA

Instalação teste habilitada na Rede Brasileira de Laboratórios Analíticos em Saúde (REBLAS)

RESOLUÇÃO-RE Nº 4.182, DE 15 DE DEZEMBRO DE 2022

Crop Biolabs - Av. Professor Mário Rubens Guimarães Montenegro | s/n | Bloco V, Unipex, Sala 208 | Botucatu/SP | Brasil | CEP 18618-687 | + 55 16 999758-1616 | Email: arua@cropbiolabs.com | Site: www.cropbiolabs.com.br



1. Introdução

1.1 Objetivos

O objetivo do estudo foi detectar genes virais, SEV, SEV–KOS, SEV–KLF4 e L–Myc em amostras de células-tronco de pluripotência induzida (iPSCs), com intuito de qualificar os clones celulares em relação aos vetores virais utilizados nas linhagens celulares.

1.2 Instalação teste e período de execução experimental

O estudo foi realizado no **Laboratório de Nível de Biossegurança 2 (LNB2)** da Prudenciatti e Ribeiro Pesquisa e Desenvolvimento LTDA (Crop Biolabs). Abaixo estão detalhadas as datas de condução experimentais e de elaboração dos relatórios técnicos.

Fase de estudo	Data de execução
Delineamento experimental	15/03/2023
Início da fase experimental	01/04/2023
Fim da fase experimental	01/04/2023
Emissão do Relatório Técnico Final	06/04/2023

1.3 Pessoal envolvido no estudo

Função	Responsável
Gerente da Qualidade e da Instalação de Teste	Lucas Gabriel Ribeiro
Diretora de Estudo	Amanda Fantini de C Andrade

Prudenciatti e Ribeiro P&D LTDA

Instalação teste habilitada na Rede Brasileira de Laboratórios Analíticos em Saúde (REBLAS)

RESOLUÇÃO-RE Nº 4.182, DE 15 DE DEZEMBRO DE 2022

Crop Biolabs - Av. Professor Mário Rubens Guimarães Montenegro | s/n | Bloco V, Unipex, Sala 208 | Botucatu/SP | Brasil | CEP 18618-687 | + 55 16 999758-1616 | Email: arua@cropbiolabs.com | Site: www.cropbiolabs.com.br



1.4 Armazenamento e retenção de registros e materiais

O formulário de envio de amostras referente aos equipamentos enviados, o relatório técnico final e outros documentos e materiais relacionados ao estudo são retidos no sistema informatizado da Prudenciatti e Ribeiro Pesquisa e Desenvolvimento LTDA e serão armazenados por um período de 05 (cinco) anos.

2. Materiais e métodos

2.1 Identificação das amostras (item teste)

Descrição	Identificação
Tipo de amostra ² :	Células criopreservadas
Identificação das amostras ² :	M2_IPSC3_A17, M2_IPSC3_B16, M2_IPSC3_L16 e M2_IPSC3_O16
Proposta Comercial ¹ :	00170
Datas de fabricação ² :	-
Características ² :	Células-tronco pluripotente induzidas
Condições de armazenamento ² :	Armazenamento em freezer - 80C°
Data de recebimento das amostras ¹ :	09 de março de 2023

- 1) Informações fornecidas pela Crop Biolabs;
- 2) Informações Fornecidas pelo patrocinador **HemoCord Clínica Médica LTDA.**

2.2 Informações do item de referência

Não aplicável.

Prudenciatti e Ribeiro P&D LTDA

Instalação teste habilitada na Rede Brasileira de Laboratórios Analíticos em Saúde (REBLAS)

RESOLUÇÃO-RE Nº 4.182, DE 15 DE DEZEMBRO DE 2022

Crop Biolabs - Av. Professor Mário Rubens Guimarães Montenegro | s/n | Bloco V, Unipex, Sala 208 | Botucatu/SP | Brasil | CEP 18618-687 | + 55 16 999758-1616 | Email: arua@cropbiolabs.com | Site: www.cropbiolabs.com.br



2.3 Equipamentos, reagentes e soluções

Os equipamentos, reagentes e demais itens utilizados no estudo estão apresentados abaixo:

Equipamentos	
Código do equipamento	Descrição
EQ.HC.026	Termociclador
EQ.HC.004	Micropipeta 10µL
EQ.HC.001	Agitador Vórtex
EQ.HC.005	Micropipeta 100µL
EQ.HC.007	Micropipeta 1000µL
EQ.HC.017	Leitor de Gotas ddPCR
EQ.HC.003	Centrífuga

Reagentes			
Descrição	Lote	Validade	Fabricante
Kit Trizol LS Reagent	10296028	26/02/2025	Thermo Fisher
kit Tubo DNA-free	00467391	28/12/2023	Thermo Fisher
Kit de detecção Got Taq Probe 1-STEP RT-qPCR	496527	26/04/2024	Promega

Soluções				
Descrição	Reagente	Validade	Fabricante	Data de preparo
-	-	-	-	-

2.4 Seleção do sistema teste

Não aplicável.

Prudenciatti e Ribeiro P&D LTDA

Instalação teste habilitada na Rede Brasileira de Laboratórios Analíticos em Saúde (REBLAS)

RESOLUÇÃO-RE Nº 4.182, DE 15 DE DEZEMBRO DE 2022

Crop Biolabs - Av. Professor Mário Rubens Guimarães Montenegro | s/n | Bloco V, Unipex, Sala 208 | Botucatu/SP | Brasil | CEP 18618-687 | + 55 16 999758-1616 | Email: arua@cropbiolabs.com | Site: www.cropbiolabs.com.br



2.5 Justificativa da escolha do sistema teste

Não aplicável.

2.6 Origem do sistema teste

Não aplicável.

2.7 Metodologia de estudo

Deteção dos genes SEV, SEV–KOS, SEV–KLF4, L–Myc, e NANOG (controle endógeno) por técnica de amplificação do cDNA pela RT–PCR (Reverse transcription polymerase chain reaction).

2.7.1 Método RT-PCR - Ensaio TaqMan

A **tabela 1** apresenta informações essenciais sobre os ensaios TaqMan utilizados para deteção dos alvos.

Tabela 1 – Ensaios TaqMan utilizados para deteção dos alvos.

<i>Assay ID</i>	<i>Gene</i>	<i>Assay Design</i>	<i>Amplicon Length</i>
Mr04269880_mr	SEV	não exon–exon	59
Mr04421257_mr	SEV–KOS	não exon–exon	80
Mr04421256_mr	SEV–KLF4	não exon–exon	67
Mr04944276_mr	L–myc	não exon–exon	–
Hs02387400_g1	NANOG	junção exon–1 e exon–2	109

Inicialmente as amostras de células foram separadas em 3 grupos: **Grupo 1.** Formado por uma única amostra que expressa todos os 4 genes (linhagem celular M2_IPSC3_A1) – célula controle positivo (CCP); **Grupo 2.** Formado por uma única amostra (MRC5) que não expressa nenhum dos genes SEV, SEV–KOS, SEV–KLF4 e L–Myc - célula controle negativo (CCN); **Grupo 3.** são as amostras a serem testadas quando



a expressão dos 4 genes anteriormente mencionados (linhagens: M2_IPSC3_A17, M2_IPSC3_B16, M2_IPSC3_L16, M2_IPSC3_O16) – Célula expressão desconhecida (CED).

Para execução das análises, as amostras de células foram descongeladas e centrifugadas para obtenção do pellet de células, em seguida, as amostras foram extraídas utilizando o protocolo de extração de RNA por Trizol, kit Trizol LS Reagent, cat.10296028, validade 26/02/2025, ThermoFisher, conforme recomendações do fabricante. Para determinar a concentração do RNA obtido e verificar contaminação por solventes orgânicos e proteínas, as amostras foram analisadas utilizando o espectrofotômetro NanoDrop One, ThermoFisher. Para eliminar possíveis interferências causadas por DNA remanescente, as amostras de RNA foram submetidas a tratamento por DNase (1 µL) utilizando o kit Tubo DNA-free, cat. AM1907, lote 00467391, validade 28/12/2023, ThermoFisher, conforme recomendações do fabricante. Para detecção dos transcritos dos genes alvos, foi utilizado o kit de detecção Got Taq Probe 1–STEP RT–qPCR, cat. A6120, lote 496527, validade 26/04/2024, Promega, conforme especificações do fabricante. A reação de RT–qPCR foi preparada com 50 ng de RNA total em 20 µL de reação.

2.7.3 Condições de termociclagem e detecção de fluorescência.

As condições de termociclagem e detecção de fluorescência foram as seguintes: transcrição reversa 45°C por 15 minutos, desnaturação inicial e ativação da DNA polimerase a 95°C por 2 minutos, desnaturação e amplificação em 45 ciclos de 95°C por 5 segundos e 60°C por 30 segundos, com detecção da fluorescência na etapa de amplificação a 60°C, utilizando o equipamento CFX Opus 96 Real–Time PCR System, Bio–Rad. Além das amostras, foi adicionado ao experimento de detecção dos alvos uma reação sem RNA, utilizada como controle negativo da reação (CN) para demonstrar que os primers e probes não geram dímeros entre os oligos de DNA.



2.7.4 Controles experimentais

Controle positivo (CCP): linhagem celular M2_IPSC3_A1 (expressa nenhum dos em estudo);

Controle negativo (CCN): linhagem celular MRC5 (não expressa nenhum dos em estudo).

Controle negativo (CN): controle da reação de RT-PCR, contendo todos os reagentes necessários para a PCR, exceto o RNA.

3. Método de Análise dos resultados

Inicialmente, avaliamos a pureza do RNA extraído, o qual ficou dentro do esperado, condizente com amostras com excelente qualidade de extração, as razões 260/280 e 260/230 ficaram acima de 1,80 e abaixo de 2,20. Em seguida, após a realização do RT-PCR, foi analisada a amplificação gênica, assim, com base na fluorescência detectada e respeitando a fase exponencial da amplificação, o threshold foi calculado para 150 RFU (relative fluorescence units) para todos os genes em análise. Foram considerados amplificados os genes que apresentaram Ct (ciclo threshold) < 40, que ultrapassaram o valor de threshold e apresentaram amplificação exponencial.

4. Resultados

A concentração do RNA extraído ficou dentro do padrão esperado e suficiente para realização das análises (**Tabela 2**).

Tabela 2 – Concentração e qualidade do RNA extraído.

Amostra	Concentração em ng/μL	Razão 260/280	Razão 260/230
M2_IPSC3_A17	117	1,80	1,88
M2_IPSC3_B16	384	1,83	1,90
M2_IPSC3_L16	309	1,87	1,89
M2_IPSC3_O16	143	1,83	1,89

Prudenciatti e Ribeiro P&D LTDA

Instalação teste habilitada na Rede Brasileira de Laboratórios Analíticos em Saúde (REBLAS)

RESOLUÇÃO-RE Nº 4.182, DE 15 DE DEZEMBRO DE 2022

Crop Biolabs - Av. Professor Mário Rubens Guimarães Montenegro | s/n | Bloco V, Unipex, Sala 208 | Botucatu/SP | Brasil | CEP 18618-687 | + 55 16 999758-1616 | Email: aru@cropbiolabs.com | Site: www.cropbiolabs.com.br



Em relação a análise de detecção de expressão dos genes SEV, SEV–KOS, SEV–KLF4 e L–Myc em células transformadas, a célula controle positiva (CCP) apresentou expressão dos 4 genes, e as células CCN não amplificou para nenhum desses genes, conforme esperado para ambos os casos (**Figura 1**). Esse resultado demonstra que os ensaios são específicos e foram capazes de detectar corretamente os transcritos alvos.

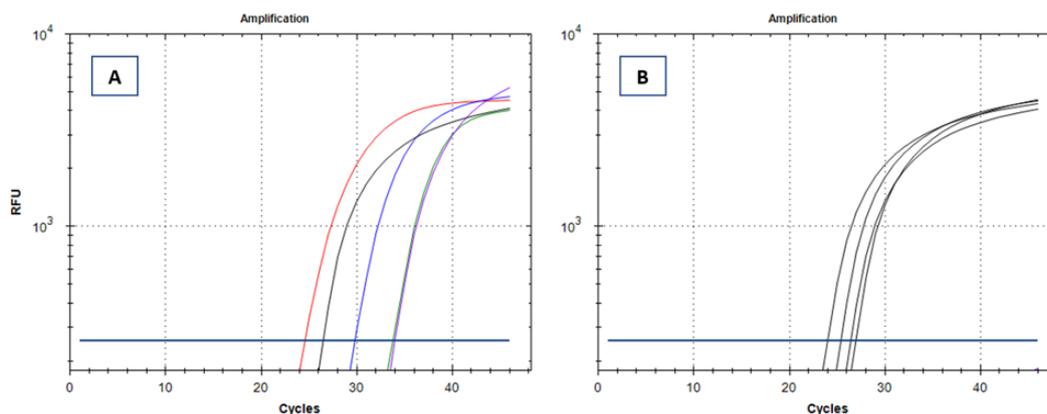


Figura 1 – Amplificação do transcrito dos genes alvos por RT–PCR. Os genes analisados podem ser identificados pelas cores: vermelho = SEV, preto = NANOG, azul = L–myc, verde = SEV–KOS e lilás = SEV–KLF4. **A)** célula controle (CCP) amplificou os 4 genes alvos (SEV, SEV–KOS, SEV–KLF4 e L–Myc) e o gene controle de interno de reação (NANOG); **B)** As células/amostra alvo (CED) amplificou apenas o gene controle de interno de reação (NANOG). Os genes entre parênteses são apresentados na ordem de amplificação de cada figura, da esquerda para direita. *Threshold* 150 RFU (*relative fluorescence units*).

As amostras (CED), M2_IPSC3_A17, M2_IPSC3_B16, M2_IPSC3_L16 e M2_IPSC3_O16, foram analisadas quanto a detecção do transcrito dos genes SEV, SEV–KOS, SEV–KLF4, L–Myc e NANOG, sendo que o último foi utilizado como controle interno da reação de PCR (verifica se a PCR está funcionando corretamente). Todas as amostras do grupo CED amplificaram apenas para o gene controle NANOG, os demais genes não foram detectados. O resultado de cada alvo é apresentado na **tabela 3**.



Tabela 3 - Resultado para detecção dos transcritos alvos.

Genes de células embrionárias transformadas (Ct)						
Amostras	Grupo	SEV	SEV–KOS	SEV–KLF4	L–myc	NANO G
M2_IPSC3_A1	CCP	24,51	33,73	33,97	29,76	26,4
MRC5	CCN	–	–	–	–	*
M2_IPSC3_A17	CED	–	–	–	–	26,35
M2_IPSC3_B16	CED	–	–	–	–	25,31
M2_IPSC3_L16	CED	–	–	–	–	24,01
M2_IPSC3_O16	CED	–	–	–	–	26,96
CN	CN	–	–	–	–	–

O sinal – indica que não houve amplificação do gene; Ct = ciclo Threshold; CCP = célula controle positivo; CCN = célula controle negativo; CED = Célula expressão desconhecida; CN = controle negativo da reação de RT-PCR, possui todos os reagentes necessários para a PCR exceto o RNA; * gene não avaliado para a amostra.

5. Conclusão

Os ensaios foram específicos para detecção dos alvos, pois a amostra/célula controle positivo (CCP) amplificou para todos os genes (4 genes alvos e 1 gene controle interno de reação de PCR), e o grupo controle (CCN) não amplificou nenhum dos 4 genes alvos. As amostras testadas (grupo CED) foram negativas para os genes SEV, SEV–KOS, SEV–KLF4 e L–Myc.

Este relatório refere-se às amostras analisadas, não sendo aplicável ou extensível a outros lotes.

Responsável técnico
Chief Scientific Officer (CSO)
 Eng. de Bioprocessos e Biotecnologia
 Dr.º Lucas Gabriel Ribeiro
 CRQ: 04368883
 Data: 05/04/2023

Prudenciatti e Ribeiro P&D LTDA

Instalação teste habilitada na Rede Brasileira de Laboratórios Analíticos em Saúde (REBLAS)

RESOLUÇÃO-RE Nº 4.182, DE 15 DE DEZEMBRO DE 2022

Crop Biolabs - Av. Professor Mário Rubens Guimarães Montenegro | s/n | Bloco V, Unipex, Sala 208 | Botucatu/SP | Brasil | CEP 18618-687 | + 55 16 999758-1616 | Email: aru@cropbiolabs.com | Site: www.cropbiolabs.com.br



Aviso Legal:

Os resultados apresentados nesse relatório técnico são referentes somente ao produto testado. Os testes de eficácia de esterilização dos equipamentos supracitados foram efetuados seguindo indicações da Anvisa e protocolos metodológicos citados. Todos os procedimentos e resultados foram executados de acordo com Boas Práticas Laboratoriais (BPLs). No entanto, além do que é expresso no relatório: (1) quaisquer usos pelo cliente dos resultados reportados devem ser de entendimento e concordância da Crop para verificação de uso correto de informações providos por esse relatório ou (2) que os resultados de efetividade de inativação viral esperado pelos clientes podem ser alcançados ou (3) que o cliente pode livremente fazer uso desses resultados ou entregáveis desde que não infrinja nenhum direito ou propriedade intelectual de terceiros.

Prudenciatti e Ribeiro P&D LTDA

Instalação teste habilitada na Rede Brasileira de Laboratórios Analíticos em Saúde (REBLAS)

RESOLUÇÃO-RE Nº 4.182, DE 15 DE DEZEMBRO DE 2022

Crop Biolabs - Av. Professor Mário Rubens Guimarães Montenegro | s/n | Bloco V, Unipex, Sala 208 | Botucatu/SP |
Brasil | CEP 18618-687 | + 55 16 999758-1616 | Email: aru@cropbiolabs.com | Site: www.cropbiolabs.com.br

