

**MARIANE IZABELLA ABREU DE MELO**

**ESTRATÉGIAS MOLECULARES PARA A  
CARACTERIZAÇÃO E DIFERENCIAÇÃO ENTRE  
CÉLULAS-TRONCO DERIVADAS DE TECIDO  
ADIPOSO E FIBROBLASTOS DÉRMICOS  
HUMANOS**

**Belo Horizonte,**

**Minas Gerais, Brasil**

**Abril - 2019**

**MARIANE IZABELLA ABREU DE MELO**

**ESTRATÉGIAS MOLECULARES PARA A  
CARACTERIZAÇÃO E DIFERENCIAÇÃO ENTRE  
CÉLULAS-TRONCO DERIVADAS DE TECIDO  
ADIPOSO E FIBROBLASTOS DÉRMICOS  
HUMANOS**

**Orientador: Dr. Dawidson Assis Gomes**

**Coorientadora: Dra. Pricila da Silva Cunha**

**Tese submetida ao Departamento de  
Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade  
Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do grau de  
Doutor em Bioquímica e Imunologia**

**Universidade Federal de Minas Gerais  
Belo Horizonte  
Abril - 2019**



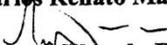
ATA DA DEFESA DA TESE DE DOUTORADO DE MARIANE IZABELLA ABREU DE MELO, orientada pelo Prof. Dawidson Assis Gomes (UFMG). Aos trinta dias do mês de abril de 2019 às 14:00 horas, reuniu-se no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, a Comissão Examinadora da tese de Doutorado, indicada *ad referendum* do Colegiado do Curso, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado "" Estratégias moleculares para a caracterização e diferenciação entre células-tronco derivadas de tecido adiposo e fibroblastos dérmicos humanos"", requisito final para a obtenção do grau de Doutor em Ciências: Bioquímica. Abrindo a sessão, sem a presença do público, o Presidente da Comissão, Prof. Alfredo Miranda de Góez, coorientador, da Universidade Federal de Minas Gerais, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: Dr. Erich Birelli Tahara (ICB - Bioquímica e Imunologia), aprovada; Dr. Carlos Renato Machado (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dr. Antero Silva de Ribeiro Andrade (Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear - CDTN), aprovada; Dra. Vivian Alonso Goulart (Universidade Federal de Uberlândia), aprovada; Dr. Alfredo Miranda de Góez - Coorientador (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dr. Pricila da Silva Cunha - Coorientadora (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada. Pelas indicações a candidata foi considerada:

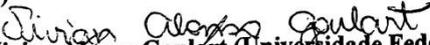
APROVADA  
 REPROVADA

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente Ata que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 30 de abril de 2019.

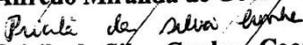
  
 Dr. Erich Birelli Tahara (UFMG)

  
 Dr. Carlos Renato Machado (UFMG)

  
 Dr. Antero Silva de Ribeiro Andrade (Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear - CDTN)

  
 Dra. Vivian Alonso Goulart (Universidade Federal de Uberlândia)

  
 Dr. Alfredo Miranda de Góez - Coorientador (UFMG)

  
 Dr. Pricila da Silva Cunha - Coorientadora (UFMG)

## **DEDICATÓRIA**

*Aos meus amados pais Luciene e Geraldo e irmã  
Marina, por sempre me preencherem de amor e carinho.*

## **EPÍGRAFE**

*“I am among those who think that science has great beauty”*

*Marie Curie*

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Professor Dawidson Assis Gomes por todos os ensinamentos, suporte, dedicação, confiança e paciência ao longo desses quatro anos de doutorado. Sinto-me muito honrada de ter feito parte da sua equipe!

Ao Professor Alfredo Miranda de Goes por todos os conselhos, disponibilidade e entusiasmo em ajudar não só a mim, mas a todos no laboratório desde sempre. Obrigada por ser esse grande exemplo de humildade e sabedoria.

À minha coorientadora Pricila Cunha, por ser essa mulher brilhante, inteligente, companheira, dedicada, carinhosa! Até hoje lembro o primeiro gel de agarose que foi você quem me ensinou a fazer quando eu estava no mestrado. Gostaria de dizer que me sinto muito privilegiada e grata por ter sido sua orientanda, nossa amizade ultrapassa todas as barreiras do conhecimento!

Agradeço também a Dra. Michele Rodrigues, pelo suporte e por ter contribuído com o financiamento do estudo.

Aos Professores (as) Doutores (as) componentes da banca por terem aceitado o convite para participarem da minha defesa.

A todos os professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas e à Universidade Federal de Minas Gerais por esses anos enriquecedores para minha formação profissional.

À equipe da Clínica Forma e ao cirurgião plástico Márcio Rezende pelo fornecimento dos produtos de lipoaspirado e abdominoplastia, imprescindível para a realização do projeto.

A todos os meus colegas e estudantes do Departamento de Bioquímica e Imunologia, pela colaboração e disponibilidade ao emprestarem equipamentos, materiais e reagentes importantes para o desenvolvimento desse estudo.

A CAPES, CNPq e FAPEMIG pelo apoio financeiro.

A todos os membros da família LICM. Faltam palavras para agradecer o quanto foi prazeroso trabalhar com essa equipe. Obrigada por todo o apoio, incentivo, pelos momentos de descontração e amizade. Esses seis anos de muito aprendizado e amadurecimento só foram possíveis porque encontrei pessoas maravilhosas como vocês! Em especial:

Ao Marcelo por acompanhar de perto todas as etapas desse estudo sempre com ideias brilhantes e disposição em ajudar! Obrigada pela paciência, parceria, pelos momentos de alegria, viagens e idas ao cinema. Sou muito grata por essa linda amizade que construímos!

À Joana pela amizade, momentos de alegria e desabafos e por ter isolado nossos queridos fibroblastos dérmicos sempre com muita paciência e habilidade com as tesouras!

A todos do grupo Lab Friends que fizeram parte da história do laboratório: Andrea, Camila, Jerusa, Marianna. Obrigada pela parceria ao longo de todos esses anos, pelas contribuições ao projeto, pelos momentos de inspiração e filosofia, risadas na hora do almoço, passeios, viagens e também pelo carinho e por aturarem minhas cantorias no laboratório. Com vocês aprendi o verdadeiro significado de amizade e trabalho em equipe!

A todas as meninas que fazem e fizeram parte do LICM 1: Joyce, Junnia, Thaís, Thalita, Juliana, Eliza, Ludmila, Marina. Obrigada por todo o apoio, amizade, palavras de carinho e presença em todos os momentos. Obrigada em especial à Thaís e Marina pelo auxílio nas diferenciações adipogênica e osteogênica, importantes para a realização desse estudo.

Aos meus familiares, em especial aos meus pais Geraldo e Luciene e à minha irmã Marina por todo o incentivo, conselhos, orações, carinho e amor desde sempre.

A todas as minhas amigas, em especial a Isabella, sempre carinhosa, animada, alegre, torcendo por mim assim como torço pelo seu sucesso!

Às meninas da República 104 por esses quatro anos morando juntas: Cris, Nayhara e Thaís, sempre compartilhando muito conhecimento, experiências de vida e por fazerem do nosso apê um ambiente alegre e prazeroso de morar!

Aos meus amigos desde os tempos de graduação e mestrado, Ana, Joaquim, Pablo, Paulo. Obrigada pela amizade sincera e por todo o apoio ao longo desses anos acadêmicos.

Por fim, a Deus pelo amor e proteção.

Enfim, a todos que contribuíram de forma direta ou indireta para a realização desse trabalho: Muito Obrigada!

## RESUMO

As células-tronco derivadas de tecido adiposo humano (hASC) são células indiferenciadas e autorrenováveis que apresentam potencial de se diferenciarem em várias linhagens celulares. Devido a essas particularidades, essas células são consideradas promissoras quanto à sua aplicação na medicina regenerativa. Uma preocupação a respeito da aplicação terapêutica das células-tronco é o risco de contaminação com fibroblastos dérmicos, que pode levar a uma série de prejuízos à terapia celular. Assim, é imperativo o desenvolvimento de novas estratégias que possibilitem a diferenciação entre esses dois tipos celulares. No presente estudo, que é constituído por três capítulos, utilizamos estratégias moleculares para a caracterização e a distinção entre células-tronco derivadas de tecido adiposo (hASC) e fibroblastos dérmicos humanos *in vitro*. As células foram isoladas por dissociação mecânica e enzimática das amostras de lipoaspirado e abdominoplastia. No primeiro capítulo, foram realizadas análises de imunofenotipagem por citometria de fluxo que mostraram marcadores semelhantes entre as duas células. Por outro lado, ensaios de curva de crescimento, de indução da diferenciação adipogênica e osteogênica por 21 dias com meios indutores específicos e de atividade de fosfatase alcalina utilizando-se BCIP-NBT mostraram-se promissores na diferenciação fenotípica entre as duas células. No segundo capítulo, utilizando-se *Cell-SELEX* (Evolução Sistemática de Ligantes por Enriquecimento Exponencial baseada em células), DNA *melting* e análises de bioinformática, foram selecionados dois aptâmeros de DNA com maior eficiência e afinidade de ligação por hASC em comparação aos fibroblastos dérmicos humanos. Além disso, a técnica de PCR quantitativa em tempo real mostrou-se robusta e eficiente para a validação de aptâmeros com alta afinidade pelas células alvo. No terceiro capítulo, três amostras distintas de hASC e fibroblastos humanos foram sequenciadas por RNA-Seq e comparadas. As análises de bioinformática contribuíram para a identificação de mais de 2.000 genes diferencialmente expressos (GDEs) entre as duas células, além de ampliar o conhecimento a respeito de funções e vias enriquecidas (GO e KEGG) relacionadas a processos biológicos e moleculares distintos em hASC e fibroblastos. Nessa etapa, também foram validados 16 genes presentes na lista de GDEs por RT-qPCR com amostras das duas células provenientes do mesmo indivíduo, totalizando quatro doadores independentes. Diante do exposto, esse estudo contribuiu para ampliação do conhecimento e para o desenvolvimento de ferramentas importantes não só para a distinção, mas também para uma melhor compreensão da biologia de ambas as células.

## **ABSTRACT**

Human adipose-derived stem cells (hASC) are undifferentiated and self-renewing cells that have the potential to differentiate into several cell lines. Due to these particularities, these cells are considered promising in regenerative medicine application. One concern about the therapeutic application of stem cells is the risk of contamination with dermal fibroblasts, which can lead to some impairment to cell therapy. Thus, it is imperative to develop new strategies that allow the differentiation between these two cell types. In the present study, which consists of three chapters, we used molecular strategies to characterize and distinguish between hASC and human dermal fibroblasts in vitro. Cells were isolated by mechanical and enzymatic dissociation from the liposuction and abdominoplasty samples, respectively. In the first chapter, immunophenotyping analyzes performed by flow cytometry showed similar markers between the two cells. Differently, growth-curve assays, induction of adipogenic and osteogenic differentiation for 21 days with specific inducing media and alkaline phosphatase activity using BCIP-NBT were shown to be promising in the phenotypic differentiation between these two cells. In the second chapter, Cell-SELEX (System-Based Evolution of Ligands by Exponential Cell-Based Enrichment), DNA melting and bioinformatics analyzes were used to select two DNA aptamers with higher efficiency and affinity for hASC binding compared to human dermal fibroblasts. Also, real-time quantitative PCR technique proved to be robust and efficient for the validation of aptamers with high affinity for target cells. In the third chapter, three unpaired samples of hASC and human fibroblasts were sequenced by RNA-Seq using the Illumina platform. Bioinformatics analyzes contributed to the identification of more than 2,000 differentially expressed genes (GDEs) between the two cells, in addition to enhancing knowledge about functions and enriched pathways (GO and KEGG) related to distinct biological and molecular processes in hASC and fibroblasts. In this chapter, 16 genes present in the list of GDEs were also validated by RT-qPCR with paired samples. Therefore, this study contributed to the expansion of scientific knowledge and the development of important tools not only for the distinction, but also for better understanding of both cells' biology.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> As hASC e fibroblastos dérmicos apresentam morfologia semelhante.....	19
<b>Figura 2.</b> As hASC apresentam os marcadores de superfície característicos de células tronco mesenquimais.....	20
<b>Figura 3.</b> Os fibroblastos apresentam os mesmos marcadores de superfície característicos das hASC.....	21
<b>Figura 4.</b> Os fibroblastos dérmicos possuem um tempo de duplicação menor que as hASC.....	22
<b>Figura 5.</b> As hASC são capazes de se diferenciar em células da linhagem adipogênica mas o mesmo não ocorre em fibroblastos dérmicos humanos.....	23
<b>Figura 6.</b> As hASC são capazes de se diferenciar em células da linhagem osteogênica mas o mesmo não ocorre em fibroblastos dérmicos humanos.....	24
<b>Figura 7.</b> As hASC são capazes de se diferenciar em células da linhagem osteogênica mas o mesmo não ocorre em fibroblastos dérmicos humanos.....	25
<b>Figura 8.</b> As hASC apresentam maior atividade de fosfatase alcalina que os fibroblastos durante as três semanas de cultivo.....	27
<b>Figura 9.</b> A análise comparativa normalizada da atividade de fosfatase alcalina entre hASC e fibroblastos dérmicos mostra maior atividade em hASC.....	28
<b>Figura 10.</b> A atividade de fosfatase alcalina decresce com o aumento da porcentagem de fibroblastos na mistura com hASC.....	29
<b>Figura 11.</b> Desenho esquemático da ligação de um aptâmero ao seu alvo.....	36
<b>Figura 12.</b> Representação esquemática do <i>Cell-SELEX</i> utilizando aptâmeros de DNA.....	41
<b>Figura 13.</b> Perfil esperado das curvas de dissociação dos conjuntos de aptâmeros selecionados por <i>Cell-SELEX</i> .....	42
<b>Figura 14.</b> Diversidade das sequências antes da realização do primeiro <i>round</i> do <i>Cell-SELEX</i> .....	57
<b>Figura 15.</b> Análise eletroforética para escolha do ciclo ideal para prosseguimento do <i>Cell-SELEX</i> .....	58
<b>Figura 16.</b> Curvas de dissociação dos oligonucleotídeos presentes na biblioteca (BBT) e no 1º <i>round</i> de seleção dos aptâmeros.....	59

<b>Figura 17.</b> Análise eletroforética em gel de agarose (2%) corado com brometo de etídeo dos <i>amplicons</i> produzidos por PCR no teste de ciclos do segundo <i>round</i> de seleção.....	60
<b>Figura 18.</b> Curvas de dissociação dos oligonucleotídeos presentes no 1º <i>round</i> e no 2º <i>round</i> de seleção dos aptâmeros.....	61
<b>Figura 19.</b> Análise eletroforética em gel de agarose (2%) corado com brometo de etídeo dos <i>amplicons</i> produzidos por PCR no teste de ciclos da seleção negativa do 3º <i>round</i> .....	62
<b>Figura 20.</b> Análise eletroforética em gel de agarose (2%) corado com brometo de etídeo dos <i>amplicons</i> produzidos por PCR no teste de ciclos da seleção negativa de todos os <i>rounds</i> .....	63
<b>Figura 21.</b> Análise eletroforética em gel de agarose (2%) corado com brometo de etídeo dos <i>amplicons</i> produzidos por PCR no teste de ciclos da seleção positiva do 3º <i>round</i> .....	64
<b>Figura 22.</b> Análise eletroforética em gel de agarose (2%) corado com brometo de etídeo dos <i>amplicons</i> produzidos por PCR no teste de ciclos da seleção positiva de todos os <i>rounds</i> .....	65
<b>Figura 23.</b> Curvas de dissociação dos oligonucleotídeos presentes no 2º <i>round</i> e no 3º <i>round</i> de seleção dos aptâmeros.....	66
<b>Figura 24.</b> Curvas de dissociação dos oligonucleotídeos presentes no 3º <i>round</i> e no 4º <i>round</i> de seleção dos aptâmeros.....	67
<b>Figura 25.</b> Curvas de dissociação dos oligonucleotídeos presentes no 4º <i>round</i> e no 5º <i>round</i> de seleção dos aptâmeros.....	68
<b>Figura 26.</b> Curvas de dissociação dos oligonucleotídeos presentes no 5º <i>round</i> e no 6º <i>round</i> de seleção dos aptâmeros.....	69
<b>Figura 27.</b> Curvas de dissociação dos oligonucleotídeos presentes no 5º, 6º e 7º <i>rounds</i> de seleção dos aptâmeros.....	70
<b>Figura 28.</b> Curvas de dissociação dos oligonucleotídeos presentes no 7º e 8º <i>rounds</i> de seleção dos aptâmeros.....	71
<b>Figura 29.</b> As sequências de nucleotídeos dos aptâmeros selecionados foram alinhadas com a ferramenta Align presente no software Mega X.....	73
<b>Figura 30.</b> As sequências de nucleotídeos dos aptâmeros foram agrupadas de acordo com o método da Máxima Verossimilhança e o modelo de Tamura-Nei presentes no software Mega X.....	74

<b>Figura 31.</b> Estrutura secundária dos aptâmeros candidatos selecionados.....	76
<b>Figura 32.</b> Estrutura secundária do aptâmero <i>Scrambled</i> .....	77
<b>Figura 33.</b> Quantificação dos ciclos (Cq) das sequências de aptâmeros e scrambled ligadas em hASC.....	78
<b>Figura 34.</b> Quantificação dos ciclos (Cq) das sequências de aptâmeros e scrambled ligadas em fibroblastos dérmicos.....	78
<b>Figura 35.</b> Quantificação Relativa da Eficiência de Ligação dos Aptâmeros 1 e 2 em hASC comparado aos fibroblastos dérmicos.....	79
<b>Figura 36.</b> Quantificação Relativa da Eficiência de Ligação dos Aptâmeros 3 e 4 em hASC comparado aos fibroblastos dérmicos.....	80
<b>Figura 37.</b> Quantificação Relativa da Eficiência de Ligação dos aptâmeros 1 a 4 em hASC.....	81
<b>Figura 38.</b> A constante de dissociação do aptâmero 3 foi menor em hASC quando comparada aos fibroblastos dérmicos.....	82
<b>Figura 39.</b> A constante de dissociação do aptâmero 4 foi menor em hASC quando comparada aos fibroblastos dérmicos.....	82
<b>Figura 40.</b> Distribuição de FPKM entre hASC (ASC) e fibroblastos (FIB).....	113
<b>Figura 41.</b> A Análise de Componente Principal (PCA) destaca as diferenças e similaridades entre as réplicas biológicas.....	115
<b>Figura 42.</b> O diagrama mostra a correlação de Pearson ( $R^2$ ) entre as réplicas biológicas de ASC e FIB.....	116
<b>Figura 43.</b> O dendograma mostra as similaridades entre as réplicas biológicas de ASC e FIB.....	117
<b>Figura 44.</b> Os genes diferencialmente expressos (GDEs) entre hASC e fibroblastos foram analisados e plotados em um diagrama de Volcano.....	118
<b>Figura 45.</b> Agrupamento hierárquico do tipo <i>heatmap</i> dos genes diferencialmente expressos.....	119
<b>Figura 46.</b> Os 30 termos GO mais enriquecidos relacionados aos genes com regulação positiva em ASC <i>versus</i> FIB.....	120
<b>Figura 47.</b> Os 30 termos GO mais enriquecidos relacionados aos genes com regulação negativa em ASC <i>versus</i> FIB.....	121
<b>Figura 48.</b> <i>Scatterplots</i> do enriquecimento de vias avaliados por KEGG.....	122

<b>Figura 49.</b> Quantificação da expressão relativa dos genes (Log 2) em hASC comparada aos fibroblastos dérmicos humanos (Fibro).....	124-125
<b>Figura 50.</b> Quantificação da expressão relativa dos genes (Log 2) em hASC comparada aos fibroblastos dérmicos humanos (Fibro).....	126
<b>Figura 51.</b> Quantificação da expressão relativa (Log 2) do gene <i>B4GALNT1</i> em hASC comparada aos fibroblastos dérmicos humanos (Fibro).....	127
<b>Figura A1.</b> Imagem dos resultados da análise de integridade e qualidade da amostra ASC_1 adquiridas no <i>software</i> Agilent 2100 Bioanalyzer System Expert.....	162
<b>Figura A2.</b> Imagem dos resultados da análise de integridade e qualidade da amostra ASC_2 adquiridas no <i>software</i> Agilent 2100 Bioanalyzer System Expert.....	163
<b>Figura A3.</b> Imagem dos resultados da análise de integridade e qualidade da amostra ASC_3 adquiridas no <i>software</i> Agilent 2100 Bioanalyzer System Expert.....	164
<b>Figura A4.</b> Imagem dos resultados da análise de integridade e qualidade da amostra FIB_1 adquiridas no <i>software</i> Agilent 2100 Bioanalyzer System Expert.....	165
<b>Figura A5.</b> Imagem dos resultados da análise de integridade e qualidade da amostra FIB_2 adquiridas no <i>software</i> Agilent 2100 Bioanalyzer System Expert.....	166
<b>Figura A6.</b> Imagem dos resultados da análise de integridade e qualidade da amostra FIB_3 adquiridas no <i>software</i> Agilent 2100 Bioanalyzer System Expert.....	167

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1-</b> Parâmetros da seleção <i>in vitro</i> de aptâmeros de DNA.....	49
<b>Tabela 2-</b> Sequências de nucleotídeos dos aptâmeros candidatos selecionados para validação com culturas celulares <i>in vitro</i> .....	72
<b>Tabela 3-</b> Dados obtidos a partir do enriquecimento dos quarto aptâmeros selecionados quanto ao número de <i>reads</i> , enriquecimento e conteúdo GC (%).....	75
<b>Tabela 4-</b> Lista dos genes diferencialmente expressos do RNA-Seq selecionados para validação <i>in vitro</i> .....	103
<b>Tabela 5-</b> Lista dos pares de <i>primers</i> desenhados para amplificação dos genes selecionados.....	105
<b>Tabela 6-</b> Sigla dos genes e relação das concentrações de <i>primers</i> selecionadas para as reações de amplificação por RT-qPCR.....	107
<b>Tabela 7-</b> As amostras sequenciadas apresentaram alta qualidade de <i>base calling</i> nas <i>reads</i> obtidas.....	110
<b>Tabela 8-</b> Sumário do sequenciamento das <i>reads</i> no genoma de referência.....	112
<b>Tabela 9-</b> Distribuição das <i>reads</i> provenientes das amostras de hASC e fibroblastos nas três regiões do genoma.....	113
<b>Tabela 10.</b> Número e porcentagens de genes exibindo níveis diferenciais de expressão, estimados usando fragmentos por quilobase de sequência de transcritos por milhões de pares de bases sequenciados (FPKM).....	114
<b>Tabela 11-</b> Genes com regulação positiva em hASC avaliados por RT-qPCR.....	123
<b>Tabela 12-</b> Genes com regulação negativa em hASC avaliados por RT-qPCR.....	125
<b>Tabela A1-</b> Análise de qualidade da amostra ASC_1.....	162
<b>Tabela A2-</b> Análise de qualidade da amostra ASC_2.....	163
<b>Tabela A3-</b> Análise de qualidade da amostra ASC_3.....	164
<b>Tabela A4-</b> Análise de qualidade da amostra FIB_1.....	165
<b>Tabela A5-</b> Análise de qualidade da amostra FIB_2.....	166
<b>Tabela A6-</b> Análise de qualidade da amostra FIB_3.....	167

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

*ABCG2*: *ATP binding cassette subfamily G member 2 (Junior blood group)* / Subfamília de cassete de ligação ao ATP G membro 2 (grupo sanguíneo júnior)

*ACAN*: *aggrecan*/ agrocan

*ADIPOQ*: *adiponectin, C1Q and collagen domain containing*/ adiponectina, C1Q e domínio contendo colágeno

*AKT*: proteína quinase B

*ALDH1A1*: *aldehyde dehydrogenase 1 family member A1*/ aldeído desidrogenase 1 membro da família A1

*ALDH2*: *aldehyde dehydrogenase 2 family member* / aldeído desidrogenase 2 membro da família

*ALPI*: *alkaline phosphatase, intestinal*/ fosfatase alcalina, intestinal

*ALPL*: *alkaline phosphatase, biomineralization associated*/ fosfatase alcalina, biomineralização associada

*AMs*: células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo

*ANLN*: *anillin actin binding protein*/ proteína de ligação de actina de anilina

*AP*: aptâmero

*APC*: *APC regulator of WNT signaling pathway*/ Regulador de APC da via de sinalização WNT

*ASC*: células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo

*AT1*: sequência derivada do genoma de *Arabidopsis thaliana*

*ATP*: adenosina trifosfato

*AXIN1*: *axin 1*/ axin 1

*B4GALNT1*: *beta-1,4-N-acetyl-galactosaminyltransferase 1*/ beta-1,4-N-acetil-galactosaminiltransferase 1

*BCIP*: 5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato p-toluidina

*BGLAP*: *bone gamma-carboxylglutamate protein*/ proteína gama-carboxiglutamato óssea

*BIRC5*: *baculoviral IAP repeat containing 5*/ repetição 5 de IAP baculoviral

*BM- MSC*: células-tronco mesenquimais derivadas de medula óssea (*bone marrow mesenchymal stem cells*)

*BMP1*: *bone morphogenetic protein 1*/ proteína morfogenética óssea 1

*BMP2*: *bone morphogenetic protein 2*/ proteína morfogenética óssea 2

*BMP3*: *bone morphogenetic protein 3*/ proteína morfogenética óssea 3

*BMs*: células-tronco derivadas da medula óssea

*BRASIL*: *Biopanning and Rapid Analysis of Selective Interactive Ligands*/ Biopanning e Análise Rápida de Ligantes Interativos Seletivos

*BSA*: albumina do soro bovino

*BST1*: ADP-ribosyl cyclase/ ADP-ribosil ciclase

*CEBPa*: CCAAT Enhancer Binding Protein Alpha/ Proteína Alfa de Ligação ao Potenciador CCAAT

CAAE: Certificado de Apresentação para Apreciação Ética

*CALD1*: caldesmon 1/ caldesmon 1

cAMP: Adenosine 3',5'-cyclic monophosphate/ Monofosfato de Adenosina 3', 5'-cíclico

*CAV1*: caveolin 1/ caveolin 1

*CBX8*: chromobox 8/ chromobox 8

*CCNA2*: cyclin A2/ ciclina A2

*CCNB1*: cyclin B1/ ciclina B1

*CCND1*: cyclin D1/ ciclina D1

*CCND2*: cyclin D2/ ciclina D2

*CCNE1*: cyclin E1/ ciclina E1

CD: cluster of differentiation/ cluster de diferenciação

*CD36*: CD36 molecule/ molécula CD36

*CD3D*: CD3d molecule/ molécula CD3d

*CD4*: CD4 molecule/ molécula CD4

*CD44*: CD44 molecule (Indian blood group)/ molécula CD44 (grupo sanguíneo Indiano)

*CD8A*: CD8a molecule/ molécula CD8a

*CD8B*: CD8b molecule/ molécula CD8b

*CDC25B*: cell division cycle 25B/ ciclo de divisão celular 25B

*CDC42*: cell division cycle 42/ ciclo de divisão celular 42

*CDC48*: cell division cycle associated 8/ ciclo de divisão celular associado 8

*CDH1*: cadherin 1/ caderina 1

*CDH2*: cadherin 2/ caderina 2

*CDK1*: cyclin dependent kinase 1/ ciclina dependente de quinase 1

cDNA: DNA complementar

Cell-SELEX: Evolução Sistemática de Ligantes por Enriquecimento Exponencial baseada em células (*Cell Based Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment*)

*CENPF*: centromere protein F/ proteína centromérica F

CFU-Fs: Unidades formadoras de colônias fibroblásticas

cGMP: cyclic guanosine monophosphate/ monofosfato de guanosina cíclico

*CKS1B*: CDC28 protein kinase regulatory subunit 1B/ Subunidade reguladora da proteína quinase CDC28 1B

*COL11A1: collagen type XI alpha 1 chain/* cadeia alfa 1 do colágeno tipo XI  
*COL1A1: collagen type I alpha 1 chain/* cadeia alfa 1 do colágeno tipo I  
*COL1A2: collagen type I alpha 2 chain/* cadeia alfa 2 do colágeno tipo I  
*COL1A3: collagen type III alpha 1 chain/* cadeia alfa 1 do colágeno tipo III  
*COL23A1: collagen Type XXIII alpha 1 chain/* cadeia alfa 1 do colágeno tipo XXIII  
*COL2A1: collagen Type II alpha 1 chain/* cadeia alfa 1 do colágeno tipo II  
*COL4A2: collagen Type IV alpha 2 chain/* cadeia alfa 2 do colágeno tipo IV  
*COL9A1: collagen Type IX alpha 1 chain/* cadeia alfa 1 do colágeno tipo IX  
Cq : Ciclo de quantificação  
CSK: proteína tirosina quinase (*Tyrosine-protein kinase*)  
*CTNNA1: catenin alpha 1/* catenina alfa 1  
*CXCL12: C-X-C Motif Chemokine Ligand 12/* Ligante de Quimiocina do Motivo C-X-C 12  
*DMD: dystrophin/* distrofina  
DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle Medium*  
*DNM1: dynamin 1/* dinamina 1  
dNTPs- desoxinucleotídeos  
DP: papila dermal ou condensado dermal  
DWAT: tecido adiposo branco dérmico  
*EBF2: EBF transcription factor 2/* fator de transcrição 2 de EBF  
*EFEMP1: EGF containing fibulin extracellular matrix protein 1/* Proteína da matriz extracelular de fibulina contendo EGF 1  
EGCs: células germinativas embrionárias  
ESCs: células-tronco embrionárias  
FA: fosfatase alcalina  
*FABP4: fatty acid binding protein 4/* proteína de ligação a ácidos graxos 4  
FAK: *focal adhesion kinase/* quinase de adesão focal  
FBs: fibroblastos dérmicos  
FDR: taxa de falsa descoberta (*false discovery rate*)  
*FGF1: fibroblast growth factor 1/* fator de crescimento de fibroblastos 1  
*FGF2: fibroblast growth factor 2/* fator de crescimento de fibroblastos 2  
*FGF3: fibroblast growth factor 3/* fator de crescimento de fibroblastos 3  
*FGF4: fibroblast growth factor 4/* fator de crescimento de fibroblastos 4  
*FGF5: fibroblast growth factor 5/* fator de crescimento de fibroblastos 5  
*FGFR1: fibroblast growth factor receptor 1/* receptor do fator de crescimento de fibroblastos 1

FIB: fibroblastos dérmicos

*FN1*: fibronectin 1/ fibronectina 1

*FOG2*: *FOG family member 2*/ membro da família FOG 2

FPKM: Número esperado de fragmentos por quilobase de sequência de transcritos por milhões de pares de bases sequenciados

*GAPDH*: *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*/ desidrogenase do gliceraldeído-3-fosfato

GC: pareamento citosina-guanina

GDEs: genes diferencialmente expressos

*GDF2*: *growth differentiation factor 2*/ fator de diferenciação de crescimento 2

*GDF3*: *growth differentiation factor 3*/ fator de diferenciação de crescimento 3

GO: *Gene Ontology*

*GPR37*: *G protein-coupled receptor 37*/ receptor 37 acoplado a proteína G

*GREM1*: *gremlin 1, DAN family BMP antagonist*/ gremlin 1, antagonista de BMP da família DAN

*H2AFZ*: *H2A histone family member Z*/ membro da família Z de histona H2A

H4R3me2a: Dimetilação assimétrica da arginina 3 na histona 4

hASC: células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo humano (*human adipose-derived stem cell*)

*HDAC2*: *histone deacetylase 2*/ histona desacetilase 2

*HELLS*: *helicase, lymphoid specific*/ helicase, linfóide específica

*HMGB1*: *high mobility group box 1*/ grupo de alta mobilidade box 1

*HMGB2*: *high mobility group box 2*/ grupo de alta mobilidade box 2

HSC: células-tronco hematopoiéticas (*hematopoietic stem cell*)

*HSPA9*: *heat shock protein family A (Hsp70) member 9*/ família de proteína de choque térmico A (Hsp70) membro 9

ICB: Instituto de Ciências Biológicas

*IGF1*: *insulin like growth factor 1*/ insulina como fator de crescimento 1

IPA (*Ingenuity Pathway Analysis*)/ Análise de caminho de engenhosidade

iPSCs: células-tronco pluripotentes induzidas

*JAG1*: *jagged canonical Notch ligand 1*/ entalhe canônico entalhado Notch 1

*KAT2A*: *lysine acetyltransferase 2*/ acetiltransferase 2 de lisina

*KAT7*: *lysine acetyltransferase 7*/ acetiltransferase 7 de lisina

*KAT8*: *lysine acetyltransferase 8*/ acetiltransferase 8 de lisina

Kd: constante de dissociação

KEGG: Enciclopédia de Kyoto de Genes e Genomas

*KIF2C*: *kinesin family member 2C*/ membro da família kinesin 2C

*KPNA2*: *karyopherin subunit alpha 2*/ subunidade alfa de carioferina 2  
*LAMC3*: *laminin subunit gamma 3*/ subunidade de laminina gama 3  
*LEP*: *leptin*/ leptina  
LICM: Laboratório de Imunologia Celular e Molecular  
*LMNA*: *lamin A/C*  
*lncRNA*: RNA não codificador longo  
*MATK*: *megakaryocyte-associated tyrosine kinase*/ tirosina quinase associada a megacariócitos  
mESCs: células-tronco embrionárias de camundongo  
*miRNA*: micro-RNA  
*MME*: *membrane metalloendopeptidase*/ metaloendopeptidase de membrana  
*MMP3*: *matrix metallopeptidase 3*/ metalopeptidase 3 de matriz  
mRNA: RNA mensageiro  
MSC: células-tronco mesenquimais (*mesenchymal stem cells*)  
MVI: *Maximum Composite Likelihood*/ Máxima Probabilidade Composta  
*MYOF*: *myoferlin*/ mioferlina  
NBT: Nitroblue tetrazólio clorídrico  
*NCAM1*: *neural cell adhesion molecule 1*/ molécula de adesão celular neural 1  
*NCAPG*: *non-SMC condensin I complex subunit G*/ subunidade não-SMC de condensina I complexa G  
*NEUROG2*: *neurogenin 2*/ neurogenina 2  
NGS: Sequenciamento de nova geração (*Next Generation Sequencing*)  
NTC: *No Template Control* / controle sem modelo  
*OCT4*: *POU class 5 homeobox 1*/ POU classe 5 homeobox 1  
OFSC: células-tronco derivadas de tecido adiposo da órbita ocular humana  
pb: pares de bases  
PBS: tampão salina-fosfato  
PCR: Reação em cadeia da polimerase (*Polymerase chain reaction*)  
*PDE1C*: *phosphodiesterase 1C*/ fosfodiesterase 1C  
PF: fibroblastos papilares  
pH: potencial hidrogeniônico  
PI3K: fosfatidilinositol-3-cinase  
*PLK1*: *polo like kinase 1*/ polo como quinase 1  
*POSTN*: *periostin*/ periostina  
*PPARG*: *peroxisome proliferator activated receptor gamma*/ gamma do receptor ativado por proliferador de peroxissoma

*PRC1*: *protein regulator of cytokinesis 1*/ regulador proteico da citocinese 1  
PSA: Antibiótico antimicótico (Penicilina/Estreptomicina/Anfotericina B)  
qPCR: PCR quantitativa em tempo real (*Real-Time quantitative PCR*)  
R<sup>2</sup>: coeficiente de correlação  
*RBI*: *RB transcriptional corepressor 1*/ Corepressor transcricional RB 1  
RF: fibroblastos reticulares  
RIN: índice de integridade do RNA (*RNA integrity number*)  
RNA- Seq: Sequenciamento de RNA (*RNA Sequencing*)  
*RPL13A*: *ribosomal protein L13a*/ proteína ribossomal L13a  
RT-qPCR: PCR quantitativo em tempo real baseada em transcrição reversa (*Reverse transcription real time quantitative PCR*)  
*RUNX2*: *runt related transcription factor 2*/ fator de transcrição relacionado ao nanico 2  
*S100A4*: *S100 calcium binding protein A4*/ Proteína ligante de cálcio S100 A4  
SCR: sequência randômica (*scrambled*)  
SCRG1: proteína estimuladora de Condrogênese (*Stimulator Of Chondrogenesis 1*)  
*SCRG1*: *stimulator of chondrogenesis 1*/ estimulador de condrogênese 1  
SFB: soro fetal bovino  
*siRNA*: RNA de interferência  
*SOX1*: *SRY-box 1*/ SRY box 1  
*SOX2*: *SRY-box 2*/ SRY box 2  
*SOX9*: *SRY-box 9*/ SRY box 9  
*SP7*: *Sp7 transcription factor*/ fator de transcrição Sp7  
*SPP1*: *secreted phosphoprotein 1*/ fosfoproteína secretada 1  
*TAGLN*: *transgelin*/ transgelina  
TEM: transição epitélio-mesenquimal  
*TERT*: *telomerase reverse transcriptase*/ transcriptase reversa de telomerase  
*TFAP2C*: *transcription factor AP-2 gamma*/ fator de transcrição AP-2 gamma  
*TGFBI*: *transforming growth factor beta induced*/ beta de fator de crescimento transformador induzido  
*TINAGL1*: *tubulointerstitial nephritis antigen like 1*/ antígeno de nefrite tubulointersticial 1  
*TK1*: *thymidine kinase 1*/ quinase de timidina 1  
*tm*: temperatura de dissociação (*Melting temperature*)  
TMs: células-tronco derivadas de tonsila palatina  
*TNNT3*: *troponin T3, fast skeletal type*/ troponina T3, tipo esquelético rápido  
*TOP2A*: *DNA topoisomerase II alpha*/ DNA topoisomerase alfa II

*TPM1: tropomyosin 1/ tropomiosina 1*

*TPM2: tropomyosin 2/ tropomiosina 2*

*UBE2C: ubiquitin conjugating enzyme E2 C/ enzima conjugada de ubiquitina E2 C*

UFMG: Universidade Federal de Minas Gerais

*ZFPM2: zinc finger protein, FOG family member 2/ proteína dedo de zinco, membro da família FOG 2*

*ZRANB1: zinc finger RANBP2-type containing 1/ dedo de zinco tipo RANBP2 1*

# SUMÁRIO

EPÍGRAFE .....	iv
AGRADECIMENTOS .....	v
RESUMO .....	vii
ABSTRACT .....	viii
SUMÁRIO.....	xxi
1 INTRODUÇÃO GERAL .....	1
2 CAPÍTULO I.....	4
CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E FUNCIONAL DE HASC E FIBROBLASTOS DÉRMICOS HUMANOS .....	4
2.1 INTRODUÇÃO .....	5
2.1.1 Células-tronco mesenquimais e células-tronco derivadas de tecido adiposo... 5	5
2.1.2 Fibroblastos dérmicos humanos .....	7
2.1.3 Comparação entre células-tronco mesenquimais e fibroblastos dérmicos humanos.....	9
2.2 OBJETIVOS .....	11
2.2.2 Objetivo Geral .....	11
2.2.3 Objetivos Específicos .....	11
2.3 MATERIAIS E MÉTODOS .....	12
2.3.1 Isolamento e cultivo de células-tronco derivadas de tecido adiposo.....	12
2.3.2 Isolamento e cultivo de fibroblastos dérmicos humanos.....	12
2.3.3 Cultivo das células.....	13
2.3.4 Caracterização do imunofenótipo das células-tronco e fibroblastos humanos. ....	14
2.3.5 Curva de Crescimento de células-tronco derivadas de tecido adiposo e fibroblastos dérmicos em cultivo .....	15
2.3.6 Indução da diferenciação adipogênica em células-tronco e fibroblastos .....	15
2.3.7 Indução da diferenciação osteogênica em células-tronco e fibroblastos..	15
2.3.8 Avaliação da atividade da enzima fosfatase alcalina.....	16
2.3.9 Análises Estatísticas .....	17
2.4 RESULTADOS .....	18

2.4.1	Células-tronco de tecido adiposo e fibroblastos dérmicos humanos são morfolologicamente similares .....	18
2.4.2	O imunofenótipo das células-tronco derivadas de tecido adiposo e fibroblastos dérmicos humanos é semelhante .....	18
2.4.3	O tempo de duplicação dos fibroblastos dérmicos é menor que o tempo de duplicação das células-tronco.....	20
2.4.4	As células-tronco são capazes de se diferenciar em células da linhagem adipogênica, mas o mesmo não ocorre em fibroblastos dérmicos humanos.....	21
2.4.5	As células-tronco são capazes de se diferenciar em células da linhagem osteogênica mas o mesmo não ocorre em fibroblastos dérmicos humanos .....	22
2.4.6	A atividade de fosfatase alcalina das células-tronco é maior em comparação aos fibroblastos dérmicos humanos .....	25
2.4.7	A atividade de fosfatase alcalina é decrescente em uma mistura de células-tronco contendo uma maior porcentagem de fibroblastos .....	27
2.5	DISCUSSÃO .....	29
3-	CAPÍTULO II .....	34
	SELEÇÃO DE APTÂMEROS PARA DISTINÇÃO ENTRE HASC E FIBROBLASTOS DÉRMICOS HUMANOS <i>IN VITRO</i> .....	34
3.1	INTRODUÇÃO .....	35
3.1.1	Aptâmeros: definição, propriedades e aplicações. ....	35
3.1.2	Cell-SELEX .....	38
3.1.3	Seleção de Aptâmeros utilizando culturas de células de mamíferos.....	42
3.2	OBJETIVOS .....	45
3.2.1	Objetivo Geral .....	45
3.2.2	Objetivos específicos.....	45
3.3	MATERIAIS E MÉTODOS .....	46
3.3.1	Cell-SELEX.....	46
3.3.2	Monitoramento do Progresso da Seleção .....	50
3.3.3	Seleção e Validação dos Aptâmeros Candidatos <i>in vitro</i> .....	50
3.3.4	Análises Estatísticas .....	55
3.4	RESULTADOS .....	56
3.4.1	Seleção dos Aptâmeros de DNA .....	56
3.4.2	Análises de bioinformática e seleção de quatro aptâmeros candidatos ....	70
3.4.3	O alinhamento e a comparação das sequências de nucleotídeos dos aptâmeros mostraram que os aptâmeros 1 e 2 formam uma ramificação independente dos aptâmeros 3 e 4.....	71

3.4.4	Os aptâmeros candidatos 1, 2 e 4 apresentaram valores mais próximos de fold de enriquecimento e de conteúdo GC (%) .....	73
3.4.5	Os aptâmeros candidatos assumem estruturas secundárias distintas.....	74
3.4.6	Validação in vitro dos aptâmeros candidatos com culturas de hASC e fibroblastos dérmicos .....	76
3.5	DISCUSSÃO .....	82
4	CAPÍTULO III.....	90
	ANÁLISE COMPARATIVA DA EXPRESSÃO GÊNICA ENTRE HASC E FIBROBLASTOS DÉRMICOS HUMANOS.....	90
4.1	INTRODUÇÃO .....	91
4.2	OBJETIVOS .....	95
4.2.1	Objetivo Geral.....	95
4.2.2	Objetivos específicos.....	95
4.3	MATERIAIS E MÉTODOS .....	96
4.3.1	Isolamento de amostras de hASC e fibroblastos dérmicos provenientes de indivíduos distintos para o Sequenciamento de RNA total (RNA-Seq) .....	96
4.3.2	Controle de qualidade das amostras para RNA-Seq .....	97
4.3.3	Sequenciamento de RNA total e análises de bioinformática .....	97
4.3.4	Validação in vitro dos genes diferencialmente expressos (GDEs) utilizando amostras de hASC e fibroblastos dérmicos humanos provenientes do mesmo indivíduo.....	100
4.3.5	Análise da expressão diferencial dos genes entre hASC e fibroblastos dérmicos humanos.....	106
4.3.6	Análises Estatísticas .....	106
4.4	RESULTADOS .....	107
4.4.1	Resultados obtidos por meio da análise de RNA-Seq.....	107
4.4.2	Validação in vitro de genes diferencialmente expressos de acordo com resultados obtidos no RNA-Seq.....	122
4.5	DISCUSSÃO .....	127
5-	CONCLUSÃO GERAL E PERSPECTIVAS .....	138
6-	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	141
	APÊNDICE I.....	162
	ANEXO I – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA-UFMG.....	168
	ANEXO II- MANUSCRITO.....	169

HUMAN ADIPOSE DERIVED-STEM CELLS AND DERMAL FIBROBLASTS SHOWED DIFFERENT GENE EXPRESSION PROFILE IN AN RNA-SEQ AND QUANTITATIVE REAL-TIME PCR ANALYSIS .....	170
1.1 Abstract.....	171
1.2 Introduction.....	171
1.3 Materials and Methods.....	173
1.3.1 Cells Isolation .....	173
1.3.2 RNA Sequencing and Bioinformatics Analyzes .....	174
1.3.3 Validation of differentially expressed genes using qPCR.....	176
1.4 Results and Discussion .....	177
1.4.1 The quality analysis of the sequenced samples showed accuracy and high quality of base calling .....	177
1.4.2 Sample reads were mapped to the human reference genome .....	177
1.4.3 Principal Component Analysis (PCA) and Pearson Correlation Coefficient (R <sup>2</sup> ) highlighted differences and similarities between ASC and FIB biological replicates.....	178
1.4.4 Bioinformatics analysis showed more than 2,000 differentially expressed genes between human adipose-derives stem cells and dermal fibroblasts.....	179
1.4.5 Upregulated and downregulated genes in ASC were classified using Gene Ontology (GO) .....	180
1.4.6 Differentially expressed genes are involved in several enriched pathways analyzed by KEGG.....	181
1.4.7 Genes were validated as upregulated and downregulated in ASC in comparison with FIB .....	181
1.5 Conclusions.....	188
1.6 Conflicts of Interest .....	189
1.7 Funding Statement .....	189
1.8 Supplementary Materials - Tables: .....	189
1.9 References.....	189
1.10 Figure Legends .....	196

# 1 INTRODUÇÃO GERAL

As células-tronco mesenquimais (*mesenchymal stem cell* - MSC) foram descritas por FRIEDENSTEIN e colaboradores (1968) como uma população clonogênica de células aderentes e altamente proliferativas. Os autores observaram que essas células apresentavam morfologia fibroblastóide, eram capazes de formar colônias quando mantidas em cultivo e também de se diferenciar em células da linhagem osteogênica. As MSC foram primeiramente isoladas de frações da medula óssea. Entretanto, sabe-se atualmente que são encontradas nos mais variados tecidos do corpo humano. Essas células-tronco adultas possuem como propriedades principais a capacidade de autorrenovação e a multipotência, promovendo a regeneração tecidual (BYDLOWSKI et al., 2009). Nos últimos anos, a pesquisa com células-tronco tem avançado bastante com a aplicação e o isolamento de células-tronco provenientes dos mais variados tecidos, como medula óssea, polpa dentária, cordão umbilical, tecido adiposo, entre outros. O tecido adiposo exerce um papel crucial para a homeostase no organismo, funcionando como uma reserva energética, desempenhando também funções metabólicas, termogênicas e regenerativas (HUANG et al., 2013).

ZUK e colaboradores (2001), trabalhando com produtos de lipoaspiração, obtiveram na fração estromal do tecido adiposo, uma população de células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo humano (*human adipose-derived stem cells* - hASC) multipotentes e de origem mesodérmica. Devido às suas propriedades, pode-se afirmar que as hASC são uma população de células atrativas para a medicina regenerativa, não só por sua fácil obtenção e multipotência, mas também pela participação no reparo tecidual, homeostase e imunomodulação (ZUK et al., 2002; HUANG et al., 2013; ZUK, 2013; CHOUDHERY et al., 2015). A partir da obtenção de hASC descrita por ZUK, outros grupos de pesquisa trabalharam com diversos protocolos para isolamento. O método mais comum de isolamento descrito na literatura envolve digestão enzimática do lipoaspirado para liberar a fração estromal vascular, que inclui células estromais e endoteliais, pericitos, várias células sanguíneas vermelhas e brancas e as células-tronco/progenitoras. As enzimas envolvidas no isolamento dessas células são variadas e incluem dispase, tripsina e, mais comumente, collagenase (BANYARD et al., 2015). Após lavagens e sucessivas passagens, uma população homogênea de hASC pode ser eficientemente isolada dos demais componentes dessa

fração. A utilização das hASC em terapia celular *in vivo* mostrou que essas células apresentam diversas funções, como a capacidade de construção de matriz extracelular, modulação do sistema imune, vascularização, regeneração de ossos, reparo tecidual e funcional do coração, regeneração da fisiologia hepática e renal, recuperação da função neuronal, regeneração de feridas e músculos, recuperação de lesões de mama provocadas por radioterapia, entre outras (ZUK, 2013; YU et al., 2018). Diferentes estratégias são atualmente usadas como modelos para terapia celular, sendo alguns dos mais bem estudados os transplantes ou injeções de células em locais lesionados e a engenharia de tecidos (ZUK, 2013).

Uma preocupação a respeito da aplicação terapêutica das células-tronco é o risco de contaminação com outros tipos de células, especialmente fibroblastos. Um estudo pré-clínico demonstrou que a contaminação com fibroblastos da derme afetou o resultado clínico de terapia celular em um modelo experimental de doença de Parkinson. Evidências sugerem que os fibroblastos anularam os efeitos benéficos das células-tronco promovendo um efeito neurotóxico (PEREIRA et al., 2011). A contaminação com fibroblastos pode levar a uma série de prejuízos para a terapia, tais como: a diminuição na capacidade de diferenciação das células-tronco e a indução de senescência. A eliminação de fibroblastos de culturas de células-tronco mesenquimais aumenta o rendimento de células-tronco obtidas assim como o potencial de diferenciação e previne a formação de tumores após o transplante (PROCKOP et al., 2009; KUNDROTAS, 2012).

Os fibroblastos extraídos da derme são uma população dinâmica e diversa de células. As diferenças fenotípicas entre os tipos de células presentes nessa população estão relacionadas principalmente à produção e organização da matriz extracelular, formação do folículo piloso, além da produção de fatores de crescimento, citocinas e participação em respostas inflamatórias do organismo (SORRELL & CAPLAN, 2004; FLAVELL et al., 2008.; SENNETT et al., 2012). Embora todos os fibroblastos dérmicos aparentem ser morfologicamente similares, eles têm distintas identidades em relação à posição e ao local anatômico que ocupam, exercendo um papel relevante na resolução de feridas e formação de cicatrizes (DRISKELL et al., 2013; THULABANDU et al., 2018). Em condições patológicas, os fibroblastos atuam como mediadores da fibrose que ocorre em resposta à injúria do tecido e inflamação crônica (KENDALL & FEGHALI-BOSTWICK, 2014).

O desafio de encontrar marcadores específicos capazes de distinguir células-tronco mesenquimais e fibroblastos dérmicos humanos tem intrigado a comunidade científica. Apesar de alguns marcadores já terem sido propostos na literatura, a exemplo da indução da diferenciação e a avaliação da expressão gênica, ainda não foi comprovado se esses são válidos para todas as células-tronco mesenquimais, visto que alguns dos marcadores utilizados na diferenciação entre ambas as células foram observados somente em células-tronco derivadas da medula óssea.

Devido à importância das células-tronco mesenquimais na medicina regenerativa, é importante ressaltar que o problema da contaminação das células-tronco com fibroblastos é uma razão para a busca por uma detecção eficiente dessas células *in vitro*, antes das mesmas serem utilizadas em experimentos de terapia celular *in vivo*. Dessa forma, o presente trabalho propõe estratégias para a caracterização e a diferenciação entre as hASC e os fibroblastos da derme humana, utilizando uma combinação de diferentes métodos, sendo esses: a caracterização fenotípica, a indução de diferenciação celular, a avaliação da atividade de fosfatase alcalina (FA) e da expressão gênica (RNA Seq e RT-qPCR) e, de forma inédita, a seleção de aptâmeros Evolução Sistemática de Ligantes por Enriquecimento Exponencial baseada em células (*Cell-SELEX*). O processo de seleção de aptâmeros de DNA torna-se uma ferramenta importante na busca por biomarcadores eficientes e válidos que possam diferenciar ambas as células. Levando-se em consideração a alta especificidade e afinidade dos aptâmeros pelo seu alvo, abre-se uma perspectiva de que a identificação das hASC em uma mistura com fibroblastos será mais eficaz e rápida. Portanto, espera-se que a estratégia adotada nesse trabalho contribua para uma melhor compreensão da natureza dessas células e das principais características que as distinguem.

Essa tese é composta por três capítulos: o primeiro capítulo refere-se à caracterização fenotípica de hASC e fibroblastos dérmicos utilizando marcadores propostos pela Sociedade Internacional de Terapia Celular, curva de crescimento, a indução da diferenciação adipogênica e osteogênica e a avaliação da atividade de fosfatase alcalina. O segundo capítulo aborda a seleção de aptâmeros com alta afinidade por hASC, utilizando a técnica *Cell-SELEX* e a validação *in vitro*. O terceiro capítulo descreve os resultados do sequenciamento de RNA de amostras de células-tronco e fibroblastos provenientes de indivíduos distintos e a análise comparativa da expressão diferencial de genes por PCR quantitativa (RT-qPCR), assim como a análise das principais vias enriquecidas nessas células.

## **2 CAPÍTULO I**

# **CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E FUNCIONAL DE HASC E FIBROBLASTOS DÉRMICOS HUMANOS**

## 2.1 INTRODUÇÃO

### 2.1.1 Células-tronco mesenquimais e células-tronco derivadas de tecido adiposo

As células-tronco são células indiferenciadas com capacidade de autorrenovação, ou seja, podem se multiplicar por longos períodos sem se especializar em um tipo celular definido. Elas proporcionam uma reposição de células nos tecidos, além de desempenharem um papel regenerativo em situação de injúria. Dentre os tipos celulares descritos na literatura, destacam-se as células-tronco embrionárias, obtidas do estágio de blástula de embriões de mamíferos e as células-tronco adultas, assim denominadas por estarem presentes na vida pós-natal. Entre os tecidos conhecidos por apresentarem células-tronco adultas, a medula óssea foi a mais estudada como fonte tanto de células-tronco hematopoiéticas (*hematopoietic stem cell* - HSC) quanto de células-tronco mesenquimais (*mesenchymal stem cell* - MSC) (BYDLOWSKI et al., 2009).

As MSC foram descritas primeiramente por FRIEDESTEIN e colaboradores em 1968, como uma população de células clonogênicas aderentes, em formato de espícula, com grande capacidade proliferativa, definidas como formadoras de colônias fibroblásticas (CFU-Fs). Em 1991, devido à capacidade de autorrenovação e diferenciação, as células estromais de medula óssea foram denominadas de células-tronco mesenquimais (MSC) por CAPLAN. Em 2005, a Sociedade Internacional de Terapia Celular propôs o termo células estromais mesenquimais multipotentes, mantendo a sigla MSC (FRIEDESTEIN et al., 1968; HORWITZ et al., 2005).

Diversos trabalhos na literatura mostram que as MSC podem diferenciar-se em linhagens germinativas diferentes daquelas relacionadas à linhagem mesodérmica. Além de se diferenciarem em osteoblastos, condroblastos e adipócitos, essas células também teriam o potencial de diferenciação endodérmica e neuroectodérmica gerando, por exemplo, neurônios e hepatócitos (KOLF et al., 2007). Em relação às suas funções, as MSC proveem suporte estrutural e regulam a passagem de células através dos tecidos. Embora essas células tenham uma capacidade de diferenciação mais limitada que as células-tronco embrionárias, as quais são consideradas totipotentes, as mesmas apresentam como vantagens a facilidade de isolamento e de propagação em cultura e o fato de não serem imunogênicas, devido à baixa expressão de MHC de classe II e de moléculas coestimulatórias (LE BLANC & RINGDÉN, 2005).

Estudos afirmam que as MSCs estão associadas à parede dos vasos sanguíneos contribuindo para a manutenção da homeostasia tecidual e do sistema imune, por meio de uma proteção dos tecidos injuriados contra respostas imunes exacerbadas, promovendo reposição celular e regeneração tecidual (CRISAN et al., 2008). Outros trabalhos presentes na literatura relatam que as MSC apresentam propriedades importantes de imunossupressão e imunorregulação, sendo capazes de modular a função de células do sistema imune inato e adaptativo, podendo induzir tolerância imune (NAUTA & FIBBE, 2007).

Sabe-se atualmente que as MSC podem ser encontradas não somente na medula óssea, mas também nos tecidos mesenquimais presentes em todos os órgãos do corpo. Células com características de células-tronco mesenquimais já foram isoladas de líquido amniótico (DE COPPI et al., 2007), membrana sinovial (DE BARI et al., 2001), sangue menstrual (DU et al., 2016), polpa dental (GRONTHOS et al., 2001), cordão umbilical (SECCO et al., 2008) e tecido adiposo (ZUK et al., 2001), entre outros tecidos.

O tecido adiposo apresenta a vantagem de prover uma maior quantidade de células-tronco do que a medula óssea, viabilizando a obtenção de uma cultura *in vitro* com maior facilidade. As hASC exibem algumas diferenças no transcriptoma e proteoma quando comparadas às células-tronco derivadas de medula óssea (*BM-MSC – bone marrow mesenchymal stem cells*), assim como apresentam uma capacidade superior de diferenciação e imunomodulação por meio da secreção de fatores de crescimento e citocinas que controlam a resposta imune (STRIOGA et al., 2012). Inicialmente isoladas por ZUK e colaboradores (2001), apresentam morfologia em formato de espícula ou fibroblastóide, são capazes de autorrenovação e formação de colônias (BOURIN et al., 2013). Estas células também apresentam potencial de se diferenciarem em várias linhagens celulares derivadas dos três folhetos embrionários (endoderme, mesoderme e ectoderme), tais como: adipócitos, osteócitos, condrócitos, miócitos, neurônios, células hepáticas e pancreáticas, dentre outras (GRONTHOS et al., 2001; ZUK et al., 2001; ERICKSON et al., 2002; SAFFORD et al., 2002; ZUK et al., 2002; GIMBLE et al., 2013; ANGHILERI et al., 2008; BOURIN et al., 2013; HUANG et al., 2013; ZUK, 2013).

Em relação às suas características, as hASC possuem marcadores em comum com outras MSC, incluindo a marcação positiva para CD105, CD90, CD73 e CD44 e marcação negativa para CD45 e CD31. As hASC também podem ser distinguidas das células-tronco derivadas da medula óssea pela marcação positiva para CD36 e negativa

para CD106. Outros marcadores positivos como CD13 e CD29 e negativos como CD235a e CD11b podem ser utilizados para sua caracterização por citometria de fluxo, de acordo com recomendações da Sociedade Internacional de Terapia Celular (ISCT) (BOURIN et al., 2013). A presença de no mínimo dois marcadores positivos e dois marcadores negativos é necessária para a confirmação do fenótipo tronco mesenquimal (BANYARD et al., 2015).

As hASC também podem ser avaliadas quanto a capacidade de diferenciação adipogênica, osteogênica e condrogênica após indução com meios de cultura específicos. Colorações especiais para cada tipo de diferenciação indicam mudanças fenotípicas nas células após a incubação com esses meios indutores. Além disso, a expressão de genes relacionados à diferenciação adipogênica (*ADIPOQ*, *LEP*, *PPARG*, *C/EBP $\alpha$* , *FABP4*), osteogênica (*ALPL*, *SPP1*, *BGLAP*, *SP7*, *RUNX2*) e condrogênica (*ACAN*, *COL2A1*, *SOX9*) pode ser verificada por reações de amplificação (BOURIN et al., 2013).

### **2.1.2 *Fibroblastos dérmicos humanos***

Os fibroblastos são células mesenquimais, em formato de espícula, capazes de aderirem ao plástico, que exercem um papel importante na manutenção, desenvolvimento e reparo tecidual. Essas células proveem força mecânica aos tecidos ao produzirem matriz extracelular e são caracterizadas pela ausência de marcadores epiteliais, vasculares e da linhagem leucocitária (FLAVELL et al., 2008).

Em relação às suas características principais, os fibroblastos estão presentes em abundância no estroma tecidual e são capazes de secretar e de responder a fatores de crescimento, participando de uma rede de interações parácrinas que mantém a homeostase de tipos celulares adjacentes. Essas interações regulam a morfogênese das estruturas epiteliais e endoteliais em tecidos e, como consequência, os fibroblastos desempenham um papel crítico durante o desenvolvimento tecidual, diferenciação e reparo tecidual, incluindo dos tecidos linfoides (FLAVELL et al., 2008). Além disso, foi demonstrado que essas células contribuem para a qualidade, quantidade e duração do infiltrado inflamatório, assim como atuam na resolução da inflamação retirando sinais de sobrevivência e normalizando gradientes de quimiocinas (BUCKLEY et al., 2001; PARSONAGE et al., 2005).

Na literatura, foram descritas três origens celulares distintas dos fibroblastos: a partir do mesênquima primário, da transição epitélio-mesenquimal (TEM) e de precursores derivados da medula óssea. É amplamente aceito que a origem principal é a partir do mesênquima primário e que, mediante estímulos, os fibroblastos proliferam para gerar novas células. Quanto à transição epitélio-mesenquimal, os fibroblastos podem ser derivados após um estresse epitelial como inflamação e lesão tecidual. Nessa situação, ocorreria uma desagregação das células epiteliais e um remodelamento completo das células em movimento, com perda de polaridade, junções aderentes e filamentos de queratina. A hipótese da TEM contribui para a crescente premissa de que os fibroblastos compõem uma população heterogênea muito mais ativa de células do que se pensava inicialmente (FLAVELL et al., 2008). Outros estudos sugeriram que os fibroblastos podem ser derivados de células precursoras da medula óssea, que circulam no sangue, sendo denominadas fibrócitos (PHILLIPS et al., 2004; FLAVELL et al., 2008). Essas células representam 0,05% das células sanguíneas circulantes e derivam de monócitos CD14<sup>+</sup> circulantes no sangue periférico.

Os fibroblastos dérmicos são os principais componentes da derme, sendo células responsáveis pela produção de matriz extracelular, contribuindo também para a formação e ciclagem do folículo capilar (SENNETT et al., 2012). Essas células são capazes de se comunicar com as células adjacentes, regulando a fisiologia da pele (SORRELL & CAPLAN, 2004). Células progenitoras embrionárias de fibroblastos podem potencialmente se diferenciar em fibroblastos papilares superiores (PF), fibroblastos reticulares inferiores (RF), papila dermal ou condensado dermal (DP) e adipócitos intradérmicos ou tecido adiposo branco dérmico (DWAT). A via Wnt/  $\beta$ -catenina é a via de sinalização mais precoce ativada em células progenitoras de fibroblastos e é essencial para a diferenciação terminal; porém, as vias que especificam cada tipo de célula derivada das progenitoras não são conhecidas (CHEN et al., 2012; DRISKELL et al., 2015). Alguns tipos de fibroblastos são mediadores centrais do acúmulo patológico de fibrose. Além disso, atuam na proliferação e diferenciação celular que ocorre em resposta à lesão tecidual prolongada e à inflamação crônica. Os miofibroblastos são o ápice do fenótipo fibrótico, exibindo uma produção exagerada de matriz extracelular e sensibilidade a sinais químicos, como citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento. Além da produção de matriz, essas células também atuam na inflamação e angiogênese que se entrecruzam com o processo de fibrose (KENDALL & FEGHALI-BOSTWICK, 2014). Assim, embora todos os fibroblastos dérmicos

aparentem ser morfológicamente similares, eles têm distintas identidades em relação à posição e ao local anatômico que ocupam, exercendo um papel relevante na resolução de feridas e formação de cicatrizes (DRISKELL et al., 2013; THULABANDU et al., 2018).

### ***2.1.3 Comparação entre células-tronco mesenquimais e fibroblastos dérmicos humanos***

Embora as células-tronco mesenquimais e os fibroblastos dérmicos humanos tenham sido bem estudados, as diferenças entre esses dois tipos celulares ainda não é bem compreendida. Ambas as células possuem aderência ao plástico e morfologia em formato de espícula, além de expressarem CD29, CD44, CD71, CD73, CD90 e CD105 como marcadores em comum (LORENZ et al., 2008; ALT et al., 2011). Os marcadores hematopoiéticos e endoteliais CD14, CD31 e CD45 também estão ausentes em ambos os tipos celulares (LORENZ et al., 2008; HALFON et al., 2011).

HALFON e colaboradores (2011) definiram CD106, CD146 e ITGA11 como marcadores específicos de MSC, e CD10 e CD26 como marcadores específicos de fibroblastos. Entretanto, os autores afirmam que 16,7% dos fibroblastos expressam ITGA11 em sua superfície em comparação a 51,4% das MSC em passagens iniciais. Aproximadamente 5% dos fibroblastos também são CD146 positivos em contraste com 91,7% das MSC que expressam essa molécula. Dessa forma, pode-se observar que a especificidade desses marcadores não é totalmente exclusiva das MSC. Os marcadores CD10 e CD26 também foram encontrados na superfície celular de MSC derivadas de medula óssea em porcentagens variáveis: 16 a 35% e 40 a 78%, respectivamente (CAPELLESSO-FLEURY et al., 2010). Portanto, não podem ser considerados totalmente exclusivos de fibroblastos. O marcador CD106 ou VCAM-1 é uma proteína responsável pelo controle da adesão leucócito-endotélio e pela transdução de sinal na inflamação. Essa proteína não foi encontrada na superfície celular de fibroblastos (CAPELLESSO-FLEURY et al., 2010; HALFON et al., 2011) e sua expressão ocorre somente em MSC derivadas da medula óssea. Assim como os fibroblastos, as hASC são negativas para esse marcador, conforme relatado anteriormente. Entre outros marcadores positivos relacionados às hASC na literatura e que podem ser usados para distinguí-las dos fibroblastos, destacam-se: CD13, CD73, CD90, CD105, CD10 e CD36 (BOURIN et al., 2013).

Em relação às propriedades de cada tipo celular, a capacidade de diferenciação e formação de colônias são características consideradas exclusivas das MSC e não estão presentes em fibroblastos (ALT et al., 2011; KUNDROTAS, 2012). MARTINS e colaboradores (2014) sugeriram que a expressão e atividade da enzima fosfatase alcalina, além dos ensaios de diferenciação celular, são confiáveis para a distinção entre MSC derivadas da gordura palpebral e fibroblastos derivados da pele da pálpebra humana. Porém, há uma controvérsia na literatura a respeito do potencial de diferenciação dos fibroblastos. Em comparação às MSC, os fibroblastos são considerados como células terminalmente diferenciadas, responsáveis pela síntese e remodelamento da matriz extracelular, sendo incapazes de se diferenciarem em outros tipos de células (BRENDEL et al., 2005; ALT et al., 2011). Entretanto, alguns autores afirmam que fibroblastos da pele e também de outras origens (derme da glândula, tecido bronquial e uterino humano) podem se diferenciar em adipócitos, condrócitos e osteócitos (HANIFFA et al., 2007; CHEN et al., 2007; KIM et al., 2008; STRAKOVA et al; 2008; HEMATTI, 2012; HEO et al., 2016). Esses resultados controversos encontrados podem ser atribuídos à contaminação das culturas primárias com MSC, impossibilitando a real distinção das propriedades dessas células (ALT et al., 2011; KUNDROTAS, 2012). Além disso, a maioria dos estudos de comparação entre MSC e fibroblastos foi desenvolvida utilizando células disponíveis comercialmente, de fundo genético desconhecido e que, dificilmente, foram isoladas a partir do mesmo doador (JÄÄGER & NEUMAN, 2011).

Como citado anteriormente, outra importante característica associada ao fenótipo de células-tronco é a presença de atividade enzimática. A fosfatase alcalina é descrita como um importante marcador de células indiferenciadas e foi observada uma baixa expressão do gene que codifica essa proteína, além de uma baixa atividade enzimática, em fibroblastos (MARTINS et al., 2014). Esse fenótipo pode ser justificado pelo fato dos fibroblastos serem células terminalmente diferenciadas, não sendo capazes de se converter em outros tipos de células (BAE et al., 2009; CAPELLESSO-FLEURY et al., 2010; ALT et al., 2011).

Dessa forma, o primeiro capítulo desse trabalho está relacionado ao estudo da caracterização fenotípica, indução da diferenciação e avaliação da atividade de fosfatase alcalina como possíveis estratégias para a caracterização e distinção entre hASC e fibroblastos dérmicos humanos.

## **2.2 OBJETIVOS**

### **2.2.2 *Objetivo Geral***

Utilizar estratégias moleculares para a caracterização e a distinção entre células-tronco derivadas de tecido adiposo e fibroblastos dérmicos humanos *in vitro*.

### **2.2.3 *Objetivos Específicos***

- a) Realizar a caracterização do fenótipo das hASC e fibroblastos humanos;
- b) Induzir as diferenciações adipogênica e osteogênica nas hASC e fibroblastos humanos;
- c) Estudar a atividade de fosfatase alcalina em ambas as células;

## **2.3 MATERIAIS E MÉTODOS**

### ***2.3.1 Isolamento e cultivo de células-tronco derivadas de tecido adiposo***

O tecido adiposo humano foi obtido conforme o consentimento de pacientes saudáveis submetidos à cirurgia de lipoaspiração ou abdominoplastia, de acordo com as normas aprovadas pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG (CAAE: 02508018.1.0000.5149). As amostras foram coletadas em seringas estéreis e levadas ao Laboratório de Imunologia Celular e Molecular (LICM) - ICB/ UFMG para processamento. Nesse projeto, foram extraídas amostras de células de aproximadamente 20 pacientes do sexo feminino.

O protocolo de extração foi adaptado de ZUK e colaboradores (2001). Em capela de fluxo laminar, o lipoaspirado foi centrifugado por 10 minutos a 300 xg em PBS (tampão salina-fosfato) para lavagem. As porções contendo óleo, células sanguíneas e PBS foram retiradas e o restante do tecido contendo gordura foi tratado para digestão da matriz extracelular com solução de colagenase tipo I 0,1 % (Life Technologies) em PBS, por 1 hora, em estufa a 37 °C e 5% CO<sub>2</sub>. Após 1 hora, o tubo foi centrifugado a 300 xg por 10 minutos. Ao final da centrifugação, o sobrenadante contendo a fração adipocitária foi desprezado e o precipitado contendo a fração estromal vascular foi ressuspendido em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium high-glucose*, Sigma-Aldrich) suplementado com 10% SFB (soro fetal bovino) e transferido para garrafas de cultura celular T-25 (Sarstedt), que foram mantidas na estufa. Quando as células atingiram aproximadamente 90% de confluência, o meio de cultura foi retirado, as células foram lavadas novamente com PBS e tratadas com 0,5 mL de tripsina 0,05% EDTA (Gibco), por 5 minutos. Após a ação da tripsina, essa foi inativada com meio DMEM 10% SFB e a suspensão formada foi dividida em novas garrafas de cultura celular T-75 cm<sup>2</sup>. As células foram expandidas, dessa maneira, até a 4<sup>a</sup> ou 5<sup>a</sup> passagem, para serem utilizadas nos experimentos.

### ***2.3.2 Isolamento e cultivo de fibroblastos dérmicos humanos***

As amostras de pele humana foram doadas por pacientes que passaram por procedimento de abdominoplastia, segundo normas aprovadas pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG (CAAE: 02508018.1.0000.5149). As amostras foram cortadas com o auxílio de uma tesoura e a pele foi separada do tecido adiposo subcutâneo utilizando-

se tesoura e pinça cirúrgicas. A pele foi, então, cortada em pequenos fragmentos de aproximadamente 0,5 cm<sup>2</sup>. Esses fragmentos foram incubados *overnight* a 4 °C em placa de cultura (Sarstedt) contendo solução de dispase (Sigma- Aldrich) 250 U/mL. Posteriormente, foi feita a separação da derme e da epiderme com a pinça cirúrgica. A epiderme foi descartada e os fragmentos de derme incubados em um tubo plástico cônico de 15 mL contendo solução de colagenase a 0,1 % (Life Technologies), por 3 horas, em estufa a 37 °C e 5% CO<sub>2</sub>. Após o tempo de digestão enzimática, o tubo contendo os fragmentos foi centrifugado a 300 xg por 10 minutos. Ao final da centrifugação, o precipitado contendo a fração celular foi ressuspensionado em meio de cultura e transferido para garrafas de cultura celular T-25 cm<sup>2</sup> (Sarstedt), que foram mantidas na estufa a 37 °C e 5% CO<sub>2</sub>. Quando as células atingiram aproximadamente 90% de confluência, o meio de cultura foi retirado, as células foram lavadas com PBS e tratadas com 0,5 mL de tripsina 0,05% EDTA (Gibco), por 5 minutos. Após a ação da tripsina, essa foi inativada com meio DMEM 10% SFB e a suspensão formada foi dividida em novas garrafas de cultura celular T-75 cm<sup>2</sup>. Assim como as células-tronco, a cultura de fibroblastos foi expandida, dessa maneira, até a 4<sup>a</sup> ou 5<sup>a</sup> passagem, para realização dos experimentos. O protocolo de extração dos fibroblastos foi adaptado de AASEN & BELMONTE (2010).

### **2.3.3 Cultivo das células**

As hASC e fibroblastos dérmicos humanos foram isolados e cultivados em meio DMEM (Sigma-Aldrich) suplementado com 5 mmol/L de bicarbonato de sódio (Vetec); 100 U/mL de penicilina; 0,1 mg/mL de estreptomicina e 0,25 µg/mL de anfotericina B (PSA - Sigma-Aldrich). O pH do meio foi ajustado para 7,2 e, em seguida, os meios foram filtrados com membrana 0,22 µm (Millipore). A suplementação foi realizada com 10% de soro fetal bovino.

A lavagem das culturas foi realizada com tampão salina-fosfato (PBS) 0,15 mol/L composto por 8 g de NaCl, 0,2 g de KCl, 1,15 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, e 0,2 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> diluídos em 1 litro de água MiliQ. O pH foi ajustado para 7,2 e, em seguida, a solução foi filtrada com membrana 0,22 µm (Millipore).

### **2.3.4 Caracterização do imunofenótipo das células-tronco e fibroblastos humanos**

As células-tronco e os fibroblastos dérmicos foram caracterizados por citometria de fluxo por meio da análise da expressão das moléculas de superfície celular CD105 e CD90, marcadores comuns de células-tronco mesenquimais, conforme definição da Sociedade Internacional de Terapia Celular (BOURIN et al., 2013). Para verificar a existência de contaminações na cultura com células-tronco hematopoiéticas, também foi analisada a presença das moléculas CD11b e CD45, presentes na superfície desse tipo celular.

#### **2.3.4.1 Marcação celular com anticorpos primário e secundário**

As células-tronco e fibroblastos foram colocados em tubos cônicos, de 1,5 mL, na densidade de  $5 \times 10^5$  a  $1 \times 10^6$  células. Inicialmente, as células foram incubadas com a solução de bloqueio 1% BSA e 5% soro de cabra por 1 hora. Após centrifugação, foram expostas a 50  $\mu$ L de solução de anticorpo primário (diluição 1:50) e incubadas à 4 °C, por 30 minutos. Após a incubação, as células foram centrifugadas para o descarte da solução inicial. Em seguida, as células foram incubadas com anticorpo secundário *Alexa Fluor 647*, na diluição de 1:50, a 4 °C por 30 minutos. Após a incubação, as células foram novamente centrifugadas e o sobrenadante descartado. O *pellet* foi ressuspendido em PBS para leitura no citômetro Guava easyCyte 6-2L (Millipore). O protocolo de marcação das células foi adaptado de MARTINS e colaboradores (2014).

#### **2.3.4.2 Aquisição dos dados do fenótipo no citômetro de fluxo**

A aquisição dos dados foi realizada utilizando o citômetro de fluxo Guava easyCyte 6-2L (Millipore). Primeiramente, como controle negativo, foi selecionado um grupo de células marcadas somente com anticorpo secundário para gerar o gráfico de dispersão lateral *versus* dispersão frontal, estabelecendo a população a ser analisada. Posteriormente, um gráfico do tipo histograma foi gerado para determinar a região do controle negativo e a região das células marcadas com anticorpo primário e secundário. A Sociedade Internacional de Terapia Celular determina que 80% dos eventos estejam dentro da faixa de marcação para os anticorpos de marcadores típicos para as células-tronco mesenquimais e que no máximo 2% estejam marcados para os anticorpos de células hematopoiéticas (BOURIN et al., 2013). As análises foram feitas com o uso do

*software* FlowJo™ de acordo com protocolo adaptado de MARTINS e colaboradores (2014).

### ***2.3.5 Curva de Crescimento de células-tronco derivadas de tecido adiposo e fibroblastos dérmicos em cultivo***

Para determinação do tempo de duplicação das células-tronco e dos fibroblastos dérmicos,  $2 \times 10^4$  células foram semeadas, em triplicata, em placas de seis poços, mantidas em estufa de CO<sub>2</sub> e contadas nos tempos 0, 3, 6, 9 e 12 dias após o plaqueamento. As contagens foram plotadas no *software* Graph Pad Prism 5 e o tempo de duplicação de cada célula foi calculado utilizando-se a equação de crescimento exponencial em um modelo de regressão não-linear.

### ***2.3.6 Indução da diferenciação adipogênica em células-tronco e fibroblastos***

Nos ensaios de diferenciação adipogênica, utilizou-se DMEM (Sigma-Aldrich) suplementado com 0,1 µM de dexametasona (Aché), 200 µM de indometacina (Sigma-Aldrich), 10 µM de insulina (Lilly), 0,5 mM de isobutil-metilxantina (Sigma-Aldrich) e 10% SFB (ZUK et al., 2001). O pH do meio foi ajustado para 7,2 e, em seguida, o meio foi filtrado com membrana de 0,22 µm. As células-tronco e os fibroblastos foram semeados em placas de 6 poços ( $1 \times 10^4$  células por poço) e induzidos a diferenciar por 21 dias. Ao final desse período, as células foram lavadas com PBS, fixadas em formalina a 10% durante 1 hora e incubadas com solução de isopropanol a 60% por 5 minutos. As células foram coradas com solução de Oléo Vermelho (*Oil-Red O* - Thermo Fisher Scientific), lavadas com água deionizada e contra coradas com hematoxilina durante 1 minuto. Os lipídeos foram corados em vermelho e as células foram analisadas no microscópio invertido Olympus IX70 utilizando-se o *software* Image Pro Plus 7.01 (Media Cybernetics, EUA).

### ***2.3.7 Indução da diferenciação osteogênica em células-tronco e fibroblastos***

Nos ensaios de diferenciação osteogênica, utilizou-se DMEM (Sigma-Aldrich) suplementado com 0,1µM de dexametasona (Aché), 10 mM de β-glicerofosfato (Sigma-Aldrich), 50 µg/mL de ácido ascórbico (Sigma-Aldrich), 0,01 µM de vitamina D3 (Sigma-Aldrich) e 10% SFB (ZUK et al., 2001; DE PAULA et al., 2013). O pH do meio

foi ajustado para 7,2 e, em seguida, o meio foi filtrado com membrana de 0,22  $\mu\text{m}$ . As células-tronco e os fibroblastos foram semeados em placas de 6 poços ( $1 \times 10^4$  células por poço) e induzidos a diferenciar por 21 dias. Para avaliar o fenótipo após indução da diferenciação osteogênica, foi realizada a coloração pelo método de *Von Kossa* e Alizarina Red.

Para a coloração de *Von Kossa*, ao término do período de 21 dias, as células foram lavadas com PBS e fixadas com álcool etílico 70% por 24 horas. No dia seguinte, após lavagem com água destilada, foi adicionado 1 mL/poço de solução aquosa de nitrato de prata (Vetec) e as células foram expostas à luz ultravioleta por 1 hora. A solução foi removida e as células lavadas para posterior adição de solução aquosa contendo 5% de tiosulfato de sódio (Cinética Química Ltda), por 5 minutos. As células foram lavadas novamente e contra coradas com eosina por 40 segundos. A presença de mineralização foi indicada pela coloração marrom.

Para coloração de Alizarina Red, as células foram fixadas em álcool etílico 70% à 4°C por 1 hora. Após a fixação, os poços foram lavados com PBS e foi acrescentado 1 mL de solução Alizarina 2% por poço, deixada em incubação por 15 minutos à temperatura ambiente. Os poços foram lavados mais uma vez e, posteriormente, foi feita uma incubação com PBS por 15 minutos. Depois, o PBS foi retirado e as células lavadas com água destilada. Os depósitos de cálcio da amostra foram corados em vermelho pelo corante. A observação e fotodocumentação de ambas as colorações foi feita utilizando-se o microscópio Olympus IX70 e o *software* Image Pro Plus 7.01 (Media Cybernetics, EUA).

### **2.3.8 Avaliação da atividade da enzima fosfatase alcalina**

A atividade de fosfatase alcalina (FA) foi avaliada por meio do ensaio BCIP-NBT (Life Technologies). Trata-se de uma reação cromogênica decorrente da clivagem do grupamento fosfato do BCIP (5-bromo 4-cloro 3-indolilfosfato p-toluidina) pela FA produzida pelas células. A reação de redução do NBT (nitroblue tetrazólio clorídrico) forma um precipitado insolúvel de cor púrpura (VALÉRIO et al., 2004).

Para o ensaio de 21 dias de atividade, as hASC e fibroblastos dérmicos foram semeados separadamente em placas de 24 poços na densidade de  $1 \times 10^4$  células/poço contendo meio DMEM 10% SFB. Em seguida, foram incubadas a 37 °C por 21 dias. Ao término de cada semana de incubação, o meio de cultura foi descartado, as células

foram lavadas com PBS e incubadas com 200  $\mu\text{L}$  por poço da solução BCIP/NBT a 37 °C, atmosfera úmida e 5%  $\text{CO}_2$ , por 2 horas. Em seguida, os precipitados de cor púrpura formados foram visualizados em microscópio de luz e as células fotodocumentadas.

Para verificar a atividade de fosfatase alcalina em uma mistura contendo hASC e fibroblastos dérmicos, as células-tronco foram semeadas em placas de 24 poços com diferentes porcentagens de fibroblastos acrescentados ao poço: de 0 a 100%, em uma escala crescente de 20%. O número total de células adicionado em cada poço foi de  $1 \times 10^5$ . Após 24 horas, as células foram lavadas com PBS e incubadas com 200  $\mu\text{L}$  por poço da solução BCIP/NBT e os cristais de cor púrpura foram visualizados após 2 horas de incubação em estufa. Os precipitados foram diluídos acrescentando-se 210  $\mu\text{L}$  por poço de solução SDS 10% HCl e as placas foram incubadas *overnight*. No dia seguinte, um volume de 100  $\mu\text{L}$  de reação, em triplicata, foi transferido para uma placa de 96 poços e a densidade ótica medida em espectrofotômetro a 595 nm.

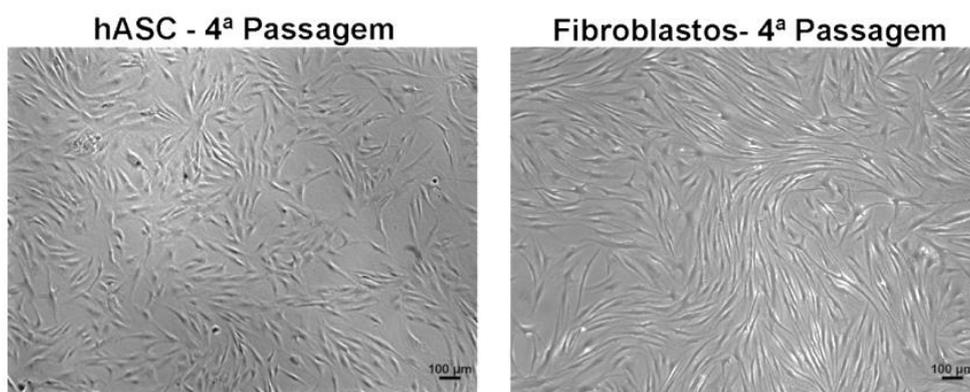
### **2.3.9 Análises Estatísticas**

O tempo de duplicação das células foi calculado utilizando o modelo de regressão não linear com a equação de crescimento exponencial. Nos ensaios de fosfatase alcalina, os pares de médias foram comparados utilizando-se One-way ANOVA com pós-teste de Bonferroni. Os resultados foram expressos graficamente em média e desvio padrão ou média e erro padrão e foram considerados valores  $p < 0,05$  como significantes. Todas as análises foram feitas no *software* Graph Pad Prism 5.

## 2.4 RESULTADOS

### 2.4.1 *Células-tronco de tecido adiposo e fibroblastos dérmicos humanos são morfológicamente similares*

Para a obtenção das células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo (hASC) e fibroblastos dérmicos humanos, os materiais provenientes das cirurgias de lipoaspiração e abdominoplastia foram processados mecanicamente e quimicamente e, assim, obtiveram-se duas populações homogêneas de células aderentes, em formato de espícula, muito similares morfológicamente. Na Figura 1, é possível observar as células-tronco derivadas de tecido adiposo e fibroblastos dérmicos por meio de imagens de campo claro. Ao atingirem a fase de crescimento e homogeneidade ideal, as culturas foram utilizadas nos experimentos desse trabalho.

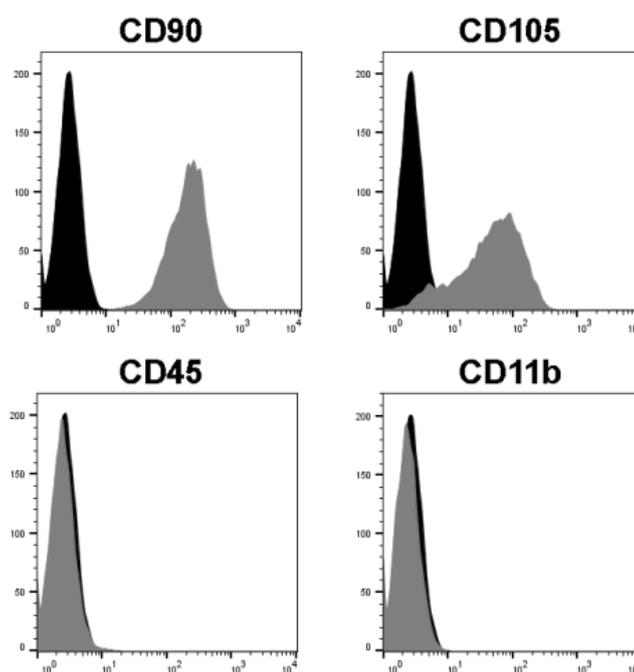


**Figura 1.** As hASC e fibroblastos dérmicos apresentam morfologia semelhante. As hASC e fibroblastos dérmicos extraídos dos produtos de lipoaspiração e abdominoplastia apresentaram aderência ao plástico e morfologia espicular. As imagens de campo claro foram adquiridas utilizando a técnica de contraste de fase no microscópio Olympus IX70, representando uma das culturas utilizadas no trabalho. Barras = 100 µm.

### 2.4.2 *O imunofenótipo das células-tronco derivadas de tecido adiposo e fibroblastos dérmicos humanos é semelhante*

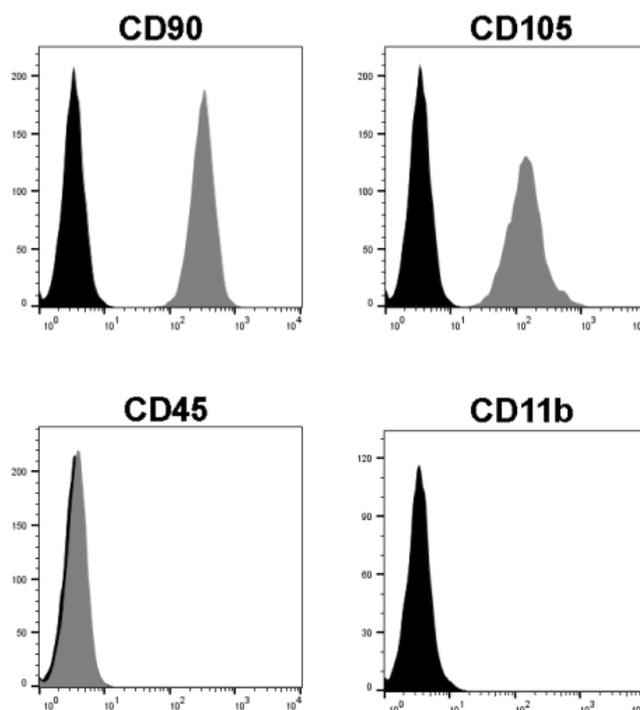
As hASC e os fibroblastos dérmicos na 4ª passagem foram analisados com anticorpos para marcadores de células-tronco mesenquimais (CD90 e CD105) e de células-tronco hematopoiéticas (CD45 e CD11b) e, posteriormente, as células foram avaliadas por citometria de fluxo. O objetivo foi verificar a contaminação por células hematopoiéticas e a semelhança na expressão de marcadores mesenquimais entre os

fibroblastos e células-tronco humanas. Os resultados estão apresentados nas figuras 2 e 3 em forma de gráficos representativos do tipo histograma. A análise dos histogramas confirmou que para as proteínas de membrana CD90 e CD105, houve marcação positiva em mais de 90% das células em cultura em comparação ao controle negativo. Para as proteínas de membrana típicas de células hematopoiéticas, CD45 e CD11b, os perfis observados foram de menos de 2% de marcação em relação ao controle não marcado. Esses resultados foram obtidos tanto para as hASC (Figura 2) quanto para os fibroblastos derivados da derme (Figura 3).



Proteína de Membrana	Porcentagem de	
	Marcação	Desvio Padrão
CD90	99,83%	±0,11
CD105	90,27%	±0,37
CD45	1,96%	±0,15
CD11b	0,59%	±0,11

**Figura 2.** As hASC apresentam os marcadores de superfície característicos de células tronco mesenquimais. As células foram analisadas por citometria de fluxo. Histogramas representativos apresentam o número de eventos (eixo y) *versus* intensidade de fluorescência (eixo x). A curva preenchida em preto corresponde ao controle negativo (células marcadas com anticorpo secundário) e a curva cinza representa a população de hASC avaliada para cada marcador. O quadro representa a porcentagem de marcação e o desvio padrão para cada proteína de membrana, n =3.

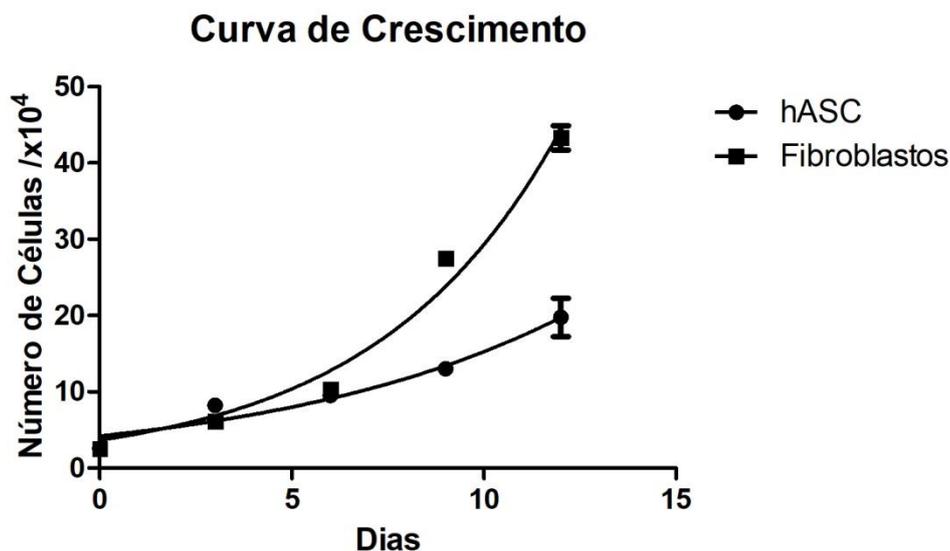


Proteína de Membrana	Porcentagem de	
	Marcação	Desvio Padrão
CD90	99,87%	±0,05
CD105	99,87%	±0,05
CD45	0,45%	±0,06
CD11b	1,46 %	±0,05

**Figura 3. Os fibroblastos apresentam os mesmos marcadores de superfície característicos das hASC.** As células foram analisadas por citometria de fluxo. Histogramas representativos apresentam o número de eventos (eixo y) *versus* intensidade de fluorescência (eixo x). A curva preenchida em preto corresponde ao controle negativo (células marcadas com anticorpo secundário) e a curva cinza representa a população de fibroblastos avaliada para cada marcador. O quadro representa a porcentagem de marcação e o desvio padrão para cada proteína de membrana, n = 3.

#### ***2.4.3 O tempo de duplicação dos fibroblastos dérmicos é menor que o tempo de duplicação das células-tronco***

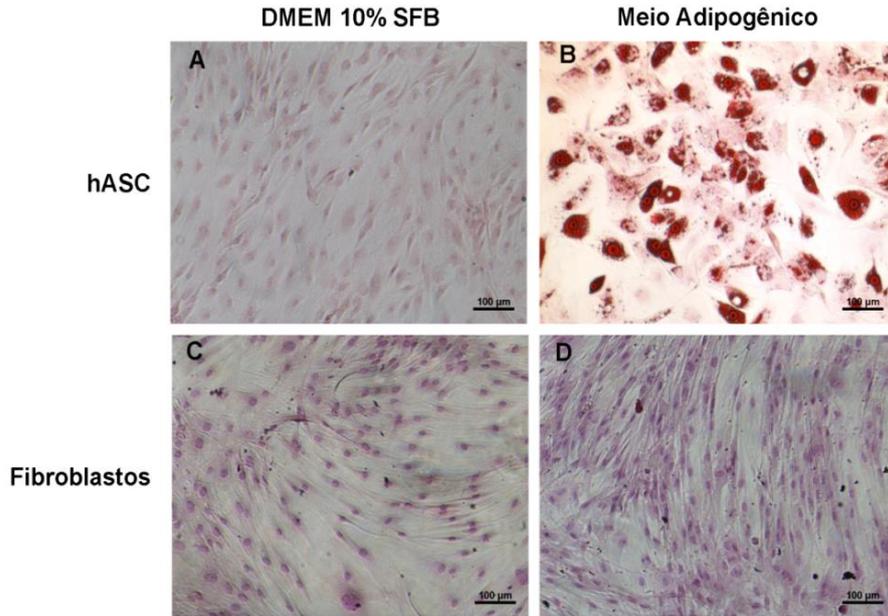
Para determinação do tempo de duplicação, as células em 4ª passagem foram plaqueadas e contadas durante 12 dias e, ao final desse período, os fibroblastos apresentaram um tempo de duplicação de 3,33 dias (erro padrão = ±0,58) e as hASC apresentaram um tempo de duplicação de 5,36 dias (erro padrão = ±0,70). A curva de crescimento foi plotada na Figura 4.



**Figura 4. Os fibroblastos dérmicos possuem um tempo de duplicação menor que as hASC.** No tempo zero,  $2 \times 10^4$  células na quarta passagem, foram distribuídas em placas de cultura celular de seis poços. Nos dias 0 (após adesão celular), 3, 6, 9 e 12 dias de cultivo, foi feita a contagem do número de células. Tempo de duplicação de fibroblastos foi igual a  $3,33 (\pm 0,58)$  dias e o de hASC igual a  $5,36$  dias ( $\pm 0,70$ ). Os dados foram analisados com a equação de crescimento exponencial.  $R^2 > 0,88$  (Graph Pad Prism 5).

**2.4.4 As células-tronco são capazes de se diferenciar em células da linhagem adipogênica, mas o mesmo não ocorre em fibroblastos dérmicos humanos.**

A indução da adipogênese das células de ambas as origens se deu por exposição ao meio adipogênico por 21 dias. Após esse período de incubação, as células induzidas e aquelas pertencentes aos grupos cultivados com meio DMEM 10% SFB foram submetidas à coloração de Óleo Vermelho O, que cora as vesículas de gordura intracelulares de vermelho. Os resultados são mostrados na figura 5.

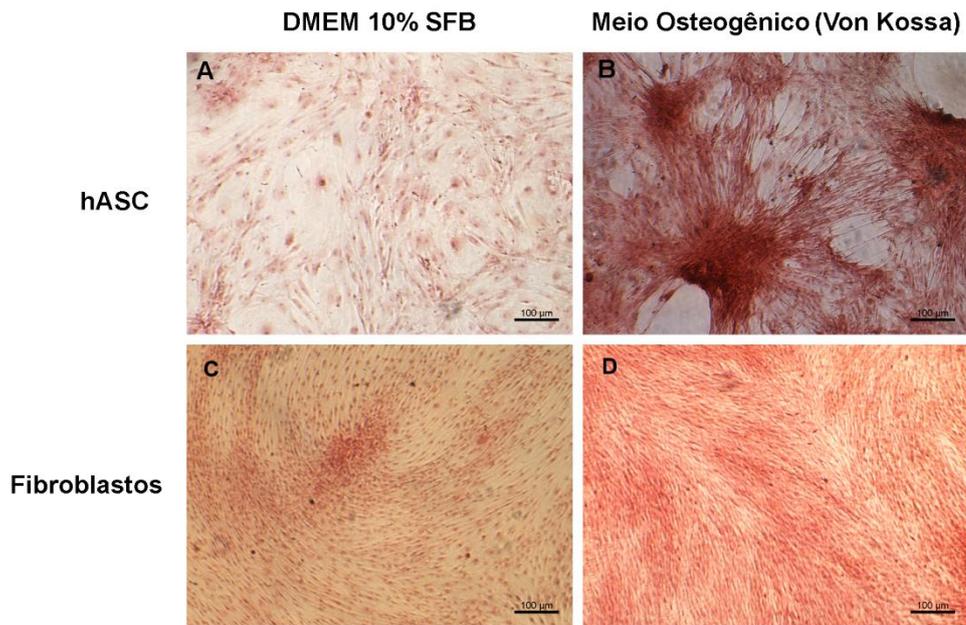


**Figura 5. As hASC são capazes de se diferenciar em células da linhagem adipogênica mas o mesmo não ocorre em fibroblastos dérmicos humanos.** Fotomicrografias das células-tronco mesenquimais de tecido adiposo (hASC) e fibroblastos dérmicos submetidos à diferenciação adipogênica após 21 dias. (A) hASC cultivadas em meio DMEM 10% SFB (controle negativo) (B) Presença de vesículas de gordura nas hASC diferenciadas (coradas em vermelho). Fibroblastos cultivados em meio adipogênico (D) apresentam morfologia semelhante ao controle (C). Coloração de Óleo Vermelho O. Imagens adquiridas no microscópio Olympus IX70. Barras = 100 µm.

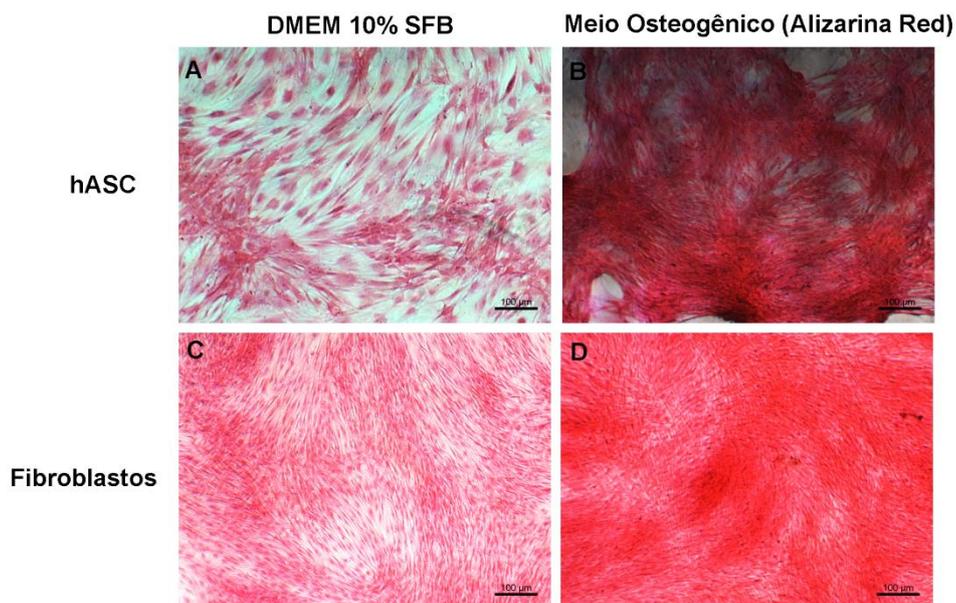
Pode-se observar, por meio da coloração de Óleo Vermelho, que as células-tronco foram capazes de se diferenciar em adipócitos; porém, os fibroblastos mantiveram um aspecto visual semelhante ao do grupo cultivado em meio DMEM 10% SFB (controle negativo) após o período de indução.

#### ***2.4.5 As células-tronco são capazes de se diferenciar em células da linhagem osteogênica mas o mesmo não ocorre em fibroblastos dérmicos humanos***

A indução da osteogênese das células de ambas as origens se deu por exposição ao meio osteogênico por 21 dias. Após esse período de incubação, as células induzidas e aquelas pertencentes aos grupos cultivados com meio DMEM 10% SFB foram submetidas às colorações de Von Kossa (Figura 6) e Alizarina Red (Figura 7), que cora nódulos de mineralização em marrom e calcificação em vermelho, respectivamente. Os resultados são apresentados abaixo.



**Figura 6.** As hASC são capazes de se diferenciar em células da linhagem osteogênica mas o mesmo não ocorre em fibroblastos dérmicos humanos. Fotomicrografias das células-tronco mesenquimais de tecido adiposo (hASC) e fibroblastos dérmicos submetidos à diferenciação osteogênica após 21 dias. (A) hASC cultivadas em meio DMEM 10% SFB (controle negativo) (B) Presença de mineralização nas hASC diferenciadas (coradas em marrom). Fibroblastos cultivados em meio osteogênico (D) apresentam morfologia semelhante ao controle (C). Coloração de Von Kossa/ eosina. Imagens adquiridas no microscópio Olympus IX70. Barras = 100  $\mu\text{m}$ .

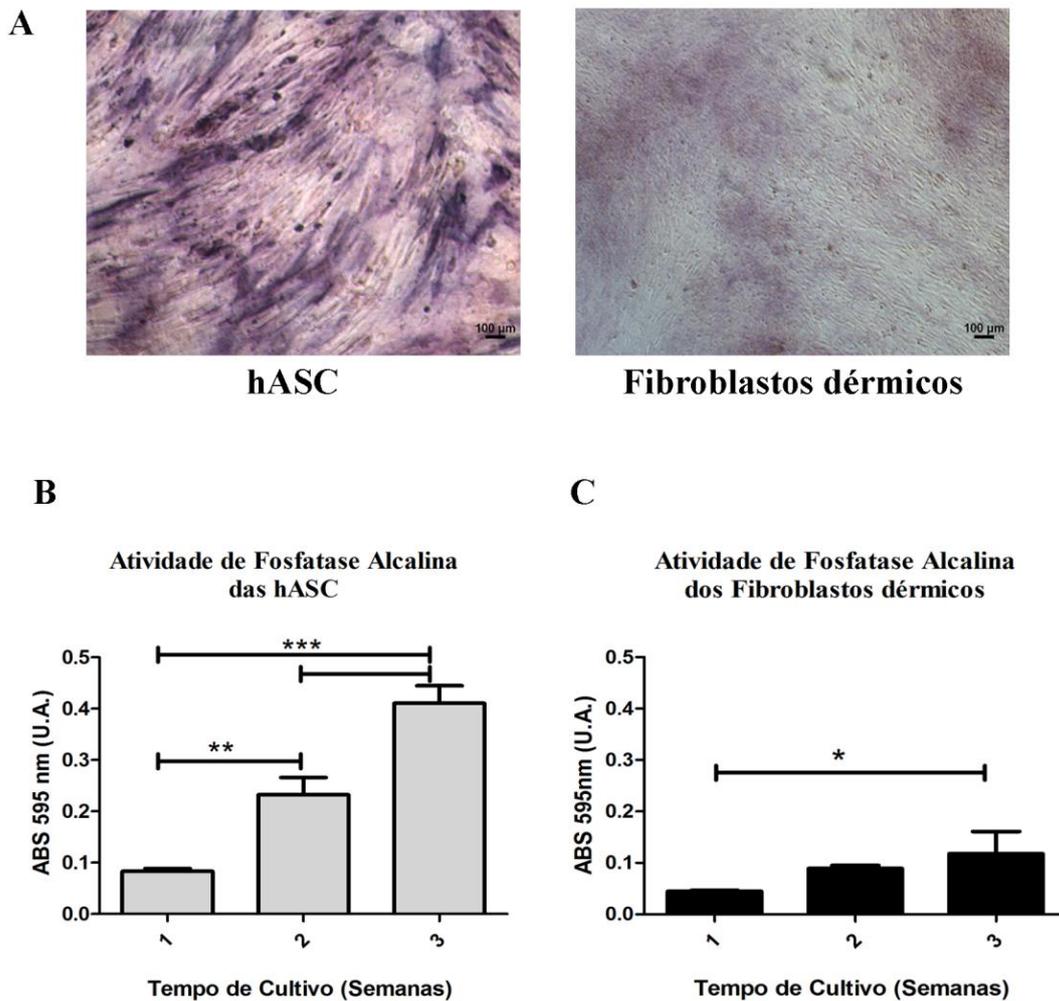


**Figura 7.** As hASC são capazes de se diferenciar em células da linhagem osteogênica mas o mesmo não ocorre em fibroblastos dérmicos humanos. Fotomicrografias das células-tronco mesenquimais de tecido adiposo (hASC) e fibroblastos dérmicos submetidos à diferenciação osteogênica após 21 dias. (A) hASC cultivadas em meio DMEM 10% SFB (controle negativo) (B) Presença de calcificação nas hASC diferenciadas (coradas em vermelho intenso). Fibroblastos cultivados em meio osteogênico (D) apresentam morfologia semelhante ao controle (C). Coloração de Alizarina Red. Imagens adquiridas no microscópio Olympus IX70. Barras = 100  $\mu$ m.

Pode-se observar que as células-tronco foram capazes de se diferenciar e apresentar o fenótipo osteogênico indicado pelas colorações de *Von Kossa* e Alizarina; porém, os fibroblastos mantiveram um aspecto visual semelhante ao grupo cultivado em meio DMEM 10% SFB (controle negativo) após o período de indução.

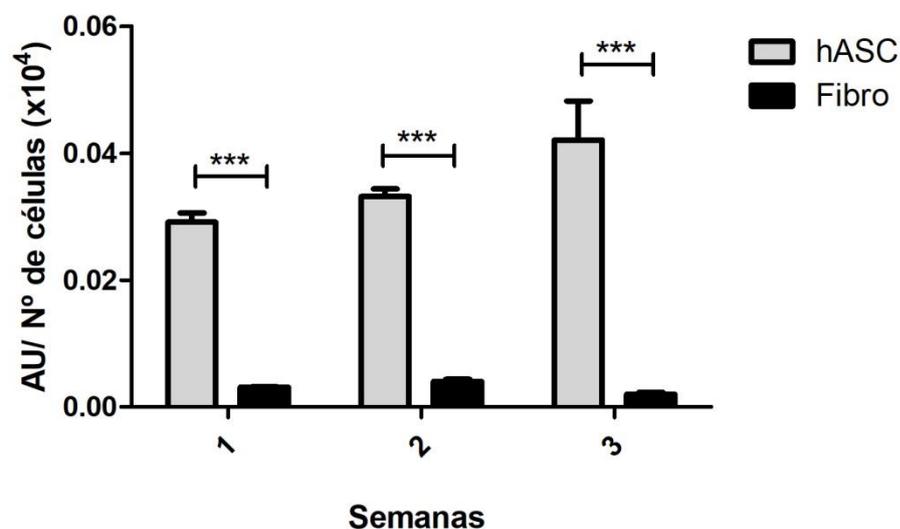
#### ***2.4.6 A atividade de fosfatase alcalina das células-tronco é maior em comparação aos fibroblastos dérmicos humanos***

As imagens de microscopia mostraram os cristais de formazan produzidos pelas células na reação cromogênica de BCIP-NBT (Figura 8A), indicando atividade da enzima fosfatase alcalina. A análise dos gráficos mostrou que há aumento na atividade de fosfatase alcalina na segunda e terceira semana de cultivo das hASC (Figura 8B) e na terceira semana de cultivo dos fibroblastos (Figura 8C). Para realizar uma comparação da atividade enzimática entre hASC e fibroblastos, as células foram contadas em câmara de Neubauer e a absorbância foi normalizada dividindo-se o valor obtido pela leitura no espectrofotômetro pelo número de células contadas ( $\times 10^4$ ). Observa-se que as células-tronco derivadas de tecido adiposo apresentaram uma atividade de fosfatase alcalina maior do que a encontrada em fibroblastos dérmicos (Figura 9).



**Figura 8. As hASC apresentam maior atividade de fosfatase alcalina que os fibroblastos durante as três semanas de cultivo. A.** Fotomicrografias mostrando os cristais de formazan produzidos por células-tronco mesenquimais de tecido adiposo (hASC) e fibroblastos dérmicos após 21 dias de cultivo. **B.** A atividade de fosfatase alcalina das hASC aumenta durante as três semanas de cultivo. **C.** A atividade de fosfatase alcalina dos fibroblastos dérmicos aumenta na terceira semana de cultivo. Imagens adquiridas no microscópio Olympus IX70. Barras = 100 µm. One-way ANOVA com pós-teste de Bonferroni. Valor p: \* p<0,05; \*\* p<0,01; \*\*\* p<0,001. Gráficos representativos com n=3.

### Comparação da atividade de Fosfatase Alcalina entre hASC e fibroblastos dérmicos *in vitro*

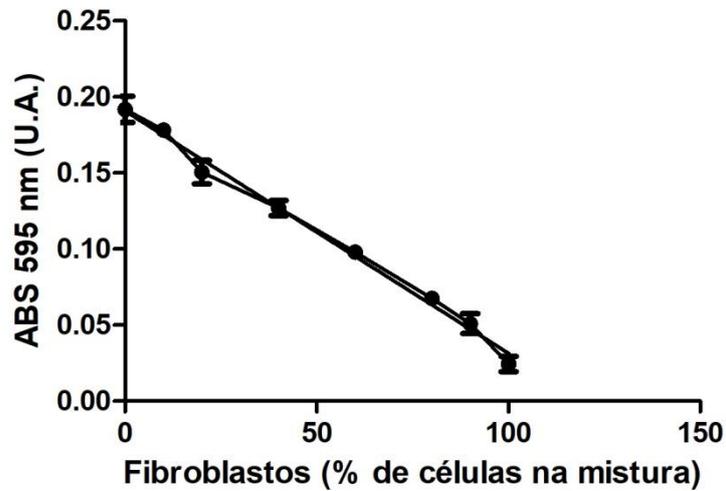


**Figura 9.** A análise comparativa normalizada da atividade de fosfatase alcalina entre hASC e fibroblastos dérmicos mostra maior atividade em hASC. Comparação entre hASC e fibroblastos dérmicos mostra diferença da atividade enzimática durante as três semanas de cultivo, após a normalização dos dados pelo número total de células ( $\times 10^4$ ). One-way ANOVA com pós-teste de Bonferroni.\*\*\*  $p < 0,001$ . Gráficos representativos com  $n=3$ .

#### 2.4.7 A atividade de fosfatase alcalina é decrescente em uma mistura de células-tronco contendo uma maior porcentagem de fibroblastos

Para averiguar os efeitos da contaminação de uma cultura de células-tronco com fibroblastos dérmicos, uma mistura de células com diferentes porcentagens de fibroblastos foi incubada por 24 horas em estufa de atmosfera úmida e, após esse período, a atividade de fosfatase alcalina foi avaliada pelo ensaio de BCIP-NBT. Observou-se que, quanto maior a porcentagem de fibroblastos presente na mistura, menor a atividade de fosfatase, em uma correlação linear ( $p < 0,001$ ). O gráfico representativo de três repetições com amostras de células distintas pode ser visualizado na Figura 10. Nota-se que a partir de 50% de mistura, a absorvância observada corresponde à aproximadamente a metade do ponto máximo sem a presença de fibroblastos (0%).

**Atividade de Fosfatase Alcalina  
Mix entre hASC e Fibroblastos**



**Figura 10.** A atividade de fosfatase alcalina decresce com o aumento da porcentagem de fibroblastos na mistura com hASC. As células-tronco foram semeadas em placas de 24 poços com diferentes porcentagens de fibroblastos acrescentados ao poço: de 0 a 100% em uma escala crescente de 20% (número total de células na mistura =  $1 \times 10^5$ /poço). Gráfico representativo com  $n=3$ . Os dados foram analisados com a equação de regressão linear e pelo teste de correlação de Pearson com  $p < 0,001$  (Graph Pad Prism 5).

## 2.5 DISCUSSÃO

É inegável o papel relevante que as células-tronco mesenquimais, entre elas as células-tronco derivadas de tecido adiposo, desempenham na medicina regenerativa. A capacidade de se autorrenovar e se diferenciar em vários tipos celulares, torna as MSC a figura central dos estudos envolvendo regeneração e reparo tecidual pós-lesão (BYDLOWSKI et al., 2009; ZUK, 2013). Entretanto, os fibroblastos também se destacam como um importante objeto de estudo por participarem ativamente de processos regenerativos no organismo, principalmente na fisiologia da pele, além de interferirem nas funções desempenhadas pelas células-tronco no sítio de regeneração (SORREL & CAPLAN, 2004; PROCKOP et al., 2009; PEREIRA et al., 2011). Apesar da ampla quantidade de estudos envolvendo essas células, ainda não há marcadores específicos que permitam a clara distinção entre MSC e fibroblastos e, por isso, as diferenças entre estes dois tipos celulares ainda não são completamente conhecidas. Embora definidas como uma entidade celular única, as MSC compartilham algumas semelhanças com fibroblastos no que diz respeito ao tamanho celular, morfologia, imunofenótipo, capacidade proliferativa e de modulação do sistema imune (LYSY et al., 2007; HANNIFA et al., 2007). Nesse capítulo, utilizamos alguns métodos presentes em trabalhos da literatura para verificar se é possível distinguir as populações de hASC e fibroblastos dérmicos humanos extraídos do produto de cirurgias plásticas.

De acordo com os resultados apresentados, a comparação morfológica entre hASC e fibroblastos dérmicos mostrou que, em relação ao aspecto visual da cultura celular, ambas as células apresentaram morfologia espiculada ou fibroblastóide e a capacidade de aderência ao plástico. Essas características estão relacionadas tanto para células-tronco mesenquimais quanto para fibroblastos em cultivo (CAPELLESSO-FLEURY et al., 2010; BOURIN et al., 2013). Portanto, a mera análise visual não garante a identificação de qual tipo celular está sendo cultivado, sendo necessária a utilização de outras ferramentas para a distinção fenotípica dessas células.

Em relação ao crescimento celular, o tempo de duplicação observado foi quase duas vezes maior em fibroblastos dérmicos quando comparados com as hASC. Em um estudo conduzido por HEO e colaboradores (2016) observou-se que o crescimento de células-tronco mesenquimais derivadas de medula óssea, cordão umbilical e de tecido adiposo foi inferior ao de fibroblastos em cultivo. Apenas as células-tronco derivadas de placenta mostraram-se mais proliferativas que fibroblastos dérmicos. DEBNATH &

CHELLURI (2018) observaram que, em média, hASC apresentou um tempo de duplicação mais lento (*lag*) em sua curva de crescimento ao longo das passagens, quando mantida em cultivo. Dessa forma, sugerimos que o fato dos fibroblastos serem células altamente proliferativas pode vir a agravar o problema da contaminação das culturas de células-tronco utilizadas em terapia celular. Hipotetiza-se que, ao se isolar um preparado de células contaminado com fibroblastos, esses últimos, por duplicarem mais rápido, possam ser transferidos em maior número para o sítio de regeneração e inibirem ou mesmo anularem os efeitos benéficos de hASC.

A Sociedade Internacional de Terapia Celular (ISCT) preconiza o uso de marcadores de membrana (CD) e a indução da diferenciação celular para a identificação precisa de células-tronco mesenquimais. De acordo com nossos resultados, em relação à expressão desses marcadores, avaliados por citometria de fluxo, tanto as células-tronco derivadas de tecido adiposo quanto os fibroblastos apresentaram marcação positiva para CD105 e CD90 (maior que 90%). Ambas as células também foram negativas para os marcadores CD45 e CD11b (menor que 2%), que são relacionados às células-tronco hematopoiéticas. Estes achados demonstraram que as culturas utilizadas nesse estudo não possuíam contaminação com células-tronco hematopoiéticas e que os fibroblastos e hASC apresentaram perfis semelhantes na expressão de marcadores de membrana.. Na literatura, estão descritas várias comparações entre células-tronco derivadas de tecido adiposo e fibroblastos dérmicos humanos em que os resultados foram similares aos obtidos nesse estudo. LORENZ e colaboradores (2008) mostraram padrões de expressão similares para CD14<sup>-</sup>, CD29<sup>+</sup>, CD31<sup>-</sup>, CD34<sup>±</sup>, CD44<sup>+</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD71<sup>+</sup>, CD73<sup>+</sup>, CD90<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD133<sup>-</sup> e CD166<sup>+</sup> em hASC e fibroblastos dérmicos humanos. ALT e colaboradores (2011) avaliaram hASC comparadas com uma linhagem comercial de fibroblastos (hSDF) e observaram marcação positiva para CD44, CD73 e CD105 e negativa para CD14, CD45, CD31 em ambas as células. Uma população clonogênica derivada de fibroblastos dérmicos também mostrou expressão positiva de CD13, CD29, CD44, CD90 e CD105 quando avaliada para marcadores mesenquimais (JUNKER et al., 2010). KUNDROTAS (2012) relacionou diversos marcadores de membrana em ambas as células presentes nos trabalhos da literatura e os perfis de expressão também foram semelhantes aos citados anteriormente. Portanto, apesar de utilizarmos a definição para células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo descrita pela Sociedade Internacional de Terapia Celular (BOURIN et al., 2013), não foi possível separar ambos os tipos celulares por esses critérios.

Entretanto, ao induzirmos a diferenciação osteogênica e adipogênica, foi observado que somente as hASC foram capazes de se diferenciar em ambas as linhagens enquanto os fibroblastos não demonstraram essa capacidade. ZYCH e colaboradores (2014) também incubaram hASC e fibroblastos dérmicos com meios indutores e afirmaram que os fibroblastos não foram capazes de se diferenciar em células da linhagem condrogênica, adipogênica e osteogênica. Um trabalho prévio a esse estudo observou que a eficiência de diferenciação de hASC é dependente do paciente. Células de pacientes mais jovens possuem maior capacidade do que as células isoladas de pacientes mais idosos (BUNNEL et al., 2008). De fato, em nosso estudo, isolamos amostras de pacientes jovens submetidas à cirurgias estéticas corroborando com esses autores. O fenótipo de diferenciação celular em MSC de tecido adiposo também foi obtido por MARTINS e colaboradores (2014) quando compararam fibroblastos e células-tronco derivadas de tecido adiposo da órbita ocular humana (OFSC). As OFSC foram capazes de se diferenciar em osteócitos, adipócitos e condrócitos e apresentaram altos níveis de atividade da fosfatase alcalina. Em contraste, os fibroblastos não exibiram propriedades de multipotência *in vitro* e apresentaram baixos níveis de expressão e atividade de fosfatase alcalina (MARTINS et al., 2014). Outro estudo mostrou que fibroblastos dérmicos e fibroblastos derivados de prepúcio humanos não foram capazes de se diferenciar em adipócitos e osteócitos quando comparados às células-tronco mesenquimais derivadas de medula óssea (CAPELLESSO-FLEURY et al., 2010). Em oposição a esses achados, alguns autores conseguiram induzir a diferenciação em fibroblastos adultos, sugerindo que essas células podem ser uma fonte alternativa para a terapia celular (HANIFFA et al., 2007; JUNKER et al., 2010). Nós hipotetizamos que esse efeito possa ter ocorrido devido à mistura de células no momento do isolamento e que a diferenciação das células-tronco presentes na mistura possa ter interferido nos resultados.

A fosfatase alcalina pertence a uma família de enzimas diméricas comuns à vários organismos, que catalisam a hidrólise de fosfomonoésteres resultando na liberação de fosfato inorgânico presente em várias biomoléculas (MORNET et al., 2001). Em humanos, foram descritas quatro isoformas dessa enzima: intestinal, germinativa, placentária e tecido não-específica. Essa última isoforma está presente em células de osso, fígado e rim (KIM et al., 2012; STEFKOVÁ et al., 2015). Alguns trabalhos demonstraram que a fosfatase alcalina é também expressa no tecido adiposo, células-tronco mesenquimais da derme, células progenitoras miogênicas e células

progenitoras neuronais (LANGER et al., 2007; DELLAVALLE et al., 2007; RIEKSTINA et al., 2009). Outros autores comprovaram que a fosfatase alcalina caracteriza-se como um marcador chave para células-tronco embrionárias (ESCs), células germinativas embrionárias (EGCs), células-tronco pluripotentes e pluripotentes induzidas (iPSCs), além de estar presente em células-tronco mesenquimais (ADEWUMI et al., 2007; RIEKSTINA et al., 2009; SINGH et al., 2012, STEFKOVÁ et al., 2015).

No presente estudo, nossos resultados mostraram que a atividade enzimática é maior em células-tronco do que em fibroblastos durante as três semanas de cultivo. Quando normalizada pelo número de células, essa diferença é melhor visualizada, já que, apesar dos fibroblastos proliferarem mais rápido do que hASC, eles apresentam menor atividade de fosfatase alcalina. Nossos achados são similares a alguns trabalhos com outros tipos de células-tronco mesenquimais adultas. KIM e colaboradores (2012) mostraram que células-tronco mesenquimais derivadas de medula óssea apresentavam alta atividade de fosfatase alcalina quando cultivadas *in vitro*. Essa atividade foi correlacionada com a capacidade de diferenciação osteogênica e condrogênica dessas células. MARTINS e colaboradores (2014) mostraram que células-tronco derivadas das bolsas de gordura de palpebral e fibroblastos dérmicos palpebrais apresentaram diferença na atividade de fosfatase alcalina, com maior atividade observada nas células-tronco. Apesar de serem células-tronco e fibroblastos extraídos de sítios corporais diferentes dos utilizados nesse estudo, atestamos que a atividade aumentada de fosfatase alcalina é um padrão em células-tronco, independentemente de seu tecido de origem, quando comparada aos fibroblastos dérmicos, que são células terminalmente diferenciadas. De fato, STEFKOVÁ e colaboradores (2015) concluíram que a atividade de fosfatase alcalina pode ser observada em diversos tipos de células-tronco mesenquimais e há uma forte correlação entre essa atividade e o fenótipo pluripotente e indiferenciado dessas células. Além disso, ao realizarmos o mesmo ensaio com uma mistura de células-tronco e fibroblastos, observamos que uma cultura de hASC potencialmente contaminada apresenta redução na atividade global de fosfatase alcalina, abrindo perspectiva para o desenvolvimento de um novo protocolo para detectar essa contaminação utilizando testes colorimétricos.

Em resumo, os resultados desse capítulo mostraram que o aspecto morfológico das células observado em microscópio e a avaliação de marcadores de membrana por citometria de fluxo não foram eficientes para a distinção entre hASC e fibroblastos

dérmicos. Entretanto, outras características avaliadas, como a maior capacidade proliferativa de fibroblastos, a diferenciação adipogênica e osteogênica em hASC, além da atividade de fosfatase alcalina podem ser critérios confiáveis para a distinção fenotípica de ambas as células.

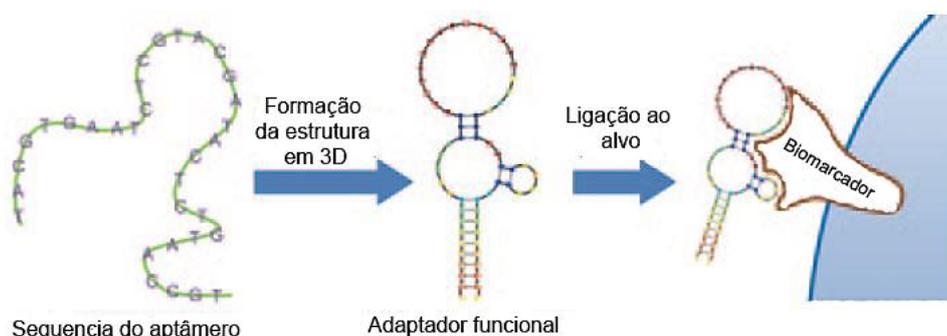
### **3- CAPÍTULO II**

## **SELEÇÃO DE APTÂMEROS PARA DISTINÇÃO ENTRE HASC E FIBROBLASTOS DÉRMICOS HUMANOS *IN VITRO***

## 3.1 INTRODUÇÃO

### 3.1.1 Aptâmeros: definição, propriedades e aplicações.

O termo aptâmeros é derivado do Latin *aptus* (apto a) e do Grego *meros* (partícula). Os aptâmeros de ácidos nucleicos podem ser definidos como oligonucleotídeos de fita simples de DNA ou RNA, geralmente menores que 100-mer, que são capazes de se ligarem a outras moléculas com alta afinidade e especificidade (SEFAH et al., 2010; DARMOSTUK et al., 2014). A ligação desses oligonucleotídeos ocorre por meio da formação de uma estrutura tridimensional criando uma superfície de interação (Figura 11) (SEFAH et al., 2010; SUN et al., 2014).



**Figura 11. Desenho esquemático da ligação de um aptâmero ao seu alvo.** A sequência linear sintetizada do oligonucleotídeo forma uma estrutura tridimensional que é capaz de se ligar especificamente à molécula alvo (Adaptado de SUN et al., 2014).

Esse processo de formação de estruturas secundárias e tridimensionais é termodinamicamente favorável e coordenado pelo pareamento de bases no DNA ou RNA. Em uma biblioteca de oligonucleotídeos com sequências aleatórias variadas, são observadas diversas topologias ou estruturas com afinidade de ligação específicas, tais como hastes, *loops*, saliências, grampos, tríplex ou quadruplex (HERMANN & PATTEL, 2000).

Os aptâmeros assumem múltiplas conformações e conseguem se ligar a alvos de variados tamanhos, tais como nucleotídeos, íons, antibióticos, estruturas de RNA e DNA, proteínas, receptores, vírus, parasitas intracelulares e células inteiras. O alcance de alvos também é maior, pois podem se ligar ao nível da sequência codificante de uma proteína até a própria proteína em si. Além disso, são capazes de distinguir entre epítomos homólogos ou isotipos e podem influenciar diretamente em algumas atividades

de suas moléculas alvo (FAMULOK & MAYER, 1999; HOMANN & GORINGER, 2001; RIMMELE 2003; ULRICH et al., 2002; TOULMÉ et al., 2004).

Atualmente, os aptâmeros são uma grande promessa no desenvolvimento de sondas e fármacos devido às suas propriedades de ligação, especialmente a moléculas pequenas, o que é comparável ou ainda melhor que as propriedades dos anticorpos monoclonais. Suas múltiplas vantagens em relação aos anticorpos, além do melhor custo-benefício, incluem: alta afinidade e especificidade, facilidade de síntese química ou enzimática sem variação de lote, a habilidade de recuperação da sua estrutura tridimensional e a durabilidade no armazenamento. A estabilidade dos oligonucleotídeos garante maior vida útil/tempo de prateleira dos aptâmeros (FANG & TAN, 2010). Adicionalmente, devido ao seu pequeno tamanho, os aptâmeros podem penetrar nas células e tecidos de forma mais eficaz que os anticorpos. Mas, ao contrário deles, os aptâmeros têm uma taxa de depuração mais rápida, o que é vantajoso particularmente para agentes potencialmente citotóxicos como radiomarcadores terapêuticos. Se o aumento do tempo de circulação no corpo é necessário, os aptâmeros podem ser modificados para prolongar a meia-vida na corrente sanguínea (YAN et al., 2005).

Entretanto, um dos desafios no desenvolvimento desses oligonucleotídeos envolve as propriedades dos alvos. Assim como os anticorpos, nem toda molécula consegue ser detectada com o uso de aptâmeros e alguns pré-requisitos para a escolha dos alvos devem ser atendidos. As moléculas alvo devem estar presentes em quantidade suficientes e com alta pureza. Isso ajuda a minimizar o enriquecimento de oligonucleotídeos inespecíficos e aumentam a especificidade da seleção. Uma característica que facilita a seleção de aptâmeros é a presença de grupos de aminoácidos positivamente carregados, a presença de doadores e aceptores de ligações de hidrogênio e planaridade molecular (WILSON & SZOSTAK, 1998; RIMMELE, 2003). A seleção de aptâmeros é mais difícil para moléculas negativamente carregadas como, por exemplo, moléculas contendo grupos fosfato. Uma possível explicação seria a repulsão entre os grupamentos negativamente carregados e as bases nitrogenadas carregadas dos aptâmeros. Os requerimentos para as propriedades dos alvos estão relacionados aos princípios básicos da interação entre o complexo alvo-aptâmero. Os aptâmeros ligam-se aos seus alvos por meio de uma combinação de complementaridade na forma, interações entre compostos aromáticos e as bases nitrogenadas dos aptâmeros, interações eletrostáticas entre grupos carregados e ligações de hidrogênio (PATEL,

1997; HERMANN & PATEL, 2000). Na presença do alvo e durante a formação do complexo, os aptâmeros sofrem mudanças conformacionais. A formação de uma estrutura tridimensional permite que os aptâmeros se liguem a pequenas moléculas alvo gerando uma espécie de “bolsão” de ligação. No caso das moléculas alvo com maior peso molecular como proteínas e células, diferentes estruturas na superfície molecular estão envolvidas na ligação dos aptâmeros. Por exemplo, uma cadeia lateral composta de aminoácidos básicos (lisina, arginina) é responsável pela ligação de hidrogênio intermolecular viabilizando a formação do complexo alvo-aptâmero (STOLTENBURG et al., 2007). Os complexos de aptâmeros que se ligam a nucleotídeos são, na maioria das vezes, caracterizados por interações entre *loops* também conhecidos como *kissing complexes*. Essas interações podem envolver duas estruturas em grampo ou *loops* e protuberâncias internas. Estruturas triplas também podem ser formadas por meio da interação entre um oligonucleotídeo ou domínio fita simples e um ácido nucleico dupla fita (KLUSSMANN, 2006).

Quanto à sua funcionalidade, os oligonucleotídeos são bastante estáveis em diferentes condições experimentais. Eles podem ser incubados com uma grande variedade de tampões e soluções e submetidos a tratamentos químicos e físicos sem perda de atividade. Adicionalmente, a plasticidade dos aptâmeros permite que eles sejam modificados quimicamente para resistirem ao ataque de nucleases. Muitos aptâmeros de RNA são modificados na posição 2' dos ribonucleotídeos (2'-amino, 2'-deoxi, 2'-metoxi, 2'-flúor) e até mesmo capeados na extremidade 5' e circularizados impedindo o ataque exonucleásico. Outra alternativa inclui o uso da tecnologia “Spiegelmer”, a qual é caracterizada por uma estrutura espelhada composta de L-riboses ou L-2'-desoxiriboses (WHITE et al., 2000; KIM et al., 2002; HASEGAWA et al., 2016). Os aptâmeros de DNA e RNA também podem ser conjugados com diferentes fluoróforos e utilizados como sondas para imagens de microscopia de fluorescência, contribuindo não só para a pesquisa básica, mas também aplicada à medicina, como no diagnóstico de doenças (ULRICH & WRENGER, 2009; JIN et al., 2015). Por meio da incorporação dos aptâmeros em lipossomas, nanopartículas e outros complexos, abordagens que utilizam terapia alvo direcionada, assim como novas terapias para o câncer, estão sendo desenvolvidas e aprimoradas (SUN et al., 2014).

A constante de dissociação ( $K_d$ ) dos aptâmeros pode variar entre picomolar (pM) até micromolar ( $\mu$ M). Valores mais altos geralmente estão relacionados com uma

menor gama de afinidade, consistente com poucos contatos possíveis entre o aptâmero e o alvo (ILGU & HAMILTON, 2016). Valores menores de  $K_d$  indicam alta afinidade pelo alvo. Além disso, a molécula alvo é reconhecida mesmo quando os aptâmeros são utilizados em pequenas quantidades. De um modo geral, pode-se concluir que essas propriedades únicas capacitam os aptâmeros para aplicação direta na detecção das mais variadas moléculas presentes da natureza.

### 3.1.2 *Cell-SELEX*

Para a seleção de aptâmeros, um conjunto de sequências aleatórias é enriquecido gerando sequências específicas ao alvo por um processo *in vitro* e iterativo denominado Evolução Sistemática de Ligantes por Enriquecimento Exponencial (SELEX: *Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment*) (TUERK & GOLD, 1990; ELLINGTON & SZOSTAK, 1990). A seleção dos ligantes era inicialmente realizada utilizando alvos simples, como pequenas moléculas e proteínas (LEEa et al., 2006). Posteriormente, com o aprimoramento das metodologias, foi possível selecionar essas sequências utilizando alvos mais complexos presentes, por exemplo, na superfície da membrana plasmática de células inteiras e esta técnica foi chamada de *Cell-SELEX* (BLANK et al., 2001; DANIELS et al., 2003; WANG et al., 2003; TAN & FANG et al., 2015).

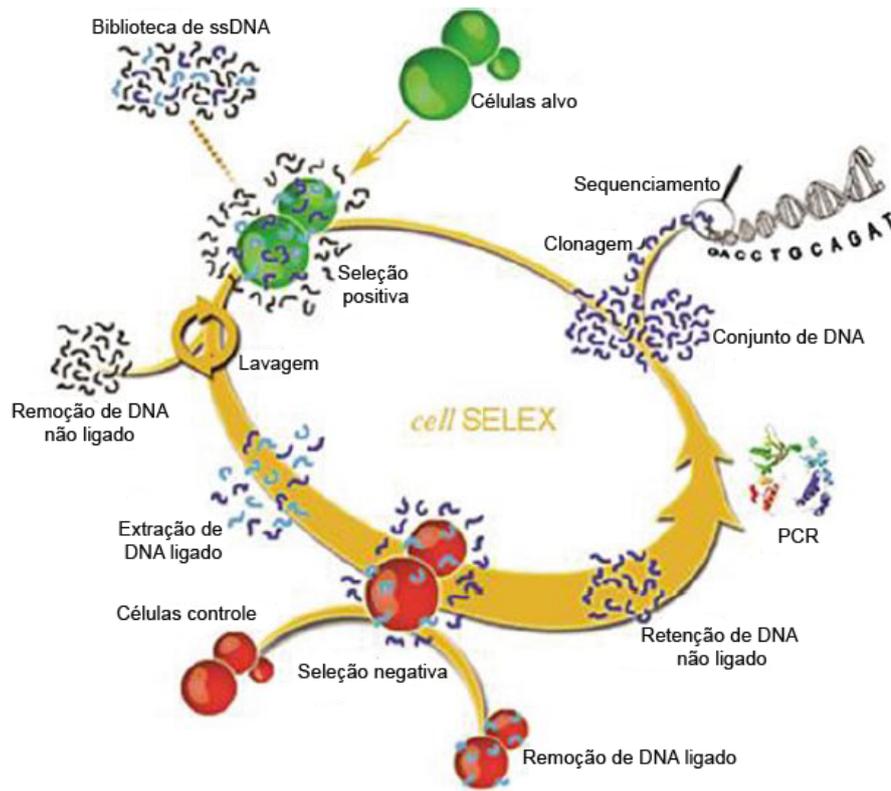
É importante ressaltar que os aptâmeros ligam-se ao estado conformacional nativo das moléculas, possibilitando o desenvolvimento de sondas *in vitro* e a descoberta de biomarcadores (SEFAH et al., 2010; TAN & FANG et al., 2015). Além disso, as moléculas alvo encontram-se naturalmente ancoradas na superfície celular. Portanto, os aptâmeros ligados podem ser facilmente separados dos oligonucleotídeos não ligados por lavagens e centrifugação durante o processo de *Cell-SELEX*, em caso de culturas de células aderentes (SHANGGUAN et al., 2015).

Na metodologia *Cell-SELEX*, não há necessidade de conhecimento prévio das moléculas presentes na membrana da célula alvo e essas podem ser identificadas após o processo de seleção. Devido à alta especificidade e afinidade dos aptâmeros, é possível diferenciar células de diferentes tipos ou origens, já que cada célula possui o seu próprio padrão de distribuição de moléculas em sua superfície. As diferenças na assinatura molecular entre dois tipos de células estão relacionadas principalmente às abundantes proteínas de membrana, que são alvos em potencial para o desenvolvimento de

aptâmeros. Portanto, uma seleção bem-sucedida vai gerar um painel de aptâmeros para alvos moleculares distintos contribuindo para descoberta de novos marcadores e, até mesmo, para o desenvolvimento de testes diagnósticos para doenças (SHANGGUAN et al., 2015).

O ponto de partida do processo *Cell-SELEX* é uma biblioteca de oligonucleotídeos de DNA ou RNA sintetizada quimicamente ou construída. Essa biblioteca consiste em uma grande variedade de sequências de DNA fita simples (aproximadamente  $10^{15}$  moléculas ou mais) compreendendo uma região central de 20 a 80 nucleotídeos distribuídos aleatoriamente flanqueados por sequências específicas, as quais funcionam como sítios de ligação para iniciadores da amplificação do DNA (STOLTENBURG et al., 2007).

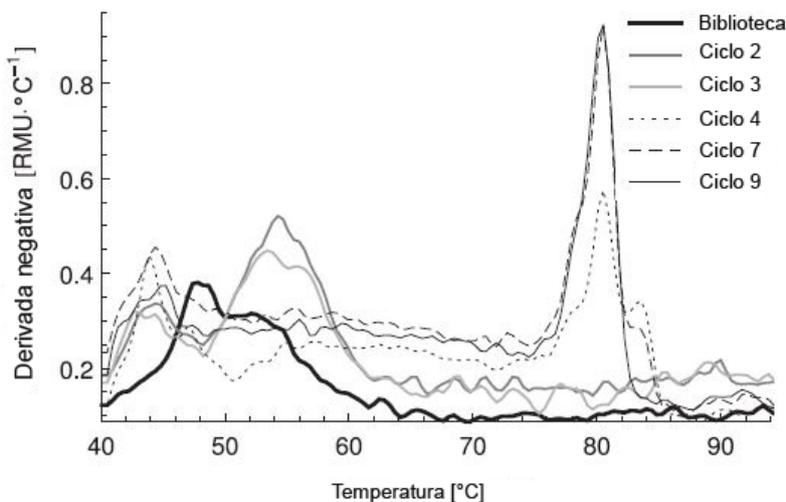
A seleção dos aptâmeros baseia-se em uma sequência de ciclos (*rounds*) de seleção positiva e negativa e etapas de amplificação por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR, *Polymerase Chain Reaction*). Na etapa de seleção positiva, os oligonucleotídeos são incubados com a célula alvo, ou seja, a célula de interesse para a ligação dos aptâmeros. Por sua vez, na etapa de seleção negativa, os aptâmeros são incubados com uma célula controle e aqueles que se ligam as proteínas presentes na superfície dessa célula são removidos da seleção (SEFAH et al., 2010). Os aptâmeros que se ligam à célula alvo são recuperados e amplificados por PCR (Figura 12). A separação da dupla fita de DNA gerada após as amplificações por PCR pode ser feita utilizando diversas metodologias (MARIMUTHU et al., 2012; LIANG et al., 2015) e, entre elas, está a obtenção do DNA fita simples usando partículas (*beads*) magnéticas conjugadas com estreptavidina (WILSON et al., 2011; MARIMUTHU et al., 2012; LIANG et al., 2015). No presente trabalho, utilizamos as hASC e fibroblastos dérmicos humanos como células alvo e controle, respectivamente, e o método de separação do DNA dupla fita descrito acima.



**Figura 12. Representação esquemática do *Cell-SELEX* utilizando aptâmeros de DNA.** O processo é baseado em *rounds* de seleção positiva e negativa de aptâmeros e amplificação do conjunto de DNA por PCR (Adaptado de FANG & TAN, 2010).

O processo de seleção é repetido sucessivas vezes até a obtenção de um conjunto de oligonucleotídeos enriquecido com aptâmeros específicos para a célula alvo. Há uma série de recomendações para uma seleção bem-sucedida de aptâmeros, tais como: redução gradual do número de células alvo, aumento do número de células controle e também redução do tempo de incubação dos aptâmeros com ambas as células (SEFAH et al., 2010). As modificações aumentam a estringência do processo de *Cell-SELEX*, eliminando as sequências inespecíficas ou com baixa afinidade pelas células-alvo. O número necessário de rodadas de seleção depende do progresso do enriquecimento, o qual é monitorado pelos ensaios de ligação. Existem várias metodologias para o monitoramento da seleção de aptâmeros por *Cell-SELEX* e, entre elas, está a análise da curva de dissociação (*DNA melting*) dos aptâmeros após cada *round* (SCHUTZE et al., 2010; MENCIN et al., 2014). A formação de picos estreitos em temperaturas de dissociação ( $T_m$ , *Melting Temperature*) elevadas ao longo da seleção de aptâmeros, indica uma diminuição na diversidade do conjunto de sequências, o que permite monitorar o êxito do processo (Figura 13) (THIEL et al., 2012; MENCIN et al., 2014).

## Curva de Dissociação



**Figura 13.** Perfil esperado das curvas de dissociação dos conjuntos de aptâmeros selecionados por *Cell-SELEX*. O gráfico representa a derivada negativa da intensidade de fluorescência no eixo y e a temperatura no eixo x em diferentes ciclos (Adaptado de MENCIN et al., 2014).

Ao final do *Cell-SELEX*, os aptâmeros dos últimos *rounds* podem ser clonados e sequenciados ou sequenciados por métodos de nova geração (NGS – *Next Generation Sequencing*) e analisados por bioinformática (THIEL et al., 2012). Posteriormente, são quimicamente sintetizados, podendo ser marcados com fluoróforos e novamente testados quanto à especificidade pelo alvo, para escolha dos melhores candidatos (TAN & FANG, 2015). Dependendo da sua utilização final, os aptâmeros também podem ser conjugados com biotina, nanocarreadores, lipossomas e outras moléculas de interesse.

A eficiência do método de *Cell-SELEX* depende de muitos fatores como, por exemplo, o tipo de biblioteca sintetizada, a natureza e o estado de crescimento das células, as condições de seleção, as moléculas alvo desejadas e as habilidades operacionais do pesquisador. Em muitas situações, o sucesso no desenvolvimento de aptâmeros dependerá do controle e da exatidão das condições experimentais, como por exemplo, a temperatura. Essa deve ser mantida nas mesmas condições de uso do oligonucleotídeo desde a seleção até a validação com culturas de células (STOLTENBURG et al., 2007). Porém, não existe um único protocolo padrão válido para todos os tipos de células existentes. Normalmente, são feitas muitas adaptações que variam de um estudo para o outro, mas alguns critérios tidos como elementos chave para uma seleção bem-sucedida devem ser seguidos como, por exemplo, o aumento da estringência.

De forma geral, a metodologia *Cell-SELEX* contribui significativamente para a descoberta de novos biomarcadores. Mudanças patológicas ou fisiológicas na superfície das células são processos complexos que envolvem diversas alterações e conformações estruturais a nível molecular. Os aptâmeros obtidos ao final do processo podem ser utilizados, por meio de separação por afinidade, para purificação e identificação dos seus alvos moleculares. Essa descoberta de novos marcadores implica em uma grande contribuição para a compreensão da biologia das células na ciência básica, assim como pode abrir novas perspectivas para o diagnóstico e tratamento de doenças (SHANGGUAN et al., 2015).

### **3.1.3 Seleção de Aptâmeros utilizando culturas de células de mamíferos**

Para o desenvolvimento de sondas moleculares em diagnóstico e pesquisa básica, aptâmeros capazes de reconhecer células de mamíferos são as ferramentas mais promissoras. Células de linhagem de câncer foram as mais extensivamente estudadas para potenciais alvos terapêuticos utilizando-se *Cell-SELEX* (OHUCHI et al., 2012). Até os dias atuais, têm sido gerados muitos aptâmeros com afinidade por diversas variedades de células tumorais. Com o uso de marcação por fluorescência, como por exemplo, fluoresceínas e cianinas, esses aptâmeros têm sido aplicados como sondas específicas. Outras estratégias desenvolvidas nesses estudos incluem a conjugação dos aptâmeros com drogas antitumorais, nanopartículas, nanocomplexos e radioisótopos para terapêutica (ZHANG et al., 2011; TAN et al., 2013; CORREA et al., 2014; SUN et al., 2014). SHANGGUAN e colaboradores (2006) reportaram a geração de uma série de aptâmeros de DNA para estudo do câncer. Eles utilizaram como modelo as células humanas precursoras de células T derivadas de leucemia aguda linfoblástica (CCRF-CEM) e as células humanas da linhagem de linfócitos B provenientes de linfoma de Burkitt (Ramos) para os passos de seleção positiva e negativa, respectivamente. Os aptâmeros obtidos mostraram alta afinidade por CCRF-CEM e não apresentaram afinidade pelas células da linhagem Ramos. Tratamentos posteriores com proteinases nas células da linhagem CCRF-CEM, sugeriram que cada aptâmero gerado reconhecia moléculas de superfície celular distintas umas das outras, reforçando a recomendação de que não é necessário o conhecimento prévio dos alvos moleculares nas células para aplicação da técnica *Cell-SELEX*. A partir desse estudo, ocorreu uma expansão de diversas pesquisas envolvendo o desenvolvimento de aptâmeros para os mais variados

alvos moleculares presentes em tumores e, dentre as publicações mais atuais, podemos citar: câncer de mama (AN et al., 2015; TAO et al., 2016; CHU et al., 2017; LIU et al., 2017; LUO et al., 2018; SHEN et al., 2018), pâncreas (CLAWSON et al., 2017), fígado (WAN et al., 2015; CHEN et al., 2016; SUN et al., 2016), pulmão (SHAMSIPUR et al., 2015; ZAMAY et al., 2016), próstata (SEFAH et al., 2013; TAMBOLI et al., 2016; ZHU et al., 2016; HUANG et al., 2017), cérebro (WU et al., 2016), cervical (WANG, 2015), colorretal (HASHKAVAYI, 2017; CHEN et al., 2017), entre outros.

Por outro lado, além dos estudos envolvendo a biologia do câncer, diversos trabalhos publicados baseados em *Cell-SELEX* utilizaram células somáticas, como: células progenitoras endoteliais, adipócitos maduros, células-tronco mesenquimais derivadas de medula óssea, células-tronco embrionárias de camundongo e células-tronco mesenquimais e pluripotentes humanas (YOON et al., 2015; KIM et al., 2014; GUO et al., 2006; IWAGAWA et al., 2012; NERY, 2014; HOU et al., 2015). GUO e colaboradores (2006) isolaram células-tronco mesenquimais derivadas de medula óssea de suínos e as utilizaram como alvo para o desenvolvimento de aptâmeros. A afinidade de ligação foi detectada utilizando ensaios de *cell-sorting* com microesferas magnéticas cobertas com estreptavidina. Os aptâmeros também foram imobilizados em placas de cultura para separar as MSC de uma solução mista de células. Além disso, os oligonucleotídeos conjugados com o fluoróforo FITC foram capazes de isolar MSC por meio de uma técnica de *cell sorting* de alta velocidade ativada por fluorescência. As células isoladas por essas metodologias foram capazes de se diferenciar e apresentaram marcação positiva para células mesenquimais, demonstrando o sucesso de uma nova técnica para identificação e isolamento de MSC derivadas de medula óssea.

Um estudo liderado por HOU e colaboradores (2015) contribuiu para o desenvolvimento de um aptâmero denominado Apt19S, que demonstrou afinidade por células-tronco humanas pluripotentes induzidas (iPSCs), células-tronco embrionárias de camundongo (mESCs), de macaco Rhesus (ESCs) e humanas (hESCs). A afinidade por células não pluripotentes (BJAB, IMR90, 293FT) foi muito mais baixa do que pelas pluripotentes (PSCs) quando testada *in vitro*, sugerindo que o Apt19S se liga especificamente a epítomos presentes somente em PSCs. Essa descoberta foi importante para a medicina regenerativa, já que a contaminação de células pluripotentes indiferenciadas com outros tipos celulares é uma preocupação constante na aplicação clínica dessas células. A capacidade de Apt19S para captura e recuperação de células pluripotentes humanas também foi testada *in vitro*. As culturas de células foram

misturadas com fibroblastos derivados da glândula e a taxa de recuperação de hESCs foi > 97% utilizando o aptâmero. Além disso, o enriquecimento de culturas contendo iPSCs em experimentos de reprogramação foi cerca de seis vezes maior do que sem a utilização do Apt19S. Esse conjunto de células isolado com Apt19S foi expandido e manteve a expressão de marcadores de pluripotência, confirmando a eficiência da técnica. Ensaio para identificação do alvo determinaram que a proteína fosfatase alcalina (ALPL) foi o alvo de ligação do Apt19S, uma proteína altamente expressa por células pluripotentes.

NERY (2014), em um estudo com células derivadas da fração estromal de lipoaspirado, conseguiu isolar dois aptâmeros APT9 e APT11 capazes de identificar e purificar uma subpopulação de células-tronco mesenquimais (15,8% e 23,7%, respectivamente) com marcação positiva para CD29<sup>+</sup>/CD90<sup>+</sup>/CD45<sup>-</sup> e separá-las das demais células presentes na fração, principalmente eritrócitos, usando nanopartículas magnéticas acopladas aos aptâmeros. As metodologias adotadas foram o *Cell-SELEX* e a técnica BRASIL (*Biopanning and Rapid Analysis of Selective Interactive Ligands*) (GIORDANO et al., 2001) adaptada para a seleção de ligantes para células inteiras. Nesse método, é acrescentada uma interface orgânica na centrifugação das células e somente os ligantes que conseguiram se ligar com alta afinidade para atravessar essa fase foram selecionados, acelerando o processo de seleção dos aptâmeros. A proposta desse estudo foi a de prover um modo de purificação dessas células em tempo clínico viável para aplicação terapêutica em cirurgias.

Dessa forma, nesse capítulo, seguindo uma perspectiva similar, desenvolvemos aptâmeros capazes de se ligarem às células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo humano (hASC) por meio da técnica *Cell-SELEX*. Os aptâmeros candidatos, selecionados por sequenciamento e análises de bioinformática, foram testados quanto à afinidade por hASC em comparação aos fibroblastos dérmicos, utilizados como controle negativo durante o processo de seleção. Os fibroblastos foram escolhidos porque, a exemplo dos eritrócitos, também podem contaminar a cultura de células-tronco mesenquimais isoladas de lipoaspirado. Hipotetizamos que os novos aptâmeros desenvolvidos sejam capazes de distinguir ambas as populações de células, e essa função possa ser observada através da diferença de afinidade desses oligonucleotídeos pelas mesmas.

## **3.2 OBJETIVOS**

### ***3.2.1 Objetivo Geral***

Utilizar estratégias moleculares para a caracterização e a distinção entre células-tronco derivadas de tecido adiposo (hASC) e fibroblastos dérmicos humanos *in vitro*.

### ***3.2.2 Objetivos específicos***

- a) Selecionar aptâmeros de DNA específicos para células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo usando a técnica *Cell-SELEX*;
- b) Sequenciar os conjuntos de aptâmeros de DNA dos últimos ciclos de seleção;
- c) Predizer a estrutura secundária dos aptâmeros selecionados;
- d) Sintetizar quimicamente os aptâmeros candidatos e utilizá-los na experimentação *in vitro*, com culturas celulares, para avaliar seu potencial na distinção entre as hASC e os fibroblastos dérmicos;

## 3.3 MATERIAIS E MÉTODOS

### 3.3.1 *Cell-SELEX*

#### 3.3.1.1 Iniciadores e biblioteca de DNA fita simples

A biblioteca de DNA fita simples e os oligonucleotídeos iniciadores *forward* (F), e *reverse* (R), desenhados exclusivamente para o presente trabalho, foram sintetizados pela *Integrated DNA Technologies* (IDT<sup>®</sup>, Coralville, IA, EUA). Análises de parâmetros tais como conteúdo GC, formação de homodímero, heterodímero e *hairpins* foram realizadas usando o *software* OligoAnalyzer 3.1 (<https://www.idtdna.com/calc/analyzer>).

O oligonucleotídeo iniciador F foi marcado na extremidade 5' com 56-FAM (Sequência: 5'- /56-FAM/ATG GTC TCA CTG CGT TCA- 3'). O oligonucleotídeo iniciador R foi marcado na extremidade 5' com biotina (Sequência: 5'-/5Biosig/ AGA TTC GGT AGC ACA GGA-3'). O mesmo par de iniciadores sem marcação nas extremidades também foram adquiridos pela IDT<sup>®</sup>.

A biblioteca de DNA fita simples foi sintetizada com uma região randômica de 60 nucleotídeos cuja sequência é: 5'-ATG GTC TCA CTG CGT TCA- 60N- TCC TGT GCT ACC GAA TCT- 3', gerando uma diversidade teórica de aproximadamente  $1,3 \times 10^{36}$  sequências de aptâmeros.

#### 3.3.1.2 Tampões de Lavagem e Ligação

O tampão de lavagem foi feito adicionando-se 4,5 g de glicose (Vetec) e 5 mL de uma solução 1 M de MgCl<sub>2</sub> (Sigma-Aldrich) a 1 L de PBS 0,15 mol/L (pH 7,4). O tampão de ligação foi feito adicionando-se 450 mg de glicose, 10 mg de tRNA de levedura (Invitrogen), 100 mg de BSA (Sigma) e 500 µL de uma solução 1 M de MgCl<sub>2</sub> (Sigma) a 100 mL de PBS (0,15 mol/L).

#### 3.3.1.3 Rounds de Seleção

O processo de seleção de aptâmeros foi realizado a partir do protocolo desenvolvido por SEFAH e colaboradores (2010), com modificações introduzidas pelo nosso grupo. No primeiro *round* de seleção, as células-tronco na densidade de  $3,5 \times 10^6$ , em uma placa de 100 mm  $\times$  20 mm, foram incubadas com 2 nmol de biblioteca de DNA fita simples diluída em tampão de ligação por 1 hora e meia. Após a incubação, o sobrenadante foi descartado e as células lavadas com tampão de lavagem por três vezes.

Posteriormente, as células-tronco foram retiradas da placa adicionando-se 500 µL de água DEPC e utilizando-se um raspador de células. Para separar os aptâmeros que se ligaram às células-tronco, a mistura foi aquecida a 95 °C e, posteriormente, centrifugada a 13.100 ×g por 5 minutos. Esse conjunto inicial de sequências foi amplificado por PCR utilizando-se 10 ciclos de amplificação e, posteriormente, foi realizado o teste de ciclos da PCR para determinação do número ótimo e prosseguimento da seleção, conforme descrito a seguir (Itens 3.3.1.4 e 3.3.1.5). O número determinado foi de seis ciclos de amplificação. As sequências foram então amplificadas e a dupla fita de DNA foi separada utilizando-se esferas magnéticas do kit *Magnisphere Paramagnetic Particles (Promega)*, conforme instruções do fabricante. De forma resumida, a separação da dupla fita ocorreu pela interação entre a biotina presente no DNA amplificado com a estreptavidina da cobertura das esferas magnéticas e a eluição das sequências de DNA fita simples foi realizada com água livre de nucleases.

O segundo *round* do *Cell-SELEX* foi realizado de forma semelhante ao descrito para o primeiro, partindo-se de uma concentração inicial de 2 nmol de DNA, conforme capacidade de separação das partículas magnéticas (0,75-1,25 nmol/mg de partículas). Porém, no segundo *round*, foram escolhidos 12 ciclos de PCR para amplificação das sequências que se ligam às células-tronco.

No terceiro *round* de seleção, a pressão negativa foi introduzida: fibroblastos dérmicos na densidade de  $3 \times 10^6$  células foram semeados em placas de 100 mm × 20 mm. As sequências de DNA fita simples provenientes do segundo *round* foram incubadas com os fibroblastos por 1 hora. Após esse período, o sobrenadante contendo os aptâmeros que não se ligaram aos fibroblastos foi extraído, aquecido e centrifugado para posterior teste de ciclos da PCR. No teste, foi escolhido o número ótimo de 20 ciclos, repetido nos ciclos posteriores de seleção negativa. Após a amplificação e separação da dupla fita de DNA, os ligantes foram incubados com a célula alvo por 1 hora e o número ótimo determinado foi de 16 ciclos de PCR. Essa quantidade de ciclos também foi utilizada nos ciclos de seleção positiva posteriores. A partir do quarto *round*, o número determinado de ciclos de PCR para fibroblastos e células-tronco foi mantido; porém, algumas modificações tais como a redução do tempo de incubação com ambas as células, aumento do número de células controle e redução do número de células alvo foram introduzidas na seleção (Tabela 1). Essas modificações visaram aumentar a estríngência do processo de *Cell-SELEX*. A seleção foi realizada até o 8º *round*.

**Tabela 1. Parâmetros da seleção *in vitro* de aptâmeros de DNA**

<b>Rounds</b>	<b>Seleção Negativa: Fibroblastos</b>	<b>Tempo de Incubação</b>	<b>Nº de <i>dish</i></b>	<b>Nº de Ciclos PCR</b>	<b>Seleção Positiva: hASC</b>	<b>Nº de <i>dish</i></b>	<b>Tempo de Incubação</b>	<b>Nº de Ciclos PCR</b>
<b>1</b>	-		-	-	3,5x 10 <sup>6</sup>	1	1h30min	6
<b>2</b>	-		-	-	3,5x10 <sup>6</sup>	1	1h30min	12
<b>3</b>	3 x10 <sup>6</sup>	30min	1	20	3x10 <sup>6</sup>	1	1h	16
<b>4</b>	3x10 <sup>6</sup>	30min	1	20	3x10 <sup>6</sup>	1	45min	16
<b>5</b>	3x10 <sup>6</sup>	30min	1	20	5x10 <sup>5</sup>	1	30min	16
<b>6</b>	3x10 <sup>6</sup>	30min	1	20	5x10 <sup>5</sup>	1	30min	16
<b>7</b>	3x10 <sup>6</sup>	30min	1	20	5x10 <sup>5</sup>	1	30min	16
<b>8</b>	3x10 <sup>6</sup>	20 min	2	20	5x10 <sup>5</sup>	1	20 min	16

#### 3.3.1.4 Reação em Cadeia da Polimerase

No primeiro *round* de seleção, uma reação com volume final de 1000 µL foi preparada com o objetivo de amplificar todas as sequências recuperadas da incubação com as células-tronco. Nessa reação, foram utilizados 500 µL de DNA fita simples, tampão 5× *Colorless GoTaq® Flexi Buffer* (Promega); 2,5 mM de cada um dos quatro dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP); 50 mM de MgCl<sub>2</sub>; 0,5 µM de iniciadores (F e R marcados com FAM e biotina, respectivamente) e 5 µL de *GoTaq® DNA Polymerase* (5 U/µL) (Promega).

O volume total foi homogeneizado e distribuído em 10 tubos contendo 100 µL cada um. As condições de amplificação foram: uma etapa inicial de desnaturação a 95 °C por 3 minutos, seguido de 10 ciclos de 95 °C por 30 segundos (desnaturação), 53,3 °C por 30 segundos (hibridização) e 72 °C por 30 segundos. Uma última etapa de extensão foi realizada a 72 °C por 5 minutos. Em todas as reações de PCR foi feito um controle (branco) de amplificação, onde água livre de nucleases foi acrescentada no lugar de DNA.

Nos *rounds* subsequentes, os mesmos reagentes relacionados anteriormente foram utilizados, porém 10% do conjunto de sequências de DNA fita simples de cada ciclo foi acrescentado na reação de 1000 µL, conforme protocolo estabelecido na literatura (SEFAH et al., 2010). No segundo *round* foram utilizadas as mesmas condições da reação de PCR, porém com 12 ciclos de amplificação. Nos *rounds* seguintes, o programa utilizado na seleção negativa (fibroblastos) e positiva (célula-tronco) também foi o mesmo, porém com 20 ciclos e 16 ciclos de amplificação, respectivamente.

#### 3.3.1.5 Teste de Ciclos: determinação do número ótimo de ciclos de PCR

O volume total da reação de PCR para cada tubo foi de 50 µL, com o conjunto de sequências de DNA recuperadas em cada ciclo correspondendo a 10% do volume final. Nas reações, foram acrescentados tampão 5× *Colorless GoTaq® Flexi Buffer* (Promega); 2,5 mM de cada um dos quatro dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP); 50 mM de MgCl<sub>2</sub>; 0,5 µM de iniciadores (F e R não marcados) e 0,25 µL de *GoTaq® DNA Polymerase* (5 U/µL) (Promega).

O teste foi realizado com o mesmo programa de amplificação descrito no item 3.3.1.4, porém com número de ciclos variável (de 4 até 22 ciclos) de acordo com o ciclo da seleção. Em todas as reações de PCR foi feito um controle branco de amplificação, contendo todos os reagentes, exceto o DNA. Os produtos das PCRs foram analisados por eletroforese em géis de agarose 2%, corados com brometo de etídio (5 µg/mL) e analisados em transluminador de luz ultravioleta (UVP). O número de ciclos ao fim de cada *round* de incubação com as células foi determinado analisando-se o tamanho e intensidade das bandas no gel, de acordo com recomendação de SEFAH e colaboradores (2010).

### **3.3.2 Monitoramento do Progresso da Seleção**

O monitoramento do progresso da seleção *in vitro* dos aptâmeros foi realizado a cada *round* por meio da análise da curva de dissociação (DNA *melting*) das sequências (THIEL et al., 2012; MENCIN et al., 2014). Para essa finalidade, o reagente SYBR® *Green PCR Master Mix 2x* (Applied Biosystems) foi adicionado na proporção 1:1 a 5 µL do produto de PCR, totalizando um volume de 10 µL. As amostras foram submetidas à desnaturação gradual para determinação da curva de acordo com o protocolo: 95 °C por 15 minutos, 95 °C por 15 segundos, rampa de desnaturação de 40 °C a 95 °C e 25 °C por 15 segundos. Em todas as reações foi feito um controle branco de amplificação, onde o branco da PCR foi acrescentado no lugar do produto da PCR. As leituras foram realizadas nos equipamentos 7500 ou 7900HT Fast Real-Time PCR System e analisados nas ferramentas *7.500 Software v. 2.3* (Applied Biosystems) ou *SDS v.2.4* (Applied Biosystems), respectivamente, onde os gráficos de intensidade de fluorescência *versus* temperatura foram gerados para análise.

### **3.3.3 Seleção e Validação dos Aptâmeros Candidatos *in vitro***

#### **3.3.3.1 Sequenciamento de Nova Geração e Seleção dos aptâmeros candidatos**

Ao final do 8° *round* de seleção, as sequências enriquecidas do 7° e 8° *round* após incubação com hASC e as sequências extraídas após a incubação com fibroblastos no 8° *round* foram encaminhadas para sequenciamento de nova geração (NGS) realizado pela empresa GenXPro (Alemanha). A Plataforma Illumina MiSeq foi utilizada para o NGS, e essa etapa foi prosseguida pela análise por bioinformática para eliminação das *reads* com baixa qualidade, quantificação e geração de tabelas com os

resultados. As análises pós-sequenciamento foram feitas usando o servidor *Galaxy* (versão 18.09) conforme descrito por THIEL (2016) e as estruturas tridimensionais, assim como a energia livre dos aptâmeros ( $\Delta G$ ), foram determinadas utilizando-se o servidor *online The mFold Web Server*. As estruturas foram calculadas utilizando-se as condições de incubação em meio sem soro a 24°C.

Após essas análises, quatro critérios de escolha foram estabelecidos para a seleção dos aptâmeros candidatos:

- a) Sequências mais prevalentes em hASC quando comparadas aos fibroblastos e enriquecidas do 7º para o 8º *round* em hASC;
- b) Sequências exclusivas em hASC e enriquecidas do 7º para o 8º *round*;
- c) Menor valor de  $\Delta G$  total a 24°C das sequências selecionadas (aptâmeros com estruturas tridimensionais termodinamicamente mais estáveis).

Ao final, quatro aptâmeros candidatos foram selecionados para os testes de validação *in vitro*.

### 3.3.3.2 Alinhamento e análise comparativa das sequências de nucleotídeos dos aptâmeros selecionados

A história evolutiva das sequências de nucleotídeos dos aptâmeros candidatos foi inferida usando o método da Máxima Verossimilhança e o modelo de Tamura-Nei (TAMURA & NEI, 1993). A árvore com a maior probabilidade de log (-407,77) foi selecionada. A (s) árvore (s) inicial (is) para a pesquisa heurística foram obtidas automaticamente aplicando algoritmos de Neighbor-Join e BioNJ a uma matriz de distância entre pares estimada usando a abordagem MVI (*Maximum Composite Likelihood*) e selecionando a topologia com valor de log superior. A árvore foi desenhada em escala, com comprimentos de ramificações medidos no número de substituições por sítio. Esta análise envolveu as quatro sequências nucleotídicas escolhidas previamente, em um total de 100 posições no conjunto de dados final. Os quatro aptâmeros foram alinhados com auxílio da ferramenta Align e depois comparados pela história evolutiva. Todas as análises foram realizadas utilizando o *software* MEGA X (KUMAR et al., 2018), disponível em <https://www.megasoftware.net/>.

### 3.3.3.3 Sequência Randômica/ Scrambled e normalizadora AT1

Além dos quatro aptâmeros candidatos escolhidos, uma sequência *scrambled* (SCR) que não é capaz de se ligar com alta afinidade às hASC e fibroblastos foi desenhada e encaminhada para síntese (IDT®). Essa sequência possui em suas extremidades a mesma região de hibridização de iniciadores que as sequências dos aptâmeros escolhidos, totalizando 65 nucleotídeos. Em negrito, destaca-se a região randômica composta por 29 nucleotídeos, que é distinta da região randômica dos demais aptâmeros: 5' ATGGTCTCACATTTGGCAGGGCCTTAAGGCCATGGGCCTTAA **GGCCCTCCTGTGCTACCGAATCT**-3'.

Baseado no método de normalização das reações de qPCR desenvolvido por GRAZIANI e colaboradores (2017), também foi sintetizada uma sequência de nucleotídeos exógena normalizadora extraída do genoma da espécie vegetal *Arabidopsis thaliana*: AT1: 5' GCATGTTTGAACAGACACTGTATCTGTATTGTTACAATGGATATTGAT TTGGTGTTTGCAGGATCCTGGACAGAAGCAAAGGCA-3', que pode ser amplificada pelos iniciadores F: GCATGTTTGAACAGACACTG e R: TGCCTTTGCTTCTGTCCAGG. A sequência AT1 foi utilizada como um controle de referência interno nas reações de qPCR. Esta sequência foi acrescentada aos sobrenadantes recuperados nos ensaios de ligação conforme descrito no método a seguir (Item 3.3.3.4).

### 3.3.3.4 Ensaio *in vitro* de Ligação dos Aptâmeros Candidatos

Os quatro aptâmeros, assim como a sequência randômica ou *scrambled*, foram testados quanto à eficiência de ligação às células humanas utilizadas nesse estudo. As hASC e os fibroblastos foram plaqueados em duplicata na densidade de  $5 \times 10^5$  células/poço em placas de 6 poços e deixados incubadora de CO<sub>2</sub>/ atmosfera úmida por 24 horas. Os aptâmeros foram diluídos na concentração de 250 nM (nanomolar), previamente aquecidos à 95 °C e depois colocados no gelo por 10 minutos para a formação adequada de sua estrutura tridimensional. Depois, foram incubados com as células-tronco e fibroblastos por 20 minutos à temperatura ambiente sob leve agitação. Ao final dos 20 minutos, o excesso de sequências foi retirado com três lavagens seguidas com PBS gelado. Para recuperação do conjugado célula-aptâmero, utilizou-se um *cell scraper* para retirada das células e, assim, as sequências foram eluídas em H<sub>2</sub>O

DEPC sob aquecimento a 95 °C por 10 minutos. A sequência normalizadora AT1 foi acrescentada, na concentração final de 100 fM (fentomolar), a uma das duplicatas de cada célula antes da eluição. Para retirada dos debris celulares, o eluído foi centrifugado por 5 minutos a 13.200 xg e o sobrenadante recuperado e armazenado a -20°C.

### 3.3.3.5 Comparação do Ciclo de Quantificação entre o aptâmero *Scrambled* e os aptâmeros candidatos após incubação com as células

Os sobrenadantes correspondentes a cada incubação com aptâmeros e a sequência *scrambled* tanto em hASC quanto em fibroblastos foram diluídos na concentração 1:100 em água DEPC. Em seguida, foram amplificados por qPCR utilizando-se o Kit Go Taq® qPCR Master Mix (Promega). Na composição de cada reação foram acrescentados: 5 µL de GoTaq® qPCR Master Mix (2X), 0,2 µM de cada par de *primers*, 2µL de aptâmeros diluídos e água livre de nucleases, totalizando 10 µL de reação. As reações, em triplicata, foram transferidas para placas rígidas de 96 poços e colocadas no equipamento CFX Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) para amplificação. As condições de amplificação da qPCR foram as seguintes: incubação inicial a 95 °C por 2 minutos, seguido de 40 ciclos de: 95 °C por 15 segundos (desnaturação) e uma etapa única de hibridização e extensão a 60 °C por 1 minuto. Após os 40 ciclos de amplificação, todas as amostras foram submetidas à desnaturação gradual para determinação da curva de dissociação (*melting curve*). Com o objetivo de se fazer análise comparativa do ciclo de quantificação (Cq) entre *scrambled* e os aptâmeros, dois mix de reações distintos para cada sequência foram preparados: um mix em que as sequências foram amplificadas com o par de iniciadores da biblioteca original de aptâmeros e outro mix para amplificação da sequência AT1 com os seus iniciadores correspondentes. Os controles (brancos) de reação também foram preparados, contendo somente os pares de iniciadores. A eficiência de cada reação foi calculada por meio da equação:  $E \text{ (eficiência)} = (R2/R1)^{1/(Ct2-Ct1)} - 1$ , onde R2 e R1 correspondem a dois valores arbitrários de fluorescência, sendo R2 o maior valor e R1 o menor valor, e Ct2 e Ct1 os valores de Cq correspondentes a R2 e R1, respectivamente (LIU & SAINT, 2002; CIKOS et al., 2007). Todas as placas foram normalizadas em função de AT1 e o Cq de cada grupo foi determinado utilizando a ferramenta Gene Study presente no *software* Bio-Rad CFX Manager Software 3.1. Todos os ensaios e cálculos de normalização foram feitos para hASC e fibroblastos dérmicos separadamente. Os dados

foram representados em gráficos de barras com média e erro padrão da média (SEM) proveniente de três experimentos independentes. Os grupos foram comparados utilizando-se o teste One-way ANOVA com pós-teste de Bonferroni.

#### 3.3.3.6 Quantificação Relativa da Eficiência de Ligação dos Aptâmeros em hASC e fibroblastos dérmicos

Os sobrenadantes correspondentes a cada sequência incubados com cada tipo celular foram diluídos na concentração 1:100 em água DEPC e amplificados por qPCR utilizando-se o Kit Go Taq<sup>®</sup> qPCR Master Mix (Promega), conforme descrito no item 3.3.3.5. Com o objetivo de se fazer análise comparativa da eficiência de ligação dos aptâmeros por hASC e fibroblastos, duas reações diferentes, em quadruplicata, foram preparadas: uma em que as sequências foram amplificadas com o par de iniciadores da biblioteca original de aptâmeros e outra reação para amplificação da sequência AT1 com os seus iniciadores correspondentes. Os controles (brancos) de reação também foram preparados, contendo somente os pares de iniciadores para amplificação de cada sequência. A eficiência de cada reação de qPCR foi calculada sem a necessidade de curva padrão prévia, conforme descrito previamente (LIU & SAINT, 2002; CIKOS et al., 2007). A quantificação relativa foi calculada utilizando-se o método desenvolvido por PFAFFL (2001), em que se consideram as eficiências calculadas a cada reação usando *Pair Wise Fixed Reallocation Randomisation Test*.

#### 3.3.3.7 Cálculo da Constante de Dissociação dos Aptâmeros (Kd) para determinação da Afinidade de Ligação por hASC e fibroblastos

Os valores da constante de dissociação (Kd) de cada aptâmero foram estimados usando a curva de regressão não-linear baseada na equação de Lineweaver-Burk adaptada por GRAZIANI e colaboradores (2017). Nos ensaios *in vitro*, as células foram plaqueadas na densidade de  $5 \times 10^5$  em placas de seis poços e, após 24 horas, foram incubadas com diferentes concentrações de cada aptâmero (em uma faixa de concentrações de 25 nM a 400 nM) por 20 minutos à temperatura ambiente. Após incubação, as células foram lavadas e o sobrenadante contendo os aptâmeros ligados às células foi recuperado por aquecimento e centrifugação conforme descrito no item 3.3.3.4, com exceção da sequência normalizadora AT1 que não foi acrescentada a essa eluição. Os sobrenadantes correspondentes às diferentes concentrações de cada

aptâmero incubado com ambos os tipos celulares (hASC e fibroblastos) foram diluídos na concentração 1:100 em água DEPC e amplificados por qPCR utilizando-se o Kit Go Taq<sup>®</sup> qPCR Master Mix (Promega), conforme descrito no item 3.3.3.5. Todas as reações foram lidas em quadruplicata. Para fins de normalização, foi feita uma curva padrão de cada aptâmero isolado, ou seja, não ligado às células. Os valores de Cq obtidos nessa curva padrão foram utilizados para conversão dos valores de Cq dos aptâmeros ligados às células para uma concentração correspondente, expressa em nanomolar. A fórmula utilizada foi:  $10^{*(Cq \text{ da concentração do aptâmeros isolados} - Cq \text{ da concentração dos aptâmeros ligados à célula}) / \text{slope da curva padrão dos aptâmeros isolados}}$  conforme descrito por GRAZIANI e colaboradores (2017). Após a obtenção desses valores em nM, a determinação do Kd foi feita utilizando-se a equação de regressão não-linear One-Site Specific Binding no software Graph Pad Prism 5.

#### **3.3.4 Análises Estatísticas**

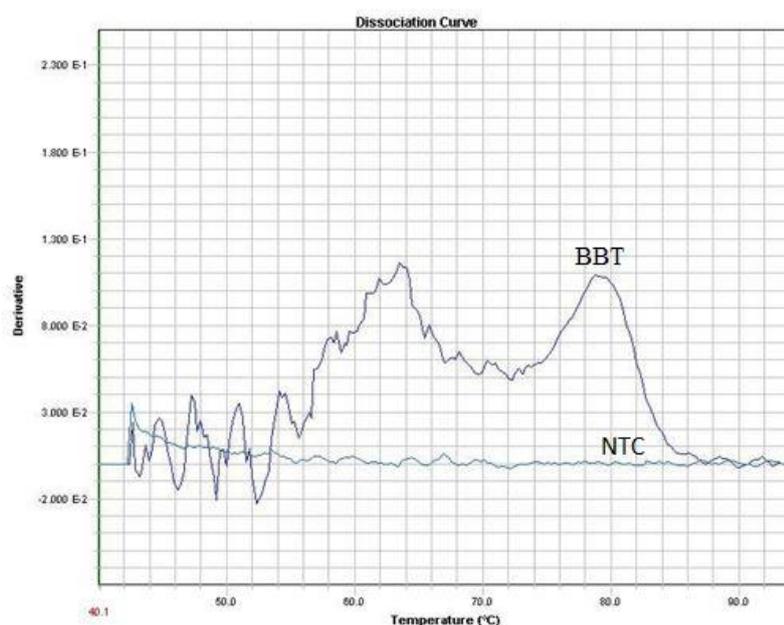
As análises estatísticas foram realizadas utilizando o *software* Graph Pad Prism 5. Para comparação entre dois grupos, foram utilizados Unpaired t test/ One-tailed, após os dados serem verificados utilizando-se o teste de normalidade de D'Agostino & Pearson. Para comparações entre mais de dois grupos, os pares de médias foram comparados utilizando-se One-way ANOVA com pós-teste de Bonferroni. Os resultados foram expressos graficamente como média  $\pm$ erro padrão e foi considerada significância com o valor de  $p < 0,05$ . Para determinação da constante de dissociação, foi utilizada a função de regressão não linear One-Site Specific Binding, considerando-se o fit da curva com  $R^2 > 0,90$ .

## 3.4 RESULTADOS

### 3.4.1 Seleção dos Aptâmeros de DNA

#### 3.4.1.1 Curva de dissociação da biblioteca de DNA antes da seleção

A biblioteca de DNA fita simples foi submetida à curva de dissociação (DNA *melting*) utilizando-se o equipamento 7900HT Fast Real-Time PCR System. Por meio do gráfico de temperatura (eixo X) *versus* intensidade de fluorescência (eixo Y), é possível observar a diversidade das sequências antes da realização do primeiro ciclo do *Cell-SELEX*, indicado pela presença de picos largos e em temperaturas de *melting* ( $T_m$ ) variadas. O pico com  $T_m$  entre 55-70 °C é representativo de aptâmeros com região randômica rica em adenina (A) e timina (T), enquanto o pico com  $T_m$  entre 70-85 °C é representativo de aptâmeros com região randômica rica em guanina (G) e citosina (C) (Figura 14).



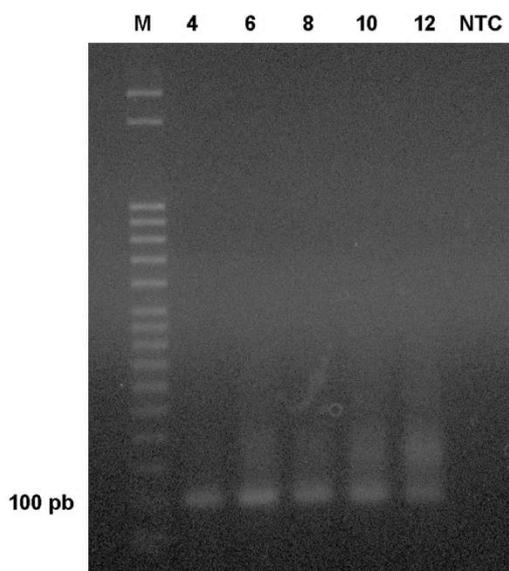
**Figura 14. Diversidade das sequências antes da realização do primeiro round do *Cell-SELEX*.** O gráfico demonstra a curva de dissociação dos oligonucleotídeos presentes na biblioteca de DNA original (BBT) utilizada na seleção dos aptâmeros. NTC: Branco da PCR (*No Template Control*). Imagem obtida por meio do *software SDS v 2.4* (Applied Biosystems).

O enriquecimento da biblioteca com aptâmeros que apresentam alta afinidade e especificidade pela célula alvo é indicado por uma alteração na curva de dissociação em direção a temperaturas mais elevadas (THIEL et al., 2012). Uma possível explicação para esse fato é que sequências ricas em C e G (três ligações de hidrogênio) formam

estruturas tridimensionais mais estáveis quando comparadas às aquelas ricas em A e T (duas ligações de hidrogênio) e, como dito anteriormente, a ligação do aptâmero ocorre por meio da formação de uma estrutura tridimensional criando uma superfície de interação com o alvo. Além disso, espera-se observar a presença de picos mais estreitos à medida que os *rounds* de seleção forem sendo realizados, indicando uma menor diversidade dos conjuntos de aptâmeros (MENCIN et al., 2014).

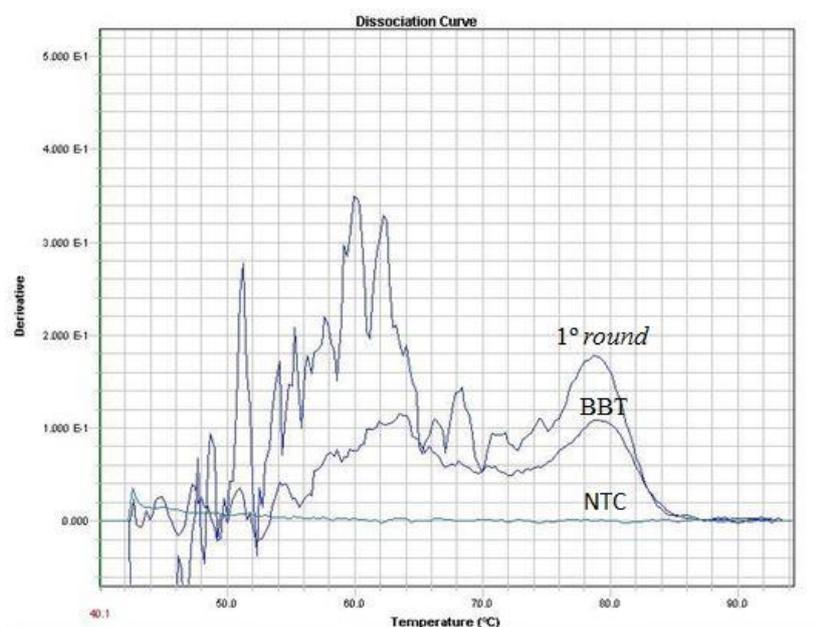
#### 3.4.1.2 1º round do Cell- SELEX

No primeiro *round*, os oligonucleotídeos de DNA fita simples foram incubados com as células-tronco na densidade de  $3,5 \times 10^6$  células por 1 hora e meia. Posteriormente, foi realizada uma amplificação prévia de 10 ciclos por PCR e, então, foi estabelecido o teste para escolha do número ótimo de ciclos após o 1º *round* de seleção. O gel de agarose (2%) corado com brometo de etídeo mostrou que o ciclo 6 apresentou uma banda brilhante e clara e não houve a presença de *amplicons* inespecíficos (Figura 15) sendo, portanto, escolhido como o número ótimo necessário para prosseguimento do Cell-SELEX.



**Figura 15. Análise eletroforética para escolha do ciclo ideal para prosseguimento do Cell-SELEX.** Amostras aplicadas em gel de agarose (2%) corado com brometo de etídeo dos *amplicons* produzidos por PCR no teste de ciclos do primeiro *round*. A ordem no gel é (M): Marcador *Step-Ladder* 50 pb, (4) até (12): *amplicons* produzidos a partir de 4, 6, 8, 10 e 12 ciclos da reação de PCR, respectivamente. (NTC): branco da reação de 12 ciclos de PCR.

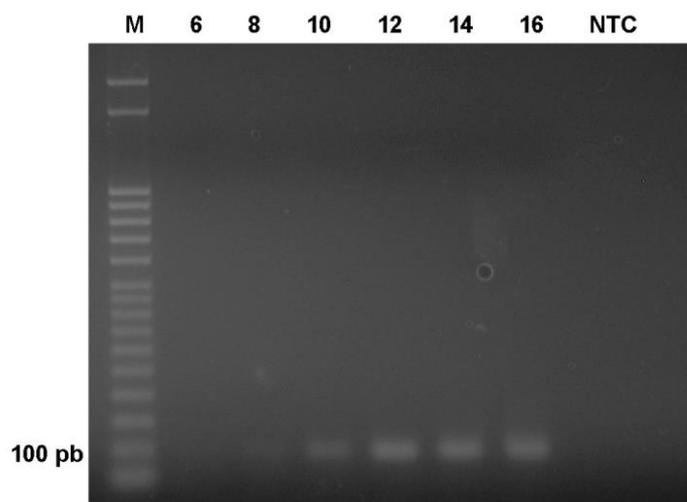
Após a determinação do número ótimo de ciclos, foi realizada a amplificação das sequências do 1º *pool*, seguida da análise da curva de dissociação das mesmas comparando-se com a biblioteca original (Figura 16). Verificou-se uma mudança na diversidade da biblioteca, com um aumento na área e na largura do pico em  $T_m$  menores (região de não interesse) e com um aumento menos relevante, mas notório, na área do pico em  $T_m$  mais elevadas (região de interesse). Assim, visto que a incubação com as células-tronco alterou o perfil do conjunto de sequências, a mesma pressão seletiva foi mantida no segundo *round* do *Cell-SELEX*.



**Figura 16. Curvas de dissociação dos oligonucleotídeos presentes na biblioteca (BBT) e no 1º round de seleção dos aptâmeros. NTC: Branco da PCR (*No Template Control*). Imagem obtida por meio do *software SDS v 2.4* (Applied Biosystems).**

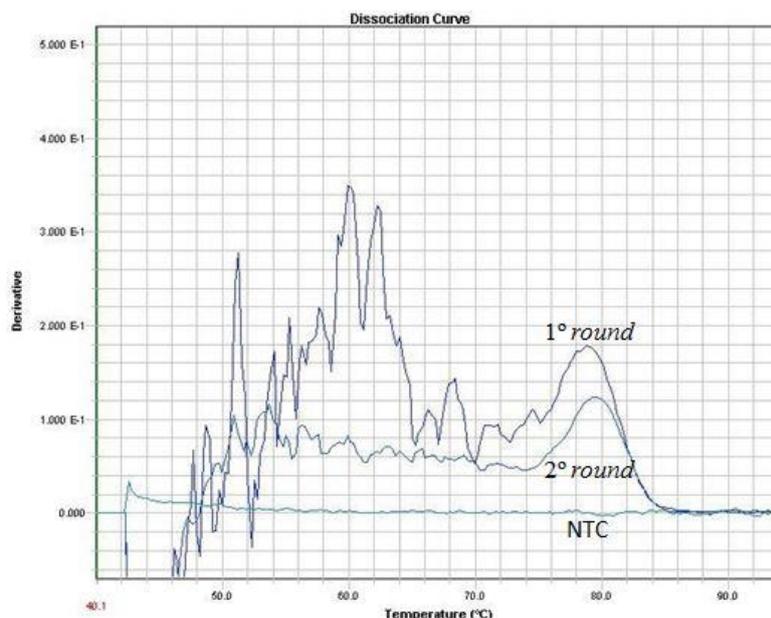
### 3.4.1.3 2º round do *Cell-SELEX*

No segundo *round*, após a recuperação da fita simples de DNA e incubação com as células-tronco, o conjunto de sequências selecionado foi submetido ao teste de ciclos (Figura 17). Analisando-se o gel, observa-se uma banda brilhante e clara sem amplificação inespecífica formada pelo produto da PCR após 12 ciclos de amplificação.



**Figura 17. Análise eletroforética em gel de agarose (2%) corado com brometo de etídeo dos amplicons produzidos por PCR no teste de ciclos do segundo round de seleção.** A ordem no gel é (M): Marcador *Step-Ladder 50pb*, (6) até (16): amplicons produzidos a partir de 6, 8, 10, 12, 14 e 16 ciclos da reação de PCR, respectivamente. (NTC): branco da reação de 16 ciclos de PCR.

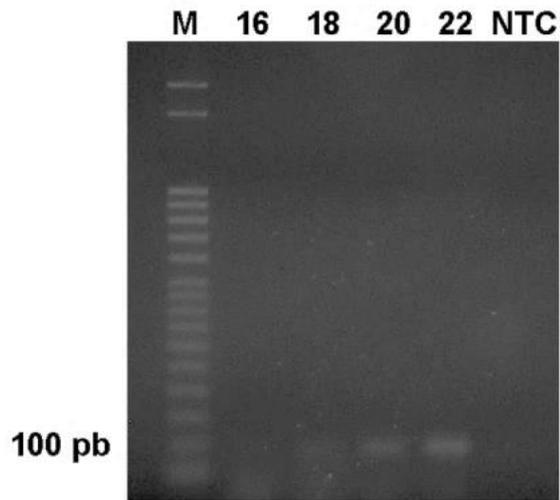
Após 12 ciclos de PCR, foi realizada a curva de dissociação das sequências selecionadas no segundo *round* do *Cell-SELEX*, comparando-se à curva obtida no primeiro (Figura 18). Verificou-se uma redução expressiva no pico correspondente às sequências com  $T_m$  menores no segundo *round* quando comparado ao primeiro, sugerindo que a seleção estava ocorrendo de acordo com os parâmetros descritos na literatura (MENCIN et al., 2014).



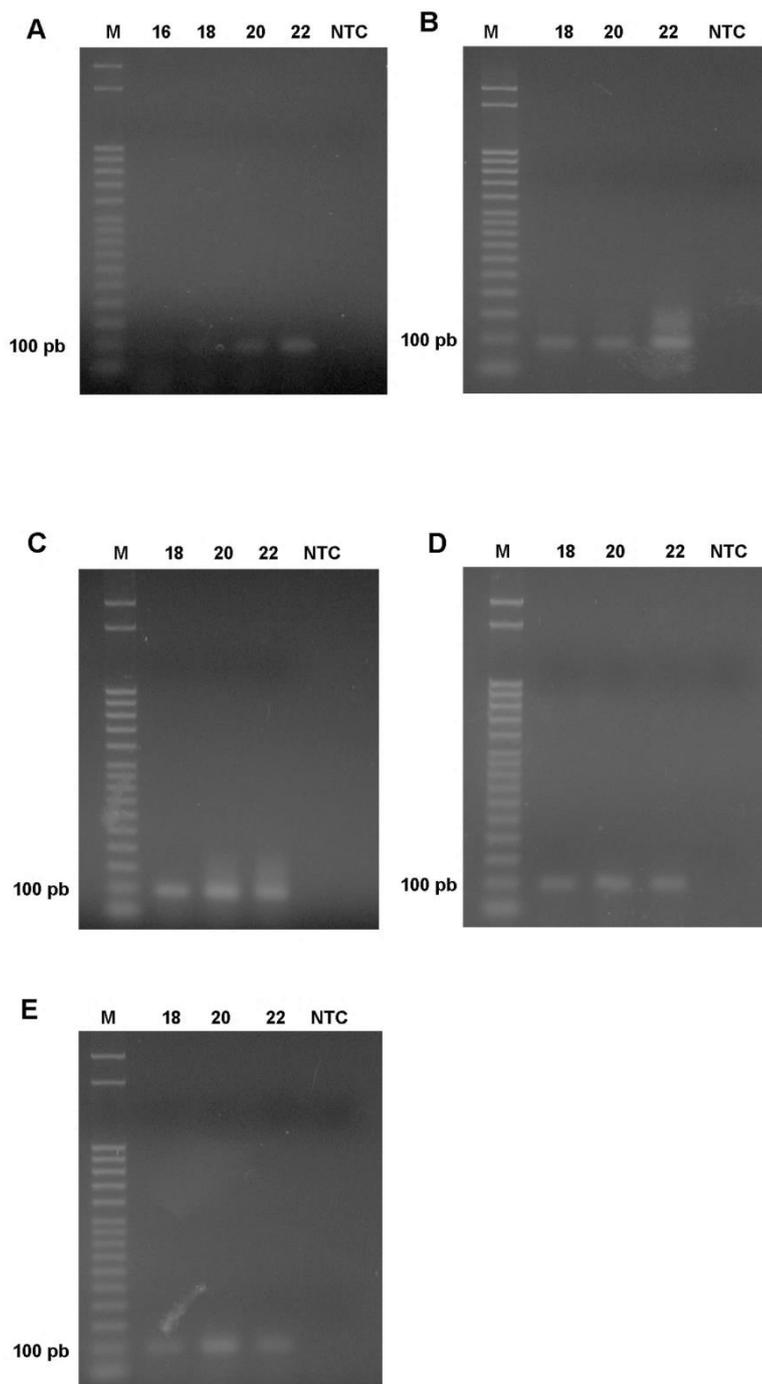
**Figura 18. Curvas de dissociação dos oligonucleotídeos presentes no 1° round e no 2° round de seleção dos aptâmeros.** NTC: Branco da PCR (*No Template Control*). Imagem obtida por meio do *software SDS v 2.4* (Applied Biosystems).

#### 3.4.1.4 3° round do Cell-SELEX

No terceiro *round* de seleção, foi introduzida a seleção negativa com os fibroblastos dérmicos, de acordo com protocolo recomendado por SEFAH e colaboradores (2010) e com experiência prévia do nosso laboratório. A introdução da seleção negativa precocemente é essencial para o enriquecimento da biblioteca com sequências específicas para a célula alvo. Após a separação das fitas de DNA, os aptâmeros foram incubados com os fibroblastos na densidade de  $3 \times 10^6$  células por 30 minutos. Posteriormente, o sobrenadante contendo as sequências que não se ligaram a essas células foi recuperado para o teste de ciclos. O número determinado foi de 20 ciclos de PCR (Figura 19). Esse número de ciclos foi mantido até o final do processo de seleção dos aptâmeros (Figura 20).

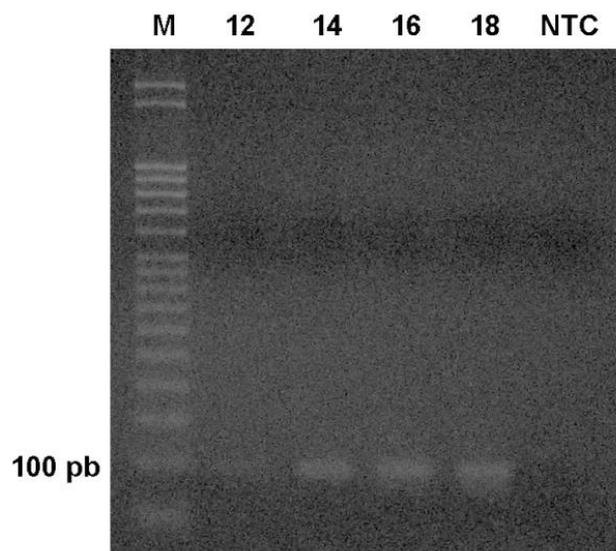


**Figura 19.** Análise eletroforética em gel de agarose (2%) corado com brometo de etídeo dos *amplicons* produzidos por PCR no teste de ciclos da seleção negativa do 3º round. A ordem no gel é (M): Marcador *Step-Ladder* 50 pb (16) até (22): *amplicons* produzidos a partir de 16, 18, 20 e 22 ciclos da reação de PCR, respectivamente, (NTC): branco da reação de 22 ciclos de PCR.

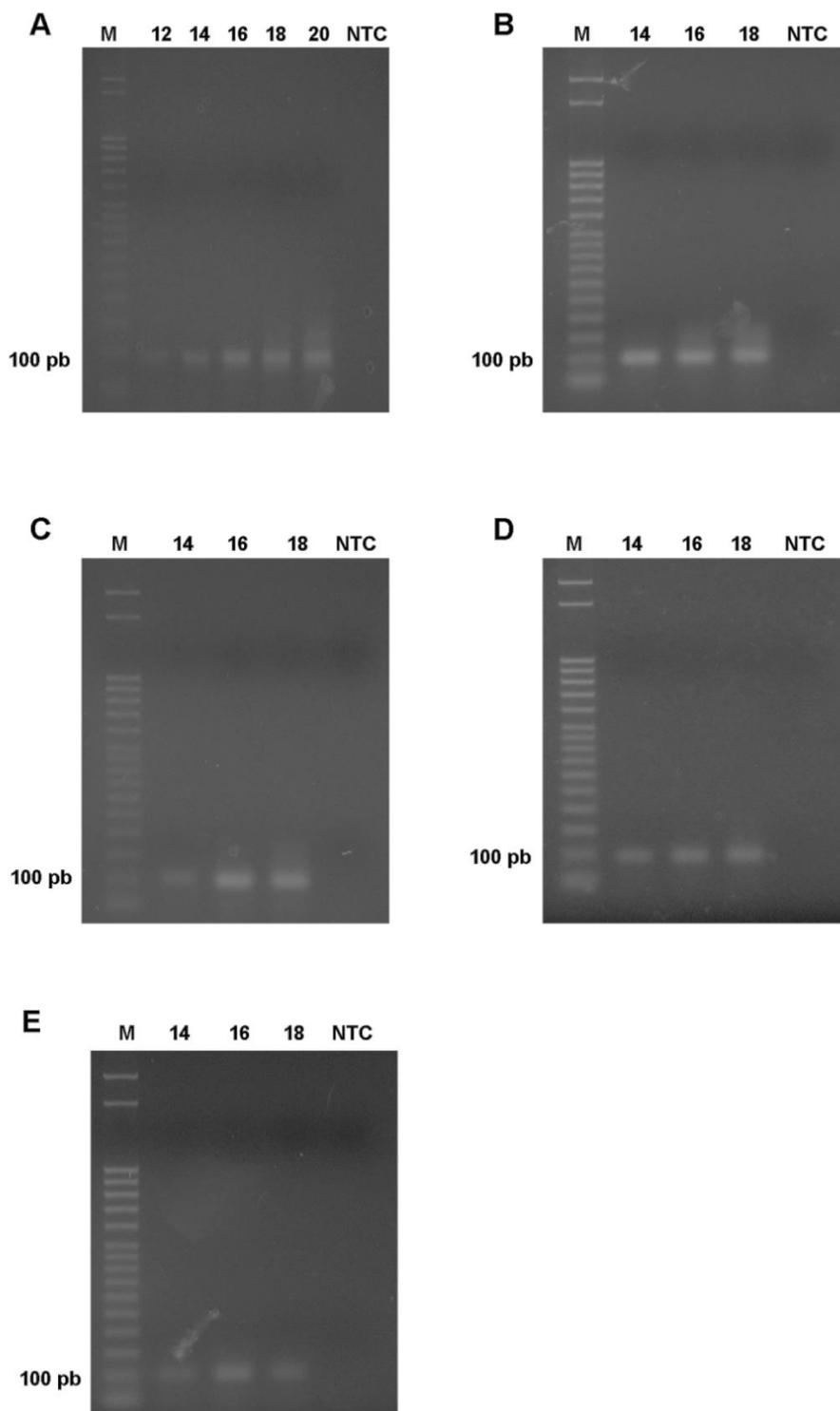


**Figura 20. Análise eletroforética em gel de agarose (2%) corado com brometo de etídeo dos amplicons produzidos por PCR no teste de ciclos da seleção negativa de todos os rounds.** A ordem no gel é (M): Marcador *Step-Ladder* 50 pb, (16) até (22): amplicons produzidos a partir de 16, 18, 20 e 22 ciclos da reação de PCR, respectivamente. (NTC): branco da reação de 22 ciclos de PCR. (A) 4º ciclo, (B) 5º ciclo, (C) 6º ciclo, (D) 7º ciclo, (E) 8º ciclo.

Após a separação da dupla fita de DNA, os oligonucleotídeos foram incubados com as células-tronco por 1 hora. A redução no tempo de incubação também foi introduzida no *Cell-SELEX* para o enriquecimento da biblioteca com aptâmeros específicos para a célula alvo, de acordo com recomendações da literatura (SEFAH et al., 2010). O teste de ciclos dos aptâmeros após o 3º *round* indicou que o número ótimo foi de 16 ciclos de PCR (Figura 21). Dessa forma, esse número foi mantido até o final do *Cell-SELEX* (Figura 22).

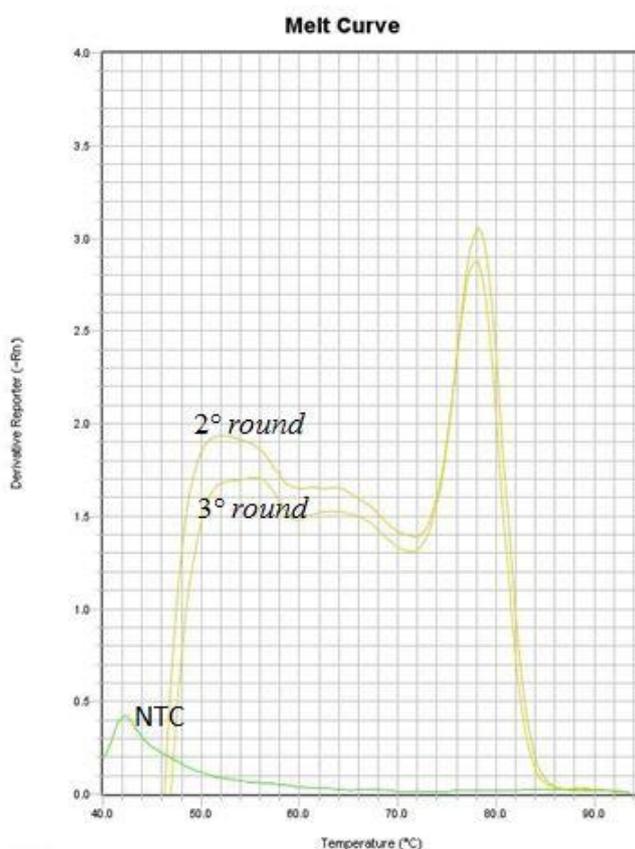


**Figura 21. Análise eletroforética em gel de agarose (2%) corado com brometo de etídeo dos amplicons produzidos por PCR no teste de ciclos da seleção positiva do 3º round.** A ordem no gel é (M): Marcador *Step-Ladder* 50 pb, (12) até (18): amplicons produzidos a partir de 12, 14, 16 e 18 ciclos da reação de PCR, respectivamente. (NTC): branco da reação de 18 ciclos de PCR.



**Figura 22.** Análise eletroforética em gel de agarose (2%) corado com brometo de etídeo dos *amplicons* produzidos por PCR no teste de ciclos da seleção positiva de todos os *rounds*. A ordem no gel é (M): Marcador *Step-Ladder* 50 pb, (12) até (20): *amplicons* produzidos a partir de 12, 14, 16, 18 e 20 ciclos da reação de PCR, respectivamente, (NTC): branco da reação de 20 ciclos (A) e 18 ciclos (B até D) de PCR. (A) 4º ciclo, (B) 5º ciclo, (C) 6º ciclo, (D) 7º ciclo, (E) 8º ciclo.

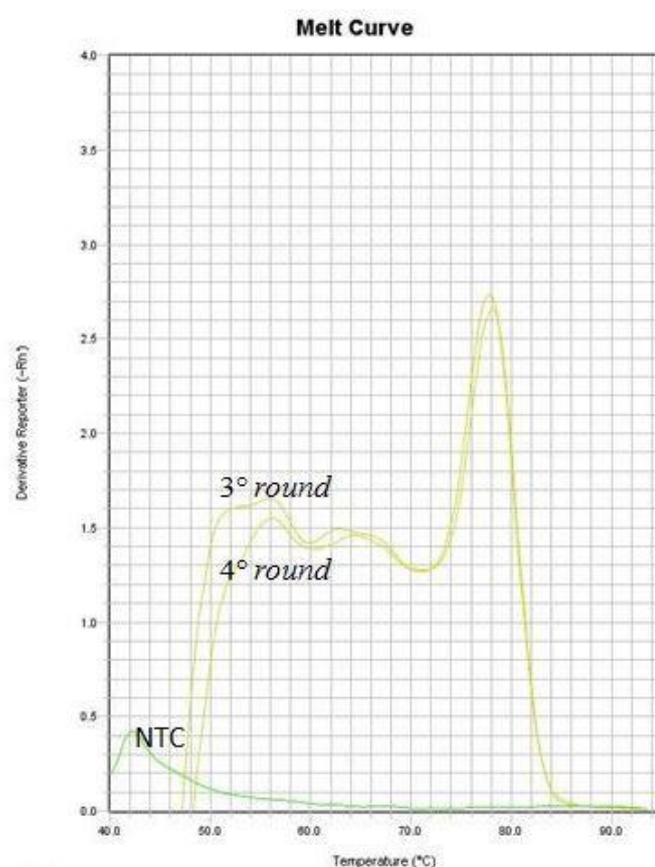
Ao final do terceiro *round*, foi gerada a curva de dissociação dos aptâmeros comparando-se com a curva do segundo *round* (Figura 23). As leituras de ambas foram realizadas no equipamento 7500 Real-Time PCR System. A curva de dissociação do terceiro *round* mostrou a presença de um pico estreito e relativamente alto à direita, correspondente às sequências com  $T_m$  maiores (região de interesse). Quando comparado ao segundo, verificou-se que esse pico estava sobreposto nos dois *rounds*, indicando que o perfil da curva não se alterou. Em relação às sequências com  $T_m$  menores (região de não interesse), o perfil da curva não se alterou. Dessa forma, optou-se por mudar a pressão de seleção no próximo *round* do *Cell-SELEX*.



**Figura 23. Curvas de dissociação dos oligonucleotídeos presentes no 2° round e no 3° round de seleção dos aptâmeros.** NTC: Branco da PCR (*No Template Control*). Imagem obtida por meio do *software* 7500 v2.3 (Applied Biosystems).

### 3.4.1.5 4º round do Cell-SELEX

No quarto *round*, a seleção negativa com os fibroblastos foi realizada de forma idêntica ao terceiro. Porém, o tempo de incubação dos aptâmeros com as células-tronco foi reduzido de 1 hora para 45 minutos, aumentando-se a pressão de seleção positiva. A comparação da curva de dissociação gerada para os dois *rounds* mostrou picos sobrepostos correspondentes às sequências com  $T_m$  maiores. O perfil da curva na região de menor  $T_m$  foi semelhante em ambos (Figura 24). Dessa forma, optou-se por aumentar a pressão positiva no próximo *round*.

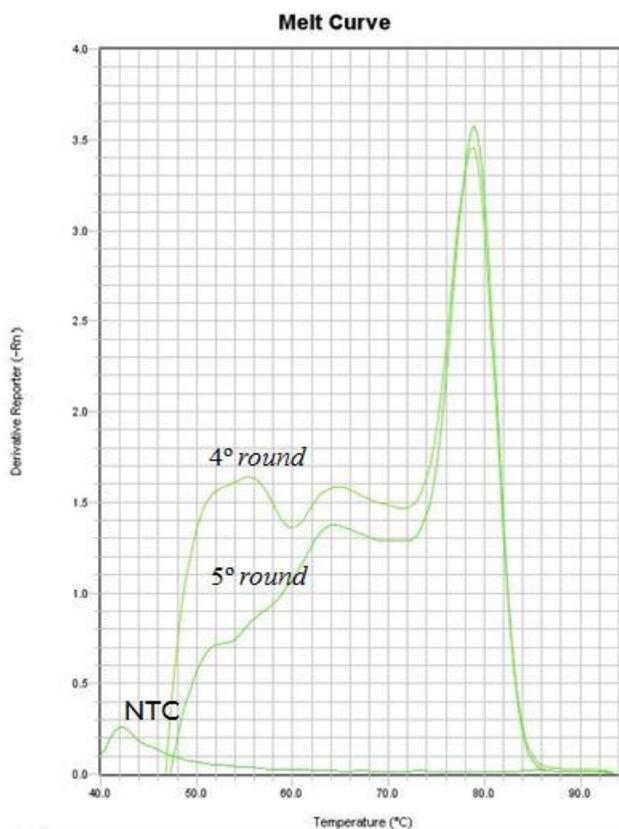


**Figura 24.** Curvas de dissociação dos oligonucleotídeos presentes no 3º *round* e no 4º *round* de seleção dos aptâmeros. NTC: Branco da PCR (*No Template Control*). Imagem obtida por meio do *software* 7500 v2.3 (Applied Biosystems).

### 3.4.1.6 5º round do Cell-SELEX

Aumentou-se a pressão de seleção positiva no quinto *round* por meio da redução no número de células alvo que foram incubadas com os aptâmeros ( $5 \times 10^5$  células). O tempo de incubação também foi reduzido de 45 minutos para 30 minutos, igualando-se

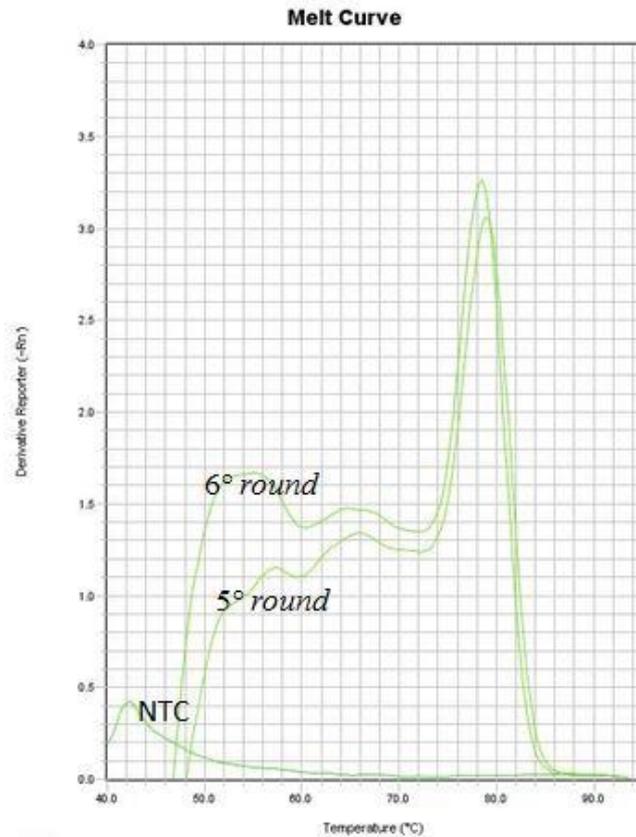
ao tempo dos fibroblastos. Comparando-se a curva do 4º e 5º rounds, verificou-se que a região de interesse para seleção dos aptâmeros ( $T_m$  maior) não alterou, porém, ocorreu uma redução significativa na região com  $T_m$  menor, indicando uma alteração na diversidade das sequências selecionadas (Figura 25). Assim, para continuar reduzindo a região de não interesse ( $T_m$  menor) no processo de seleção, a mesma pressão positiva e negativa foi mantida no 6º round.



**Figura 25.** Curvas de dissociação dos oligonucleotídeos presentes no 4º round e no 5º round de seleção dos aptâmeros. NTC: Branco da PCR (*No Template Control*). Imagem obtida por meio do software 7500 v2.3 (Applied Biosystems).

#### 3.4.1.7 6º round do Cell-SELEX

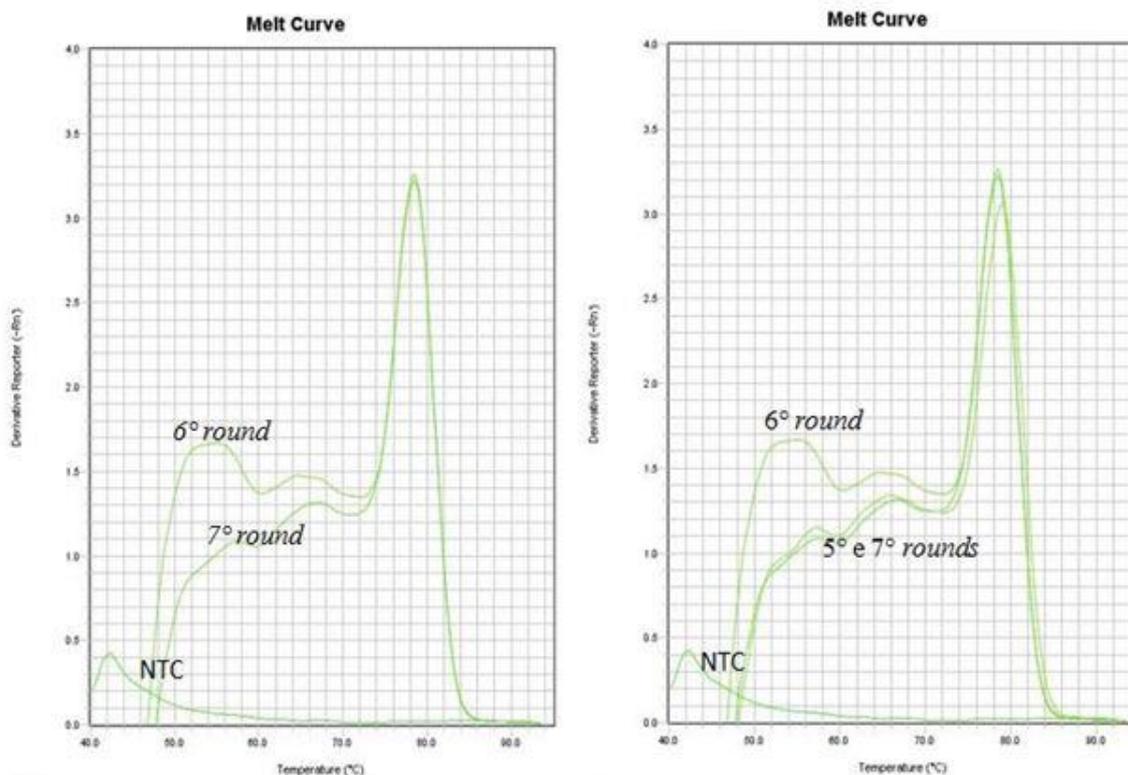
Ao aplicar a mesma pressão seletiva do quinto round, observou-se uma alteração no perfil da curva de dissociação: a redução na região de menor  $T_m$  observada no 5º round não se manteve no 6º round, notado como um aumento da curva à esquerda do gráfico (Figura 26). Dessa forma, como houve alteração na diversidade das sequências selecionadas no Cell-SELEX, manteve-se a mesma pressão seletiva no 7º round.



**Figura 26. Curvas de dissociação dos oligonucleotídeos presentes no 5° round e no 6° round de seleção dos aptâmeros.** NTC: Branco da PCR (*No Template Control*). Imagem obtida por meio do *software 7500 v2.3* (Applied Biosystems).

#### 3.4.1.8 7° round do Cell-SELEX

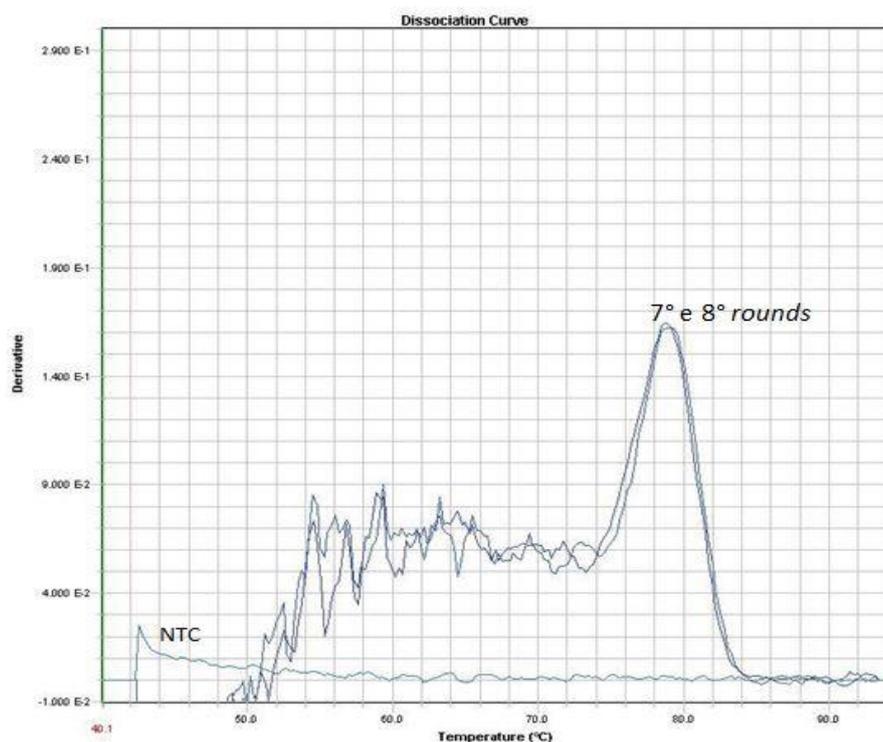
A curva de dissociação das sequências selecionadas no 7° round mostrou um perfil semelhante ao que foi obtido no *melting* dos aptâmeros no 5° round, com os picos das regiões de interesse ( $T_m$  maior) e de não interesse ( $T_m$  menor) sobrepostos (Figura 27). Optou-se, então, por modificar a pressão seletiva positiva e negativa no próximo ciclo do *Cell-SELEX*.



**Figura 27.** Curvas de dissociação dos oligonucleotídeos presentes no 5°, 6° e 7° rounds de seleção dos aptâmeros. NTC: Branco da PCR (*No Template Control*). Imagem obtida por meio do software 7500 v2.3 (Applied Biosystems).

#### 3.4.1.9 8° round do Cell-SELEX

No 8° round, a pressão positiva foi modificada reduzindo-se o tempo de incubação com as células-tronco para 20 minutos e a pressão negativa foi alterada realizando-se duas incubações consecutivas de 20 minutos com os fibroblastos na densidade de  $3 \times 10^6$  células. O DNA *melting* foi realizado utilizando-se o equipamento 7900HT Fast Real-Time PCR System. A análise comparativa mostrou que os perfis das curvas de dissociação não se alteraram: as regiões de interesse ( $T_m$  maior) e de não interesse ( $T_m$  menor) no 8° round apresentaram picos sobrepostos semelhante ao observado no 7° round. Portanto, nenhuma alteração adicional ocorreu na complexidade da biblioteca, determinando o último round e o sucesso do processo de seleção (Figura 28).



**Figura 28.** Curvas de dissociação dos oligonucleotídeos presentes no 7° e 8° rounds de seleção dos aptâmeros. NTC: Branco da PCR (*No Template Control*). Imagem obtida por meio do software SDS v 2.4 (Applied Biosystems).

### 3.4.2 Análises de bioinformática e seleção de quatro aptâmeros candidatos

Na etapa posterior do *Cell-SELEX*, os conjuntos de aptâmeros correspondentes ao 7° round de seleção em hASC e ao 8° round de seleção em hASC e fibroblastos, foram sequenciados utilizando a Plataforma Illumina MiSeq e analisados por bioinformática para seleção dos aptâmeros candidatos a serem utilizados nos ensaios de validação *in vitro*.

Na plataforma Galaxy, seguindo os critérios estabelecidos para seleção dos aptâmeros descritos no item 3.3.3.1 da metodologia, foram selecionadas quatro sequências de nucleotídeos candidatas. A lista das sequências dos aptâmeros selecionados a partir de aproximadamente  $7 \times 10^3$  oligonucleotídeos está apresentada na tabela 2. Eliminaram-se as sequências de oligonucleotídeos com baixo número de *reads* nas listas (equivalentes a aproximadamente 80% do total) e foram estabelecidos critérios de corte (*cut-off*) para o 7° e 8° rounds em hASC: 20 e 45 *reads* respectivamente.

**Tabela 2. Sequências de nucleotídeos dos aptâmeros candidatos selecionados para validação com culturas celulares *in vitro*.**

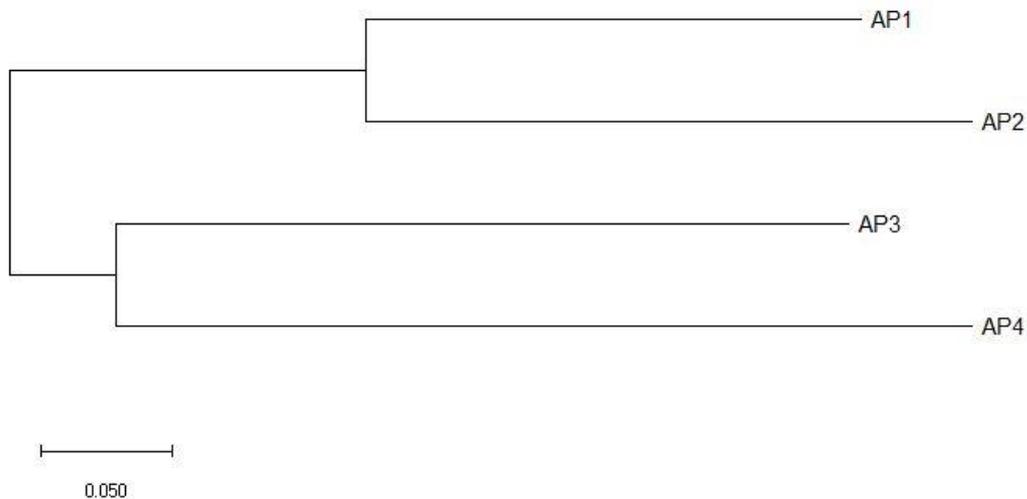
<b>Aptâmero Candidato</b>	<b>Sequência</b>
<b>Aptâmero 1 (AP1)</b>	5'ATGGTCTCACTGCGTTCACACGTTGCTCATTACTCGATTGTC CTTGACGAACTCCCGTCATCCTGCCTACACCGTGCCTCCTGT GCTACCGAATCT-3'
<b>Aptâmero 2 (AP2)</b>	5'ATGGTCTCACTGCGTTCAGCAACATCCCGTGATAGCCGTATC CTCCCTCATTGCCGTCCAGTGTTCCTATTGGCCCTCCTGTG CTACCGAATCT-3'
<b>Aptâmero 3 (AP3)</b>	5'ATGGTCTCACTGCGTTCACAAGCGGTCCACGATGTGTCGCCC AATCCCCGAACTCCGCCCGCCATGTACGTATCTCCTCCTGT GCTACCGAATCT-3'
<b>Aptâmero 4 (AP4)</b>	5'ATGGTCTCACTGCGTTCAGCAGACATGATTGCGGAGCGATTC TCGTA <del>CTTCTGCGCCTTGTATCATT</del> CCTCCCCTGCCTCCTGTG CTACCGAATCT-3'

Em negrito estão destacados os nucleotídeos da região randômica, que diferenciam os aptâmeros.

**3.4.3 O alinhamento e a comparação das sequências de nucleotídeos dos aptâmeros mostraram que os aptâmeros 1 e 2 formam uma ramificação independente dos aptâmeros 3 e 4**

Os quatro aptâmeros selecionados foram alinhados e classificados de acordo com a semelhança na sequência de nucleotídeos por meio de análises no *software* MEGA X usando o método da Máxima Verossimilhança e o modelo de Tamura-Nei. A árvore foi desenhada em escala, com comprimentos de ramificações medidos no número de substituições por sítio avaliado (Figuras 29 e 30). Observa-se que o aptâmero 1 e o 2 apresentam sequências de nucleotídeos mais semelhantes, formando uma ramificação distinta dos aptâmeros 3 e 4, os quais compõem outra ramificação com maior semelhança na árvore.





**Figura 30.** As seqüências de nucleotídeos dos aptâmeros foram agrupadas de acordo com o método da Máxima Verossimilhança e o modelo de Tamura-Nei presentes no software **Mega X**. Os aptâmeros 1 e 2 compõem um agrupamento distinto dos aptâmeros 3 e 4.

#### **3.4.4 Os aptâmeros candidatos 1, 2 e 4 apresentaram valores mais próximos de fold de enriquecimento e de conteúdo GC (%)**

Os dados referentes ao sequenciamento dos aptâmeros candidatos e o conteúdo GC dos mesmos foram organizados na Tabela 3. Observa-se que o *fold* de enriquecimento dos aptâmeros 1, 2 e 4 do 7º para 8º *round* foi bastante similar, com o AP3 apresentando o maior valor (3,8). O conteúdo GC (quantidade de bases citosina e guanina), dado em porcentagem, também foi similar entre AP1, AP2 e AP4, com o AP3 apresentando o maior valor (57,3%) (Tabela 3).

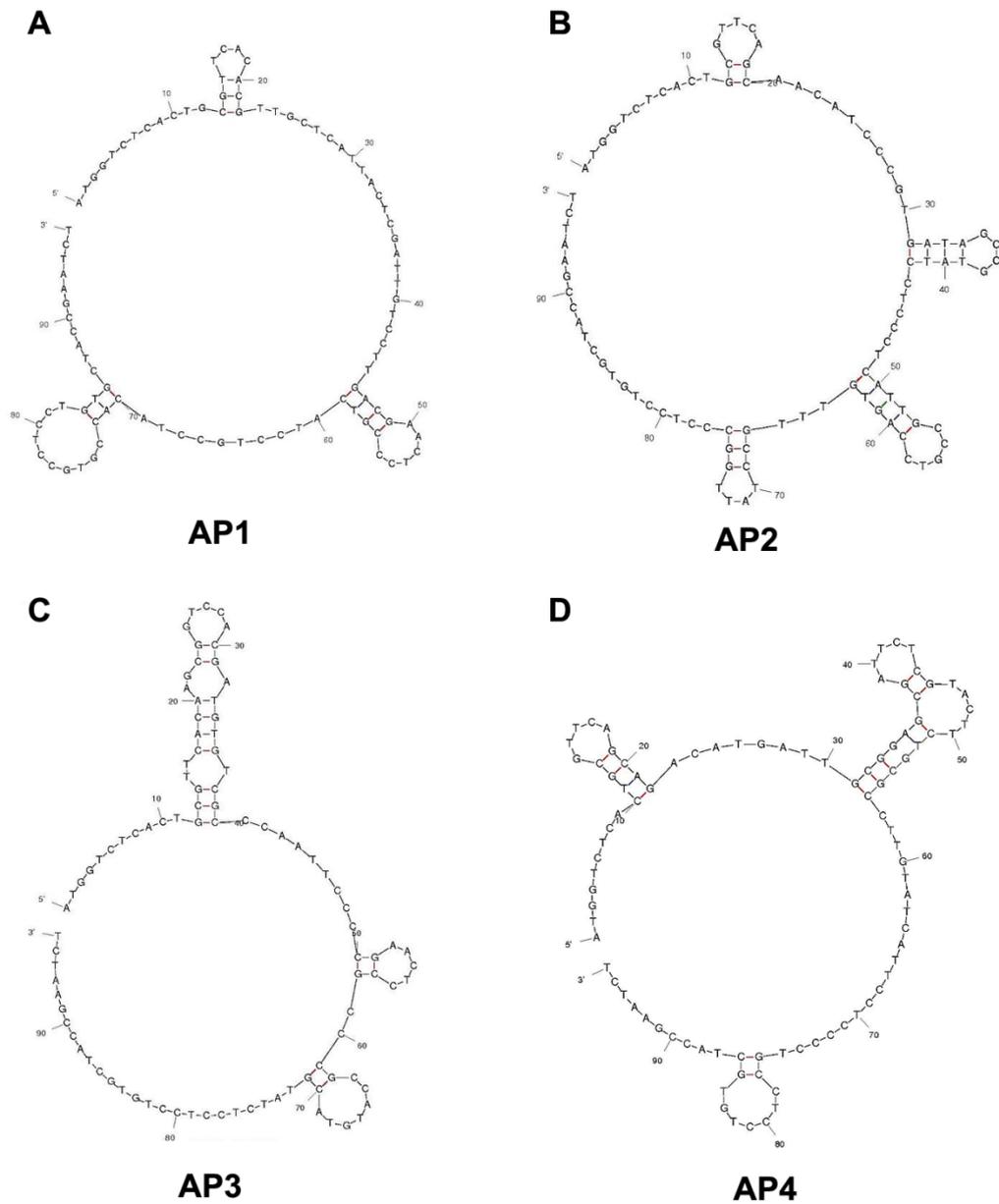
**Tabela 3. Dados obtidos a partir do enriquecimento dos quatro aptâmeros selecionados quanto ao número de *reads*, enriquecimento e conteúdo GC (%)**

<b>Aptâmero</b>	<b>Nº de <i>reads</i> no 7º round em hASC</b>	<b>Nº de <i>reads</i> no 8º round em hASC</b>	<b>Enriquecimento (<i>fold</i>)*</b>	<b>Nº de <i>reads</i> no 8º round em Fibroblastos</b>	<b>Conteúdo GC (%)**</b>
<b>AP1</b>	30	78	2,6	0	53,1%
<b>AP2</b>	100	269	2,6	57	54,2%
<b>AP3</b>	25	95	3,8	26	57,3%
<b>AP4</b>	22	49	2,2	0	53,1%

\* Razão entre o número de reads do 8º e 7º rounds em hASC; \*\***Conteúdo GC** = porcentagem equivalente a quantidade de bases citosina e guanina das sequências nucleotídicas.

### 3.4.5 *Os aptâmeros candidatos assumem estruturas secundárias distintas*

A estrutura secundária dos aptâmeros candidatos e do aptâmero *scrambled* foi simulada utilizando-se o servidor *The mFold Web Server* (<http://unafold.rna.albany.edu/?q=mfold>) nas condições de validação *in vitro*: incubação com meio sem soro à temperatura de 24 °C. As figuras mostram as estruturas com o menor valor de  $\Delta G$  total para cada aptâmero candidato selecionado (Figura 31). O conteúdo GC da sequência *scrambled*, dado em porcentagem apresentou um valor igual a 55,4% e a estrutura dessa sequência pode ser visualizada na Figura 32.

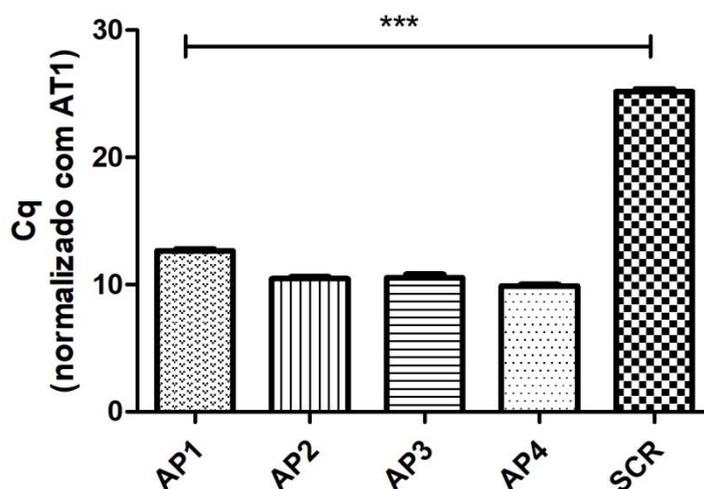


**Figura 31. Estrutura secundária dos aptâmeros candidatos selecionados. (A)** AP1 possui  $\Delta G$  total = -7,37 kcal/mol; **(B)** AP2 possui  $\Delta G$  total = -7,28 kcal/mol; **(C)** AP3 possui  $\Delta G$  total = -9,34 kcal/mol; **(D)** AP4 possui  $\Delta G$  total = -10,28 kcal/mol. As estruturas foram obtidas utilizando *The mfold Web server*.



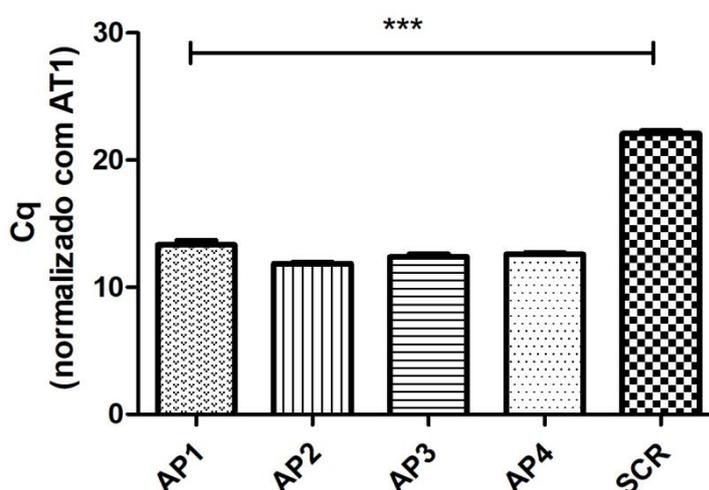
correspondentes ao aptâmeros SCR que se ligaram às células foi menor, devido à baixa eficiência de ligação nessas células (Figuras 33 e 34).

### Cq das Sequências ligadas em hASC



**Figura 33. Quantificação dos ciclos (Cq) das sequências de aptâmeros e scrambled ligadas em hASC.** Média do Cq determinada após normalização com a sequência AT1: AP1=12,64 (±0,18), AP2= 10,47 (±0,13), AP3= 10,53 (±0,27), AP4= 9,89 (±0,11), SCR= 25,19 (±0,20). One-way ANOVA com pós-teste de Bonferroni, SCR comparado aos aptâmeros 1 a 4 \*\*\*p <0,001, n=3.

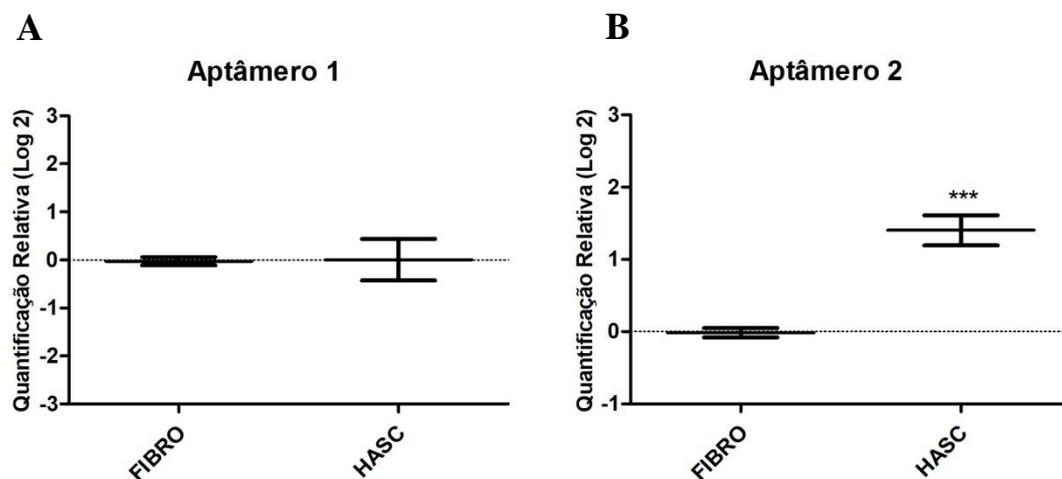
### Cq das Sequências ligadas em Fibroblastos



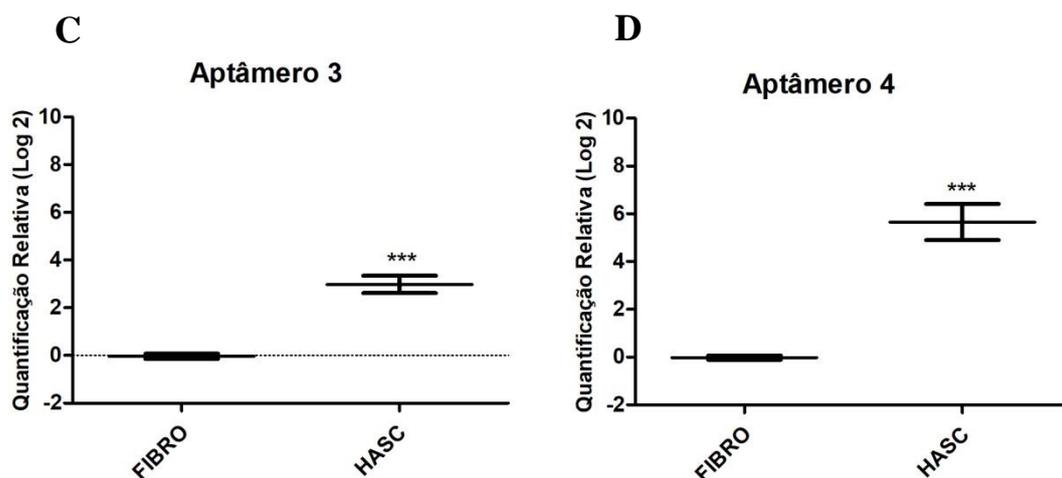
**Figura 34. Quantificação dos ciclos (Cq) das sequências de aptâmeros e scrambled ligadas em fibroblastos dérmicos.** Média do Cq determinada após normalização com a sequência AT1: AP1= 13,34 (±0,33), AP2= 11,85 (±0,10), AP3= 12,40 (±0,22), AP4= 12,58 (±0,12), SCR= 22,08 (±0,22). One-way ANOVA com pós-teste de Bonferroni, SCR comparado aos aptâmeros 1 a 4 \*\*\*p <0,001, n=3

### 3.4.6.2 Os aptâmeros 3 e 4 apresentaram maior eficiência de ligação em hASC quando comparados aos aptâmeros 1 e 2

As hASC e os fibroblastos dérmicos foram incubados com 250 nM de aptâmeros e 100 fM de sequência normalizadora AT1 para comparação da eficiência de ligação dos mesmos entre as células. A quantificação relativa dessa ligação foi determinada por qPCR utilizando-se o método desenvolvido por PFAFFL (2001) e as diferentes repetições foram plotadas e comparadas pelo teste estatístico *Unpaired t test* considerando  $p < 0,05$  como diferença significativa. Os resultados dos ensaios de ligação de cada aptâmero estão apresentados nas Figuras 35 e 36. Os gráficos mostram que não houve diferença na ligação do aptâmero 1 quando comparamos hASC e fibroblastos. O aptâmero 2 apresentou diferença mostrando maior eficiência de ligação em hASC, assim como os aptâmeros 3 e 4.



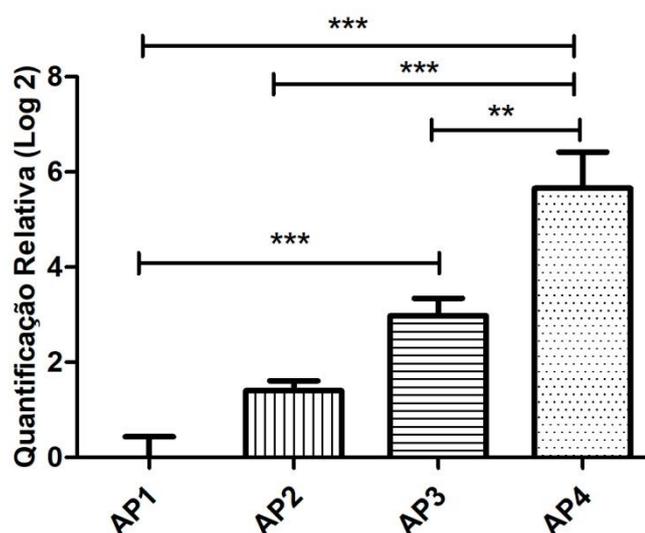
**Figura 35. Quantificação Relativa da Eficiência de Ligação dos Aptâmeros 1 e 2 em hASC comparado aos fibroblastos dérmicos.** **A.** Média da quantificação (log 2) da ligação do aptâmero 1 em hASC comparado ao controle (fibroblastos) = 0,25 ( $\pm 0,98$ ). **B.** Média da quantificação da ligação do aptâmero 2 em hASC comparado ao controle (fibroblastos) = 1,44 ( $\pm 0,38$ ). Unpaired t test (\*\*\*) $p < 0,001$ ,  $n=4$ .



**Figura 36. Quantificação Relativa da Eficiência de Ligação dos Aptâmeros 3 e 4 em hASC comparado aos fibroblastos dérmicos.** **C.** Média da quantificação (log 2) da ligação do aptâmero 3 em hASC comparado ao controle (fibroblastos) = 3,00 ( $\pm$  0,70). **D.** Média da quantificação da ligação do aptâmero 4 em hASC comparado ao controle (fibroblastos)= 5,67 ( $\pm$  1,51). Unpaired t test (\*\*p<0,001), n = 4.

Ao avaliar os valores expressos em escala logarítmica (Log 2), observou-se que o aptâmeros 3 e 4 apresentaram maior eficiência de ligação às células-tronco quando comparados aos aptâmeros 1 e 2, sendo o aptâmero 4 o mais eficiente nessa ligação em comparação com fibroblastos (Figura 37).

### Eficiência de Ligação dos aptâmeros 1 a 4 em hASC



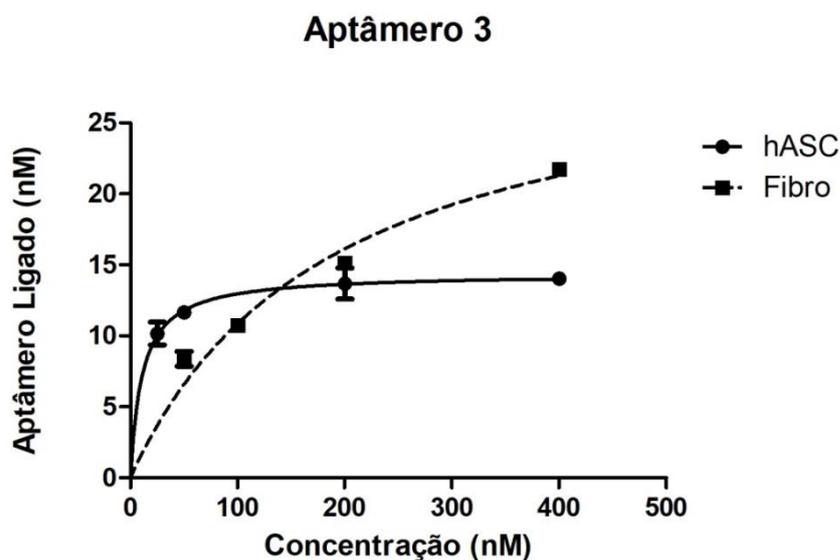
**Figura 37. Quantificação Relativa da Eficiência de Ligação dos aptâmeros 1 a 4 em hASC.** A comparação mostra que a eficiência de ligação em hASC dos aptâmeros 3 (AP3) e 4 (AP4) foi maior que a eficiência de ligação dos aptâmeros 1 (AP1) e 2 (AP2). Média da quantificação: AP1 = 0,25 (±0,98), AP2= 1,44 (±0,38), AP 3= 3,00 (± 0,70); AP4= 5,67 (± 1,51). One-way ANOVA com pós-teste de Bonferroni. AP4 comparado com AP1 e AP2 \*\*\* $p < 0,001$ ; AP3 comparado com AP1 \*\*\* $p < 0,001$ ; AP4 comparado com AP3 \*\* $p < 0,01$ ),  $n=4$ .

#### 3.4.6.3 A constante de dissociação dos aptâmeros 3 e 4 é menor para hASC quando comparada aos fibroblastos dérmicos humanos

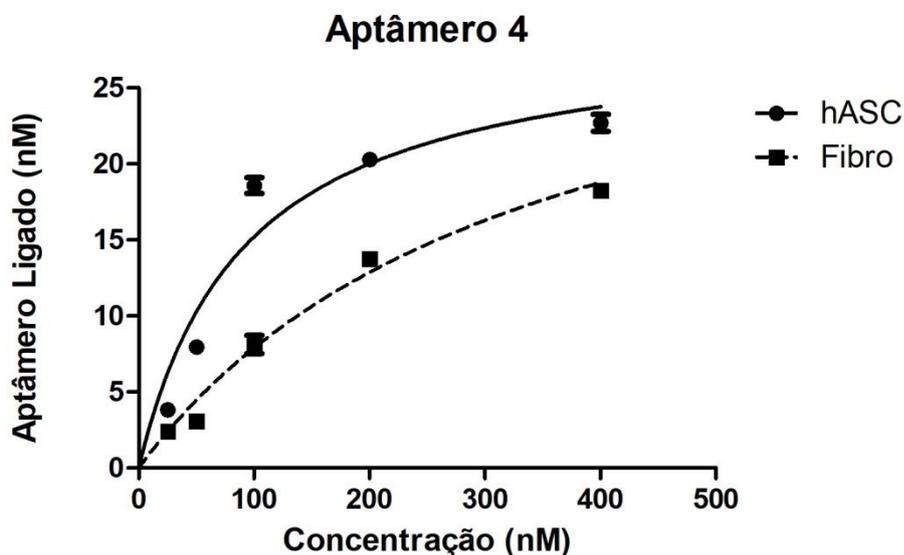
A afinidade dos aptâmeros pelo seu alvo é determinada pela constante de dissociação (Kd). Quanto menores os valores de Kd, maior a afinidade de uma determinada molécula pelo seu alvo. As hASC e os fibroblastos foram incubados com concentrações crescentes dos aptâmeros 3 e 4 (25 a 400 nM) e a quantidade de aptâmeros ligados foi determinada por reações de qPCR. A constante de dissociação de cada aptâmero para cada célula foi determinada pela equação de regressão não-linear One- Site Specific Binding (Figuras 38 e 39).

Os aptâmeros 3 e 4 mostraram uma maior afinidade por hASC, o que pode ser observado pelo menor valor de Kd obtido após incubação com essas células. Os valores obtidos em hASC foram, respectivamente: 19,47 (±2,56) para o aptâmero 3 e 92 (±19,77) nM para o aptâmero 4. Os valores de Kd dos aptâmeros obtidos em fibroblastos foram maiores: 188,3 (±31,94) nM para o aptâmero 3 e 339,9 (±61,51) nM para o aptâmero 4. Esses resultados mostraram que o aptâmero 3 possui mais afinidade

por hASC em comparação com o aptâmero 4, apesar de este último apresentar maior eficiência de ligação.



**Figura 38.** A constante de dissociação do aptâmero 3 foi menor em hASC quando comparada aos fibroblastos dérmicos.  $K_d$  para hASC = 19,47 nM ( $\pm 2,56$ ) e  $K_d$  para Fibro = 188,3 nM ( $\pm 31,94$ ). Regressão não-linear: One Site Specific Binding Equation.  $R^2 > 0,95$ .



**Figura 39.** A constante de dissociação do aptâmero 4 foi menor em hASC quando comparada aos fibroblastos dérmicos.  $K_d$  para hASC = 92 nM ( $\pm 19,77$ ) e  $K_d$  para Fibro = 339,9 nM ( $\pm 61,51$ ). Regressão não-linear: One Site Specific Binding Equation.  $R^2 > 0,90$ .

### 3.5 DISCUSSÃO

A superfície de membrana das células-tronco derivadas de tecido adiposo é rica em proteínas, lipídios, carboidratos e outros elementos que, em conjunto, formam uma marca exclusiva, definida como assinatura molecular de membrana (AMM). Devido à relevância para a terapia celular, existe uma demanda junto à comunidade científica para que a identificação das hASC seja bastante precisa (NERY et al., 2009). Por definição, a membrana celular não é totalmente uniforme e possui uma variedade de canais, receptores, proteínas sinalizadoras, moléculas de adesão, entre outras (NERY, 2014). O presente estudo aborda principalmente a necessidade de se encontrarem marcadores que as diferenciem de fibroblastos dérmicos, células que são morfologicamente semelhantes às hASC e potencialmente contaminantes da cultura celular.

Entretanto, esses biomarcadores, além de serem inéditos, devem estar conservados entre os diversos indivíduos doadores de lipoaspirado, cujas células foram extraídas para a realização desse estudo. Considera-se que um marcador comum identificado entre células-tronco provenientes de doadores diferentes aumentaria a precisão e agilidade no processo de isolamento e identificação das hASC para aplicação terapêutica. Esse marcador, presente na assinatura molecular, também precisaria estar conservado entre as diferentes passagens da cultura (NERY, 2014). Alguns marcadores de membrana de células mesenquimais foram propostos pela Sociedade Internacional para Terapia Celular para identificação de células-tronco adultas. Assim, as hASC foram verificadas quanto à marcação positiva para CD90 e CD105 e marcação negativa para CD45 e CD11b (BOURIN et al., 2013), conforme abordado no Capítulo 1. Porém, os fibroblastos dérmicos apresentaram perfil fenotípico muito semelhante ao de hASC, dificultando a distinção das células por esse método.

A seleção de aptâmeros por meio do enriquecimento exponencial de ligantes tem se destacado no campo da biologia celular e molecular como uma ferramenta inovadora na descoberta de novos biomarcadores para células tumorais e normais. Diante desse cenário, hipotetiza-se que o uso dos aptâmeros e da tecnologia do *Cell-SELEX* possa contribuir para a identificação de células-tronco derivadas de tecido adiposo (hASC) com o objetivo principal de distinguí-las dos fibroblastos. Trata-se de dois tipos celulares muito semelhantes, mas, considerando a alta afinidade e especificidade que é

característica dos aptâmeros, estes podem ter afinidade por uma molécula de membrana presente em hASC e ausente em fibroblastos, indetectável por outros métodos.

A seleção de aptâmeros nesse projeto foi feita a partir de uma biblioteca de DNA fita simples (ssDNA) composta por 60 nucleotídeos na região randômica. Na literatura, existe um questionamento sobre qual seria o tamanho ideal dessa região para o *screening* de aptâmeros. Pesquisadores que trabalharam com aptâmeros de RNA sugeriram que uma região randômica contendo 60 nucleotídeos produziria seleções otimizadas (COLLEMAN & HUANG, 2002). LEGIEWICS e colaboradores (2005) obtiveram melhores resultados de seleção com regiões variáveis compostas por 50 a 70 nucleotídeos. Assim, assume-se que quanto maior o tamanho dessa região aleatória, maior a diversidade de sequências e também de estruturas conformacionais assumidas pelas mesmas (SHANGGUAN et al., 2015). Dada a complexidade do alvo, hASC e fibroblastos dérmicos (células inteiras), foi sintetizada uma região randômica de tamanho relativamente grande para aumentar a variabilidade de sequências candidatas e, conseqüentemente, as chances de enriquecimento de aptâmeros com estruturas conformacionais que façam um maior número de contatos com as moléculas de membrana. Quanto às regiões conservadas para a hibridização de *primers*, recomenda-se que a extensão média seja composta por 18 a 21 nucleotídeos e, idealmente, estas devem ter influência mínima sobre a região variável para o isolamento bem-sucedido dos aptâmeros. Adicionalmente, os iniciadores para amplificação por PCR dos oligonucleotídeos devem ser bem desenhados para que ocorra mínima formação de dímeros e *cross*-hibridização entre sequências (SEFAH et al., 2010; SHANGGUAN et al., 2015). Os cuidados básicos durante o *design* dos *primers* assim como da biblioteca de DNA foram seguidos para a realização desse estudo. Antes de dar prosseguimento ao processo de seleção, foi realizada uma amplificação prévia da biblioteca de DNA com 10 ciclos de PCR. Esse passo anterior é necessário para aumentar o número de cópias dos oligonucleotídeos originais e evitar que sequências alvo específicas sejam perdidas antes do início da seleção (SEFAH et al., 2010). Além disso, esse enriquecimento prévio é importante porque moléculas de DNA quimicamente sintetizadas são amplificadas pela polimerase com eficiências distintas (STOLTENBURG et al., 2007).

Para a seleção de aptâmeros capazes de se ligarem com alta afinidade às células-tronco, foi utilizada a técnica de *Cell*-SELEX que trata da seleção de aptâmeros para células inteiras, descrita por SEFAH e colaboradores (2010), com a introdução de algumas modificações. Os autores do protocolo sugerem o uso da citometria de fluxo a

cada *round* de seleção para monitoramento do enriquecimento das sequências, o controle de amplificação do DNA por PCR, seguido por eletroforese em gel de agarose. O teste de ciclos por PCR é necessário para que não haja uma amplificação em excesso que favoreça o enriquecimento de sequências inespecíficas. No presente estudo, os ciclos de seleção foram monitorados por PCR e eletroforese em gel durante os testes de ciclos, mas, em vez da citometria de fluxo, optou-se pelo método de análise da curva de dissociação (DNA *Melting*) para definição do número necessário de *rounds* de seleção. De acordo com essa técnica, a região mais enriquecida da curva de dissociação apresenta sequências específicas ao alvo, que possuem temperaturas de *melting* ( $T_m$ ) elevadas. Portanto, esses oligonucleotídeos selecionados são mais ricos em pares de bases GC e mantêm uma maior estabilidade conformacional e de ligação ao alvo desejado (THIEL et al., 2012; MENCIN et al., 2014). Em nossos resultados, observou-se que o conteúdo GC dos quatro aptâmeros selecionados para validação foi maior que 53%, sendo o maior deles o aptâmero 3, com 57,3%. Dessa forma, pode-se notar que ao longo de oito ciclos de seleção, ocorreu a formação de picos mais estreitos na região de enriquecimento, com estabilização entre o 7° e o 8° *rounds*, confirmando que a seleção foi bem-sucedida. Para realizar o ensaio da curva de dissociação, foi utilizado um menor número de células do que as que são necessárias para o monitoramento por citometria de fluxo e, além disso, não houve a necessidade de tripsinização rápida ou dissociação não-enzimática das células. Para células aderentes como hASC, a dissociação do plástico da garrafa de cultura poderia alterar a conformação das proteínas na membrana das células e, portanto, introduziria um viés no processo de seleção e monitoramento dos aptâmeros candidatos. Assim, pode-se confirmar a afirmação de que o método de DNA *Melting* é simples e informativo, além de prover uma estimativa qualitativa da diversidade do conjunto de aptâmeros (MENCIN et al., 2014).

Para a continuidade do processo de enriquecimento dos aptâmeros, é necessário que a dupla fita do DNA amplificada por PCR seja separada para recuperação das sequências fita simples. Nesse projeto, foi utilizado um *primer* reverso (R) biotilado para as reações de amplificação após cada ciclo do *Cell-SELEX*. A constante de dissociação (Kd) entre biotina-estreptavidina é de aproximadamente  $4 \times 10^{-14}$  M (GREEN, 1990) e a separação entre ambas é a base da separação da dupla fita de DNA. Assim, ao usar esferas magnéticas cobertas com estreptavidina e lavagens com tampão SSC (salina de sódio e citrato), a fita de interesse (senso) foi separada para dar continuidade à incubação com as células e ao enriquecimento dos aptâmeros. Esse

método de isolamento da fita simples apresenta um custo mais baixo que outros, como por exemplo, a digestão por lambda exonuclease, além de apresentar uma execução mais simplificada que o método de PCR assimétrico e gel desnaturante de ureia e poliacrilamida (WILSON et al., 2011; MARIMUTHU et al., 2012; SHANGGUAN et al., 2015). Técnicas alternativas utilizam hidróxido de sódio (NaOH) para separação das fitas de DNA (SEFAH et al., 2010; WILSON et al., 2011; MARIMUTHU et al., 2012) garantindo um rendimento de sequências similar ao da extração com o uso de tampão SSC. Entretanto, nesse projeto, o método foi padronizado de acordo com as instruções do *kit* das esferas magnéticas para não prejudicar o processo de isolamento das sequências de interesse.

Ao final do 8º *round* de seleção dos aptâmeros, as sequências recuperadas da incubação com hASC no 7º e 8º ciclos e da incubação com fibroblastos dérmicos no 8º ciclo foram encaminhadas para sequenciamento utilizando a Plataforma Illumina. A maioria dos trabalhos consultados na literatura aborda a clonagem em vetores usando *Escherichia coli* como hospedeiro e posterior sequenciamento dos mesmos pelo método de Sanger para identificação da sequência dos aptâmeros candidatos mais enriquecidos (STOLTENBURG et al., 2007; SEFAH et al., 2010; SHANGGUAN et al., 2015). Porém, com a ampliação e redução de custos da tecnologia de NGS, a tendência é que haja uma substituição de uma técnica pela outra, pois a obtenção dos dados por NGS é mais informativa, direta e rápida, independente de passos intermediários e a resolução e qualidade do sequenciamento são melhores. Além disso, o sequenciamento do tipo *high-throughput* permite a identificação das sequências independente da facilidade ou dificuldade de serem clonadas, o que é um fator limitante para o uso da primeira técnica (SCHUTZE et al., 2011).

Quanto ao método de escolha dos aptâmeros a serem validados em bancada, observa-se uma variedade de critérios adotados pelos grupos de pesquisa. Um dos critérios adotados é o de agupar aptâmeros conforme a similaridade de sequências e filtrar possíveis candidatos específicos para determinado alvo. Para esse alinhamento são utilizadas algumas ferramentas, tais como CLUSTAL X, APTANI e MEGA, que agrupam famílias de acordo com a homologia. Outro critério importante é a avaliação da estrutura secundária e o cálculo dos valores de energia livre de Gibbs ( $\Delta G$ ) as sequências. Geralmente, uma sequência representativa de cada família é sintetizada para validação, conforme descrito na literatura (SEFAH et al., 2010; NERY, 2014; SHANGGUAN et al., 2015; CAROLI et al., 2016).

Nesse projeto, as sequências obtidas após NGS foram analisadas de acordo com a prevalência, buscando por sequências exclusivas de hASC ou sequências com maior número de reads em hASC quando comparadas aos fibroblastos e enriquecidas do 7º para o 8º *round*. Outro critério estabelecido foi a avaliação do  $\Delta G$  total nas condições de cultivo à temperatura ambiente. As sequências selecionadas foram alinhadas e organizadas de acordo com a semelhança na sequência de nucleotídeos em uma árvore filogenética. Observou-se a formação de dois agrupamentos distintos: no primeiro, os aptâmeros 1 e 2 são mais semelhantes entre si e, no segundo, os aptâmeros 3 e 4 demonstraram maior semelhança.

De acordo com nossos resultados, o segundo agrupamento que contém as sequências com valores de  $\Delta G$  total mais negativos (-9,34 kcal/mol para o aptâmero 3 e -10,28 kcal/mol para o aptâmero 4) mostraram os melhores resultados nos ensaios de validação *in vitro*. Hipotetizamos que a ligação com maior afinidade por hASC esteja relacionada à maior estabilidade termodinâmica de ambas as estruturas, otimizando o contato com o alvo na membrana celular das células-tronco. Entre os trabalhos de *Cell-SELEX* presentes na literatura, observa-se que os valores de  $\Delta G$  total dos aptâmeros são variáveis dentro de um grupo de valores negativos. SOUZA e colaboradores (2016) selecionaram aptâmeros de RNA capazes de se ligarem com alta afinidade em células da linhagem de câncer de próstata PC-3 crescidas em esferoides. Os valores de  $\Delta G$  total das sequências variou entre -13,8 kcal/mol e -28,5 kcal/mol, o que contribuiu para a elevada estabilidade termodinâmica desses aptâmeros. Outro estudo mostrou o enriquecimento de quatro aptâmeros de DNA com alta afinidade pela linhagem de adenocarcinoma pulmonar A549 com valores menos negativos de  $\Delta G$  total, variando de -0,36 kcal/mol a -6,8 kcal/mol a 24 °C (VIDIC et al., 2018). Assim, pode-se destacar que os valores de  $\Delta G$  total encontrados em nosso estudo estão próximos à faixa de valores descrita na literatura.

Um dos métodos sugeridos e mais comumente utilizados para avaliar a ligação dos aptâmeros nas células em cultivo é a citometria de fluxo. Entretanto, nesse projeto, utilizamos a validação por PCR quantitativo de acordo com o trabalho desenvolvido por GRAZIANI e colaboradores (2017). Em comparação com a citometria de fluxo, no método de PCR não é necessário utilizar um número elevado de células, conforme abordado anteriormente. Essa vantagem é importante uma vez que no presente estudo foram utilizadas culturas de células primárias, cuja obtenção de um grande número de células é mais difícil.

Conforme instruções da técnica, os aptâmeros podem ser recuperados por eluição após serem colocados em contato com as células alvo, amplificados por PCR e avaliados quantitativamente em comparação com a célula controle. Para que não ocorram erros nessa quantificação, é necessária a presença de uma sequência normalizadora, acrescentada a todas as reações. Da mesma maneira que o grupo de pesquisa consultado, foi inserida a sequência AT1 proveniente do vegetal *Arabidopsis thaliana* nos ensaios de validação, garantindo a eficácia do método. Na literatura científica, outros autores comprovaram a ligação de aptâmeros de DNA e a internalização de aptâmeros de RNA nos mais variados tipos de células por PCR quantitativo. Como exemplo, pode-se citar o trabalho desenvolvido por AVCI-ADALI e colaboradores (2013) que monitoraram o enriquecimento da ligação de aptâmeros de DNA em células da linhagem HEK-293 (rim embrionário humano) utilizando qPCR durante a seleção por *Cell-SELEX*. Outro trabalho importante com aptâmeros de RNA foi desenvolvido por THIEL e colaboradores (2012), que validaram por RT- qPCR a internalização de aptâmeros em células musculares lisas vasculares (VSMCs). LI e colaboradores (2017) desenvolveram um método de detecção de proteína C-reativa em amostras de soro humano usando aptâmeros, cuja ligação também foi detectada por qPCR, mostrando a possibilidade de uma futura aplicação clínica dessa técnica.

Para atestar se a ligação dos aptâmeros candidatos ocorreu por interações específicas ou ao acaso, foi inserida uma sequência randômica (*scrambled*) nos testes de ligação às células. O valor do Cq da sequência *scrambled* foi maior em comparação com os valores de Cq obtidos na amplificação dos aptâmeros 1, 2, 3 e 4. Esse resultado indica que a sequência aleatória não mostrou afinidade por hASC e fibroblastos, visto que a quantidade recuperada após incubação com as células foi menor, sendo necessários mais ciclos de amplificação para detecção desses alvos na qPCR. Assim, pode-se afirmar que a interação dos aptâmeros com os alvos moleculares presentes da superfície das células ocorre com mais especificidade e afinidade do que a sequência randômica, cuja interação é inespecífica (não foi enriquecida pelo processo do *Cell-SELEX*). GRAZIANI e colaboradores (2017) também inseriram uma sequência randômica como controle de ligação às células e, ao avaliarem a eficiência de ligação por qPCR, demonstraram que essa sequência não foi capaz de se ligar às células-alvo.

Os aptâmeros 3 e 4, que se ligaram com maior eficiência em hASC, foram escolhidos para o cálculo da constante de dissociação (Kd). Ambos apresentaram valores menores para hASC e maiores para fibroblastos. O Kd é a constante que mede a

probabilidade de um complexo se dissociar em suas moléculas componentes; portanto, um valor menor de  $K_d$  indica menos chance de dissociação desse complexo e maior afinidade entre seus componentes. Dessa forma, como os aptâmeros 3 e 4 mostraram alta afinidade por hASC e menor afinidade por fibroblastos, sugere-se que as moléculas-alvo dos oligonucleotídeos possam assumir estruturas diferentes na membrana dos fibroblastos em comparação à hASC, dado o alto valor de  $K_d$  calculado para essas células. Isso se deve ao fato de que a especificidade e a afinidade dos aptâmeros não é regulada pelo tamanho, complexidade ou quantidade de alvos. Os principais fatores determinantes para o valor de  $K_d$  dos aptâmeros são os atributos dos alvos, como por exemplo grupos funcionais e outras propriedades selecionadas durante o processo de enriquecimento do *Cell-SELEX* (STOLTENBURG et al., 2007). SHIGDAR e colaboradores (2013) desenvolveram aptâmeros específicos para o marcador CD133, presente na membrana de células-tronco tumorais provenientes de tumores sólidos. Os autores obtiveram valores de  $K_d$  variando entre 33,9 nM ( $\pm 12,5$ ) e 145,1 nM ( $\pm 75,4$ ) após incubação de aptâmeros candidatos com as linhagens CD133 positivas HT-29 e Hep3B. XU e colaboradores (2015) utilizaram *Cell-SELEX* para o desenvolvimento de aptâmeros capazes de se ligar com alta afinidade por células da linhagem hepática Hep G2, células de câncer de ovário e de adenocarcinoma de pulmão com  $K_d$  variável entre 64 e 349 nM. KIM e colaboradores (2014) desenvolveram aptâmeros de DNA com alta afinidade para adipócitos da linhagem 3T3-L1 e determinaram os valores de  $K_d$  variando entre 33,1 nM ( $\pm 2,9$ ) e 142,5 nM ( $\pm 3,8$ ). NINOMIYA e colaboradores (2013) conseguiram isolar um aptâmero de DNA com  $K_d$  de 19 nM ( $\pm 1,0$ ) para células de hepatocarcinoma humano, valor bem próximo ao achado nesse estudo para o aptâmero 3 em hASC. Um aptâmero de RNA desenvolvido para células de câncer de mama humano que superexpressavam HER-2 apresentou o valor da constante de dissociação igual a 94,6 nM, próximo ao valor achado nesse estudo para o aptâmero 4 em hASC. Assim, diante dos trabalhos científicos publicados recentemente com alvos celulares distintos, foi possível notar que os valores de  $K_d$  encontrados no presente estudo estão dentro da faixa esperada para essa constante.

A partir dos anos 2000, foram desenvolvidos alguns trabalhos na literatura científica envolvendo a identificação de células-tronco mesenquimais de origens variadas com o uso de aptâmeros. GUO e colaboradores (2006) publicaram um estudo com células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea de porco, em que foi possível purificar essas células utilizando um aptâmero de DNA por meio de uma nova

metodologia de separação de células. Outro estudo liderado por HOU e colaboradores (2015) foi importante para a descoberta de um aptâmero denominado Apt19S que demonstrou alta afinidade por células-tronco humanas pluripotentes induzidas (iPSCs), células tronco embrionárias de camundongo (mESCs), de macaco Rhesus (ESCs) e humanas (hESCs). NERY (2014), em um estudo com células derivadas da fração estromal de lipoaspirado, conseguiu isolar dois aptâmeros APT9 e APT11 capazes de identificar e separar uma subpopulação de células-tronco mesenquimais CD29<sup>+</sup>/CD90<sup>+</sup>/CD45<sup>-</sup> das demais células presentes na fração. Contudo, os autores desses trabalhos não determinaram o  $\Delta G$  total dos aptâmeros assim como não calcularam a constante de dissociação (Kd) proveniente da interação aptâmero-alvo, diferentemente dos nossos resultados em que essas constantes foram determinadas. Considera-se que o cálculo dessas constantes seja essencial para a compreensão das características intrínsecas desses aptâmeros por serem referentes tanto à estabilidade termodinâmica quanto à afinidade pelos seus ligantes presentes nas células.

No presente estudo, não foi identificado o alvo molecular que os aptâmeros se ligam, entretanto, hipotetiza-se que estes possam ser distintos entre os aptâmeros 3 e 4. Ao analisar a conformação estrutural nas condições de validação *in vitro*, observamos que ambos assumem estruturas distintas, porém com a presença de grampos laterais mais alongados ricos em pareamentos GC. Segundo NERY (2014), a presença de pareamentos GC nas regiões de *loops* distais em estruturas de grampo favorece a interação com o alvo por disponibilizar mais pontes de hidrogênio possíveis, quando comparados a *loopings* ricos em AT. Nesse projeto, os aptâmeros que se destacaram como mais proeminentes na identificação de hASC em comparação com fibroblastos dérmicos humanos serão submetidos para depósito de patente.

Diante dos dados apresentados no Capítulo 2, essa pesquisa é inovadora na medida em que o método de *Cell-SELEX* foi adaptado de forma bem-sucedida para seleção de aptâmeros capazes de se ligarem com mais afinidade e eficiência às células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo. Nesse trabalho, foi possível identificar duas sequências candidatas termodinamicamente estáveis com maior afinidade por hASC em comparação com fibroblastos e determinar a constante de dissociação (Kd) de ambas por meio de PCR quantitativo em tempo real. Essa técnica apresenta grande sensibilidade e eficácia, mas ainda é pouco utilizada em ensaios de validação *in vitro*. Assim, esse estudo também contribuiu para verificar a robustez e eficácia desse método de validação de aptâmeros com afinidade por células humanas.

## **4 CAPÍTULO III**

# **ANÁLISE COMPARATIVA DA EXPRESSÃO GÊNICA ENTRE HASC E FIBROBLASTOS DÉRMICOS HUMANOS**

## 4.1 INTRODUÇÃO

As MSC têm a capacidade de se diferenciar em vários tipos de células e têm sido isoladas da fração estromal de praticamente todos os tecidos, entre eles o tecido adiposo, sítio onde estão localizadas as hASC. No entanto, pouco se sabe sobre a verdadeira identidade dessas células. Sabe-se que as células-tronco mesenquimais exibem uma variação na expressão gênica que é dependente do tecido, da localização e *background* genético do indivíduo (JÄÄGER et al., 2012; ZYCH et al., 2014). Os fibroblastos dérmicos humanos também estão envolvidos em remodelamento de matriz extracelular e processos regenerativos da pele e ainda há muito que se explorar sobre a expressão gênica dessas células, em relação à sua gênese, diferenciação terminal e atuação no processo de regeneração e cicatrização (DRISKEL & WATT, 2015; THULABANDU et al., 2018).

Nos últimos anos, alguns projetos de pesquisa descreveram diferenças entre células-tronco mesenquimais derivadas de medula óssea e fibroblastos dérmicos quanto à expressão de genes e de micro-RNAs em análises de microarranjo, com posterior confirmação da expressão diferencial por validação *in vitro*. Nesses estudos, foram utilizadas para a análise comparativa tanto linhagens de fibroblastos quanto fibroblastos de cultura primária. Em média, aproximadamente 100 genes foram identificados como diferencialmente expressos entre os tipos celulares. (BRENDDEL et al., 2005; BAE et al., 2009). Um estudo conduzido por BROHEM e colaboradores (2013) utilizou PCR array para análise comparativa entre fibroblastos e células-tronco mesenquimais derivadas do tecido dérmico e adiposo. A população de células-tronco derivadas de tecido adiposo foi a que mais diferiu dos fibroblastos em termos de expressão gênica. Nessa análise, foram considerados genes descritos na literatura que estavam envolvidos na regulação do ciclo e divisão celular (*APC*, *AXIN1*, *CCNA2*, *CCND1*, *CCND2*, *CCNE1*, *CDK1*, *CDC42* e outros), modulação da cromatina (*KAT2A*, *HDAC2*, *KAT8*, *KAT7*, *RBI* e *TERT*) marcadores de autorrenovação (*HSPA9*, *NEUROG2*, *SOX1*, *SOX2*), moléculas de adesão (*APC*, *BGLAP*, *CD4*, *CD44*, *CDH1*, *CDH2*, *COL9A1*, *CTNNA1*, *CXCL12*, *NCAMI*), citocinas e fatores de crescimento (*BMP1*, *BMP2*, *BMP3*, *CXCL12*, *FGF1*, *FGF2*, *FGF3*, *FGF4*, *GDF2*, *GDF3*, *IGF1*, *JAG1*), marcadores metabólicos (*ABCG2*, *ALDH1A1*, *ALDH2*, *FGFR1*), marcadores mesenquimais (*ACAN*, *ALPI*, *BGLAP*, *COL1A1*, *COL2A1*, *COL9A1*, *PPARG*) e hematopoiéticos (*CD3D*, *CD4*, *CD8A*, *CD8B*, *MME*), dentre outros grupos funcionais de genes. Por esse método de microarranjo,

cerca de 20 genes foram encontrados como diferencialmente expressos por ambas as células. A maioria dos genes não apresentou significância em uma análise comparativa, considerando valor  $p < 0,05$ .

Recentemente, o RNA-Seq (Sequenciamento de RNA) tem se destacado como a principal técnica de análise do transcriptoma devido à quantidade de dados adquiridos em larga escala. O processo do RNA-Seq consiste em pelo menos quatro etapas, sendo essas: (1) mapeamento preciso de milhões de *reads* curtas em um genoma de referência; (2) quantificação dos níveis de expressão dos genes, transcritos e éxons; (3) análise diferencial da expressão gênica entre condições biológicas distintas e (4) interpretação biológica dos genes diferencialmente expressos. Em uma comparação com análises de microarranjo, o RNA-Seq mostrou ter maior acurácia e reprodutibilidade com uma variação técnica relativamente pequena. Além disso, o RNA-Seq permite a detecção de novos tipos de transcritos em organismos bem estudados, transcrições únicas em tecidos ou em tipos celulares raros, e tem sido fundamental para catalogar a diversidade de novas espécies de transcritos incluindo RNA não codificador longo (*lncRNA*), micro-RNA (*miRNA*), RNA de interferência (*siRNA*) e outras pequenas classes de RNA (ZHAO et al., 2016).

JÄÄGER e colaboradores analisaram por RNA-Seq a dinâmica da diferenciação de hASC e fibroblastos dérmicos (FBs) provenientes de amostras de células do mesmo indivíduo. Ambas as células apresentaram aproximadamente 150 genes diferencialmente expressos no estado indiferenciado, considerando uma taxa de falsa descoberta (FDR) de 5%. Esses padrões de expressão gênica distintos estavam relacionados principalmente aos genes envolvidos na regulação do ciclo celular (*ANLN*, *BIRC5*, *CCNB1*, *CDC25B*, *CDCA8*, *CENPF*, *CKS1B*, *H2AFZ*, *HELLS*, *HMGB1*, *HMGB2*, *KIF2C*, *KPNA2*, *LMNA*, *NCAPG*, *PLK1*, *PRC1*, *TK1*, *TOP2A*, *UBE2C* e outros), processos de desenvolvimento (*CBX8*), transdução de sinal (*CAVI*, *CXCL12*, *DNM1*, *FGF5*, *S100A4*, *GREM1*, *MYOF*, *ZRANB1* e outros) e também na organização estrutural das células (*CALD1*, *TAGLN*, *TPM1*, *TPM2*, *COL1A1*, *COL1A2*, *COL1A3*, *EFEMP1*, *FNI*, *POSTN*, *TGFBI* e outros). Esses pesquisadores também observaram que os fibroblastos foram capazes de se diferenciar em células da linhagem adipogênica e osteogênica em uma dinâmica de expressão gênica similar à de hASC, porém essa dinâmica foi distinta na diferenciação condrogênica. Outro estudo comparou o perfil polissomal (mRNA associado à maquinaria de tradução da célula) entre células-tronco derivadas de tecido adiposo e fibroblastos dérmicos. A análise desse perfil revelou que

aproximadamente 1.547 genes foram diferencialmente expressos nos dois tipos celulares. Esses genes estavam relacionados com funções primordiais como adesão celular, diferenciação e proliferação. De maneira oposta aos achados de JÄÄGER e colaboradores, nesse estudo foi demonstrado que os fibroblastos não foram capazes de se diferenciar em outras linhagens celulares (ZYCH et al., 2014). Outra análise de RNA-Seq com MSCs derivadas de medula óssea (BMs), tecido adiposo (AMs) e tonsila palatina (TMs) mostrou uma alta expressão de genes que codificam para ligação de proteínas, fatores de crescimento e atividade de citocinas em compartimentos extracelulares nas AMs e TMs em comparação às BMs. No total, 953 genes foram identificados como diferencialmente expressos entre células-tronco derivadas do tecido adiposo e as células de medula óssea (THULABANDU et al., 2018).

O sequenciamento de RNA é capaz de prover dados em larga escala, muito maior que a quantidade obtida por ensaios de microarranjo, sendo que a validação dos dados em bancada (*in vitro*) tem sido considerada essencial. Muitos trabalhos identificam genes diferencialmente expressos por microarranjo e validam usando PCR quantitativa em tempo real baseada em transcrição reversa (RT-qPCR), para confirmar e estudar a função biológica dos mesmos. Em relação ao RNA-Seq, ainda se discute se a validação por RT-qPCR é necessária (FANG & CUI, 2011). Alguns autores mostraram que o número de vezes de aumento estimado na expressão dos genes avaliados por RNA-Seq tem alta correlação e consistência com os resultados da RT-qPCR (RAMSKOLD et al., 2009; CAMARENA et al., 2010). Além disso, estudos sobre expressão alélica e *splicing* alternativo também foram validados por PCR quantitativa apresentando boa correlação (SERRE et al., 2008; ZHENG et al., 2009). É importante destacar que a validação usando as mesmas amostras de RNA que foram sequenciadas somente valida a tecnologia, e não possibilita tirar conclusão sobre tratamentos ou condições distintas. Somente a validação usando diferentes réplicas biológicas das mesmas populações podem confirmar as conclusões biológicas de um determinado estudo (FANG & CUI, 2011).

Dessa forma, o capítulo 3 aborda os resultados do sequenciamento de amostras de RNA provenientes de hASC e fibroblastos dérmicos humanos de indivíduos distintos. Alguns genes provenientes dessas análises foram validados por RT-qPCR, possibilitando uma correlação entre os dados de RNA-Seq e aqueles gerados pela validação em bancada. Além disso, as principais funções desempenhadas por esses genes foram revisadas na literatura científica e analisadas quanto à provável relevância

para distinguir os dois tipos celulares. Hipotetizamos que a análise da expressão diferencial e das vias enriquecidas em ambas as células possam ser ferramentas importantes não só para a compreensão da biologia das mesmas, mas também possam contribuir para diferencia-las, garantindo uma aplicação terapêutica de maneira segura.

## 4.2 OBJETIVOS

### 4.2.1 *Objetivo Geral*

Utilizar estratégias moleculares para a caracterização e a distinção entre células-tronco derivadas de tecido adiposo (hASC) e fibroblastos dérmicos humanos *in vitro*.

### 4.2.2 *Objetivos específicos*

- a) Realizar o sequenciamento de RNA (RNA-Seq) de amostras de hASC e fibroblastos dérmicos proveniente de indivíduos distintos;
- b) Verificar a expressão diferencial de genes nas duas culturas de células por análises de bioinformática;
- c) Analisar as funções dos genes e as principais vias enriquecidas nos dois tipos celulares por análises de bioinformática;
- d) Validar *in vitro* os resultados da expressão diferencial de genes obtidos por RNA-Seq com pareamento de amostras de hASC e fibroblastos.

## 4.3 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.3.1 *Isolamento de amostras de hASC e fibroblastos dérmicos provenientes de indivíduos distintos para o Sequenciamento de RNA total (RNA-Seq)*

Três amostras de RNA provenientes de hASC e fibroblastos dérmicos humanos cultivados até a quarta passagem, isoladas de indivíduos distintos submetidos à cirurgia plástica (CAAE: 02508018.1.0000.5149), foram encaminhadas para sequenciamento de RNA (RNA-Seq). O RNA total foi extraído das células utilizando-se 1 mL do reagente TRIzol (Ambion), de acordo com as instruções do fabricante. Para essa extração, foram utilizadas garrafas de cultura T75 cm<sup>2</sup> com células na confluência máxima. As amostras foram transferidas para tubos de plástico livres de nucleases volume 1,5 mL e, a cada 1 mL de TRIzol, foram acrescentados 200 µL de clorofórmio. A mistura foi agitada vigorosamente e centrifugada por 15 minutos a 15.000 xg à 4 °C. Depois, a fase aquosa foi transferida para um novo tubo e a precipitação do RNA foi realizada com o acréscimo de 1 µL de acrilamida linear (Invitrogen) e incubação em freezer -70°C por 3 horas. Ao final do período de precipitação, as amostras foram novamente centrifugadas por 10 minutos a 15.000 xg à 4°C. O sobrenadante foi descartado e foi acrescentado 1 mL de etanol 75% v/v ao *pellet* contendo RNA. A amostra foi submetida à centrifugação 15.500 xg à 4°C por 10 minutos. O excesso de álcool foi evaporado por meio de incubação do RNA a 37°C por 15 minutos em Thermomixer (Eppendorf). Ao final do processo de isolamento, o RNA foi solubilizado em água contendo dietilpirocarbonato (DEPC) (Invitrogen). A concentração do RNA foi determinada pela leitura da absorbância a 260/280 nm em espectrofotômetro Multiskan™ GO (Thermo Scientific) e a qualidade e integridade do RNA foi avaliada utilizando-se o equipamento Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent). Para evitar degradação no transporte das amostras, estas foram acondicionadas em tubos GenTegra® e submetidas à secagem por SpeedVac à temperatura ambiente durante 4 horas. O RNA seco foi armazenado à temperatura ambiente e encaminhado à empresa GenOne para sequenciamento e posteriores análises de bioinformática.

### **4.3.2 Controle de qualidade das amostras para RNA-Seq**

Todas as amostras de RNA total foram quantificadas e passaram por análise de qualidade no equipamento Agilent 2100 Bioanalyzer para determinação do índice RIN (*RNA Integrity Number*). De acordo com os parâmetros do Bioanalyzer, os RNAs avaliados apresentaram  $RIN \geq 7,4$ , com a linha base sem interferências, degradação ou contaminação. Quanto à concentração e pureza determinadas em espectrofotômetro Multiskan™ GO, as amostras apresentaram concentração igual ou superior a 50 ng/μL, razão 260 nm/280 nm entre 1,8 e 2,2, e razão 260 nm/230 nm entre 0,85 a 1,80. Os resultados estão relacionados no APÊNDICE 1 desse documento.

### **4.3.3 Sequenciamento de RNA total e análises de bioinformática**

As bibliotecas de RNA foram construídas com o kit NEBNext® Ultra™ RNA Library Prep (NEB, USA) de acordo com instruções dos fabricantes e sequenciadas em Plataforma Illumina HiSeq 2500™ (sequenciamento por síntese em paralelo) com *reads* do tipo *paired-ends* de tamanho 125-150 pares de bases, gerando no total mais de 30 milhões de *reads*. Segundo as diretrizes do projeto ENCODE (*Encyclopedia of DNA Elements*) cujas instruções estão disponíveis em: <https://www.encodeproject.org/about/experiment-guidelines/>), para estudar a expressão de transcritos poly A, uma cobertura de 20 a 25 milhões de *reads* curtas mapeadas é suficiente. As amostras de hASC foram identificadas como: ASC\_1, ASC\_2 e ASC\_3 e as amostras de fibroblastos dérmicos foram identificadas por FIB\_1, FIB\_2 e FIB\_3. O projeto ENCODE recomenda a realização de duas ou mais replicatas biológicas, sendo desnecessário realizar replicatas técnicas. Nesse projeto, trabalhamos com triplicatas biológicas.

#### **4.3.3.1 Mapeamento das reads no genoma de referência**

Os arquivos de referência do genoma e da anotação de genes foram baixados diretamente dos *sites* pertencentes ao NCBI / UCSC / Ensembl. Os índices do genoma de referência foram construídos usando o Bowtie v 2.0.6 e as *reads* limpas foram alinhadas usando o TopHat v2.0.9. Bowtie usa um algoritmo BWT (*Burrows-Wheeler Transformer*) para mapear leituras no genoma e Tophat pode gerar um banco de dados de junções de *splicing* baseadas no arquivo modelo de anotação dos genes e, assim,

alcançar um melhor resultado de mapeamento do que outras ferramentas de mapeamento sem *splicing* (KIM et al., 2013).

#### 4.3.3.2 Quantificação dos níveis de expressão gênica

O HTSeq v0.6.1 foi usado para contar as *reads* mapeadas para cada gene. O FPKM de cada gene foi calculado com base no tamanho do gene (em pares de bases) e na contagem de *reads* mapeadas em cada gene. FPKM (abreviação para o número esperado de fragmentos por quilobase de sequência de transcritos por milhões de pares de bases sequenciados) é o método mais comum de estimar os níveis de expressão gênica, o qual leva em consideração os efeitos da profundidade de sequenciamento e comprimento do gene na contagem dos fragmentos (MORTAZAVI et al., 2008).

#### 4.3.3.3 PCA (Análise de Componente Principal) e Correlação de Pearson ( $R^2$ )

A Análise de Componente Principal (PCA) é um método de análise estatística multivariada que leva em consideração o FPKM de todas as amostras, sumarizando a variância total. Essa análise transfere um grande número de genes que afetarão o padrão de expressão em alguns componentes principais por meio da redução do número de dimensões, sem perda significativa das informações das variáveis originais, ou seja, do todo. Assim, essas variáveis originais são transformadas em um conjunto menor de variáveis lineares não correlacionadas que compõem os componentes principais (SMITH, 2002; JOLLIFFE & CADIMA, 2016). Já a correlação de Pearson ou *Pearson Product-Moment Correlation* ( $R^2$ ) é um indicativo de correlação linear entre duas variáveis contínuas, cujo cálculo é baseado no método de covariância (AKOGLU, 2018). O dendograma estabelece uma relação de proximidade entre grupos, classificando as amostras conforme a semelhança entre elas. Todas essas análises foram feitas para comparação de similaridade entre as réplicas biológicas de hASC e fibroblastos dérmicos, denominadas nos gráficos como ASC e FIB.

#### 4.3.3.4 Análise da expressão diferencial de genes

A análise de expressão diferencial entre duas condições / grupos (duas repetições biológicas por condição) foi realizada utilizando o Pacote DESeq2 R (Versão 2\_1.6.3). O pacote DESeq2 leva em consideração a profundidade do sequenciamento e as diferenças na composição das bibliotecas sequenciadas (ANDERS & HUBER, 2010). A

expressão diferencial é determinada usando um modelo baseado na distribuição binomial negativa. Os valores de p resultantes foram ajustados usando os dados de Benjamini e Hochberg, abordagem usada para controlar a Taxa de Falsa Descoberta (FDR). Genes com um p-valor ajustado  $<0,05$  encontrados pelo DESeq2 foram atribuídos como diferencialmente expressos entre as amostras de hASC e fibroblastos. As diferentes amostras de hASC e fibroblastos (ASC e FIB) foram agrupadas usando o nível de expressão FPKM com o objetivo de correlacioná-las por meio do método de distância de *clustering* hierárquico com a função *heatmap* (mapa de calor).

#### 4.3.3.5 Análises de enriquecimento dos genes diferencialmente expressos (GO e KEGG)

*Gene Ontology* (GO, <http://www.geneontology.org/>) é um sistema de classificação internacional padronizado que descreve a função dos genes. Depois de filtrar os genes diferencialmente expressos, pode-se pesquisar a distribuição deles em *Gene Ontology* para ilustrar suas diferenças funcionais. O *software* de análise de enriquecimento GO utilizado foi o Goseq (YOUNG et al., 2010), o qual é baseado na distribuição hiper-geométrica não-central de Wallenius. Métodos padrão produzem resultados enviesados em dados de RNA-Seq devido à detecção excessiva de expressão diferencial para transcritos longos e altamente expressos. Goseq foi desenhado para compensar esse viés no teste estatístico introduzindo uma correção quando se trata de genes longos. Os termos de GO com p-valor corrigido inferior a 0,05 foram considerados como significativamente enriquecidos.

KEGG (Enciclopédia de Kyoto de Genes e Genomas, <http://www.kegg.jp/>) é um importante recurso de banco de dados para análise de vias enriquecidas (KANEHISA, 2008), as quais são identificadas usando teste hipergeométrico. Nesse projeto, as vias que os genes diferencialmente expressos estão envolvidos foram identificadas por *KEGG Pathway Enrichment Analysis* e o *software* KOBAS foi utilizado para testar a estatística de enriquecimento desses genes nas vias.

#### ***4.3.4 Validação in vitro dos genes diferencialmente expressos (GDEs) utilizando amostras de hASC e fibroblastos dérmicos humanos provenientes do mesmo indivíduo***

A partir dos resultados do sequenciamento de RNA, alguns genes classificados como diferencialmente expressos foram escolhidos para validação por PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR) utilizando amostras de RNA total diferente das amostras que foram sequenciadas. O menor p-valor ajustado entre as três amostras de hASC e três amostras de fibroblastos dérmicos do sequenciamento indica a homogeneidade da expressão e maior significância na expressão diferencial dos genes. Portanto, foram escolhidos para validação, 17 genes com p-valor ajustado igual ou menor a  $1,84 \times 10^{-4}$  e o p-valor mínimo selecionado foi igual a  $6,41 \times 10^{-38}$ . Os genes *ALPL* e *B4GALNT1*, os quais apresentaram valores de p-ajustado menos negativos ( $5,33 \times 10^{-8}$  e  $1,84 \times 10^{-4}$ , respectivamente), foram selecionados com o objetivo adicional de verificar dados da literatura que observaram uma expressão significativa desses genes em células-tronco mesenquimais humanas (MARTINEZ et al., 2007; STEFKOVÁ et al., 2015; HEO et al., 2016). No total, foram selecionados 17 genes para validação *in vitro*, sendo 7 com regulação negativa e 10 com regulação positiva em hASC, de acordo com os resultados das análises de genes diferencialmente expressos avaliados por bioinformática. Os genes também foram analisados utilizando-se a ferramenta IPA (*Ingenuity Pathway Analysis*) da QIAGEN. A lista dos genes escolhidos com o respectivo p-valor ajustado e a regulação em hASC (positiva ou negativa) estão relacionados na Tabela 4. As análises foram conduzidas a partir do RNA extraído das células provenientes de quatro indivíduos.

**Tabela 4. Lista dos genes diferencialmente expressos do RNA-Seq selecionados para validação *in vitro*.**

<b>GENE *</b>	<b>p-valor ajustado</b>	<b>Regulação em hASC</b>
<i>ENSG00000149968</i> <i>MMP3</i>	$6,41 \times 10^{-38}$	Negativa
<i>ENSG00000164106</i> <i>SCRG1</i>	$6,65 \times 10^{-37}$	Positiva
<i>ENSG00000087510</i> <i>TFAP2C</i>	$1,29 \times 10^{-36}$	Negativa
<i>ENSG00000130595</i> <i>TNNT3</i>	$1,90 \times 10^{-34}$	Positiva
<i>ENSG00000060718</i> <i>COL11A1</i>	$4,00 \times 10^{-33}$	Positiva
<i>ENSG00000154678</i> <i>PDE1C</i>	$6,61 \times 10^{-28}$	Positiva
<i>ENSG00000135218</i> <i>CD36</i>	$2,84 \times 10^{-22}$	Positiva
<i>ENSG00000198947</i> <i>DMD</i>	$1,25 \times 10^{-22}$	Positiva
<i>ENSG00000169946</i> <i>ZFPM2</i>	$3,67 \times 10^{-18}$	Positiva
<i>ENSG00000142910</i> <i>TINAGL1</i>	$5,13 \times 10^{-17}$	Positiva
<i>ENSG00000221818</i> <i>EBF2</i>	$2,00 \times 10^{-17}$	Positiva
<i>ENSG00000170775</i> <i>GPR37</i>	$7,23 \times 10^{-14}$	Negativa
<i>ENSG00000050555</i> <i>LAMC3</i>	$6,98 \times 10^{-12}$	Negativa
<i>ENSG00000050767</i> <i>COL23A1</i>	$1,14 \times 10^{-11}$	Negativa
<i>ENSG00000162551</i> <i>ALPL</i>	$5,33 \times 10^{-8}$	Positiva
<i>ENSG00000007264</i> <i>MATK</i>	$7,30 \times 10^{-5}$	Negativa
<i>ENSG00000135454</i> <i>B4GALNT1</i>	$1,84 \times 10^{-4}$	Negativa

\*A nomenclatura e as identidades dos genes estão relacionadas de acordo com a lista do HGNC (*HUGO Gene Nomenclature Committee*).

#### 4.3.4.1 Desenhos dos iniciadores para a amplificação de cada gene selecionado

Para as reações de RT-qPCR, os pares de *primers* foram desenhados com auxílio da ferramenta BLAST/ *Pick Primers* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) e Primer 3 Input (<http://primer3.ut.ee/>). Os parâmetros de cada par de *primer* gerado foram conferidos utilizando-se a ferramenta IDT *Oligo Analyzer* (<https://www.idtdna.com/calc/analyzer>). A temperatura de hibridização, a formação de *hairpin*, homodímeros e heterodímeros foram verificados para cada dupla de iniciadores. A lista contendo as sequências dos pares de *primers* (F: *forward*, R: *reverse*) escolhidos para cada gene, assim como o tamanho esperado de cada *amplicon*, estão relacionados na Tabela 5. Para fins de normalização de cada reação, dois controles endógenos foram utilizados: os genes *GAPDH* e *RPL13A*, considerados bons normalizadores para hASC de acordo com a literatura (PALOMBELLA et al., 2017).

**Tabela 5. Lista dos pares de *primers* desenhados para a amplificação dos genes selecionados**

<b>GENE</b>	<b>Primer F (5'- 3')</b>	<b>Primer R (5'- 3')</b>	<b>Amplicon (pb)*</b>
<i>MMP3</i>	GACAAAGGATACAACAGGGACCA	CCGAGTCAGGTCTGTGAGTG	136
<i>SCRG1</i>	CTGGGATGGGAAGGGATGTG	AAAACGTCTTTTGGGCAGCA	75
<i>TFAP2C</i>	GCAGAACTACATCAAAGAAGCC	TGTTTCTCCATTTTCTCCAGGG	108
<i>TNNT3</i>	ACCGAGACCCAAACTCACTG	GCTTCAAAGTGGCTGTGATG	129
<i>COL11A1</i>	TGACTATGAGTATGGGGAAGCAG	TCAACGATGTTTGCCTCCGT	105
<i>PDE1C</i>	GTCGCCAACCAAGGAGATTGA	GAGCCGAAGCCAGATTTTCTC	88
<i>CD36</i>	GAAGTGTGGGCTCATCGCT	TAAGCAGGTCTCCAAGTGGC	86
<i>DMD</i>	GTTGGCAGTCAAACCTTCGGAC	TGGCTTTCCAGGGGTATTTCT	144
<i>ZFPM2</i>	TCCATCAGAGGAAACAGACATCA	CCACTTCTTCGCAGCTCAGAT	101
<i>TINAGL1</i>	CAGTCTTGGGAACGTAAGTGGG	TGGTTCTTGGTCACACTGCC	80
<i>EBF2</i>	AGTGGTGGACGCTAATGTGCG	CGCCAGGACGAAGTGAAAGA	115
<i>GPR37</i>	TGAGCAAGGAGGATTTGGGG	ATACCACCACAGTCTCGCAC	131
<i>LAMC3</i>	TGTTTCATGTCCCACTGGCTAC	GCATCTCCCTCTTGTATCCCG	70
<i>COL23A1</i>	CTCCATCCGAATGTGTCTGC	GGTAGCCATCTCGTCCTGATTG	105
<i>ALPL</i>	CAGGGGACATGCAGTACGAG	CGTGGTCAATTCTGCCTCCT	141
<i>MATK</i>	ACATTGGGAGCACAGATCGG	CTGGGCTGTACATCACACT	108
<i>B4GALNT1</i>	TGAACCTGACTGCCTCCCTA	TGCCTGTTGAGTTGGTCCAG	124
<i>RPL13A</i>	TATGAGTGAAAGGGAGCC	ATGACCAGGTGGAAAGTC	82
<i>GAPDH</i>	ACAACCTTTGGTATCGTGGAAGG	GCCATCACGCCACAGTTTC	101

\*pb= pares de bases

#### 4.3.4.2 Extrações de RNA total das amostras

Para validação dos genes selecionados, foram escolhidas amostras de hASC e fibroblastos dérmicos provenientes de quatro indivíduos (hASC e fibroblastos da mesma fonte). O RNA total foi extraído de garrafas de células T 75 cm<sup>2</sup> confluentes utilizando-se 1 mL do reagente TRIzol (Ambion), de acordo com as instruções do fabricante. O protocolo de isolamento foi realizado conforme descrito no item 3.1 para as amostras submetidas ao sequenciamento de RNA. Ao final do processo de isolamento, o RNA foi solubilizado em água contendo dietilpirocarbonato (DEPC) (Invitrogen). A concentração do RNA foi determinada pela leitura da absorbância a 260/280 nm em espectrofotômetro Multiskan™ GO (Thermo Scientific) e a qualidade do RNA foi verificada em gel de agarose 1%. As amostras foram estocadas em freezer -70 °C até serem utilizadas.

#### 4.3.4.3 Tratamento do RNA total com DNase e síntese da primeira fita de cDNA

Três microgramas de RNA total de cada amostra foram tratados com DNase (Kit RQ1 DNase - Promega) a 37° C por 30 minutos, seguida de incubação com Solução de Parada a 56°C por 10 minutos. Após a digestão do DNA genômico contaminante, as amostras foram novamente quantificadas e armazenadas a -70 °C.

A primeira fita de cDNA foi sintetizada usando o *kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems), em que foi feito um mix contendo 2 µL de 10X RT Buffer; 0,8 µL de 25X dNTP Mix (100 mM); 2 µL de 10X RT *Random Primers*; 1 µL de *MultiScribe™ Reverse Transcriptase*; 1 µg de RNA tratado com DNase e água *nuclease-free*, totalizando um volume de 20 µL. As reações foram incubadas a 25 °C por 10 minutos, 37 °C por 2 horas e, em seguida, a enzima foi inativada a 85 °C por 5 minutos com solução de parada da reação.

#### 4.3.4.4 Reações de PCR quantitativa em tempo real (RT- qPCR)

Inicialmente, foram feitos ensaios de RT-qPCR para a determinação da concentração ótima de cada oligonucleotídeo iniciador (teste de concentração de *primers*). As concentrações testadas de cada iniciador foram 0,1; 0,2; 0,3 e 0,4 µM, utilizando amostras de cDNA diluídas 1:2. A concentração ótima de cada par de

*primers*, expressa em micromolar ( $\mu\text{M}$ ) sem a presença de dímeros, foi escolhida para cada gene (Tabela 6).

**Tabela 6. Sigla dos genes e relação das concentrações de *primers* selecionadas para as reações de amplificação por RT-qPCR.**

GENE	Concentração de <i>Primers</i> F e R ( $\mu\text{M}$ )*
<i>MMP3</i>	0,2
<i>SCRG1</i>	0,1
<i>TFAP2C</i>	0,3
<i>TNNT3</i>	0,1
<i>COL11A1</i>	0,2
<i>PDE1C</i>	0,1
<i>CD36</i>	0,2
<i>DMD</i>	0,2
<i>ZFPM2</i>	0,1
<i>TINAGL1</i>	0,1
<i>EBF2</i>	0,2
<i>GPR37</i>	0,2
<i>LAMC3</i>	0,3
<i>COL23A1</i>	0,3
<i>ALPL</i>	0,1
<i>MATK</i>	0,2
<i>B4GALNT1</i>	0,3
<i>RPL13A</i>	0,3
<i>GAPDH</i>	0,4

\* micromolar ( $\mu\text{M}$ ).

Cada reação de PCR quantitativa continha 5 $\mu\text{L}$  de 2X GoTaq® qPCR Master Mix, 2  $\mu\text{L}$  de mix de *primers* F e R específicos, cDNA diluído 1:2 e água DEPC para um volume final de 10  $\mu\text{L}$ . As reações, em triplicata, foram transferidas para placas rígidas de 96 poços e colocadas no equipamento CFX Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) para quantificação da expressão relativa de cada gene. As condições de amplificação foram: um passo inicial de 95 °C por 2 minutos, seguido de 40 ciclos constituídos por uma etapa de desnaturação a 95 °C por 15 segundos e uma etapa associada de hibridização e extensão a 60 °C por 1 minuto. Após os 40 ciclos de

amplificação todas as amostras foram submetidas à desnaturação gradual para determinação da curva de dissociação (*Melt curve*), com o objetivo de verificar a especificidade da reação de amplificação, a formação de dímeros de *primers* e determinar o  $T_m$  de cada *amplicon*. Em todas as reações de RT-qPCR foi feito um “branco” (NTC – No Template Control) para cada par de iniciadores contendo todos os reagentes exceto o DNA.

#### **4.3.5 Análise da expressão diferencial dos genes entre hASC e fibroblastos dérmicos humanos**

A eficiência de cada reação foi calculada sem a necessidade de curva padrão prévia, conforme descrito na literatura. A equação de cálculo dessa eficiência é definida por:  $E = (R2/R1)^{1/(Ct2-Ct1)} - 1$ , onde R2 e R1 correspondem a dois valores arbitrários de fluorescência, sendo R2 o maior valor e R1 o menor valor, e Ct2 e Ct1 os valores de Cq correspondentes a R2 e R1, respectivamente. Esse cálculo foi determinado para cada conjunto de reações de amplificação de um mesmo gene (LIU & SAINT, 2002; CIKOS et al., 2007). A quantificação relativa foi calculada utilizando-se o método desenvolvido por PFAFFL (2001), em que se consideram as eficiências calculadas a cada reação de RT-qPCR usando *Pair Wise Fixed Reallocation Randomisation Test*. Nesse cálculo, as eficiências previamente determinadas para cada reação foram plotadas em planilhas e a amostra referente aos fibroblastos foi considerada como calibrador nos cálculos da expressão relativa. *GAPDH* e *RPL13A* foram os controles endógenos na análise comparativa entre hASC e fibroblastos.

#### **4.3.6 Análises Estatísticas**

Todas as análises de RT- qPCR foram realizadas no *software* Graph Pad Prism 5. Para determinar se as amostras obedeceram a uma distribuição Gaussiana, foi utilizado o teste de normalidade de D’Agostino & Pearson e foram determinados a média e o erro padrão dos grupos avaliados. Por fim, a quantificação relativa da expressão dos genes entre hASC e fibroblastos foi comparada utilizando-se *Unpaired-t test* com correção de Welch, que considera as variâncias distintas entre as amostras. Os resultados foram plotados nos gráficos como média  $\pm$  erro padrão. O valor de significância  $p < 0,05$  foi considerado em todas as análises.

## 4.4 RESULTADOS

### 4.4.1 Resultados obtidos por meio da análise de RNA-Seq

As amostras de RNA total isoladas de hASC e fibroblastos dérmicos, em réplicas biológicas, foram encaminhadas para sequenciamento e posterior análise de bioinformática. No APÊNDICE 1 desse documento, destacamos os resultados obtidos nas análises de qualidade anteriores ao sequenciamento, onde foram avaliados os parâmetros: concentração do RNA, razão 28s/18s, razão 260/280, razão 260/230 e RIN.

#### 4.4.1.1 A análise de qualidade das amostras sequenciadas mostrou acurácia e alta qualidade de *base calling*

As três amostras de hASC e as três amostras de fibroblastos dérmicos foram verificadas quanto ao número de *reads*. Os dados brutos do sequenciamento high-throughput realizado na plataforma Illumina HiSeq 2500™ foram transformados em *reads* sequenciadas (*reads* brutas) pela ferramenta de reconhecimento de bases CASAVA (*base calling*). Para obtenção das *reads* limpas, foram removidas as sequências contendo adaptadores, *reads* com N > 10% (N representa as bases que não puderam ser determinadas) e também com baixo valor de Q *score*. O número de bases limpas foi calculado através da multiplicação do número de sequências pelo comprimento das mesmas, dado em unidade G. Além disso, foi determinada a taxa de erro do sequenciamento de bases, os *scores* Q20 e Q30 e o conteúdo de bases GC, dados em porcentagem. Os *scores* Q são definidos como uma propriedade logarítmica relacionada às probabilidades de erro na *base calling* (processo de identificação das bases de uma determinada sequência). Se uma base recebe um *score* Q30, isso é equivalente à probabilidade da identificação de 1 base incorreta a cada 1.000 bases lidas. Nesse caso, a acurácia de identificação de bases será de 99,9%. Em um *score* Q20, a probabilidade é equivalente a identificação de 1 base incorreta a cada 100 bases lidas. Nesse caso, a acurácia será de 99% (ILLUMINA TECHNICAL NOTE, 2011). Mais de 95,9% das bases lidas nas amostras receberam um *score* Q20 e mais de 90,2% receberam um *score* Q30, indicando alta qualidade do sequenciamento. O conteúdo GC variou entre 53,91% e 57,73% (Tabela 7).

**Tabela 7. As amostras sequenciadas apresentaram alta qualidade de *base calling* nas *reads* obtidas**

<b>Amostras</b>	<b><i>Reads</i> Brutas</b>	<b><i>Reads</i> Limpas</b>	<b>Bases Limpas</b>	<b>Taxa de erro (%)</b>	<b>Q20 (%) *</b>	<b>Q30 (%) **</b>	<b>Conteúdo GC (%) ***</b>
<b>ASC_1</b>	52.997.608	51.577.670	7,74G	0,02	96,17	90,68	53,91
<b>ASC_2</b>	50.243.124	48.867.828	7,33G	0,02	95,98	90,29	54,78
<b>ASC_3</b>	54.024.442	52.663.284	7,9G	0,02	95,96	90,26	53,23
<b>FIB_1</b>	55.744.896	53.962.472	8,09G	0,02	96,44	91,31	54,24
<b>FIB_2</b>	71.577.818	69.158.408	10,37G	0,02	96,60	91,65	55,13
<b>FIB_3</b>	67.995.480	65.833.220	9,87G	0,02	96,42	91,21	57,73

\***Q20**= probabilidade equivalente a identificação de 1 base incorreta a cada 100 bases lidas. \*\***Q30**= probabilidade equivalente a identificação de 1 base incorreta a cada 1.000 bases lidas. \*\*\***Conteúdo GC**= pareamento citosina-guanina expresso em porcentagem.

#### 4.4.1.2 As *reads* foram mapeadas com o genoma de referência humano

O genoma humano e a sua anotação são cada vez mais compreendidos desde o surgimento do projeto Genoma Humano, em 2001. Essas informações são de grande utilidade para a análise do transcriptoma. A sequência anotada do genoma humano fornecida pelo browser Ensembl (<https://www.ensembl.org/index.html>) foi usada como referência nesse projeto. O alinhamento das *reads* obtidas no sequenciamento ao genoma de referência foi obtida por meio da ferramenta TopHat 2 (KIM et al., 2013). O mapeamento do TopHat 2 pode ser dividido em três passos:

- 1- Alinhamento das *reads* ao transcriptoma;
- 2- Alinhamento das *reads* ao éxon inteiro, não permitindo grandes *gaps*;
- 3- As *reads* não mapeadas são cortadas em segmentos menores e alinhadas independentemente. As regiões genômicas ao redor dos segmentos de *reads* mapeados são então analisadas para possíveis conexões de *splicing* no genoma incluindo indels, fusões e quebras.

O sumário do mapeamento do genoma pode ser visualizado na tabela 8.

**Tabela 8. Sumário do mapeamento das *reads* no genoma de referência**

<b>Amostras</b>	<b>ASC_1</b>	<b>ASC_2</b>	<b>ASC_3</b>	<b>FIB_1</b>	<b>FIB_2</b>	<b>FIB_3</b>
<b><i>Reads</i> totais</b>	51.577.670	48.867.828	52.663.284	53.962.472	69.158.408	65.833.220
<b>Total mapeado</b>	43.210.246 (83,78%)	40.711.807 (83,31%)	44.384.453 (84,28%)	45.383.811 (84,10%)	57.960.267 (83,81%)	54.792.348 (83,23%)
<b>Mapeamento Múltiplo</b>	663.247 (1,29%)	612.898 (1,25%)	670.092 (1,27%)	685.658 (1,27%)	768.379 (1,11%)	773.863 (1,18%)
<b>Mapeamento Único</b>	42.546.999 (82,49%)	40.098.909 (82,06%)	43.714.361 (83,01%)	44.698.153 (82,83%)	57.191.888 (82,70%)	54.018.485 (82,05%)
<b><i>Reads</i> mapeadas na fita +</b>	21.356.559 (41,41%)	20.121.106 (41,17%)	21.928.078 (41,64%)	22.369.569 (41,45%)	28.579.785 (41,33%)	27.016.260 (41,04%)
<b><i>Reads</i> mapeadas na fita -</b>	21.190.440 (41,08%)	19.977.803 (40,88%)	21.786.283 (41,37%)	22.328.584 (41,38%)	28.612.103 (41,37%)	27.002.225 (41,02%)
<b><i>Reads</i> não splice</b>	21.363.162 (41,42%)	19.189.275 (39,27%)	21.452.170 (40,73%)	22.664.814 (42%)	29.732.109 (42,99%)	24.734.513 (37,57%)
<b><i>Reads</i> splice</b>	21.183.837 (41,07%)	20.909.634 (42,79%)	22.262.191 (42,27%)	22.033.339 (40,83%)	27.459.779 (39,71%)	29.283.972 (44,48%)

***Reads* totais**= *reads* limpas após processamento. **Total mapeado**= a razão entre *reads* mapeadas e o número total (deve ser maior que 70%). **Mapeamento múltiplo**= a razão entre *reads* multiplamente mapeadas e o número total de *reads* (deve ser menor que 10%). **Mapeamento único**= a razão entre as *reads* alinhadas em locais únicos e o total. ***Reads* mapeadas na fita + e na fita -** = a razão entre as *reads* mapeadas em cada uma das fitas do DNA e o total. ***Reads* splice** = também chamadas de *reads* de junção, é dada pela razão entre as *reads* splice mapeadas e o total de *reads*.

A distribuição das *reads* no genoma também foi avaliada. O mapeamento geralmente ocorre em éxons, íntrons e regiões intergênicas. Como o genoma humano possui uma anotação completa, a proporção de *reads* mapeadas nos éxons é maior. *Reads* mapeadas em regiões intrônicas podem ocorrer devido à presença de pré-mRNA remanescente ou eventos de *splicing* alternativo. O mapeamento em áreas intergênicas pode ocorrer devido à anotação incompleta dos genes. A maioria das *reads* foi alinhada com os éxons, apresentando uma porcentagem maior que 95% para todas as amostras sequenciadas. Menos que 5% das *reads* foram mapeadas em regiões intrônicas e intergênicas. O sumário da distribuição de *reads* relacionadas a cada amostra nas regiões do genoma está relacionado na tabela 9.

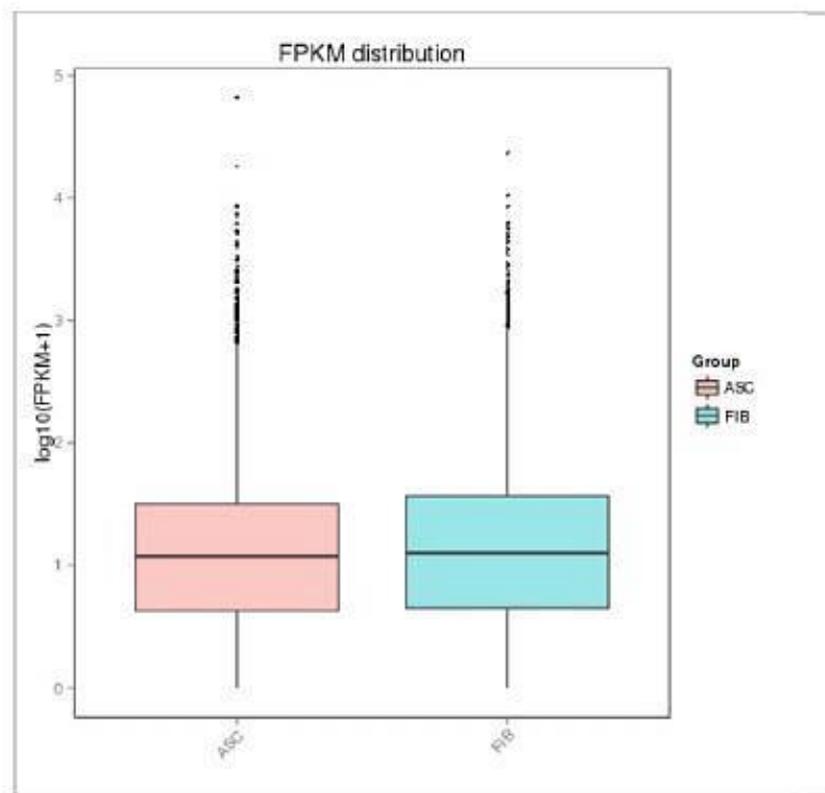
**Tabela 9. Distribuição das *reads* provenientes das amostras de hASC e fibroblastos nas três regiões do genoma.**

<b>Amostras</b>	<b>ASC_1</b>	<b>ASC_2</b>	<b>ASC_3</b>	<b>FIB_1</b>	<b>FIB_2</b>	<b>FIB_3</b>
<b>Éxon</b>	96,3%	96,1%	95,6%	95,8%	96,2%	98,5%
<b>Íntron</b>	2,8%	2,9%	3,4%	3,2%	2,9%	1,0%
<b>Intergênica</b>	0,9%	1,0%	1,0%	1,0%	0,9%	0,5%

#### 4.4.1.3 Normalização dos transcritos em unidade FPKM

A abundância dos transcritos está diretamente relacionada ao nível de expressão gênica. Nos experimentos de RNA-Seq, o nível de expressão gênica é estimado pela abundância de transcritos mapeados no genoma ou éxons. A contagem de *reads* é proporcional ao nível de expressão gênica, tamanho do gene e profundidade de sequenciamento. FPKM (abreviação para o número esperado de fragmentos por quilobase de sequência de transcritos por milhões de pares de bases sequenciados) é uma unidade de expressão que leva em consideração os efeitos da profundidade de sequenciamento e tamanho do gene na contagem de fragmentos, normalizando a contagem de *reads* do tipo *paired-ends* (MORTAZAVI et al., 2008). Ao analisar as amostras de hASC e fibroblastos, foi possível observar que a distribuição de FPKM apresentou-se bastante homogênea em ambos os grupos (Figura 40). O FPKM foi calculado para cada gene em todas as réplicas biológicas, totalizando 48.163 genes. Aproximadamente 10% dos genes foram expressos em níveis relativamente altos com  $FPKM \geq 15$  e cerca de 80% dos genes foram expressos em baixos níveis ( $FRKM = 0-3$ )

nas amostras de hASC e fibroblastos avaliadas. A quantificação de FPKM distribuída em intervalos (0 até > 60) está apresentada na tabela 10.



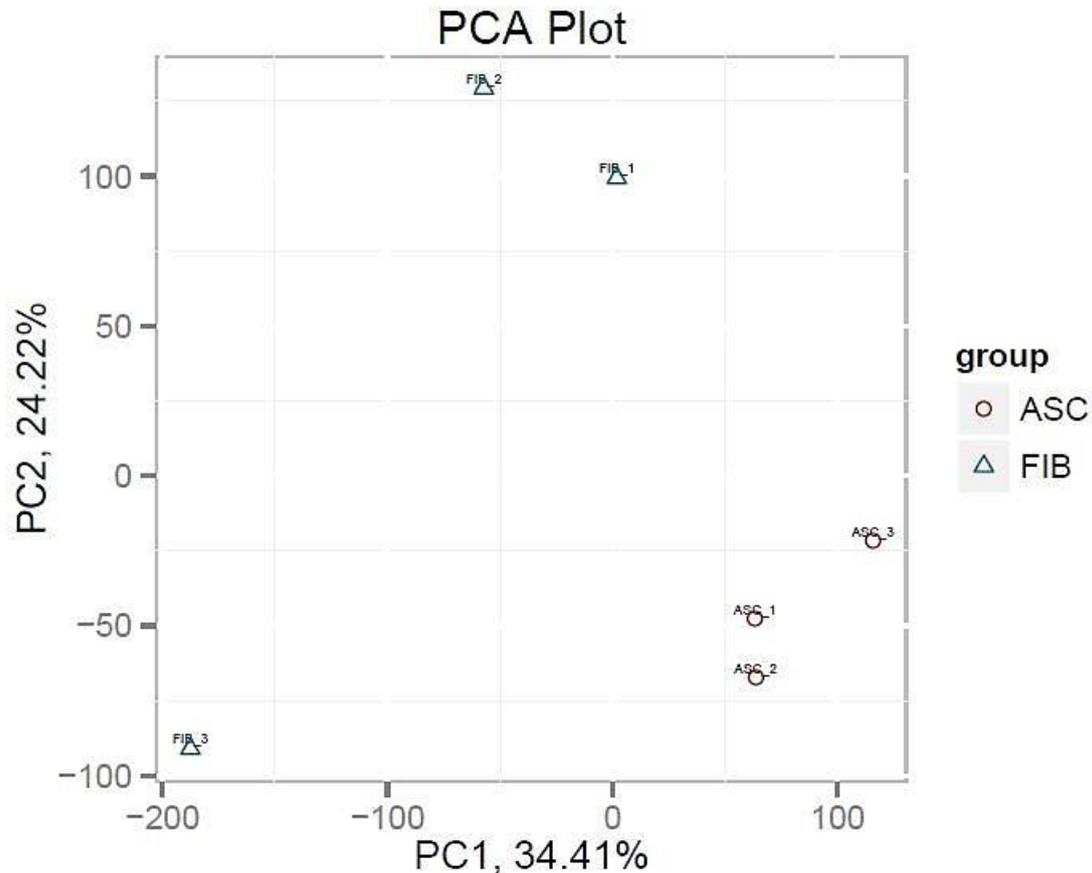
**Figura 40. Distribuição de FPKM entre hASC (ASC) e fibroblastos (FIB).** O eixo x indica o nome das amostras ASC e FIB e o eixo y indica o  $\log_{10}(\text{FPKM}+1)$ . Os dados estão representados em formato Box Plot indicando uma distribuição homogênea de FPKM entre os grupos analisados.

**Tabela 10. Número e porcentagens de genes exibindo níveis diferenciais de expressão, estimados usando fragmentos por quilobase de sequência de transcritos por milhões de pares de bases sequenciados (FPKM)**

<b>FPKM</b>	<b>ASC_1</b>	<b>ASC_2</b>	<b>ASC_3</b>	<b>FIB_1</b>	<b>FIB_2</b>	<b>FIB_3</b>
<b>0~1</b>	35778 (74,29%)	35773 (74,28%)	35590 (73,90%)	35384 (73,47%)	35425 (73,55%)	36678 (76,16%)
<b>1~3</b>	2405 (4,99%)	2388 (4,96%)	2350 (4,88%)	2315 (4,81%)	2283 (4,74%)	2472 (5,13%)
<b>3~15</b>	4535 (9,42%)	4575 (9,50%)	4567 (9,48%)	4512 (9,37%)	4344 (9,02%)	3951 (8,20%)
<b>15~60</b>	3661 (7,60%)	3671 (7,62%)	3914 (8,13%)	3932 (8,16%)	3870 (8,04%)	2971 (6,17%)
<b>&gt;60</b>	1783 (3,70%)	1755 (3,64%)	1741 (3,61%)	2019 (4,19%)	2240 (4,65%)	2090 (4,34%)

#### 4.4.1.4 A Análise de Componente Principal (PCA) destaca as diferenças e similaridades entre as réplicas biológicas

A Análise de Componente Principal é recomendada quando a principal preocupação do pesquisador é determinar, por meio de uma análise multivariada, os componentes principais que serão responsáveis pela variação máxima nos dados. A tarefa da PCA é identificar padrões na variação dos dados, destacando suas semelhanças e diferenças (SMITH, 2002). PC1 é o eixo que explica mais variabilidade entre as amostras incluídas no teste. PC2 é o segundo eixo que explica mais variabilidade entre os grupos analisados (JOLLIFFE & CADIMA, 2016). Na figura 41, pode-se observar que as réplicas biológicas das amostras de células-tronco formam um grupo distinto do grupo das réplicas biológicas de fibroblastos, com a amostra FIB\_3 mostrando-se mais distinta do restante das amostras. Os dois primeiros PCs (PC1 e PC2) representaram 34,41% e 24,22%, respectivamente, da variação total no conjunto de dados.

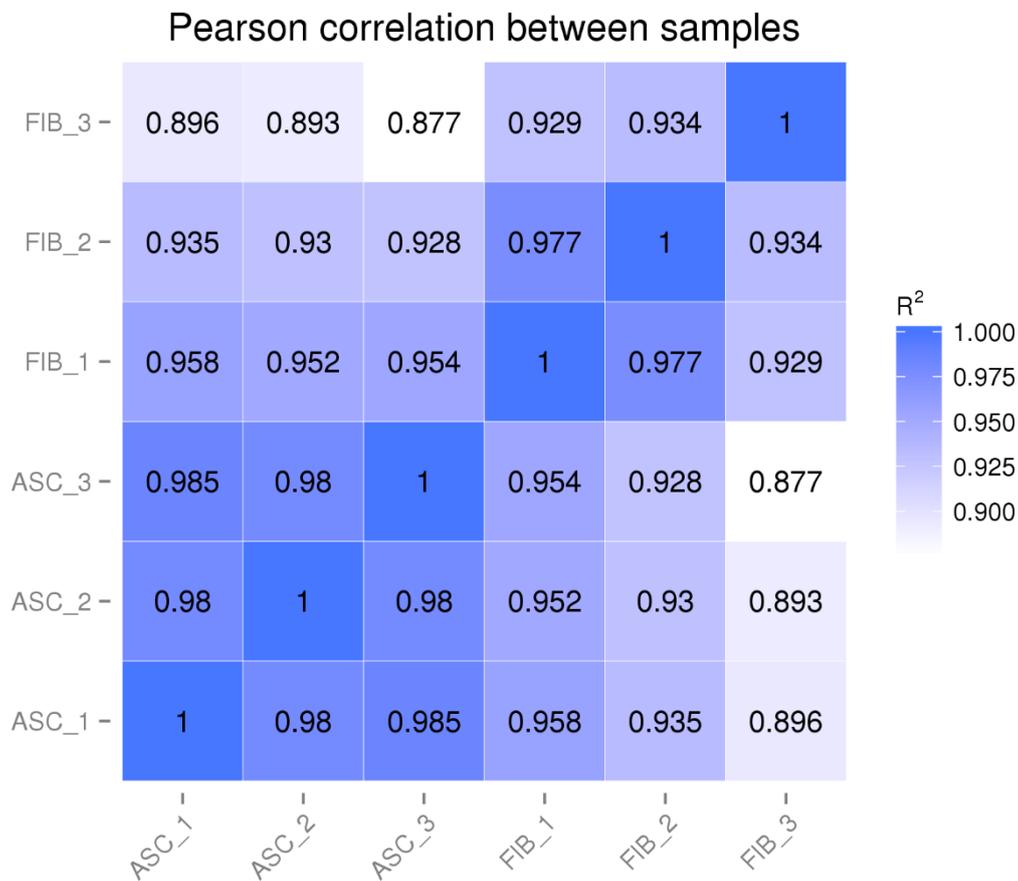


**Figura 41.** A Análise de Componente Principal (PCA) destaca as diferenças e similaridades entre as réplicas biológicas. As amostras de ASC formam um grupo independente do grupo dos fibroblastos (FIB). A amostra FIB\_3 apresenta-se como mais distinta das demais amostras analisadas. PC1= 34,41% e PC2= 24,22% indicam variabilidade entre as amostras analisadas.

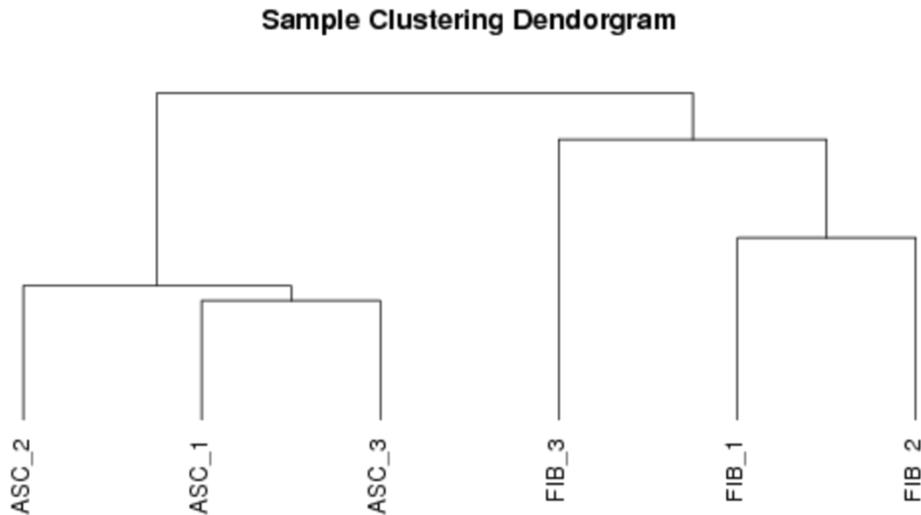
#### 4.4.1.5 A Correlação de Pearson mostrou similaridade entre as réplicas biológicas sequenciadas

As réplicas biológicas são necessárias para qualquer experimento, incluindo a tecnologia de RNA-Seq (HANSEN et al., 2003). As réplicas são importantes para dois objetivos principais: o primeiro é o de demonstrar que o experimento é reprodutível e o segundo é analisar a diferença de expressão gênica entre as amostras do mesmo grupo determinada através do cálculo do valor p-ajustado. A correlação entre as amostras é um importante indicador de avaliação para testar a confiabilidade do experimento. Quanto mais o coeficiente de correlação estiver próximo de 1, maior será a similaridade entre as amostras. O projeto ENCODE sugere que o quadrado do coeficiente de correlação de Pearson ( $R^2$ ) seja maior que 0,92 (sob condições ideais de experimento). No presente estudo, o  $R^2$  foi maior que 0,98 entre as réplicas de ASC e maior que 0,929 entre as

réplicas de FIB, indicando um alto índice de correlação entre as mesmas. (Figura 42). As amostras também foram agrupadas em um dendrograma de acordo com a similaridade. Pode-se observar que as amostras de células-tronco formam um clado independente das amostras de fibroblastos (Figura 43).



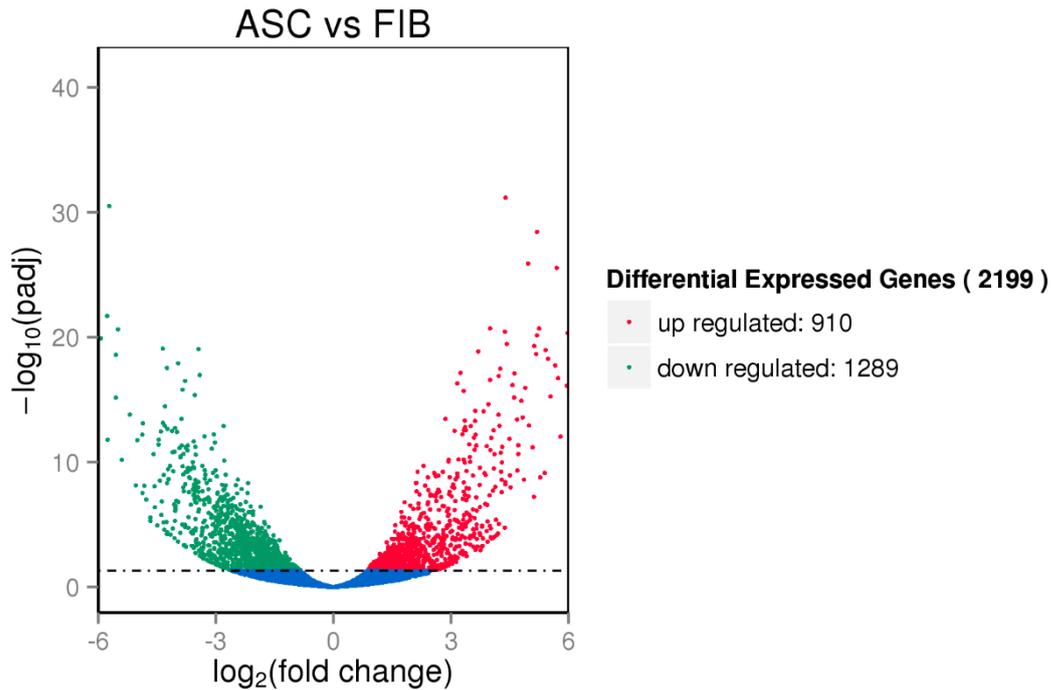
**Figura 42. O diagrama mostra a correlação de Pearson ( $R^2$ ) entre as réplicas biológicas de ASC e FIB.** As réplicas de ASC e FIB apresentaram um índice de correlação maior que 0,92. O menor valor de  $R^2$  obtido foi 0,877 entre as amostras FIB\_3 e ASC\_3 e o maior índice foi de 0,985 entre ASC\_1 E ASC\_3.



**Figura 43.** O dendrograma mostra as similaridades entre as réplicas biológicas de ASC e FIB. As réplicas de ASC formam um clado independente de FIB. As amostras de ASC\_1 e ASC\_3 apresentam mais similaridade em comparação com a amostra ASC\_2. As amostras FIB\_1 e FIB\_2 apresentam mais similaridade em comparação com a amostra FIB\_3.

#### 4.4.1.6 A análise de bioinformática mostrou mais de 2.000 genes diferencialmente expressos entre hASC e fibroblastos dérmicos

A contagem de *reads* foi utilizada para a análise de expressão diferencial de genes (GDEs) entre hASC e fibroblastos dérmicos humanos. Os dois grupos de células foram comparados utilizando o pacote DESeq 2 R (ANDERS & HUBER, 2010). Os p valores resultantes foram ajustados usando a abordagem de Benjamini e Hochberg para controlar a taxa de falsa descoberta (*False Discovery Rate* ou FDR). Uma visão geral dos genes diferencialmente expressos pode ser mostrada pelo diagrama de Volcano, onde o *threshold* (limiar de corte) dos GDEs foi estabelecido a partir do p-valor ajustado  $< 0,05$ . Quanto menor o p-valor ajustado, mais confiável é a significância da expressão diferencial dos genes entre os grupos. Aproximadamente 2.199 genes foram identificados no total e, entre eles, 910 genes são regulados pra cima (regulação positiva) e 1.289 regulados pra baixo (regulação negativa) em hASC (Figura 44).

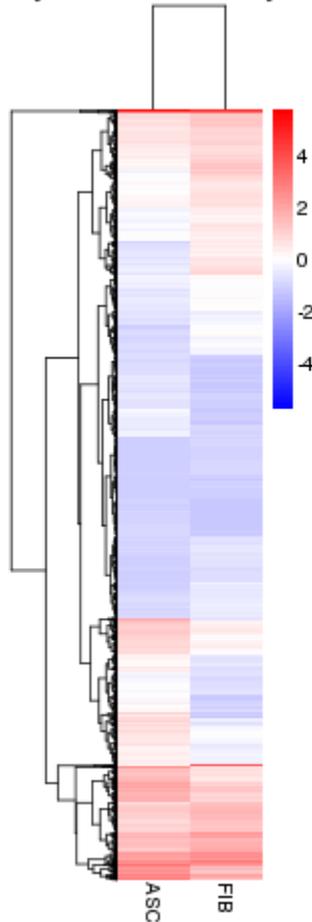


**Figura 44.** Os genes diferencialmente expressos (GDEs) entre hASC e fibroblastos foram analisados e plotados em um diagrama de Volcano. O eixo X representa vezes de aumento (*fold change*) da expressão dos genes detectada entre as duas células (escala log<sub>2</sub>). Já o eixo y mostra o p-valor ajustado entre os grupos (escala -log<sub>10</sub>). A linha tracejada indica o *threshold* de p-ajustado < 0,05. Em vermelho estão representados os genes com regulação positiva e em verde os genes com regulação negativa. Em azul, estão representados os genes que não possuem diferença de expressão entre as células.

#### 4.4.1.7 Os genes foram agrupados em conjuntos com padrão de expressão e função similares

Através do agrupamento de genes com padrão de expressão similar, funções desconhecidas de transcritos são reconhecidas, dado que os mesmos tipos de transcritos têm funções similares ou participam dos mesmos processos metabólicos ou vias celulares. A análise de agrupamento hierárquico foi realizada com o log<sub>10</sub> (FPKM + 1) proveniente da união de genes diferencialmente expressos das réplicas biológicas e comparados entre os dois grupos: hASC e fibroblastos. Na figura 45, as linhas representam os agrupamentos de genes, em azul estão representados os genes de baixa expressão e em vermelho, estão representados os genes com alta expressão. A escala de cores descendente do vermelho para o azul indicando log<sub>10</sub>(FPKM+1) do maior para o menor valor.

### Cluster analysis of differentially expressed genes



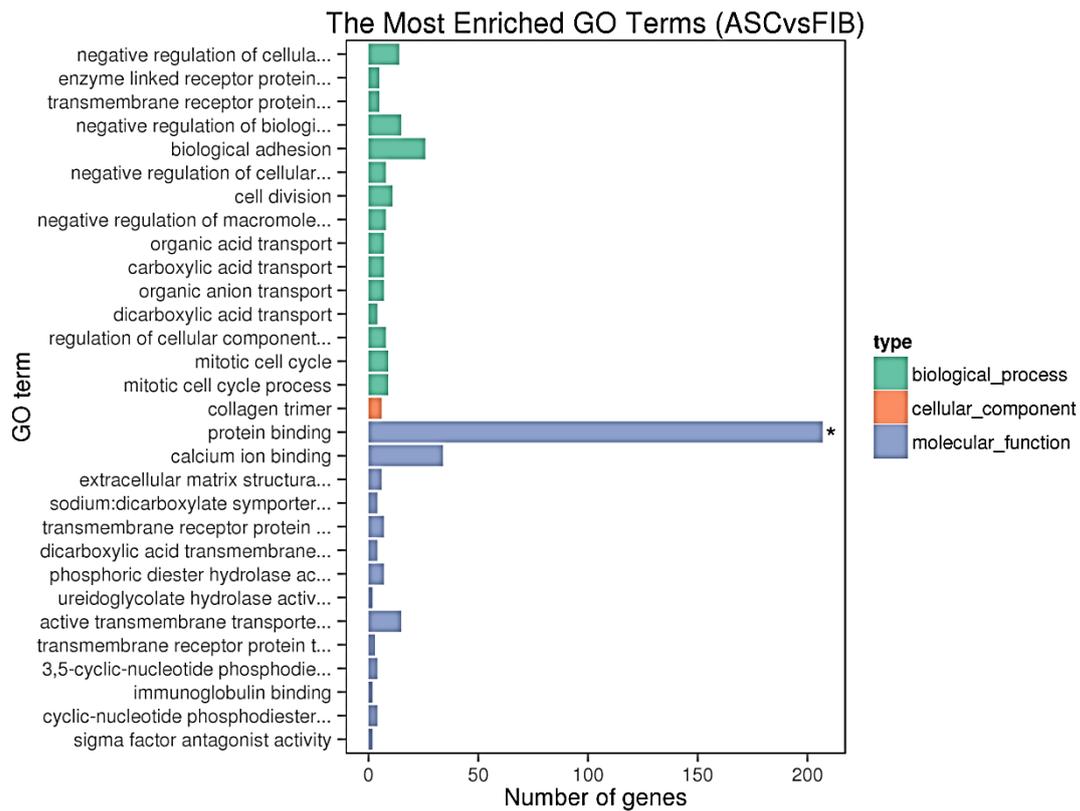
**Figura 45. Agrupamento hierárquico do tipo *heatmap* dos genes diferencialmente expressos.** Em azul estão representados os genes de baixa expressão e em vermelho, estão representados os genes com alta expressão. A escala de cores descendente do vermelho para o azul indica  $\log_{10}(\text{FPKM}+1)$  do maior para o menor valor.

#### 4.4.1.8 Os genes com regulação positiva e negativa em hASC foram classificados quanto à sua função utilizando *Gene Ontology* (GO)

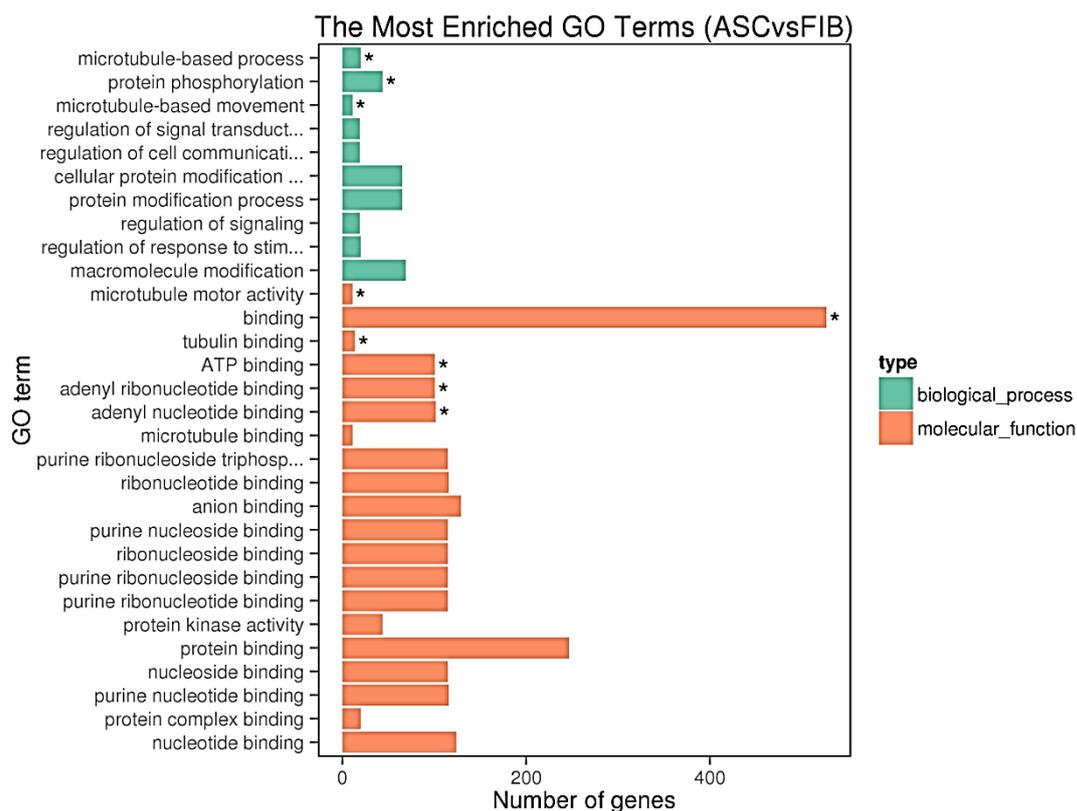
*Gene Ontology* é um sistema de classificação internacional padronizado que descreve a função do gene. Inclui genes classificados em três grupos principais: Componente Celular, Função Molecular e Processo Biológico. Os resultados da análise de enriquecimento GO são exibidos por meio de histogramas. O histograma exibe o número de genes que são significativamente enriquecidos em cada termo GO. Os 30 termos GO mais enriquecidos são exibidos nos gráficos.

Na Figura 46, observa-se que os genes com regulação positiva em hASC mais enriquecidos estão relacionados à função molecular, mais especificamente ligação de proteínas (\* $p < 0,05$ ). Já os genes com regulação negativa em hASC estão relacionados à

processos biológicos e função molecular, com os termos GO mais enriquecidos sendo aqueles relacionados aos microtúbulos (processos, movimentos e atividade), fosforilação de proteínas, ligação de ATP, adenil nucleotídeo e adenil ribonucleotídeo, ligação e ligação de tubulinas (\* $p < 0,05$ ) (Figura 47).



**Figura 46. Os 30 termos GO mais enriquecidos relacionados aos genes com regulação positiva em ASC versus FIB.** Em verde, estão representados os genes relacionados ao grupo Processo Biológico, em laranja estão destacados os genes pertencentes ao grupo Componente Celular e, em azul, os genes pertencentes à Função Molecular. \* $p$ -valor  $< 0,05$ ; indicando o termo GO mais enriquecido.

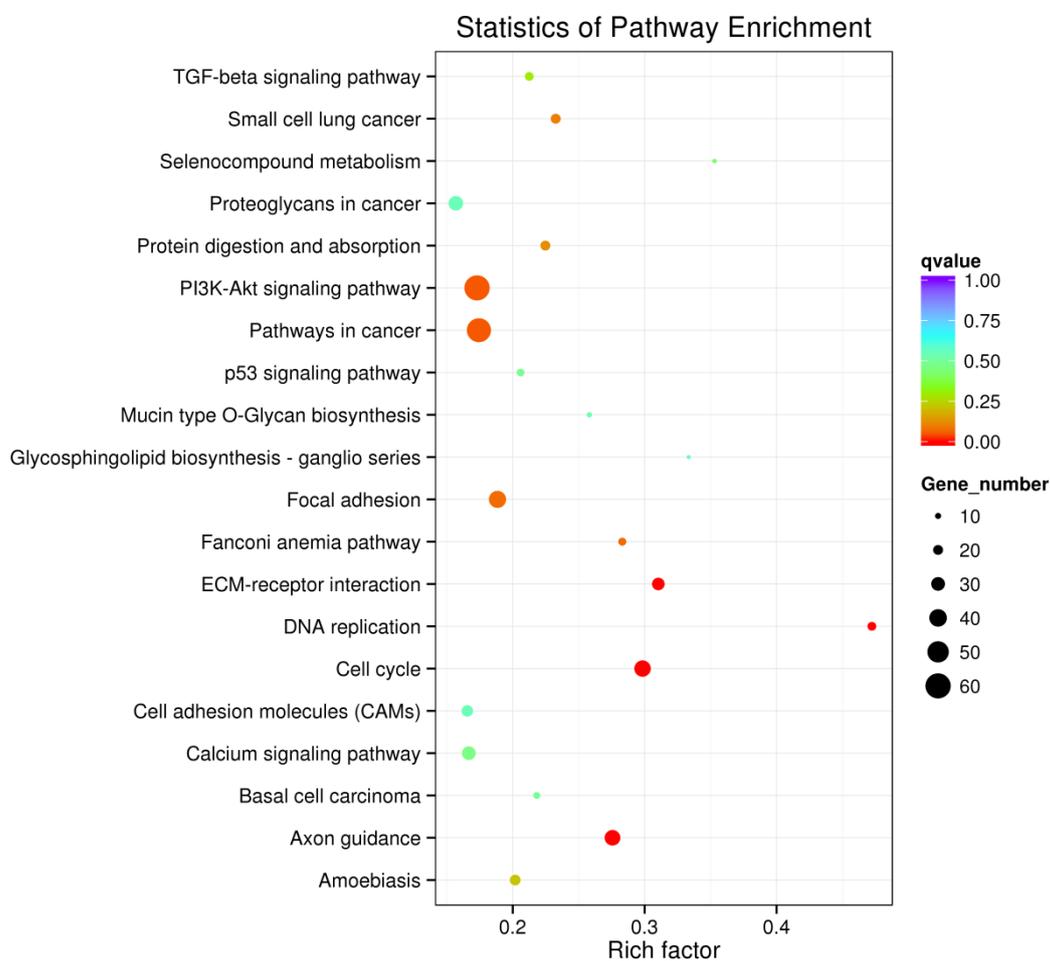


**Figura 47. Os 30 termos GO mais enriquecidos relacionados aos genes com regulação negativa em ASC versus FIB.** Em verde, estão representados os genes relacionados ao grupo Processo Biológico, em laranja estão destacados os genes pertencentes ao termo Função Molecular. \*p-valor < 0,05; indicando o termo GO mais enriquecido.

#### 4.4.1.9 Os genes diferencialmente expressos estão envolvidos em várias vias enriquecidas analisadas por KEGG

É possível identificar as vias em que os genes diferencialmente expressos estão envolvidos por meio da ferramenta *KEGG Pathway Enrichment Analysis*. KEGG (Enciclopédia de Kyoto de Genes e Genomes, <http://www.kegg.jp/>) é um importante recurso de banco de dados para análise de vias (KANEHISA et al., 2008), cuja significância é identificada pelo teste hipergeométrico. Os resultados podem ser demonstrados usando um gráfico do tipo *Scatterplot* e são avaliados pelos critérios: fator *Rich*, *Q-value* e número de genes de expressão diferencial envolvidos na via enriquecida. O fator *Rich* refere-se à razão entre o número de genes diferencialmente expressos na via e o número de todos os genes anotados na via. Quanto maior o fator *Rich*, mais significativo é o grau de enriquecimento. *Q-value* é o resultado após vários testes de hipóteses de p-valor, seu intervalo é de [0,1] e, quanto mais próximo de zero

estiver, mais significativo será o enriquecimento. O fator *Gene Number* está relacionado ao número absoluto de genes diferencialmente expressos encontrados nas vias (de 10 a 60). As 20 vias mais enriquecidas dos GDEs identificados e de maior fator *Rich* estão relacionadas à interação entre receptor e matriz extracelular, replicação do DNA, ciclo celular e orientação de axônio. As vias em câncer e vias de sinalização PI3K-AKT apresentaram um grau significativo de enriquecimento com maior número de genes, porém com menor valor do fator *Rich*. As vias enriquecidas em adesão focal seguiram a mesma tendência, porém com menor número de genes, assim como as vias envolvidas em digestão de proteínas e absorção, anemia de Fanconi e câncer de pulmão de células pequenas (Figura 48).



**Figura 48. Scatterplots do enriquecimento de vias avaliados por KEGG.** O eixo vertical mostra os termos das vias, o eixo horizontal representa o fator *Rich* e o tamanho dos nódulos representa o número absoluto de genes com expressão diferencial. Na via metabólica analisada por KEGG, os nódulos vermelhos e laranjas representam os genes de regulação positiva e os nódulos azuis e verdes representam genes de regulação negativa em hASC comparados aos fibroblastos.

#### 4.4.2 Validação *in vitro* de genes diferencialmente expressos de acordo com resultados obtidos no RNA-Seq

##### 4.4.2.1 Dez genes foram validados como regulados positivamente em hASC quando comparados aos fibroblastos dérmicos humanos

A partir da quantificação da expressão diferencial dos genes provenientes de quatro amostras de hASC e fibroblastos dérmicos, utilizando-se RT-qPCR, observou-se que dez deles apresentaram regulação positiva em hASC quando comparados aos fibroblastos, confirmando os resultados obtidos pela análise de RNA-Seq. A média e o erro padrão (Log 2) em hASC assim como os gráficos da quantificação relativa de cada gene podem ser visualizados na tabela 11 e na figura 49.

**Tabela 11. Genes com regulação positiva em hASC avaliados por RT-qPCR**

Gene	Média da Quantificação Relativa (Log 2) em hASC	Erro Padrão
<i>COL11A1</i>	7,14	±1,35
<i>CD36</i>	8,65	±1,63
<i>TNNT3</i>	7,86	±0,83
<i>ALPL</i>	6,66	±0,91
<i>TINAGL1</i>	6,52	±0,66
<i>SCRG1</i>	5,91	±0,72
<i>DMD</i>	2,26	±0,68
<i>PDE1C</i>	3,68	±0,31
<i>ZFPM2</i>	1,38	±0,25
<i>EBF2</i>	4,24	±0,65

Média e erro padrão calculados utilizando-se o *software* Graph Pad Prism 5, n=4.

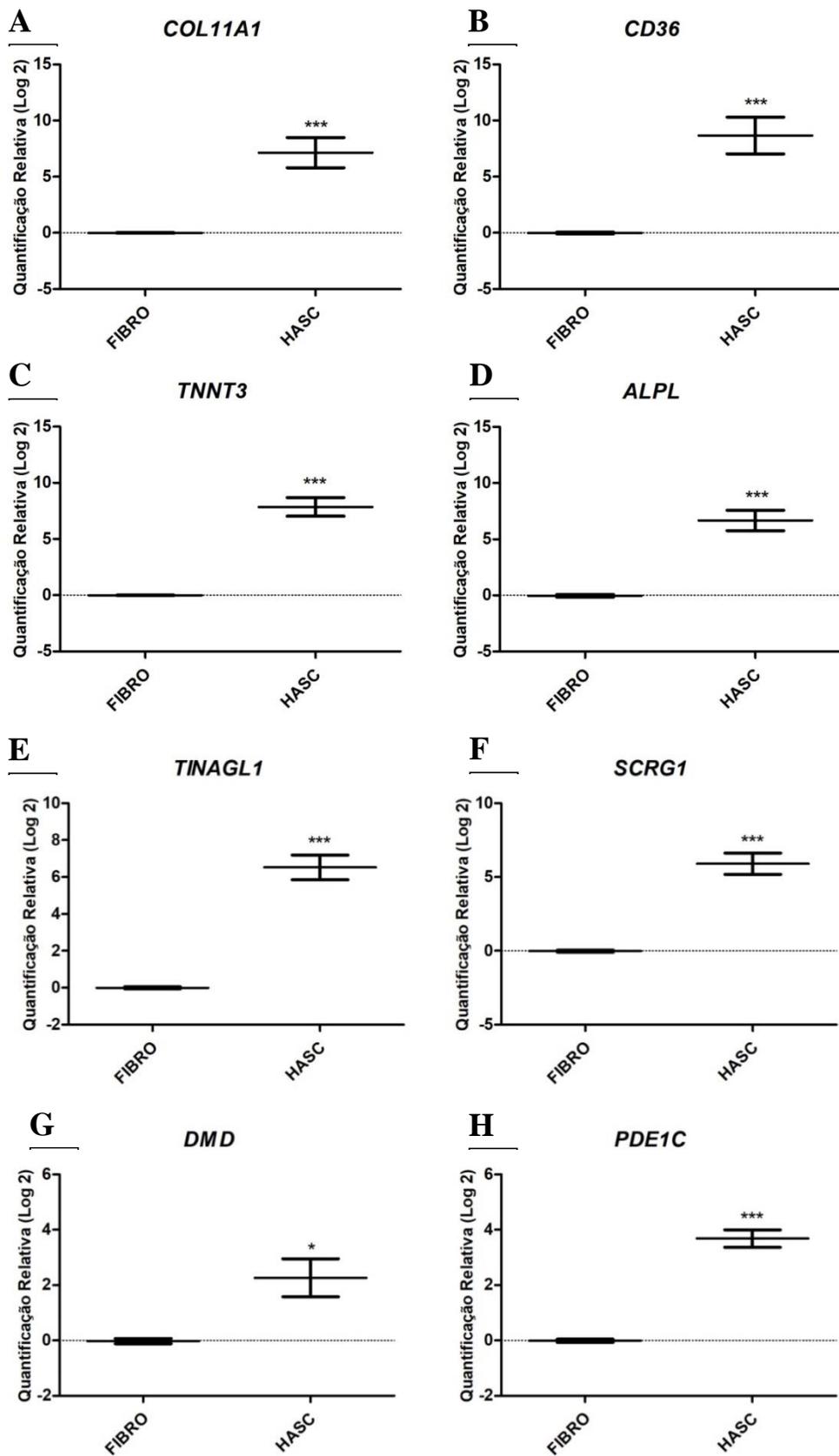
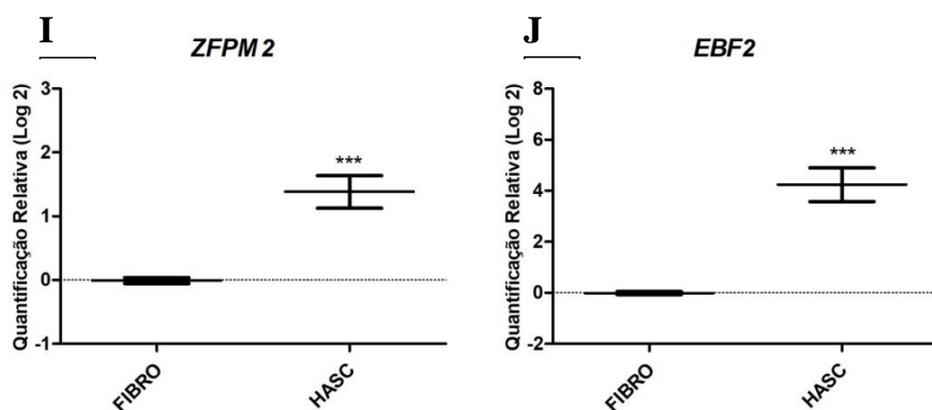


Figura 49. Quantificação da expressão relativa dos genes (Log 2) em hASC comparada aos fibroblastos dérmicos humanos (Fibro).



**Figura 49. (Continuação) Quantificação da expressão relativa dos genes (Log 2) em hASC comparada aos fibroblastos dérmicos humanos (Fibro).** Os genes *COL11A1* (A), *CD36* (B), *TNNT3* (C), *ALPL* (D), *TINAGL1* (E), *SCRG1* (F), *DMD* (G), *PDE1C* (H), *ZFPM2* (I) e *EBF2* (J) apresentaram regulação positiva em hASC quando comparados aos fibroblastos nas amostras avaliadas por RT-qPCR. Os dados foram comparados utilizando-se o *software* Graph Pad Prism. Unpaired t-test com correção de Welch. \*\*\* $p < 0,001$ , \* $p < 0,05$ ,  $n = 4$ .

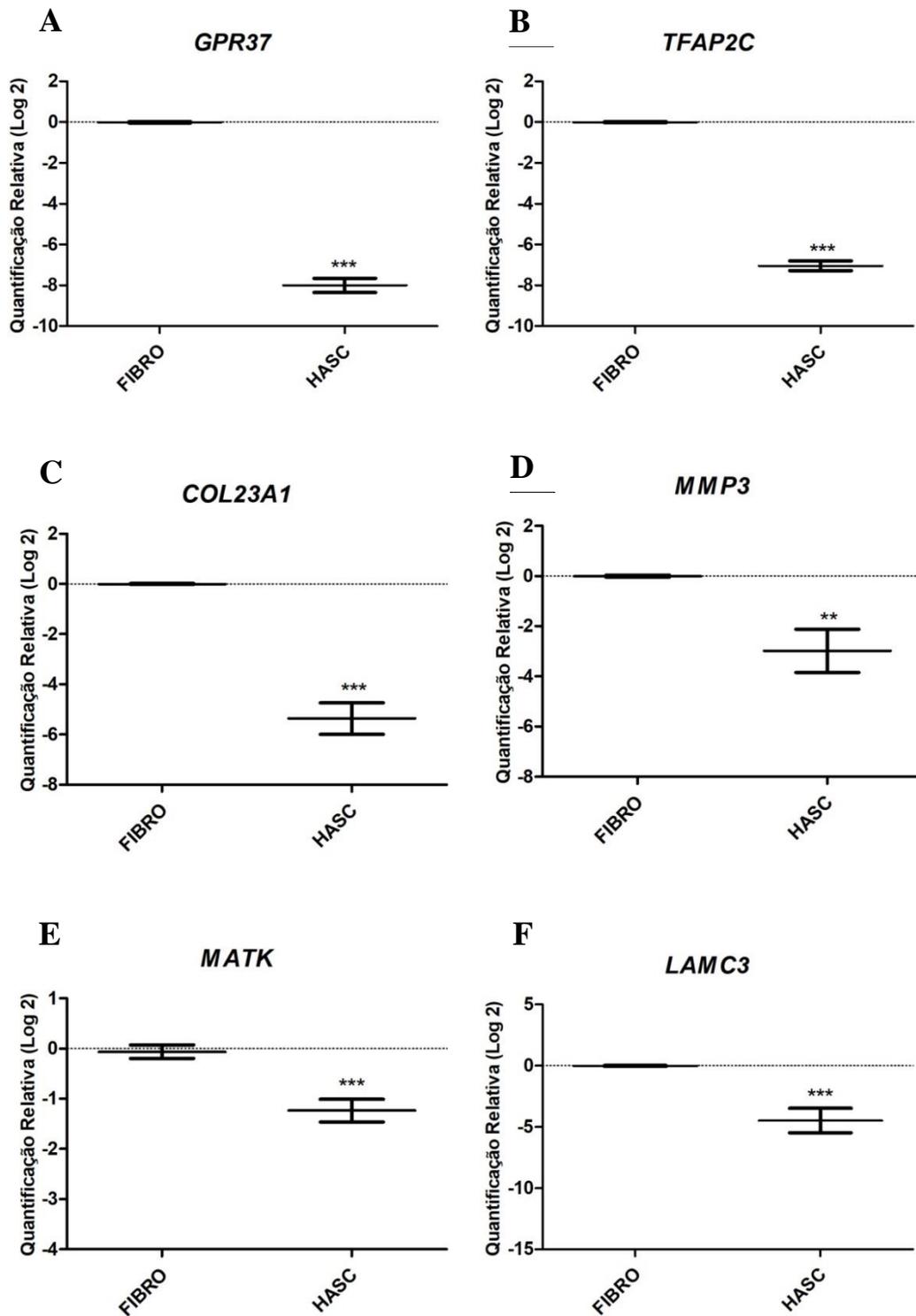
#### 4.4.2.2 Seis genes foram validados com regulação negativa em hASC quando comparados com fibroblastos dérmicos humanos

A partir da quantificação da expressão diferencial dos genes provenientes de quatro amostras de hASC e fibroblastos dérmicos, utilizando-se RT-qPCR, observou-se que seis deles apresentaram regulação negativa em hASC quando comparados aos fibroblastos, validando os resultados obtidos pela análise de RNA-Seq. A média e o erro padrão (Log 2) em hASC assim como os gráficos da quantificação relativa de cada gene podem ser visualizados na tabela 12 e na figura 50.

**Tabela 12. Genes com regulação negativa em hASC avaliados por RT-qPCR.**

Gene	Média da Quantificação Relativa (Log 2)	Erro Padrão
<i>GPR37</i>	-7,99	$\pm 0,34$
<i>TFAP2C</i>	-7,04	$\pm 0,23$
<i>COL23A1</i>	-5,36	$\pm 0,62$
<i>MMP3</i>	-2,98	$\pm 0,85$
<i>MATK</i>	-1,23	$\pm 0,22$
<i>LAMC3</i>	-4,47	$\pm 0,99$

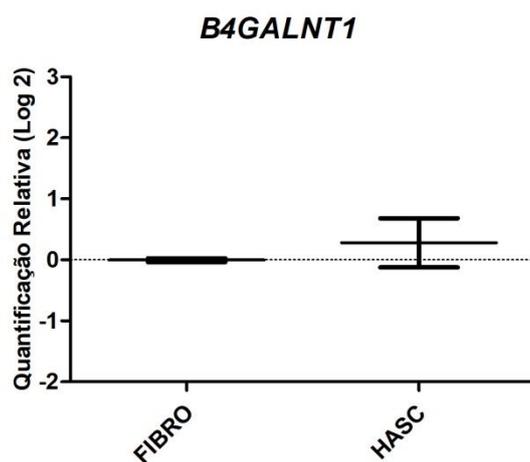
Média e erro padrão calculados utilizando-se o *software* Graph Pad Prism 5,  $n = 4$ .



**Figura 50.** Quantificação da expressão relativa dos genes (Log 2) em hASC comparada aos fibroblastos dérmicos humanos (Fibro). Os genes *GPR37* (A), *TFAP2C* (B), *COL23A1* (C), *MMP3* (D), *MATK* (E) e *LAMC3* (F) apresentaram regulação negativa em hASC quando comparados aos fibroblastos nas amostras avaliadas por RT-qPCR. Os dados foram comparados utilizando-se o *software* Graph Pad Prism. Unpaired t-test com correção de Welch. \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ ,  $n = 4$ .

4.4.2.3 O gene *B4GALNT1* não apresentou expressão diferencial nas amostras de hASC e fibroblastos dérmicos avaliadas

Entre todos os genes avaliados, o único que não apresentou diferença de expressão entre hASC e fibroblastos dérmicos foi o *B4GALNT1*. A média, o erro padrão e a representação gráfica da quantificação relativa podem ser visualizados na figura 51.



**Figura 51. Quantificação da expressão relativa (Log 2) do gene *B4GALNT1* em hASC comparada aos fibroblastos dérmicos humanos (Fibro).** Média da quantificação relativa em hASC = 0,27 e erro padrão =  $\pm 0,40$ , determinados por análise estatística. Os dados foram comparados utilizando-se o *software* Graph Pad Prism. Unpaired t-test com correção de Welch, n=4. Não foi observada diferença entre os grupos.

## 4.5 DISCUSSÃO

No Capítulo 3, investigou-se a possibilidade de utilização do RNA-Seq e posterior validação por PCR quantitativa em tempo real para identificação das principais diferenças entre hASC e fibroblastos dérmicos quanto à expressão gênica. As amostras de RNA utilizadas no RNA-Seq foram extraídas de pacientes saudáveis, distintos entre si, com o objetivo de se obter uma amostra humana heterogênea. Embora em termos computacionais a análise de amostras heterogêneas seja complexa, hipotetizamos que os resultados da comparação entre as células poderiam ser extrapolados para hASC e fibroblastos dérmicos humanos independentemente do *background* genético dos indivíduos.

Na Análise de Componente Principal (PCA), ao se comparar as réplicas de hASC e fibroblastos, foram identificados padrões de similaridades e diferenças quanto aos transcritos mapeados. As amostras de RNA das células-tronco apresentaram maior similaridade entre si, enquanto que, no grupo dos fibroblastos, a amostra FIB\_3 mostrou-se distinta das demais. Essa observação pode ser justificada pelas variações de lote, também conhecidas como *batch effect*, as quais são comumente observadas quando amostras biológicas são analisadas por RNA-Seq (LIU & MARKATOU, 2016). JÄÄGER e colaboradores (2012) também observaram que amostras de células-tronco derivadas de tecido adiposo e fibroblastos dérmicos formavam dois agrupamentos distintos, mostrando que o perfil do transcriptoma é característico de cada tipo celular, independentemente das particularidades dos indivíduos doadores.

Quanto à estimativa da correlação de Pearson ( $R^2$ ) entre as amostras, observou-se que a similaridade entre as réplicas biológicas de hASC e fibroblastos (> 92%) foi suficiente para uma comparação confiável entre os dois tipos celulares. O dendograma também mostrou que os dois tipos celulares formam agrupamentos distintos conforme os transcritos mapeados, refletindo uma maior similaridade entre as réplicas biológicas pertencentes ao mesmo tipo de célula. É importante destacar que o processo de preparação e análise das amostras desse estudo seguiu as recomendações do projeto ENCODE (2016), desde a seleção das replicatas biológicas até o processamento dos dados por bioinformática, garantindo, assim, a confiabilidade dos dados obtidos.

Como foi observado nesse estudo, a maioria das *reads* apresentaram alta qualidade, foram mapeadas em regiões de exóons e a proporção das mesmas foi similar entre hASC e fibroblastos quando normalizada pelo método FPKM. Na análise de

expressão gênica, foram identificados 2.199 genes diferencialmente expressos entre as células, sendo 1.289 com regulação negativa e 910 com regulação positiva em hASC. Esse número foi determinado a partir de um p-valor ajustado de 0,05 estabelecido como ponto de corte. Com o objetivo de eliminar os genes falso-positivos da lista, a taxa de falsa descoberta (FDR) foi determinada em 5%. Posteriormente, os grupos de genes foram organizados em um *heatmap* e observou-se um perfil de expressão distinto entre as amostras em algumas regiões do mapa. JÄÄGER e colaboradores (2012), analisando cinco replicatas biológicas de hASC e seis replicatas de fibroblastos indiferenciados obtiveram 178 genes diferencialmente expressos, sendo 59 com alta expressão e 119 genes com baixa expressão nas células-tronco, com uma FDR de 5%. Ao compararmos nossa lista com a dos autores, foram encontrados 26 genes em comum positivamente regulados em hASC e 59 genes em comum negativamente regulados em hASC, totalizando uma identidade com 47,75% da lista de genes gerada nesse estudo. Levando-se em consideração os genes em comum, validamos em bancada *MMP3* (regulação negativa) e *COL1A1* (regulação positiva) que, de acordo com nossas análises, estavam entre os genes com p-valor ajustado mais negativo. O restante dos genes em comum, na lista de GDEs gerada por nossas análises, apresentou valores de p-ajustado maiores que o p-valor mínimo estabelecido para validação e, portanto, não foram selecionados para os testes *in vitro*. ZYCH e colaboradores (2014) encontraram 1.547 genes diferencialmente expressos entre hASC e fibroblastos associados à maquinaria de tradução do mRNA, a partir de uma FDR de 0,1%. Em uma comparação entre a lista de GDEs encontrados no presente estudo e a dos autores, foi encontrado um total de 703 genes em comum. Entretanto, na presente pesquisa, avaliamos o RNA total das células, incluindo aqueles não associados à maquinaria de tradução.

Com o objetivo de se investigar as funções dos genes diferencialmente expressos no metabolismo dessas células, foram utilizadas as ferramentas GO e KEGG. Nas análises de GO, as diferenças mais significativas encontradas entre hASC e fibroblastos foram quanto à expressão de genes ligados a funções biológicas e moleculares, como por exemplo: ligação e fosforilação de proteínas, adesão celular, movimento e atividade de microtúbulos, ligação de tubulinas, ATP, adenil nucleotídeo e ribonucleotídeo. Esses resultados podem ser relacionados às diferenças do metabolismo energético celular, ao comportamento distinto do citoesqueleto dessas células assim como às diferenças nas interações que as mesmas estabelecem com o ambiente extracelular. O grupo de pesquisa liderado por JÄÄGER (2012) identificou perfis de expressão gênica distintos

entre hASC e fibroblastos, principalmente devido a diferenças na expressão de genes envolvidos na regulação do ciclo celular, processos de desenvolvimento e também na organização estrutural das células. Outras análises de GO coordenadas por ZYCH e colaboradores (2014) identificaram termos relacionados à adesão celular, sinalização, ciclo celular, proliferação e processos de desenvolvimento celulares que distinguiram ambas as células. No presente estudo, as análises de vias enriquecidas por KEGG indicaram enriquecimento de genes envolvidos em processos importantes relacionados à replicação do DNA, vias em câncer, vias de sinalização PI3K-AKT, orientação de axônio, adesão e ciclo celular e interação receptor-matriz extracelular. No estudo liderado por CHO (2017), em análises de KEGG, vias enriquecidas em câncer, na sinalização PI3K-AKT, na adesão focal e na interação receptor-matriz extracelular também foram encontradas em células-tronco derivadas do tecido adiposo, porém reguladas para baixo em comparação às células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea. Entretanto, essas vias não foram comparadas a partir dos fibroblastos como condição de referência, conforme abordado nessa análise. É importante destacar que nossos resultados foram similares aos encontrados pelos autores citados, apesar de que a classificação mostrada nesse estudo aborda as 20 vias gerais mais enriquecidas, sem detalhamento de uma via em específico. Além disso, os genes das vias mais enriquecidas também podem desempenhar funções e participarem de vias alternativas, além das descritas nos gráficos. Hipotetiza-se que, apesar de hASC e fibroblastos serem muito similares fenotipicamente, uma vez que apresentam a mesma origem mesenquimal, a regulação fina do metabolismo e da arquitetura dessas células é bastante individualizada. Em conjunto, essas observações mostram que hASC e fibroblastos apresentam diferenças significativas em relação à expressão gênica que culminam em dinâmicas e funcionalidades biológicas distintas, como por exemplo, na regulação da divisão celular, estrutura do citoesqueleto e das interações com a matriz extracelular. A partir da lista contendo mais de 2.000 genes, pode-se explorar e identificar aqueles mais importantes não só para a compreensão da biologia dessas células na pesquisa básica, mas também na sua futura identificação e aplicação das células-tronco na medicina regenerativa.

A partir da lista de genes diferencialmente expressos obtidos por meio do sequenciamento de RNA, um conjunto de 17 genes foi selecionado para validação. Sabendo-se que há uma grande variação de expressão gênica na população optou-se por utilizar amostras de células do mesmo indivíduo nos ensaios de validação *in vitro*.

O valor referente à quantificação relativa da expressão do gene *COL11A1* (expresso em escala logarítmica) em hASC quando comparado aos fibroblastos foi igual a 7,14 ( $\pm 1,35$ ). O gene *COL11A1* codifica para a cadeia  $\alpha 1$  do protocólágeno 11A1 e do colágeno maduro 11A1, um colágeno fibrilar extracelular. Em condições normais, este gene e seus derivados são principalmente expressos por condrócitos e células-tronco mesenquimais, bem como por osteoblastos. Células epiteliais normais e fibroblastos quiescentes de diversas localizações não os expressam. Tumores derivados do mesênquima e condições relacionadas, como esclerodermia e queloides, são positivos para a expressão de *COL11A1* / (pró) colágeno 11A1, assim como gliomas / glioblastomas humanos de alto grau. Recentemente, *COL11A1* foi considerado um marcador importante de células estromais associadas à progressão tumoral (VÁZQUEZ-VILLA et al., 2015). Nossos achados mostraram que a expressão de *COL11A1* ocorre em fibroblastos dérmicos, porém é maior em células-tronco derivadas de tecido adiposo, confirmando que essa expressão é marcante em células-tronco mesenquimais adultas. Além disso, JÄÄGER e colaboradores (2012) também encontraram esse gene com elevada expressão em hASC quando comparado aos fibroblastos em análises de sequenciamento de RNA, o que corrobora com os resultados de RNA-Seq e posterior validação *in vitro* realizada no presente estudo.

O gene *CD36* também foi validado como positivamente regulado em hASC com o maior valor de quantificação relativa comparado aos fibroblastos (média 8,65  $\pm 1,63$ ). GAO e colaboradores (2017) identificaram a proteína de superfície CD36 como um marcador de células-tronco derivadas de tecido adiposo com maior propensão de se diferenciarem em células progenitoras de adipócitos. Segundo os autores, células que apresentam marcação positiva para CD36 apresentam maior facilidade na captação de lipídeos e armazenamento de triglicerídeos, facilitando a diferenciação terminal. Além disso, a expressão de CD36 *in vivo* está relacionada à alta capacidade adipogênica dos depósitos de gordura corporal. Esse marcador também está presente nas recomendações da Sociedade Internacional de Terapia Celular para identificação de células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo e em outros trabalhos que estudaram marcadores de membrana importantes para identificação de células-tronco mesenquimais (ROJEWSKI et al., 2008; BOURIN et al., 2013; WETZIG et al., 2013). Portanto, nossos achados corroboram que esse é um importante marcador de membrana, verificado por ensaios de RT-qPCR e/ou citometria de fluxo, para confirmação do fenótipo tronco-mesenquimal em hASC.

De acordo com os resultados obtidos nesse estudo, outro marcador com regulação positiva em hASC foi o gene *TNNT3* (média  $7,86 \pm 0,83$ ). Esse gene codifica para uma forma de proteína denominada troponina T. Essa proteína é encontrada no músculo esquelético e está diretamente envolvida na contração muscular (STEFANCSIK et al., 2003). Em um estudo desenvolvido por um grupo de pesquisadores liderado por MAHMOOD (2010), células-tronco embrionárias humanas foram induzidas para diferenciarem-se em células mesenquimais progenitoras. O gene *TNNT3*, juntamente com outras troponinas, aparece regulado para cima após incubação com indutores, confirmando a diferenciação mesodérmica e miogênica. Outro estudo utilizando exossomos de células musculares humanas estimulou a miogênese em hASC e o gene *TNNT3* foi positivamente regulado após incubação com meio indutor contendo vesículas extracelulares (CHOI et al., 2016). Provavelmente esse gene apresenta regulação positiva em hASC porque essas células são capazes de diferenciarem-se em células da linhagem miogênica (ZUK, 2013) e, ao contrário das células-tronco, os fibroblastos dérmicos não possuem tal propriedade.

A fosfatase alcalina é uma enzima ligada à membrana que ocorre em quase todos os organismos vivos. É marcadora tradicional de células-tronco pluripotentes, nas quais é altamente expressa (SINGH et al., 2012; STEFKOVÁ et al., 2015), está presente em células estromais de tecido adiposo humano (ZANNETINO et al., 2007), além de estar presente em várias isoformas no organismo de um indivíduo adulto (STEFKOVÁ et al., 2015). A maioria dos trabalhos publicados destacou a presença da proteína fosfatase alcalina e sua atividade por ensaios enzimáticos, colorimétricos e citometria de fluxo. Em nossos ensaios, foi possível observar que as hASC também apresentaram uma elevada atividade dessa fosfatase, confirmado pelo ensaio colorimétrico de BCIP-NBT (vide Capítulo 1). Ao verificar os níveis de expressão gênica para *ALPL* por RT-qPCR, observa-se que ocorre também uma expressão significativamente aumentada de *ALPL* em hASC quando comparada aos fibroblastos dérmicos (média  $6,66 \pm 0,91$ ). Assim, é importante ressaltar a necessidade de se verificar tanto a atividade da enzima nessas células quanto os níveis de expressão do mRNA codificante para confirmação da pureza das culturas de células-tronco derivadas de tecido adiposo.

O gene *TINAGLI* codifica para uma proteína de matriz celular que interage tanto com outras proteínas estruturais da matriz quanto com receptores de superfície celular e está envolvido no processo de desenvolvimento do embrião pós-implantação em camundongos (IGARASHI et al., 2009). Em humanos, esse gene codifica para uma

glicoproteína de matriz extracelular que interage com lamininas, estando associada a adesão celular e à progressão tumoral (XIONG & XU, 2016). Análises de RNA-Seq indicam que esse gene está regulado positivamente em hASC Sca1<sup>high</sup> (*Stem Cell Antigen 1*) positivas presentes no estroma do tecido adiposo (TOKUNAGA et al., 2014). De maneira similar, as análises de RT-qPCR feitas pelo nosso grupo também indicaram uma expressão relativa significativamente maior de *TINAGLI* em hASC quando comparada aos fibroblastos com média igual a 6,52 ( $\pm 0,66$ ).

Células-tronco mesenquimais humanas (MSC) remodelam ou regeneram diversos tecidos por meio de vários mecanismos distintos. Um estudo desenvolvido por AOMATSU e colaboradores (2014) demonstrou que células-tronco mesenquimais derivadas de medula óssea (hMSC) secretam a proteína SCRG1 e seu receptor BST1, e estes atuam como reguladores positivos das propriedades mesenquimais. Os autores ressaltaram que ocorreu um decréscimo na expressão dos genes codificantes para essas proteínas e na secreção das mesmas durante a diferenciação osteogênica das hMSC. Isso mostra a importância de ambos os fatores para manutenção do estado indiferenciado das células. De fato, foi demonstrado que o eixo SCRG1/ BST1 preservou o potencial de autorrenovação e a expressão de marcadores de células-tronco como CD90, CD105, CD7, CD146 e Stro-1. De forma interessante, foi observado também que o eixo SCRG1/BST1 estimulou a atividade migratória de hMSC dependente da ativação das vias FAK/PI3K, mesmo após expansão *ex vivo* das células. ZYCH e colaboradores (2014) também validaram a expressão de *SCRG1* em células-tronco derivadas de tecido adiposo por análises de PCR quantitativa em tempo real, observando uma especificidade de expressão em relação aos fibroblastos. Portanto, a partir da regulação positiva do gene *SCRG1* observada em hASC (média 5,91 $\pm$ 0,72) nesse estudo, pode-se levantar a hipótese de que essa proteína é importante para a manutenção das propriedades de células-tronco mesenquimais.

O gene *DMD* codifica para distrofina, uma proteína extracelular que conecta o citoesqueleto de uma fibra muscular à matriz extracelular circundante por meio da membrana celular. A deficiência dessa proteína foi estabelecida como uma das principais causas de miopatias definidas coletivamente como distrofia muscular, sendo uma doença bem caracterizada a Distrofia Muscular de Duchenne. Estudos observaram a expressão de mRNA codificante e da proteína distrofina em hASC após indução com meio miogênico e co-cultura com mioblastos (FORCALES, 2015). A expressão desse gene é importante no processo de diferenciação miogênica e comprova a utilidade de

hASC para a terapia celular (ZUK, 2013). De acordo com nossos resultados, comprovados por RT- qPCR, o gene *DMD* também está regulado pra cima em hASC (média  $2,26 \pm 0,68$ ), quando essas células são comparadas aos fibroblastos.

Um estudo recente destacou o gene *PDE1C*, que codifica para a proteína fosfodiesterase 1C, como um fator envolvido na modulação epigenética da proliferação e migração de hASC. Um estudo recente conduzido por SHEN e colaboradores (2018) demonstrou que a enzima histona desmetilase JMJD6 exerce uma função fundamental na regulação da proliferação e migração de hASC. Ela atua removendo H4R3me2a nas regiões promotoras de *PDE1C* e suprimindo a expressão dessa enzima. *PDE1C* parece estar diretamente associado com uma maior capacidade motora e proliferativa de hASC, visto que a depleção de JMJD6 em hASC levou a um aumento na expressão do gene *PDE1C* e a um decréscimo nos níveis de cAMP e cGMP nas células. Esse aumento na proliferação e migração foi revertido pelo tratamento com inibidores de *PDE1C*, sugerindo que JMJD6 atenua os dois processos em hASC via regulação epigenética e que a expressão de *PDE1C* é modulada por essa histona desmetilase. Dessa forma, destaca-se mais um gene com regulação positiva em hASC (média  $3,68 \pm 0,31$ ) validado em bancada pelo nosso grupo, cuja função está relacionada aos processos cruciais de renovação e migração da população de células-tronco derivadas de tecido adiposo.

Quanto ao fator de transcrição *ZFPM2*, sabe-se que este é expresso no coração de embriões e adultos, juntamente com *FOG2* (CONTA & BREITBART, 2010). Esse fator também foi encontrado em células embrionárias de camundongos (ES) induzidas para diferenciação neural. *ZFPM2* e outros seis genes tiveram a expressão marcadamente induzida durante a diferenciação (BERNSTEIN et al., 2006). Recentemente, um trabalho com células-tronco derivadas de tecido adiposo humano mostrou que a superexpressão exógena de sete fatores de transcrição, entre eles *ZFPM2*, foi responsável pela reprogramação dessas células em cardiomiócitos (WYSTRYCHOWSKI et al., 2016). No presente estudo, houve diferença significativa na expressão desse marcador em hASC, porém o valor do *fold change* não foi tão elevado quanto para os demais genes (média  $1,38 \pm 0,25$ ). Logo, apesar de estar envolvido em funções de diferenciação, não foi observada uma expressão marcadamente positiva em células hASC indiferenciadas quando comparadas aos fibroblastos.

O gene *EBF2* codifica o fator de transcrição *early-B cell fator 2* que é seletivamente expresso em células precursoras adipogênicas de gordura marrom e

células-tronco mesenquimais derivadas de medula óssea. WANG e colaboradores (2014) trabalhando com camundongos, isolaram e determinaram o perfil molecular de células embrionárias pré-adiposas de gordura marrom *EBF2* positivas. Eles demonstraram que esse fator é o mais importante para a regulação de genes envolvidos na diferenciação em células de gordura. Foi constatado que a perda de *EBF2* em células pré-adiposas marrons reduziu os níveis de expressão dos genes que fazem parte da assinatura molecular dessas células, enquanto a expressão induzida de *EBF2* em mioblastos ativou genes específicos de células pré-adiposas marrons. Outro grupo de pesquisa (QIAN et al., 2013), estudando BM-MSC de camundongos, chegaram à conclusão que células *EBF2*<sup>+</sup> são altamente proliferativas e fisiologicamente quiescentes. Ensaio de diferenciação *in vitro* revelaram sua capacidade de diferenciação, autorrenovação e multipotência. A análise de expressão gênica das células *EBF2* positivas mostrou a presença de genes associados às células-tronco mesenquimais e a coexpressão de genes associados a múltiplas linhagens no nível unicelular. Assim, segundo QIAN e colaboradores, a presença desse gene está associada não só a células progenitoras de osteoblastos, mas também a células progenitoras mesenquimais multipotentes de medula óssea em camundongos adultos. Diante do exposto, como o gene *EBF2* foi expresso em níveis mais elevados em hASC quando comparado aos fibroblastos (média 4,24 ±0,65), hipotetizamos que esse fator de transcrição esteja envolvido na regulação das funções mesenquimais, como autorrenovação e multipotência, em humanos assim como foi constatado em camundongos.

Além dos 10 genes com regulação positiva em hASC, outros seis genes foram selecionados para validação *in vitro* e, posteriormente, observou-se que estes estão regulados para baixo (negativa) em uma análise comparativa com os fibroblastos. O gene *GPR37* é um membro da família de receptores acoplados à proteína G. Este gene codifica para uma proteína composta por sete domínios transmembrana encontrada na membrana plasmática e do retículo endoplasmático. É uma proteína altamente expressa no sistema nervoso central de mamíferos, incluindo seres humanos. O produto desse gene está envolvido na neurogênese e doença de Parkinson juvenil (DUNHAM et al., 2009; BERGER et al., 2017). Segundo o banco de dados *The Human Protein Atlas* (2019), a expressão do mRNA codificante para essa proteína em tecido adiposo é baixa. Assim, por meio da análise por RT-qPCR, foi confirmado que a expressão desse gene em hASC foi significativamente menor do que em fibroblastos (média -7,99 ±0,34) e

uma provável justificativa para o que foi observado é o fato de que essas células estão associadas a um tecido corporal onde a expressão desse gene é baixa.

Outro gene validado por ensaios de RT-qPCR, que é regulado para baixo em hASC, é o fator *TFAP2C* (média  $-7,04 \pm 0,23$ ). A proteína codificada por esse gene é um fator de transcrição ligante de DNA sequência-específica envolvido na ativação de vários genes associados ao desenvolvimento. Essa proteína tem um papel importante no desenvolvimento dos olhos, face, parede corporal, membros e tubo neural em mamíferos. Em células-tronco pluripotentes embrionárias humanas, foi demonstrado que *TFAP2C* estabelece e mantém o estado de pluripotência dessas células e regula a expressão de *OCT4* por mecanismos distintos dos encontrados em camundongos (PASTOR et al., 2018). De acordo com o banco de dados *The Human Protein Atlas* (2019), a expressão do mRNA codificante e dessa proteína na pele é maior do que no tecido adiposo. Isso pode estar relacionado ao fato de termos encontrado uma expressão aumentada desse gene em fibroblastos dérmicos, que fazem parte do nicho da pele e exercem muitas funções fisiológicas importantes nesse sítio corporal. Entretanto, a função desse fator de transcrição em fibroblastos ainda não foi tão bem descrita como a função regulatória em células pluripotentes humanas.

Quanto à expressão do gene *COL23A1*, também foi observada uma regulação negativa em hASC em uma comparação com fibroblastos (média  $-5,36 \pm 0,62$ ). Esse gene codifica para uma proteína transmembrana pertencente à subfamília dos colágenos não fibrilares e a sua expressão está envolvida em doenças que atingem a pele, como a esclerose sistêmica. Alguns estudos confirmaram a hipometilação e a superexpressão de *COL23A1* e *COL4A2* em fibroblastos da pele de portadores de esclerose quando comparados aos fibroblastos normais (ALTOROK et al., 2015). Como visto no estudo de ALTOROK e colaboradores, fibroblastos normais também expressam *COL23A1* e foi encontrado um resultado similar nos fibroblastos extraídos para a realização desse estudo, os quais também são provenientes de doadores normais.

O gene *MMP3* foi relacionado por JÄÄGER e colaboradores (2012) como um dos genes diferencialmente expressos entre hASC e fibroblastos, com regulação negativa em hASC. No presente estudo, o mesmo resultado foi obtido para esse gene por meio da análise dos resultados de RNA-Seq e posterior validação por RT-qPCR (média  $-2,98 \pm 0,85$ ). O gene *MMP3* codifica uma proteína metaloproteinase de matriz que degrada fibronectina, laminina, colágenos II, IV, IX e X e proteoglicanos de cartilagem. Sua função parece estar interligada aos processos de reparo de feridas,

progressão de aterosclerose e iniciação tumoral (KUKACKA et al., 2005; SPINALE, 2007; NCBI, 2008). LINDNER e colaboradores (2012) investigaram a expressão basal de metaloproteases em fibroblastos de origem cardíaca, dérmica e pulmonar. Esses autores observaram uma expressão cerca de sete vezes aumentada do gene *MMP3* em fibroblastos dérmicos quando comparados aos fibroblastos cardíacos. Esse estudo também afirmou que há uma correlação entre a capacidade da enzima MMP3 digerir o colágeno IV e a expressão aumentada de seu gene codificante na pele. No presente estudo, também observamos uma maior expressão de *MMP3* em fibroblastos dérmicos, o que corrobora com esses achados.

Interessantemente, o gene *MATK* foi identificado como regulado para baixo em hASC, porém com uma menor diferença no valor log 2 calculado (média  $-1,23 \pm 0,22$ ). A proteína codificada por esse gene tem similaridade de sequência de aminoácidos com a proteína tirosina cinase CSK, está relacionada à transdução de sinais em células hematopoiéticas e pode desempenhar um papel inibitório no controle da proliferação de células T (LEE et al., 2006). *MATK* também pode estar envolvido na sinalização em alguns tipos de câncer de mama, onde foi observado como diferencialmente expresso em fibroblastos derivados da fração estromal do tumor (SINGER et al., 2008). Em nossos achados, a exemplo dos fibroblastos associados ao tumor de mama, os fibroblastos dérmicos apresentaram uma expressão aumentada de *MATK* em relação às hASC. Entretanto, a função desse gene em ambas as células não foi totalmente elucidada.

Outro gene identificado com regulação negativa em hASC foi *LAMC3* (média  $-4,47 \pm 0,99$ ). As lamininas compõem uma família de glicoproteínas da matriz extracelular e são os principais componentes não-colagênicos das membranas basais. Essas proteínas estão envolvidas em uma ampla variedade de processos biológicos, incluindo adesão celular, diferenciação, migração, sinalização e metástase de tumores. O gene *LAMC3* codifica uma isoforma da cadeia gama de laminina, chamada de gama 3. A cadeia gama 3 é amplamente expressa na pele, coração, pulmão e trato reprodutivo (NCBI, 2011). Na pele, sua expressão é encontrada dentro da membrana basal da junção dermo-epidérmica em pontos de penetração nervosa (CSERHALMI-FRIEDMAN et al., 2001). Devido à importância da expressão desse gene na pele, esperava-se que fosse observada uma expressão aumentada em fibroblastos dérmicos, o que foi confirmado no resultado obtido pelo nosso grupo.

O único gene não validado em nossas análises de RT-qPCR foi o *B4GALNT1*. Esse gene codifica para a proteína beta-1,4 N-acetilglicosaminiltransferase, envolvida na biossíntese dos glicosfingolípídeos GM2 e GD2, presentes em células que compõem o tecido neuronal. MARTINEZ e colaboradores (2007) afirmaram que essa proteína é um importante marcador de superfície para a identificação de células-tronco mesenquimais derivadas de medula óssea. Um estudo liderado por HEO e equipe de pesquisadores (2016) também identificou a expressão desse gene em células-tronco mesenquimais provenientes de cordão umbilical, placenta e tecido adiposo. Ambos os estudos afirmaram que a expressão desse marcador distingue unicamente as MSCs dos fibroblastos. Entretanto, ao contrário dos achados da literatura, de acordo com o presente estudo, a expressão desse gene está regulada negativamente em hASC. Além disso, a validação *in vitro* utilizando RT-qPCR mostrou que fibroblastos dérmicos também expressam *B4GALNT1*, assim como as células-tronco mesenquimais. Um ponto importante a ser destacado é que esses projetos avaliaram a expressão do gene por PCR convencional e a resolução dessa técnica é inferior tanto à análise por RNA-Seq quanto à técnica de PCR quantitativa em tempo real. Além disso, a função desse gene em ambas as células ainda não foi totalmente compreendida.

Diante do exposto, nossos resultados da comparação referente à expressão gênica entre hASC e fibroblastos dérmicos confirmaram 16 genes diferencialmente expressos por análises de RT-qPCR. Os genes *COL11A1* e *MMP3* foram previamente identificados por JÄÄGER e colaboradores (2012) em uma análise de expressão diferencial, porém, estes resultados obtidos por meio de RNA-Seq ainda não tinham sido validados utilizando ambas as células. Além disso, os demais genes investigados nesse estudo são diferentes da lista de GDEs publicada previamente, acrescentando novas informações à literatura científica relacionadas à expressão diferencial de genes em hASC e fibroblastos. Por outro lado, assim como explorado nesse estudo, ZYCH e colaboradores (2014) também validaram o gene *SCRGI* utilizando PCR quantitativa em tempo real. Ao compararmos os resultados com os previamente publicados, contribuímos com uma lista contendo um grande número de GDEs. Até a presente análise, a maior lista continha aproximadamente 1.547 genes diferencialmente expressos identificados entre hASC e fibroblastos (ZYCH et al., 2014), contendo 703 genes em comum. Outros GDEs além dos descritos nesse projeto podem ser estudados quanto à sua função e utilidade para distinguir ambos os tipos celulares, abrindo-se a perspectiva de projetos mais aprofundados nesse tópico.

## **5- CONCLUSÃO GERAL E PERSPECTIVAS**

Nos últimos anos, diversos estudos buscaram compreender a biologia das células-tronco mesenquimais adultas derivadas de diferentes regiões do corpo humano assim como dos fibroblastos dérmicos, com destaque para a identificação das principais características que distinguem esses dois tipos celulares. As células-tronco derivadas de tecido adiposo são reconhecidas como uma população de células mesenquimais com enorme potencial de aplicação nos campos da medicina regenerativa e na terapia celular com células-tronco. Porém, como foi abordado previamente, os efeitos benéficos das hASC no sítio de regeneração podem ser anulados caso ocorra uma contaminação do preparado de células com fibroblastos dérmicos. Baseando-se nesse problema, o presente estudo buscou utilizar um conjunto de estratégias moleculares para a distinção entre hASC e fibroblastos dérmicos humanos mantidos em cultivo.

No Capítulo 1, em uma comparação do fenótipo das células, foi observado que a capacidade de diferenciação nas linhagens adipogênica e osteogênica e a maior atividade de fosfatase alcalina das hASC podem ser bons critérios para identificá-las visto que os fibroblastos não apresentam essas mesmas propriedades, apesar de possuírem maior capacidade proliferativa. Diante desses achados, o desenvolvimento de um método colorimétrico para detectar o nível exato de contaminação, em uma mistura com fibroblastos, a partir da atividade de fosfatase alcalina configura-se como uma perspectiva interessante para estudos complementares a esse.

No Capítulo 2, foi verificada a hipótese de que a utilização de aptâmeros selecionados por meio do método de enriquecimento exponencial *Cell-SELEX* poderia ser relevante para a distinção entre hASC e fibroblastos. Nesse estudo, foram selecionados dois aptâmeros termodinamicamente estáveis que apresentaram maior eficiência e afinidade de ligação por hASC, contribuindo para a identificação das mesmas quando mantidas em cultivo. O método de validação de aptâmeros por qPCR com culturas de células humanas, ainda pouco utilizado, também se mostrou eficaz nesse processo. Estudos futuros com os dois melhores aptâmeros candidatos selecionados podem ser desenvolvidos com o objetivo de identificar o alvo molecular em hASC. Para essa finalidade, um lisado contendo as proteínas de membrana das células-tronco pode ser preparado para purificação do alvo por cromatografia de afinidade e posterior identificação por proteômica (espectrometria de massas) ou por ensaios do tipo *pull-down*. Além disso, a eficácia do uso de aptâmeros na separação entre células-tronco e fibroblastos pode ser testada a partir de uma separação magnética utilizando aptâmeros ligados a esferas magnéticas ou por *cell-sorting* utilizando

citometria de fluxo e aptâmeros conjugados a fluoróforos. Os aptâmeros ligados a moléculas fluorescentes também podem ser utilizados para detecção por imagem das células-tronco mesenquimais utilizando microscopia de fluorescência. Dessa forma, espera-se que sejam validados novos ligantes para alvos conhecidos nessas células ou, até mesmo, a descoberta de novos biomarcadores em hASC. Outra perspectiva de uso desses aptâmeros seria testar sua aplicabilidade na identificação de outras células-tronco de origem mesenquimal, como por exemplo, células provenientes da medula óssea, tecido adiposo da pálpebra, polpa dentária, entre outras, com o objetivo de desenvolver uma nova estratégia de identificação do grupo das células-tronco mesenquimais. Adicionalmente, partindo dos resultados de sequenciamento dos produtos dos últimos *rounds* do *Cell- SELEX*, outras estruturas de aptâmeros podem ser sintetizadas e avaliadas quanto à eficiência de ligação às hASC e outras células-tronco mesenquimais.

No Capítulo 3, em uma análise de sequenciamento de RNA total (RNA-Seq) de hASC e fibroblastos foram identificados mais de 2.000 genes diferencialmente expressos entre as duas células, assim como as funções desses genes e as vias enriquecidas determinadas por análises de GO e KEGG. A partir da lista de genes, foi validado por qPCR um conjunto contendo 16 marcadores com regulação positiva e negativa em hASC, alguns deles relacionados a funções cruciais no metabolismo de células-tronco. Nas análises de GO, as diferenças mais significativas encontradas entre hASC e fibroblastos foram em funções biológicas e moleculares, tais como: ligação e fosforilação de proteínas, sinalização, adesão celular, movimento e atividade de microtúbulos, ligação de tubulinas. As análises de vias enriquecidas por KEGG indicaram enriquecimento em processos importantes relacionados à replicação do DNA, vias em câncer, vias de sinalização PI3K-AKT, orientação de axônio, adesão e ciclo celular e interação receptor-matriz extracelular. Diante da diversidade de genes diferencialmente regulados e suas diversas funções no metabolismo celular tanto de hASC quanto de fibroblastos dérmicos, esse estudo poderá contribuir para a validação de mais marcadores e uma compreensão mais aprofundada da maquinaria biológica que rege e distingue o comportamento e função dessas células no organismo.

## **6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

AASEN T, IZPISÚA BELMONTE JC. Isolation and cultivation of human keratinocytes from skin or plucked hair for the generation of induced pluripotent stem cells. *Nat Protoc.* 2010 Feb;5(2):371-82. doi: 10.1038/nprot.2009.241.

ADEWUMI O, AFLATOONIAN B, AHRLUND-RICHTER L, AMIT M, ANDREWS PW, BEIGHTON G, BELLO PA, BENVENISTY N, BERRY LS, BEVAN S, BLUM B, BROOKING J, CHEN KG, CHOO AB, CHURCHILL GA, CORBEL M, DAMJANOV I, DRAPER JS, DVORAK P, EMANUELSSON K, FLECK RA, FORD A, GERTOW K, GERTSENSTEIN M, GOKHALE PJ, HAMILTON RS, HAMPL A, HEALY LE, HOVATTA O, HYLLNER J, IMREH MP, ITSKOVITZ-ELDOR J, JACKSON J, JOHNSON JL, JONES M, KEE K, KING BL, KNOWLES BB, LAKO M, LEBRIN F, MALLON BS, MANNING D, MAYSHAR Y, MCKAY RD, MICHALSKA AE, MIKKOLA M, MILEIKOVSKY M, MINGER SL, MOORE HD, MUMMERY CL, NAGY A, NAKATSUJI N, O'BRIEN CM, OH SK, OLSSON C, OTONKOSKI T, PARK KY, PASSIER R, PATEL H, PATEL M, PEDERSEN R, PERA MF, PIEKARCZYK MS, PERA RA, REUBINOFF BE, ROBINS AJ, ROSSANT J, RUGG-GUNN P, SCHULZ TC, SEMB H, SHERRER ES, SIEMEN H, STACEY GN, STOJKOVIC M, SUEMORI H, SZATKIEWICZ J, TURETSKY T, TUURI T, VAN DEN BRINK S, VINTERSTEN K, VUORISTO S, WARD D, WEAVER TA, YOUNG LA, ZHANG W. Characterization of human embryonic stem cell lines by the International Stem Cell Initiative. *Nat Biotechnol.* 2007; Jul;25(7):803-16.

AKOGLU H. User's guide to correlation coefficients. *J Emerg Med.* 2018 Sep; 18(3): 91–93. doi: 10.1016/j.tjem.2018.08.001.

ALBADA HB, GOLUB E, WILLNER I. Computational docking simulations of a DNA-aptamer for argininamide and related ligands. *J Comput Aided Mol Des.* 2015 Jul;29(7):643-54. doi: 10.1007/s10822-015-9844-5.

ALT E, YAN Y, GEHMERT S, et al. Fibroblasts share mesenchymal phenotypes with stem cells, but lack their differentiation and colony-forming potential. *Biol Cell.* 2011;103(4):197-208. doi:10.1042/BC20100117.

ALTOROK N, TSOU PS, COIT P, KHANNA D, SAWALHA AH. Genome-wide DNA methylation analysis in dermal fibroblasts from patients with diffuse and limited systemic sclerosis reveals common and subset-specific DNA methylation aberrancies. *Ann Rheum Dis.* 2015 Aug;74(8):1612-20. doi: 10.1136/annrheumdis-2014-205303.

AN Y, WU J, YANG B, ZHU Z, GAO M, YU C, YANG CJ. Selection and Application of DNA Aptamer Against Oncogene Amplified in Breast Cancer 1. *J Mol Evol.* 2015 Dec;81(5-6):179-85. doi: 10.1007/s00239-015-9703-y.

ANDERS S, HUBER W. Differential expression analysis for sequence count data. *Genome Biol.* 2010;11(10):R106. doi: 10.1186/gb-2010-11-10-r106.

ANGHILERI E, MARCONI S, PIGNATELLI A, et al. Neuronal differentiation potential of human adipose-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev.* 2008;17(5):909-916. doi:10.1089/scd.2007.0197.

AOMATSU E, TAKAHASHI N, SAWADA S, OKUBO N, HASEGAWA T, TAIRA M, MIURA H, ISHISAKI A, CHOSA N. Novel SCRG1/BST1 axis regulates self-renewal, migration, and osteogenic differentiation potential in mesenchymal stem cells. *Sci Rep*. 2014 Jan 13;4:3652. doi: 10.1038/srep03652.

AVCI-ADALI M, WILHELM N, PERLE N, STOLL H, SCHLENSAK C, WENDEL HP. Absolute quantification of cell-bound DNA aptamers during SELEX. *Nucleic Acid Ther*. 2013 Apr;23(2):125-30. doi: 10.1089/nat.2012.0406.

BAE S, AHN JH, PARK CW, SON HK, KIM KS, LIM NK, JEON CJ, KIM H. Gene and microRNA expression signatures of human mesenchymal stromal cells in comparison to fibroblasts. *Cell Tissue Res*. 2009 Mar; 335(3):565-73. doi: 10.1007/s00441-008-0729-y.

BANYARD DA, SALIBIAN AA, WIDGEROW AD, EVANS GRD. Implications for human adipose-derived stem cells in plastic surgery. *J. Cell. Mol. Med*. 2015;19 (1):21-30.

BERGER BS, ACEBRON SP, HERBST J, KOCH S, NIEHRS C. Parkinson's disease-associated receptor GPR37 is an ER chaperone for LRP6. *EMBO Rep*. 2017 May;18(5):712-725. doi: 10.15252/embr.201643585.

BERNSTEIN BE, MIKKELSEN TS, XIE X, KAMAL M, HUEBERT DJ, CUFF J, FRY B, MEISSNER A, WERNIG M, PLATH K, JAENISCH R, WAGSCHAL A, FEIL R, SCHREIBER SL, LANDER ES. A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells. *Cell*. 2006 Apr 21;125(2):315-26.

BLANK M, WEINSCHENK T, PRIEMER M, SCHLUESENER H. Systematic evolution of a DNA aptamer binding to rat brain tumor microvessels: Selective targeting of endothelial regulatory protein pigpen. *J Biol Chem*. 2001;276(19):16464-16468. doi:10.1074/jbc.M100347200.

BOURIN P, BUNNELL BA, CASTEILLA L, et al. Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/ stem cells: a joint statement of the International Federation for Adipose Therapeutics (IFATS) and Science and the International S. *Cytotherapy*. 2013;15(6):641-648. doi:10.1016/j.jcyt.2013.02.006.

BRENDEL C, KUKLICK L, HARTMANN O, KIM TD, BOUDRIOT U, SCHWELL D, NEUBAUER A. Distinct gene expression profile of human mesenchymal stem cells in comparison to skin fibroblasts employing cDNA microarray analysis of 9600 genes. *Gene Expr*. 2005;12(4-6):245-57.

BROHEM CA, DE CARVALHO CM, RADOSKI CL, SANTI FC, BAPTISTA MC, SWINKA BB, DE A URBAN C, DE ARAUJO LR, GRAF RM, FEFERMAN IH, LORENCINI M. Comparison between fibroblasts and mesenchymal stem cells derived from dermal and adipose tissue. *Int J Cosmet Sci*. 2013 Oct;35(5):448-57. doi: 10.1111/ics.12064.

BUCKLEY CD, PILLING D, LORD JM, AKBAR AN, SCHEEL-TOELLNER

D, SALMON M. Fibroblasts regulate the switch from acute resolving to chronic persistent inflammation. *Trends Immunol.* 2001 Apr;22(4):199-204.

BUNNELL BA, FLAAT M, GAGLIARDI C, PATEL B, RIPOLL C. Adipose-derived stem cells: isolation, expansion and differentiation. *Methods.* 2008 Jun;45(2):115-20. doi: 10.1016/j.ymeth.2008.03.006.

BUSTIN SA, BENES V, GARSON JA, HELLEMANS J, HUGGETT J, KUBISTA M, MUELLER R, NOLAN T, PFAFFL MW, SHIPLEY GL, VANDESOMPELE J, WITTEWER CT. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem.* 2009 Apr;55(4):611-22. doi: 10.1373/clinchem.2008.112797.

BYDŁOWSKI SP, DEBES AA, MASELLI LMF, JANZ FL. Características biológicas das células-tronco mesenquimais. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* [online]. 2009, 31 (1): 25-35 doi: 10.1590/S1516-84842009005000038.

CAMARENA L, BRUNO V, EUSKIRCHEN G, POGGIO S, SNYDER M. Molecular mechanisms of ethanol-induced pathogenesis revealed by RNA-sequencing. *PLoS Pathog.* 2010 Apr 1;6(4):e1000834. doi: 10.1371/journal.ppat.1000834.

CAPLAN AI. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res.* 1991 Sep;9(5):641-50. doi: 10.1002/jor.1100090504.

CAPPELLESSO-FLEURY S, PUISSANT-LUBRANO B, APOIL P-A, et al. Human fibroblasts share immunosuppressive properties with bone marrow mesenchymal stem cells. *J Clin Immunol.* 2010;30:607-619. doi:10.1007/s10875-010-9415-4.

CAROLI J, TACCIOLI C, DE LA FUENTE A, SERAFINI P, BICCIATO S, APTANI: a computational tool to select aptamers through sequence-structure motif analysis of HT-SELEX data. *Bioinformatics.* 2016 Jan 15;32(2):161-4. doi: 10.1093/bioinformatics/btv545.

CHEN C, ZHOU S, CAI Y, TANG F. Nucleic acid aptamer application in diagnosis and therapy of colorectal cancer based on cell-SELEX technology. *NPJ Precis Oncol.* 2017 Nov 14;1(1):37. doi: 10.1038/s41698-017-0041-y.

CHEN D, JARRELL A, GUO C, LANG R, ATIT R. Dermal  $\beta$ -catenin activity in response to epidermal Wnt ligands is required for fibroblast proliferation and hair follicle initiation. *Development.* 2012; 139:1522–1533.

CHEN FG, ZHANG WJ, BI D, et al. Clonal analysis of nestin vimentin+ multipotent fibroblasts isolated from human dermis. *J Cell Sci.* 2007;120(16):2875-2883. doi:10.1242/jcs.03478.

CHEN H, YUAN CH, YANG YF, YIN CQ, GUAN Q, WANG FB, TU JC. Subtractive Cell-SELEX Selection of DNA Aptamers Binding Specifically and Selectively to Hepatocellular Carcinoma Cells with High Metastatic Potential. *Biomed Res Int.* 2016;2016:5735869. doi: 10.1155/2016/5735869.

CHO KA, PARK M, KIM YH, WOO SY, RYU KH. RNA sequencing reveals a transcriptomic portrait of human mesenchymal stem cells from bone marrow, adipose tissue, and palatine tonsils. *Sci Rep*. 2017 Dec 7;7(1):17114. doi: 10.1038/s41598-017-16788-2.

CHOI JS, YOON HI, LEE KS, CHOI YC, YANG SH, KIM IS, CHO YW. Exosomes from differentiating human skeletal muscle cells trigger myogenesis of stem cells and provide biochemical cues for skeletal muscle regeneration. *J Control Release*. 2016 Jan 28;222:107-15. doi: 10.1016/j.jconrel.2015.12.018.

CHOUDHERY MS, BADOWSKI M, MUISE A, PIERCE J, HARRIS DT. Subcutaneous Adipose Tissue-Derived Stem Cell Utility Is Independent of Anatomical Harvest Site. *Biores Open Access*. 2015;4(1):131-145. doi:10.1089/biores.2014.0059.

CHU M, KANG JR, WANG W, LI H, FENG JH, CHU ZY, ZHANG MB, XU L, WANG YD. Evaluation of human epidermal growth factor receptor 2 in breast cancer with a novel specific aptamer. *Cell Mol Immunol*. 2017 Apr;14(4):398-400. doi: 10.1038/cmi.2015.31.

CIKOS S, BUKOVSKÁ A, KOPPEL J. Relative quantification of mRNA: comparison of methods currently used for real-time PCR data analysis. *BMC Mol Biol*. 2007 Dec 20;8:113. doi: 10.1186/1471-2199-8-113.

CLAWSON GA, ABRAHAM T, PAN W, TANG X, LINTON SS, MCGOVERN CO, LOC WS, SMITH JP, BUTLER PJ, KESTER M, ADAIR JH, MATTERS GL. A Cholecystokinin B Receptor-Specific DNA Aptamer for Targeting Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Nucleic Acid Ther*. 2017 Feb;27(1):23-35. doi: 10.1089/nat.2016.0621.

COLLEMAN TM, HUANG F. RNA-catalyzed thioester synthesis. *Chem Biol*. 2002 Nov;9(11):1227-36.

CONTA JH, BREITBART RE. Chapter 31 - Genomics of Congenital Heart Disease. *Essentials of Genomic and Personalized Medicine* 2010, p.390-403. Doi: 10.1016/B978-0-12-374934-5.00031-3.

CORREA CR, DE BARROS AL, FERREIRA CDE A, DE GOES AM, CARDOSO VN, DE ANDRADE AS. Aptamers directly radiolabeled with technetium-99m as a potential agent capable of identifying carcinoembryonic antigen (CEA) in tumor cells T84. *Bioorg Med Chem Lett*. 2014 Apr 15;24(8):1998-2001. doi: 10.1016/j.bmcl.2014.02.048.

CRISAN M, YAP S, CASTEILLA L, CHEN CW, CORSELLI M, PARK TS, ANDRIOLO G, SUN B, ZHENG B, ZHANG L, NOROTTE C, TENG PN, TRAAS J, SCHUGAR R, DEASY BM, BADYLAK S, BUHRING HJ, GIACOBINO JP, LAZZARI L, HUARD J, PÉAULT B. A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell Stem Cell*. 2008 Sep 11;3(3):301-13. doi: 10.1016/j.stem.2008.07.003.

CSEHALMI-FRIEDMAN PB, OLSON PF, KOCH M, CHAMPLAUD

MF, BRUNKEN WJ, BURGESSON RE, CHRISTIANO AM. Structural analysis and mutation detection strategy for the human LAMC3 gene. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001 Jan 12;280(1):39-44.

DANIELS D A, CHEN H, HICKE BJ, SWIDEREK KM, GOLD L. A tenascin-C aptamer identified by tumor cell SELEX: systematic evolution of ligands by exponential enrichment. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(26):15416-15421. doi:10.1073/pnas.2136683100.

DARMOSTUK M, RIMPELOVA S, GBELCOVA H, RUMIL T. Current approaches in SELEX: An update to aptamer selection technology. *Biotechnol Adv*. 2014;33(6):1141-1161. doi:10.1016/j.biotechadv.2015.02.008.

DE BARI C, DELL'ACCIO F, TYLZANOWSKI P, LUYTEN FP. Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis Rheum*. 2001 Aug;44(8):1928-42. DOI: 10.1002/1529-0131(200108)44:8<1928::AID-ART331>3.0.CO;2-P.

DE COPPI P, BARTSCH G JR, SIDDIQUI MM, XU T, SANTOS CC, PERIN L, MOSTOSLAVSKY G, SERRE AC, SNYDER EY, YOO JJ, FURTH ME, SOKER S, ATALA A. Isolation of amniotic stem cell lines with potential for therapy. *Nat Biotechnol*. 2007 Jan;25(1):100-6. Epub 2007 Jan 7. DOI: 10.1038/nbt1274.

DE PAULA AC, ZONARI AA, MARTINS TM, NOVIKOFF S, DA SILVA AR, CORRELO VM, REIS RL, GOMES DA, GOES AM. Human serum is a suitable supplement for the osteogenic differentiation of human adipose-derived stem cells seeded on poly-3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate scaffolds. *Tissue Eng Part A*. 2013 Jan;19(1-2):277-89. doi: 10.1089/ten.TEA.2012.0189.

DEBNATH T, CHELLURI LK. Standardization and quality assessment for clinical grade mesenchymal stem cells from human adipose tissue. *Hematol Transfus Cell Ther*. 2008 doi: 10.1016/j.htct.2018.05.001.

DELLAVALLE A, SAMPAOLESI M, TONLORENZI R, TAGLIAFICO E, SACCHETTI B, PERANI L, INNOCENZI A, GALVEZ BG, MESSINA G, MOROSETTI R, LI S, BELICCHI M, PERETTI G, CHAMBERLAIN JS, WRIGHT WE, TORRENTE Y, FERRARI S, BIANCO P, COSSU G. Pericytes of human skeletal muscle are myogenic precursors distinct from satellite cells. *Nat Cell Biol*. 2007 Mar;9(3):255-67.

DRISKELL RR, LICHTENBERGER BM, HOSTE E, KRETZSCHMAR K, SIMONS BD, CHARALAMBOUS M, FERRON SR, HERAULT Y, PAVLOVIC G, FERGUSON-SMITH AC, et al. Distinct fibroblast lineages determine dermal architecture in skin development and repair. *Nature* 2013; 504:277–281.

DRISKELL RR, WATT FM. Understanding fibroblast heterogeneity in the skin. *Trends Cell Biol* 2015; 25:92–99.

DU X, YUAN Q, QU Y, ZHOU Y, BEI J. Endometrial Mesenchymal Stem Cells

Isolated from Menstrual Blood by Adherence. *Stem Cells Int.* 2016;2016:3573846. doi: 10.1155/2016/3573846.

DUNHAM JH, MEYER RC, GARCIA EL, HALL RA. GPR37 surface expression enhancement via N-terminal truncation or protein-protein interactions. *Biochemistry.* 2009 Nov 3;48(43):10286-97. doi: 10.1021/bi9013775.

ELLINGTON, AD, SZOSTAK, JW. In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature.* 1990;346, 818–822.

ENCODE Guidelines and Best Practices for RNA-Seq: December 2016 – Disponível em <<https://www.encodeproject.org/about/experiment-guidelines/>> Acesso em 22/01/2019.

ERICKSON GR, GIMBLE JM, FRANKLIN DM, RICE HE, AWAD H, GUILAK F. Chondrogenic potential of adipose tissue-derived stromal cells in vitro and in vivo. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002;290(2):763-769. doi:10.1006/bbrc.2001.6270\rs0006291X01962709.

FAMULOK M, MAYER G. Aptamers as tools in molecular biology and immunology. *Curr.Top. Microbiol. Immunol.* 1999; 243: 123-136. doi: 10.1007/978-3-642-60142-2\_7.

FANG X, TAN W. Aptamers generated from cell-SELEX for molecular medicine: a chemical biology approach. *Acc Chem Res.* 2010 Jan 19;43(1):48-57. doi: 10.1021/ar900101s.

FANG Z, CUI X. Design and validation issues in RNA-seq experiments. *Brief Bioinform.* 2011 May;12(3):280-7. doi: 10.1093/bib/bbr004.

FLAVELL SJ, HOU TZ, LAX S, FILER AD, SALMON M, BUCKLEY CD. Fibroblasts as novel therapeutic targets in chronic inflammation. *Br J Pharmacol.* 2008;(Suppl 1):S241-S246. doi:10.1038/sj.bjp.0707487.

FORCALES S. Potential of adipose-derived stem cells in muscular regenerative therapies. *Front. Aging Neurosci.* 2015 . doi: 10.3389/fnagi.2015.00123.

FRIEDENSTEIN AJ, PETRAKOVA KV, KUROLESOVA AI, FROLOVA GP. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation.* 1968 Mar;6(2):230-47.

GAO H, VOLAT F, SANDHOW L, GALITZKY J, NGUYEN T, ESTEVE D, ÅSTRÖM G, MEJHERT N, LEDOUX S, THALAMAS C, ARNER P, GUILLEMOT JC, QIAN H, RYDÉN M, BOULOUMIÉ A. CD36 Is a Marker of Human Adipocyte Progenitors with Pronounced Adipogenic and Triglyceride Accumulation Potential. *Stem Cells.* 2017 Jul;35(7):1799-1814. doi: 10.1002/stem.2635.

GIMBLE JM, BUNNELL BA, FRAZIER T, et al. Adipose-derived stromal/stem cells. *Organogenesis.* 2013;9(1):3-10. doi:10.4161/org.24279.

GIORDANO RJ, CARDÓ-VILA M, LAHDENRANTA J, PASQUALINI R, ARAP W. Biopanning and rapid analysis of selective interactive ligands. *Nat Med.* 2001 Nov;7(11):1249-53. doi: 10.1038/nm1101-1249.

GRAZIANI AC, STETS MI, LOPES ALK, SCHLUGA PHC, MARTON S, MENDES IF, ANDRADE ASR, KRIEGER MA, CARDOSO J. High Efficiency Binding Aptamers for a Wide Range of Bacterial Sepsis Agents. *J Microbiol Biotechnol.* 2017 Apr 28;27(4):838-843. doi: 10.4014/jmb.1611.11004.

GREEN NM. Avidin and streptavidin. *Methods Enzymol.* 1990;184:51-67.

GRONTHOS S, FRANKLIN DM, LEDDY HA, ROBEY PG, STORMS RW, GIMBLE JM. Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells. *J Cell Physiol.* 2001;189(1):54-63. doi:10.1002/jcp.1138.

GUO KT, SCHAFFER R, PAUL A, GERBER A, ZIEMER G, WENDEL HP. A new technique for the isolation and surface immobilization of mesenchymal stem cells from whole bone marrow using high-specific DNA aptamers. *Stem Cells.* 2006 Oct;24(10):2220-31 doi: 10.1634/stemcells.2006-0015.

HALFON S, ABRAMOV N, GRINBLAT B, GINIS I. Markers distinguishing mesenchymal stem cells from fibroblasts are downregulated with passaging. *Stem Cells Dev.* 2011;20(1):53-66. doi:10.1089/scd.2010.0040.

HANIFFA M A, WANG X, HOLTICK U, et al. Adult Human Fibroblasts Are Potent Immunoregulatory Cells and Functionally Equivalent to Mesenchymal Stem Cells. *J Immunol.* 2007;179:1595-1604. doi:10.4049/jimmunol.179.3.1595.

HANSEN KD, IRIZARRY RA, WU Z. Removing technical variability in RNA-seq data using conditional quantile normalization. *Biostatistics.* 2012 Apr;13(2):204-16. doi:10.1093/biostatistics/kxr054.

HAO H, WEN CY, HONG CY, LAI JC. Evaluation of aptamer specificity with or without primers using clinical samples for C-reactive protein by magnetic-assisted rapid aptamer selection. *RSC Adv.*, 2017, 7, 42856. DOI: 10.1039/c7ra07249j.

HASEGAWA H, SAVORY N, ABE K, IKEBUKURO K. Methods for Improving Aptamer Binding Affinity. *Molecules.* 2016 Mar 28;21(4):421. doi: 10.3390/molecules21040421.

HASHKAVAYI AB, RAOOF JB, OJANI R, KAVOOSIAN S. Ultrasensitive electrochemical aptasensor based on sandwich architecture for selective label-free detection of colorectal cancer (CT26) cells. *Biosens Bioelectron.* 2017 Jun 15;92:630-637. doi: 10.1016/j.bios.2016.10.042.

HEMATTI P. Mesenchymal stromal cells and fibroblasts: a case of mistaken identity? *Cytotherapy.* 2012;14(5):516-521. doi:10.3109/14653249.2012.677822.

HEO JS, CHOI Y, KIM HOH-SH, KIM HOH-SH. Comparison of molecular profiles of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, umbilical cord blood,

placenta and adipose tissue. *Int J Mol Med*. 2016;37(1):115-125. doi:10.3892/ijmm.2015.2413.

HERMANN T, PATEL DJ. Adaptive recognition by nucleic acid aptamers. *Science*. 2000 Feb 4;287(5454):820-825. doi: 10.1126/science.287.5454.820.

HOMANN M, GÖRINGER HU. Uptake and intracellular transport of RNA aptamers in African trypanosomes suggest therapeutic "piggy-back" approach. *Bioorg Med Chem*. 2001 Oct;9(10):2571-2580. doi: 10.1016/S0968-0896(01)00032-3.

HORWITZ EM, LE BLANC K, DOMINICI M, MUELLER I, SLAPER-CORTENBACH I, MARINI FC, DEANS RJ, KRAUSE DS, KEATING A; International Society for Cellular Therapy. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2005;7(5):393-5. DOI: 10.1080/14653240500319234.

HOU Z, MEYER S, PROPSON NE, NIE J, JIANG P, STEWART R, THOMSON JA. Characterization and target identification of a DNA aptamer that labels pluripotent stem cells. *Cell Res*. 2015 Mar; 25(3): 390–393 doi: 10.1038/cr.2015.7.

HUANG S, FU R, SHYU W, LIU S, JONG G. Review Adipose-Derived Stem Cells : Isolation , Characterization , and Differentiation Potential. *Cell Transplant*. 2013;22:701-709.

HUANG Z X, XIE Q, GUO Q P, WANG K M, MENG XX, YUAN BY, CHEN YY. DNA aptamer selected for specific recognition of prostate cancer cells and clinical tissues. *Chin Chem Lett* 2017. 28(6), 1252-1257.

IGARASHI T, TAJIRI Y, SAKURAI M, SATO E, LI D, MUKAI K, SUEMATSU M, FUKUI E, YOSHIZAWA M, MATSUMOTO H. Tubulointerstitial nephritis antigen-like 1 is expressed in extraembryonic tissues and interacts with laminin 1 in the Reichert membrane at postimplantation in the mouse. *Biol Reprod*. 2009 Nov;81(5):948-55. doi: 10.1095/biolreprod.109.078162.

ILGU M, NILSEN-HAMILTON M. Aptamers in Analytics. *Analyst*. 2016 Mar 7; 141(5): 1551–1568. doi: 10.1039/c5an01824b.

ILLUMINA TECHNICAL NOTE. Technical Note: Sequencing -Quality Scores for Next-Generation Sequencing. October 2011. Disponível em: <[https://www.illumina.com/documents/products/technotes/technote\\_Q-Scores.pdf](https://www.illumina.com/documents/products/technotes/technote_Q-Scores.pdf)> Acesso em: 22 jan 2019.

IWAGAWA T, OHUCHI SP, WATANABE S, NAKAMURA Y. Selection of RNA aptamers against mouse embryonic stem cells. *Biochimie*. 2012 Jan;94(1):250-7. doi: 10.1016/j.biochi.2011.10.017.

JÄÄGER K, ISLAM S, ZAJAC P, LINNARSSON S, NEUMAN T. RNA-seq analysis reveals different dynamics of differentiation of human dermis- and adipose-derived stromal stem cells. *PLoS One*. 2012;7(6):e38833. doi: 10.1371/journal.pone.0038833.

JÄÄGER K, NEUMAN T. Human dermal fibroblasts exhibit delayed adipogenic differentiation compared with mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev.* 2011 Aug;20(8):1327-36. doi: 10.1089/scd.2010.0258.

JAVAHERIAN S, MUSHEEV MU, KANOATOV M, BEREZOVSKI MV, KRYLOV SN. Selection of aptamers for a protein target in cell lysate and their application to protein purification. *Nucleic Acids Res.* 2009 May;37(8):e62. doi: 10.1093/nar/gkp176.

JIN C, ZHENG J, LI C, QIU L, ZHANG X, TAN W. Aptamers Selected by Cell-SELEX for Molecular Imaging. *J Mol Evol.* 2015 Dec;81(5-6):162-71. doi: 10.1007/s00239-015-9716-6.

JOLLIFFE IT, CADIMA J. Principal component analysis: a review and recent developments. *Philos Trans A Math Phys Eng Sci.* 2016 Apr 13;374(2065):20150202. doi: 10.1098/rsta.2015.0202.

JUNKER JP, SOMMAR P, SKOG M, JOHNSON H, KRATZ G. Adipogenic, chondrogenic and osteogenic differentiation of clonally derived human dermal fibroblasts. *Cells Tissues Organs.* 2010;191(2):105-18. doi: 10.1159/000232157.

KANEHISA M, ARAKI M, GOTO S, HATTORI M, HIRAKAWA M, ITOH M, KATAYAMA T, KAWASHIMA S, OKUDA S, TOKIMATSU T, YAMANISHI Y. KEGG for linking genomes to life and the environment. *Nucleic Acids Res.* 2008. doi:10.1093/nar/gkm882.

KANG, HS, HUH YM, KIM S, LEE DK. Isolation of RNA aptamers targeting HER-2-overexpressing breast cancer cells using cell-SELEX. *Bull. Korean Chem. Soc.* 2009, 30:1827–1831. Doi: 10.5012/bkcs.2009.30.8.1827

KANOATOV M, JAVAHERIAN S, KRYLOV S. Aptamer-facilitated Protein Isolation from Cells. *Nat Protoc* 2011 Jan. doi:10.1038/protex.2011.204. KAWAKAMI J, IMANAKA H, YOKOTA Y, SUGIMOTO N. In vitro selection of aptamers that act with Zn<sup>2+</sup>. *J Inorg Biochem.* 2000 Nov;82(1-4):197-206. doi: 10.1016/S0162-0134(00)00158-6.

KENDALL RT, FEGHALI-BOSTWICK CA. Fibroblasts in fibrosis: novel roles and mediators. *Front Pharmacol.* 2014 May 27;5:123. doi: 10.3389/fphar.2014.00123.

KIM D, PERTEA G, TRAPNELL C, PIMENTEL H, KELLEY R, SALZBERG SL. TopHat2: accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions. *Genome Biol.* 2013 Apr 25;14(4):R36. doi: 10.1186/gb-2013-14-4-r36.

KIM EY, KIM JW, KIM WK, HAN BS, PARK SG, CHUNG BH, LEE SC, BAE KH. Selection of aptamers for mature white adipocytes by cell SELEX using flow cytometry. *PLoS One.* 2014 May 20;9(5):e97747. doi: 10.1371/journal.pone.0097747.

KIM SJ, KIM MY, LEE JH, YOU JC, JEONG S. Selection and stabilization of the RNA aptamers against the human immunodeficiency virus type-1 nucleocapsid protein.

*Biochem Biophys Res Commun.* 2002 Mar 8;291(4):925-31 doi: 10.1006/bbrc.2002.6521.

KIM SW, CHO JH, HONG MW, RHIE J-W, YOON HR. Induction of chondrogenic differentiation in cultured fibroblasts isolated from the inferior turbinate. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2008;139(1):143-148. doi:10.1016/j.otohns.2008.04.015.

KIM YH, YOON DS, KIM HO, LEE JW. Characterization of different subpopulations from bone marrow-derived mesenchymal stromal cells by alkaline phosphatase expression. *Stem Cells Dev.* 2012 Nov 1;21(16):2958-68. doi: 10.1089/scd.2011.0349.

KLUSSMANN, S. The aptamer handbook: functional oligonucleotides and their applications. Weinheim: WILEY-VCH, 2006.

KOLF CM, CHO E, TUAN RS. Mesenchymal stromal cells. Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation. *Arthritis Res Ther.* 2007;9(1):204. DOI: 10.1186/ar2116.

KUKACKA J, PRŮSA R, KOTASKA K, PELOUCH V. Matrix metalloproteinases and their function in myocardium. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2005 Dec;149(2):225-36.

KUMAR S, STECHER G, LI M, KNYAZ C, TAMURA K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Mol Biol Evol.* 2018 Jun 1;35(6):1547-1549. doi: 10.1093/molbev/msy096.

KUNDROTAS G. Surface markers distinguishing mesenchymal stem cells from fibroblasts. *Acta medica Litu.* 2012;19(2):75-79. doi:10.6001/actamedica.v19i2.2313.

LANGER D, IKEHARA Y, TAKEBAYASHI H, HAWKES R, ZIMMERMANN H. The ectonucleotidases alkaline phosphatase and nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 2 are associated with subsets of progenitor cell populations in the mouse embryonic, postnatal and adult neurogenic zones. *Neuroscience.* 2007 Dec 19;150(4):863-79.

LE BLANC K, RINGDÉN O. Immunobiology of human mesenchymal stem cells and future use in hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2005 May;11(5):321-34. DOI: 10.1016/j.bbmt.2005.01.005.

LEE BC, AVRAHAM S, IMAMOTO A, AVRAHAM HK. Identification of the nonreceptor tyrosine kinase MATK/CHK as an essential regulator of immune cells using Matk/CHK-deficient mice. *Blood.* 2006 Aug 1;108(3):904-7.(Cap. 3)

LEE JF, STOVALL GM, ELLINGTON AD. Aptamer therapeutics advance. *Curr Opin Chem Biol.* 2006;10(3):282-289. doi:10.1016/j.cbpa.2006.03.015.(Cap. 2)

LEGIEWICZ M, LOZUPONE C, KNIGHT R, YARUS M. Size, constant sequences, and optimal selection. *RNA.* 2005 Nov;11(11):1701-9. doi: 10.1261/rna.2161305.

LI HH, WEN CY, HONG CY, LAI JH. Evaluation of aptamer specificity with or without primers using clinical samples for C-reactive protein by magnetic-assisted rapid aptamer selection. *RSC Adv* 2017. Issue 68, 2017, Issue in Progress.

LIANG C, LI D, ZHANG G, et al. Comparison of the methods for generating single-stranded DNA in SELEX. *Analyst*. 2015;140(10):3439-3444. doi:10.1039/C5AN00244C.

LINDNER D, ZIETSCH C, BECHER PM, SCHULZE K, SCHULTHEISS HP, TSCHÖPE C, WESTERMANN D. Differential expression of matrix metalloproteases in human fibroblasts with different origins. *Biochem Res Int*. 2012;2012:875742. doi: 10.1155/2012/875742.

LIU M, YU X, CHEN Z, YANG T, YANG D, LIU Q, DU K, LI B, WANG Z, LI S, DENG Y, HE N. Aptamer selection and applications for breast cancer diagnostics and therapy. *J Nanobiotechnology*. 2017 Nov 13;15(1):81. doi: 10.1186/s12951-017-0311-4.

LIU Q, MARKATOU M. Evaluation of Methods in Removing Batch Effects on RNA-Seq Data. *Infect Dis Transl Med*, 2016, 2 (1): 3-9 DOI: 10.11979/idtm.201601002.

LIU W, SAINT DA. A new quantitative method of real time reverse transcription polymerase chain reaction assay based on simulation of polymerase chain reaction kinetics. *Anal. Biochem*. 2002. 302, 52:59. doi:10.1006/abio.2001.5530.

LORENZ K, SICKER M, SCHMELZER E, et al. Multilineage differentiation potential of human dermal skin-derived fibroblasts. *Exp Dermatol*. 2008;17(11):925-932. doi:10.1111/j.1600-0625.2008.00724.x.

LUO S, WANG S, LUO N, CHEN F, HU C, ZHANG K. The application of aptamer 5TR1 in triple negative breast cancer target therapy. *J Cell Biochem*. 2018 Jan;119(1):896-908. doi: 10.1002/jcb.26254.

LYSY PA, SMETS F, SIBILLE C, NAJIMI M, SOKAL EM. Human skin fibroblasts: From mesodermal to hepatocyte-like differentiation. *Hepatology*. 2007 Nov;46(5):1574-85. DOI: 10.1002/hep.21839.

MAHMOOD A, HARKNESS L, SCHRØDER HD, ABDALLAH BM, KASSEM M. Enhanced differentiation of human embryonic stem cells to mesenchymal progenitors by inhibition of TGF-beta/activin/nodal signaling using SB-431542. *J Bone Miner Res*. 2010 Jun;25(6):1216-33. doi: 10.1002/jbmr.34.

MARIMUTHU C, TANG TH, TOMINAGA J, TAN SC, GOPINATH SC. Single-stranded DNA (ssDNA) production in DNA aptamer generation. *Analyst*. 2012;137(6):1307-1315. doi: 10.1039/c2an15905h.

MARTINEZ C, HOFMANN TJ, MARINO R, DOMINICI M AND HORWITZ EM. Human bone marrow mesenchymal stromal cells express the neural ganglioside GD2: a novel surface marker for the identification of MSCs. *Blood*. 2007 109: 4245-4248.

MARTINS TM DA M, DE PAULA ACC, GOMES DA, GOES AM. Alkaline Phosphatase Expression/Activity and Multilineage Differentiation Potential are the Differences Between Fibroblasts and Orbital Fat-Derived Stem Cells – A Study in Animal Serum-Free Culture Conditions. *Stem Cell Rev Reports*. 2014;10(5):697-711. doi:10.1007/s12015-014-9529-9.

MAYER G, AHMED MS, DOLF A, ENDL E, KNOLLE PA, FAMULOK M. Fluorescence-activated cell sorting for aptamer SELEX with cell mixtures. *Nat Protoc*. 2010 Dec;5(12):1993-2004. doi: 10.1038/nprot.2010.163.

MENCIN N, SMUC T, VRANICAR M, et al. Optimization of SELEX: Comparison of different methods for monitoring the progress of in vitro selection of aptamers. *J Pharm Biomed Anal*. 2014;91:151-159. doi:10.1016/j.jpba.2013.12.031.

MORNET E, STURA E, LIA-BALDINI AS, STIGBRAND T, MÉNEZ A, LE DU MH. Structural evidence for a functional role of human tissue nonspecific alkaline phosphatase in bone mineralization. *J Biol Chem*. 2001 Aug 17;276(33):31171-8.

MORTAZAVI A, WILLIAMS BA, MCCUE K, SCHAEFFER L, WOLD B. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nat Methods*. 2008 Jul;5(7):621-8. doi: 10.1038/nmeth.1226.

NAUTA AJ, FIBBE WE. Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. *Blood*. 2007 Nov 15;110(10):3499-506. Epub 2007 Jul 30. DOI: 10.1182/blood-2007-02-069716.

NCBI- LAMC3 laminin subunit gamma 3 [ *Homo sapiens* (human) ] Ref Seq 2011. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/10319>>. Acesso em: 28/01/2019.

NCBI - MMP3 matrix metalloproteinase 3 [ *Homo sapiens* (human) ] Ref Seq 2008. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4314>> Acesso em 28/01/2019.

NERY A.A. Purificação de células-tronco de lipoaspirado humano por aptâmeros de DNA, seguida da caracterização dos fenótipos obtidos da diferenciação neuronal. 2014. 141 f. Tese (Doutorado em Ciências/Bioquímica)- Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014 doi: 10.11606/T.46.2014.tde-02102014-083926.

NERY AA, WRENGER C, ULRICH H. Recognition of biomarkers and cell-specific molecular signatures: aptamers as capture agents. *J Sep Sci*. 2009 May;32(10):1523-30. doi: 10.1002/jssc.200800695.

NINOMIYA K, KANEDA K, KAWASHIMA S, MIYACHI Y, OGINO C, SHIMIZU N. Cell-SELEX based selection and characterization of DNA aptamer recognizing human hepatocarcinoma. *Bioorg Med Chem Lett*. 2013 Mar 15;23(6):1797-802. doi: 10.1016/j.bmcl.2013.01.040

OHUCHI S. Cell-SELEX Technology. *Biores Open Access*. 2012 Dec;1(6):265-72. doi: 10.1089/biores.2012.0253.

PALOMBELLA S, PIRRONE C, CHERUBINO M, VALDATTA L, BERNARDINI G, GORNATI R. Identification of reference genes for qPCR analysis during hASC long culture maintenance. *PLoS One*. 2017 Feb 9;12(2):e0170918. doi: 10.1371/journal.pone.0170918.

PARSONAGE G, FILER AD, HAWORTH O, NASH GB, RAINGER GE, SALMON M, BUCKLEY CD. A stromal address code defined by fibroblasts. *Trends Immunol*. 2005 Mar;26(3):150-6. DOI: 10.1016/j.it.2004.11.014.

PASTOR WA, LIU W, CHEN D, HO J, KIM R, HUNT TJ, LUKIANCHIKOV A, LIU X, POLO JM, JACOBSEN SE, CLARK AT. TFAP2C regulates transcription in human naive pluripotency by opening enhancers. *Nat Cell Biol*. 2018 May;20(5):553-564. doi: 10.1038/s41556-018-0089-0.

PATEL DJ. Structural analysis of nucleic acid aptamers. *Curr Opin Chem Biol*. 1997 Jun;1(1):32-46.

PEREIRA MCL, SECCO M, SUZUKI DE, et al. Contamination of Mesenchymal Stem-Cells with Fibroblasts Accelerates Neurodegeneration in an Experimental Model of Parkinson's Disease. *Stem Cell Rev Reports*. 2011;7(4):1006-1017. doi:10.1007/s12015-011-9256-4.

PFÄFFL MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*. 2001 May 1; 29(9): e45. doi: 10.1093/nar/29.9.e45.

PHILLIPS RJ, BURDICK MD, HONG K, LUTZ MA, MURRAY LA, XUE YY, BELPERIO JA, KEANE MP, STRIETER RM. Circulating fibrocytes traffic to the lungs in response to CXCL12 and mediate fibrosis. *J Clin Invest*. 2004 Aug;114(3):438-46.

PROCKOP DJ, OLSON SD. Clinical trials with adult stem / progenitor cells for tissue repair : let ' s not overlook some essential precautions. *Blood*. 2009;109(8):3147-3151. doi:10.1182/blood-2006-03-013433.

QIAN H, BADALONI A, CHIARA F, STJERNBERG J, POLISETTI N, NIHLBERG K, CONSALEZ GG, SIGVARDSSON M. Molecular characterization of prospectively isolated multipotent mesenchymal progenitors provides new insight into the cellular identity of mesenchymal stem cells in mouse bone marrow. *Mol Cell Biol*. 2013 Feb;33(4):661-77. doi: 10.1128/MCB.01287-12.

RADDATZ MS, DOLF A, ENDL E, KNOLLE P, FAMULOK M, MAYER G. Enrichment of cell-targeting and population-specific aptamers by fluorescence-activated cell sorting. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2008;47(28):5190-3. doi: 10.1002/anie.200800216.

RAMSKÖLD D, WANG ET, BURGE CB, SANDBERG R. An abundance of ubiquitously expressed genes revealed by tissue transcriptome sequence data. *PLoS Comput Biol*. 2009 Dec;5(12):e1000598. doi: 10.1371/journal.pcbi.1000598.

RIEKSTINA U, CAKSTINA I, PARFEJEVS V, HOOGDUIJN M, JANKOVSKIS

G, MUIZNIEKS I, MUCENIECE R, ANCANS J. Embryonic stem cell marker expression pattern in human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, adipose tissue, heart and dermis. *Stem Cell Rev.* 2009 Dec;5(4):378-86. doi: 10.1007/s12015-009-9094-9.

RIMMELLE M. Nucleic acid aptamers as tools and drugs: recent developments. *Chembiochem.* 2003; Oct 6;4(10): 963-971. doi: 10.1002/cbic.200300648.

ROJEWSKI MT, WEBER BM, SCHREZENMEIER H. Phenotypic Characterization of Mesenchymal Stem Cells from Various Tissues. *Transfus Med Hemother.* 2008;35(3):168-184. DOI:10.1159/000129013.

SAFFORD KM, HICOK KC, SAFFORD SD, et al. Neurogenic differentiation of murine and human adipose-derived stromal cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002;294(2):371-379. doi:10.1016/S0006-291X(02)00469-2.

SCHUTZE T, ARNDT PF, MENGER M, WOCHNER A, VINGRON M, ERDMANN VA, LEHRACH H, KAPS C, GLOKLER J. A calibrated diversity assay for nucleic acid libraries using DiStRO—a Diversity Standard of Random Oligonucleotides. *Nucleic Acids* 2010 Res38: e23. doi: 10.1093/nar/gkp1108.

SCHUTZE T, WILHELM B, GREINER N, BRAUN H, PETER F, MORL M, ERDMANN VA, LEHRACH H, KONTHUR Z, MENGER M, ARNDT PF, GLOKLER J. Probing the SELEX Process with Next-Generation Sequencing. *PLoS One* 2011 6: e29604. Doi: 10.1371/journal.pone.0029604.

SECCO M, ZUCCONI E, VIEIRA NM, FOGAÇA LL, CERQUEIRA A, CARVALHO MD, JAZEDJE T, OKAMOTO OK, MUOTRI AR, ZATZ M. Multipotent stem cells from umbilical cord: cord is richer than blood! *Stem Cells.* 2008 Jan;26(1):146-50. DOI: 10.1634/stemcells.2007-0381.

SEFAH K, SHANGGUAN D, XIONG X, O'DONOGHUE MB, TAN W. Development of DNA aptamers using Cell-SELEX. *Nat Protoc.* 2010;5(6):1169-1185. doi:10.1038/nprot.2010.66.

SEFAH K, BAE KM, PHILLIPS JA, SIEMANN DW, SU Z, MCCLELLAN S, VIEWEG J, TAN W. Cell-based selection provides novel molecular probes for cancer stem cells. *Int J Cancer.* 2013 Jun 1;132(11):2578-88. doi: 10.1002/ijc.27936.

SENNETT R, RENDL M. Mesenchymal-epithelial interactions during hair follicle morphogenesis and cycling. *Semin Cell Dev Biol.* 2012;23:917–927.

SERRE D, GURD S, GE B, SLADEK R, SINNETT D, HARMSSEN E, BIBIKOVA M, CHUDIN E, BARKER DL, DICKINSON T, FAN JB, HUDSON TJ. Differential allelic expression in the human genome: a robust approach to identify genetic and epigenetic cis-acting mechanisms regulating gene expression. *PLoS Genet.* 2008 Feb 29;4(2):e1000006. doi: 10.1371/journal.pgen.1000006.

SHAMSIPUR M, FARZIN L, AMOUZADEH TABRIZI M, MOLAABASI F. Highly sensitive label free electrochemical detection of VEGF165 tumor marker based on

"signal off" and "signal on" strategies using an anti-VEGF165 aptamer immobilized BSA-gold nanoclusters/ionic liquid/glassy carbon electrode. *Biosens Bioelectron.* 2015 Dec 15;74:369-75. doi: 10.1016/j.bios.2015.06.079.

SHANGGUAN D, BING T, ZHANG N. CELL-SELEX: Aptamer Selection Against Whole Cells. In: Tan W., Fang X. (eds) *Aptamers Selected by Cell-SELEX for Theranostics.* Springer, Berlin, Heidelberg, 2015.

SHANGGUAN D, LI Y, TANG Z, CAO ZC, CHEN HW, MALLIKARATCHY P, SEFAH K, YANG CJ, TAN W. Aptamers evolved from live cells as effective molecular probes for cancer study. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 Aug 8;103(32):11838-43 doi: 10.1073/pnas.0602615103.

SHEN C, QUAN Q, YANG C, WEN Y, LI H. Histone demethylase JMJD6 regulates cellular migration and proliferation in adipose-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res Ther.* 2018 Aug 9;9(1):212. doi: 10.1186/s13287-018-0949-3.

SHEN Y, ZHANG J, HAO W, WANG T, LIU J, XIE Y, XU S, LIU H. Copolymer micelles function as pH-responsive nanocarriers to enhance the cytotoxicity of a HER2 aptamer in HER2-positive breast cancer cells. *Int J Nanomedicine.* 2018 Jan 25;13:537-553. doi: 10.2147/IJN.S149942.

SHIGDAR S, QIAO L, ZHOU SF, XIANG D, WANG T, LI Y, LIM LY, KONG L, LI L, DUAN W. RNA aptamers targeting cancer stem cell marker CD133. *Cancer Lett.* 2013 Mar 1;330(1):84-95. doi: 10.1016/j.canlet.2012.11.032.

SHUAIJIAN NI, HOUZONG YAO, LILI WANG, JUN LU, FENG JIANG, AIPING LU, GE ZHANG. Chemical Modifications of Nucleic Acid Aptamers for Therapeutic Purposes. *Int J Mol Sci.* 2017 Aug; 18(8): 1683. doi: 10.3390/ijms18081683.

SINGER CF, GSCHWANTLER-KAULICH D, FINK-RETTNER A, HAAS C, HUDELIST G, CZERWENKA K, KUBISTA E. Differential gene expression profile in breast cancer-derived stromal fibroblasts. *Breast Cancer Res Treat.* 2008 Jul;110(2):273-81.

SINGH U, QUINTANILLA RH, GRECIAN S, GEE KR, RAO MS, LAKSHMIPATHY U. Novel live alkaline phosphatase substrate for identification of pluripotent stem cells. *Stem Cell Rev.* 2012 Sep;8(3):1021-9. doi: 10.1007/s12015-012-9359-6.

SMITH LI, A tutorial on Principal Components Analysis (*Computer Science Technical Report No. OUCS-2002-12*). 2002. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/10523/7534>>. Acesso em 10/02/2019.

SORRELL JM, CAPLAN AI. Fibroblast heterogeneity: more than skin deep. *J Cell Sci.* 2004 Feb 15;117(Pt 5):667-75.

SOUZA AG, MARANGONI K, FUJIMURA PT, ALVES PT, SILVA MJ, BASTOS VA, GOULART LR, GOULART VA. 3D Cell-SELEX: Development of RNA aptamers as molecular probes for PC-3 tumor cell line. *Exp Cell Res.* 2016 Feb

15;341(2):147-56. doi: 10.1016/j.yexcr.2016.01.015.

SPINALE FG. Myocardial matrix remodeling and the matrix metalloproteinases: influence on cardiac form and function. *Physiol Rev.* 2007 Oct;87(4):1285-342.

STEFANCSIK R, RANDALL JD, MAO C, SARKAR S. Structure and sequence of the human fast skeletal troponin T (TNNT3) gene: insight into the evolution of the gene and the origin of the developmentally regulated isoforms. *Comp Funct Genomics.* 2003;4(6):609-25. doi: 10.1002/cfg.343.

STEFKOVÁ K, PROCHÁZKOVÁ J, PACHERNÍK J. Alkaline Phosphatase in Stem Cells. *Stem Cells International.* 2015; 1-11, <http://dx.doi.org/10.1155/2015/628368>.

STOLTENBURG R, REINEMANN C, STREHLITZ B. SELEX--a (r)evolutionary method to generate high-affinity nucleic acid ligands. *Biomol Eng.* 2007 Oct;24(4):381-403 doi: 10.1016/j.bioeng.2007.06.001.

STRAKOVA Z, LIVAK M, KREZALEK M, IHNATOVYCH I. Multipotent properties of myofibroblast cells derived from human placenta. *Cell Tissue Res.* 2008; 332(3):479-88. doi: 10.1007/s00441-008-0604-x.

STRIOGA M, VISWANATHAN S, DARINSKAS A, SLABY O, MICHALEK J. Same or not the same? Comparison of adipose tissue-derived versus bone marrow-derived mesenchymal stem and stromal cells. *Stem Cells Dev.* 2012 Sep 20;21(14):2724-52. doi: 10.1089/scd.2011.0722.

SUN D, LU J, ZHONG Y, YU Y, WANG Y, ZHANG B, CHEN Z. Sensitive electrochemical aptamer cytosensor for highly specific detection of cancer cells based on the hybrid nanoelectrocatalysts and enzyme for signal amplification. *Biosens Bioelectron.* 2016 Jan 15;75:301-7. doi: 10.1016/j.bios.2015.08.056.

SUN H, ZHU X, LU PY, ROSATO RR, TAN W, ZU Y. Oligonucleotide aptamers: new tools for targeted cancer therapy. *Mol Ther Nucleic Acids.* 2014;3(April):e182. doi:10.1038/mtna.2014.32.

TAMBOLI VK, BHALLA N, JOLLY P, BOWEN CR, TAYLOR JT, BOWEN JL, ALLENDER CJ, ESTRELA P. Hybrid Synthetic Receptors on MOSFET Devices for Detection of Prostate Specific Antigen in Human Plasma. *Anal Chem.* 2016 Dec 6;88(23):11486-11490. Doi:10.1021/acs.analchem.6b02619.

TAMURA K, NEI M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol Biol Evol.* 1993 May;10(3):512-26. doi:10.1093/oxfordjournals.molbev.a040023

TAN W, DONOVAN MJ, JIANG J. Aptamers from cell-based selection for bioanalytical applications. *Chem Rev.* 2013;113(4):2842-2862. doi:10.1021/cr300468w.

TAN W, FANG X (EDS.), Aptamers Selected by Cell-SELEX for Theranostics, *Springer-Verlag Berlin Heidelberg.* 2015; doi: 10.1007/978-3-662-46226-3\_2.

TAO W, ZENG X, WU J, ZHU X, YU X, ZHANG X, ZHANG J, LIU G, MEI L. Polydopamine-Based Surface Modification of Novel Nanoparticle-Aptamer Bioconjugates for In Vivo Breast Cancer Targeting and Enhanced Therapeutic Effects. *Theranostics*. 2016 Feb 11;6(4):470-84. doi: 10.7150/thno.14184.

The Human Protein Atlas GPR37. Disponível em: <<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000170775-GPR37/tissue>> Acesso em 28/01/2019.

The Human Protein Atlas TFAP2C. Disponível em: <<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000087510-TFAP2C/tissue>>. Acesso em 28/01/2019.

THIEL WH, BAIR T, PEEK AS, et al. Rapid Identification of Cell-Specific, Internalizing RNA Aptamers with Bioinformatics Analyses of a Cell-Based Aptamer Selection. *PLoS One*. 2012;7(9). doi:10.1371/journal.pone.0043836.

THIEL WH. Galaxy Workflows for Web-based Bioinformatics Analysis of Aptamer High-throughput Sequencing Data. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2016;5:e345. doi: 10.1038/mtna.2016.54.

THULABANDU V, CHEN D, ATIT RP. Dermal fibroblast in cutaneous development and healing. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol*. 2018 Mar;7(2). doi: 10.1002/wdev.307.

TOKUNAGA M, INOUE M, JIANG Y, BARNES RH 2ND, BUCHNER DA, CHUN TH. Fat depot-specific gene signature and ECM remodeling of Sca1(high) adipose-derived stem cells. *Matrix Biol*. 2014 Jun;36:28-38. doi: 10.1016/j.matbio.2014.03.005.

TOULMÉ JJ, DI PRIMO C, BOUCARD D. Regulating eukaryotic gene expression with aptamers. *FEBS Lett*. 2004 Jun 1;567(1):55-62 doi: 10.1016/j.febslet.2004.03.111.

TUERK C, GOLD L. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science*. 1990;249(4968):505-510. 56 doi:10.1126/science.2200121.

ULRICH H, MAGDESIAN MH, ALVES MJ, COLLI W. In vitro selection of RNA aptamers that bind to cell adhesion receptors of *Trypanosoma cruzi* and inhibit cell invasion. *J Biol Chem*. 2002 Jun 7;277(23):20756-62 doi: 10.1074/jbc.M111859200.

ULRICH H, WRENGER C. Disease-specific biomarker discovery by aptamers. *Cytometry A*. 2009 Sep;75(9):727-33. doi: 10.1002/cyto.a.20766.

VALERIO, P.; PEREIRA, M. M.; GOES, A. M.; et al. The effect of ionic products from bioactive glass dissolution on osteoblast proliferation and collagen production. *Biomaterials*. 2004 25: 2941-2948.

VÁZQUEZ-VILLA F, GARCÍA-OCAÑA M, GALVÁN JA, GARCÍA-MARTÍNEZ J, GARCÍA-PRAVIA C, MENÉNDEZ-RODRÍGUEZ P, GONZÁLEZ-DEL REY C, BARNEO-SERRA L, DE LOS TOYOS JR. COL11A1/(pro)collagen 11A1 expression is a remarkable biomarker of human invasive carcinoma-associated stromal

cells and carcinoma progression. *Tumour Biol.* 2015 Apr;36(4):2213-22. doi: 10.1007/s13277-015-3295-4.

VIDIC M, SMUC T, JANEZ N, BLANK M, ACCETTO T, MAVRI J, NASCIMENTO IC, NERY AA, ULRICH H, LAH TT. In Silico Selection Approach to Develop DNA Aptamers for a Stem-like Cell Subpopulation of Non-small Lung Cancer Adenocarcinoma Cell Line A549. *Radiol Oncol.* 2018 Mar 25;52(2):152-159. doi: 10.2478/raon-2018-0014.

WAN J, YE L, YANG X, GUO Q, WANG K, HUANG Z, TAN Y, YUAN B, XIE Q. Cell-SELEX based selection and optimization of DNA aptamers for specific recognition of human cholangiocarcinoma QBC-939 cells. *Analyst.* 2015 Sep 7;140(17):5992-7. doi:10.1039/c5an01055a.

WANG C, ZHANG M, YANG G, et al. Single-stranded DNA aptamers that bind differentiated but not parental cells: Subtractive systematic evolution of ligands by exponential enrichment. *J Biotechnol.* 2003;102(1):15-22. doi:10.1016/S0168-1656(02)00360-7.

WANG T, LIU J, GU X, LI D, WANG J, WANG E. Label-free electrochemical aptasensor constructed by layer-by-layer technology for sensitive and selective detection of cancer cells. *Anal Chim Acta.* 2015 Jul 2;882:32-7. doi: 10.1016/j.aca.2015.05.008.

WANG W, KISSIG M, RAJAKUMARI S, HUANG L, LIM HW, WON KJ, SEALE P. Ebf2 is a selective marker of brown and beige adipogenic precursor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014 Oct 7;111(40):14466-71. doi: 10.1073/pnas.1412685111.

WETZIG A, ALAIYA A, AL-ALWAN M, PRADEZ CB, PULICAT MS, AL-MAZROU A, SHINWARI Z, SLEIMAN GM, GHEBEH H, AL-HUM Aidan H, GAAFAR A, KANAAN I, ADRA C. Differential marker expression by cultures rich in mesenchymal stem cells. *BMC Cell Biol.* 2013 Dec 5;14:54. doi: 10.1186/1471-2121-14-54.

WHITE RR, SULLENGER BA, RUSCONI CP. Developing aptamers into therapeutics. *J Clin Invest.* 2000 Oct;106(8):929-934 doi:10.1172/JCI11325.

WILSON C, SZOSTAK JW. Isolation of a fluorophore-specific DNA aptamer with weak redox activity. *Chem Biol.* 1998 Nov;5(11):609-617.

WILSON R. Preparation of single-stranded DNA from PCR products with streptavidin magnetic beads. *Nucleic Acid Ther.* 2011;21(6):437-440. doi:10.1089/nat.2011.0322.

WU Q, WU L, WANG Y, ZHU Z, SONG Y, TAN Y, WANG XF, LI J, KANG D, YANG CJ. Evolution of DNA aptamers for malignant brain tumor gliosarcoma cell recognition and clinical tissue imaging. *Biosens Bioelectron.* 2016 Jun 15;80:1-8. doi: 10.1016/j.bios.2016.01.031.

WYSTRYCHOWSKI W, PATLOLLA B, ZHUGE Y, NEOFYTOS E, ROBBINS RC, BEYGUI RE. Multipotency and cardiomyogenic potential of human adipose-

derived stem cells from epicardium, pericardium, and omentum. *Stem Cell Res Ther.* 2016 Jun 13;7(1):84. doi: 10.1186/s13287-016-0343-y.

XIONG GF, XU R. Function of cancer cell-derived extracellular matrix in tumor progression. *J Cancer Metastasis Treat.* 2016;2:357-64 doi:10.20517/2394-4722.2016.08.

XU J, TENG IT, ZHANG L, DELGADO S, CHAMPANHAC C, CANSIZ S, WU C, SHAN H, TAN W. Molecular Recognition of Human Liver Cancer Cells Using DNA Aptamers Generated via Cell-SELEX. *PLoS One.* 2015 May 4;10(5):e0125863. doi: 10.1371/journal.pone.0125863.

XU Y, PHILLIPS JA, YAN J, LI Q, FAN ZH, TAN W. Aptamer-based microfluidic device for enrichment, sorting, and detection of multiple cancer cells. *Anal Chem.* 2009 Sep 1;81(17):7436-42. doi: 10.1021/ac9012072.

YAN AC, BELL KM, BREEDEN MM, ELLINGTON AD. Aptamers: prospects in therapeutics and biomedicine. *Front Biosci.* 2005 May 1;10:1802-27.

YOON JW, JANG IH, HEO SC, KWON YW, CHOI EJ, BAE KH, SUH DS, KIM SC, HAN S, HAAM S, JUNG J, KIM K, RYU SH, KIM JH. Isolation of Foreign Material-Free Endothelial Progenitor Cells Using CD31 Aptamer and Therapeutic Application for Ischemic Injury. *PLoS One.* 2015 Jul 6;10(7):e0131785. doi: 10.1371/journal.pone.0131785.

YOUNG MD, WAKEFIELD MJ, SMYTH GK, OSHLACK A. Gene ontology analysis for RNA-seq: accounting for selection bias. *Genome Biol.* 2010;11(2):R14. doi: 10.1186/gb-2010-11-2-r14.

YU J, WANG MY, TAI HC, CHENG NC. Cell sheet composed of adipose-derived stem cells demonstrates enhanced skin wound healing with reduced scar formation. *Acta Biomater.* 2018; Sep 1;77:191-200. doi: 10.1016/j.actbio.2018.07.022.

ZAMAY GS, ZAMAY TN, KOLOVSKII VA, SHABANOV AV, GLAZYRIN YE, VEPRINTSEV DV, KRAT AV, ZAMAY SS, KOLOVSKAYA OS, GARGAUN A, SOKOLOV AE, MODESTOV AA, ARTYUKHOV IP, CHESNOKOV NV, PETROVA MM, BEREZOVSKI MV, ZAMAY AS. Electrochemical aptasensor for lung cancer-related protein detection in crude blood plasma samples. *Sci Rep.* 2016 Oct 3;6:34350. doi: 10.1038/srep34350.

ZANNETTINO AC, PATON S, ARTHUR A, KHOR F, ITESCU S, GIMBLE JM, GRONTHOS S. Multipotential human adipose-derived stromal stem cells exhibit a perivascular phenotype in vitro and in vivo. *J Cell Physiol.* 2008 Feb;214(2):413-21. doi: 10.1002/jcp.21210.

ZHANG Y, HONG H, CAI W. Tumor-targeted drug delivery with aptamers. *Curr Med Chem.* 2011;18(27):4185-94.

ZHAO S, ZHANG B, ZHANG Y, GORDON W, DU S, PARADIS T, VINCENT M, SCHACK DV. Bioinformatics for RNA-Seq Data Analysis, Bioinformatics, Ibrokhim

Y. Abdurakhmonov, IntechOpen, 2016 doi: 10.5772/63267. Available from: <https://www.intechopen.com/books/bioinformatics-updated-features-and-applications/bioinformatics-for-rna-seq-data-analysis>

ZHENG S, CHEN L. A hierarchical Bayesian model for comparing transcriptomes at the individual transcript isoform level. *Nucleic Acids Res.* 2009 Jun;37(10):e75. doi: 10.1093/nar/gkp282.

ZHU Y, WANG H, WANG L, ZHU J, JIANG W. Cascade Signal Amplification Based on Copper Nanoparticle-Reported Rolling Circle Amplification for Ultrasensitive Electrochemical Detection of the Prostate Cancer Biomarker. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2016 Feb 3;8(4):2573-81. doi: 10.1021/acsami.5b10285.

ZUK PA, ZHU M, ASHJIAN P, DE UGARTE DA. et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell.* 2002; 13(12):4279-95.

ZUK PA, ZHU M, MIZUNO H, HUANG J. et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng.* 2001;7(2):211-228.

ZUK PA. Adipose-Derived Stem Cells in Tissue Regeneration: A Review. *Int Sch Res Not.* 2013; (1):e713959. doi:10.1155/2013/713959.

ZYCH J, SPANGENBERG L, STIMAMIGLIO MA, ABUD AP, SHIGUNOV P, MARCHINI FK, KULIGOVSKI C, COFRÉ AR, SCHITTINI AV, AGUIAR AM, SENEGAGLIA A, BROFMAN PR, GOLDENBERG S, DALLAGIOVANNA B, NAYA H, CORREA A. Polysome profiling shows the identity of human adipose-derived stromal/stem cells in detail and clearly distinguishes them from dermal fibroblasts. *Stem Cells Dev.* 2014 Nov 15;23(22):2791-802. doi: 10.1089/scd.2013.0496.

## APÊNDICE I

### As amostras de RNA isoladas obedeceram aos critérios de qualidade e integridade verificados por Multiskan™ GO e Agilent Bioanalyzer

Antes de prosseguir ao sequenciamento de RNA, as amostras foram avaliadas quanto à integridade com auxílio do *software* Agilent 2100 Bioanalyzer System Expert e a concentração determinada em espectrofotômetro Multiskan™ GO (Thermo Scientific). Os resultados estão apresentados nas figuras A1 a A6 e tabelas A1 a A6. As amostras de hASC estão aqui denominadas ASC\_1, ASC\_2 e ASC\_3 e as amostras de fibroblastos FIB\_1, FIB\_2 e FIB\_3.

#### ASC\_1

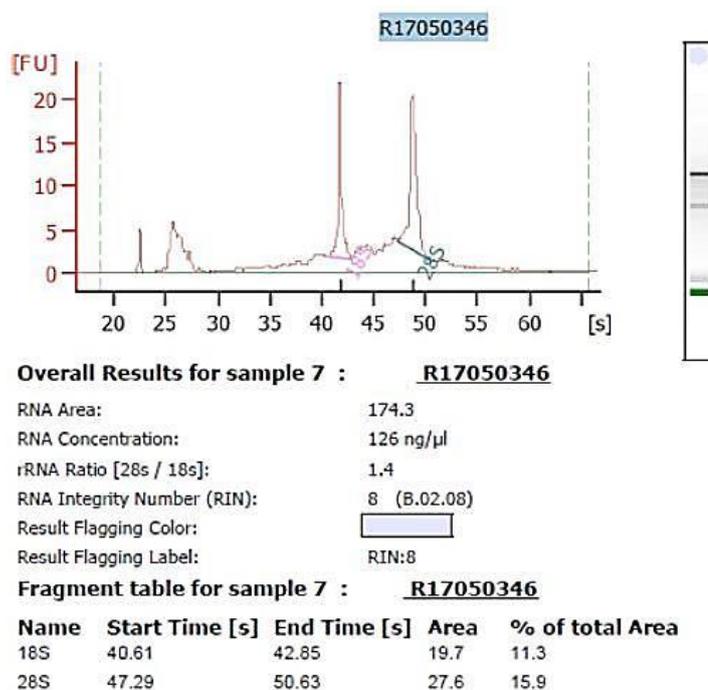


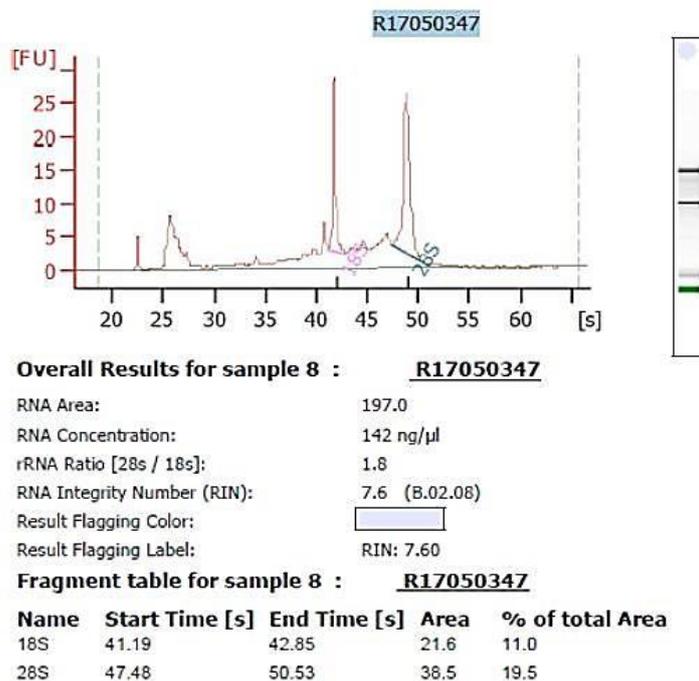
Figura A1. Imagem dos resultados da análise de integridade e qualidade da amostra ASC\_1 adquiridas no *software* Agilent 2100 Bioanalyzer System Expert.

Tabela A1. Análise de qualidade da amostra ASC\_1

Amostra	Concentração (ng/ $\mu$ L)	Razão 28s/18s	Razão 260/280	Razão 260/230	RIN
ASC_1	832	1,4	2,01	1,03	8

Os resultados da quantificação da concentração de RNA (ng/ $\mu$ L), razão 260/280 e razão 260/230 foram obtidos em espectrofotômetro Multiskan™ GO. Os demais parâmetros de qualidade da amostra ASC\_1 (razão 28s/18s e RIN) foram adquiridos no *software* Agilent 2100 Bioanalyzer System Expert.

## ASC\_2



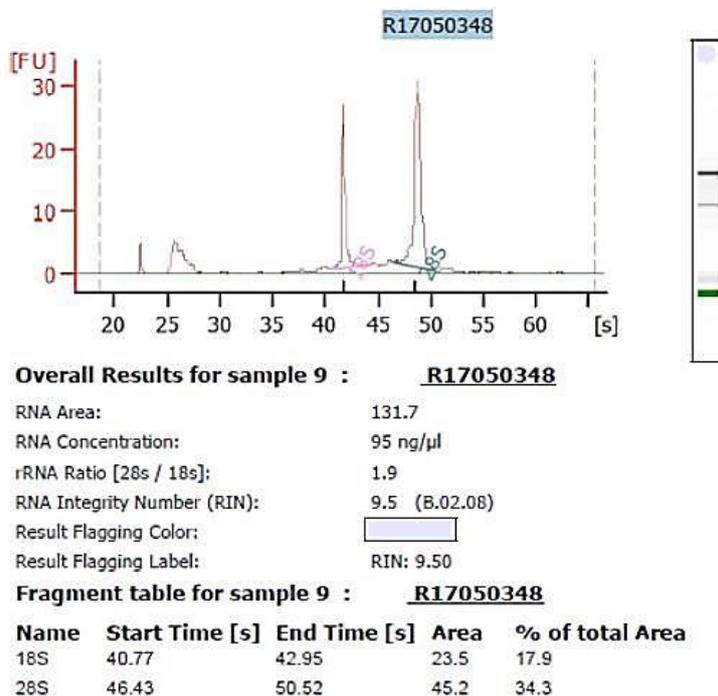
**Figura A2.** Imagem dos resultados da análise de integridade e qualidade da amostra ASC\_2 adquiridas no *software* Agilent 2100 Bioanalyzer System Expert.

**Tabela A2.** Análise de qualidade da amostra ASC\_2.

Amostra	Concentração (ng/μL)	Razão 28s/18s	Razão 260/280	Razão 260/230	RIN
ASC_2	142	1,8	1,97	0,90	7,6

Os resultados da quantificação da concentração de RNA (ng/μL), razão 260/280 e razão 260/230 foram obtidos em espectrofotômetro Multiskan™ GO. Os demais parâmetros de qualidade da amostra ASC1 (razão 28s/18s e RIN) foram adquiridos no *software* Agilent 2100 Bioanalyzer System Expert.

## ASC\_3



**Figura A3.** Imagem dos resultados da análise de integridade e qualidade da amostra ASC\_3 adquiridas no *software* Agilent 2100 Bioanalyzer System Expert.

**Tabela A3.** Análise de qualidade da amostra ASC\_3

Amostra	Concentração (ng/ $\mu$ L)	Razão 28s/18s	Razão 260/280	Razão 260/230	RIN
ASC_3	475	1,9	1,96	1,80	9,5

Os resultados da quantificação da concentração de RNA (ng/ $\mu$ L), razão 260/280 e razão 260/230 foram obtidos em espectrofotômetro Multiskan™ GO. Os demais parâmetros de qualidade da amostra ASC1 (razão 28s/18s e RIN) foram adquiridos no *software* Agilent 2100 Bioanalyzer System Expert.

## FIB\_1

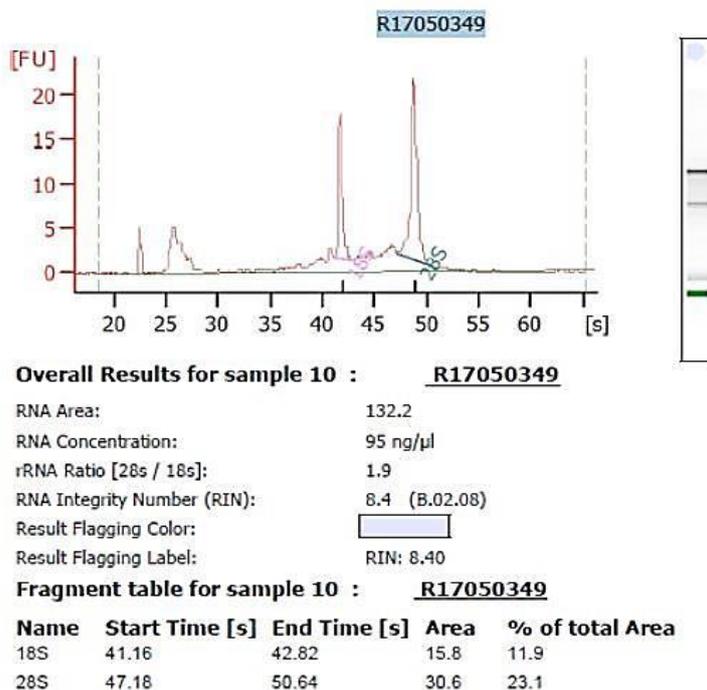


Figura A4. Imagem dos resultados da análise de integridade e qualidade da amostra FIB\_1 adquiridas no *software* Agilent 2100 Bioanalyzer System Expert.

Tabela A4. Análise de qualidade da amostra FIB\_1

Amostra	Concentração (ng/μL)	Razão 28s/18s	Razão 260/280	Razão 260/230	RIN
FIB_1	285	1,9	1,98	1,56	8,4

Os resultados da quantificação da concentração de RNA (ng/μL), razão 260/280 e razão 260/230 foram obtidos em espectrofotômetro Multiskan™ GO. Os demais parâmetros de qualidade da amostra ASC1 (razão 28s/18s e RIN) foram adquiridos no *software* Agilent 2100 Bioanalyzer System Expert.

## FIB\_2

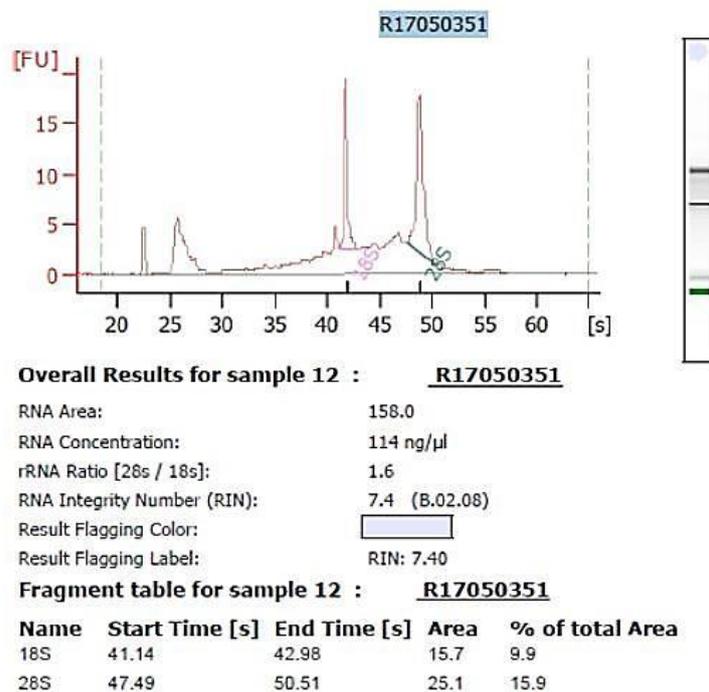


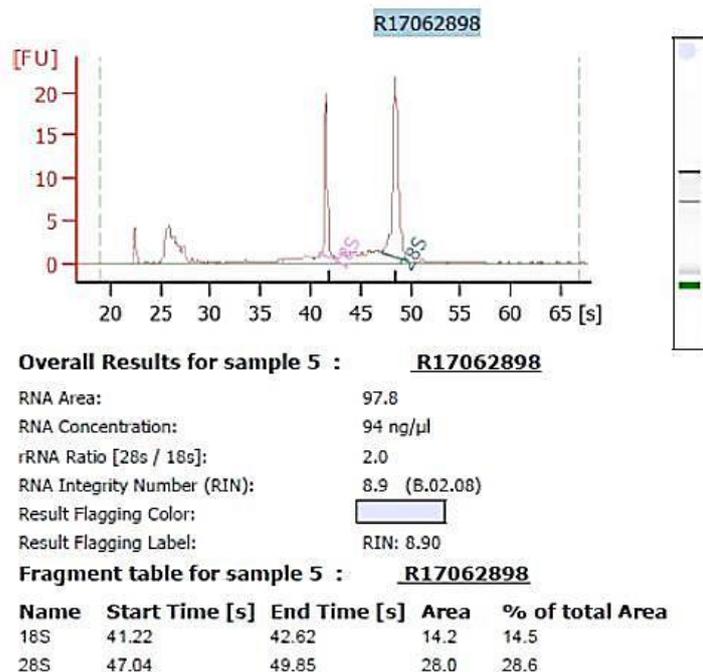
Figura A5. Imagem dos resultados da análise de integridade e qualidade da amostra FIB\_2 adquiridas no *software* Agilent 2100 Bioanalyzer System Expert.

Tabela A5. Análise de qualidade da amostra FIB\_2

Amostra	Concentração (ng/ $\mu$ L)	Razão 28s/18s	Razão 260/280	Razão 260/230	RIN
FIB_2	114	1,6	1,93	0,85	7,4

Os resultados da quantificação da concentração de RNA (ng/ $\mu$ L), razão 260/280 e razão 260/230 foram obtidos em espectrofotômetro Multiskan™ GO. Os demais parâmetros de qualidade da amostra ASC1 (razão 28s/18s e RIN) foram adquiridos no *software* Agilent 2100 Bioanalyzer System Expert.

### FIB\_3



**Figura A6.** Imagem dos resultados da análise de integridade e qualidade da amostra FIB\_3 adquiridas no *software* Agilent 2100 Bioanalyzer System Expert.

**Tabela A6.** Análise de qualidade da amostra FIB\_3

Amostra	Concentração (ng/μL)	Razão 28s/18s	Razão 260/280	Razão 260/230	RIN
FIB 3	940	2,0	2,02	2,02	8,9

Os resultados da quantificação da concentração de RNA (ng/μL), razão 260/280 e razão 260/230 foram obtidos em espectrofotômetro Multiskan™ GO. Os demais parâmetros de qualidade da amostra ASC1 (razão 28s/18s e RIN) foram adquiridos no *software* Agilent 2100 Bioanalyzer System Expert.

**ANEXO I – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM  
PESQUISA-UFMG**

## **ANEXO II- MANUSCRITO**

# HUMAN ADIPOSE DERIVED-STEM CELLS AND DERMAL FIBROBLASTS SHOWED DIFFERENT GENE EXPRESSION PROFILE IN AN RNA-SEQ AND QUANTITATIVE REAL-TIME PCR ANALYSIS

Mariane Izabella Abreu de Melo<sup>1</sup>, Pricila da Silva Cunha<sup>1</sup>, Marcelo Coutinho de Miranda<sup>1</sup>, Camila Cristina Fraga Faraco<sup>2</sup>, Joana Lobato Barbosa<sup>1</sup>, Andrea da Fonseca Ferreira<sup>3</sup>, Marianna Kunrath Lima<sup>1</sup>, Jerusa Araújo Quintão Arantes Faria<sup>4</sup>, Michele Ângela Rodrigues<sup>5</sup>, Alfredo Miranda de Goes<sup>1,6</sup>, Dawidson Assis Gomes<sup>1</sup>.

## Authors' Information

<sup>1</sup>Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

<sup>2</sup>Department of Biochemistry, McGill University, Montreal, Quebec, Canada.

<sup>3</sup>Interdisciplinary Stem Cell Institute, Miller School of Medicine, University of Miami, Florida, USA.

<sup>4</sup> Departamento de Ciências Fisiológicas, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Brazil.

<sup>5</sup> Digestive Diseases Department, Yale University, New Haven, Connecticut, USA.

<sup>6</sup> Departamento de Patologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

**To whom correspondence should be addressed:** Dawidson A. Gomes.

E-mail:dawidson@icb.ufmg.br. Instituto de Ciências Biológicas, bloco Q4, sala 238. Universidade Federal de Minas Gerais. Av. Antônio Carlos, 6627. Belo Horizonte - MG, 31270-901, Brazil.

Key words: RNA-Seq, human adipose-derived stem cells, dermal fibroblasts, qPCR, gene expression.

## 1.1 Abstract

Human adipose tissue-derived stem cells (ASC) are self-renewing and have the potential to differentiate into several cell lines. Due to these particularities, these cells are promising for application in regenerative medicine. However, the risk of contamination with dermal fibroblasts (FIB) is a concern in stem cell therapy. Thus, it is imperative to develop new strategies that contribute to the distinction between these two cell types. In this study, ASC and FIB samples were analyzed and compared by RNA sequencing (RNA-Seq) and Quantitative Real-time PCR (qPCR) for gene expression profile. We identified more than 2,000 differentially expressed genes (DEG) between the two cell types and the gene functions and enriched pathways (GO and KEGG) related to distinct biological and molecular processes in both cells. Moreover, we validated 16 differentially expressed genes present in the list of DEG *in vitro*. In conclusion, we showed that ASC and FIB have a distinct gene expression profile. Given the diversity of upregulated and downregulated genes and their diverse functions in the cellular metabolism, this study contribute to the validation of more cell markers and a deeper understanding of the biological machinery that distinguishes the behavior and function of these cells.

## 1.2 Introduction

In recent years, several studies have sought to understand the biology of adult mesenchymal stem/stromal cells (MSC) derived from different sources as well as dermal fibroblasts, highlighting the main characteristics that distinguish these two cell types. Adipose-derived stem cells (ASC) are recognized as a population of mesenchymal cells with enormous therapeutic potential. These cells can differentiate into several cell lines derived from the three germ layers: endoderm, mesoderm, and ectoderm. ASC also mediates inflammation and vascularization during tissue regeneration [1]. MSC and dermal fibroblasts have markers in common, including positive labeling for CD105, CD90, CD73, CD44 and negative labeling for CD45 and CD31 [2]. It is known that MSC exhibit a variation in gene expression that depends on the tissue, location and genetic background of the individual [3,4].

Unlike MSC, human dermal fibroblasts (FIB) are terminally differentiated mesenchymal cells responsible for tissue maintenance, development, and repair. These

cells provide mechanical strength to the tissues by producing extracellular matrix (ECM) and are characterized by the absence of epithelial, vascular and leukocyte markers [5]. Although all dermal fibroblasts appear to be morphologically similar, they have distinct identities regarding the position and anatomical site they occupy, playing a relevant role, for example, in resolving wounds and scar formation in skin [6, 7, 8].

The risk of contamination with other cell types, especially fibroblasts, is a concern in MSC therapy. A preclinical study demonstrated that contamination with dermal fibroblasts affected the clinical outcome of cell therapy in an experimental model of Parkinson's disease. Evidence suggests that fibroblasts impaired the beneficial effects of stem cells promoting a neurotoxic effect [9]. Contamination with fibroblasts can also lead to a decrease in stem cells ability to differentiate, increased fibrosis and induction of senescence, which also impairs MSC therapy. The elimination of fibroblasts from mesenchymal stem cell cultures increases the yield of stem cells obtained as well as their differentiation potential, and prevents the formation of tumors after transplantation [10, 11]. It is necessary to explore the gene expression profile of both cells and the correlation to their genesis, biological characteristics, terminal differentiation and roles in the regeneration and healing processes. Moreover, in-depth analyzes are needed to determine new differential markers for these cells

Recently, RNA Sequencing (RNA-Seq) has emerged as an important technique of transcriptome analysis due to the acquisition of large-scale data [12]. Jääger and colleagues analyzed the dynamics of ASC and dermal fibroblasts differentiation from samples of matched individuals by RNA-Seq [3]. Both cells presented approximately 150 differentially expressed genes in the undifferentiated state, considering a false discovery rate (FDR) of 5%. These distinct gene expression patterns were mainly related to genes involved in regulation of the cell cycle, development processes, signal transduction and structural organization of cells. Otherwise, polysome-bound mRNA profiling revealed that approximately 1,547 genes were differentially expressed in the two cell types and these genes were related to cell adhesion, extracellular matrix, cell differentiation and proliferation [4]. Also, some of these genes from polysomal fraction were validated by Quantitative real time polymerase chain reaction (qPCR) confirming the sequencing results [13]. Others have shown that the number of estimated increases in gene expression evaluated by RNA-Seq has high correlation and consistency with the results of qPCR [14, 15].

Our study addresses the data obtained from RNA sequencing of three independent ASC and FIB samples and its biological interpretations. We hypothesize that the analyzes of differential gene expression and enriched pathways are essential tools for understanding the main properties that distinguish both cell types. Here, we obtained 2,199 differential expressed genes between adipose-derived stem cells and fibroblasts and most of the Gene Ontology (GO) enriched terms were related to molecular functions and biological process that are distinct between ASC and FIB. KEGG analysis showed enrichment of pathways in ASC related to DNA replication, cell cycle, ECM- receptor interaction, axon guidance, and others. A group of 16 genes from these analyzes were selected and validated by qPCR with independent samples, allowing a correlation between RNA-Seq data and those generated *in vitro*. Therefore, the methods adopted in this study contributed to distinguish both cell types at the level of RNA expression profile establishing a correlation with their biological functions.

### **1.3 Materials and Methods**

#### **1.3.1 Cells Isolation**

ASC and FIB were isolated from subcutaneous adipose tissue and skin samples donated by aesthetics surgery patients according to the regulations approved by the *Universidade Federal de Minas Gerais's* Research Ethics Committee (number: 02508018.1.0000.5149). ASC extraction was carried out as described by Zuk et al. [16]. Briefly, liposuction samples were washed twice with phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) to remove blood cells, and incubated with 0.1% collagenase solution (Thermo Fisher Scientific) for 1 hour at 37°C. After incubation, samples were centrifuged at  $300 \times g$  for 7 min, the supernatant was discarded, and the remaining pellet was resuspended in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Thermo Fisher Scientific) containing 10% fetal bovine serum (FBS; Thermo Fisher Scientific) and 1% penicillin/streptomycin (PS; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Cells were transferred to culture flasks and kept in a humidified atmosphere of 95% air and 5% CO<sub>2</sub> at 37°C. FIB was isolated from skin. Epidermis and dermis were separated from subcutaneous adipose tissue with scissors, and the fatty tissue was discarded. Then, skin samples were fragmented into 0.5 cm<sup>2</sup> pieces and incubated in dispase solution (2.5 UI) overnight at 4°C. After this, the dermis and

epidermis were separated with tweezers. The dermis was incubated in a 0.1% collagenase solution (Thermo Fisher Scientific) for 3 h at 37°C. After this incubation, dermal fragments that remained undigested were discarded, and the supernatant underwent centrifugation for 7 min at 300 × g. The resulting pellet was resuspended in DMEM containing 10% FBS and 1% PS and transferred to a culture flask. Both cell types were kept in a humidified atmosphere of 95% air and 5% CO<sub>2</sub> at 37°C and the culture medium was changed every 3 days. Cells were expanded to the 4th or 5th passage for the experiments.

### 1.3.2 *RNA Sequencing and Bioinformatics Analyzes*

Total RNA was extracted from the culture flask containing cells using 1 mL TRIzol reagent (Thermo Scientific) according to the manufacturer's instructions. The concentration of RNA was determined by reading the absorbance at 260/280 nm in Multiskan™ Go spectrophotometer (Thermo Scientific) and the quality and integrity of the RNA was evaluated using Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent, Santa Clara, CA, USA). RNA sequencing and analyzes were performed in collaboration with GenOne Biotechnologies (Rio de Janeiro, Brazil). RNA libraries were constructed with the NEBNext® Ultra™ RNA Library Prep kit (NEB, Ipswich, MA, USA), following manufacturer's instructions. Samples were sequenced on Illumina HiSeq 2500™ Platform (Illumina®, San Diego, CA, USA) with short paired-ends reads (125-bp /150-bp). ASC biological triplicates were identified as ASC\_1, ASC\_2 and ASC\_3 and dermal fibroblast triplicates were identified by FIB\_1, FIB\_2 and FIB\_3. Raw data from the high-throughput sequencing performed on the Illumina HiSeq 2500™ platform were transformed into sequenced raw reads by the CASAVA base recognition tool. To obtain clean reads, the sequences containing adapters, reads with N > 10% (N represents the bases that could not be determined) and reads with a low value of Q score were removed.

Reference genome and gene model annotation files were downloaded from the genome website browser (NCBI/UCSC/Ensembl). Indexes of the reference genome were built using Bowtie v2.0.6 and paired-end clean reads were aligned to the reference genome using TopHat v2.0.9 [17, 18]. Principal Component Analysis (PCA) and Pearson Correlation Coefficient (R<sup>2</sup>) were used to visualize differences and similarities between biological replicates of ASC and FIB and a dendrogram represented

associations and similarities between biological replicates [19,20]. HTSeq v0.6.1 was used to count the read numbers mapped of each gene. Fragments Per Kilobase of transcript sequence per Millions of base pairs sequenced (FPKM) considers the effect of sequencing depth and gene length on the counting of fragments [21]. To allow for log adjustment, genes with 0 FPKM were assigned a value of  $p < 0.001$ . Correlation was determined using the `cor.test` function in R with options set `alternative = "greater"` and `method = "Spearman"`. We clustered different samples using expression level FPKM to see the correlation using hierarchical clustering distance method with the function of the heatmap. Hierarchical clustering analysis was carried out with the `log10 (FPKM+1)` of union differential expression genes of all comparison groups under different experimental conditions. Differential expression analysis between two conditions/groups was performed using the DESeq2 R package (2\_1.6.3). P-values were adjusted using the Benjamini and Hochberg's approach for controlling the False Discovery Rate (FDR). Genes with an adjusted P-value  $< 0.05$  found by DESeq2 were assigned as differentially expressed [22]. Gene Ontology (GO) enrichment analysis of differentially expressed genes was implemented by the Goseq R package, in which gene length bias was corrected [23]. GO terms with corrected P-value less than 0.05 were considered significantly enriched by differential expressed genes. KEGG is a database resource for understanding high-level functions and utilities of the biological system, such as the cell, the organism and the ecosystem, from molecular-level information, especially large-scale molecular datasets generated by genome sequencing and other high-throughput experimental technologies, whose significance is identified by the hypergeometric test. (<http://www.genome.jp/kegg/>) [24]. We used KOBAS software to test the statistical enrichment of differential expression genes in KEGG pathways. The results of the enriched KEGG pathway were demonstrated using Scatterplot. Rich factor refers to the ratio between the number of genes differentially expressed and the number of all genes annotated in a specific pathway. A higher Rich factor means a significant degree of enrichment. Q-value is the result after several tests of p-value hypotheses; the closer to zero, more significant is the enrichment. Gene Number factor is related to the absolute number of differentially expressed genes found in the pathways (from 10 to 60).

### 1.3.3 Validation of differentially expressed genes using qPCR

Total RNA was extracted from ASC and FIB using TRIzol™ Reagent (Thermo Scientific) followed by treatment with DNase (Promega, Madison, WI, USA). Synthesis of first strand cDNA was performed using kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). After, qPCR was performed to verify the expression of specific genes: *MMP3*, *SCRGI*, *TFAP2C*, *TNNT3*, *COL11A1*, *PDE1C*, *CD36*, *DMD*, *ZFPM2*, *TINAGL1*, *EBF2*, *GPR37*, *LAMC3*, *COL23A1*, *ALPL*, *MATK*, *RPL13A* and *GAPDH* genes were used as a control of constitutive expression. We used specific primers designed using the tools BLAST and Primer 3 Input. Gene names, the sequence of primers and amplicon size are indicated in Table 1.

**Table 1. List of primers forward (F') and reverse (R') designed for gene amplification and amplicon length (bp – base pair)**

Gene	Primer F (5'- 3')	Primer R (5'- 3')	Amplicon (bp)
<i>MMP3</i>	GACAAAGGATACAACAGGGACCA	CCGAGTCAGGTCTGTGAGTG	136
<i>SCRGI</i>	CTGGGATGGGAAGGGATGTG	AAAACGTCTTTTGGGCAGCA	75
<i>TFAP2C</i>	GCAGAACTACATCAAAGAAGCC	TGTTTCTCCATTTTCTCCAGGG	108
<i>TNNT3</i>	ACCGAGACCCAAACTCACTG	GCTTCAAAGTGGCTGTGCGATG	129
<i>COL11A1</i>	TGACTATGAGTATGGGGAAGCAG	TCAACGATGTTTGCCTCCGT	105
<i>PDE1C</i>	GTCGCCAACCAAGGAGATTGA	GAGCCGAAGCCAGATTTTCTC	88
<i>CD36</i>	GAAGTGTGGGCTCATCGCT	TAAGCAGGTCTCCAAGTGGC	86
<i>DMD</i>	GTTGGCAGTCAAACCTTCGGAC	TGGCTTTCCAGGGGTATTTCT	144
<i>ZFPM2</i>	TCCATCAGAGGAAACAGACATCA	CCACTTCTTCGCAGCTCAGAT	101
<i>TINAGL1</i>	CAGTCTTGGGAACGTAAGTGGG	TGGTTCTTGGTCACACTGCC	80
<i>EBF2</i>	AGTGGTGGACGCTAATGTCG	CGCCAGGACGAAGTGAAAGA	115
<i>GPR37</i>	TGAGCAAGGAGGATTTGGGG	ATACCACCACAGTCTCGCAC	131
<i>LAMC3</i>	TGTTTCATGTCCCACTGGCTAC	GCATCTCCCTCTTGATCCCG	70
<i>COL23A1</i>	CTCCATCCGAATGTGTCTGC	GGTAGCCATCTCGTCCTGATTG	105
<i>ALPL</i>	CAGGGGACATGCAGTACGAG	CGTGGTCAATTCTGCCTCCT	141
<i>MATK</i>	ACATTGGGAGCACAGATCGG	CTGGGCTGTACATCACACT	108
<i>RPL13A</i>	TATGAGTGAAAGGGAGCC	ATGACCAGGTGGAAAGTC	82
<i>GAPDH</i>	ACAACCTTGGTATCGTGGAAGG	GCCATCACGCCACAGTTTC	101

Real-time PCR validation was performed using GoTaq® qPCR Master Mix (Promega). Amounts of RNA and cDNA were used as recommended by the manufacturer. Reactions were read using CFX Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) and analyzed with Bio-Rad CFX Manager software (Bio-Rad Laboratories). Relative gene expression was calculated by

the method developed by Pfaffl [25]. Real-time PCR analysis was performed on the Graph Pad Prism software. Data represent four independent experiments and are expressed as the mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM). We used D'Agostino & Pearson normality test, and relative quantification of gene expression was compared using Unpaired-t test with Welch correction.  $P < 0.05$  were considered significant.

## 1.4 Results and Discussion

### 1.4.1 *The quality analysis of the sequenced samples showed accuracy and high quality of base calling*

Base calling is a crucial phase of the sequencing process [26]. Here, we acquired above 50 million raw reads for ASC replicates, and over 55 million raw reads for FIB replicates. Regarding clean reads, we obtained values higher than 48 million reads for ASC and 53 million reads for FIB. The number of clean bases was calculated by multiplying the number of sequences by their length, given in unit G. The Q scores are defined as a logarithmic property related to the probabilities of error in the base calling (Q20= 99% and Q30= 99.9%). More than 95.9% of the bases read in the samples received a Q20 score and more than 90.2% received a Q30 score, indicating the high quality of the sequencing and base calling. The reads GC content ranged from 53.91% to 57.73%. See Table S1 in the Supplementary Material for comprehensive data analysis (**Table S1**).

### 1.4.2 *Sample reads were mapped to the human reference genome*

The summary of mapping results obtained for each sample can be visualized in the **Supplementary Material (Table S2)**. Sequencing results yielded more than 40 million mapped reads with a ratio between mapped reads and total reads greater than 83%. According to ENCODE guidelines, each long RNA-Seq library must have a minimum of 30 million aligned reads/mate-pairs [27]. Reads were also distributed to exon, intron and intergenic regions. In this study, we obtained some mapped reads for all samples predominantly in exon regions (>95%), which is important for differential gene expression analysis (data not shown). To evaluate the gene expression levels, FPKM was calculated for each predicted gene (~48,163 genes). Approximately 10% of

the genes were expressed at relatively high levels with FPKM  $\geq 15$  and ~79% of the genes were expressed at low levels (FRKM = 0-3) in ASC and FIB replicates as shown in **Supplementary Material (Table S3)**.

#### 1.4.3 *Principal Component Analysis (PCA) and Pearson Correlation Coefficient ( $R^2$ ) highlighted differences and similarities between ASC and FIB biological replicates*

PCA is a multivariate ordination analysis method that considers the FPKM of all samples, summarizing the total variance. This analysis transfers many genes that will affect the expression pattern in some major components by reducing the number of dimensions without significant loss of information from the original variables. Thus, these original variables are transformed into a smaller set of linearly uncorrelated variables that represents the main components [18]. PCA analysis showed that ASC and FIB biological replicates formed distinct groups. Likewise, according to the 2D plot, FIB\_3 was distinct from the rest of the fibroblast samples (FIB\_1 and FIB\_2). This observation can be related to the batch effect, which is commonly observed when biological samples are analyzed by RNA-Seq. The first two PCs (PC1 and PC2) accounted for 34.41% and 24.22%, respectively, of the total variation in the data set (**Figure 1**).

Otherwise, the dendrogram establishes a relation of proximity between groups, classifying the samples according to the similarity between them. These results indicated that the cell-specific populations were organized in distinct sample clusters, supporting PCA observations (**Figure 2**). In a similar study, Jääger and colleagues [3] also observed in a PCA analysis that undifferentiated adipose-derived stem cells and fibroblasts were distributed in two distinct clusters. Pearson's correlation or Pearson's Product-Moment Correlation ( $R^2$ ) is indicative of a linear correlation between two normally distributed continuous variables, whose calculation is based on the covariance method [2]. Correlation between samples is an important indicator to test the reliability of the experiment. ENCODE project [28] suggests that the square of the Pearson correlation coefficient ( $R^2$ ) should be greater than 0.92 (under ideal experiment conditions). In the present study,  $R^2$  was greater than 0.98 between ASC replicates and greater than 0.929 between FIB replicates, indicating a high correlation index between

biological replicates (**Figure 3**). Taken together, PCA and Pearson correlation findings confirm that the transcriptome profiles are distinct between the two cell types more than individuals' particularities.

#### 1.4.4 *Bioinformatics analysis showed more than 2,000 differentially expressed genes between human adipose-derived stem cells and dermal fibroblasts*

In RNA-Seq, gene expression level is estimated by the abundance of transcripts that mapped to a given genome or exon. DESeq2 provide statistical routines for determining differential expression in digital gene expression data using a model based on the negative binomial distribution. Reads counts were used for differential gene expression analysis [22]. An overview of differential expressed genes (DEG) can be shown by the Volcano diagram, where the threshold of the differentially expressed genes was established from the adjusted p-value  $<0.05$ . The lower the adjusted p-value, the more reliable is the significance of the differential expression of the genes between the groups. Approximately 2,199 genes were identified: 910 genes are upregulated and 1,289 downregulated in ASC in comparison with FIB (Figure 4). The list of DEG containing read counts,  $\log_2$  fold change, p-value, adjusted p-value, and gene information is available in **Supplementary Material (Table S4)**. Cluster Analysis was used to estimate expression pattern of differential expression genes under diverse experimental conditions, with the reason that same kind of transcripts have similar functions or participate in the same metabolic processes or cellular pathways. In the graphic representation on Figure 5, lines represent the clusters of genes; low expression genes are represented in blue and genes with high expression are represented in red. The descending color scale from red to blue indicates  $\log_{10}(\text{FPKM} + 1)$  from highest to lowest value (**Figure 5**). The heatmap highlights the distinct gene expression profile between adipose-derived stem cells and fibroblasts.

A study on polysome-bound mRNA profile revealed that about 1,547 genes were differentially expressed between ASC and fibroblasts with an FDR of 0.1% [4]. In a comparison between the list of DEG found in the present study and the list of the authors, a total of 703 genes were found in common. However, we evaluated the total RNA of the cells, including those not associated with the translation machinery. Jäger and colleagues [3] analyzing 5 undifferentiated ASC replicates, and 6 undifferentiated fibroblast replicates obtained 178 differentially expressed genes, 59 with high

expression and 119 genes with low expression in ASC, with an FDR of 5%. We found 26 upregulated genes and 59 downregulated genes in ASC in common with these authors, but the DEG list generated in this study included a higher number of genes, which was not previously shown.

#### 1.4.5 *Upregulated and downregulated genes in ASC were classified using Gene Ontology (GO)*

Gene Ontology is a standardized international classification system that describes the function of genes. It includes genes classified into three main groups: Cellular Component, Molecular Function and Biological Process. GO terms with corrected P-values  $< 0.05$  were considered significantly enriched for differentially expressed genes. The histogram displays the 30 most enriched GO terms. In **Figure 6**, the most significant enriched GO term of upregulated genes in ASC were related to molecular function, more specifically protein binding. The most significant GO terms of downregulated genes were related to biological processes and molecular function, more specifically to microtubules (processes, movement, and motor activity), protein phosphorylation, ATP binding, adenyly nucleotide and adenyly ribonucleotide binding, and tubulin binding (**Figure 7**). These observations are related to differences in cellular energy metabolism, to the distinct behavior of the cytoskeleton of these cells as well as to the differences in the interactions they establish with the extracellular environment. The most enriched GO terms related to downregulated genes in ASC indicates that fibroblasts have a greater proliferative capacity in comparison to mesenchymal stem cells. Accordingly, in a study conducted by Heo and colleagues [29] it was observed that the growth of mesenchymal stem cells derived from bone marrow, umbilical cord and adipose tissue was lower than that of cultured fibroblasts. Only placental-derived stem cells are more proliferative than dermal fibroblasts. Debnath & Chelluri [30] observed that, on average, ASC showed a slower doubling time (lag) in its growth curve along the passages when maintained in culture. They also studied the proliferation of ASC was compared with that of dermal fibroblasts by studying BrdU incorporation, and fibroblasts showed significantly higher proliferation values than ASC [4]. Thus, we suggest that the fact that fibroblasts are highly proliferative cells may intensify the problem of contamination of stem cell cultures used in cell therapy. Accordingly, a distinct gene expression profile between ASC and FIB was identified mainly due to

differences in the expression of genes involved in cell cycle regulation, developmental processes and also in the structural organization of cells (cytoskeleton, extracellular matrix, and adhesion) [3]. Other analyzes of GO coordinated by ZYCH and colleagues [4] identified terms related to cell adhesion, signaling, cell cycle, proliferation and cellular development processes that distinguished both cells.

#### 1.4.6 *Differentially expressed genes are involved in several enriched pathways analyzed by KEGG*

It is possible to identify which pathways the differentially expressed genes are involved through the KEGG Pathway Enrichment Analysis tool. In **Figure 8**, KEGG enriched pathway results were evaluated by a Rich factor, Q-value and number of differential expression genes involved in each pathway. The most enriched and higher Rich factor pathways in ASC in comparison with FIB are related to the receptor and extracellular matrix interaction, DNA replication, cell cycle, and axon orientation. The pathways in cancer and PI3K-AKT signaling presented a significant degree of enrichment with a higher number of genes, but with lower Rich factor value. The pathways related to focal adhesion showed significant enrichment with a lower Rich factor, but with a small number of related genes, as well as the pathways involved in protein digestion and absorption, Fanconi's anemia and small cell lung cancer. Previous KEGG analysis showed that cancer-enriched pathways, PI3K-AKT signaling, focal adhesion, and extracellular matrix-receptor interaction were also found in adipose tissue-derived stem cells but downregulated in comparison with mesenchymal stem cells derived from bone marrow [31]. However, these pathways were not compared to fibroblasts as a reference condition, as approached in this analysis. It is important to highlight that our results address the 30 most enriched general pathways, without detailing a specific pathway in ASC. These genes of the most enriched pathways can also participate in alternative pathways, in addition to those here described.

#### 1.4.7 *Genes were validated as upregulated and downregulated in ASC in comparison with FIB*

Biological replicas are required for any experiment, including RNA-Seq. Replicas are important for two main purposes: demonstrate that the experiment is

reproducible and analyze the difference in gene expression between the samples of the same group, which can be determined by calculating the adjusted p-value [32]. Validation using different biological replicates from the same cell type can confirm the biological conclusions of a given study [33]. We selected ten genes that showed positive regulation and six genes that showed negative regulation in ASC and correlated with the probable biological relevance to distinguish ASC and FIB. The lower adjusted p-value between ASC samples and FIB samples indicates the homogeneity of the expression and higher significance in the differential expression of the genes. Therefore, we selected 16 genes with an adjusted p-value equal to or less than  $5.33 \times 10^{-8}$  and the minimum p-value selected was  $6.41 \times 10^{-38}$ . These values are available in **Supplementary Material (Table S5)**. *ALPL*, which presented the lowest negative adjusted p-value, was selected with the additional aim of verifying previous literature findings that observed significant expression of this gene in human MSC [29,34]. The mean and standard error (Log 2), as well as the relative quantification plots of each gene (ASC in comparison with FIB), were summarized in **Table 4 and 5** and **Figures 9 and 10**.

**Table 4. Upregulated Genes in ASC assessed by qPCR**

<b>Gene</b>	<b>Relative Quantification (Log 2)</b>	<b>SEM</b>
<i>COL11A1</i>	7.14	±1.35
<i>CD36</i>	8.65	±1.63
<i>TNNT3</i>	7.86	±0.83
<i>ALPL</i>	6.66	±0.91
<i>TINAGL1</i>	6.52	±0.66
<i>SCRG1</i>	5.91	±0.72
<i>DMD</i>	2.26	±0.68
<i>PDE1C</i>	3.68	±0.31
<i>ZFPM2</i>	1.38	±0.25
<i>EBF2</i>	4.24	±0.65

**Table 5. Downregulated genes in ASC assessed by qPCR**

Gene	Relative Quantification (Log 2)	SEM
<i>GPR37</i>	-7.99	±0.34
<i>TFAP2C</i>	-7.04	±0.23
<i>COL23A1</i>	-5.36	±0.62
<i>MMP3</i>	-2.98	±0.85
<i>MATK</i>	-1.23	±0.22
<i>LAMC3</i>	-4.47	±0.99

The *COL11A1* gene encodes for a component of type XI collagen called the pro-alpha (XI) chain. Under normal conditions, this gene and its derivatives are mainly expressed by chondrocytes and MSC, as well as by osteoblasts. Normal epithelial cells and quiescent fibroblasts from various locations do not express them. Mesenchymal-derived tumors and related conditions, such as scleroderma and keloids, are positive for *COL11A1*/(pro) collagen 11A1 expression, as well as high-grade human gliomas/glioblastomas. Recently, *COL11A1* was considered an important marker of stromal cells associated with tumor progression [35]. Our findings showed that *COL11A1* expression occurs in dermal fibroblasts but is higher in stem cells derived from adipose tissue, confirming this expression in adult MSC (**Figure 9A**). In addition, it was also found in RNA-Seq analysis that this gene has higher expression in ASC when compared with fibroblasts [3].

*CD36* gene was also validated as upregulated in ASC with the highest relative quantification value compared to fibroblasts (**Table 4**). Gao and coworkers [36] identified CD36 surface protein as a marker of stem cells derived from adipose tissue with a higher propensity to differentiate into adipocyte progenitor cells. According to the authors, CD36 positive cells presented augment in lipid uptake and storage of triglycerides, facilitating the terminal differentiation. Also, *CD36* expression in vivo is related to the higher adipogenic capacity of fat deposits. This marker is listed in the International Society of Cell Therapy recommendations for the identification of mesenchymal stem cells and in other studies that have studied important membrane markers for the identification of MSC [2, 37, 38]. Thus, our findings corroborate that CD36 could be defined as an important membrane marker, verified by qPCR assays and by flow cytometry, to confirm the mesenchymal phenotype of ASC (**Figure 9B**).

*TNNT 3* gene encodes for a form of a protein called troponin T. This protein is found in skeletal muscle and is directly involved in muscle contraction [39]. The *TNNT3* gene, together with other troponins, was upregulated after incubation with myogenic inducers, confirming the mesodermal and myogenic differentiation in human embryonic stem cells [40]. Other study using human muscle cell exosomes stimulated myasthenia in ASC, and the *TNNT3* gene was upregulated after incubation with inducing medium containing extracellular vesicles [41]. We hypothesize that this upregulated gene in ASC may be important to differentiate into cells of the myogenic lineage (**Figure 9C**).

Alkaline phosphatase is a membrane-bound enzyme that occurs in almost all living organisms assuming several isoforms in the body or an adult individual [34]. It is a marker of traditional pluripotent stem cells, in which it is highly expressed [42]. This protein is also present in stromal cells of human adipose tissue [43]. Most of the published work highlight the presence of alkaline phosphatase protein and its activity by enzymatic, colorimetric and flow cytometry assays. Additionally, when verifying the levels of gene expression for *ALPL* by qPCR, we observed significant increased expression of *ALPL* compared to dermal fibroblasts (**Figure 9D**). Thus, it is important to emphasize that the quantification of *ALPL* expression can also be used to confirm the purity of the stem cells isolated from adipose tissue.

In humans, *TINAGLI* encodes an extracellular matrix glycoprotein that interacts with laminins, and is associated with cell adhesion and tumor progression [44]. There is a report that this gene is upregulated in ASC Sca1<sup>high</sup> positive cells, which is associated with the adipose tissue stroma [45]. Our analysis also indicated a significantly higher relative expression of *TINAGLI* in ASC when compared to fibroblasts (**Figure 9E**).

Human MSC regenerate various tissues through several mechanisms. A study developed by Aomatsu and colleagues [46] has suggested that bone marrow-derived mesenchymal stem cells (hMSC) secrete SCRG1 protein and its BST1 receptor, and both factors act as positive regulators of mesenchymal properties. This study found that there was a decrease in the expression of genes encoding these proteins and their secretion during the osteogenic differentiation of hMSC. This shows the importance of both factors for maintaining the undifferentiated state of the cells. In fact, the SCRG1 / BST1 axis has been shown to preserve the potential for self-renewal and expression of stem cell markers such as CD90, CD105, CD7, CD146, and Stro-1. Interestingly, it was

also observed that the *SCRG1/BST1* axis stimulated the migratory activity of hMSC dependent on the activation of the FAK / PI3K pathways, even after ex vivo expansion of the cells. The expression of *SCRG1* gene in adipose tissue-derived stem cells was also confirmed by quantitative real-time PCR analysis, observing specificity of expression in relation to fibroblasts [4]. Therefore, we can hypothesize that this protein is important for the maintenance of the properties of mesenchymal stem cells (**Figure 9F**).

*DMD* gene encodes for dystrophin, an extracellular protein that connects the cytoskeleton of a muscle fiber to the surrounding extracellular matrix through the cell membrane. Deficiency of this protein has been established as one of the main causes of myopathies collectively defined as muscular dystrophy, such as Duchenne Muscular Dystrophy. Studies have observed the expression of dystrophin in ASC after induction with myogenic medium and co-culture with myoblasts [47]. The expression of this gene is important in the process of myogenic differentiation of ASC in cell therapy [1]. According to our results, confirmed by qPCR, *DMD* is upregulated in ASC when these cells are compared to FIB (**Figure 9G**).

A recent study highlighted the *PDE1C* gene, which encodes for the phosphodiesterase 1C protein, as a factor involved in the epigenetic modulation of ASC proliferation and migration. It was shown that the histone demethylase enzyme *JMJD6* plays a key role in the regulation of ASC proliferation and migration. It acts by removing H4R3me2a in the *PDE1C* promoter regions and suppressing the expression of that enzyme. *PDE1C* appears to be directly associated with increased motor and proliferative capacity of ASC since the depletion of *JMJD6* in ASC led to an increase in *PDE1C* gene expression and a decrease in cAMP and cGMP levels in cells. The proliferation and migration increase was reversed by treatment with *PDE1C* inhibitors, suggesting that *JMJD6* attenuates the two processes in ASC via epigenetic regulation and that *PDE1C* expression is modulated by this histone demethylase [48]. Therefore, another gene upregulated in ASC was validated by our group and this observation corroborates with previous findings that *PDE1C* function is related to self-renewal and migration processes of stem cell population (**Figure 9H**).

*ZFPMP2* is a transcription factor expressed in the heart of embryos and adults, along with *FOG2* [49]. This factor was also found in embryonic cells of mice (ES) induced for neural differentiation. *ZFPM2* and other six genes had markedly induced expression during differentiation [50]. Recently, a study involving stem cells derived

from human adipose tissue showed that the exogenous overexpression of seven transcription factors, including *ZFPM2*, was responsible for reprogramming these cells into cardiomyocytes [51]. In the present study, there was a significant difference in the expression of this marker in ASC, but the fold change value was lower in comparison with other genes evaluated by qPCR (**Figure 9I**).

*EBF2* gene encodes the early-B cell factor 2 transcription factor that is selectively expressed in brown fat adipogenic precursor cells and bone marrow-derived mesenchymal stem cells. Wang and colleagues [52] isolated and determined the molecular profile of mice pre-adipose embryonic EBF2-positive brown cells. They have demonstrated that this factor is the most important for the regulation of genes involved in the differentiation in fat cells. EBF2 loss in brown pre-adipose cells has been shown to reduce the expression levels of the genes that are part of the molecular signature of these cells, while the induced expression of EBF2 in myoblasts has activated specific genes of brown pre-adipose cells. A recent study concluded that mice BM-MS-C EBF2 + cells are highly proliferative and physiologically quiescent. *In vitro* differentiation assays revealed their capacity for differentiation, self-renewal, and multipotency [53]. Gene expression analysis of EBF2 positive cells showed the presence of genes associated with mesenchymal stem cells and multiple lineages at the unicellular level. The presence of this gene was associated not only to osteoblast progenitor cells, but also to multipotent bone marrow mesenchymal progenitor cells in adult mice. Since *EBF2* was highly expressed in ASC when compared to FIB, we hypothesized that this transcription factor is involved in the regulation of several mesenchymal functions, such as self-renewal and multipotency, in humans in a similar way that was observed in mice. Specific assays are needed to confirm this hypothesis (**Figure 9J**).

Furthermore, six downregulated genes were selected for *in vitro* validation and, subsequently, they were downregulated in a comparative analysis with fibroblasts using qPCR. *GPR37* is a member of the G protein-coupled receptor family. This gene encodes a protein composed of seven transmembrane domains found in the plasma membrane and the endoplasmic reticulum. It is a highly expressed protein in the central nervous system of mammals, including humans. The protein encoded by this gene is involved in neurogenesis and juvenile Parkinson's disease [54, 55]. However, to the best of our knowledge, the role of this transcription factor in ASC and fibroblasts has not yet been fully understood (**Figure 10A**).

Another gene validated by qPCR assays was *TFAP2C*, which is downregulated in ASC (**Figure 10B**). The protein encoded by this gene is a sequence-specific DNA-binding transcription factor involved in the activation of several genes associated with development. This protein plays an important role in the development of the eyes, face, body wall, limbs and neural tube in mammals. In human embryonic pluripotent stem cells, it has been demonstrated that *TFAP2C* establishes and maintains the pluripotency status of these cells and regulates the expression of *OCT4* by other mechanisms than those found in mice [56]. High expression of *TFAP2C* was also detected on human skin distributed throughout the epidermis [57]. We have found an increased expression of this gene in dermal fibroblasts. These cells are responsible for extracellular matrix production, formation and cycling of the hair follicle [58] and are also capable of communicating with adjacent cells regulating the physiology of the skin, among other functions [59]. Thus, the positive regulation of *TFAP2C* in fibroblasts may be related to the various physiological roles performed by these cells in the skin niche. However, the role of this transcription factor in fibroblasts has not yet been as well described as the regulatory function in human pluripotent cells.

Regarding the expression of *COL23A1*, a negative regulation in ASC was also observed in comparison with fibroblasts (**Figure 10C**). This gene encodes a transmembrane protein belonging to the subfamily of non-fibrillar collagens and its expression is involved in diseases that affect the skin, such as systemic sclerosis. Some studies have confirmed hypomethylation and overexpression of *COL23A1* and *COL4A2* in skin fibroblasts of individuals with sclerosis when compared to normal fibroblasts [60]. As seen in this study, normal fibroblasts also express *COL23A1* and a similar result was observed in fibroblasts.

*MMP3* gene was reported as one of the differentially expressed genes between ASC and fibroblasts, with downregulation in ASC [3]. This gene encodes a matrix metalloproteinase protein that degrades fibronectin, laminin, collagens II, IV, IX and X and cartilage proteoglycans. This protein also participates in the processes of wound healing, atherosclerosis progression and tumor initiation [61, 62]. Lindner and colleagues [63] investigated the basal expression of metalloproteases in fibroblasts of cardiac, dermal and pulmonary origin. These authors observed an approximately 7-fold increased expression of the *MMP3* gene in dermal fibroblasts when compared to cardiac fibroblasts. This study also stated that there is a correlation between the ability of the *MMP3* enzyme to digest collagen IV and the increased expression of its coding gene in

the skin. In the present study, we also observed a higher expression of *MMP3* in dermal fibroblasts, which corroborates with these findings (**Figure 10D**).

*MATK* gene was also identified as down-regulated in ASC (**Figure 10E**). The protein encoded by this gene has amino acid sequence similarity to the CSK protein tyrosine kinase and is related to signal transduction in hematopoietic cells. *MATK* protein may play an inhibitory role in the control of T cell proliferation [64]. It has been observed as differentially expressed in fibroblasts derived from tumor stromal fraction [65] but, to date, the functions performed by this protein in ASC and human dermal fibroblasts physiology has not been fully elucidated.

Another gene identified as downregulated in ASC was *LAMC3* (**Figure 10F**). Laminins belong to extracellular matrix glycoproteins and are the major non-collagen components of basement membranes. These proteins are involved in a wide variety of biological processes, including cell adhesion, differentiation, migration, signaling and tumor metastasis. *LAMC3* gene encodes a gamma-chain isoform of laminin, called gamma 3. The gamma 3 chain is widely expressed in the skin, heart, lung and reproductive tract. In the skin, its expression is found within the basement membrane of the dermo-epidermal junction at points of nervous penetration [66]. Due to the importance of the expression of this gene in the skin, it was expected that an increased expression would be observed in dermal fibroblasts, which was also observed in our assays.

## 1.5 Conclusions

In summary, more than 2,000 differentially expressed genes were identified between ASC and FIB in our RNA-Seq analyzes. According to the GO analysis, the most significant differences found between ASC and fibroblasts were in biological and molecular functions, such as: protein binding and phosphorylation, signaling, cell adhesion, microtubule activity and movement, tubulin binding. KEGG-enriched pathway analysis indicated enrichment in important processes related to DNA replication, cancer pathways, PI3K-AKT signaling pathways, axon orientation, adhesion and cell cycle, and extracellular matrix-receptor interaction. Our results regarding gene expression of ASC and FIB confirmed 16 genes differentially expressed by quantitative real-time PCR analysis. We generate a list containing many genes not yet investigated elsewhere. These genes can be studied regarding their functionalities

and utility to distinguish both cell types, opening a perspective of deeper projects in this topic.

## 1.6 Conflicts of Interest

The authors declare that there is no conflict of interest regarding the publication of this paper.

## 1.7 Funding Statement

"This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES), FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais) and CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico)."

## 1.8 Supplementary Materials - Tables:

**Table S1.** The sequenced reads showed the high quality of base calling indicated by Q score

**Table S2.** Summary of mapping results obtained for ASC and FIB samples

**Table S3.** The number and percentages of genes exhibiting differential expression levels as estimated using fragments per kilobase pair per million reads (FPKM)

**Table S4.** A complete list of ASC vs FIB DEG containing read counts, log<sub>2</sub> fold change, p-value, adjusted p-value, gene type, and description.

**Table S5.** List of differentially expressed RNA-Seq genes selected for in vitro validation.

## 1.9 References

[1] ZUK PA. Adipose-Derived Stem Cells in Tissue Regeneration: A Review. *Int Sch Res Not.* 2013; (1):e713959. doi:10.1155/2013/713959.

[2] BOURIN P, BUNNELL BA, CASTEILLA L, et al. Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/ stem cells: a joint statement of the International Federation for Adipose Therapeutics (IFATS) and Science and the International S. *Cytotherapy.*

2013;15(6):641-648. doi:10.1016/j.jcyt.2013.02.006.

[3] JÄÄGER K, ISLAM S, ZAJAC P, LINNARSSON S, NEUMAN T. RNA-seq analysis reveals different dynamics of differentiation of human dermis- and adipose-derived stromal stem cells. *PLoS One*. 2012;7(6):e38833. doi: 10.1371/journal.pone.0038833.

[4] ZYCH J, SPANGENBERG L, STIMAMIGLIO MA, ABUD AP, SHIGUNOV P, MARCHINI FK, KULIGOVSKI C, COFRÉ AR, SCHITTINI AV, AGUIAR AM, SENEGAGLIA A, BROFMAN PR, GOLDENBERG S, DALLAGIOVANNA B, NAYA H, CORREA A. Polysome profiling shows the identity of human adipose-derived stromal/stem cells in detail and clearly distinguishes them from dermal fibroblasts. *Stem Cells Dev*. 2014 Nov 15;23(22):2791-802. doi: 10.1089/scd.2013.0496.

[5] FLAVELL SJ, HOU TZ, LAX S, FILER AD, SALMON M, BUCKLEY CD. Fibroblasts as novel therapeutic targets in chronic inflammation. *Br J Pharmacol*. 2008;(Suppl 1):S241-S246. doi:10.1038/sj.bjp.0707487.

[6] DRISKELL RR, LICHTENBERGER BM, HOSTE E, KRETZSCHMAR K, SIMONS BD, CHARALAMBOUS M, FERRON SR, HERAULT Y, PAVLOVIC G, FERGUSON-SMITH AC, et al. Distinct fibroblast lineages determinedermal architecture in skin development and repair. *Nature* 2013; 504:277–281.

[7] DRISKELL RR, WATT FM. Understanding fibroblast heterogeneity in the skin. *Trends Cell Biol* 2015; 25:92–99.

[8] THULABANDU V, CHEN D, ATIT RP. Dermal fibroblast in cutaneous development and healing. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol*. 2018 Mar;7(2). doi: 10.1002/wdev.307.

[9] PEREIRA MCL, SECCO M, SUZUKI DE, et al. Contamination of Mesenchymal Stem-Cells with Fibroblasts Accelerates Neurodegeneration in an Experimental Model of Parkinson's Disease. *Stem Cell Rev Reports*. 2011;7(4):1006-1017. doi:10.1007/s12015-011-9256-4.

[10] PROCKOP DJ, OLSON SD. Clinical trials with adult stem / progenitor cells for tissue repair : let ' s not overlook some essential precautions. *Blood*. 2009;109(8):3147-3151. doi:10.1182/blood-2006-03-013433.

[11] KUNDROTAS G. Surface markers distinguishing mesenchymal stem cells from fibroblasts. *Acta medica Litu*. 2012;19(2):75-79. doi:10.6001/actamedica.v19i2.2313.

- [12] ZHAO S, ZHANG B, ZHANG Y, GORDON W, DU S, PARADIS T, VINCENT M, SCHACK DV. Bioinformatics for RNA-Seq Data Analysis, Bioinformatics, Ibrokhim Y. Abdurakhmonov, IntechOpen, 2016 doi: 10.5772/63267. Available from: <https://www.intechopen.com/books/bioinformatics-updated-features-and-applications/bioinformatics-for-rna-seq-data-analysis>
- [13] ZYCH J, SPANGENBERG L, STIMAMIGLIO MA, ABUD AP, SHIGUNOV P, MARCHINI FK, KULIGOVSKI C, COFRÉ AR, SCHITTINI AV, AGUIAR AM, SENEGAGLIA A, BROFMAN PR, GOLDENBERG S, DALLAGIOVANNA B, NAYA H, CORREA A. Polysome profiling shows the identity of human adipose-derived stromal/stem cells in detail and clearly distinguishes them from dermal fibroblasts. *Stem Cells Dev.* 2014 Nov 15;23(22):2791-802. doi: 10.1089/scd.2013.0496.
- [14] RAMSKÖLD D, WANG ET, BURGE CB, SANDBERG R. An abundance of ubiquitously expressed genes revealed by tissue transcriptome sequence data. *PLoS Comput Biol.* 2009 Dec;5(12):e1000598. doi: 10.1371/journal.pcbi.1000598.
- [15] CAMARENA L, BRUNO V, EUSKIRCHEN G, POGGIO S, SNYDER M. Molecular mechanisms of ethanol-induced pathogenesis revealed by RNA-sequencing. *PLoS Pathog.* 2010 Apr 1;6(4):e1000834. doi: 10.1371/journal.ppat.1000834.
- [16] ZUK PA, ZHU M, ASHJIAN P, DE UGARTE DA. et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell.* 2002; 13(12):4279-95.
- [17] SCHBATH S, MARTIN V, ZYTNICKI M, FAYOLLE J, LOUX V, GIBRAT JF. Mapping reads on a genomic sequence: an algorithmic overview and a practical comparative analysis. *J Comput Biol.* 2012 Jun;19(6):796-813. doi: 10.1089/cmb.2012.0022.
- [18] KIM D, PERTEA G, TRAPNELL C, PIMENTEL H, KELLEY R, SALZBERG SL. TopHat2: accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions. *Genome Biol.* 2013 Apr 25;14(4):R36. doi: 10.1186/gb-2013-14-4-r36.
- [19] JOLLIFE IT, CADIMA J. Principal component analysis: a review and recent developments. *Philos Trans A Math Phys Eng Sci.* 2016 Apr 13;374(2065):20150202. doi: 10.1098/rsta.2015.0202.
- [20] AKOGLU H. User's guide to correlation coefficients. *J Emerg Med.* 2018 Sep; 18(3): 91–93. doi: 10.1016/j.tjem.2018.08.001
- [21] MORTAZAVI A, WILLIAMS BA, MCCUE K, SCHAEFFER L, WOLD B. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nat Methods.* 2008 Jul;5(7):621-8. doi: 10.1038/nmeth.1226.

- [22] ANDERS S, HUBER W. Differential expression analysis for sequence count data. *Genome Biol.* 2010;11(10):R106. doi: 10.1186/gb-2010-11-10-r106.
- [23] YOUNG MD, WAKEFIELD MJ, SMYTH GK, OSHLACK A. Gene ontology analysis for RNA-seq: accounting for selection bias. *Genome Biol.* 2010;11(2):R14. doi: 10.1186/gb-2010-11-2-r14.
- [24] KANEHISA M, ARAKI M, GOTO S, HATTORI M, HIRAKAWA M, ITOH M, KATAYAMA T, KAWASHIMA S, OKUDA S, TOKIMATSU T, YAMANISHI Y. KEGG for linking genomes to life and the environment. *Nucleic Acids Res.* 2008. doi:10.1093/nar/gkm882.
- [25] PFAFFL MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 2001 May 1; 29(9): e45. doi: 10.1093/nar/29.9.e45.
- [26] ] LEDERGERBER C, DESSIMOZ C. Base-calling for next-generation sequencing platforms. *Brief Bioinform.* 2011 Sep;12(5):489-97. doi: 10.1093/bib/bbq077.
- [27] SCHBATH S, MARTIN V, ZYTNICKI M, FAYOLLE J, LOUX V, GIBRAT JF. Mapping reads on a genomic sequence: an algorithmic overview and a practical comparative analysis. *J Comput Biol.* 2012 Jun;19(6):796-813. doi: 10.1089/cmb.2012.0022.
- [28] ENCODE Guidelines and Best Practices for RNA-Seq: December 2016 – Disponível em <<https://www.encodeproject.org/about/experiment-guidelines/>> Acesso em 22/01/ 2019.
- [29] HEO JS, CHOI Y, KIM HOH-SH, KIM HOH-SH. Comparison of molecular profiles of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, umbilical cord blood, placenta and adipose tissue. *Int J Mol Med.* 2016;37(1):115-125. doi:10.3892/ijmm.2015.2413.
- [30] DEBNATH T, CHELLURI LK. Standardization and quality assessment for clinical grade mesenchymal stem cells from human adipose tissue. *Hematol Transfus Cell Ther.* 2008 doi: 10.1016/j.htct.2018.05.001.
- [31] CHO KA, PARK M, KIM YH, WOO SY, RYU KH. RNA sequencing reveals a transcriptomic portrait of human mesenchymal stem cells from bone marrow, adipose tissue, and palatine tonsils. *Sci Rep.* 2017 Dec 7;7(1):17114. doi: 10.1038/s41598-017-16788-2.
- [32] HANSEN KD, IRIZARRY RA, WU Z. Removing technical variability in RNA-seq data using conditional quantile normalization. *Biostatistics.* 2012 Apr;13(2):204-16. doi:10.1093/biostatistics/kxr054.
- [33] FANG Z, CUI X. Design and validation issues in RNA-seq experiments. *Brief Bioinform.* 2011 May;12(3):280-7. doi: 10.1093/bib/bbr004.

[34] STEFKOVÁ K, PROCHÁZKOVÁ J, PACHERNÍK J. Alkaline Phosphatase in Stem Cells. *Stem Cells International*. 2015; 1-11, <http://dx.doi.org/10.1155/2015/628368>.

[35] VÁZQUEZ-VILLA F, GARCÍA-OCAÑA M, GALVÁN JA, GARCÍA-MARTÍNEZ J, GARCÍA-PRAVIA C, MENÉNDEZ-RODRÍGUEZ P, GONZÁLEZ-DEL REY C, BARNEO-SERRA L, DE LOS TOYOS JR. COL11A1/(pro)collagen 11A1 expression is a remarkable biomarker of human invasive carcinoma-associated stromal cells and carcinoma progression. *Tumour Biol*. 2015 Apr;36(4):2213-22. doi: 10.1007/s13277-015-3295-4.

[36] GAO H, VOLAT F, SANDHOW L, GALITZKY J, NGUYEN T, ESTEVE D, ÅSTRÖM G, MEJHERT N, LEDOUX S, THALAMAS C, ARNER P, GUILLEMOT JC, QIAN H, RYDÉN M, BOULOUMIÉ A. CD36 Is a Marker of Human Adipocyte Progenitors with Pronounced Adipogenic and Triglyceride Accumulation Potential. *Stem Cells*. 2017 Jul;35(7):1799-1814. doi: 10.1002/stem.2635.

[37] ROJEWSKI MT, WEBER BM, SCHREZENMEIER H. Phenotypic Characterization of Mesenchymal Stem Cells from Various Tissues. *Transfus Med Hemother*. 2008;35(3):168-184. DOI:10.1159/000129013.

[38] WETZIG A, ALAIYA A, AL-ALWAN M, PRADEZ CB, PULICAT MS, AL-MAZROU A, SHINWARI Z, SLEIMAN GM, GHEBEH H, AL-HUMAIDAN H, GAAFAR A, KANAAN I, ADRA C. Differential marker expression by cultures rich in mesenchymal stem cells. *BMC Cell Biol*. 2013 Dec 5;14:54. doi: 10.1186/1471-2121-14-54.

[39] STEFANCSIK R, RANDALL JD, MAO C, SARKAR S. Structure and sequence of the human fast skeletal troponin T (TNNT3) gene: insight into the evolution of the gene and the origin of the developmentally regulated isoforms. *Comp Funct Genomics*. 2003;4(6):609-25. doi: 10.1002/cfg.343.

[40] MAHMOOD A, HARKNESS L, SCHRØDER HD, ABDALLAH BM, KASSEM M. Enhanced differentiation of human embryonic stem cells to mesenchymal progenitors by inhibition of TGF-beta/activin/nodal signaling using SB-431542. *J Bone Miner Res*. 2010 Jun;25(6):1216-33. doi: 10.1002/jbmr.34.

[41] CHOI JS, YOON HI, LEE KS, CHOI YC, YANG SH, KIM IS, CHO YW. Exosomes from differentiating human skeletal muscle cells trigger myogenesis of stem cells and provide biochemical cues for skeletal muscle regeneration. *J Control Release*. 2016 Jan 28;222:107-15. doi: 10.1016/j.jconrel.2015.12.018.

[42] SINGH U, QUINTANILLA RH, GRECIAN S, GEE KR, RAO MS, LAKSHMIPATHY U. Novel live alkaline phosphatase substrate for identification

of pluripotent stem cells. *Stem Cell Rev.* 2012 Sep;8(3):1021-9. doi: 10.1007/s12015-012-9359-6.

[43] ZANNETTINO AC, PATON S, ARTHUR A, KHOR F, ITESCU S, GIMBLE JM, GRONTHOS S. Multipotential human adipose-derived stromal stem cells exhibit a perivascular phenotype in vitro and in vivo. *J Cell Physiol.* 2008 Feb;214(2):413-21. doi: 10.1002/jcp.21210.

[44] XIONG GF, XU R. Function of cancer cell-derived extracellular matrix in tumor progression. *J Cancer Metastasis Treat.* 2016;2:357-64 doi:10.20517/2394-4722.2016.08.

[45] TOKUNAGA M, INOUE M, JIANG Y, BARNES RH 2ND, BUCHNER DA, CHUN TH. Fat depot-specific gene signature and ECM remodeling of Scap(high) adipose-derived stem cells. *Matrix Biol.* 2014 Jun; 36:28-38. doi: 10.1016/j.matbio.2014.03.005.

[46] AOMATSU E, TAKAHASHI N, SAWADA S, OKUBO N, HASEGAWA T, TAIRA M, MIURA H, ISHISAKI A, CHOSA N. Novel SCRG1/BST1 axis regulates self-renewal, migration, and osteogenic differentiation potential in mesenchymal stem cells. *Sci Rep.* 2014 Jan 13;4:3652. doi: 10.1038/srep03652.

[47] FORCALES S. Potential of adipose-derived stem cells in muscular regenerative therapies. *Front. Aging Neurosci.*, 2015 .doi: 10.3389/fnagi.2015.00123.

[48] SHEN C, QUAN Q, YANG C, WEN Y, LI H. Histone demethylase JMJD6 regulates cellular migration and proliferation in adipose-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res Ther.* 2018 Aug 9;9(1):212. doi: 10.1186/s13287-018-0949-3.

[49] CONTA JH, BREITBART RE. Chapter 31 - Genomics of Congenital Heart Disease. *Essentials of Genomic and Personalized Medicine* 2010, p.390-403. Doi: 10.1016/B978-0-12-374934-5.00031-3.

[50] BERNSTEIN BE, MIKKELSEN TS, XIE X, KAMAL M, HUEBERT DJ, CUFF J, FRY B, MEISSNER A, WERNIG M, PLATH K, JAENISCH R, WAGSCHAL A, FEIL R, SCHREIBER SL, LANDER ES. A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells. *Cell.* 2006 Apr 21;125(2):315-26.

[51] WYSTRYCHOWSKI W, PATLOLLA B, ZHUGE Y, NEOFYTOS E, ROBBINS RC, BEYGUI RE. Multipotency and cardiomyogenic potential of human adipose-derived stem cells from epicardium, pericardium, and omentum. *Stem Cell Res Ther.* 2016 Jun 13;7(1):84. doi: 10.1186/s13287-016-0343-y.

[52] WANG W, KISSIG M, RAJAKUMARI S, HUANG L, LIM HW, WON

KJ, SEALE P. Ebf2 is a selective marker of brown and beige adipogenic precursor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014 Oct 7;111(40):14466-71. doi: 10.1073/pnas.1412685111.

[53] QIAN H, BADALONI A, CHIARA F, STJERNBERG J, POLISETTI N, NIHLBERG K, CONSALEZ GG, SIGVARDSSON M. Molecular characterization of prospectively isolated multipotent mesenchymal progenitors provides new insight into the cellular identity of mesenchymal stem cells in mouse bone marrow. *Mol Cell Biol*. 2013 Feb;33(4):661-77. doi: 10.1128/MCB.01287-12.

[54] DUNHAM JH, MEYER RC, GARCIA EL, HALL RA. GPR37 surface expression enhancement via N-terminal truncation or protein-protein interactions. *Biochemistry*. 2009 Nov 3;48(43):10286-97. doi: 10.1021/bi9013775.

[55] BERGER BS, ACEBRON SP, HERBST J, KOCH S, NIEHRS C. Parkinson's disease-associated receptor GPR37 is an ER chaperone for LRP6. *EMBO Rep*. 2017 May;18(5):712-725. doi: 10.15252/embr.201643585.

[56] PASTOR WA, LIU W, CHEN D, HO J, KIM R, HUNT TJ, LUKIANCHIKOV A, LIU X, POLO JM, JACOBSEN SE, CLARK AT. TFAP2C regulates transcription in human naive pluripotency by opening enhancers. *Nat Cell Biol*. 2018 May;20(5):553-564. doi: 10.1038/s41556-018-0089-0.

[57] EDQVIST PH, FAGERBERG L, HALLSTRÖM BM, DANIELSSON A, EDLUND K, UHLÉN M, PONTÉN F. Expression of human skin-specific genes defined by transcriptomics and antibody-based profiling. *J Histochem Cytochem*. 2015 Feb;63(2):129-41. doi: 10.1369/0022155414562646.

[58] SENNETT R, RENDL M. Mesenchymal-epithelial interactions during hair follicle morphogenesis and cycling. *Semin Cell Dev Biol*. 2012;23:917-927.

[59] SORRELL JM, CAPLAN AI. Fibroblast heterogeneity: more than skin deep. *J Cell Sci*. 2004 Feb 15;117(Pt 5):667-75.

[60] ALTOROK N, TSOU PS, COIT P, KHANNA D, SAWALHA AH. Genome-wide DNA methylation analysis in dermal fibroblasts from patients with diffuse and limited systemic sclerosis reveals common and subset-specific DNA methylation aberrancies. *Ann Rheum Dis*. 2015 Aug;74(8):1612-20. doi: 10.1136/annrheumdis-2014-205303.

[61] KUKACKA J, PRŮSA R, KOTASKA K, PELOUCH V. Matrix metalloproteinases and their function in myocardium. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*. 2005 Dec;149(2):225-36.

[62] SPINALE FG. Myocardial matrix remodeling and the matrix metalloproteinases:

influence on cardiac form and function. *Physiol Rev.* 2007 Oct;87(4):1285-342.

[63] LINDNER D, ZIETSCH C, BECHER PM, SCHULZE K, SCHULTHEISS HP, TSCHÖPE C, WESTERMANN D. Differential expression of matrix metalloproteases in human fibroblasts with different origins. *Biochem Res Int.* 2012;2012:875742. doi: 10.1155/2012/875742.

[64] LEE BC, AVRAHAM S, IMAMOTO A, AVRAHAM HK. Identification of the nonreceptor tyrosine kinase MATK/CHK as an essential regulator of immune cells using Matk/CHK-deficient mice. *Blood.* 2006 Aug 1;108(3):904-7.

[65] SINGER CF, GSCHWANTLER-KAULICH D, FINK-RETTNER A, HAAS C, HUDELIST G, CZERWENKA K, KUBISTA E. Differential gene expression profile in breast cancer-derived stromal fibroblasts. *Breast Cancer Res Treat.* 2008 Jul;110(2):273-81.

[66] CSERHALMI-FRIEDMAN PB, OLSON PF, KOCH M, CHAMPLAUD MF, BRUNKEN WJ, BURGESSON RE, CHRISTIANO AM. Structural analysis and mutation detection strategy for the human LAMC3 gene. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001 Jan 12;280(1):39-44.

## 1.10 Figure Legends

**Figure 1. Principal Component Analysis (PCA) highlights the differences and similarities between biological replicates.** ASC and FIB form two independent groups. The FIB\_3 sample is shown as more distinct from the other samples analyzed. PC1 = 34.41% and PC2 = 24.22% indicated variability among the analyzed samples.

**Figure 2. The dendrogram shows the similarities between the biological replicates of ASC and FIB.** ASC replicates form an independent clade from FIB samples. The ASC\_1 and ASC\_3 samples show more similarity compared to the ASC\_2 sample. The FIB\_1 and FIB\_2 samples show more similarity compared to the FIB\_3 sample.

**Figure 3. The diagram shows the Pearson correlation (R<sup>2</sup>) between the biological replicates of ASC and FIB.** The ASC and FIB replicates had a correlation index greater than 0.92. The lowest R<sup>2</sup> value was 0.877 between samples FIB\_3 and ASC\_3, and the highest index was 0.985 between ASC\_1 and ASC\_3.

**Figure 4. Differentially expressed genes (DEG) between ASC and fibroblasts were analyzed and plotted on a Volcano diagram.** The X-axis represents gene expression fold change detected between the two cells (log<sub>2</sub> scale). The y-axis shows the adjusted p-value between groups (scale -log<sub>10</sub>). The dashed line indicates the p-adjusted threshold <0.05. Upregulated genes are represented in red and the downregulated ones in green. In blue, genes with no difference in expression between both cells are represented.

**Figure 5. Heatmap hierarchical clustering of differentially expressed genes.** Genes of low expression are represented in blue and genes with high expression are represented in red. The descending color scale from red to blue indicates  $\log_{10}(\text{FPKM} + 1)$  from highest to lowest value.

**Figure 6. The 30 most enriched GO terms related to upregulated genes in ASC versus FIB.** GO terms related to the Biological Process group are represented in green, GO terms belonging to the group Cellular Component are represented in orange and GO terms belonging to the Molecular Function are highlighted in blue. \* p-value <0.05, indicating the most enriched GO term.

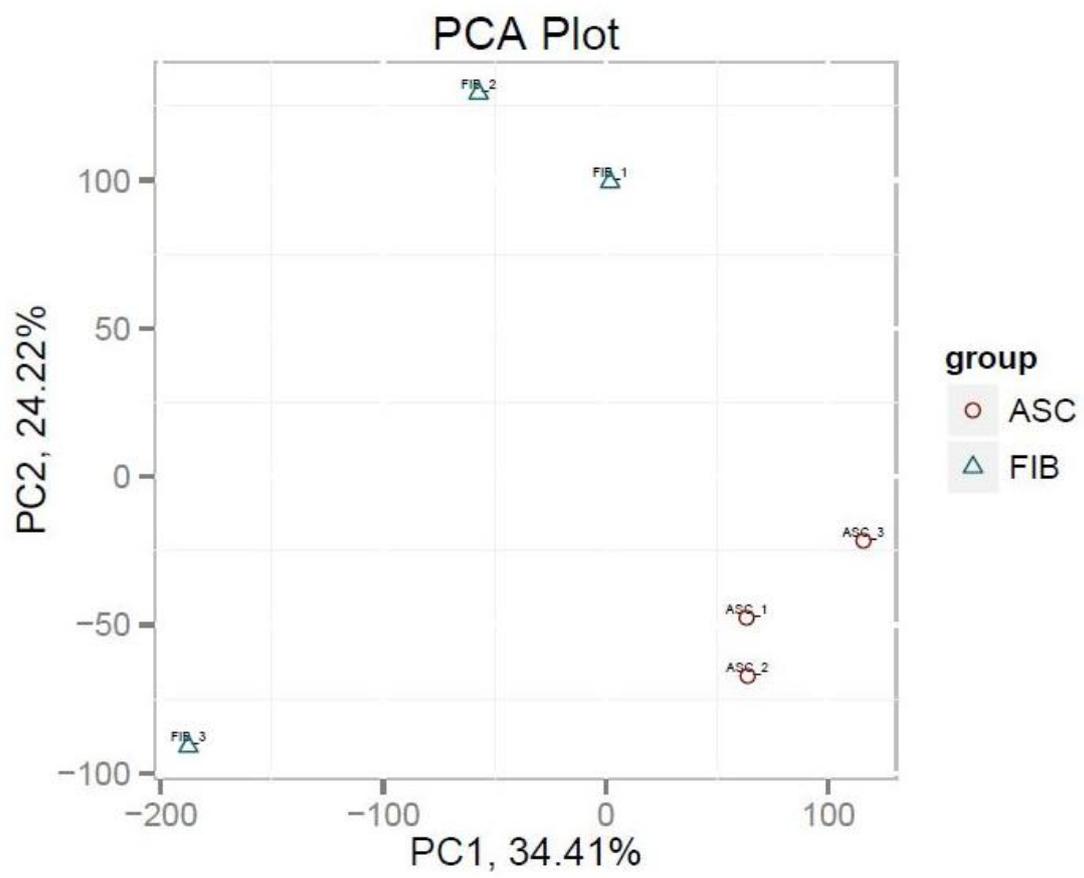
**Figure 7. The 30 most enriched GO terms related to downregulated genes in ASC versus FIB.** GO terms related to the Biological Process group are represented in green, GO terms belonging to the Cellular group. Component are represented in orange. \* p-value < 0.05, indicating the most enriched GO term.

**Figure 8. Scatterplots of pathway enrichment evaluated by KEGG.** The vertical axis shows the terms of the pathways, the horizontal axis represents the Rich factor, and the size of the nodules represents the absolute number of genes with differential expression. In the KEGG metabolic pathway, red and orange nodules represent the positively regulated genes, green nodules represent downregulated genes, yellow nodules represent both up and downregulated genes in ASC compared to fibroblasts.

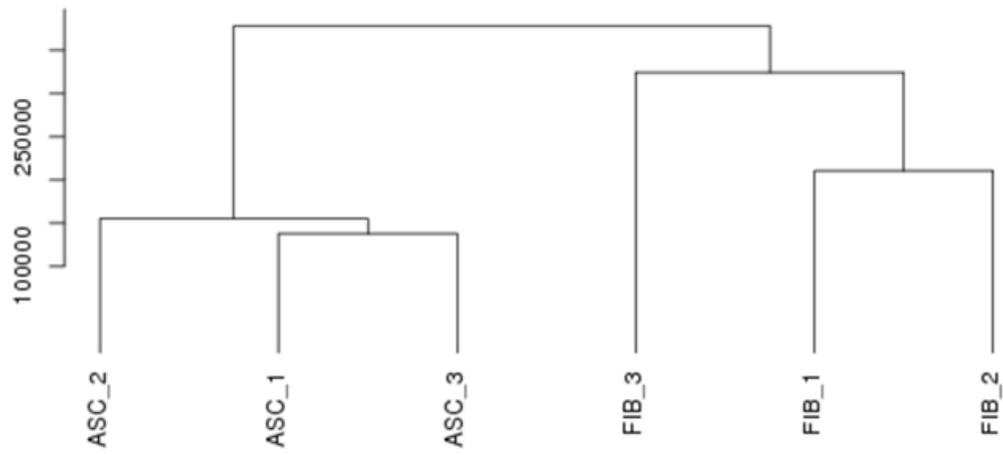
**Figure 9. Quantification of relative gene expression (Log 2) in ASC compared to FIB.** The genes COL11A1 (A), CD36 (B), TNNT3 (C), ALPL (D), TINAGL1 (E), SCRG1 (F), DMD (G), PDE1C (H), ZFPM2 (I) and EBF2 (J) are upregulated in ASC when compared to fibroblasts in all samples evaluated by qPCR. Data were compared using unpaired t-test with Welch correction. \*\*\* p < 0.001, \* p < 0.05, n = 4.

**Figure 10. Quantification of relative gene expression (Log 2) in ASC compared to FIB.** The genes GPR37 (A), TFAP2C (B), COL23A (C), MMP3 (D), MATK (E) and LAMC3 (F) are downregulated in ASC when compared to fibroblasts in all samples evaluated by qPCR. Data were compared using unpaired t-test with Welch correction. \*\* p < 0.01, \*\*\* p < 0.001, n = 4.

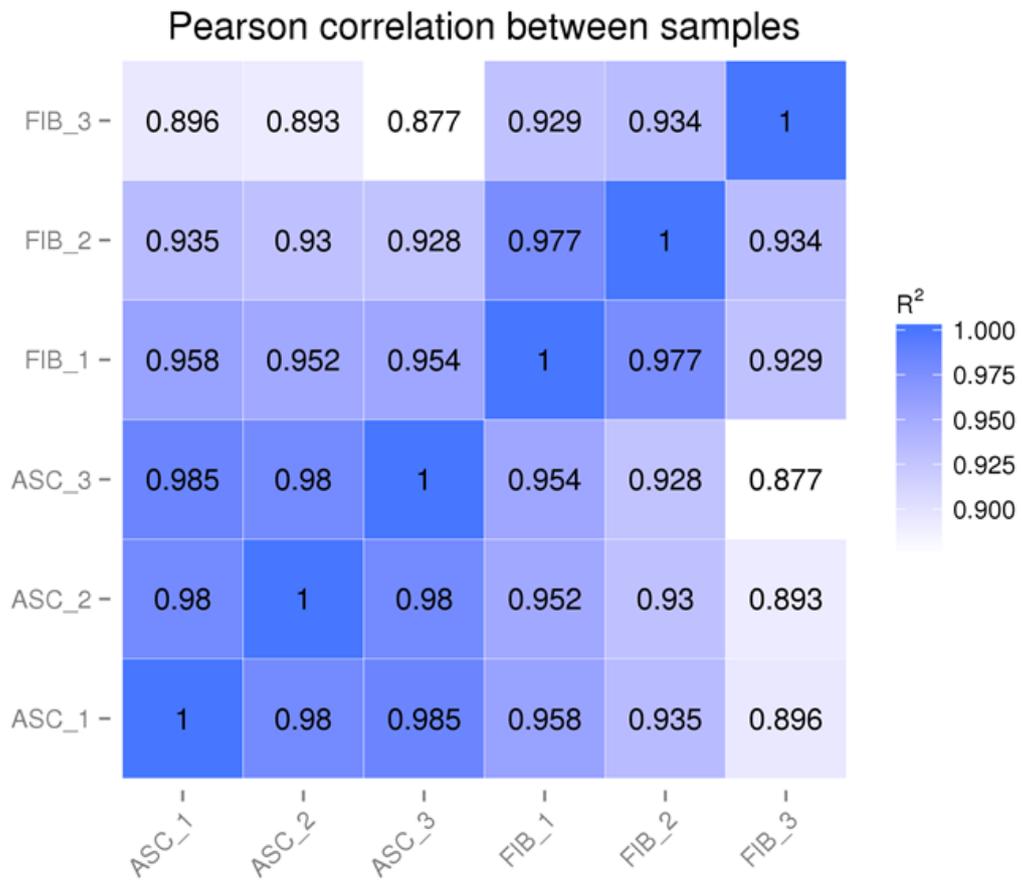
Figure 1.



**Figure 2.**



**Figure 3.**



**Figure 4.**

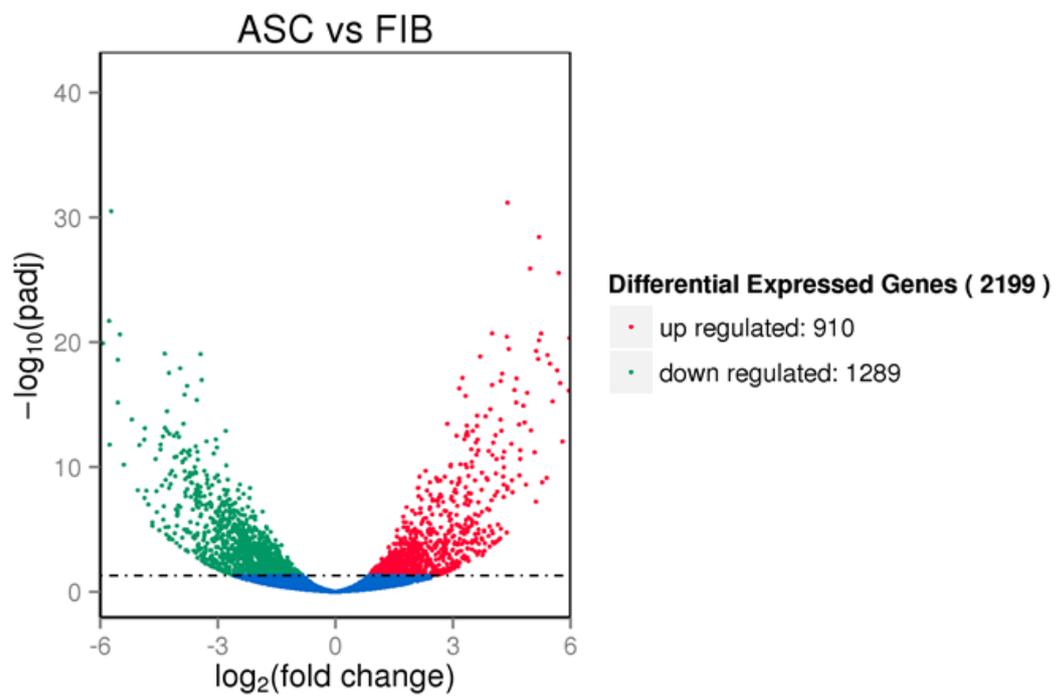
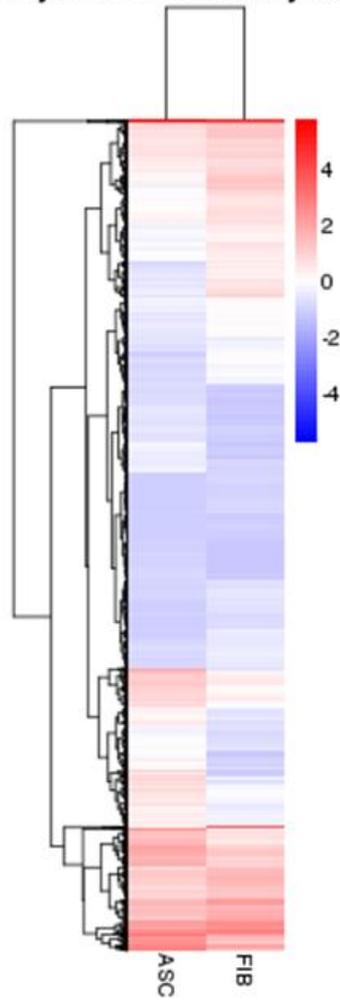
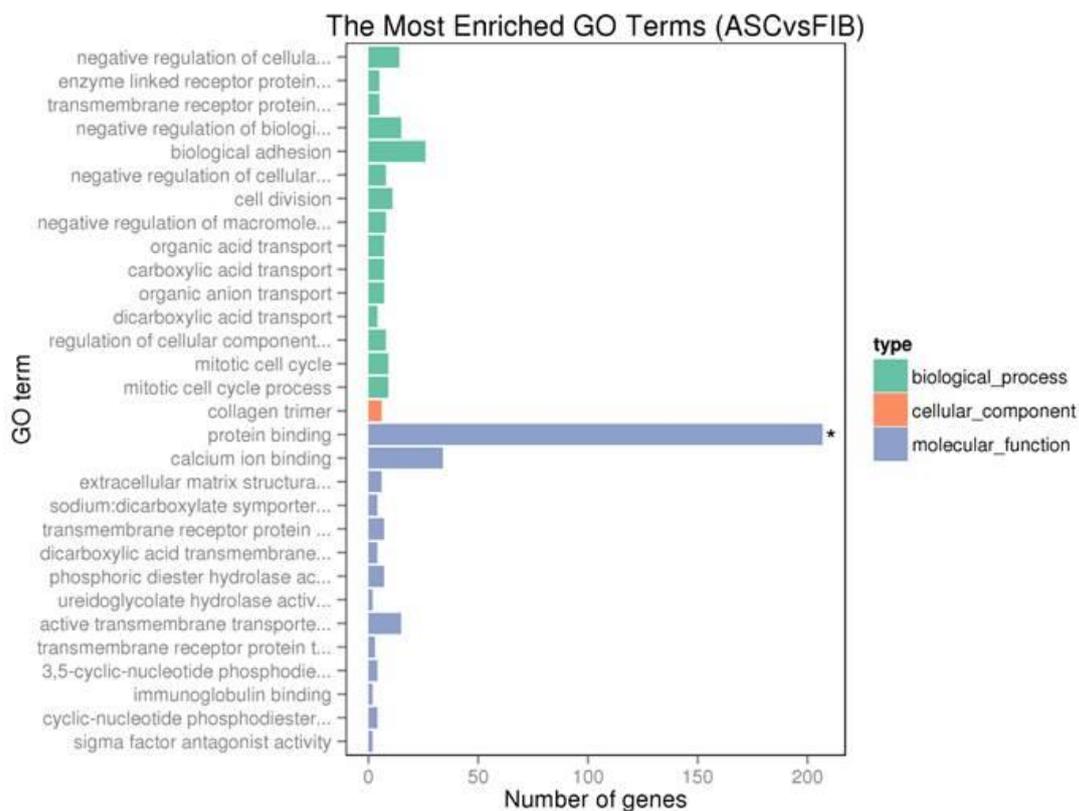


Figure 5.

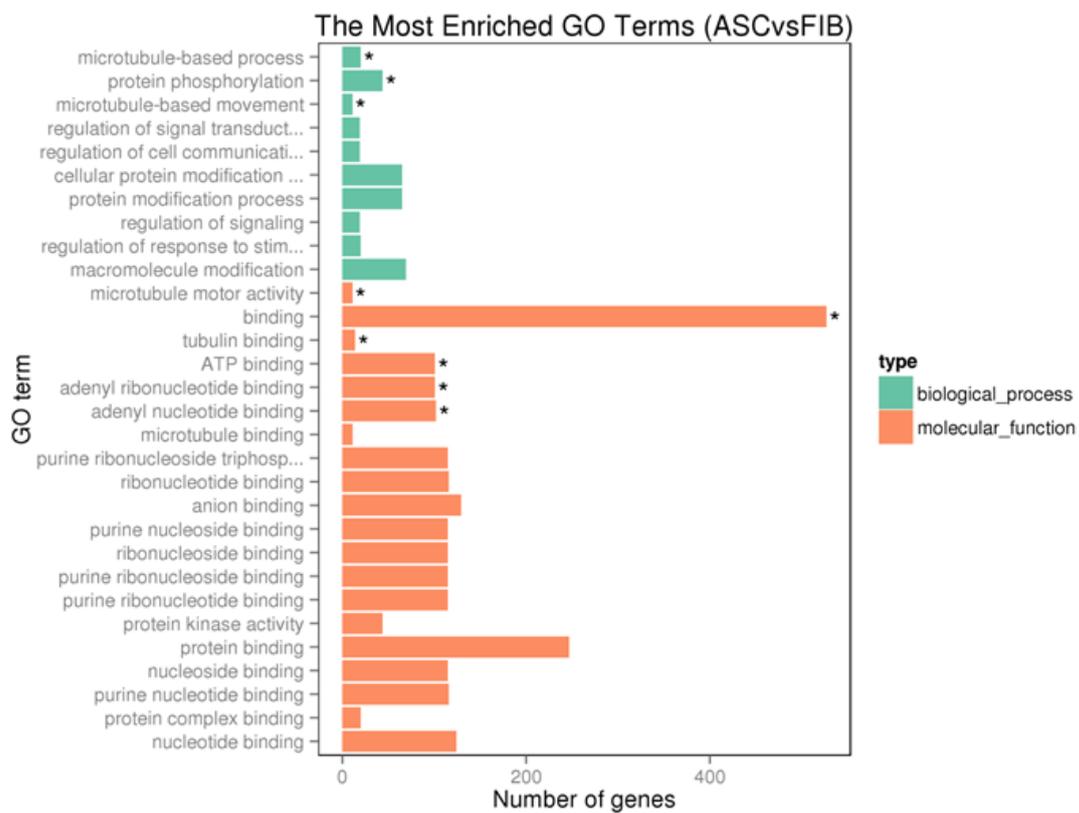
Cluster analysis of differentially expressed genes



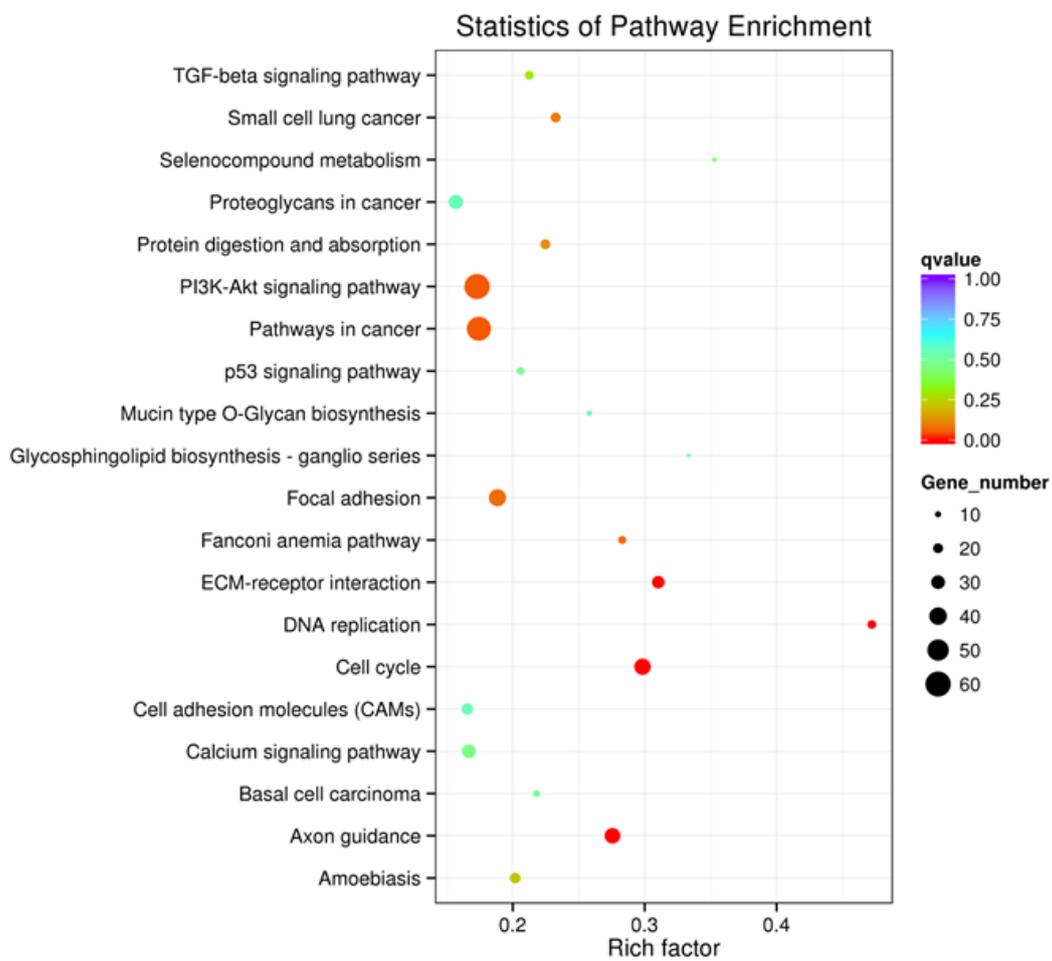
**Figure 6.**



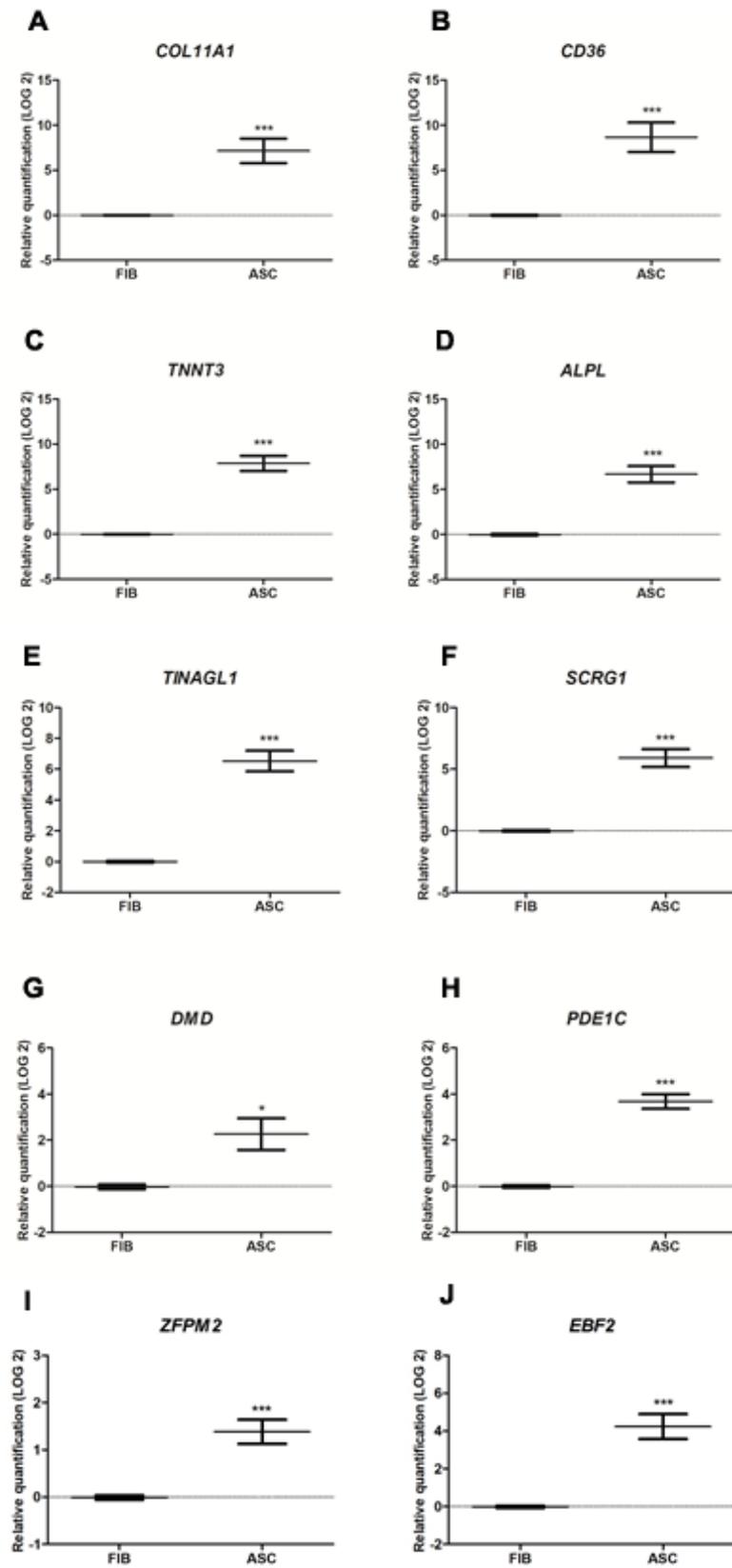
**Figure 7.**



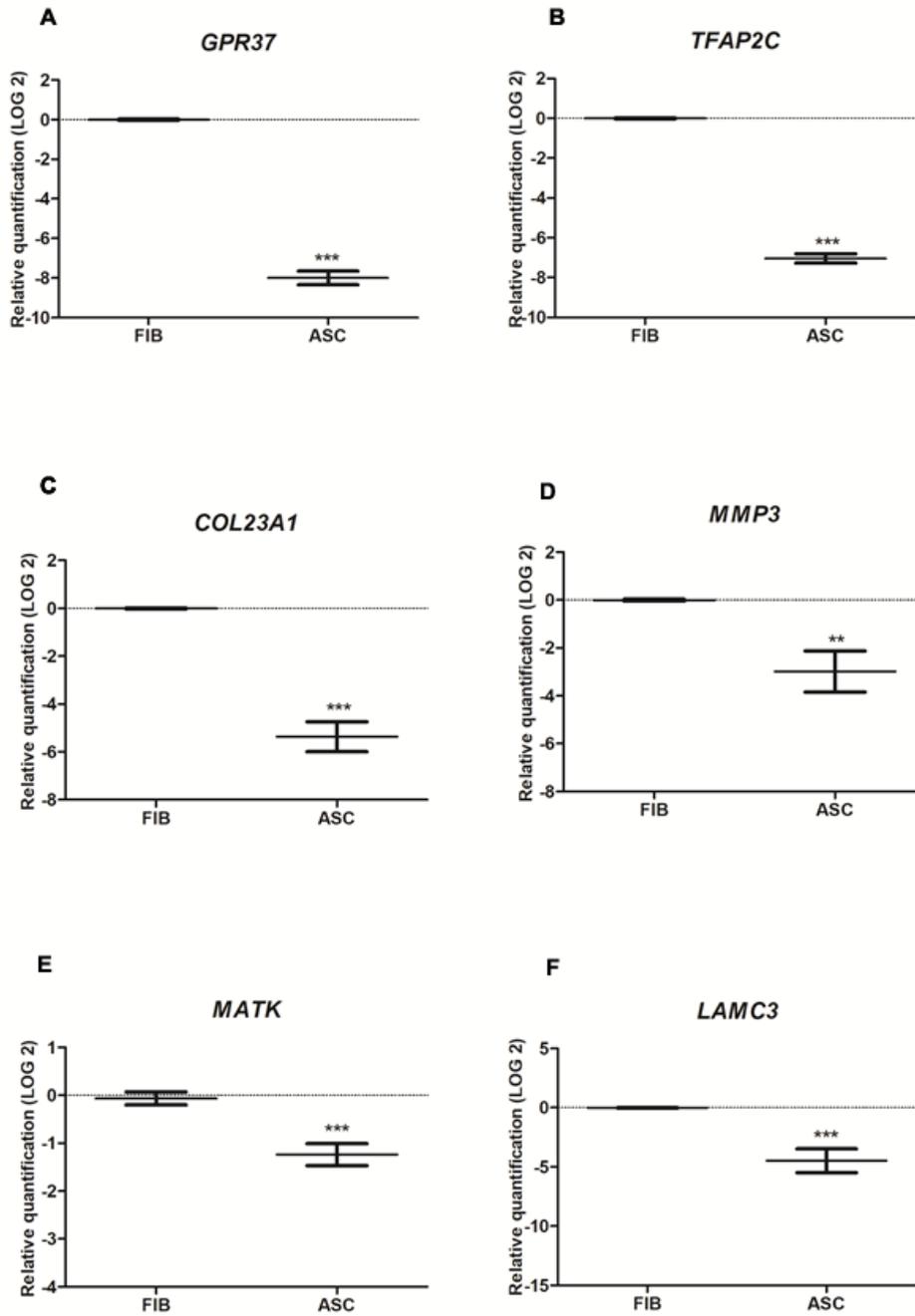
**Figure 8.**



**Figure 9.**



**Figure 10.**



**Table S1. The sequenced reads showed high quality of base calling indicated by Q score**

<b>Sample name</b>	<b>Raw reads</b>	<b>Clean reads</b>	<b>Clean bases</b>	<b>Q20(%)</b>	<b>Q30(%)</b>	<b>GC content(%)</b>
ASC_1	52997608	51577670	7.74G	96.17	90.68	53.91
ASC_2	50243124	48867828	7.33G	95.98	90.29	54.78
ASC_3	54024442	52663284	7.9G	95.96	90.26	53.23
FIB_1	55744896	53962472	8.09G	96.44	91.31	54.24
FIB_2	71577818	69158408	10.37G	96.60	91.65	55.13
FIB_3	67995480	65833220	9.87G	96.42	91.21	57.73

**Table S2. Summary of mapping results obtained for ASC and FIB samples**

<b>Sample Name</b>	<b>ASC_1</b>	<b>ASC_2</b>	<b>ASC_3</b>	<b>FIB_1</b>	<b>FIB_2</b>	<b>FIB_3</b>
<b>Total reads</b>	51577670	48867828	52663284	53962472	69158408	65833220
<b>Total mapped</b>	43210246 (83.78%)	40711807 (83.31%)	44384453 (84.28%)	45383811 (84.1%)	57960267 (83.81%)	54792348 (83.23%)
<b>Multiple mapped</b>	663247 (1.29%)	612898 (1.25%)	670092 (1.27%)	685658 (1.27%)	768379 (1.11%)	773863 (1.18%)
<b>Uniquely mapped</b>	42546999 (82.49%)	40098909 (82.06%)	43714361 (83.01%)	44698153 (82.83%)	57191888 (82.7%)	54018485 (82.05%)
<b>Reads map to '+'</b>	21356559 (41.41%)	20121106 (41.17%)	21928078 (41.64%)	22369569 (41.45%)	28579785 (41.33%)	27016260 (41.04%)
<b>Reads map to '-'</b>	21190440 (41.08%)	19977803 (40.88%)	21786283 (41.37%)	22328584 (41.38%)	28612103 (41.37%)	27002225 (41.02%)
<b>Non-splice reads</b>	21363162 (41.42%)	19189275 (39.27%)	21452170 (40.73%)	22664814 (42%)	29732109 (42.99%)	24734513 (37.57%)
<b>Splice reads</b>	21183837 (41.07%)	20909634 (42.79%)	22262191 (42.27%)	22033339 (40.83%)	27459779 (39.71%)	29283972 (44.48%)

(1) Total reads: total clean reads

(2) Total mapped: the ratio of mapped reads with total reads (the ratio should higher than 70%)

(3) Multiple mapped: the ratio of multiple mapped reads with total reads (the ratio should lower than 10%)

(4) Uniquely mapped: the ratio of uniquely mapped reads with total reads

(5) Reads map to '+', Reads map to '-': the ratio of Reads map to '+' strand, Reads map to '-' strand with total reads

(6) Splice reads: also called Junction reads, the ratio of mapped splice reads with total reads

**Table S3. The number and percentages of genes exhibiting differential expression levels as estimated using fragments per kilobase pair per million reads (FPKM)**

<b>FPKM</b>	<b>ASC_1</b>	<b>ASC_2</b>	<b>ASC_3</b>	<b>FIB_1</b>	<b>FIB_2</b>	<b>FIB_3</b>
<b>0~1</b>	35778 (74.29%)	35773 (74.28%)	35590 (73.90%)	35384 (73.47%)	35425 (73.55%)	36678 (76.16%)
<b>1~3</b>	2405 (4.99%)	2388 (4.96%)	2350 (4.88%)	2315 (4.81%)	2283 (4.74%)	2472 (5.13%)
<b>3~15</b>	4535 (9.42%)	4575 (9.50%)	4567 (9.48%)	4512 (9.37%)	4344 (9.02%)	3951 (8.20%)
<b>15~60</b>	3661 (7.60%)	3671 (7.62%)	3914 (8.13%)	3932 (8.16%)	3870 (8.04%)	2971 (6.17%)
<b>&gt;60</b>	1783 (3.70%)	1755 (3.64%)	1741 (3.61%)	2019 (4.19%)	2240 (4.65%)	2090 (4.34%)

Supplementary Table S4 ASCvsFIB.DEG - Microsoft Excel

Arquivo | Página Inicial | Inserir | Layout da Página | Fórmulas | Dados | Revisão | Exibição

Calibri | 11 | A A | Quebrar Texto Automaticamente | Geral | % 000 | 0,00 0,00

Colar | Fonte | Alinhamento | Número | Estilo | Células | Edição

AutoSoma | Preencher | Limpar | Classificar e Filtrar | Localizar e Selecionar

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T	
1	Gene_id	readcount_ASC	readcount_FII	log2FoldC	pval	padj	Associate	genetype	Description												
2	ENSG0000	#####	#####	12.035	0.0009311	0.010887	GCLC	protein_c	glutamate-cysteine ligase, catalytic subunit [Source:HGNC Symbol;Acc:4311]												
3	ENSG0000	#####	#####	-37.201	3,01E-10	4,77E-08	HECW1	protein_c	HECT, C2 and WW domain containing E3 ubiquitin protein ligase 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:22195]												
4	ENSG0000	#####	#####	-17.132	0.0050291	0.041593	DBNDD1	protein_c	dysbindin (dystrobrevin binding protein 1) domain containing 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:28455]												
5	ENSG0000	16.634.873.407	#####	-11.164	0.0043654	0.037291	CAMKK1	protein_c	calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase 1, alpha [Source:HGNC Symbol;Acc:1469]												
6	ENSG0000	#####	#####	21.109	4,97E-02	0.0001259	HSPB6	protein_c	heat shock protein, alpha-crystallin-related, B6 [Source:HGNC Symbol;Acc:26511]												
7	ENSG0000	#####	#####	-21.082	6,81E-05	3,63E-03	ARHGAP3	protein_c	Rho GTPase activating protein 33 [Source:HGNC Symbol;Acc:23085]												
8	ENSG0000	138.897.441.328	#####	-19.954	0.0015194	0.016188	PDK4	protein_c	pyruvate dehydrogenase kinase, isozyme 4 [Source:HGNC Symbol;Acc:8812]												
9	ENSG0000	#####	#####	-17.834	0.0045977	0.038811	ZMYND10	protein_c	zinc finger, MYND-type containing 10 [Source:HGNC Symbol;Acc:19412]												
10	ENSG0000	#####	#####	-21.966	1,47E-03	5,93E-02	HOXA11	protein_c	homeobox A11 [Source:HGNC Symbol;Acc:5101]												
11	ENSG0000	#####	#####	-18.084	3,64E-02	9,68E-01	AC004381	protein_c	Putative RNA exonuclease NEF-sp [Source:UniProtKB/Swiss-Prot;Acc:Q96IC2]												
12	ENSG0000	105.128.303.603	#####	-24.985	3,17E-03	1,16E-01	PRKAR2B	protein_c	protein kinase, cAMP-dependent, regulatory, type II, beta [Source:HGNC Symbol;Acc:9392]												
13	ENSG0000	#####	#####	-17.153	0.0001585	0.0024419	BZRAP1	protein_c	benzodiazepine receptor (peripheral) associated protein 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:16831]												
14	ENSG0000	#####	#####	-16.204	0.0002806	0.0039557	WDR54	protein_c	WD repeat domain 54 [Source:HGNC Symbol;Acc:25770]												
15	ENSG0000	#####	#####	-24.536	7,22E-02	0.0001720	ABCB4	protein_c	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 4 [Source:HGNC Symbol;Acc:45]												
16	ENSG0000	#####	#####	12.293	0.001737	0.018014	MYCBP2	protein_c	MYC binding protein 2, E3 ubiquitin protein ligase [Source:HGNC Symbol;Acc:23386]												
17	ENSG0000	#####	#####	-13.042	0.0018782	0.019165	PDK2	protein_c	pyruvate dehydrogenase kinase, isozyme 2 [Source:HGNC Symbol;Acc:8810]												
18	ENSG0000	#####	#####	-16.797	0.0002735	0.0038625	ITGA3	protein_c	integrin, alpha 3 (antigen CD49C, alpha 3 subunit of VLA-3 receptor) [Source:HGNC Symbol;Acc:6139]												
19	ENSG0000	#####	#####	-18.938	0.0004916	0.006365	TMEM132	protein_c	transmembrane protein 132A [Source:HGNC Symbol;Acc:31092]												
20	ENSG0000	#####	#####	-35.128	1,90E-09	2,57E-07	CACNA1G	protein_c	calcium channel, voltage-dependent, T type, alpha 1G subunit [Source:HGNC Symbol;Acc:1394]												
21	ENSG0000	0.3894394329442	#####	-32.636	0.0001828	0.0027462	MAP3K9	protein_c	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 9 [Source:HGNC Symbol;Acc:6861]												
22	ENSG0000	#####	#####	13.133	0.0050661	0.041778	JHDM1D	protein_c	jumonji C domain containing histone demethylase 1 homolog D (S. cerevisiae) [Source:HGNC Symbol;Acc:22224]												
23	ENSG0000	#####	#####	-22.482	3,88E-01	0.0007298	ETV1	protein_c	ets variant 1 [Source:HGNC Symbol;Acc:3490]												
24	ENSG0000	#####	#####	-21.786	5,62E-07	4,83E-05	ALDH3B1	protein_c	aldehyde dehydrogenase 3 family, member B1 [Source:HGNC Symbol;Acc:410]												
25	ENSG0000	#####	#####	-12.786	0.0016984	0.017635	TBXA2R	protein_c	thromboxane A2 receptor [Source:HGNC Symbol;Acc:11608]												

**Table S5. List of differentially expressed RNA-Seq genes selected for in vitro validation.**

<b>Gene</b>	<b>Adjusted p-value</b>	<b>Regulation</b>
<i>ENSG00000149968</i> <i>MMP3</i>	$6.41 \times 10^{-38}$	<i>Downregulated</i>
<i>ENSG00000164106</i> <i>SCRG1</i>	$6.65 \times 10^{-37}$	<i>Upregulated</i>
<i>ENSG00000087510</i> <i>TFAP2C</i>	$1.29 \times 10^{-36}$	<i>Downregulated</i>
<i>ENSG00000130595</i> <i>TNNT3</i>	$1.90 \times 10^{-34}$	<i>Upregulated</i>
<i>ENSG00000060718</i> <i>COL11A1</i>	$4.00 \times 10^{-33}$	<i>Upregulated</i>
<i>ENSG00000154678</i> <i>PDE1C</i>	$6.61 \times 10^{-28}$	<i>Upregulated</i>
<i>ENSG00000135218</i> <i>CD36</i>	$2.84 \times 10^{-22}$	<i>Upregulated</i>
<i>ENSG00000198947</i> <i>DMD</i>	$1.25 \times 10^{-22}$	<i>Upregulated</i>
<i>ENSG00000169946</i> <i>ZFPM2</i>	$3.67 \times 10^{-18}$	<i>Upregulated</i>
<i>ENSG00000142910</i> <i>TINAGL1</i>	$5.13 \times 10^{-17}$	<i>Upregulated</i>
<i>ENSG00000221818</i> <i>EBF2</i>	$2.00 \times 10^{-17}$	<i>Upregulated</i>
<i>ENSG00000170775</i> <i>GPR37</i>	$7.23 \times 10^{-14}$	<i>Downregulated</i>
<i>ENSG00000050555</i> <i>LAMC3</i>	$6.98 \times 10^{-12}$	<i>Downregulated</i>
<i>ENSG00000050767</i> <i>COL23A1</i>	$1.14 \times 10^{-11}$	<i>Downregulated</i>
<i>ENSG00000162551</i> <i>ALPL</i>	$5.33 \times 10^{-8}$	<i>Upregulated</i>
<i>ENSG00000007264</i> <i>MATK</i>	$7.30 \times 10^{-5}$	<i>Downregulated</i>