

1 - INTRODUÇÃO

1.1 - CONCEITOS GERAIS

Nos últimos anos, os avanços científicos e metodológicos, juntamente com o acelerado processamento de informações, proporcionaram um desenvolvimento exponencial na área da Saúde nas suas mais diversas áreas como diagnósticos, desenvolvimento de fármacos, clínica e etc. No campo da medicina regenerativa, esse fenômeno vem caminhando com maior velocidade desde a década de 50, quando os antígenos de histocompatibilidade humana (HLA) foram descobertos (Degos, 2009) e o entendimento sobre o processo de rejeição aos transplantes foi mais bem compreendido.

Um marco importante na história recente dos transplantes ocorreu na década de 60, quando se obtiveram os primeiros transplantes bem sucedidos de medula óssea, os quais possibilitaram a cura para diversos tipos de leucemias (Adams *et al.*, 1967). A crescente demanda pela medicina regenerativa, focada no potencial terapêutico das células-tronco, tem feito com que essas células venham sendo amplamente estudadas e seus segredos desvendados (Nadig, 2009). As células-tronco são consideradas, hoje, dentro das possibilidades terapêuticas de reposição e regeneração tecidual, uma realidade com bases teórico-práticas, que se desenvolve com precisão e segurança para uma transição do ponto experimental para a clínica médica (Fraser *et al.*, 2004; Zuk, 2001).

Com características importantes e que definem o termo célula-tronco, esse tipo celular sem especialização pode ser conceituado como uma célula

especial que apresenta capacidade única de auto-renovação e potencial de especializar-se e diferenciar-se em variados tipos celulares (Pera & Tam, 2010).

Enquanto a maioria das células do nosso corpo, tais como células cardíacas ou células epiteliais, estão comprometidas com a condução de funções específicas, a célula-tronco é, neste sentido amplo, descompromissada e permanece assim até que receba um sinal de desenvolvimento para uma linhagem celular específica (Ivanova *et al.*, 2002).

Na última década, muitos manuscritos sobre fontes de células-tronco provenientes de reservatórios como pele, fígado, pâncreas, cérebro, pulmão e tecido adiposo, dentre outros, têm sido intensamente discutidos e amplamente estudados (Turksen & Rao, 2005). Atualmente as células-tronco podem ser agrupadas quanto a sua capacidade natural de originar células especializadas em totipotentes, pluripotentes ou multipotentes (Brandenberger *et al.*, 2004).

A célula-tronco totipotente é aquela adquirida precocemente da massa celular inerente ao embrião, no período até o 5º dia de desenvolvimento embrionário em um estágio de 32 a 64 células. São células do blastocisto que apresentam a capacidade natural de diferenciar-se em todas as células especializadas do corpo humano pertencentes aos três folhetos embrionários, incluindo placenta e células germinativas (Ivanova *et al.*, 2002).

A pluripotencialidade pertence às células extraídas do blastocisto no período entre o 5º e 14º dia de desenvolvimento embrionário. Essas células podem se comprometer com diversos tipos celulares pertencentes novamente aos três folhetos embrionários, entretanto não apresentam a capacidade de originar os anexos embrionários e células germinativas. Essas células

denominadas como células-tronco embrionárias podem ser obtidas por fertilização *in vitro*, podendo manter-se em estado de intensa proliferação ou serem induzidas *in vitro* a se diferenciar em tipos celulares específicos (Brandenberger *et al.*, 2004; Ivanova *et al.*, 2002).

Finalmente, as células-tronco multipotentes compreendem as células indiferenciadas, localizadas em um tecido diferenciado, que podem se renovar e se diferenciar em células especializadas do próprio tecido onde residem ou diferenciar-se em outros tipos celulares que, originalmente, faziam parte do tecido embrionário do qual essas células se originaram (Ivanova *et al.*, 2002).

As células-tronco multipotentes, também conhecidas como adultas, oferecem uma oportunidade singular de estudo, contornando problemas éticos e religiosos, pois não estão implicadas nas discussões polêmicas com relação à definição da vida, e com isso, o estudo das células-tronco adultas não contradiz os preceitos da igreja católica.

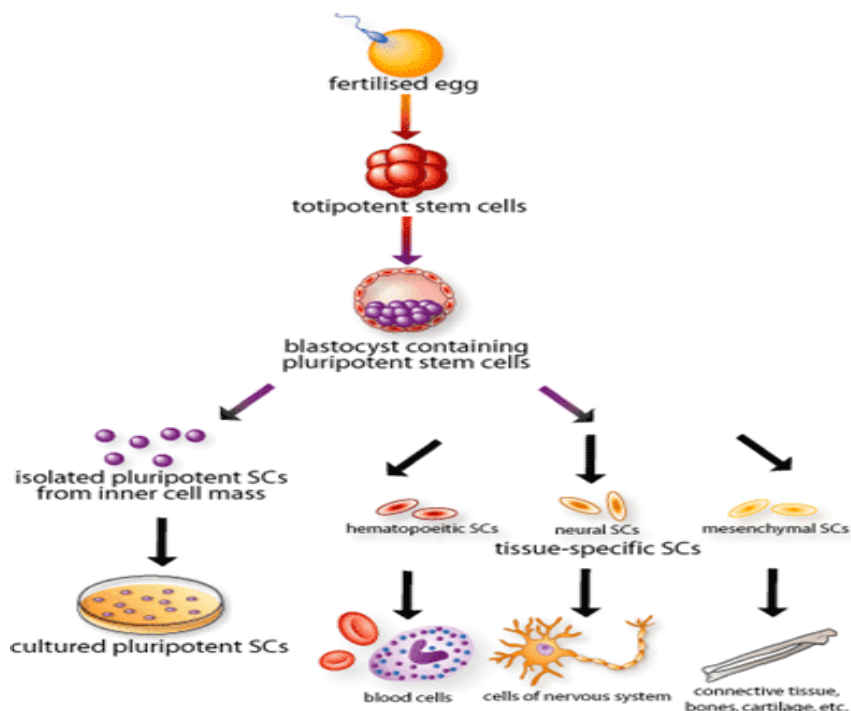


Figura 1 - Ontogênese das células-tronco e derivações

(www.adult-stemcell-research.com/)

As células-tronco adultas assim referenciadas devido a sua presença em uma variedade de tecidos tais como: músculo, cérebro, medula óssea, tecido adiposo, pele, dente, cordão umbilical e outros, agem nesses tecidos como reservatório e auxiliando os padrões homeostáticos do organismo (Moraleda *et al.*, 2006). Essas células apresentam certa limitação em seu potencial de autorrenovação e podem diferenciar-se nos tecidos comuns provenientes do mesmo folheto embrionário, mantendo a integridade e reparando possíveis lesões teciduais localizadas (Fernandes *et al.*, 2004; Sethe *et al.*, 2006).

Em determinadas situações, evidenciadas experimentalmente, as células-tronco adultas, quando estimuladas *in vitro* com fatores de diferenciação que direcionam sua especialização para outros tipos celulares pertencentes a outros folhetos embrionários diferentes daquele que lhes originou, respondem com certa plasticidade, indicando um potencial terapêutico ainda maior para essa classe de células-tronco (Fernandes *et al.*, 2004). A plasticidade, nesses casos, define-se como um fenômeno que determina a capacidade da célula-tronco adulta de gerar outros tipos celulares diferentes dos tecidos que a hospedam induzidos por estímulos muito específicos, especialmente no caso das células-tronco adultas (Pountos & Giannoudis, 2005).

As células-tronco adultas são alvos de intensos estudos uma vez que podem ser usadas na terapêutica sem induzir processos de rejeição quando o paciente em questão pode ser o próprio doador dessas células (transplante autólogo). Entretanto, se a patologia for de propagação genética, o paciente deverá procurar um doador compatível e saudável para o seu transplante celular (transplante alogênico) (Moraleda *et al.*, 2006).

A habilidade de isolar, expandir e diferenciar as células-tronco mesenquimais *in vitro* em linhagens distintas fornece uma oportunidade única para estudar eventos associados ao comprometimento e diferenciação dessas células, bem como para desvendar as bases moleculares dos diferentes processos de ontogênese (Pittenger *et al.*, 1999; Zuk *et al.*, 2002).

Com características comuns às células-tronco da medula óssea, tipo celular bem caracterizado, as células-tronco isoladas do tecido adiposo são outra importante fonte de célula-tronco (Zuk *et al.*, 2001). Derivada também do mesoderma embrionário, esse tipo celular tem sido explorado com elevada aceitação devido a algumas características relevantes do ponto de vista científico e clínico (Yanez *et al.*, 2006; Zuk *et al.*, 2002). Estudos científicos realizados apontaram o tecido adiposo como uma fonte real, eficaz e alternativa de células-tronco multipotentes (Patrick, 2000). Essas células-tronco mesenquimais presentes no tecido adiposo podem ser facilmente isoladas e cultivadas (Zuk *et al.*, 2002). Os estudos primários utilizando-se de métodos enzimáticos para a separação celular no tecido adiposo, foi capaz de distinguir células indiferenciadas dos adipócitos maduros, o que já indiciava a facilidade em trabalhar com essa fonte de célula-tronco (Rodbell, 1964). Destaca-se, também, que essas células isoladas do tecido adiposo possuem um elevado potencial proliferativo e capacidade de diferenciar-se em multilinhagens (Tanzi & Fare, 2009; Zuk, 2001; Zuk *et al.*, 2002). Em 2001 identificou-se o tecido adiposo subcutâneo como um reservatório de células tronco mesenquimais e essas células isoladas do tecido adiposo foram nomeadas genericamente como ADAS (“adipose-derived adult stem cells”) (Zuk *et al.*, 2002).

Há vários trabalhos demonstrando que células indiferenciadas provenientes do produto de lipoaspiração são capazes de diferenciar-se na linhagem condrogênica, osteogênica, adipogênica e miogênica *in vitro*, sugerindo sua aplicabilidade na reconstituição tecidual (Tanzi & Fare, 2009; Zuk *et al.*, 2001).

Utilizando-se das ADAS, foi observado a capacidade destas células de se diferenciarem em osteoblastos, condroblastos e adipócitos, sendo este o primeiro estudo a promover a diferenciação osteogênica das ADAS extraídas de camundongos (Ogawa *et al.*, 2004). As ADAS, então, tornaram-se grande fonte de estudo uma vez que a lipoaspiração de adipócitos subcutâneos pode ser realizada com anestesia local e mínimo desconforto (Hattori *et al.*, 2006), além de ser considerado um procedimento de baixos risco e custo, podendo proporcionar benefício estético (Tanzi & Fare, 2009; Zuk *et al.*, 2001). Soma-se ainda ao potencial terapêutico dessa população de célula-tronco, o alto rendimento de células-tronco residentes no tecido adiposo quando comparado com o rendimento da medula óssea (Kuhbier *et al.*, 2010). Outras vantagens são que essas células apresentam também, moléculas de superfície que podem ser utilizadas como biomarcadores, possibilitando a identificação dessa população celular e sua caracterização assim como, sua atividade imunossupressora importante para o campo da terapêutica (Peroni *et al.*, 2008; Yanez *et al.*, 2006). Os marcadores como a B1 integrina, que apresenta um papel crítico na angiogênese terapêutica, e o CD44 receptor hialurônico, que está associado com a produção de matriz extracelular, são comuns tanto para as ADAS como para todas as células-tronco mesenquimais, estando presentes também em muitas células mesenquimais (Zuk, 2001).

Entretanto, VCAM-1 (CD106), o receptor para VLA-4, está apenas presente na maioria das células-tronco de medula óssea assim como a molécula CD34, que representa um marcador importante para células-tronco hematopoiéticas (Ju *et al.*, 2005). A molécula CD49d, uma integrina (Alfa 4) relacionada com a migração celular, apresenta-se nas membranas da maioria das populações de células-tronco isoladas de tecido adiposo, sugerindo assim uma maneira de identificar essa população (Yoshimura *et al.*, 2006).

1.2 - USO TERAPÊUTICO DAS CÉLULAS-TRONCO

A terapia com base na utilização das células-tronco vem sendo objeto de estudo em diversas patologias. Muitos trabalhos relatam sua eficácia no tratamento de doenças tais como câncer, doenças autoimunes, doenças degenerativas crônicas e muitas outras. Destacam-se no cenário científico avanços para as seguintes patologias: 1) *Câncer*: substituição da população celular afetada e reconstrução do tecido acometido (Russo *et al.*, 2007); 2) *Doenças cardíacas*: reposição do tecido isquêmico utilizando novos cardiomiócitos saudáveis e produção de novos vasos sanguíneos (Bartunek *et al.*, 2007; Breymann *et al.*, 2006) 3) *Mal de Parkinson*: reposição de células nervosas produtoras de dopamina (Singh *et al.*, 2007); 4) *Diabetes*: infusão do pâncreas com novas células produtoras de insulina (Koblas *et al.*, 2005).

Os avanços na manipulação dessas células bem como uma melhor caracterização das mesmas são os maiores responsáveis pela sua ampla utilização e prospecção científica e terapêutica.

No campo lesões ósseas, sua potencialidade pode beneficiar o tratamento de osteoporose, necrose óssea e osteogênese imperfeita, possibilitando repopularizar os ossos com osteoblastos secretores e produtores de matriz extracelular, repondo, assim, a massa óssea e trazendo a cura para essas doenças (Hacker & Mikos, 2006).

1.3 - CONSTITUIÇÃO ÓSSEA E DANOS DO TECIDO ÓSSEO

O tecido ósseo é considerado um componente com grande resistência e rigidez do corpo humano. Constituinte principal do esqueleto, ele age como suporte para as partes moles e protege órgãos vitais. O tecido ósseo envolve a medula óssea protegendo-a contra lesões físicas, além de proporcionar apoio aos músculos esqueléticos transformando suas contrações em movimentos úteis. Funciona, ainda, como reservatório de cálcio, fosfato e outros íons, armazenando-os ou liberando-os de maneira controlada, mantendo constante a concentração desses íons nos líquidos corporais (Bordier *et al.*, 1974).

O tecido ósseo é derivado do tecido conjuntivo, sendo constituído por células e material intercelular calcificado, denominado matriz óssea. Suas células maduras são os osteócitos, domiciliados em cavidades e lacunas no interior da matriz óssea; os osteoblastos, células ósseas juvenis, são responsáveis pela produção orgânica da matriz e, finalmente, os osteoclastos, células multinucleadas gigantes e móveis dedicadas aos processos de remodelagem óssea, por serem capazes de reabsorver o tecido ósseo (Amitai *et al.*, 1980).

Os precursores do tecido ósseo podem ser mais bem compreendidos se divididos em estágios de desenvolvimento. Iniciando-se à partir das células-tronco mesenquimais, capazes de se diferenciar em vários tipos celulares, evoluem, neste caso, para células osteoprogenitoras que são responsáveis pela expansão do número de osteoblastos em resposta a fatores de crescimento mitóticos, mas desprovidas da capacidade de autorrenovação. Em seguida, encontram-se os pré-osteoblastos que representam células em um estágio de transição entre células osteoprogenitoras e os osteoblastos. Finalmente, têm-se os osteoblastos responsáveis pela produção e secreção de matriz formadora do tecido ósseo como um todo sendo que esse processo pode ser sumarizado pela figura 2 (el-Khoury *et al.*, 1986).

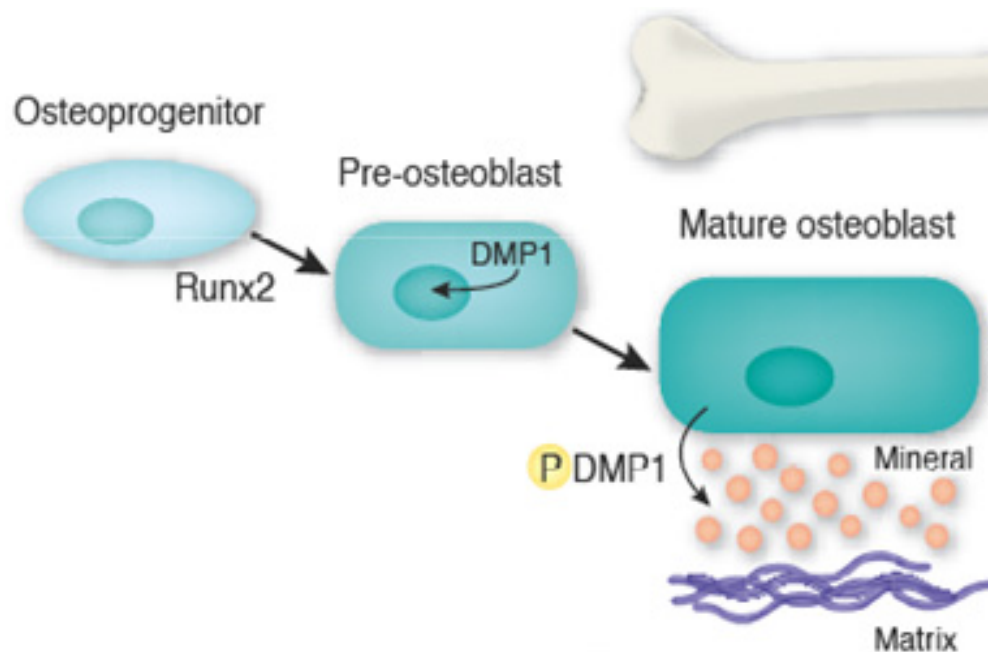


Figura 2 - Processo osteogênico a partir de células osteoprogenitoras

(www.gghjournal.com/volume23/1/ab11.cfm)

A matriz óssea sintetizada por osteoblastos é composta por colágeno do tipo 1, proteoglicanos e glicoproteínas. Estes são capazes de concentrar o

fosfato de cálcio tornando a matriz mineralizada. Os osteoblastos encontram-se nas superfícies ósseas, lado a lado, num arranjo que se assemelha um epitélio simples. Em estado de síntese intensa assumem a morfologia cubóide, com citoplasma basófilo, porém, quando em repouso, tornam-se achatados e sua basófilia diminui. Osteoblastos em fase de síntese apresentam características ultra-estruturais de células secretoras de proteínas sendo que a principal proteína sintetizada é o colágeno.

A matriz óssea, recém-formada ao lado dos osteoblastos ativos e que não está calcificada recebe o nome de osteóide. Normalmente, os osteoblastos estão separados da região de calcificação por uma camada de matriz óssea secretada por ele. A matriz calcificada circunda os osteoblastos e, nesse momento, as células passam a ser denominadas como osteócitos (Ross, 1975). O tecido mineralizado adquire consistência e funcionalidade devido a três fatores: concentração, qualidade e forma (estrutura) da matriz óssea. O tecido adulto pode apresentar-se com ossos corticais densos, compactos, e ossos trabeculares conhecidos como ossos esponjosos. A combinação de uma camada densa, lisa e compacta de osso cortical adicionada a um osso trabecular esponjoso favorece a força estrutural e extensa superfície, na qual rápidas mudanças na construção ou reabsorção óssea podem responder às necessidades metabólicas transitórias (Vargas & Raisz, 1990).

O tecido ósseo é remodelado durante toda a vida. Especula-se que o esqueleto adulto seja totalmente renovado a cada quatro anos (Parfitt, 2002). A remodelação óssea ocorre em áreas de unidades multicelulares devido à ação coordenada dos osteoblastos, responsáveis pela produção de matriz óssea, e dos osteoclastos, responsáveis pela reabsorção da mesma mediada pela ação

endócrina (Long, 2001). Existe, portanto, um equilíbrio que mantém o tecido ósseo funcional e as alterações de caráter fisiológico ou patológico podem gerar debilidade, o que reitera importante aspecto diante das prioridades de saúde pública.

O tecido ósseo pode ser acometido por várias lesões e danos destacando-se as doenças congênitas e metabólicas, acrescidas de fatores externos como fissuras e fraturas (Christenson *et al.*, 1997).

Dentre as doenças do tecido ósseo, a osteoporose representa grave problema de saúde pública (Christenson *et al.*, 1997). A osteoporose pode ser caracterizada pela deterioração microestrutural do tecido ósseo devido à perda de osteóide, o que acarreta fragilidade óssea e suscetibilidade a fraturas (Fernandes, 1993). A osteoporose afeta indivíduos de ambos os sexos, de faixa etária preferencial entre 51 e 75 anos, sendo sua incidência em mulheres duas vezes maior que em homens. Registram-se principalmente como consequência as fraturas vertebrais, femorais e de quadril (Casiano & Cooper, 1992; Jacobsen *et al.*, 1992; Nolan *et al.*, 1991; Smith *et al.*, 1992; Wilson, 1991).

Considerada de fácil prevenção, a osteoporose é, entretanto, de difícil reversão (Parfitt, 1988) e acomete milhões de pessoas em todo o mundo. Observa-se uma relação direta do envelhecimento da população com a osteoporose (Liao *et al.*, 2002). Estudos clínicos mostram que apenas 10% da população com mais de 70 anos têm índices normais de massa óssea (Riera-Espinoza *et al.*, 2004).

A osteoporose atingiu, nos Estados Unidos, cerca de 50% das mulheres e 25% dos homens com idade acima de 50 anos, sendo que os gastos com

tratamento alcançaram valor superior a 10 bilhões de dólares anuais (Christenson *et al.*, 1997). A osteoporose, nesse mesmo país, é responsável por 1,5 milhões de fraturas anuais.

A organização mundial de saúde (Abe *et al.*) aponta que um quarto das mulheres entre 65 - 70 anos de idade, será acometido por osteoporose, este índice é aumentando até 70% após os 80 anos (WHO, 2003). Dados da Sociedade Brasileira de Osteoporose (2004) mostram que há, no Brasil, cerca de 10 milhões de pessoas acometidas pela osteoporose. Acredita-se que aproximadamente 2,4 milhões dessas pessoas terão fraturas. Contudo, destaca-se que, no Brasil, somente uma pessoa a cada três com osteoporose é diagnosticada e destas apenas uma em cinco recebe algum tratamento.

Após a osteoporose, a doença metabólica de Paget é a mais comum entre as enfermidades do tecido ósseo (Roodman & Windle, 2005). Tal doença é caracterizada por regiões de excessiva remodelação óssea com alta atividade dos osteoclastos, apresentando anormalidades em todas as fases de remodelação. As causas para doença de Paget ainda constituem um tema controverso, entretanto é certo que a patogênese da doença está relacionada a fatores genéticos e ambientais. Os fatores genéticos assumem grande relevância uma vez que 15 a 40% dos pacientes apresentam um parente de primeiro grau com a doença (Miron-Canelo *et al.*, 1997). Sua pior progressão é o desenvolvimento de osteossarcomas (Boland *et al.*, 1986).

Estima-se que até 10% da população mundial acima dos 60 anos tenham a doença de Paget (OMS, 2001). No Brasil, cerca de 80.000 pessoas sofrem com esta doença. Nesse índice predominam pacientes de ascendência

européia, destacando-se a região de Recife, com alta prevalência, chegando a 0,8% em indivíduos acima de 50 anos (Ministério da Saúde, 2004).

O osteossarcoma é a principal modalidade de carcinoma ósseo. Caracterizado pelo acometimento nas extremidades do fêmur ou na articulação do joelho, é responsável pelo comprometimento do osso e se espalha rapidamente pelos tecidos adjacentes e pelo corpo, podendo vir a causar metástase nos pacientes (Lau, 2010).

Outra desordem de extrema importância é a osteogênese imperfeita que se caracteriza por ser uma doença congênita, de transmissão autossômica dominante. Fundamentalmente essa doença constitui-se de uma mutação genética que afeta a capacidade dos osteoblastos em sintetizar de forma regular colágeno do tipo I, proteína fundamental da matriz óssea. Como consequência, não há uma ossificação normal do tecido, levando a uma fragilidade e adensamento da massa óssea (Rauch *et al.*, 2010). No Brasil, estima-se haver cerca de 12.000 portadores da referida doença (Ministério da Saúde, 2003).

Incluindo-se nas desordens ósseas citadas acima podemos ressaltar, ainda, os fatores externos como queda, violência urbana, acidentes automobilísticos e domésticos, lesões autoprovocadas e inúmeras outras que assumem grande relevância nos traumas do tecido ósseo.

No Brasil, no ano de 2000, foram notificadas 652.249 internações por causas externas, representando 5,2% das internações do Sistema Unificado de Saúde (SUS, 2003). Neste mesmo ano, a reparação das sequelas e o tratamento das complicações dos acidentes foram responsáveis por 32.855 dessas internações (Gawryszewski *et al.*, 2004).

Outras lesões devem ser ainda mencionados como traumas na coluna tóraco-lombar e perda, parcial ou total, do osso alveolares, causando paralisias e defeitos de mastigação respectivamente (Baig & Rajan, 2010).

As inúmeras formas de doenças e danos no tecido ósseo justificam as pesquisas na busca de mecanismos reparadores mais eficientes, e que ofereçam aos pacientes melhores prognósticos.

1.4 - REPARO TECIDUAL ÓSSEO

No decorrer da prática médica um grande salto veio da utilização do uso de agentes anestésicos que se deu no início do século XIX possibilitando que as práticas extirpativas visando conter sangramentos e a reparar partes acometidas por lesões tivessem maior sucesso. Contudo, nos padrões ideológicos da época, a extirpação não condizia com a definição de saúde como bem estar físico e mental e os enxertos ainda não eram aplicados, embora já fossem idealizados na medicina daquela época (Vacanti & Vacanti, 2000).

Atualmente no caso dos danos ósseos os transplantes autólogos e heterólogos são os mais indicados na intenção de promover o reparo ósseo, sendo que os transplantes celulares são, atualmente, comumente usados (Chinen & Buckley, 2010; Petropoulou *et al.*, 2010).

Reconstruções utilizando-se de tecidos autólogos, embora favorecidas por propriedades imunológicas, podem resultar em seqüelas estéticas e ocasionalmente funcionais da área doadora (Bauer & Muschler, 2000).

Adicionando-se a um importante aspecto da viabilidade e durabilidade dos enxertos, destacam-se o relacionamento do processo de enxertar com doenças como a diabetes e vícios como o do tabagismo que podem influenciar o suprimento vascular do enxerto, culminando com um insucesso do procedimento (Nahabedian *et al.*, 2004).

Os enxertos autólogos para reparos de tecido ósseo são, em geral, eficientes. Entretanto, é difícil a obtenção de quantidade suficiente do tecido doador para o local a ser enxertado (Ruimerman *et al.*, 2005).

Seguindo as possibilidades, os aloenxertos têm como desvantagem o potencial de desencadear reações de rejeição, representando risco ao paciente, além de ser veículo para doenças de transmissão viral (Eastlund, 1995).

Alternativamente, materiais sintéticos e metálicos têm sido empregados para substituir partes lesionadas de tecidos e são conhecidas com próteses. As próteses de silicone e próteses de platina mostram-se com alto grau de eficiência, porém não descartam o risco de processos de rejeição e, em inúmeros casos, não conseguem recuperar 100% dos movimentos do paciente (Bauer & Muschler, 2000; Huang *et al.*, 2004).

Devido às desvantagens da enxertia, ainda hoje se buscam novos avanços que possam resultar em métodos mais eficientes e seguros.

Os avanços científicos na biologia celular, principalmente no que diz respeito às células-tronco, têm obtido grande atenção uma vez que inúmeras moléculas, como fatores de crescimento e hormônios têm sido utilizado nessas células, resultando na diferenciação de tipos celulares específicos,

incluindo-se a diferenciação bem-sucedida para osteoblastos (Arosarena, 2005; Cancedda *et al.*, 2003; de Paula & Rosen, 2010).

As técnicas de engenharia de tecidos, associadas ao uso das células-tronco, têm ganhado destaque visando a aplicabilidade do tratamento futuro de lesões ósseas, sendo essa alternativa considerada muito promissora. Entretanto, para o uso de células-tronco no reparo de tecido ósseo se faz necessário, para assegurar o sucesso do tratamento, a caracterização minuciosa das populações de células envolvidas, seu processo de desenvolvimento e a determinação do momento ideal para o transplante. Isso pode ser determinado a partir de marcadores moleculares que podem representar estágios de maturação da diferenciação celular. Atualmente, uma das ferramentas mais amplamente utilizada para a descoberta e caracterização de marcadores celulares é a análise proteômica (Hayman & Przyborski, 2004; Wagner *et al.*, 2006).

1.5 - PROTEÔMICA X CÉLULAS-TRONCO

A proteômica, no que se refere à biologia celular, pode ser definida como o estudo do conjunto de proteínas constituintes de uma célula caracterizada em termos de sua localização, modificações pós-traducionais, interações e renovações. O proteoma consiste em uma análise da natureza dinâmica e intrínseca das proteínas celulares, apresentando alterações na suas expressões, ativações e/ou modificações ocorridas em resposta a sinais ou

alterações no microambiente em um determinado período de vida (Fathi *et al.*, 2009; Unwin *et al.*, 2003; Zhang & Marmorstein, 2010).

As cascatas de sinalização são mecanismos celulares de intensos estudos proteômicos, pois atuam na regulação, nas alterações pós-traducionais, proteólise e/ou realocização subcelular de proteínas chaves envolvidas no gerenciamento, sobrevivência, proliferação e desenvolvimento das células (Mortensen *et al.*, 2010). Estima-se que o número total de transcritos protéicos, em mamíferos, esteja em torno de 5.000 (Kettman *et al.*, 2002), podendo chegar até 10.000, ou mais, se forem incluídas as modificações pós-transducionais (Unwin *et al.*, 2003). Outro fator a ser considerado é que a relação direta do mRNA sintetizado poderia não ter uma correspondência equivalente e precisa das proteínas envolvidas nos diversos processos que ocorrem nas células (Hayman & Przyborski, 2004).

As técnicas de análise proteômica vêm sendo amplamente aperfeiçoadas e utilizadas, como é o caso da eletroforese de gel de poliacrilamida bi-dimensional (2D-PAGE), que tem uma capacidade teórica de resolver mais de 10.000 espécies protéicas (Klose & Kobalz, 1995). Subseqüentemente com a análise por espectrometria de massa proporcionam um método investigativo da análise do conteúdo protéico. Conseqüentemente identificar diferentes proteínas e até mesmo identificar mudanças pós-traducionais. Dessa maneira, a caracterização de tecidos sadios e doentes, classificação das populações celulares (Fathi *et al.*, 2009; Gilabert *et al.*, 2010) e busca de marcadores biológicos para diversos processos (Hayman & Przyborski, 2004) biológicos tornam-se uma atividade científica promissora e resolutive.

No âmbito dos estudos com células-tronco a proteômica tem assumido cada vez mais importância. A proteômica como estratégia para identificar marcadores de malignidade nas células-tronco hematopoiéticas em pacientes com leucemias (Ota *et al.*, 2003). Neste estudo, os autores priorizaram os resultados da avaliação das proteínas identificadas pela técnica de eletroforese 2D, uma vez que em análise de microarranjo gênico obtiveram baixa correlação entre a abundância do RNA mensageiro e as proteínas identificadas (Evans *et al.*, 2004). Aumentando a sensibilidade dos ensaios de eletroforese 2D a partir do uso de fluorocromos conjugados às amostras (DIGE), obtiveram resultados mais sensíveis por captação dos sinais das amostras por fluorescência.

Outro exemplo da aplicabilidade da proteômica e mais detalhadamente da utilização da eletroforese 2D (DIGE) vem nas análises comparativas no rastreamento das alterações celulares ocorridas mediante a ação quimiotática de uma determinada molécula aplicada as células-tronco hematopoiéticas murinas. A comparação entre uma situação normal dessas células e a situação de depleção para o receptor quimiotático específico dessa molécula revelou uma similaridade de 73% do seu conjunto de proteínas entre as situações analisadas. Assim, foi possível avaliar a ação quimiotática dessa molécula.

Inserida na osteogênese a proteômica, já atuante, busca mapear o fenômeno da diferenciação de células-tronco em osteoblastos. Neste contexto, outro importante demonstração acompanhada pela associação das técnicas proteômicas e de microarranjo gênico em que as células-tronco humanas mesenquimais de medula óssea, quando cultivadas com meios de culturas com

receitas diferentes para indução osteogênica, apresentavam diferenças em seu perfil protéico no momento em que eram avaliados (Wagner *et al.*, 2006). Entretanto, foi relatado que esse fenômeno de diferenciação era constante para diferentes pacientes, ressaltando a influência do meio de indução osteogênica no cultivo dessas células e o seu resultado na diferenciação para a linhagem osteoblástica (Wagner *et al.*, 2006).

Continuando na mesma linha de trabalhos científicos, um estudo evidenciou, também por meio de eletroforese 2D, o potencial das células-tronco humanas de cordão umbilical em se diferenciar em osteoblastos, quando induzidas por meio osteogênico (Kim *et al.*, 2008b). Foi sugerida, então, a utilização de algumas moléculas encontradas somente nas células diferenciadas como marcadores a serem empregados no controle de qualidade da diferenciação osteogênica, aplicando-os à terapia celular experimental.

Os avanços técnico-metodológicos, atuais, para o tratamento de dados nas técnicas de eletroforese 2D e espectrometria de massa vem permitindo identificar qualitativamente e quantitativamente o conteúdo protéico relacionado com a diferenciação osteoblástica *in vitro*, gerando informações relacionadas aos eventos de sinalização e ao controle da diferenciação no âmbito molecular (Blonder *et al.*, 2006).

Contudo, as informações obtidas por meio do processo osteogênico, somando-se às várias fontes de células-tronco mesenquimais estudadas, incluindo nesse cenário a hADAS, ainda são insuficientes para apontar um cenário da osteogênese na sua face molecular.

1.6 - JUSTIFICATIVA

Há estudos em animais demonstrando a eficácia do uso das células tronco mesenquimais no tratamento de defeitos ósseos (Bruder *et al.*, 1994; Granero-Molto *et al.*, 2009; Ohgushi *et al.*, 1989). Nestes estudos células mesenquimais expandidas *in vitro* foram injetadas para preencher falhas ósseas em modelo animais (coelhos e cães) com a finalidade de recuperação de fraturas ósseas e obtiveram sucesso regenerando a parte lesionada do osso.

Apesar de sua utilização nas áreas de reparo de tecidos lesionados, a qualidade de sua diferenciação vem sendo alvo de estudos, objetivando ampliar os conhecimentos e aperfeiçoar a utilização das hADAS na diferenciação e especialização celular e possivelmente, aplicação dessas células na medicina moderna com alternativa terapêutica para lesões teciduais.

A abordagem proteômica vem sendo amplamente utilizada como ferramenta na caracterização e definição de populações de células-tronco, tornando possível estabelecer padrões moleculares para as populações e até mesmo avaliar os processos de diferenciação (Hayman & Przyborski, 2004).

Com o intuito de acrescentar na caracterização das proteínas envolvidas no processo de diferenciação das células-tronco mesenquimais humanas isoladas de tecido adiposo em osteoblastos, o presente trabalho propõe uma caracterização proteômica da osteogênese induzida "*in vitro*". Focando na busca de marcadores de diferenciação osteogênicos, novos receptores de superfície celular e outras moléculas envolvidas na manutenção e diferenciação dessas células no decorrer da osteogênese. Portanto, as informações, geradas no

presente trabalho tornam-se relevante para um amplo estudo visando uma utilização eficaz e segura dessas células na medicina regenerativa moderna.

2 - OBJETIVOS

2.1 - OBJETIVO GERAL

O presente trabalho objetiva um estudo proteômico da osteogênese “in vitro”, visando à busca de marcadores de diferenciação e diversas outras moléculas envolvidas, na manutenção e diferenciação dessas células, possibilitando avanços na compreensão do fenômeno de diferenciação e caracterização molecular das células-tronco isoladas de tecido adiposo humano.

2.2 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- Extrair , cultivar e caracterizar fenotípicamente as células-tronco isoladas de tecido adiposo humano
- Promover a diferenciação “*in vitro*” das ADAS para linhagem osteoblástica.
- Determinar a regularidade do processo osteogénico induzido “in vitro” a partir da análise dos três doadores.
- Realizar um estudo comparativo do perfil das proteínas no processo de diferenciação osteogénica por meio do fracionamento da eletroforese 2D.
- Identificar as principais proteínas cuja expressão foi determinada como diferenciada em cada estágio..

3 - METODOLOGIA

3.1 - OBTENÇÃO E CULTIVO DE CÉLULAS

3.1.1 - MEIOS DE CULTURA

3.1.1.1 - MEIO DE CULTURA BASAL

O meio básico foi preparado utilizando-se D-MEM (*Dulbeco's Modified Eagle Medium*, Gibco) suplementado com 5,0 mM de bicarbonato de sódio (Merck), 10% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco), 100 unidades de penicilina G/mL, 100 unidades de streptomicina/mL e 0,25 µg de anfotericina B/mL (PSA, Gibco). Finalmente, pH do meio de cultura foi ajustado para 7,2 e então submetido a filtração em membrana de 0,22 µm. O procedimento de filtração foi realizado em ambiente estéril.

3.1.1.2 - MEIO DE CULTURA OSTEOGÊNICO

Para a diferenciação de células-tronco isoladas de tecido adiposo em osteoblastos foram acrescentados ao meio de cultura basal 0,2 mM de vitamina C (Sigma), 10,0 mM de β-glicerofosfato (Sigma) e 10⁻⁸ M de dexametasona (Sigma), como descrito por (Jaiswal *et al.*, 1997). Este meio de indução osteogênica foi novamente filtrado em membrana de 0,22 µm em ambiente estéril.

3.1.2 - LINHAGENS CELULARES

3.1.2.1 - CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS HUMANAS ISOLADAS DE TECIDO ADIPOSEO

O produto de lipoaspiração foi obtido de pacientes internados na Clínica de Cirurgia Plástica - Núcleo de Cirurgia Plástica – coordenada pelo Dr Luiz Lamana dos Santos, localizada na cidade de Belo Horizonte, Minas Gerais em concordância com as normas aprovadas pelo Comitê de Ética em pesquisa da UFMG (número do processo: ETIC 361/06). O produto de lipoaspiração de diferentes partes do corpo (flanco esquerdo e direito, regiões supra e infra umbilical) foi acondicionado em seringas estéreis de 20 mL`s. Esse conteúdo, no fluxo laminar, foi transferido para tubos de polietileno de 50 mL`s para lavagem com tampão fosfato 0,15 M, pH 7,2 (PBS), e posterior centrifugação por 5 minutos a 1.400 rpm, na temperatura de 10° C. Após a centrifugação, formou-se uma solução bifásica, sendo que a parte inferior contendo um precipitado com as hemácias foi aspirado e descartado, enquanto que a fase superior, contendo o tecido adiposo, foi tratada enzimaticamente com colagenase D (Sigma) (0,15% p/v em PBS) na proporção de 1:1 e incubada por 2 h a 37° C.

No decorrer do período de incubação, em intervalos constantes de 15 minutos, os tubos eram vigorosamente agitados. Após o termino desse período, os tubos foram centrifugados novamente por 5 minutos a 1.400 rpm, a uma temperatura de 10° C, para a separação da fração adipocitária da fração estromal vascular. A fração superior contendo a gordura foi, então, desprezada e a fração estromal vascular ressuspendida em meio D-MEM com 10% SFB,

distribuída em garrafas T25 e mantida em estufa de CO₂ a 37° C. Após 2 dias de repouso, o conteúdo das garrafas foi transferido para tubos plásticos de 50 mL's e centrifugado nas mesmas condições anteriores. O precipitado formado foi novamente ressuspensionado em meio D-MEM acrescido 10% SFB e acondicionado em novas garrafas T25, enquanto que o sobrenadante foi descartado. As garrafas de cultivo celular iniciais foram novamente embebidas em D-MEM com 10% SFB para posterior cultivo de células aderentes remanescentes .

As células obtidas foram provenientes de três doadores saudáveis do sexo feminino e foram cultivadas *in vitro* por 8 semanas. Para manter pelo mesmo tempo em cultivo *in vitro*, as células foram mantidas e expandidas por 4 semanas, posteriormente divididas em três estágios e, novamente, mantidas por mais 4 semanas. O estágio denominado S0 é composto pelas células não induzidas a se diferenciar e mantidas por 4 semanas em meio basal. O estágio 1 (S1) é composto por células induzidas a se diferenciar, sendo respeitado um período inicial de 2 semanas sem estímulos e 2 semanas tratadas com meio osteogênico. O último estágio estabelecido, estágio 2 (S2), foi induzido por 4 semanas em meio osteogênico. Após o término dessas 8 semanas de cultura, o material biológico foi submetido a experimentação. O fluxograma temporal do cultivo representado abaixo sumariza as informações.

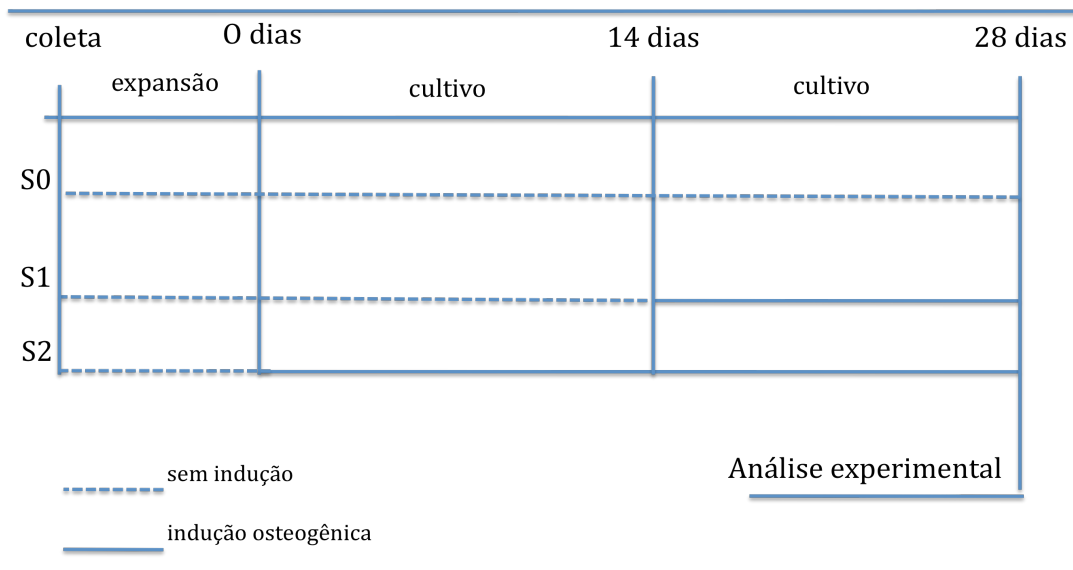


Figura 3 - Fluxograma do desenvolvimento temporal e experimental da osteogênese

3.2 - CITOMETRIA DE FLUXO

A análise das moléculas que caracterizam as populações de células-tronco mesenquimais isoladas de tecido adiposo humano (hADAS) foi realizada por citometria de fluxo em células cultivadas no estágio S0. Os resultados foram representados em forma de histogramas.

As hADAS foram caracterizadas por citometria de fluxo por meio da análise da presença de duas moléculas de superfície celular CD29 e CD44, que são consideradas como marcadores positivos de células-tronco mesenquimais. Para verificar a existência de contaminações da cultura de células-tronco mesenquimais com células-tronco hematopoiéticas, também foi analisada a presença das moléculas de superfície celular CD34, consideradas um marcador positivo de células-tronco hematopoiéticas (Pittenger *et al.*, 1999). Os marcadores CD106 e CD49d também foram utilizados para melhor

definição da população de hADAS como marcadores celulares negativos e positivos, respectivamente.

3.2.1 - MARCAÇÃO CELULAR COM ANTICORPOS PRIMÁRIOS E SECUNDÁRIOS

Células-tronco mesenquimais humanas na densidade de 5×10^5 foram incubadas com 0,4 μg de anticorpos primários monoclonais de camundongo IgG anti CD29 humano (Santa Cruz Biotechnology), anti CD44 humano (Santa Cruz Biotechnology), anti CD106 humano, CD49d humano e CD34 humano (abcam) em diferentes posições em uma placa de 96 poços (placa fundo em U) por 30 minutos à temperatura de 4°C. Após a incubação, as células foram lavadas com PBS e incubadas com 0,4 μg do anticorpo secundário policlonal de coelho anti IgG de camundongo marcado com isotiocianato de fluoresceína (FITC) (CALBIOCHEM) ou com ALEXA – 568 nm ou 488 nm (Invitrogen) por 30 minutos a 4°C. As células foram novamente lavadas em PBS e depois fixadas em solução a 2% de formaldeído. Como controle negativo de fluorescência, também foi adicionado o anticorpo secundário às células não marcadas com o anticorpo primário. Células sem qualquer tipo de marcação foram fixadas e utilizadas para gerar o gráfico de tamanho versus granulosidade para estabelecer o intervalo da população a ser analisada.

3.2.2 - LEITURA NO CITÔMETRO DE FLUXO FACSCAN (BECTON DICKINSON IMMUNOCYTOMETRY SYSTEM, SAN JOSE, CA)

Um mínimo de 15.000 eventos foram adquiridos para analisar a marcação das células auxiliado pelo programa CellQuest. Os dados obtidos foram analisados no programa WinMDI 2.8. Primeiramente, a população de células a ser estudada foi delimitada através de regiões que são definidas em gráficos de tamanho versus granulosidade, gerado pela análise de células que não foram submetidas a nenhum tipo de marcação. Posteriormente, utilizou-se um gráfico de histograma para delimitar a região do controle negativo de fluorescência referente às células que foram incubadas apenas com o anticorpo monoclonal de coelho anti IgG de camundongo marcado com FITC e com ALEXA. A partir da definição desses parâmetros, iniciamos a análise das células marcadas com os anticorpos primários e secundários.

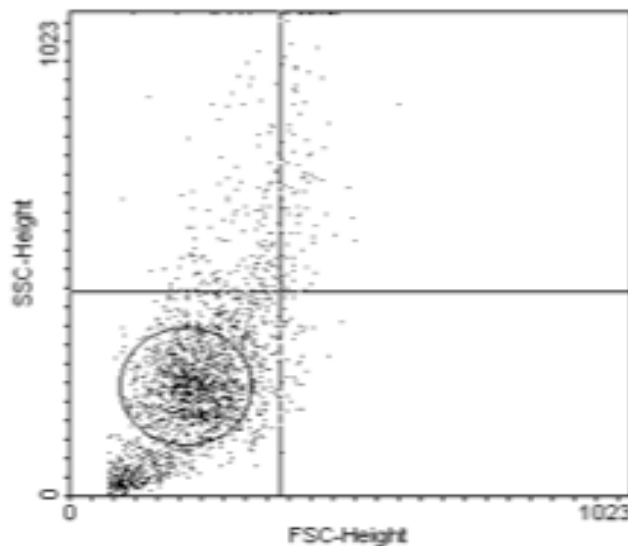


Figura 4 - Dot blot representando a população de células selecionadas pelos parâmetros de tamanho e granulosidade para análise fenotípica dos marcadores moleculares de Células tronco mesenquimais por citometria de fluxo.

3.3 - TESTE DE VIABILIDADE CELULAR

O ensaio de MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) é um método colorimétrico sensível, qualitativo e quantitativo, que mensura a viabilidade, proliferação e estado de ativação das células. Este ensaio baseia-se na capacidade de enzimas desidrogenases, presentes na mitocôndria de células viáveis, em converter o substrato MTT, solúvel em água, no cristal de formazan, produto insolúvel em água. A quantidade de formazan produzido é diretamente proporcional ao número de células viáveis (Mosmann, 1983).

As populações celulares pertencentes aos três estágios (S0, S1 e S2) foram cultivadas em meio de cultura basal em uma placa de 24 poços (TPP – Techno Plastic Products in Trasadingen, Switzerland, Germany) em uma densidade de 5×10^5 células/mL/poço (contagem em câmara de Neubauer) e incubadas por 18 horas a 37°C em estufa com 5%CO₂. Após este período, o meio de cultura foi retirado e 210µL de meio de cultura basal foi adicionado. Foram acrescentados às células, 170 µL da solução de MTT (SIGMA) 5 mg/mL. A placa foi novamente incubada em estufa com 5% de CO₂ a 37°C por 2 horas e, em seguida, as células foram observadas em microscópio óptico para a visualização dos cristais de formazan e documentada para análise morfológica.

3.4 - DETECÇÃO DA ATIVIDADE DA FOSFATASE ALCALINA.

A produção de fosfatase alcalina foi avaliada pelo ensaio colorimétrico da redução do substrato bromo,4-cloro,3-indol/nitroblue tetrazol (NBT-BCIP) (Gibco). Esse ensaio é baseado na reação cromatogênica iniciada pela clivagem do grupamento fosfato presente no BCIP (bromo-cloro-indol fosfato) pela fosfatase alcalina presente nas células. A reação produz um próton que reduz o NBT (nitro *blue* tetrazol) a um precipitado insolúvel de cor púrpura (Machado *et al.*, 2007).

Para a detecção de fosfatase alcalina as células foram semeadas na concentração de 5×10^5 /poço em placas de cultivo de 24 poços, sendo que todo o meio de cultivo celular foi retirado. As células foram lavadas com PBS 0,15 M e 200 μ L's de solução de BCIP-NBT foi adicionados a cada poço, de acordo com as instruções do fabricante (Gibco).. Após 2 horas de incubação, cada poço recebeu 210 μ L de SDS 10% HCl 0,01N para a solubilização dos precipitados púrpura. As placas foram incubadas à 37°C por 12 horas. Após a solubilização, 100 μ L da solução de cada poço foi colocado em uma placa de 96 poços e a densidade óptica da solução foi medida a 595 nm em um leitor automático de micro placas. Foi utilizada uma enzima de AP comercial (sigma) para produção de uma curva de concentração a ser usada para determinar a concentração das amostras em μ g/ por numero de células. A curva de concentração estabelecida com 5 pontos teve um R^2 de 0,9782 (Figura 5). Foi utilizado como ferramenta para comparação real e significativa entre os estágios analisados o Teste T, sendo considerado o valor $p < 0,05$ como

significativo. O resultado foi sumarizado na forma de histograma na secção resultados .

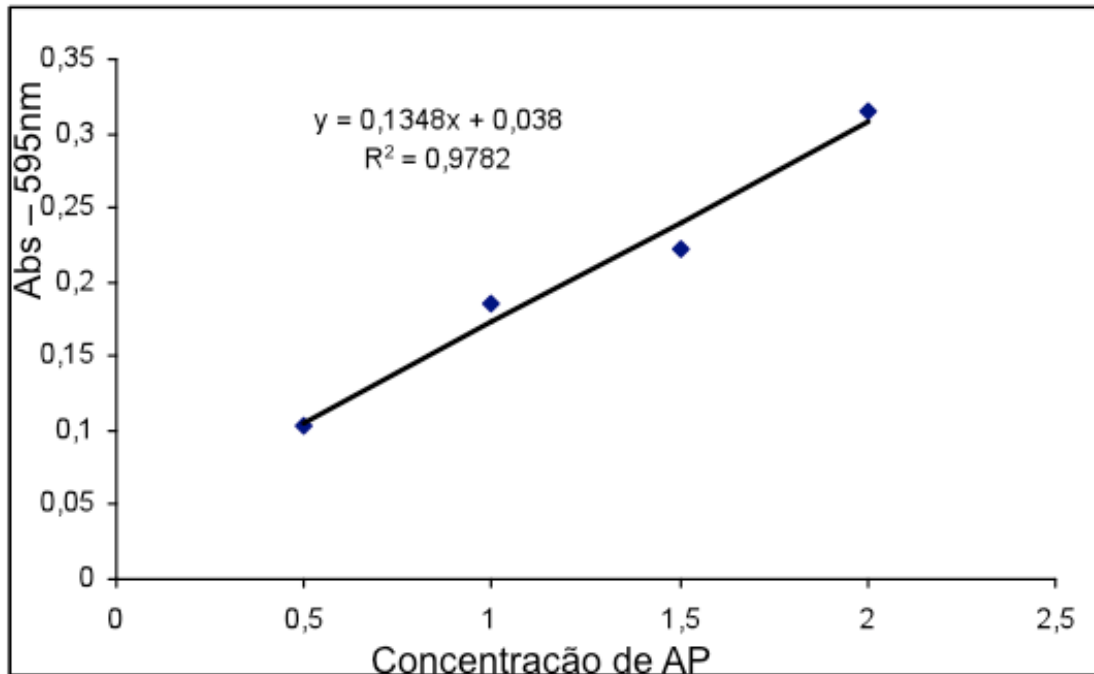


Figura 5 - Equação da reta. Dosagem da fosfatase alcalina (AP), no eixo X expressa a concentração da enzima, no Y os valores de absorbância obtidos

3.5 - DETECÇÃO DE COLÁGENO - SIRCOL

O colágeno é considerado a proteína de matriz extracelular mais abundante do tecido ósseo, secretada em grandes quantidades pelos osteoblastos (Valerio *et al.*, 2004). A presença aumentada de colágeno no decorrer do processo de indução osteogênica pode ser um forte indicativo da diferenciação osteoblástica e do desenvolvimento de osteoblastos, agindo como parâmetro bioquímico da diferenciação.

A detecção de colágeno foi realizada pelo método de coloração por sircol (Sweat *et al.*, 1964), que tem a propriedade de se ligar seletivamente à sequência terminal do colágeno de mamíferos, composta por tripeptídeos [Gli-X-Y]. Entretanto, o ensaio com este corante não tem a capacidade de distinguir entre os diferentes tipos de colágeno.

As células em cultura, dos estágios 0, 1 e 2, foram plaqueadas na concentração de 5×10^5 células/poço (contagem em câmara de Neubauer), em placas de 6 poços e incubadas por 24 h. Posteriormente, o meio de cultura dos poços foram aspirados e fixados com 1,0 mL de Bouin por 1h a 37° C. Após fixação, os poços foram lavados em água corrente por 10 minutos. A placa foi, então, levada à estufa a 37°C para secagem. Em seguida, foi adicionada a solução de *sirius red* (0,6 mg do pó de *sirius red* em 1,0 mL de ácido pícrico), mantida em agitação a 37° C por 30 minutos. Ao término do período de incubação, o corante foi removido e os poços foram lavados com uma solução de HCL 0,01N por 3 vezes, observado no microscópio óptico e as células fotografadas. Posterior à documentação, foi utilizada uma solução de NaOH 0,1N (300µl/poço) para dissolver o corante.

O Homogeneizado foi transferido para placa de 96 poços (nunc) e a absorbância foi finalmente lida a 540 nm. O resultado foi representado em gráfico de barras, levando-se em conta que as amostras foram submetidas a ensaios em triplicata para posterior tratamento estatístico (Valerio *et al.*, 2004). Foi utilizado um colágeno comercial (Sigma) para produção de curva de concentração, possibilitando obter os resultados em concentração de µg/ 5×10^5 células. Foi utilizado como ferramenta para comparação real e significativa

entre os estágios analisados o Teste T, sendo considerado o valor $p < 0,05$ como significativo. O resultado foi sumarizado em forma de histograma.

3.6 - AVALIAÇÃO DA FORMAÇÃO DOS NÓDULOS DE MINERALIZAÇÃO

O ensaio qualitativo para detecção de cálcio e para evidenciar a mineralização foi realizado em placas de cultivo de 6 poços contendo lamínulas de vidro 22×22 mm inseridas dentro dos poços. Foram realizados os ensaios com as células pertencentes aos três estágios – S0, S1 e S2 - na concentração 5×10^5 células/poço mantidas em estufa a 37°C e 5% de CO_2 . Após o período experimental, o meio de cultura foi retirado e as células foram fixadas em solução de etanol 70% por 24h. Posteriormente, as células foram hidratadas em água destilada por 5 minutos e imersas em solução de nitrato de prata 50% por 1 hora sob incidência de luz quente artificial. Em seguida, as células foram lavadas em água destilada por 5 minutos e embebidas em solução de tiosulfato de sódio a 5% por 5 minutos. Em seqüência, as células foram desidratadas em solução de etanol 90% e etanol absoluto e, para finalizar, na montagem das lâminas histológicas, foi utilizado o bálsamo do Canadá para fixar a lamínula à lâmina. As lâminas foram observadas em microscópio óptico, documentadas para análise morfológica.

3.7 - ENSAIO PARA DETERMINAÇÃO DA MATURAÇÃO DAS FIBRAS DE COLÁGENO

As células em cultura dos estágios S0, S1 e S2 foram submetidas a ensaios para determinação da maturação do colágeno secretado como parâmetro de diferenciação osteogênica. Essas células foram cultivadas em placas de 6 poços com lamínulas (22 × 22 mm) estéreis e foram lavadas com PBS 0,15 M. Em seguida foram adicionados 4,0 mL de Bouin em cada poço, para incubação por 1 hora a 37⁰C, sob agitação. As placas foram lavadas em água corrente por 15 minutos para posterior coloração pelo *Sirius Red* durante 30 minutos, a 37⁰C, sob agitação. O excesso de corante foi removido e, em seguida, as células foram lavadas abundantemente com HCl 0,01N. Posteriormente, adicionou-se 1 mL de álcool 70% para fixação por 24 horas. As lamínulas foram removidas da placa, imersas em álcool absoluto, em xilol e, em seguida, montadas em lâminas com bálsamo para observação em microscopia de campo escuro sob luz polarizada, segundo técnica descrita por (Junqueira *et al.*, 1979). A observação da orientação e adensamento das fibras de colágeno foi realizada e as células foram fotografadas para documentação do processo de maturação do colágeno durante o desenvolvimento dos osteoblastos.

3.8 - EXTRAÇÃO DE RNA E RT-PCR

O RNA total das células pertencentes a cada um dos três estágios estabelecidos (S0, S1 e S2), na quantidade de 1×10^6 células, foi isolado usando o reagente TRIzol (GIBCO). O RNA foi precipitado da fase aquosa com álcool isopropílico. O precipitado resultante foi ressuspendido em água DEPC (di-etil pirocarbonato). A concentração do RNA foi determinada pela leitura da absorbância a 260 e 280 nm. O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado a partir de 1 μ g de RNA total, utilizando-se do kit SuperScript III (Invitrogen). O cDNA resultante foi utilizado nas reações de PCR descritas a seguir.

3.8.1 - PCR

O cDNA sintetizado foi utilizado na reação de amplificação dos genes do Colágeno tipo 1 (Col1), *Bone morpho protein 4* (BMP 4), *Mineralization protein 1* (Lamp 1) e Osteocalcina (Oc), e foi usado como controle positivo das células o iniciador para desidrogenase gliceraldeído-3-fostatase (GAPDH) (Tabela 1).

As reações de amplificação foram realizadas com um aquecimento inicial de 95° C por 2 minutos, seguidos de 30 ciclos de 95° C, por 30 segundos, 58°C por 45 segundos, 72°C por 45 segundos, e 72°C por 10 minutos, utilizando-se o termociclador (PTC-100 MJ Research. Inc.). Os produtos da amplificação foram submetidos à eletroforese em 2% gel de agarose com brometo de etídio para visualização do produto amplificado.

Tabela1 - Iniciadores para ensaios de PCR. Informações complementares das seqüências dos iniciadores selecionados para os ensaios de PCR .

Banco Génico (No)	Sequências (5' – 3') Iniciadores	Pares de base (No)	Ciclos (No)
Col - 1 (AB209597)	TGACGAGACCAAGAACTG CCATCCAAACCACTGAAACC	599	35
BMP - 4 (NM_001202)	ACCTGAGACGGGGAAGAAAA TTAAAGAGGAAACGAAAAGCA	348	35
Lamp -1 (AF345904)	CAGCCGGTTCAGAGCAAAC GCCAGTCCTCTGTGTTCTCC	214	35
OC (X53698)	ATGAGAGCCCTCACACTCCTC CGGGCCGTAGAAGCGCCGATA	297	35
GAPDH (BC013852)	TGGTATCGTGGAAGGACTCATGAC ATGCCAGTGAGCTTCCCGTTCAGC	189	35

3.9 - ELETROFORESE BIDIMENSIONAL (2-D DIGE)

3.9.1 - EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS CELULARES

As células em cultivo pertencentes aos três estágios (S0, S1 e S2) foram lavadas e removidas de suas garrafas de cultivo celular por raspagem. O conteúdo celular de 6 garrafas T75 foi necessário para a lise celular e coleta de material protéico. Para isso, essas células foram, então, lavadas em meio D-MEM sem soro fetal bovino e centrifugadas por 5 minutos a 1.500 rpm, sendo

esse procedimento repetido por 3 vezes. Ao sedimento formado acrescentou-se tampão de lise (8M de Uréia, 2M de Tiouréia, 4% de CHAPS, 65 mM de Ditiotretitol, 40mM de Tris base. Após centrifugação a 14.000 rpm por 30 minutos, o sobrenadante (extrato protéico) foi aliquoteado e armazenado à temperatura de -70°C . A concentração protéica foi quantificada pelos métodos de Bradford modificado (Weekes *et al.*, 1999) e também pelo kit 2D quant (GE Healthcare).

3.9.2 - CONJUGAÇÃO DAS PROTÉICAS AOS *MINIMAL CYDYES*.

A utilização da técnica de DIGE consiste nos CyDye DIGE *minimal*, que apresentam um grupamento reativo ester NHS. Esse grupamento reativo é desenhado para formar uma ligação covalente com o grupamento amina épsilon do resíduo de Lisina na proteína, via uma ligação amídica. O CyDye *minimal* carrega uma carga positiva igual a 1, que, quando conjugada à Lisina, substitui a carga da Lisina pela sua, assegurando que o ponto isoelétrico da proteína não seja alterado significativamente (GE Healthcare).

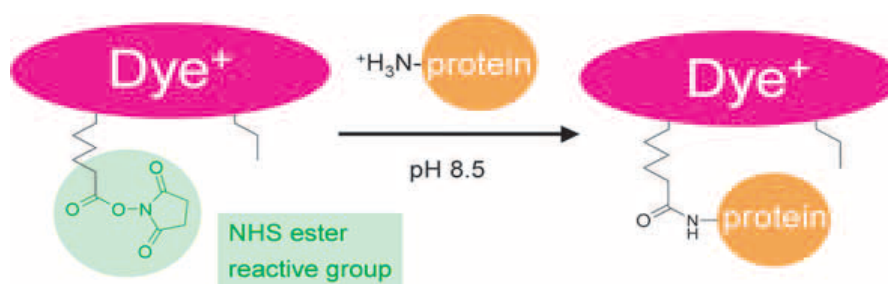


Figura 6 - Conjugação do Dye a proteína via ligação covalente (GE Healthcare).

O *CyDye DIGE minimal* é conjugado com apenas uma quantidade pequena das proteínas, sendo que aproximadamente apenas 1 ou 2% dos resíduos de Lisina acaba por ser ligado ao corante. Com isso, cada "spot" identificado é visualizado como um único (GE Healthcare).

O CyDye minimal apresenta três fluorocromos que podem ser incorporados as proteínas. O Cy2, Cy3 e o Cy5 que combinam com massa e carga. Cada CyDye conjugado a proteína vai adicionar 450Da a massa da proteína. Esse ganho de massa não afeta os parâmetros de visibilidade na segunda dimensão do gel de SDS PAGE possibilitando uma real análise do gel. Contudo, o desenho experimental dos géis contendo amostra protéica dos três estágios (S0, S1 e S2) provenientes simultaneamente de três doadores (P1,P2 e P3), pode ser visualizado na Tabela 2.

Tabela 2 - Agrupamento das amostras protéicas dos indivíduos nos estágios S0, S1 e S2 nos géis DIGE . S - estágio, P - paciente, Pad interno - agrupamento de todas as amostras em igual quantidade.

Dye	Gel 1	Gel 2	Gel 3	Gel 4	Gel 5
Cy2	Pad.interno	Pad.interno	Pad.interno	Pad.interno	Pad.interno
Cy3	S0 - P1	S2 - P1	S0 - P2	S1 - P2	-----
Cy5	S1 - P1	S2 - P2	S1 - P3	S0 - P3	S2 - P3

Em todos os géis foram utilizados um padrão interno contendo a mistura de todas as amostras, com a finalidade de ser uma ferramenta importante para normalizar os diferentes géis proporcionando uma análise mais fidedigna das imagens.

As amostra protéicas foram conjugadas aos CyDyes na proporção de 2 pmol/ μ g de proteína, sendo utilizada por amostra de cada paciente uma quantidade de 160 μ g de proteína. Portanto, cada gel continha a soma de duas amostras distintas (estágio e/ou paciente) mais o padrão interno, totalizando 480 μ g por gel. A ligação dos CyDyes foi realizada seguindo a instrução do fabricante (GE Healthcare).

3.9.3 - ELETROFORESE BIDIMENSIONAL (2-DE)

Fitas de gradiente de potencial de hidrogênio imobilizadas (*Immobilized pH gradient (IPG) strips*), de 18 cm de comprimento e distribuição de valores não-lineares de pH entre 3 e 10, foram hidratadas com extrato protéico (480 μ g) e avolumadas com tampão IEF (Uréia 8M, Thioúreia 2M, CHPS 4%, 0.2% v/v IPG-buffer - GE Healthcare) resultando em um volume final de 450 μ l. Foi realizada uma hidratação passiva por 12h à temperatura ambiente, no escuro. A focalização isoeétrica das fitas IPGs procedeu de forma inicial com o aumento gradual da voltagem até 8.000V. Um acúmulo de 60.000V/h foi necessário para possibilitar a migração do conteúdo protéico e um posterior declínio dessa voltagem também de forma gradual até 500V, sendo a temperatura de 20⁰C constante em todas as etapas da focalização. As fitas IPG, posteriormente à focalização, foram então incubadas uma vez com 125 mM DTT em tampão de equilíbrio (6M uréia, 30% glicerol, 2% SDS, 0.02% *Commasie blue* G-250, pH 8.8) por 15 minutos e, posteriormente,

carbamidometiladas por 15 min (125 mM iodoacetamida em tampão de equilíbrio).

Na segunda dimensão, utilizou-se gel de poliacrilamida a 10% no sistema Ettan DALTsix (GE Healthcare Life Sciences) resfriado pela passagem de água no sistema. A eletroforese foi feita na ausência de luz a 50µA por gell, sob corrente constante.

3.9.4 - ANÁLISE DAS IMAGENS

Os géis conjugados com os CyDyes foram lidos no escaner de fluorescência Typhoon™ 9400 (GE Healthcare) e as imagens geradas foram transportadas e analisadas no softwares Decyder 6,5V (GE Healthcare) e ImageMaster 2D Platinum (GE Healthcare). Posteriormente, os géis foram corados por protocolo compatível com a espectrometria de massa utilizando-se do Comassie Coloidal para permitir a extração dos spots (Neuhoff *et al.*, 1988).

Utilizando-se dos recursos do programa de análise, foi realizado um agrupamento das imagens dos géis em classes contendo uma triplicata biológica de cada situação: i) o grupo S0, composto de amostras protéicas das células-tronco isoladas de tecido adiposo dos três indivíduos, que não foram estimuladas a se diferenciar em osteoblastos; ii) o grupo S1, composto de amostras protéicas de células com 2 semanas de estimulação osteogênica e iii) o grupo S2, composto por amostras protéicas de células estimuladas osteogenicamente por 4 semanas.

Inicialmente foi avaliada a reprodutibilidade dos perfis das diferentes amostras de um mesmo estágio (análise intraclasse) e, em seguida, a variação dos perfis entre diferentes estágios (análise interclasse). A autenticidade de cada "spot" foi validada por inspeção visual e confirmada pelo software de análise Platinum VI (GE Healthcare) e editada quando necessário. Os valores dos volumes de cada "spot" foram obtidos e normalizados pela intensidade total dos "spots" detectados.

O tratamento estatístico utilizando-se de Teste T para comparar cada duas situações diferentes foi realizado entre os diferentes estágios, e os "spots" que se apresentaram diferencialmente expressos, com intensidades significativas, foram selecionados para identificação por espectrometria de massa.

3.9.5 - EXTRAÇÃO DOS SPOTS SELECIONADOS DOS GÉIS E PLAQUEAMENTO DAS AMOSTRAS PARA MALDI-TOF-TOF

Os spots selecionados foram extraídos dos géis em pequenos fragmentos. Esses fragmentos foram lavados em solução descorante de bicarbonato de amônio 25 mM/50% acetonitrila por 30 minutos, por 3 vezes. Após a lavagem, os fragmentos foram tratados com acetonitrila 100% até assumirem a cor opaca e levados a um evaporador para secagem. Os fragmentos foram, então, tratados enzimaticamente com 50 µl de uma solução de tripsina (*Sequence grade modified trypsin*, Promega Biosciences, CA), a uma concentração de 20 ng/µL em 25 mM bicarbonato de amônio. A digestão triptica foi realizada a 37° C por 16 h e a extração realizada por duas lavagens

com duração de 20 minutos cada, a partir de uma solução de 50% acetronitrila/ 5% de ácido fórmico. O volume resultante da digestão triptica foi levado a um ressecador (sppedvac – Savant) para redução parcial do volume até aproximadamente 10µl, conseqüentemente concentrando os peptídeos. A retirada dos sais presentes nos tampões após o resultado da digestão enzimática foi feita por meio da micro coluna de Zip-Tip (C18 resin; P10, Millipore Corporation, Bedford, MA). Finalmente, as amostras foram misturadas com matriz CHCA (5 mg/ml recrystallized α -cyano-4-hydroxycinnamic acid) em um volume final de 1,0 µl na proporção de 1:1 e plaqueada em placas anchorship 600 (Bruker Daltonics, Billerica, EUA) para análise por espectrometria de massa (MALDI-TOF-TOF).

3.10 - IDENTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS VIA POR ESPECTROMETRIA DE MASSA

A identificação das proteínas foi realizada por espectrometria de massa em tandem (MS/MS) no aparelho Autoflex III™ (Bruker Daltonics, Billerica, USA) tipo MALDI–TOF-TOF, utilizando-se o modo positivo/refletor pelo software FlexControl™. A calibração do aparelho foi realizada com o padrão “Peptide Calibration Standard II” (Bruker Daltonics) em “ α -Cyano-4 hydroxycinnamic acid ” (CHCA) . Os sinais de contaminantes, tais como tripsina e queratina foram excluídos das listas usadas para a identificação em banco de dados. Cada espectro produzido é resultado do acúmulo de informação de 200 disparos de laser consecutivos, somados pelo programa.

Os resultados obtidos por espectrometria de massa, em modo MS/MS, que representam porções da sequência primária das proteínas extraídas do gel, foram direcionados para procura no Banco de Dados de Humanos do NCBI (Centro Nacional de Informações Biotecnológicas não repetitivo) através do programa MASCOT®. O MASCOT® trabalha comparando dados experimentais com os dados teóricos da digestão triptica dos peptídeos, buscando identificar as seqüências primárias geradas no Banco de Dados selecionado. Os parâmetros de busca utilizados foram: Tipo de busca - massas dos peptídeos gerados (*mass fingerprint*) e MS/MS análise - Enzima - tripsina - modificações fixas, carboiodometilação (Cys) - modificações variáveis - oxidação (Kimura *et al.*), valores de massa monoisotópica, estado da carga do peptídeo +1, clivagem máxima perdida -1, e tolerância de massa peptídica de 0,05% Da (50 ppm). Sendo considerado significativo apenas os resultados com pontuações acima do ponto de corte estabelecido pelo programa MASCOT®.

4 - RESULTADOS

4.1 - MORFOLOGIA DAS CÉLULAS-TRONCO ISOLADAS DE TECIDO ADIPOSEO HUMANO (hADAS) EM MEIO PADRÃO.

As hADAS, em cultura laminar, apresentaram-se morfológicamente homogêneas agrupando-se e colonizando toda a área disponível. Assumiram forma fusiforme, alongada, com núcleo central e alguns prolongamentos, assemelhando-se à morfologia de fibroblastos. Essas células notoriamente apresentaram atividade proliferativa e aderência às garrafas de cultivo celular (Figura 7).

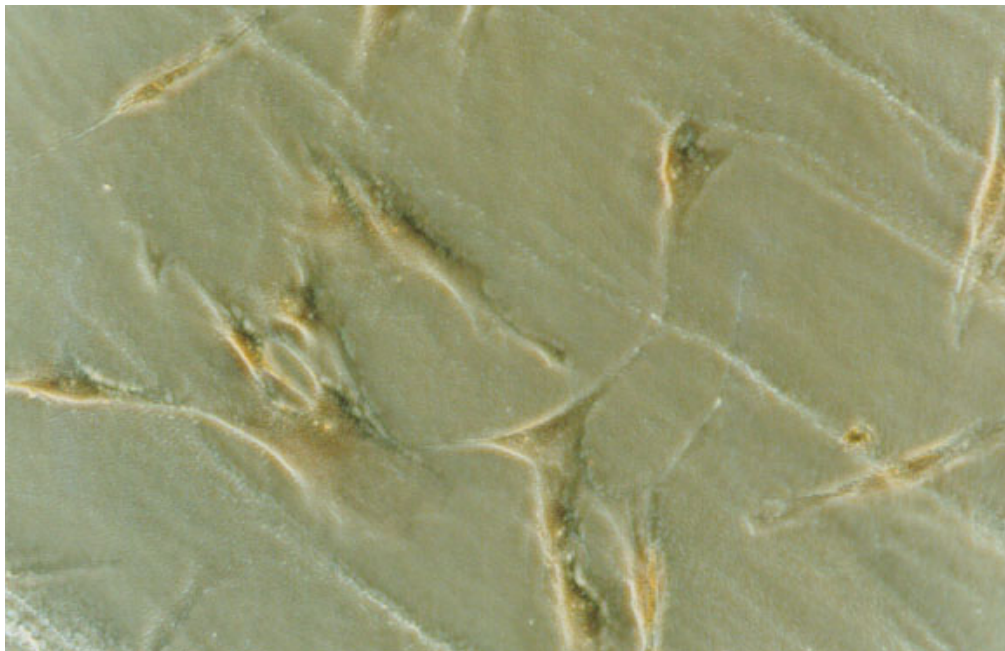


Figura 7. Cultura celular de célula-tronco isolada de tecido adiposo humano (hADAS). Documentação fotográfica das células após 4ª passagem pelo microscópio óptico no aumento de 200x.

4.2 - ANÁLISE FENOTÍPICA DAS CÉLULAS-TRONCO ISOLADAS DE TECIDO ADIPOSEO HUMANO (hADAS).

A confirmação das proteínas descritas como marcadores para definir as populações de células-tronco, evidenciadas nos ensaios de citometria de fluxo, objetivou determinar o fenótipo das células-tronco obtidas de tecido adiposo e o seu perfil com relação aos marcadores moleculares.

Portanto, para verificar a homogeneidade da cultura de hADAS foram selecionadas as proteínas CD29, CD44, CD106, CD49d e CD34.

CD29, CD44 e CD49d são também denominadas respectivamente como B1integrina, Hcam, e a proteína CD49d faz parte do receptor VLA-4. Essas moléculas são importantes para a adesão celular ao epitélio vascular na interação célula-célula e na associação com a matriz extracelular, apresentando-se altamente expressas em células-tronco mesenquimais, sendo que CD49d pode ser considerado como um marcador preferencial para as hADAS. As moléculas CD106 e CD34 são consideradas marcadores negativos para células-tronco mesenquimais, uma vez que essas moléculas foram descritas como expressas apenas em células-tronco hematopoéticas. Os resultados das análises da busca dessas moléculas comprovaram a origem e a qualidade dessas células e os resultados obtidos podem ser sumarizados no histograma das Figura 8 e no gráfico da Figura 9.

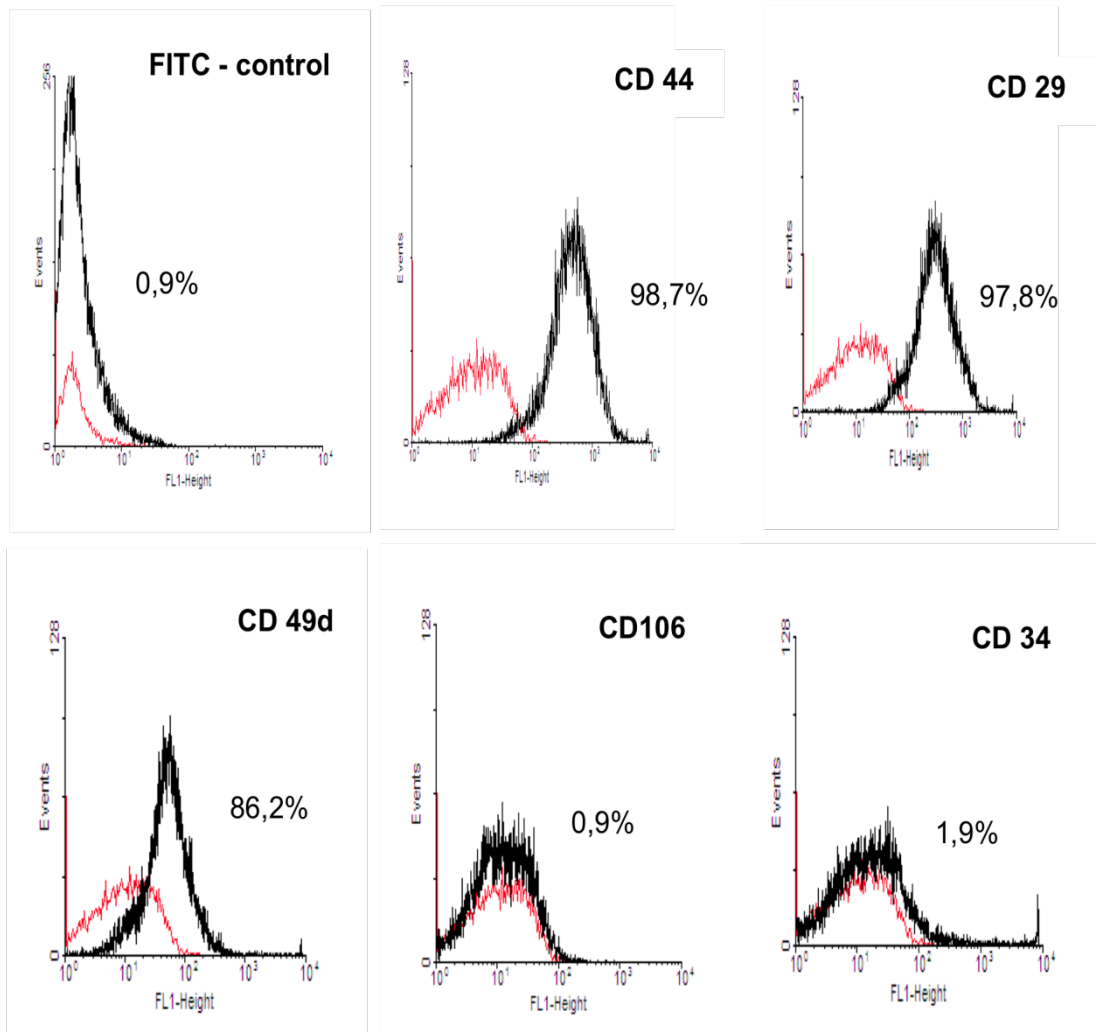


Figura 8 - O deslocamento da linha preta em relação à linha vermelha, representado nos histogramas acima, indicam a marcação positiva e, portanto, presença das moléculas CD29, CD44, CD49d nas células. A sobreposição do trajeto preto sobre o vermelho indica a ausência das moléculas CD106 e CD34 nas células analisadas.

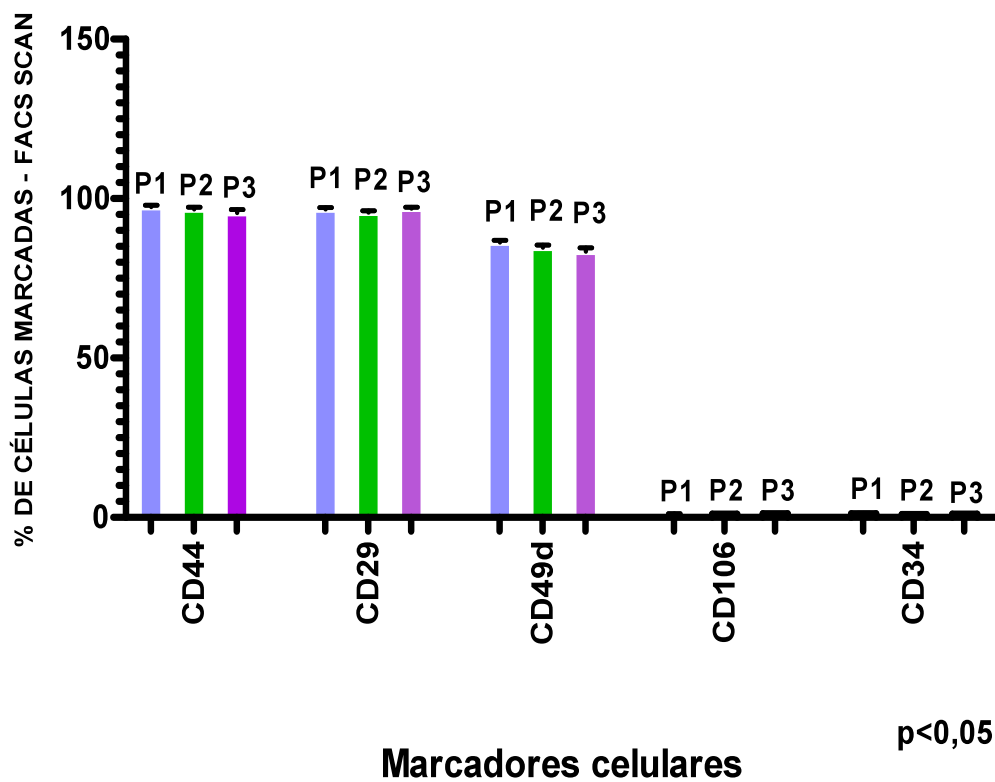


Figura 9 - Percentagem das células marcadas dos doadores (P1,P2 e P3) no estágio S0 para os marcadores moleculares CD44,CD29, CD49d CD106 e CD34.

4.3 – AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR

Os ensaios enzimáticos qualitativos avaliando a catálise da metabolização do MTT realizados nos estágios S0, S1 e S2 indicaram que as células mantiveram-se vivas por todo o período de experimentação evidenciada pela formação dos cristais de formazan, que determinam a metabolização do MTT (Figura 10). A atividade da enzima desidrogenase mitocondrial é um indicador positivo de que as células se apresentam enzimaticamente ativas e funcionais durante todo o período de cultura celular.

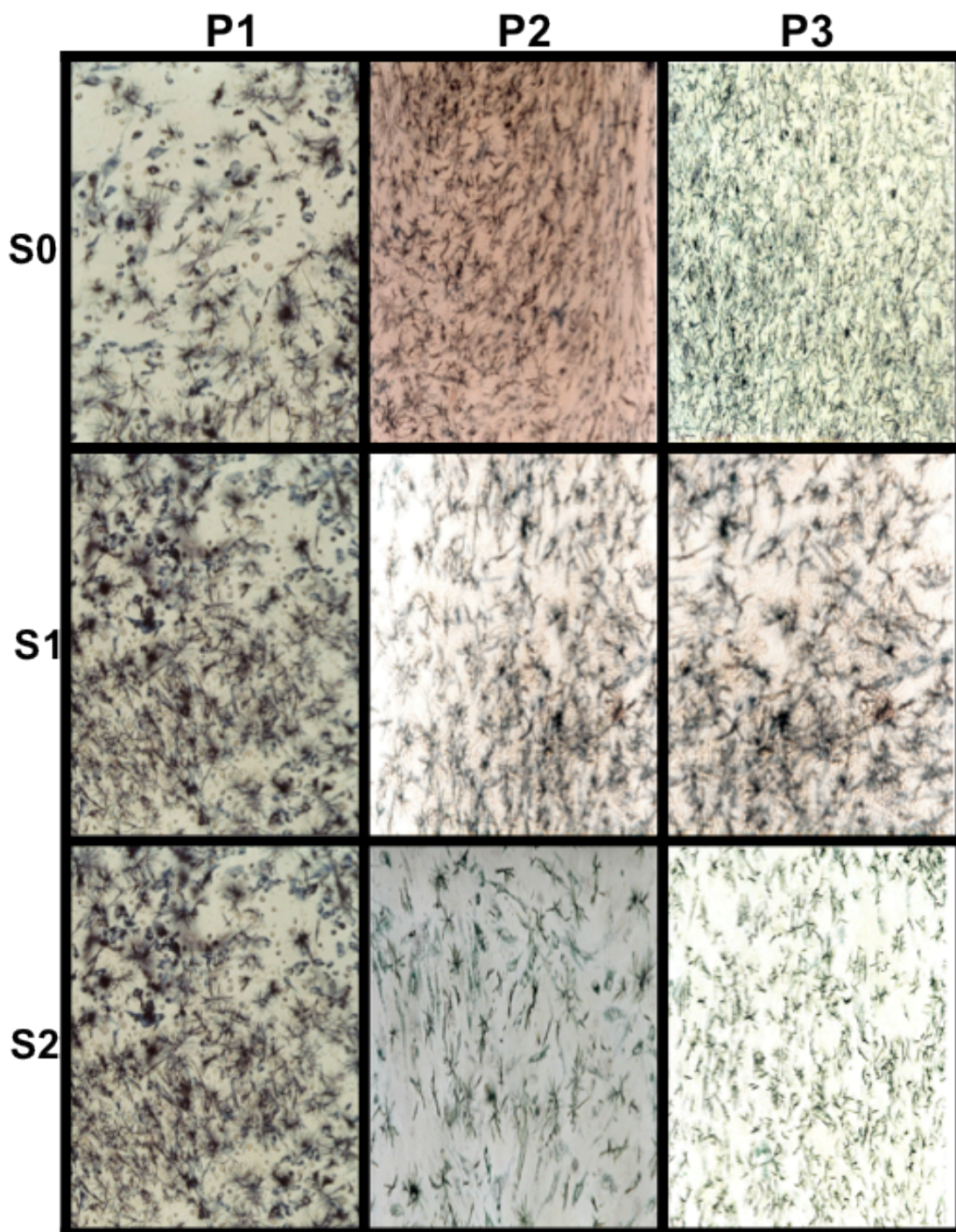


Figura 10 - Visualização dos cristais de formazan confirmando a metabolização do MTT em todos os estágios de diferenciação analisados (S0, S1 e S2) dos três doadores (P1, P2 e P3), indicando atividade normal das células e sua viabilidade no decorrer do processo. As imagens foram obtidas por microscopia óptica no aumento 100X.

4.4 - DETECÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA FOSFATASE ALCALINA

A avaliação da atividade da fosfatase alcalina possibilita, de forma qualitativa e quantitativa, evidenciar a diferenciação das células-tronco em osteoblastos. Essa enzima encontra-se em níveis elevados nos osteoblastos, sugerindo que seu aumento durante a indução osteogênica seja reflexo das alterações metabólicas sofridas para se chegar a um osteoblasto. A documentação das células dos estágios S0, S1 e S2, visualizada na Figura 11, destaca os precipitados azuis que indicam a atividade catalítica da fosfatase alcalina sob o substrato. O resultado quantitativo da Figura 12 representa, em gráfico de barras, a detecção da fosfatase alcalina das amostras por indivíduos e de sua média em cada um dos estágios (S0, S1 e S2). A análise dos gráficos indica aumento da detecção da fosfatase alcalina e, conseqüentemente, sugere alterações metabólicas relacionadas com a osteogênese.

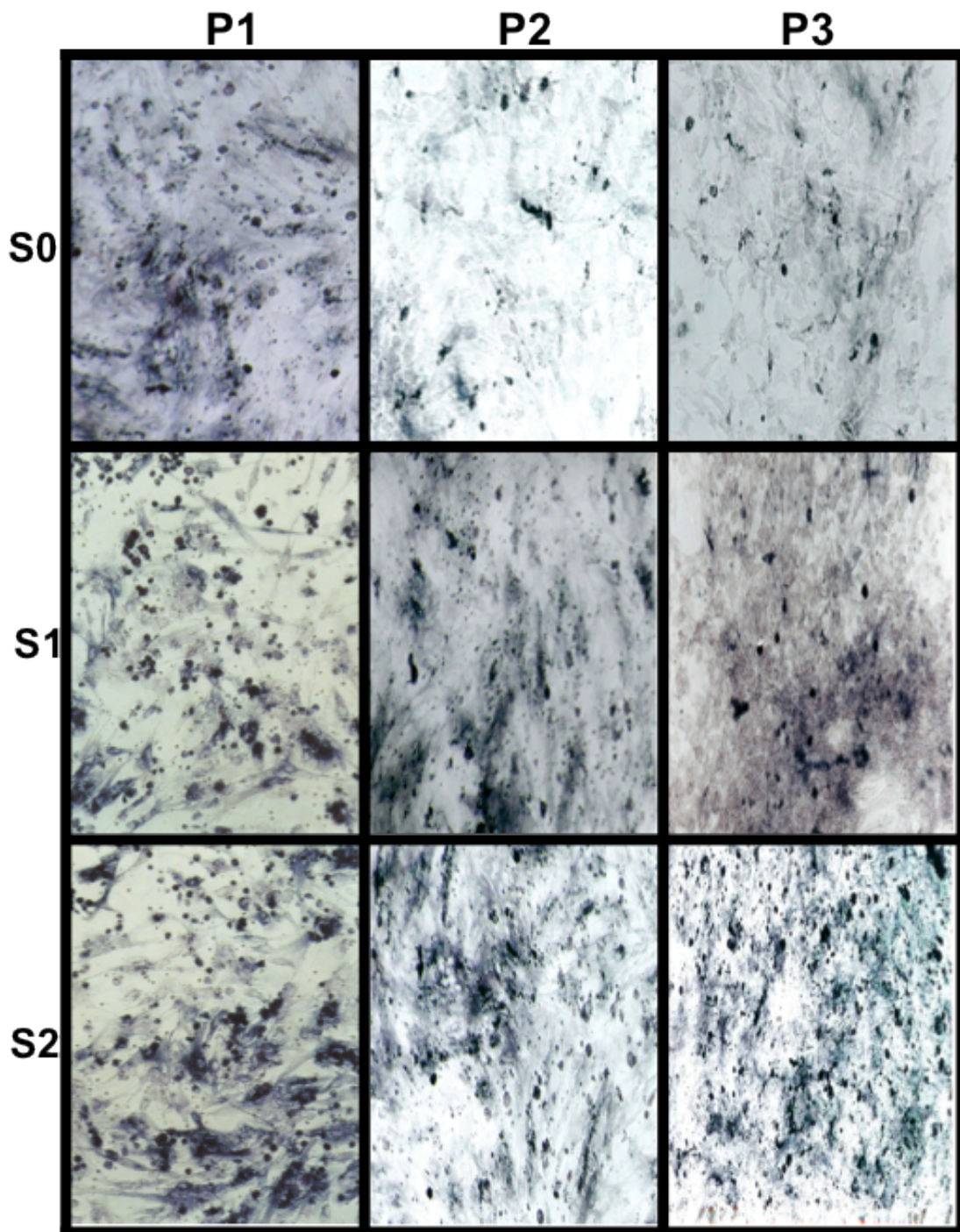


Figura 11 - Visualização dos precipitados púrpuras confirmando a metabolização do substrato NBT/BCIP catalisado pela enzima fosfatase Alcalina em todos os estágios de diferenciação analisados (S0, S1 e S2), dos três doadores (P1, P2 e P3). As imagens foram obtidas em microscópio óptico aumentado 100X.

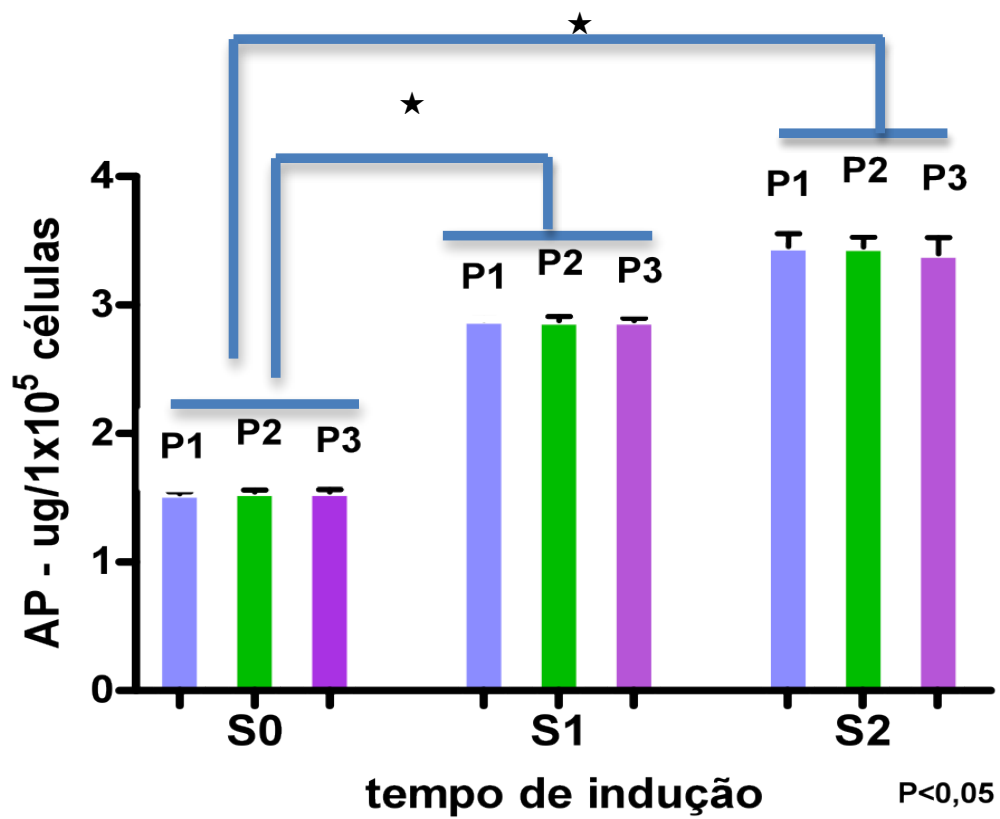


Figura 12 - Histograma representando a concentração relativa de fosfatase alcalina nos diferentes doadores (p1, p2 e p3) e nos diferentes estágios (S0, S1 e S2) determinada pela catálise do substrato NBT/BCIP em ensaio colorimétrico lido a 600nm.

4.5 - DETECÇÃO DO COLÁGENO TOTAL

A detecção do colágeno total foi realizada pelo método de coloração por sircol. O colágeno é um dos constituintes mais importantes da matriz extracelular do tecido ósseo secretados pelo osteoblasto em grande quantidade. Portanto, dentro da indução osteogênica, a crescente detecção do colágeno remete ao fenótipo dos osteoblastos. A Figura 13 permite observar pela coloração do método de sircol esse crescente aumento do colágeno nos estágios S0, S1 e S2, evidenciado pelo aumento da deposição dos precipitados vermelhos revelado no microscópio óptico. Os gráficos em barra apresentados na Figura 14 ressaltam o crescente aumento do colágeno verificado nas amostras individuais dos três doadores e da média em cada um dos estágios (S0, S1 e S2) analisados. Esse resultado confirma alterações metabólicas que fortemente sugerem uma alteração direcionada dessas células para células com características osteoblásticas.

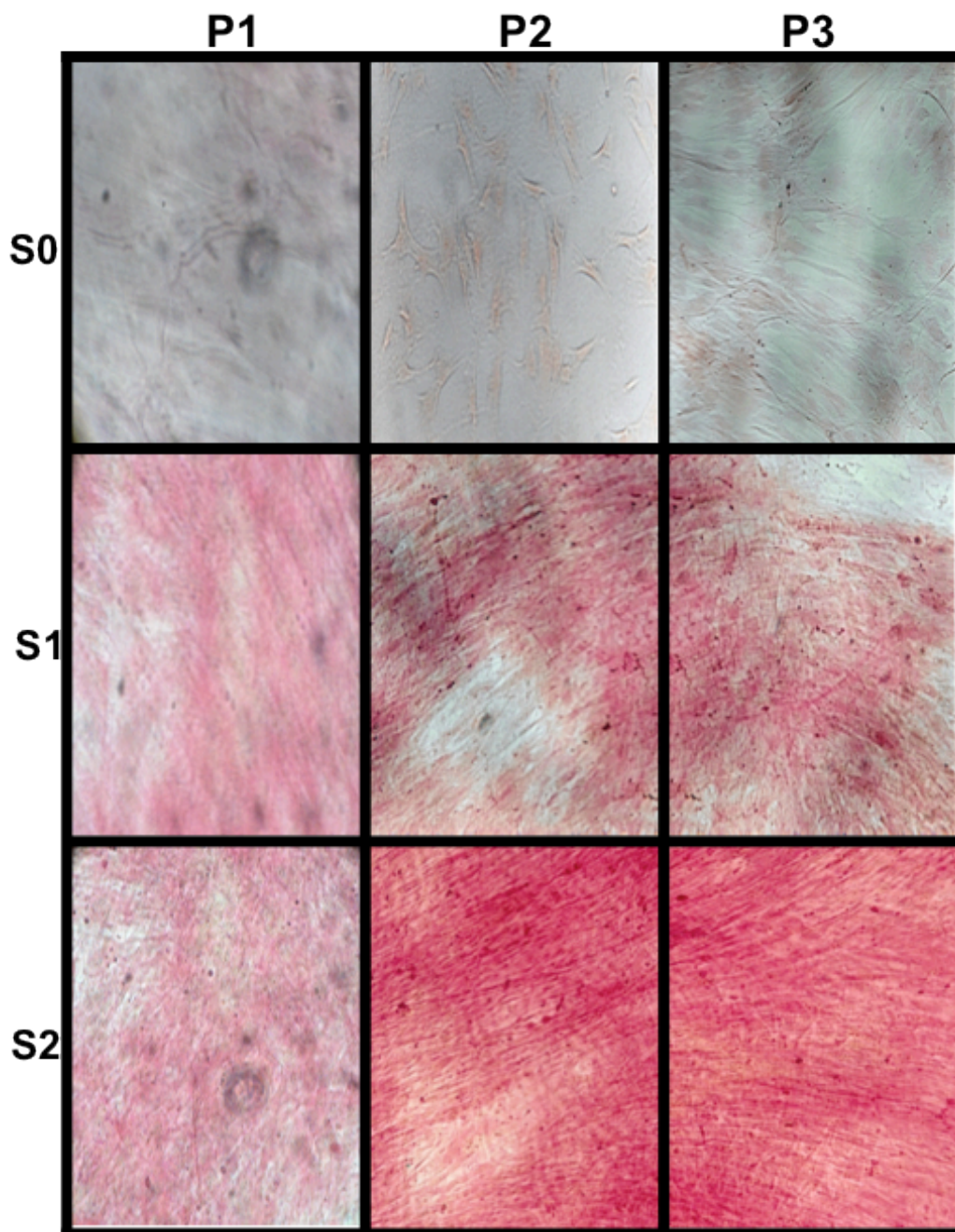


Figura 13. Detecção do colágeno total pelo método clorimétrico de sircol nos diferentes doadores (P1, P2 e P3) analisados nos diferentes tempos de indução osteogênica (S0, S1 e S2). A deposição de colágeno é representada pela coloração avermelhada observada no microscópio óptico no aumento 100X.

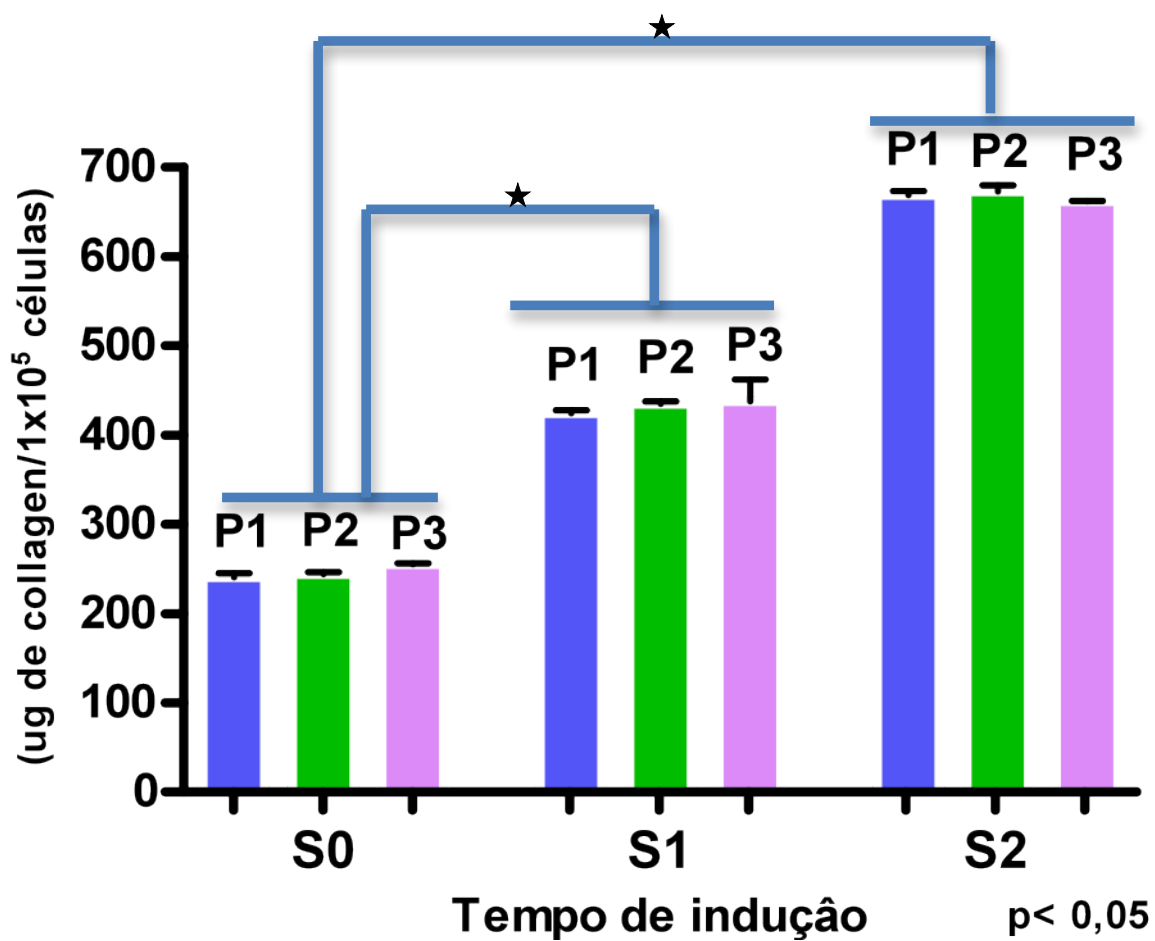


Figura 14 - Histograma representando a concentração relativa de colágeno nos diferentes doadores (p1, p2 e p3) e nos diferentes estágios (S0, S1 e S2) determinada pela incorporação do corante "syrius red" (alta afinidade pelo colágeno) em ensaio colorimétrico lido 660nm.

4.6 - FORMAÇÃO DOS NÓDULOS DE MINERALIZAÇÃO

O ensaio para detecção de cálcio evidenciando a mineralização é um indicativo real de formação de tecido ósseo. Os resultados qualitativos da documentação provenientes das imagens microscópicas sumarizados na Figura 15 demonstram o crescente aumento da mineralização, sendo que no estágio S0 não há formação das estruturas de mineralização. Já no estágio S1 identificam-se núcleos de mineralização e no estágio S2, mais avançado, apresentam-se os nódulos de mineralização. Os resultados corroboram o amadurecimento da matriz extracelular e, conseqüentemente, indicam a presença de células comprometidas com a formação do tecido ósseo.

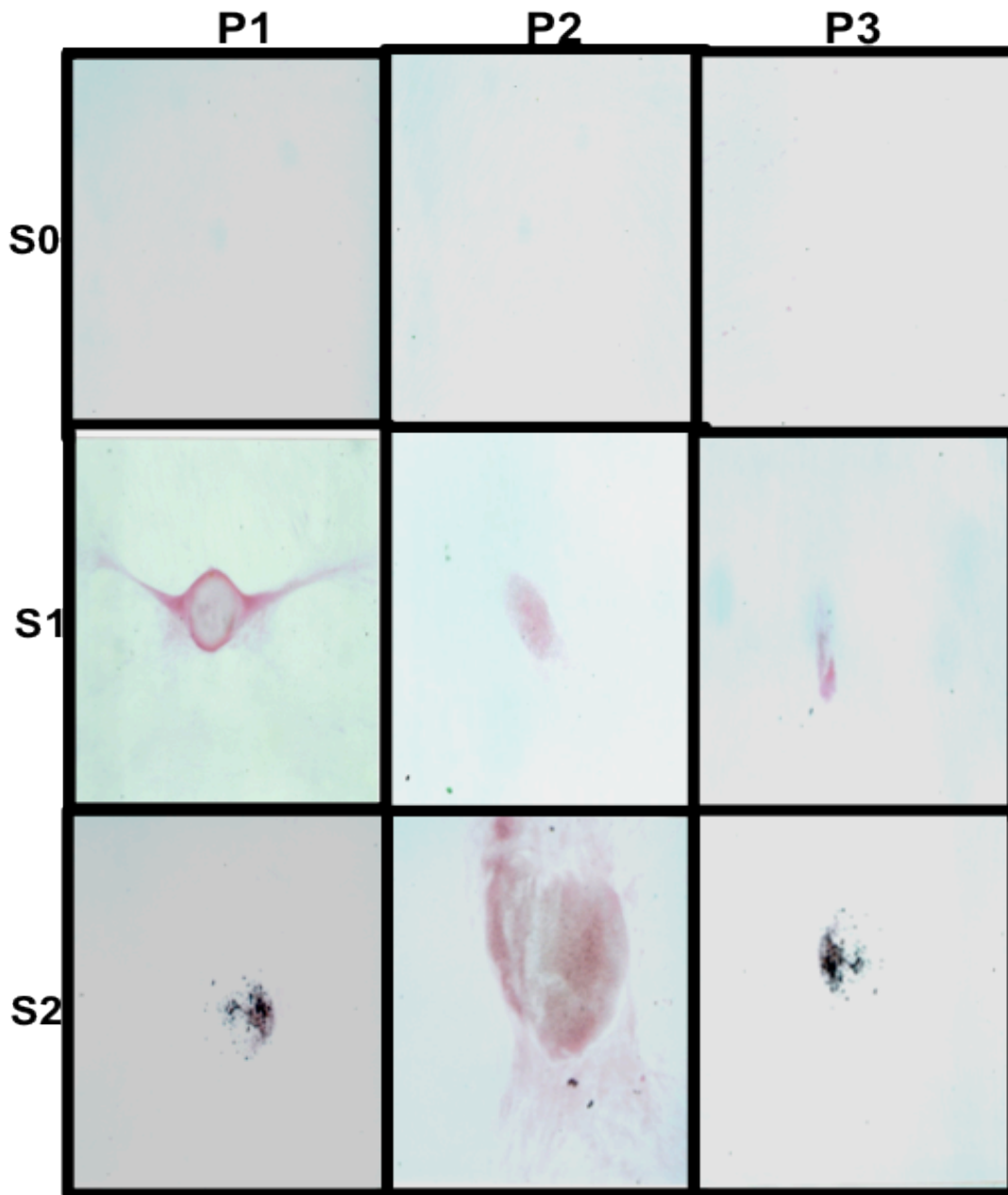


Figura 15 - Visualização do depósito de cálcio evidenciado em ensaio de mineralização nos diferentes doadores (P1, P2 e P3), analisados nos diferentes tempos de indução osteogênica (S0, S1 e S2). Os núcleos de mineralização podem ser observados como aglomerados de cálcio pouco adensados, de cor avermelhada. Os nódulos de mineralização são formações de deposição de cálcio mais denso, observados através de uma coloração mais escura. As imagens foram obtidas no microscópio óptico aumentado em 100X.

4.7 - EVIDENCIA DA MATURAÇÃO DAS FIBRAS DE COLÁGENO

O ensaio qualitativo de determinação da maturação da fibra de colágeno realizado nos estágios S0, S1 e S2 visualizado na Figura 16, demonstra uma crescente maturação das fibras do colágeno relacionada com o tempo de indução osteogênica. O estágio S0 não apresentou enovelamento e organização do colágeno, uma vez que nesse estágio as células não são osteogenicamente induzidas. Os estágios S1 e S2 apresentaram uma organização e um enovelamento maiores, sendo que no S2 o grau de organização e a estrutura das fibras referidas foram ainda mais expressivos, indicando maior comprometimento da matriz resultante de células que se configuram como osteoblastos.

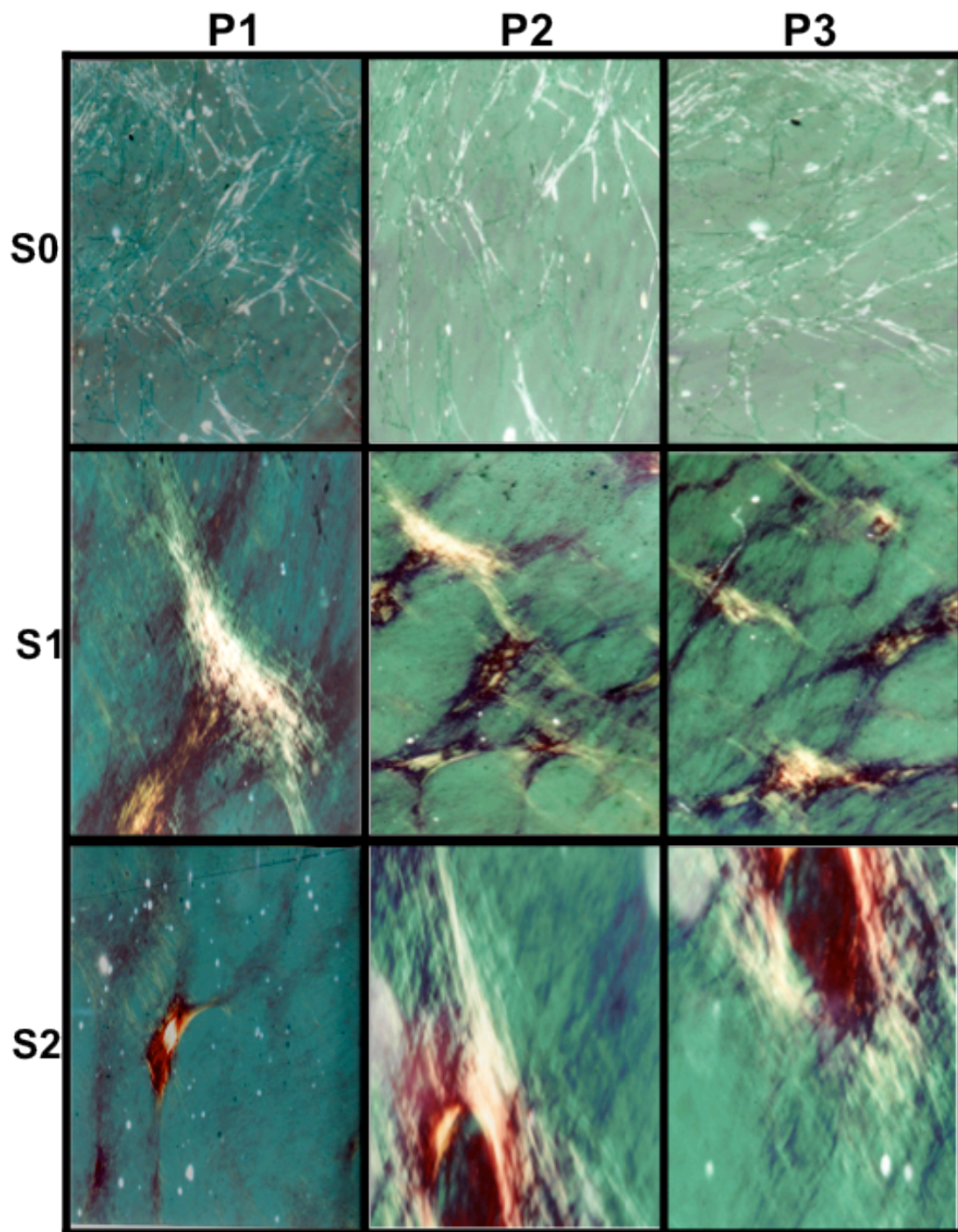


Figura 16 - Visualização do amadurecimento das fibras de colágeno observado ao microscópio óptico de luz polarizada e invertida nos diferentes doadores (P1, P2 e P3) analisados nos diferentes tempos de indução osteogênica (S0, S1 e S2). O adensamento das fibras pode ser identificado pela coloração avermelhada mostrando orientação e condensação retendo a luz polarizada do microscópio e evidenciando o amadurecimento da matriz extracelular. As imagens foram obtidas ao microscópio óptico no aumento de 50X.

4.8 - Análise da expressão gênica direcionada para osteoblastos

O cDNA sintetizado proveniente das amostras do indivíduos nos estágios S0, S1 e S2 foi utilizado na reação de amplificação das sequências nucleotídicas do colágeno tipo 1 (Col1), *bone morpho protein 4* (BMP 4), *Mineralization protein 1* (Lamp 1) e Osteocalcina (Oc) foi usado como controle positivo da gliceraldeído 3-fosfato hidrogenase (GAPDH). O resultado da análise da expressão gênica por PCR das seqüências nucleotídicas selecionadas, evidenciou, no estágio S0, ausência da amplificação dos transcritos para Col1, BMP4, Lamp1 e Oc e amplificação positiva para GAPDH (Figura 17). Nos estágios S1 e S2, a amplificação para todas as sequências nucleotídicas selecionadas foi positiva (Figura 18), indicando o diferenciação celular de células-tronco para osteoblastos alterações gênicas para o genótipo de células osteoblásticas.

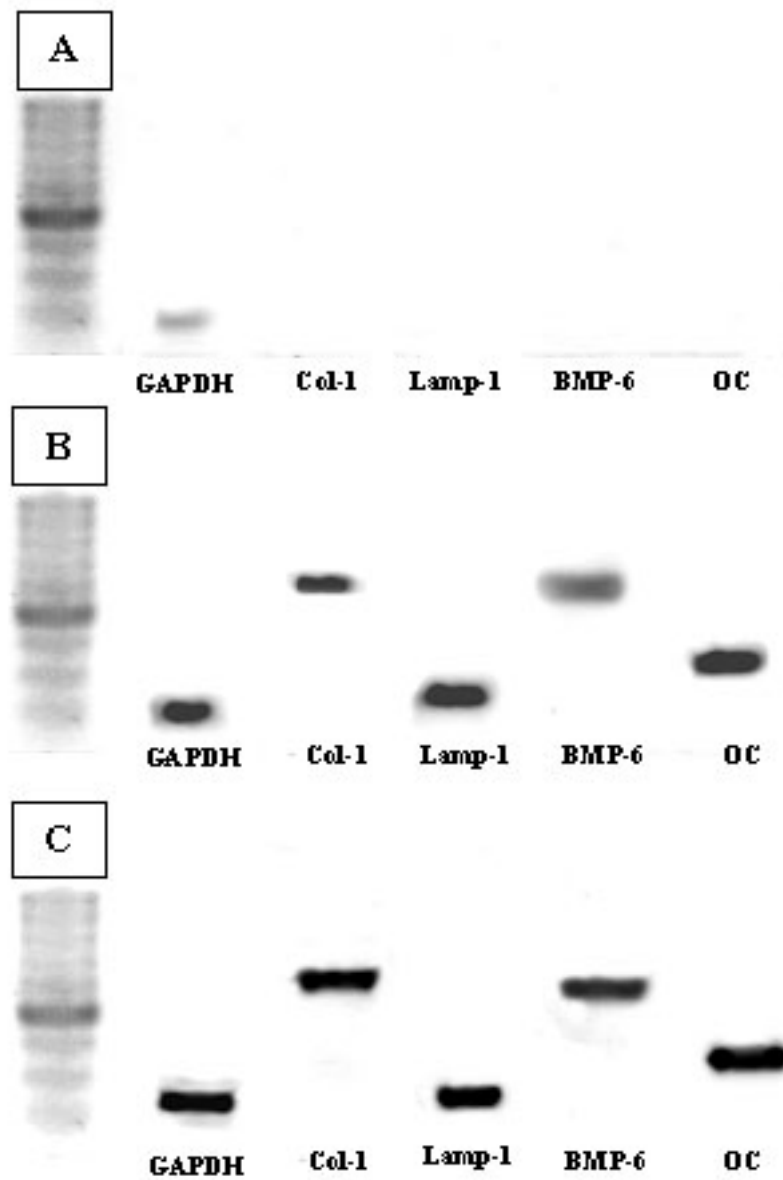


Figura 17 - Gel de agarose (2%) representando a amplificação das sequências gênicas no ensaio de PCR a partir do cDNA dos doadores (P1, P2 e P3), analisados nos estágios de diferenciação osteogênica (S0, S1 e S2). (A) estágio S0, (B) estágio S1 e (C) estágio S2.

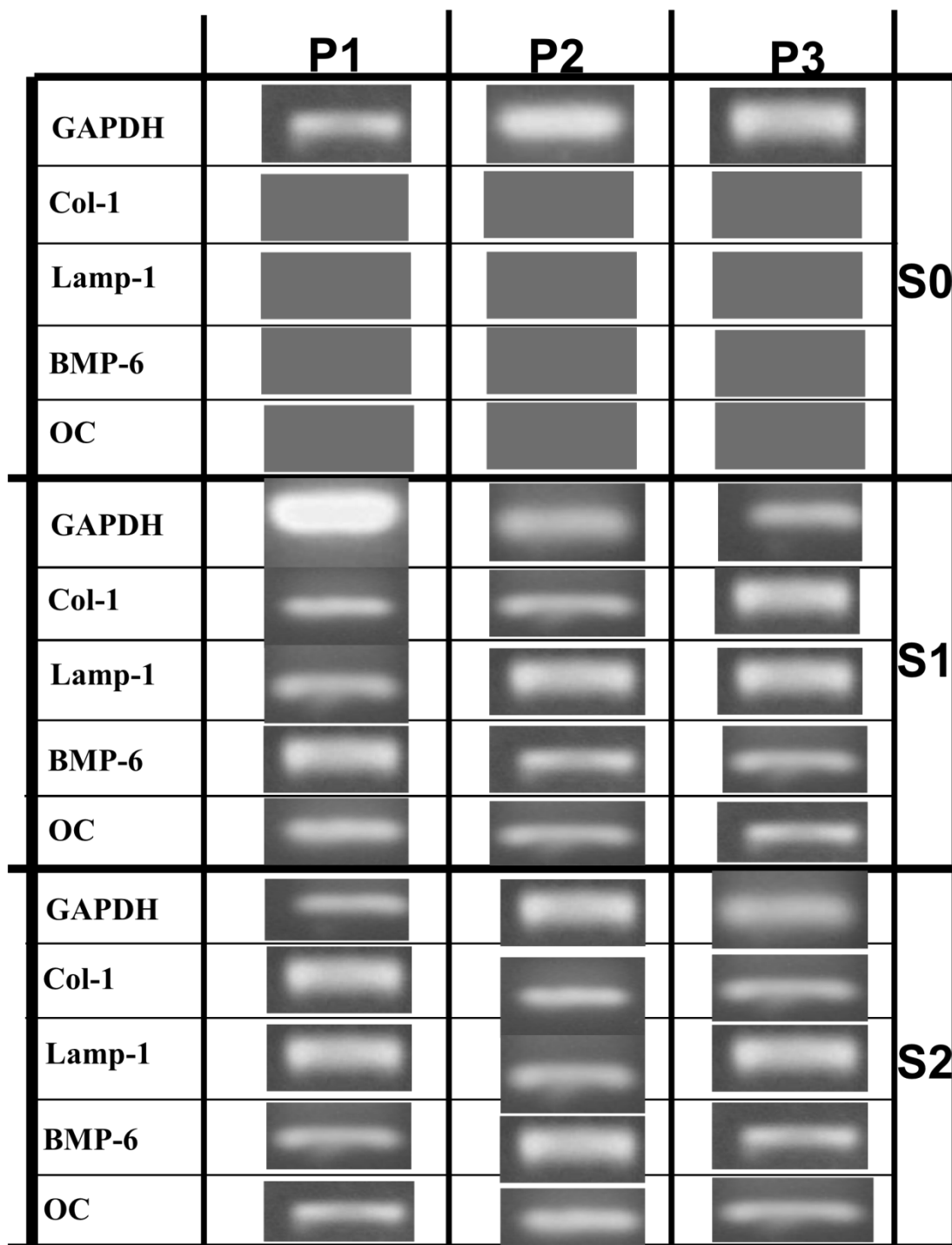


Figura 18 - Representação do agrupamento dos resultados da amplificação dos genes relacionados à diferenciação osteoblástica dos diferentes pacientes (P1, P2 e P3) nos diferentes estágios analisados (S0, S1 e S2).

4.9 - ELETROFORESE DIFERENCIAL BIDIMENSIONAL (2-D DIGE)

A análise proteômica dos estágios S0, S1 e S2, abordada pela eletroforese bidimensional diferencial (DIGE), visando encontrar alterações protéicas factíveis de serem utilizadas como parâmetros para definir fases de alterações moleculares e aumentando as informações sobre a indução “in vitro” da osteogênese a partir das hADAS, apontou alterações passíveis de investigações. A análise estatística das imagens dos géis referentes às condições agrupadas nas classes S0, S1 e S2 das amostras dos três indivíduos participantes revelou um elevado grau de similaridade do conteúdo protéico dentro da mesma classe (Figuras 19 e 20). Entretanto, diversas alterações nos aspectos qualitativos e quantitativos foram observadas. Foi dada maior atenção às proteínas que se mostraram superexpressas, sendo estas analisadas em pelo menos um dos estágios estabelecidos. Portanto, foram selecionados 51 “spots”, representando proteínas superexpressas, pertencentes aos três estágios definidos (S0, S1 e S2). Foram selecionados 16 “spots em S0 em relação a S2. Em S2 foram 28 em relação a S0 e S1 apresentou 7 quando comparado com ambos os estágios S0 e S2, totalizando as 51 proteínas identificados (Figura 21).

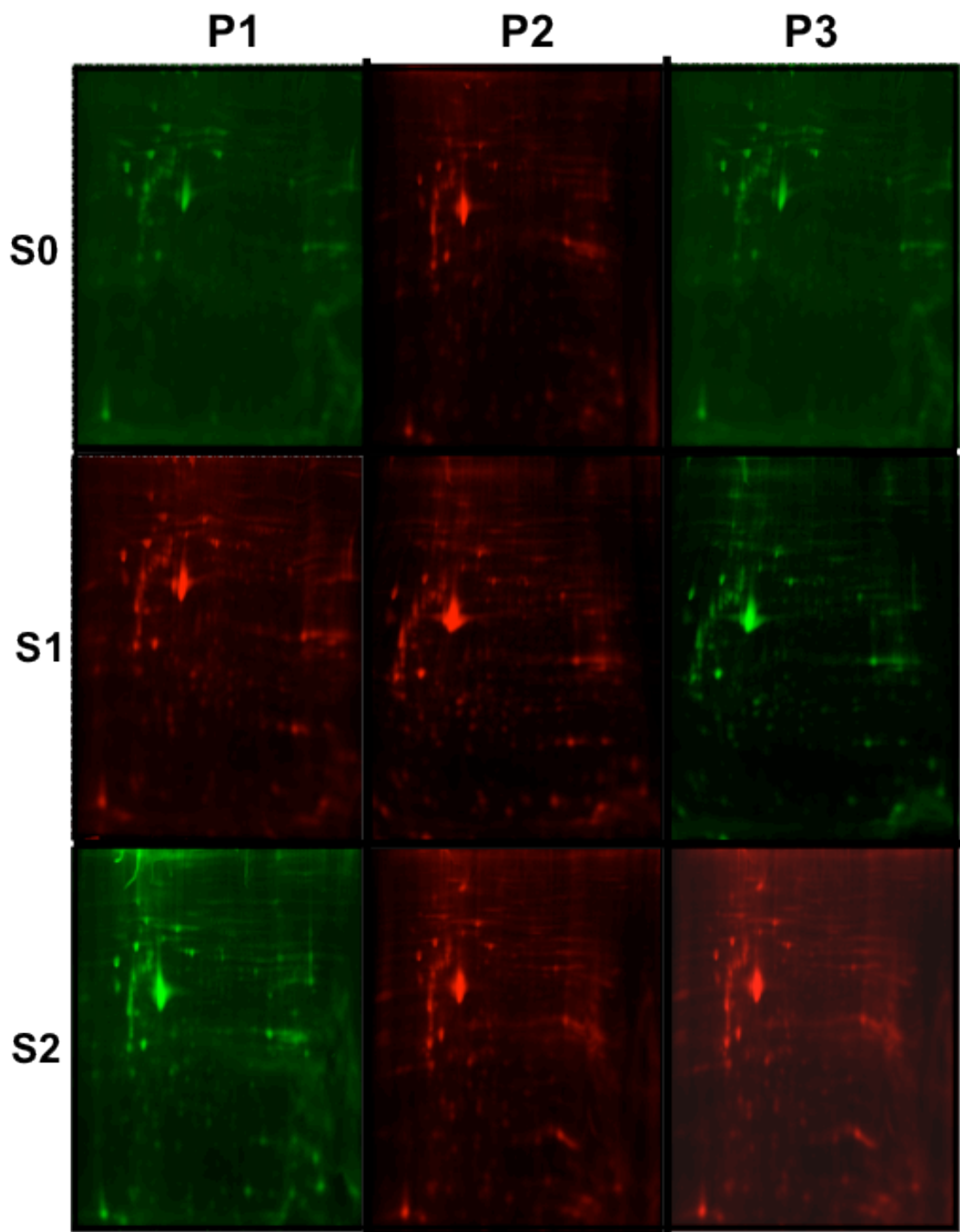


Figura 19 - Imagens dos géis DIGE (florescentes) de amostras provenientes dos diferentes doadores (P1, P2 e P3) analisadas nos diferentes estágios de diferenciação (S0, S1 e S2).

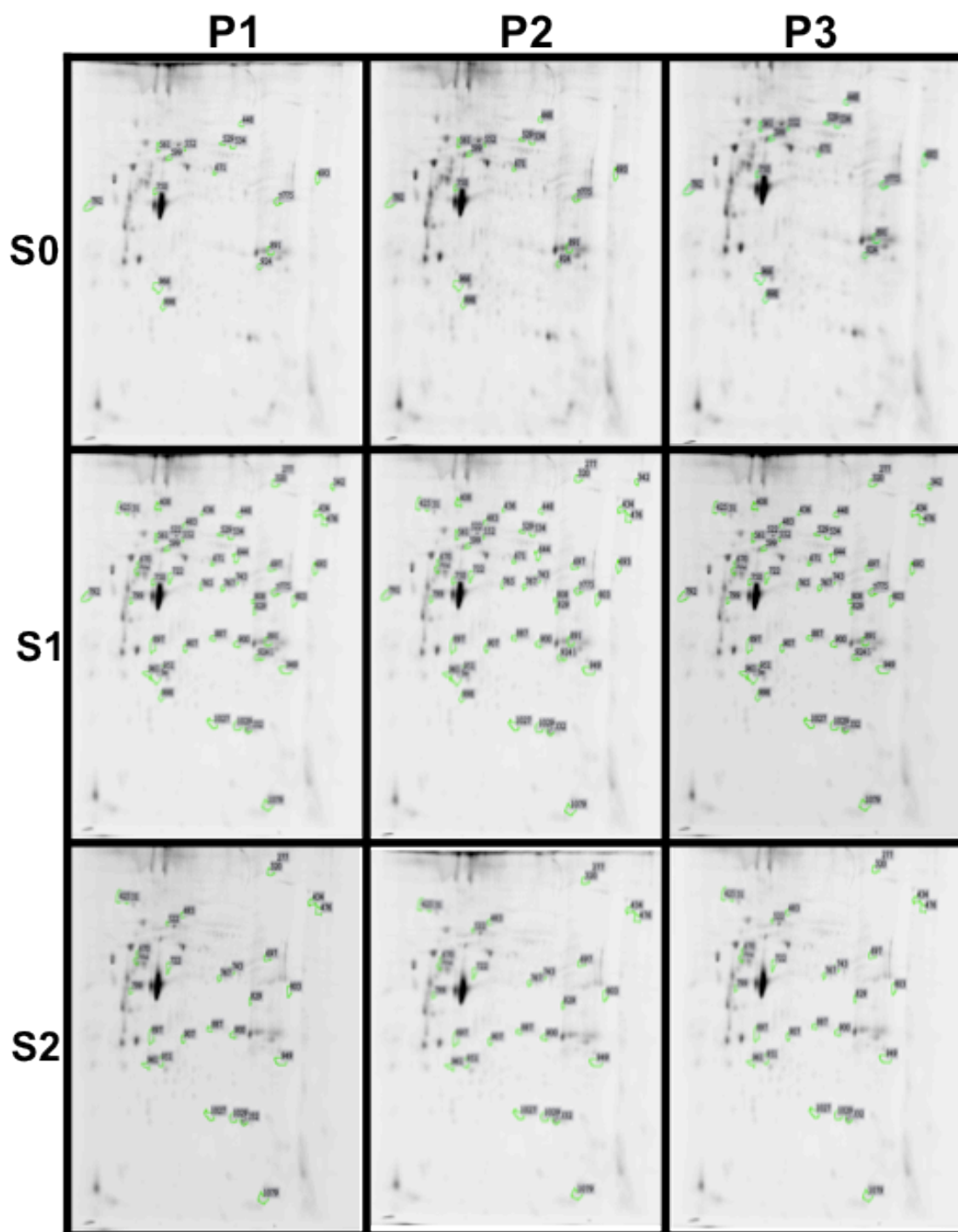


Figura 20 - Imagens dos géis de amostras provenientes dos diferentes doadores (P1, P2 e P3) analisadas nos estágios de diferenciação estabelecidos (S0, S1 e S2). Em destaque, na coloração verde, os spots selecionados estatisticamente (teste T – $p < 0,05$) para serem analisados.

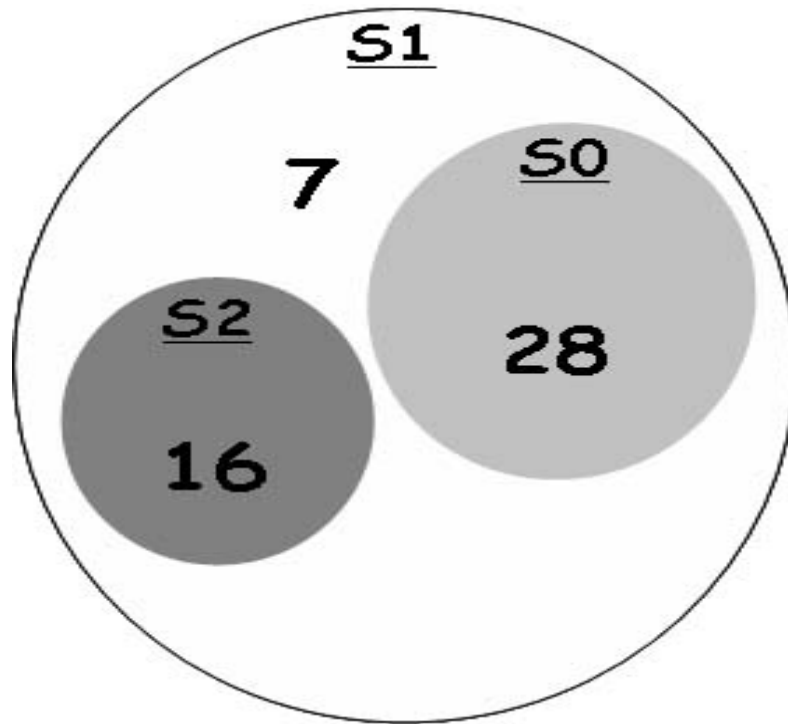


Figura 21. Diagrama de Venn. Sumário dos resultados obtidos pela análise dos spots super expressos a partir da análise entre os estágios de diferenciação osteogênica (S0, S1 e S2).

4.10 - IDENTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS POR ESPECTROMETRIA DE MASSA BUSCA NO BANCO DE DADOS RNCBI, HUMANO

A identificação das amostras provenientes da clivagem tríplica, extraídas dos spots dos géis dos diferentes pacientes dentro dos mesmos estágios S0, S1 e S2, foram realizadas por MS/MS em espectrômetro de massa MALDI–TOF-TOF Autoflex III™ (Bruker Daltonics, Billerica, USA). O resultado do método MS/MS foi direcionado para procura no Banco de Dados de Humanos do NCBI através do programa MASCOT®, à partir do qual foram identificadas 51 proteínas superexpressas, comparadas entre os diferentes estágios analisados S0, S1 e S2 (Tabela 3).

Tabela 3 – Proteínas identificadas durante o processo osteogênico a partir das hADAS

Spot ID ^A	Estágios ^B		MS/MS – proteínas ^C	Peptídeos	Função molecular
342		S1	Fibulin-1	EFTRPEEIIFLR LEMNYVVGGVVSHR	Proteína constitutiva de matriz extra-celular / proteína ligadora
408		S1	unnamed protein product	LASDLLEWIR TFTAWCNSHLR GYEEWLLNEIR	ND ^d
436		S1	Filamin-A	WGDEHIPGSPYR THEAEIVEGENHTYCIR	Filamento ligador de actina / atividade de transdução de sinal
644		S1	Amiloride-sensitive cation channel 1, neuronal	VGIVAWHPTAR VTWSSFCVAVNPR	Canal iônico / Canal de sódio
765		S1	Septin-2	TIISYIDEQFER LTVVDTPGYGDAINCR STLINSFLFLDLYPER	Proteína ligadora do fator de transcrição
808		S1	Annexin A2	SLYYYIQQDTK SYSPYDMLESIR AEDGSVIDYELIDQDAR	Atividade inibitória de fosfatase
925		S1	Annexin A1	TPAQFDADELK SEDFGVNEDLADSDAR	Atividade inibitória de fosfatase
446	S0	S1	Corticotropin-lipotropin	RPVKVYPNGAEDESAAEAFPLEF	Endorfina / Hormônio
529	S0	S1	Laminin subunit alpha-2	NIYSEELR TLEGELHDLR LALDMEIHAYR	Atividade molecular estrutural
534	S0	S1	Laminin subunit alpha-2	LADALQELR TLEGELHDLR	Atividade molecular estrutural
552	S0	S1	Plastin-3	IGLFADIELSR ANDDIIVNWWNR	Proteína ligadora do fator de transcrição
561	S0	S1	Heat shock 70kDa protein 8 isoform 1 variant	TVTNAVVTVPAYFNDSQR FEELNADLFR	Proteína ligadora de ATP
599	S0	S1	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	NLPLPPPPPPR	Ribonucleoproteína
671	S0	S1	Aldehyde dehydrogenase	EEIFGPVQPLFK TIPMDGQHFCTR TFVEESIYNEFLER GFFIKPTVFGGVQDDMR TFPTVNPTTGEVIGHVAEGDR	Oxidoreductase
693	S0	S1	CREB-regulated transcription coactivator 2	EQFLDGDGWTSR IKDPDASKPEDWDER	Ativador
750	S0	S1	Gamma-actin	QEYDESGPSIVHR SYELPDGQVITIGNER	Atividade molecular estrutural
775	S0	S1	Isocitrate dehydrogenase [NADP], mitochondrial	YFDLGLPNR	Oxidoreductase
781	S0	S1	Phosphoglycerate kinase 1	LGDVYVNDAFGTAHR ACANPAAGSVILLENLR QIVWNGPVGVFWEAFAR	Cinase/Transferase

Tabela 3 – continuação

Spot ID	Estágio			MS/MS proteínas	Peptídeos	Função molecular
792	S0	S1		Beta Actin	GYSFTTTAER AVFPSIVGRPR IWHHTFYNELR VAPEEHPVLLTEAPLNPK	Atividade molecular estrutural
891	S0	S1		Annexin A2	QDIAFAYQR SYSPYDMLIESIR SYSPYDMLIESIR GVDEVTIVNLTNR	Atividade inibitória de fosfatase
924	S0	S1		Guanine nucleotide-binding protein G(q) subunit alpha	DETNYGIPQR LWDLTTGTTTR DVLSVAFSSDNR YWLCAATGPSIK YTVQDESHSEWVSCVR HLYTLGGDIINALCFSPNR	Trasdução de sinal
966	S0	S1		Nicotinamide N-methyltransferase	DTYLSHFNPR	Metiltransferase/Transferase
998	S0	S1		Glutathione S-transferase P	PPYTVVYFPVR FQDGDLTLYQSNTILR	Proteína ligadora do fator de transcrição
277		S1	S2	Peptidyl-prolyl cis-trans Isomerase A	MVNPTVFFDIAVDGEPLGR	Isomerase/Rotamase
320		S1	S2	Thrombospondin-1	FVFGTTPEDILR	Atividade inibitória de endopeptidase / Adesão celular
425		S1	S2	Endoplasmin	FAFQAEVNR SILFVPTSAPR	Chaperona
431		S1	S2	fibulin-1 isoform D precursor	CLAFECPENYR EFTRPEEIIFLR	Proteína constitutiva de matriz extra-celular
434		S1	S2	unnamed protein product	SILFVPTSAPR FQSSHPTDITSLDQYVER	ND ^d
476		S1	S2	Alpha-centractin	AQYYLPDGSTIEIGPSR	Atividade molecular estrutural
483		S1	S2	Filamin-A	YGGPYHIGGSPFK AEAGVPAEFSIWTR YNEQHVPGPSFTAR THEAEIVEGENHTYCIR FNEEHIPDSPFVVPVAVSPGDAR	filamento ligador de actina / atividade de transdução de sinal
522		S1	S2	Annexin A1	TPAQFDADEL GTDVNVFNTILTTR GLGTDEDTLIEILASR SEDFGVNEDLADSDAR GGPGSAVSPYPTFNPSDVAAALHK IGLFADIELSR ANDDIIVNWVNR	Atividade inibitória de fosfolipase
670		S1	S2	Cytochrome P450	FPGQLNADLR GHYTEGAELVDSVLDVVR	Monoxigenase / Oxireductase
697		S1	S2	CREB-regulated transcription coactivator 2	EQFLDGDGWTSR	inibidor de alfa-amilase

Tabela 3 – continuação

Spot ID	Estágio		MS/MS proteínas	Peptídeos	Função molecular
702	S1	S2	Tubulin beta-2C chain	ISEQFTAMFR ISVYYNEATGGK GHYTEGAELVDSVLDVVR	Proteína ligadora de MHC de classe I / proteína ligadora
722	S1	S2	Cytochrome b-c1 complex subunit 1, mitochondrial	SGMFWLR RIPLAEWESR YIYDQCPAVAGYGPPIQLPDYNR	Proteína ligadora / Atividade ubiquinol-citocromo C redutase
743	S1	S2	Enolase	AAVPSGASTGIYEALER	Lise / Repressor
767	S1	S2	Ornithine aminotransferase, mitochondrial	GIYLWDVEGR YGAHNYHPLPVALER HQVLFIADEIQTGLAR	Transferase/aminotrasferase
799	S1	S2	Vimentin	ISLPLPNFSSLNLR EMEENFAVEAANYQDTIGR	Constituinte estrutural de citoesqueleto
803	S1	S2	Aspartate aminotransferase, mitochondrial	IAAAILNTPDLR FVTVQTISGTGALR	Atividade de aspartato transaminase
829	S1	S2	Annexin A2	GVDEVTIVNILTNR	Atividade inibitória de fosfolipase
887	S1	S2	Annexin A1	TPAQFDADELRL GTDVNVFNTILTTR GLGTDEDTLIEILASR SEDFGVNEDLADSDAR GGPGSAVSPYPTFNPSSDVAALHK	Atividade inibitória de fosfolipase
897	S1	S2	Alpha-soluble NSF attachment protein	IEEACEIYAR	Proteína ligadora do fator de transcrição
900	S1	S2	Annexin A2	SYSPYDMLESIRK GLGTDEDSLIEICSR AEDGSVIDYELIDQDAR	Atividade inibitória de fosfolipase
907	S1	S2	Cathepsin D	FDGILGMAYPR LVDQNIYSFYLSR	Aspartyl protease/ Hidrolase/Protease
949	S1	S2	Voltage-dependent anion-selective channel protein 1	WTEYGLTFTEK KLETAVNLAWTAGNSNTR EHINLGCMDMDFDIAGPSIR	Porina
951	S1	S2	Nicotinamide N-methyltransferase	FSSLPLGR DTYLSHFNPR EPEAFDWSPVVTYVCDLEGNR	Metiltransferase/Transferase
961	S1	S2	Heat shock protein beta-1 (HSP 27)	DWYPHSR QDEHGYISR	Interação seletiva não covalente com proteínas idênticas
1027	S1	S2	Superoxide dismutase [Mn]	AIWNVINWENVTER GELLEAIKR NVRPDYLK	Oxidoreductase
1029	S1	S2	Vimentin	ISLPLPNFSSLNLR	Constituinte estrutural de citoesqueleto
1032	S1	S2	Superoxide dismutase [Mn]	LTAASVGVQGGSGWGLGFNK	Oxidoreductase
1079	S1	S2	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	FEDENFILK IIPGFMCGGDFTR VNPTVFFDIAVDGEPLGR	Isomerase/Rotamase

^A Spot ID – localização dos spots no gel. ^B S0: célula-tronco sem estímulo; S1: com duas semanas de estimulação osteogênica e S2: com quatro semanas de estimulação osteogênica; ^C MS/MS proteína – identificação de proteínas por MS/MS ^d; ND: Não determinada

4.11 – CATEGORIA FUNCIONAL DAS PROTEÍNAS IDENTIFICADAS

A catalogação das proteínas identificadas dos estágios S0, S1 e S2 agrupadas por sua categoria funcional pode evidenciar que entre as proteínas super expressas do estágio S0 em comparação com S1 e S2 nota-se uma tendência a proteínas relacionadas com Biogênese de constituintes celulares e transcrição. As proteínas super expressas nos estágios S1 e S2 revelam uma tendência no aumento da interação celular com o ambiente, defesa celular, destinação das proteínas e síntese protéica. A tabela 4 sumariza as tendências do agrupamento funcional das proteínas super expressas presentes em cada estágio.

Tabela 4 – Agrupamento funcional das proteínas dos estágios S0,S1 e S2

Categoria funcional	S0	S1	S2
Metabolismo	25%	21,56%	25%
Defesa celular	0%	1,96%	3,57%
Biogêneses de constituintes celulares	6,25%	1,96%	0%
Interação celular com o ambiente	25%	29,41%	28,57%
Síntese protéica	0%	7,84%	14,28%
Transcrição	6,25%	3,92%	3,57%
Comunicação celular	25%	23,52%	17,85%
Destinação das proteínas	0%	1,96%	3,57%
Desconhecidas	6,25%	5,88%	3,57%

5 - DISCUSSÃO

Vislumbrando-se a perspectiva de utilizar células-tronco isoladas do tecido adiposo (hADAS) como substrato terapêutico no campo da medicina regenerativa, grande interesse vem sendo direcionado para pesquisas com esse modelo (van Dijk *et al.*, 2008; Zuk *et al.*, 2002).

Similar a medula óssea, o tecido adiposo também é derivado do mesoderma, que contém uma população estromal de células microvasculares endoteliais, células de músculo liso e células-tronco mesenquimais (Frayn *et al.*, 2003; Hollenberg, 1990; Markman, 1989). As células-tronco encontradas em ambos os tecidos compartilham características comuns entre si. Destacam-se as atividades proliferativas elevadas e o potencial de diferenciação em multilinhagens (Granero-Molto *et al.*, 2009; Puetzer *et al.*, 2010).

Entretanto, as hADAS se apresentam muito mais abundantes, mais homogêneas e são mais facilmente obtidas (Peng *et al.*, 2008; Peroni *et al.*, 2008). Diante desse conjunto de informações, somando-se às suas propriedades imunorreguladoras, a população de células-tronco isolada de tecido adiposo vem atraindo interesse e surge como uma das melhores possibilidades podendo substituir as células-tronco de medula óssea nas terapias baseadas nas engenharias de tecido e na medicina regenerativa (Yanez *et al.*, 2006).

Em comparação com as células-tronco de medula óssea, as hADAS ainda são pouco estudadas e importantes espaços devem ser

preenchidos para que elas possam ser utilizadas em transplantes celulares (Locke *et al.*, 2009).

Ainda com relação aos parâmetros terapêuticos, é necessário o estabelecimento de procedimentos padrões e rotineiros para o uso hADAS com segurança. As etapas iniciais de caracterização devem ser exaustivamente estudadas, procurando definir e identificar as populações de hADAS, além de buscar parâmetros para identificar se, na indução para um tipo específico celular, o resultado foi satisfatório (Sterodimas *et al.*, 2009).

Entre os diversos problemas que envolvem o tecido ósseo e a possibilidade de contribuir ofertando alternativas de forma a dar suporte para o uso terapêutico das hADAS nos modelos de diferenciação osteogênica *in vitro*, o presente estudo focou-se nos marcadores moleculares que fazem parte da osteogênese induzida *in vitro* para fornecer subsídios moleculares que ampliem o conhecimento básico a respeito do processo osteogênico e que possam, ainda, assegurar a utilização dessas células na clínica médica.

No processo de diferenciação osteogênica, as hADAS de três doadores foram cultivadas e analisadas em três estágios distintos: o primeiro estágio compreende as células-tronco cultivadas em meio basal e, portanto, sem indução à diferenciação (S0); o segundo estágio compreende células-tronco induzidas à osteogênese por 14 dias (S1) e o terceiro é composto por células-tronco induzidas à osteogênese por 28 dias. Em todos os estágios analisados as células dos três pacientes apresentavam-se com o mesmo tempo total de 8 semanas de cultivo.

A análise fenotípica por citometria de fluxo usando-se dos marcadores para células tronco mesenquimais CD29, CD44 (Zuk, 2001) e CD49d (Yoshimura *et al.*, 2006), além dos marcadores para células-tronco hematopoiéticas CD34 e CD106 (Ju *et al.*, 2005; Zhu *et al.*, 2010), foi realizada nas células obtidas dos três doadores no estágio S0 (sem indução osteogênica). Os resultados em todas as amostras indicaram uma população bastante homogênea, confirmada pela marcação dos biomarcadores de células-tronco mesenquimais CD29, CD44 e CD49d. Corroborando, dessa maneira, com os resultados demonstrados por outros autores para o fenótipo dessas células (Yoshimura *et al.*, 2006; Zuk, 2001).

O ensaio enzimático da metabolização do MTT, realizado com o propósito de evidenciar a viabilidade celular por meio da atividade enzimática nas amostras dos três doadores nos três estágios S0, S1 e S2, apresentou resultado positivo quanto à viabilidade celular. Comprovado a viabilidade dessas células de forma qualitativa, pela visualização dos cristais de formazan nos estágios S0, S1 e S2. Apesar do ensaio de MTT oferecer resultados quantitativos (Mosmann, 1983), no desenho experimental proposto neste estudo, eles seriam pouco confiáveis, uma vez que estaríamos comparando células com atividades metabólicas distintas, podendo ambas serem perfeitamente viáveis. Entretanto, poderia haver uma diferença quanto à quantidade de MTT metabolizado, sugerindo, de forma errônea, uma menor viabilidade de determinada condição.

O ensaio enzimático de detecção da fosfatase alcalina (AP) (Meltzer *et al.*, 1997) pode ser considerado um experimento bastante conclusivo, no que diz a respeito à diferenciação osteogênica (Im *et al.*, 2005). Embora células-tronco possuam a característica de apresentarem a atividade de fosfatase alcalina aumentada, é nos osteoblastos que se pode detectar uma elevada atividade dessa enzima (Roser *et al.*, 2000). Os resultados qualitativos dos ensaios de AP não conseguem destacar com clareza a diferença da atividade de enzima comparando-a visualmente nos estágios. Porém, a comparação dos resultados quantitativos entre os estágios S0, S1 e S2 possibilita expor com precisão o crescente aumento da atividade de AP relacionado com maior tempo de indução osteogênica. Esse resultado corrobora com as alterações, já observadas, de âmbito metabólico que também foram evidenciadas cientificamente e que relacionam-se com o perfil de células osteoblásticas (Im *et al.*, 2005; Jaiswal *et al.*, 1997).

Outra importante característica do perfil das células osteoblásticas é a produção exacerbada de colágeno, que é secretado para formação e manutenção da matriz extracelular do tecido ósseo (Toledo *et al.*, 2010). O resultado da detecção de colágeno pela coloração de sircol apresentou dados qualitativos e quantitativos que vão de encontro com os relatos bibliográficos que enfatizam sua elevada produção nas células ósseas juvenis (Valerio *et al.*, 2005). Os resultados comprovam um aumento gradual e elevado entre os estágios S1 e S2, quando comparados com o estágio S0. Este aumento pode ser observado, também, pelo aumento qualitativo da deposição dos precipitados vermelhos - associação do

corante ao colágeno - nos tempos S1 e S2, o que confirma os resultados anteriores relatados por (Zhu *et al.*, 2009). Tais alterações sugerem a diferenciação osteoblástica.

O tecido ósseo apresenta uma importante característica no que diz respeito ao acúmulo, manutenção e reposição de íons como cálcio e fosfato. Para a ossificação é necessária a calcificação da matriz extracelular processo conhecido como mineralização (Shaw, 1989). Em função dessa característica de reter o cálcio no tecido ósseo, a detecção deste mineral, o cálcio, é um referencial importante do processo de maturação de matriz extracelular e avanço do processo osteogênico, sendo utilizado como um ensaio seguro para evidenciar a maturação do processo de ossificação. No presente trabalho relata-se a mineralização da matriz óssea no decorrer da osteogênese sendo bem evidenciado o nódulo de mineralização no estágio S2.

Ainda com relação à caracterização morfológica da diferenciação osteogênica, foi observado, em microscópio de luz polarizada, a organização e estrutura das fibras de colágeno presentes nos estágios S0, S1 e S2. As imagens obtidas indicam maior condensação e organização das fibras de colágeno nos estágios S1 e S2, sendo que, em S2, as fibras estão densamente agrupadas. Tais características podem ser consideradas como critério de maturação desse colágeno e da organização da matriz extra-celular. Nossos resultados corroboram os observados anteriormente por (Pallotta *et al.*, 2009). A análise da expressão gênica por rtPCR com base nos iniciadores, relacionados com os genes ativos em osteoblastos, *Col1*, *BMP6*, *Lamp1* e *OC*, apontou

mudanças genéticas no perfil das células induzidas por meio osteoblástico, após 14 (S1) e 28 dias (S2). Entretanto, o estágio S0 manteve-se negativo para esses iniciadores. Os resultados obtidos em S0, S1 e S2 assemelham-se ao perfil encontrado para células-tronco em diferenciação já descritos por (Zhou *et al.*, 2006), ressaltando que a indução osteogênica *in vitro* indica comprometimento para linhagem osteoblástica.

Contudo, as informações obtidas quanto aos aspectos morfológicos e metabólicos, observados em ensaios enzimáticos, não oferecem precisão temporal e escala real de diferenciação. Apesar disso, o uso da eletroforese 2D DIGE, com a finalidade de agrupar e comparar as diferentes amostras dos doadores, nos diferentes estágios no decorrer do processo osteogênico induzido *in vitro* e em escala temporal real, poderia revelar alterações moleculares importantes para acompanhar a osteogênese. Essa abordagem de análise proteômica, que visa caracterizar diferentes processos celulares induzidos “*in vitro*”, tem sido utilizada apresentando resultados consistentes e discriminativos como os observados por alguns autores (Evans *et al.*, 2004; Fathi *et al.*, 2009; Wagner *et al.*, 2006). Em nosso estudo, vale ressaltar que os agrupamentos em classes das diferentes amostras representantes dos mesmos estágios – doadores dentro de um determinado estágio - revelaram um elevado grau de similaridade do perfil proteômico (> 80%), observado pelas análises das imagens nos géis 2D DIGE. Este quadro conservado está de acordo com os trabalhos de (Barzilay *et al.*, 2009; Jansen *et al.*, 2009; Lazzarotto-Silva *et al.*, 2009), que observaram um

padrão regular nas populações celulares de indivíduos distintos, evidenciando um caráter de poucas alterações dessas populações provenientes de tais indivíduos.

Entretanto, como consequência das alterações metabólicas e morfológicas induzidas pelo meio indutor osteogênico, foram observadas diferenças qualitativas e quantitativas na análise interclasses na comparação entre os estágios S0, S1 e S2.

Dentro das diferenças identificadas na análise inter-classe, o presente trabalho propôs direcionar as análises para os “*spots*” com maior abundância de forma a dar maior ênfase aos resultados qualitativos.

Seguindo os parâmetros qualitativos de análise realizada no programa Platinum VI (GE Healthcare,), auxiliada pelo programa Decyder 6.5V (GE Healthcare,), foram processados e identificados 51 *proteínas*, no total dentro dos estágios S0, S1 e S2.

Um importante aspecto relatado neste trabalho é que não foram identificados *spots* em abundância entre as classes S0 e S1 e também S2 e S1. Esse intrigante resultado sugere que o estágio S1 pode ser considerado um importante divisor, do ponto de vista funcional, entre as células indiferenciadas e as células diferenciadas, uma vez que ele representa o conteúdo protéico de ambos os estágios S0 e S2. A análise entre as classes S0 e S2 identificou 16 *spots* superexpressos e entre S2 e S0 28 *spots* superexpressos. Outro importante resultado, observado em S1, diz respeito à identificação de 7 *spots* superexpressos, quando comparados a ambos os estágios S0 e S2. A identificação dos *spots* por sequenciamento primário realizado por espectrometria de massa,

associado à busca em bancos de dados (rNCBI-human), revelou que algumas das proteínas identificadas estavam localizadas em pontos diferentes do gel 2D. A maioria das proteínas identificadas nesta circunstância é de citoesqueleto ou de membranas e suas localizações diversas poderiam ser consequência de mudanças pós-traducionais resultantes dos estímulos osteogênicos fornecidos nos diferentes estágios. Essas observações podem ser apoiadas pelos trabalhos de (Iarbi-Chiellini *et al.*, 2008), que relatam as mudanças pós-traducionais mediadas por diferentes estímulos. A partir das proteínas identificadas e revisadas, um grupo de 5 proteínas abundantes presentes nos estágios S1 e S2, em relação ao estágio S0 e, também, 1 proteína superexpressa em S0 e S1, em relação a S2, foram selecionadas para discussão mais aprofundada sobre os possíveis envolvimento funcionais no processo osteogênico.

Os biomarcadores que possam ser utilizados para referenciar determinadas condições têm sido importante ferramenta biológica para determinar situações de forma a caracterizar dinamicamente os processos celulares e auxiliar em diversos diagnósticos (Kossowska *et al.*, 2009; Riekstina *et al.*, 2009). As 5 proteínas selecionadas superexpressas em S1 e S2 apresentaram características estruturais e metabólicas ligadas ao processo osteogênico, podendo fornecer respostas funcionais para o entendimento mais completo do processo osteogênico. Essas proteínas ainda oferecem a possibilidade de serem utilizadas como biomarcadores do processo osteogênico induzido *in vitro* a partir das hADAS, que pode ser considerada uma das mais importante funções para

definição de estratégias terapêuticas seguras no campo dos transplantes celulares.

A primeira proteína a ser avaliada é a Superóxido dismutase - SOD. Essa enzima foi evidenciada como estando superexpressa nos estágios S1 e S2 e tem grande relevância na proliferação celular e no metabolismo. Os tratamentos experimentais utilizando-se de ondas de choque para recuperação de ossos e tendões, revelaram que a SOD é um importante mediador no processo de recuperação (Park *et al.*, 2009; Sutra *et al.*, 2008). A formação de células osteoprogenitoras *in vitro*, pela estimulação de ondas de choque, promove estresse oxidativo e aumento de SOD (Wang *et al.*, 2002a). Esse fenômeno é um indicativo interessante da relação do aumento da população de células ósseas com o aumento da SOD e, também, da produção de fator de crescimento transformante β 1 (TGF β B1) (Wang *et al.*, 2002b). Com isso, a SOD pode ser um indicativo do crescimento populacional nos tratamentos de recolonização do tecido ósseo, podendo vir a ser utilizado como um marcador *in vitro* e *in vivo* para avaliar a recuperação tecidual. Finalmente, a SOD previne a ação deletéria do estresse oxidativo aumentando, assim, a meia vida dessas células (Wang *et al.*, 2004) .

A segunda proteína superexpressa nos estágios S1 e S2 a ser avaliada é a Filamina A. A Filamina A é uma proteína ligadora de actina, que apresenta sua maior ação na colonização e no agrupamento de células em matrizes extracelulares ricas em colágeno (Kim *et al.*, 2010). Caracterizada pela sua grande interação com superfícies ricas em colágeno e com a integrina B1, o aumento de filamina promove uma

melhor distribuição celular em superfícies ricas em colágeno. A Filamina é utilizada como referência para proteínas e culturas de tecidos que secretam grandes quantidades de colágeno que interagem com constituintes celulares como os pré-osteoblastos e osteoblastos. A filamina A, em grandes quantidades, também reduz as chances de apoptose, aumentando, assim, a viabilidade celular (Kim *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2008a).

A próxima proteína identificada nos estágios S1 e S2, que atende aos parâmetros de relevância para se destacar, é a *Heat Shock protein 27* (HSP 27). HSP 27 apresenta uma correlação muito alta com a prostaglandina D2 (PGD2). Acredita-se que PGD2 tenha uma conexão forte no metabolismo ósseo agindo como um autocóide suprimindo a síntese da expressão de osteoprotegerina e RANKL, gerando uma resposta anabólica. Uma indicação da correlação entre HSP27 e PGD2 é a direta relação de expressão de HSP27 associada a um aumento de PGD2. A PGD2 estimula a indução de HSP27 por três vias de ativação mitogênica (Takai *et al.*, 2006). Além disso, outro importante fato é que, em função de estimulação mecânica nessas células, nota-se também o aumento de PGD2 (Siddhivarn *et al.*, 2006). Entretanto, os detalhes que ligam a fosforilação de HSP27 a alguma alteração metabólica em osteoblastos ainda não foram elucidados. A fosforilação de HSP27 sugere que existam outras proteínas envolvidas, gerando respostas metabólicas, sinalizadoras e funcionalmente estruturais, relacionadas às atividades realizadas pelos osteoblastos.

A Cathepsina D, presente nos estágios S1 e S2, é outra importante proteína a ser destacada. A Cathepsina D está presente em altos níveis nos lisossomas e tem um importante papel funcional, uma vez que sua expressão está associada ao aumento da migração celular e também em níveis de expressão elevados, além de estar associada a uma lentidão no processo de mineralização da matriz óssea (Matsumoto *et al.*, 2005). A Cathepsina D pode também estar associada a outras patologias ósseas (Matsumoto *et al.*, 2005). A Cathepsina D, apesar de estar presente nos estágios S1 e S2, aparentemente não interferiu no processo de mineralização induzido *in vitro*. Provavelmente, os níveis identificados eram insuficientes para causar o retardo da mineralização. Aproveitando-se da possibilidade da Cathepsina D agir como um referencial do processo de mineralização durante a osteogênese. Essa proteína apresenta forte indicativo para ser usada como marcador biológico de definição para mapeamento do processo de mineralização.

Finalmente, a Fibulina é a última proteína de destaque que se apresentou superexpressa nos estágios S1 e S2. A glicoproteína Fibulina (família) é uma das proteínas ligadoras de cálcio mais conservadas em mamíferos, sendo componente da matriz extracelular dos osteoblastos e de outros tecidos, por estar intimamente relacionada à adesão celular (Aspberg *et al.*, 1999). A secreção aumentada de Fibulina 1 e 2 é característica comum dos osteoblastos, sendo a fibulina 1 secretada na forma intacta, enquanto a fibulina 2 é sintetizada por osteoblastos durante uma degradação proteolítica. A Fibulina também apresenta uma atividade redutora de proliferação de células-tronco hematopoiéticas, uma vez que

ela tem elevada capacidade de interferir na adesão de CD34, presente em células-tronco hematopoiéticas, e nas fibronectinas, sendo isso uma importante característica para a manutenção a população de osteoblasto uniforme (Hergeth *et al.*, 2008). A fibulina torna-se atrativa porque está diretamente relacionada com o processo osteogênico, favorecendo a formação de uma matriz óssea coesiva que dá sustentabilidade ao tecido ósseo em humanos.

Por outro lado, a proteína Laminina identificada nos estágios S0 e S1 foi selecionada como possível marcador biológico negativo do processo osteogênico, nestas condições. Sua importância, focada como fator de relevância para processos iniciais e sua ausência em estágios mais avançados dentro da osteogênese, garantem o amadurecimento e a transição das células indiferenciadas em células comprometidas com a linhagem osteoblástica em sua ausência. A laminina é uma das proteínas mais relevantes na adesão molecular das células-tronco isoladas de tecido adiposo, responsável por conectar essas células a matriz extracelular (van Dijk *et al.*, 2008). Notoriamente, a laminina apresenta um papel significativo na diferenciação de cardiomiócitos (Suzuki *et al.*, 2010). Durante o processo osteogênico induzido *in vitro*, a laminina, que era superexpressa no estágios indiferenciados (S0), tornou-se subexpressa durante o amadurecimento do processo osteogênico, tendo diminuída a sua expressão, no decorrer do tempo de indução. Portanto, Laminina pode ser considerada como um filtro para populações heterogêneas dentro do processo osteogênico, ajudando a nortear procedimentos terapêuticos, uma vez que sua ausência pode definir um estágio mais

avançado de diferenciação osteogênica. Como resultado de nossas análises as proteínas SOD, Filamina A, HSP 27, Cathepsina D e Fibulina evidenciadas nos estágios S1 e S2 quando agrupadas para atuarem como biomarcadores podem auxiliar a definir o estágio de transição e diferenciação das células-tronco dentro da osteogênese possibilitando distinguir facilmente o avanço da diferenciação osteogênica.

6 - CONCLUSÃO

Os resultados iniciais obtidos neste trabalho abrem novas perspectivas no comportamento das hADAS como fonte de células-tronco induzidas para a diferenciação osteogênica. As mudanças observadas nos estágios S0, S1 e S2 apoiadas por análise gênica, relacionada ao processo osteogênico, observações morfológicas e os ensaios enzimáticos associados à comprovação proteômica, dão consistência ao trabalho do comprometimento à osteogênese dessas células, quando induzidas *in vitro*. A confirmação e a futura utilização das 5 proteínas identificadas neste trabalho, que estão intimamente relacionadas ao processo osteogênico, oferecem novos caminhos para o uso dessas moléculas com a função de biomarcadores do processo osteogênico, assim como uma estimativa real da condição de diferenciação das células durante o processo. Esforços adicionais ainda são necessários para melhorar a caracterização dessas proteínas e compreender as suas funções específicas no processo osteogênico, sendo que este desafio continua sendo o ponto crítico para terapias celulares e abordagens clínicas eficazes e seguras.

7 - PERSPECTIVAS

O presente trabalho apresenta fortes indícios de proteínas que podem vir a atuar como marcadores da osteogênese e complementar as informações do processo de diferenciação *in vitro* da osteogênese. Neste momento estudos mais aprofundados que possam expor com mais clareza a funcionalidade e aplicabilidade dessas proteínas se fazem necessário. Portanto, temos como perspectivas realizar repetidos ensaios de imunoblots com anticorpos específicos para essas proteínas previamente selecionadas e discutidas acima com números maiores de doadores afim de confirmar o expressão dessas proteínas. Também passa ser outra prioridade analisar a funcionalidade dessas proteínas por meio de silenciamento gênico, clonagem e transfecção dessas proteínas para determinar funcionalidades e suas relações na osteogênese.

8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, F., *et al.* Search for a W' boson via the decay mode $W' \rightarrow \mu\mu$ in 1.8 TeV pp collisions. *Phys Rev Lett*, 2000 84(25), 5716-5721.

ADAMS, R.A., *et al.* Leukemia: serial transplantation of human leukemic lymphoblasts in the newborn Syrian hamster. *Cancer Res*, 1967 27(4), 772-783.

AMITAI, G., ASHANI, Y., SHAHAR, A., GAFNI, A., SILMAN, I. Fluorescent organophosphates: novel probes for studying aging-induced conformational changes in inhibited acetylcholinesterase and for localization of cholinesterase in nervous tissue. *Monogr Neural Sci*, 1980 7, 70-84.

AROSARENA, O. Tissue engineering. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg*, 2005 13(4), 233-241.

ASPBERG, A., ADAM, S., KOSTKA, G., TIMPL, R., HEINEGARD, D. Fibulin-1 is a ligand for the C-type lectin domains of aggrecan and versican. *J Biol Chem*, 1999 274(29), 20444-20449.

BAIG, M.R., RAJAN, G. Treatment of a maxillary dento-alveolar defect using an immediately loaded definitive zygoma implant-retained prosthesis with 11-month follow-up: a clinical report. *J Oral Implantol*, 2010 36(1), 31-35.

BARTUNEK, J., *et al.* Bone-marrow-derived cells for cardiac stem cell therapy: safe or still under scrutiny? *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*, 2007 4 Suppl 1, S100-105.

BARZILAY, R., SADAN, O., MELAMED, E., OFFEN, D. Comparative characterization of bone marrow-derived mesenchymal stromal cells from four different rat strains. *Cytotherapy*, 2009 11(4), 435-442.

BAUER, T.W., MUSCHLER, G.F. Bone graft materials. An overview of the basic science. *Clin Orthop Relat Res*, 2000 (371), 10-27.

BLONDER, J., XIAO, Z., VEENSTRA, T.D. Proteomic profiling of differentiating osteoblasts. *Expert Rev Proteomics*, 2006 3(5), 483-496.

BOLAND, C.J., FRIED, R.M., TASHJIAN, A.H., JR. Measurement of cytosolic free Ca²⁺ concentrations in human and rat osteosarcoma cells: actions of bone resorption-stimulating hormones. *Endocrinology*, 1986 118(3), 980-989.

BORDIER, P., RASMUSSEN, H., DORFMANN, H. Effectiveness of parathyroid hormone, calcitonin and phosphate on bone cells in Paget's disease. *Am J Med*, 1974 56(6), 850-857.

BRANDENBERGER, R., *et al.* MPSS profiling of human embryonic stem cells. *BMC Dev Biol*, 2004 4, 10.

BREYMAN, C., SCHMIDT, D., HOERSTRUP, S.P. Umbilical cord cells as a source of cardiovascular tissue engineering. *Stem Cell Rev*, 2006 2(2), 87-92.

BRUDER, S.P., FINK, D.J., CAPLAN, A.I. Mesenchymal stem cells in bone development, bone repair, and skeletal regeneration therapy. *J Cell Biochem*, 1994 56(3), 283-294.

CANCEDDA, R., BIANCHI, G., DERUBEIS, A., QUARTO, R. Cell therapy for bone disease: a review of current status. *Stem Cells*, 2003 21(5), 610-619.

CASIANO, R.R., COOPER, J. Anterior table free bone graft technique for frontal sinus obliteration. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 1992 106(4), 363-366.

CHIELLINI, C., *et al.* Characterization of human mesenchymal stem cell secretome at early steps of adipocyte and osteoblast differentiation. *BMC Mol Biol*, 2008 9, 26.

CHINEN, J., BUCKLEY, R.H. Transplantation immunology: solid organ and bone marrow. *J Allergy Clin Immunol*, 2010 125(2 Suppl 2), S324-335.

CHRISTENSON, L., MIKOS, A.G., GIBBONS, D.F., PICCIOLO, G.L. Biomaterials for tissue engineering: summary. *Tissue Eng*, 1997 3(1), 71-73; discussion 73-76.

DE PAULA, F.J., ROSEN, C.J. Back to the Future: Revisiting Parathyroid Hormone and Calcitonin Control of Bone Remodeling. *Horm Metab Res*, 2010.

DEGOS, L. [Jean Dausset. Pioneer, discoverer and responsible]. *Rev Prat*, 2009 59(7), 1030-1033.

EASTLUND, T. Infectious disease transmission through cell, tissue, and organ transplantation: reducing the risk through donor selection. *Cell Transplant*, 1995 4(5), 455-477.

EL-KHOURY, G.Y., *et al.* Case report 364: Massive calcium pyrophosphate dihydrate crystal deposition disorder (MCPDD) involving thumb. *Skeletal Radiol*, 1986 15(4), 313-315.

EVANS, C.A., *et al.* Comparative proteomics of primitive hematopoietic cell populations reveals differences in expression of proteins regulating motility. *Blood*, 2004 103(10), 3751-3759.

FATHI, A., *et al.* Comparative proteome and transcriptome analyses of embryonic stem cells during embryoid body-based differentiation. *Proteomics*, 2009 9(21), 4859-4870.

FERNANDES, M., *et al.* Limbal stem cell transplantation. *Indian J Ophthalmol*, 2004 52(1), 5-22.

FERNANDES, M.S. [Fourth International Symposium on Osteoporosis and the Consensus Development Conference. Hong Kong 1993]. *Acta Med Port*, 1993 6(3-4), 168-170.

FRASER, J.K., SCHREIBER, R.E., ZUK, P.A., HEDRICK, M.H. Adult stem cell therapy for the heart. *Int J Biochem Cell Biol*, 2004 36(4), 658-666.

FRAYN, K.N., KARPE, F., FIELDING, B.A., MACDONALD, I.A., COPPACK, S.W. Integrative physiology of human adipose tissue. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 2003 27(8), 875-888.

GAWRYSZEWSKI, V.P., KOIZUMI, M.S., MELLO-JORGE, M.H. [Morbidity and mortality from external causes in Brazil, 2000]. *Cad Saude Publica*, 2004 20(4), 995-1003.

GILBERT, M., *et al.* [Proteomics and breast cancer: a search for novel diagnostic and theragnostic Biomarkers.]. *Bull Cancer*, 2010.

GRANERO-MOLTO, F., *et al.* Regenerative effects of transplanted mesenchymal stem cells in fracture healing. *Stem Cells*, 2009 27(8), 1887-1898.

HACKER, M.C., MIKOS, A.G. Trends in tissue engineering research. *Tissue Eng*, 2006 12(8), 2049-2057.

HATTORI, H., *et al.* Bone formation using human adipose tissue-derived stromal cells and a biodegradable scaffold. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 2006 76(1), 230-239.

HAYMAN, M.W., PRZYBORSKI, S.A. Proteomic identification of biomarkers expressed by human pluripotent stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004 316(3), 918-923.

HERGETH, S.P., *et al.* Characterization and functional analysis of osteoblast-derived fibulins in the human hematopoietic stem cell niche. *Exp Hematol*, 2008 36(8), 1022-1034.

HOLLENBERG, C.H. Perspectives in adipose tissue physiology. *Int J Obes*, 1990 14 Suppl 3, 135-152.

HUANG, J.I., *et al.* Chondrogenic potential of multipotential cells from human adipose tissue. *Plast Reconstr Surg*, 2004 113(2), 585-594.

IM, G.I., SHIN, Y.W., LEE, K.B. Do adipose tissue-derived mesenchymal stem cells have the same osteogenic and chondrogenic potential as bone marrow-derived cells? *Osteoarthritis Cartilage*, 2005 13(10), 845-853.

IVANOVA, N.B., *et al.* A stem cell molecular signature. *Science*, 2002 298(5593), 601-604.

JACOBSEN, S.J., *et al.* Hospitalization with vertebral fracture among the aged: a national population-based study, 1986-1989. *Epidemiology*, 1992 3(6), 515-518.

JAISSWAL, N., HAYNESWORTH, S.E., CAPLAN, A.I., BRUDER, S.P. Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro. *J Cell Biochem*, 1997 64(2), 295-312.

JANSEN, B.J., *et al.* Functional Differences between Mesenchymal Stem Cell Populations Are Reflected by Their Transcriptome. *Stem Cells Dev*, 2009.

JU, X.L., HUANG, Z.W., SHI, Q., HOU, H.S., DUAN, C.H. [Biological characteristics and induced differentiation ability of in vitro expanded umbilical cord blood mesenchymal stem cells]. *Zhonghua Er Ke Za Zhi*, 2005 43(7), 499-502.

JUNQUEIRA, L.C., BIGNOLAS, G., BRENTANI, R.R. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *Histochem J*, 1979 11(4), 447-455.

KETTMAN, J.R., COLECLOUGH, C., FREY, J.R., LEFKOVITS, I. Clonal proteomics: one gene - family of proteins. *Proteomics*, 2002 2(6), 624-631.

KIM, H., *et al.* Regulation of cell adhesion to collagen via beta1 integrins is dependent on interactions of filamin A with vimentin and protein kinase C epsilon. *Exp Cell Res*, 2010.

KIM, H., SENGUPTA, A., GLOGAUER, M., MCCULLOCH, C.A. Filamin A regulates cell spreading and survival via beta1 integrins. *Exp Cell Res*, 2008a 314(4), 834-846.

KIM, J.S., LEE, H.K., KIM, M.R., KIM, P.K., KIM, C.W. Differentially expressed proteins of mesenchymal stem cells derived from human cord blood (hUCB) during osteogenic differentiation. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2008b 72(9), 2309-2317.

KIMURA, S., ROBERTS, A.W., METCALF, D., ALEXANDER, W.S. Hematopoietic stem cell deficiencies in mice lacking c-Mpl, the receptor for thrombopoietin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998 95(3), 1195-1200.

KLOSE, J., KOBALZ, U. Two-dimensional electrophoresis of proteins: an updated protocol and implications for a functional analysis of the genome. *Electrophoresis*, 1995 16(6), 1034-1059.

KOBLAS, T., HARMAN, S.M., SAUDEK, F. The application of umbilical cord blood cells in the treatment of diabetes mellitus. *Rev Diabet Stud*, 2005 2(4), 228-234.

KOSSOWSKA, B., DUDKA, I., GANCARZ, R., ANTONOWICZ-JUCHNIEWICZ, J. [Proteomic analysis of protein profiles in some pathological stages of the human organism]. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*, 2009 63, 549-563.

KUHBIER, J.W., *et al.* Isolation, Characterization, Differentiation, and Application of Adipose-Derived Stem Cells. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 2010.

LAU, C.C. Molecular classification of osteosarcoma. *Cancer Treat Res*, 2010 152, 459-465.

LAZZAROTTO-SILVA, C., *et al.* Similar proteomic profiles of human mesenchymal stromal cells from different donors. *Cytotherapy*, 2009 11(3), 268-277.

LIAO, E.Y., *et al.* Age-related bone mineral density, accumulated bone loss rate and prevalence of osteoporosis at multiple skeletal sites in chinese women. *Osteoporos Int*, 2002 13(8), 669-676.

LOCKE, M., WINDSOR, J., DUNBAR, P.R. Human adipose-derived stem cells: isolation, characterization and applications in surgery.*ANZ J Surg*,2009 79(4), 235-244.

LONG, M.W. Osteogenesis and bone-marrow-derived cells.*Blood Cells Mol Dis*,2001 27(3), 677-690.

MACHADO, C.B., *et al.* 3D chitosan-gelatin-chondroitin porous scaffold improves osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells.*Biomed Mater*,2007 2(2), 124-131.

MARKMAN, B. Anatomy and physiology of adipose tissue.*Clin Plast Surg*,1989 16(2), 235-244.

MATSUMOTO, N., JO, O.D., SHIH, R.N., YANAGAWA, N. Altered cathepsin D metabolism in PHEX antisense human osteoblast cells.*Biochem Biophys Res Commun*,2005 332(1), 248-253.

MELTZER, J.C., GRIMM, P.C., GREENBERG, A.H., NANCE, D.M. Enhanced immunohistochemical detection of autonomic nerve fibers, cytokines and inducible nitric oxide synthase by light and fluorescent microscopy in rat spleen.*J Histochem Cytochem*,1997 45(4), 599-610.

MIRON-CANELO, J.A., DEL PINO-MONTES, J., VICENTE-ARROYO, M., SAENZ-GONZALEZ, M.C. Epidemiological study of Paget's disease of bone in a zone of the Province of Salamanca (Spain). The Paget's disease of the bone study group of Salamanca.*Eur J Epidemiol*,1997 13(7), 801-805.

MORALEDA, J.M., *et al.* Adult stem cell therapy: dream or reality?*Transpl Immunol*,2006 17(1), 74-77.

MORTENSEN, P., *et al.* MSQuant, an open source platform for mass spectrometry-based quantitative proteomics.*J Proteome Res*,2010 9(1), 393-403.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays.*J Immunol Methods*,1983 65(1-2), 55-63.

NADIG, R.R. Stem cell therapy - Hype or hope? A review.*J Conserv Dent*,2009 12(4), 131-138.

NAHABEDIAN, M.Y., SINGH, N., DEUNE, E.G., SILVERMAN, R., TUFARO, A.P. Recipient vessel analysis for microvascular reconstruction of the head and neck.*Ann Plast Surg*,2004 52(2), 148-155; discussion 156-147.

NEUHOFF, V., AROLD, N., TAUBE, D., EHRHARDT, W. Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250.*Electrophoresis*,1988 9(6), 255-262.

NOLAN, P., TEMPLETON, P., MOLLAN, R.A., WILSON, D.J. Osteoinductive potential of human demineralised bone and a bioceramic in abdominal musculature of the rat.*J Anat*,1991 174, 97-102.

OGAWA, R., *et al.* Osteogenic and chondrogenic differentiation by adipose-derived stem cells harvested from GFP transgenic mice.*Biochem Biophys Res Commun*,2004 313(4), 871-877.

OHGUSHI, H., GOLDBERG, V.M., CAPLAN, A.I. Repair of bone defects with marrow cells and porous ceramic. Experiments in rats.*Acta Orthop Scand*,1989 60(3), 334-339.

OTA, J., *et al.* Proteomic analysis of hematopoietic stem cell-like fractions in leukemic disorders.*Oncogene*,2003 22(36), 5720-5728.

PALLOTTA, I., LOVETT, M., RICE, W., KAPLAN, D.L., BALDUINI, A. Bone marrow osteoblastic niche: a new model to study physiological regulation of megakaryopoiesis.*PLoS One*,2009 4(12), e8359.

PARFITT, A.M. Use of calciferol and its metabolites and analogues in osteoporosis. Current status.*Drugs*,1988 36(5), 513-520.

PARFITT, A.M. Targeted and nontargeted bone remodeling: relationship to basic multicellular unit origination and progression.*Bone*,2002 30(1), 5-7.

PARK, Y.G., *et al.* Combinatory responses of proinflammatory cytokines on nitric oxide-mediated function in mouse calvarial osteoblasts.*Cell Biol Int*,2009 33(1), 92-99.

PATRICK, C.W., JR. Adipose tissue engineering: the future of breast and soft tissue reconstruction following tumor resection.*Semin Surg Oncol*,2000 19(3), 302-311.

PENG, L., *et al.* Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, cartilage, and adipose tissue.*Stem Cells Dev*,2008 17(4), 761-773.

PERA, M.F., TAM, P.P. Extrinsic regulation of pluripotent stem cells.*Nature*,2010 465(7299), 713-720.

PERONI, D., *et al.* Stem molecular signature of adipose-derived stromal cells.*Exp Cell Res*,2008 314(3), 603-615.

PETROPOULOU, A.D., *et al.* Prospective assessment of bone turnover and clinical bone diseases after allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation.*Transplantation*,2010 89(11), 1354-1361.

PITTINGER, M.F., *et al.* Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells.*Science*,1999 284(5411), 143-147.

POUNTOS, I., GIANNOUDIS, P.V. Biology of mesenchymal stem cells.*Injury*,2005 36 Suppl 3, S8-S12.

PUETZER, J.L., PETITTE, J.N., LOBOA, E.G. Comparative Review of Growth Factors for Induction of Three-Dimensional In Vitro Chondrogenesis in Human Mesenchymal Stem Cells Isolated from Bone Marrow and Adipose Tissue.*Tissue Eng Part B Rev*,2010.

RAUCH, A., *et al.* Glucocorticoids suppress bone formation by attenuating osteoblast differentiation via the monomeric glucocorticoid receptor.*Cell Metab*,2010 11(6), 517-531.

RIEKSTINA, U., *et al.* Embryonic stem cell marker expression pattern in human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, adipose tissue, heart and dermis. *Stem Cell Rev*, 2009 5(4), 378-386.

RIERA-ESPINOZA, G., *et al.* Changes in bone turnover during tibolone treatment. *Maturitas*, 2004 47(2), 83-90.

RODBELL, M. Localization of Lipoprotein Lipase in Fat Cells of Rat Adipose Tissue. *J Biol Chem*, 1964 239, 753-755.

ROODMAN, G.D., WINDLE, J.J. Paget disease of bone. *J Clin Invest*, 2005 115(2), 200-208.

ROSER, K., JOHANSSON, C.B., DONATH, K., ALBREKTSSON, T. A new approach to demonstrate cellular activity in bone formation adjacent to implants. *J Biomed Mater Res*, 2000 51(2), 280-291.

ROSS, R. Connective tissue cells, cell proliferation and synthesis of extracellular matrix-a review. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 1975 271(912), 247-259.

RUIMERMAN, R., HILBERS, P., VAN RIETBERGEN, B., HUISKES, R. A theoretical framework for strain-related trabecular bone maintenance and adaptation. *J Biomech*, 2005 38(4), 931-941.

RUSO, J., BALOGH, G., RUSO, I.H. Breast cancer prevention. *Climacteric*, 2007 10 Suppl 2, 47-53.

SETHE, S., SCUTT, A., STOLZING, A. Aging of mesenchymal stem cells. *Ageing Res Rev*, 2006 5(1), 91-116.

SHAW, J.P. A morphometric study of bone and tooth volumes in the pipid frog *Xenopus laevis* (Daudin), with comments on the importance of tooth resorption during normal tooth replacement. *J Exp Zool*, 1989 249(1), 99-104.

SIDDHIVARN, C., *et al.* Prostaglandin D2 pathway and peroxisome proliferator-activated receptor gamma-1 expression are induced by

mechanical loading in an osteoblastic cell line. *J Periodontal Res*, 2006 41(2), 92-100.

SINGH, N., PILLAY, V., CHOONARA, Y.E. Advances in the treatment of Parkinson's disease. *Prog Neurobiol*, 2007 81(1), 29-44.

SMITH, M.D., *et al.* Proximal femoral bone density and its correlation to fracture load and hip-screw penetration load. *Clin Orthop Relat Res*, 1992 (283), 244-251.

STERODIMAS, A., DE FARIA, J., NICARETTA, B., PITANGUY, I. Tissue engineering with adipose-derived stem cells (ADSCs): current and future applications. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*, 2009.

SUTRA, T., *et al.* Superoxide production: a procalcifying cell signalling event in osteoblastic differentiation of vascular smooth muscle cells exposed to calcification media. *Free Radic Res*, 2008 42(9), 789-797.

SUZUKI, S., *et al.* Effects of extracellular matrix on differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells into smooth muscle cell lineage: utility for cardiovascular tissue engineering. *Cells Tissues Organs*, 2010 191(4), 269-280.

SWEAT, F., PUCHTLER, H., ROSENTHAL, S.I. Sirius Red F3ba as a Stain for Connective Tissue. *Arch Pathol*, 1964 78, 69-72.

TAKAI, S., *et al.* Prostaglandin D2 induces the phosphorylation of HSP27 in osteoblasts: function of the MAP kinase superfamily. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 2006 75(2), 61-67.

TANZI, M.C., FARE, S. Adipose tissue engineering: state of the art, recent advances and innovative approaches. *Expert Rev Med Devices*, 2009 6(5), 533-551.

TOLEDO, S.R., *et al.* Bone deposition, bone resorption, and osteosarcoma. *J Orthop Res*, 2010.

TURKSEN, K., RAO, M. Issues in human embryonic stem cell biology. *Stem Cell Rev*, 2005 1(2), 79-81.

UNWIN, R.D., GASKELL, S.J., EVANS, C.A., WHETTON, A.D. The potential for proteomic definition of stem cell populations. *Exp Hematol*, 2003 31(12), 1147-1159.

VACANTI, C.A., VACANTI, J.P. The science of tissue engineering. *Orthop Clin North Am*, 2000 31(3), 351-356.

VALERIO, P., GUIMARAES, M.H., PEREIRA, M.M., LEITE, M.F., GOES, A.M. Primary osteoblast cell response to sol-gel derived bioactive glass foams. *J Mater Sci Mater Med*, 2005 16(9), 851-856.

VALERIO, P., PEREIRA, M.M., GOES, A.M., LEITE, M.F. The effect of ionic products from bioactive glass dissolution on osteoblast proliferation and collagen production. *Biomaterials*, 2004 25(15), 2941-2948.

VAN DIJK, A., NIESSEN, H.W., ZANDIEH DOULABI, B., VISSER, F.C., VAN MILLIGEN, F.J. Differentiation of human adipose-derived stem cells towards cardiomyocytes is facilitated by laminin. *Cell Tissue Res*, 2008 334(3), 457-467.

VARGAS, S.J., RAISZ, L.G. Simultaneous assessment of bone resorption and formation in cultures of 22-day fetal rat parietal bones: effects of parathyroid hormone and prostaglandin E2. *Bone*, 1990 11(1), 61-65.

WAGNER, W., *et al.* The heterogeneity of human mesenchymal stem cell preparations--evidence from simultaneous analysis of proteomes and transcriptomes. *Exp Hematol*, 2006 34(4), 536-548.

WANG, F.S., *et al.* Ras induction of superoxide activates ERK-dependent angiogenic transcription factor HIF-1alpha and VEGF-A expression in shock wave-stimulated osteoblasts. *J Biol Chem*, 2004 279(11), 10331-10337.

WANG, F.S., *et al.* Superoxide mediates shock wave induction of ERK-dependent osteogenic transcription factor (CBFA1) and mesenchymal cell

differentiation toward osteoprogenitors. *J Biol Chem*, 2002a 277(13), 10931-10937.

WANG, F.S., YANG, K.D., CHEN, R.F., WANG, C.J., SHEEN-CHEN, S.M. Extracorporeal shock wave promotes growth and differentiation of bone-marrow stromal cells towards osteoprogenitors associated with induction of TGF-beta1. *J Bone Joint Surg Br*, 2002b 84(3), 457-461.

WEEKES, J., *et al.* Bovine dilated cardiomyopathy: proteomic analysis of an animal model of human dilated cardiomyopathy. *Electrophoresis*, 1999 20(4-5), 898-906.

WHO. 2003. Prevention and management of osteoporosis. Report of a WHO Scientific Group. *In* Geneva: World Health Organization.

WILSON, J.H. Bone strength of caged layers as affected by dietary calcium and phosphorus concentrations, reconditioning, and ash content. *Br Poult Sci*, 1991 32(3), 501-508.

YANEZ, R., *et al.* Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells have in vivo immunosuppressive properties applicable for the control of the graft-versus-host disease. *Stem Cells*, 2006 24(11), 2582-2591.

YOSHIMURA, K., *et al.* Characterization of freshly isolated and cultured cells derived from the fatty and fluid portions of liposuction aspirates. *J Cell Physiol*, 2006 208(1), 64-76.

ZHANG, Y., MARMORSTEIN, L.Y. Focus on molecules: fibulin-3 (EFEMP1). *Exp Eye Res*, 2010 90(3), 374-375.

ZHOU, Y.S., LIU, Y.S., TAN, J.G. Is 1, 25-dihydroxyvitamin D3 an ideal substitute for dexamethasone for inducing osteogenic differentiation of human adipose tissue-derived stromal cells in vitro? *Chin Med J (Engl)*, 2006 119(15), 1278-1286.

ZHU, M., *et al.* The effect of age on osteogenic, adipogenic and proliferative potential of female adipose-derived stem cells. *J Tissue Eng Regen Med*, 2009 3(4), 290-301.

ZHU, W.D., *et al.* Bladder reconstruction with adipose-derived stem cell-seeded bladder acellular matrix grafts improve morphology composition. *World J Urol*,2010.

ZUK, P.A. Stem cell research has only just begun. *Science*,2001 293(5528), 211-212.

ZUK, P.A., *et al.* Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell*,2002 13(12), 4279-4295.

ZUK, P.A., *et al.* Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng*,2001 7(2), 211-228.

9 - ANEXO

Anexo 1 - Parecer de aprovação do comitê de ética para o desenvolvimento do trabalho

Universidade Federal de Minas Gerais
Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG - COEP

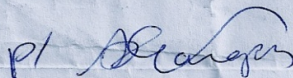
Parecer nº. ETIC 361/06

**Interessado: Prof. Adriano Monteiro de Castro Pimenta
Departamento de Bioquímica e Imunologia
Instituto de Ciências Biológicas-UFMG**

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP, aprovou, *ad referendum*, no dia 29 de novembro de 2006, depois de atendidas as solicitações de diligência, o projeto de pesquisa intitulado **“Identificação, caracterização e elaboração de um estudo do perfil proteômico na osteogênese de células tronco mesenquimais isoladas de tecido adiposo humano”** bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido do referido projeto.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.



**Profa. Dra. Maria Elena de Lima Perez Garcia
Presidente do COEP/UFMG**

Anexo 2 - Trabalho publicado