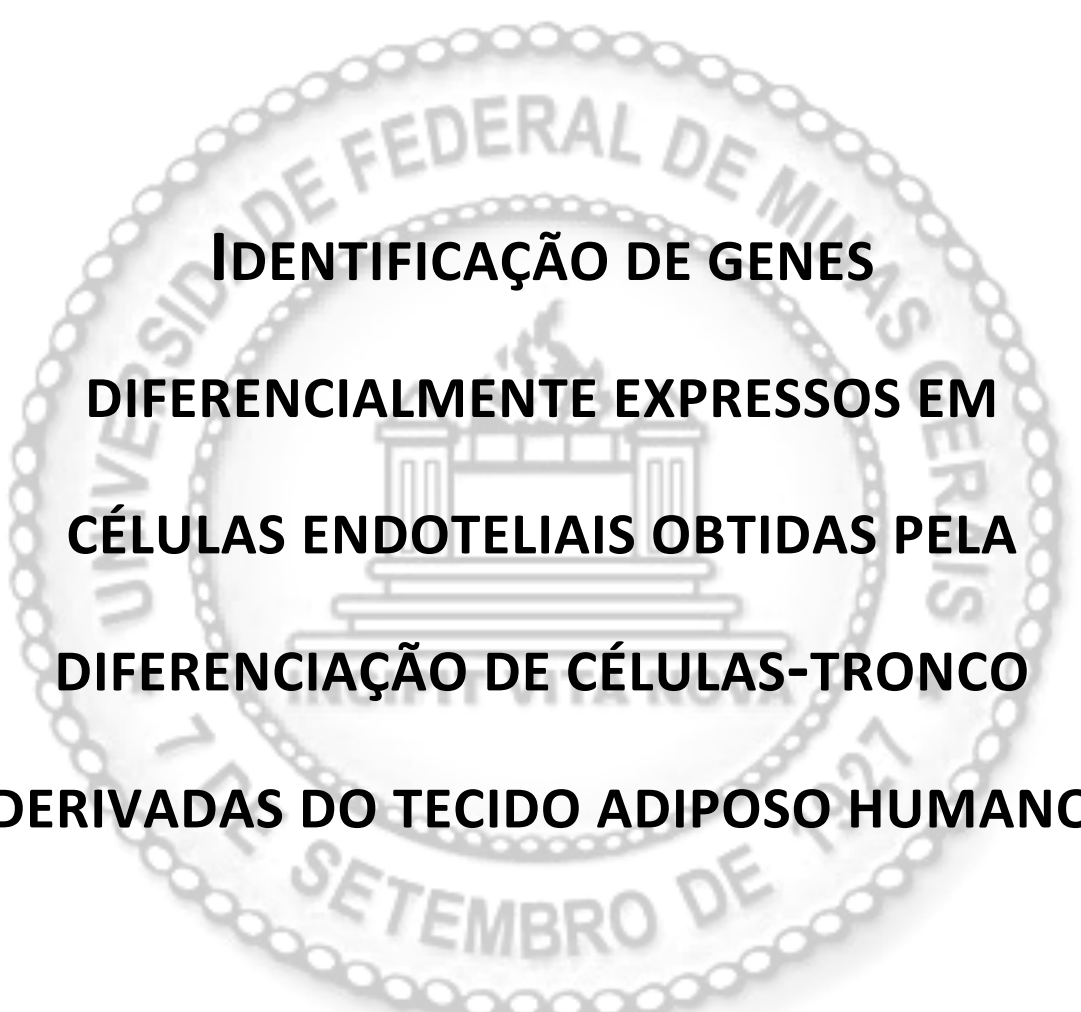


UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA GERAL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA



Dissertação de Mestrado



**IDENTIFICAÇÃO DE GENES  
DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS EM  
CÉLULAS ENDOTELIAIS OBTIDAS PELA  
DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO  
DERIVADAS DO TECIDO ADIPOSEO HUMANO**

Naira Roque Electo de Paiva

ORIENTADOR: Prof. Dr. Alfredo Miranda de Góes

BELO HORIZONTE

Agosto – 2011

Naira Roque Electo de Paiva

**IDENTIFICAÇÃO DE GENES  
DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS EM  
CÉLULAS ENDOTELIAIS OBTIDAS PELA  
DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO  
DERIVADAS DO TECIDO ADIPOSEO HUMANO**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre pelo programa de Pós-Graduação em Genética, Departamento de Biologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais.

**Orientador: Prof. Dr. Alfredo Miranda de Góes**

BELO HORIZONTE

Agosto – 2011

## DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação ao meu pai Péricles (*in memoriam*), à minha mãe Júlia, aos meus irmãos Narúbia e Júnior, à minha sobrinha Isabella Beatriz e ao meu marido Anderson Miyoshi, que sempre estiveram ao meu lado em todos os momentos importantes da minha vida.

*“Ando devagar  
Porque já tive pressa  
E levo esse sorriso  
Porque já chorei demais  
Hoje me sinto mais forte,  
Mais feliz, quem sabe  
Só levo a certeza  
De que muito pouco sei,  
Ou nada sei...”*

*Almir Sater e Renato Teixeira*

# AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus, pela fidelidade incondicional.

À Universidade Federal de Minas Gerais pela excelente formação acadêmica que me foi oferecida;

À agência de fomento, CNPq, por financiar este projeto de mestrado;

À coordenação, professores e colegas do curso de Pós-Graduação em Genética do ICB-UFMG;

Aos membros da banca por terem aceitado o convite para avaliar este trabalho;

Ao meu orientador Prof. Dr. Alfredo Miranda de Góes pela oportunidade e confiança em mim depositada, para desenvolver este projeto;

Aos colegas do LICM, por contribuírem para o meu crescimento científico e por me auxiliarem na realização dos experimentos;

À Alessandra Zonari, minha dupla, por dividir comigo, cada momento, e me ensinar muito...

Às amigas Vivi, Luíza e Marina, pelo apoio e carinho constantes;

À Betinha, por ser assim... Mãe...

À minha mãe, Júlia, meu motivo maior. Aos meus irmãos, Narúbia e Júnior, pela torcida, mesmo que distante. À minha sobrinha Isabella, que tanto amo.

Ao meu marido, Anderson Miyoshi, por me incentivar e apoiar em todas as decisões. Por todo apoio pessoal e profissional.



# SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	I
LISTA DE TABELAS .....	III
LISTA DE ABREVIATURAS .....	IV
RESUMO .....	1
ABSTRACT .....	2
1. INTRODUÇÃO .....	3
1.1. Células-tronco e a medicina regenerativa. ....	4
1.2. Células-tronco embrionárias. ....	5
1.3. Células-tronco de pluripotência induzida .....	7
1.4. Células-tronco adultas .....	9
1.4.1. Células-tronco hematopoiéticas .....	10
1.4.2. Células-tronco mesenquimais .....	11
1.4.2.1. Células-tronco mesenquimais e o tecido adiposo .....	13
1.5. Utilização de células-tronco na angiogênese .....	14
1.6. Células-tronco e a segurança para uso clínico .....	16
1.7. Análise global da expressão gênica .....	18
1.7.1. Técnicas de hibridização subtrativa .....	20
1.7.1.1. Hibridização subtrativa .....	20
1.7.1.2. Hibridização subtrativa rápida (RaSH) .....	22
1.8. Justificativa de realização do trabalho. ....	25
2. OBJETIVOS .....	26
2.1. Objetivo geral .....	27
2.2. Objetivos específicos .....	27
3. MATERIAIS E MÉTODOS .....	28
3.1. Isolamento e cultivo de células-tronco mesenquimais de tecido adiposo humano .....	29

3.1.1. Obtenção do tecido adiposo . . . . .	29
3.1.2. Processamento do tecido adiposo e obtenção das células-tronco.	29
3.1.3. Análise da viabilidade e proliferação celular . . . . .	31
3.1.4. Avaliação da produção da fosfatase alcalina. . . . .	32
3.1.5. Caracterização das células-tronco de tecido adiposo humano por citometria de fluxo. . . . .	33
3.1.5.1. Marcação celular com anticorpos primário e secundário.	34
3.1.5.2. Leitura no citômetro de fluxo (FACScan). . . . .	35
3.2. Indução à diferenciação endotelial. . . . .	35
3.2.1. Avaliação da proliferação e viabilidade celular após a indução à diferenciação endotelial. . . . .	36
3.2.2. Avaliação da produção da fosfatase alcalina após a indução à diferenciação endotelial. . . . .	36
3.2.3. Análises estatísticas. . . . .	37
3.2.4. Avaliação da presença de marcadores de células endoteliais através de ensaio de imunofluorescência. . . . .	37
3.3. Identificação de genes diferencialmente expressos através de hibridização subtrativa rápida (RaSH) . . . . .	39
3.3.1. Extração de RNA total. . . . .	40
3.3.2. Síntese de cDNA dupla fita. . . . .	41
3.3.2.1. Preparação dos fragmentos para hibridização - Digestão do cDNA e ligação dos adaptadores. . . . .	43
3.3.3. Hibridização e construção da biblioteca subtrativa. . . . .	44
3.3.3.1. Confeção de <i>Escherichia coli</i> eletrocompetente. . . . .	45
3.3.3.2. Transformação de <i>E.coli</i> eletrocompetente . . . . .	46
3.3.3.3. Seleção de clones para seqüenciamento. . . . .	47
3.3.3.4. Extração do DNA plasmidiano. . . . .	47
3.3.4. Reação de sequenciamento e análises <i>in silico</i> . . . . .	48
3.3.5. PCR em Tempo Real para a validação dos genes identificados. . .	50

3.3.5.1. Elaboração de oligonucleotídeos. . . . .	50
3.3.5.2. Seleção do controle endógeno. . . . .	50
3.3.5.3. Determinação da eficiência de amplificação dos iniciadores. . . . .	52
3.3.5.4. Reação de PCR em Tempo Real. . . . .	53
3.3.5.5. Cálculo da expressão gênica diferencial dos genes avaliados. . . . .	54
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO . . . . .	56
4.I. Isolamento e caracterização das células-tronco. . . . .	57
4.I.1. Extração e cultivo das hASC. . . . .	57
4.I.2. Avaliação da viabilidade celular. . . . .	58
4.I.3. Avaliação da produção de fosfatase alcalina. . . . .	59
4.I.4. Caracterização fenotípica por citometria de fluxo. . . . .	60
4.II. Indução de hASC à diferenciação endotelial. . . . .	63
4.II.1. Diferenciação endotelial. . . . .	63
4.II.2. Avaliação da viabilidade e proliferação celular após a diferenciação endotelial. . . . .	63
4.II.3. Avaliação da produção da fosfatase alcalina após a diferenciação endotelial. . . . .	65
4.II.4. Análise de marcadores de células endoteliais após a diferenciação endotelial através de imunofluorescência. . . . .	66
4.III. Identificação de genes diferencialmente expressos após a diferenciação endotelial - RaSH. . . . .	69
4.III.1. Extração de RNA e análise da integridade e pureza. . . . .	69
4.III.2. Síntese de cDNA fita dupla e comprovação por PCR. . . . .	70
4.III.3. Digestão enzimática das seqüências de cDNA pela endonuclease de restrição <i>Mbo I</i> . . . . .	71
4.III.4. Ligação dos adaptadores aos fragmentos gerados. . . . .	72
4.III.5. Hibridização subtrativa. . . . .	74

4.III.6. Extração do DNA plasmidiano das colônias selecionadas.	74
4.III.7. Amplificação das sequências ligadas ao plasmídeo. . . . .	75
4.III.8. Análise das seqüências geradas. . . . .	76
4.IV. Validação dos genes encontrados por PCR em Tempo Real. . . . .	80
4.IV.1. Teste de eficiência dos oligonucleotídeos. . . . .	81
4.IV.2. Os genes candidatos validados. . . . .	84
5. CONCLUSÕES . . . . .	87
6. PERSPECTIVAS . . . . .	89
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS. . . . .	91
8. ANEXOS . . . . .	106

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: CÉLULAS-TRONCO EMBRIONÁRIAS - ORIGEM E PLASTICIDADE .....	6
FIGURA 2: IPSC – TÉCNICA DE OBTENÇÃO .....	8
FIGURA 3: ESQUEMA REPRESENTATIVO DA TÉCNICA DE RASH .....	23
FIGURA 4: ASPECTOS MORFOLÓGICOS DA CULTURA DE CÉLULAS EXTRAÍDAS DO TECIDO ADIPOSEO HUMANO ATÉ A 4ª PASSAGEM .....	58
FIGURA 5: VISUALIZAÇÃO DOS CRISTAIS DE FORMAZAN OBTIDOS COM O ENSAIO DE MTT REALIZADO COM A CULTURA EM 4ª PASSAGEM DE HASC PREVIAMENTE ISOLADAS .....	59
FIGURA 6: VERIFICAÇÃO DA PRODUÇÃO DE FOSFATASE ALCALINA PELAS HASC, NA 4ª PASSAGEM DE CULTIVO .....	60
FIGURA 7: GRÁFICO DE TAMANHO VERSUS GRANULOSIDADE DA POPULAÇÃO DE HASC.....	61
FIGURA 8: ANÁLISE FENOTÍPICA DAS HASC ATRAVÉS DE CITOMETRIA DE FLUXO.....	62
FIGURA 9: REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA QUANTIDADE DE CÉLULAS VIÁVEIS NA CULTURA DE HASC E APÓS ESTAS SEREM INDUZIDAS À DIFERENCIAÇÃO ENDOTELIAL POR 14 DIAS.....	65
FIGURA 10: REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA PRODUÇÃO DE FOSFATASE ALCALINA NA CULTURA DE HASC E APÓS ESTAS SEREM INDUZIDAS À DIFERENCIAÇÃO ENDOTELIAL POR 14 DIAS.....	66
FIGURA 11: ANÁLISE DA IMONUFLUORESCÊNCIA PARA A PROTEÍNA VE-CADERINA.....	67
FIGURA 12: ANÁLISE DA IMONUFLUORESCÊNCIA PARA A PROTEÍNA VWF .....	68
FIGURA 13: ANÁLISE DO RNA EXTRAÍDO DAS CÉLULAS INDIFERENCIADAS E DIFERENCIADAS.....	70

FIGURA 14: COMPROVAÇÃO DA SÍNTESE DE CDNA ATRAVÉS DE PCR.....	71
FIGURA 15: VISUALIZAÇÃO DA DIGESTÃO DAS AMOSTRAS DE CÉLULAS INDIFERENCIADAS E DIFERENCIADAS APÓS 14 DIAS, COM A ENZIMA DE RESTRIÇÃO <i>MBO I</i> .....	72
FIGURA 16: COMPROVAÇÃO DA LIGAÇÃO DOS ADAPTADORES ATRAVÉS DA AMPLIFICAÇÃO DOS FRAGMENTOS COM OLIGONUCLEOTÍDEO ESPECÍFICO (XDPN-18) PARA OS ADAPTADORES XDPN-12 E XDPN-14.....	73
FIGURA 17: AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE DO DNA PLASMIDIANO EXTRAÍDO DE ALGUNS CLONES SELECIONADOS.....	75
FIGURA 18: ANÁLISE DO PRODUTO DE AMPLIFICAÇÃO POR PCR DE ALGUMAS AMOSTRAS.....	76
FIGURA 19: EXEMPLO DE PADRONIZAÇÃO DAS REAÇÕES DE PCR EM TEMPO REAL.....	83
FIGURA 20: ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DOS CINCO GENES IDENTIFICADOS EM AMOSTRAS DE CÉLULAS-TRONCO INDUZIDAS À DIFERENCIAÇÃO ENDOTELIAL.....	85

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1: ANTICORPOS PRIMÁRIOS UTILIZADOS PARA CITOMETRIA DE FLUXO .....	34
TABELA 2: ANTICORPOS PRIMÁRIOS UTILIZADOS PARA IMUNOFLUORESCÊNCIA.....	39
TABELA 3: PARÂMETROS DE UTILIZAÇÃO DOS REAGENTES NAS REAÇÕES DE PCR EM TEMPO REAL.....	51
TABELA 4: PARÂMETROS DE AMPLIFICAÇÃO DAS REAÇÕES DE PCR EM TEMPO REAL.....	51
TABELA 5: SEQUÊNCIAS DE OLIGONUCLEOTÍDEOS UTILIZADOS NAS REAÇÕES DE PCR EM TEMPO REAL.....	52
TABELA 6: GENES IDENTIFICADOS PELA TÉCNICA DE RASH.....	77

## LISTA DE ABREVIATURAS

°C - Graus Celsius

µg - Micrograma (10<sup>-6</sup> gramas)

µL - Microlitro (10<sup>-6</sup> litros)

µm - Micrômetros (10<sup>-6</sup> metros)

µM - Micromolar (10<sup>-6</sup> molar)

Amp<sup>r</sup> - Resistência a Ampicilina

ASC - “Adipose Stem Cell”

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

bFGF - “Basic Fibroblast Growth Factor”

BLAST - “Basic Local Alignment Search Tool”

BMP-4 - “Bone Morphogenetic Protein 4”

bp - pares de base

BSA - “Bovine Serum Albumin”

CD - “Cluster of Differentiation”

CEMEL - Centro de Microscopia Eletrônica

Ct - “Cycle threshold”

DEPC - Dietil pirocarbonato

DNA - Ácido desoxirribonucléico

dNTP - Desoxinucleotídeo trifosfato

DO - Densidade óptica

DTT - Ditioneitol

EDTA - Etileno diamino tetra-acetato dissódio

ESC - “Embrionic Stem Cell”

FACS - “Fluorescent Activated Cell Sorter”

GAPDH - Gliceroldeído-3-fosfato desidrogenase

HCl - Ácido clorídrico

HIV - “Human Immunodeficiency Virus”



HSC - “Hematopoietic Stem Cell”  
ICB - Instituto de Ciências Biológicas  
IgG - Imunoglobulina G  
INF- $\beta$  - Interferon  $\beta$   
iPSC - “Induced Pluripotent Stem Cell”  
IPTG - Isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosídeo  
Kb - Quilobases ( $10^3$  pb)  
KCL - Cloreto de Potássio  
KDa - Quilodaltons ( $10^3$  Da)  
kV - Quilovolt ( $10^3$  Volts)  
LB - Luria-Bertani  
M - Molar  
mA - Miliampere (Amperagem)  
mg - Miligrama ( $10^{-3}$  grama)  
MgCl<sub>2</sub> - Cloreto de magnésio  
MHC - “Major Histocompatibility Complex”  
min - minutos  
mL - Mililitro ( $10^{-3}$  litro)  
mM - Milimolar ( $10^{-3}$  molar)  
mRNA - RNA mensageiro  
MSC - “Mesenquimal Stem Cell”  
MTT - Tetrazólio 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio bromide  
NaCl - Cloreto de sódio  
NaOAc - Acetato de sódio  
NaOH - Hidróxido de sódio  
NBT - Nitroblue tetrazólio clorídrico  
NCBI - “National Center for Biotechnology Information”  
ng - Nanograma ( $10^{-9}$  gramas)  
nm - Nanômetro ( $10^{-9}$  metros)

PBS - “Phosphate Buffered Saline”

PCR - “Polymerase Chain Reaction”

pH - Potencial Hidrogeniônico

PI - Iodeto de Propídeo

pmol - Picomolar ( $10^{-9}$  molar)

PSA - Persulfato de Amônio

RaSH - “Rapid Subtractive Hybridization”

RNA - Ácido ribonucléico

rpm - Rotações por Minuto

rRNA - RNA ribossômico

SAGE - “Serial Analysis of Gene Expression”

SDS - Dodecil Sulfato de Sódio

seg - segundos

SSH - “Supression Subtractive Hybridization”

TBE - Tris-Borato-EDTA

TGF- $\beta$  - “Transforming Growth Factor beta”

TLR - “Toll Like Receptor”

tRNA - RNA transportador

U - Unidade

UFC - Unidade Formadora de Colônia

V/V - Volume por Volume

X - Vezes

X-Gal - 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranoside

$\Omega$  - Ohm (resistência)

## RESUMO

Há alguns anos, células-tronco foram obtidas de embriões e fetos humanos, dando início a uma nova era na área da biologia do desenvolvimento e suas possíveis aplicações médicas. Desde então, diferentes estratégias para se obter células-tronco foram descritas e, dentre estas, o isolamento de *human Adipose Stem Cell* (hASC); as quais possuem a capacidade de se diferenciarem em várias linhagens mesenquimais, tais como células endoteliais. Contudo, ainda que algumas análises fenotípicas sejam utilizadas para comprovar tal diferenciação, para que a aplicação da terapia celular seja mais segura e eficaz, os processos genéticos que envolvem a diferenciação de células-tronco em determinadas linhagens celulares ainda não estão completamente elucidados no que se refere à expressão gênica diferencial. Nesse contexto, o objetivo desse trabalho foi o de identificar genes diferencialmente expressos em hASC induzidas à diferenciação endotelial. Para tanto, as células-tronco foram extraídas de produto de lipoaspirado, processadas e avaliadas por Citometria de Fluxo e por Ensaio de Fosfatase Alcalina. Para indução à diferenciação endotelial, VEGF e bFGF, foram adicionados ao meio de cultivo e após 14 dias, análises fenotípicas foram realizadas através de Ensaio de Fosfatase Alcalina, Citometria de Fluxo e Microscopia Confocal. Para a identificação de genes diferencialmente expressos nas células induzidas à diferenciação, foi utilizada a técnica de *Rapid Subtractive Hybridization* (RaSH) e posterior identificação dos genes através de seqüenciamento e validação por PCR em Tempo Real. Os resultados obtidos comprovaram o isolamento de células-tronco derivadas do tecido adiposo e a diferenciação endotelial após indução. Através da utilização da técnica de RaSH foram identificados 5 genes (ELAVL1, LAMB2, SC5DL, HARS e VEGFA), dos quais foram validados VEGFA e HARS, através de PCR em Tempo Real, com expressão de 1,5 e 1,78 vezes maior do que na célula indiferenciada, respectivamente.

## ABSTRACT

Stem cells were obtained from embryos and human fetuses for the first time a few years ago, giving rise to a new era in the area of development biology and its possible medical applications. Different strategies have been thenceforth described to obtain stem cells, among which isolation of the *human Adipose Stem Cell* (hASC) stands out, as these have the capacity to differentiate into several mesenchymal strains, such as endothelial cells. Nevertheless, although some phenotypic analyses can be used to prove such differentiation, in order for cellular therapy application to be safer and more efficient, genetic processes that involve stem cell differentiation into determined cellular strains still need to be completely elucidated, especially regarding differential gene expression. In this context, the objective of this work was to identify differentially expressed genes in hASC induced to endothelial differentiation. Stem cells were therefore extracted from lipoaspired product, processed and evaluated by Flow Cytometry and Alkaline Phosphatase Assay. Following, VEGF and bFGF were added to the culture medium for induction of endothelial differentiation and after 14 days, phenotypic analyses were realized through the Alkaline Phosphatase Assay, Flow Cytometry and Confocal Microscopy. In order to identify differentially expressed genes in the cells induced for differentiation, *Rapid Subtractive Hybridization* (RaSH) technique and posterior gene identification through sequencing and Real Time PCR were performed. The obtained results confirmed isolation of stem cells derived from the adipose tissue and endothelial differentiation after induction. Using the RaSH technique, 5 genes (ELAVL1, LAMB2, SC5DL, HARS e VEGFA) were identified, of which VEGFA and HARS were validated through Real Time PCR with 1,5 and 1,78 times higher expression, respectively, when compared to undifferentiated cells.

## **1. INTRODUÇÃO**

## 1.1. Células-tronco e a medicina regenerativa

Desde os primeiros experimentos realizados, há mais de dez anos, com modelos animais, os trabalhos com células-tronco têm tido enormes avanços no sentido de torná-las uma opção de tratamento clinicamente aceitável (Marelli *et al.*, 1992; Koh *et al.*, 1993). A utilização dessas células para o reparo de órgãos e tecidos lesados abre as portas para uma nova era, rica em possibilidades, e chamada de “Medicina Regenerativa”, a qual busca a reconstituição de tecidos com as mesmas funcionalidades originais e, segundo alguns pesquisadores, apresenta um potencial revolucionário comparável ao do advento da penicilina. Desde a primeira vez que conseguiu-se isolar células-tronco embrionárias, há cerca de 30 anos, uma série de novas informações e conhecimentos tem contribuído para o avanço, cada vez maior, da área da medicina regenerativa.

Essas células apresentam muitas propriedades especiais, além da capacidade de se renovarem e se diferenciarem em tipos celulares especializados, e o entendimento completo do funcionamento das células-tronco, só é possível baseado em estudos dos mecanismos moleculares que controlam esses processos (Chambers e Smith, 2004; Naveiras e Daley, 2006).

As células-tronco são células indiferenciadas que possuem a capacidade de auto-renovação e diferenciação em vários tipos celulares diferentes. (Gepstein, 2002). Elas estão presentes desde o desenvolvimento embrionário e persistem no indivíduo adulto, podendo ser classificadas pelo seu potencial de diferenciação em: totipotentes, pluripotentes e multipotentes.

O ovócito fecundado e as células do blastômero são considerados células-tronco totipotentes porque possuem a capacidade de dar origem a um organismo completo, bem como a todos os anexos embrionários (endoderma, mesoderma e ectoderma) (Lo *et al.*, 2003).

## 1.2. Células-tronco embrionárias

As células-tronco embrionárias (ESC do inglês *Embryonic Stem Cell*), classificadas como pluripotentes, são extraídas da massa interna do blastocisto e possuem a capacidade de se diferenciar em qualquer tipo celular derivado dos três folhetos embrionários (Figura 1). O isolamento de ESC tanto de ratos quanto de primatas, em 1981 (Evans e Kaufman, 1981; Martin, 1981; Thomson *et al.*, 1995), foi a base para o estabelecimento, em 1998, do isolamento da linhagem de células embrionárias humanas (Thomson *et al.*, 1998) as quais expressam os fatores de transcrição Oct-4, Nanog e Sox2 que são responsáveis por manter o estado de pluripotência (Gokhale e Andrews, 2009). Desde então, vários grupos de pesquisa têm conseguido expandir e diferenciar tais células-tronco em diferentes tipos celulares, *in vitro*, e, desde a sua derivação inicial, essas células têm sido extensivamente estudadas, apresentando grande potencial para aplicação na medicina regenerativa.



**Figura 1: Células-tronco embrionárias - Origem e Plasticidade:** Esquema representativo do isolamento de células embrionárias retiradas da massa interna do blastocisto. Essas células podem originar células componentes dos três folhetos embrionários. Fonte: <<http://www.proprofs.com>>. Último acesso: 28/06/2011

Desde o estabelecimento das primeiras células-tronco embrionárias de ratos (Evans e Kaufman, 1981), inúmeros estudos vêm demonstrando resultados promissores para a terapia celular, como a cicatrização de lesões (Fu *et al.*, 2006; Lau *et al.*, 2009; Luo *et al.*, 2010), a restauração dos níveis de dopamina no cérebro em modelo murino de Parkinson (Wolff *et al.*, 2010), a manutenção dos níveis de glicose no sangue (Piacibello *et al.*, 1999; Arai *et al.*, 2004), tratamentos de lesões medulares na coluna vertebral (Nandoe *et al.*, 2006; Vaquero e Zurita, 2009; Yamazaki *et al.*, 2010) e outras doenças (Patel *et al.*, 2005; Pitini *et al.*, 2006; Vilquin e Rosset, 2006; Granero-Molto *et al.*, 2008; Borlongan *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2010).

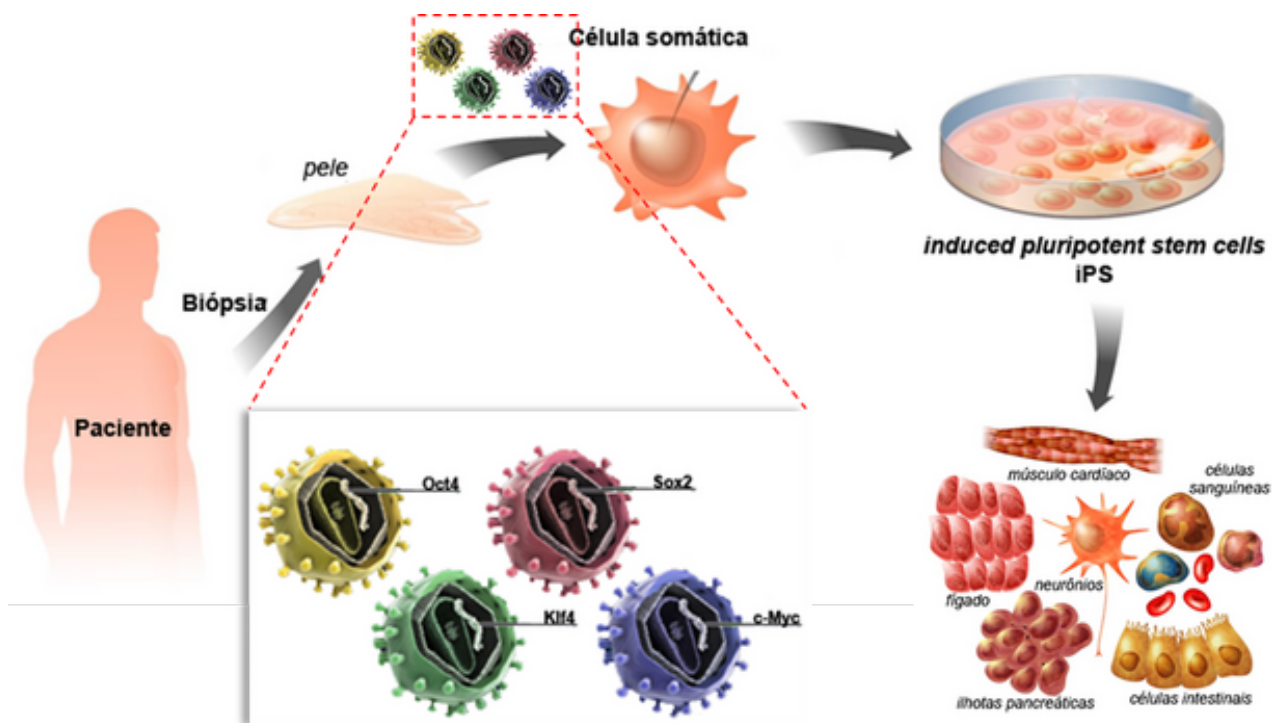


Apesar disto, essas células exibem um potencial para a formação de teratomas, quando introduzidas em camundongos imunodeficientes (Nussbaum *et al.*, 2007). Dessa forma, sua utilização, em humanos, se torna restrita, até que se desenvolvam métodos eficientes e seguros de isolamento e diferenciação. Em relação ao *status* de diferenciação, a avaliação de risco em relação à utilização dessas células, deve, por definição, incluir a possível ocorrência de teratomas, uma das marcas da pluripotência. Em modelos animais, não só teratomas benignos mas também teratocarcinomas malignos foram observados após a administração destes tipos celulares (Okita *et al.*, 2007). Nesse contexto, a diferenciação, *in vitro*, de ESC em tipos celulares específicos é preferível, porque isto reduziria o potencial teratogênico das células e poderia, assim, reduzir o risco de formação de tumores. No entanto, convém referir que, em cultura, *in vitro*, estas células também devem ser consideradas como carcinogênicas. Além disso, sua obtenção e utilização geram questionamentos éticos, políticos e religiosos (Fischbach e Fischbach, 2004). No Brasil, a utilização de células-tronco embrionárias é permitida, para fins experimentais, de acordo com a Lei de Biossegurança (Lei 11.105), de 24 de março de 2005 (Pereira, 2008).

### 1.3. Células-tronco de pluripotência induzida

Diante do exposto anteriormente, uma fonte alternativa e bastante promissora às células-tronco embrionárias são as células-tronco de pluripotência induzida (iPSC do inglês *induced Pluripotent Stem Cell*). Em 2006, Takahashi e Yamanaka, demonstraram que através de manipulações genéticas, é possível reverter o processo de diferenciação de uma célula adulta. Através da indução da expressão de fatores de transcrição como, por exemplo, Oct3/4, Sox2, c-Myc e Klf4, células diferenciadas podem retornar ao estado de pluripotência, semelhante às células-tronco embrionárias (Figura 2). Contudo,

embora vários aspectos sobre a indução, o cultivo e a manutenção dessas células ainda devam ser esclarecidos, elas demonstram ser uma fonte promissora de células autólogas - isto é: extraídas do indivíduo e implantadas nele mesmo - para utilização na medicina regenerativa (Takahashi e Yamanaka, 2006; Yu *et al.*, 2007; Takahashi *et al.*, 2007).



**Figura 2: iPSC – Técnica de Obtenção:** Esquema representativo da indução ao estado de pluripotência de células extraídas de tecido epitelial, através da introdução de fatores de transcrição característicos de células-tronco embrionárias. Fonte: <<http://www.lancet-ufrj.org>>. Último acesso em 30/06/11

Munenari e colaboradores propuseram a indução à pluripotência não só de fibroblastos humanos saudáveis, mas também de fibroblastos de pele de dois pacientes com epidermólise distrófica recessiva. Depois de diferenciadas em queratinócitos, foi observada uma alta eficiência de diferenciação das iPSC derivadas dos fibroblastos dos dois pacientes, gerando um tecido tridimensionalmente equivalente ao normal, sugerindo que os queratinócitos

eram totalmente funcionais. Este estudo indicou que iPSC autólogas têm potencial para fornecer uma fonte de células para terapias regenerativas aplicadas às doenças específicas da pele (Ioth *et al.*, 2011).

Apesar da diferença em suas origens, ESC e iPSC são muito semelhantes. Elas têm muitas características de crescimento, perfis de expressão gênica (tais como expressão dos fatores Oct3/4, Sox2, c-Myc e Klf4), e de potencial de desenvolvimento parecidos (Xu *et al.*, 2009). No entanto, algumas diferenças na expressão gênica foram relatadas, sugerindo ser, a reprogramação em iPSC, incompleta (Saric e Hescheler, 2008). A comparação entre culturas de ESC e de iPSC revelou uma marcante heterogeneidade nos níveis de expressão gênica de fatores de transcrição específicos para células totipotentes já mencionados anteriormente, sugerindo que iPSC têm um estado menos estável de pluripotência. Além disso, as iPSC também mostraram uma cinética de crescimento mais lento e um potencial de diferenciação reduzido, em comparação com as ESC. Sendo assim, esses estudos sugerem cautela antes de assumir que as iPSC são equivalentes às ESC em relação ao estado de pluripotência, uma vez que essa diferença pode limitar sua aplicabilidade clínica (Narsihn *et al.*, 2011).

#### **1.4. Células-tronco adultas**

Outra alternativa às células-tronco embrionárias são as células-tronco adultas. Essas células são consideradas multipotentes, pois possuem a capacidade de se diferenciarem em vários tipos celulares derivados dos três folhetos embrionários. Podem ser isoladas de tecidos fetais, placenta, cordão umbilical, medula óssea, trabécula óssea, músculo, tecido adiposo, glândulas mamárias, trato gastrointestinal, sistema nervoso central, pulmão, sangue periférico, pele, folículo piloso e outros tecidos do indivíduo adulto (Alison e Islam, 2009).

Inicialmente, acreditava-se que as células-tronco adultas só se diferenciavam em linhagens celulares do tecido ao qual pertenciam. Embora as células-tronco adultas tenham menor capacidade de diferenciação (menor plasticidade celular), sob certas condições, estas células podem gerar um tipo celular especializado de outro tecido ou de outro folheto embrionário. Tal capacidade é chamada de transdiferenciação e ocorre na presença de fatores de transcrição adequados, como ocorre, por exemplo, com células-tronco de origem mesodérmica, que são capazes de se diferenciar em células de origem ectodérmica, sob condições específicas (Alison e Islam, 2009).

Dentre as células-tronco adultas mais bem estudadas e caracterizadas estão as células-tronco hematopoiéticas e as células-tronco mesenquimais (Hipp e Atala, 2008).

#### **1.4.1. Células-tronco hematopoiéticas**

As células-tronco hematopoiéticas (HSC do inglês *Hematopoietic Stem Cells*) são células multipotentes, e dão origem a duas linhagens distintas de células precursoras: mielóide e linfóide (Kawamoto e Katsura, 2009). As HSC são responsáveis pela renovação das células sanguíneas e do sistema imune e têm contribuído para a maioria dos conhecimentos atuais sobre células-tronco adultas. São encontradas na medula óssea e sangue periférico, e, mais recentemente, foram também encontradas no sangue do cordão umbilical (Schlechta *et al.*, 2009). Estas células expressam a molécula de superfície CD34, uma glicofosfoproteína responsável pelo ancoramento das células-tronco hematopoiéticas ao estroma medular (Krause *et al.*, 1996), sendo esse o marcador de superfície mais utilizado para caracterizar e isolar essas células.

As HSC já são utilizadas em transplantes para regeneração do sistema hematopoiético desde 1956 (Hipp e Atala, 2008), mas, apenas recentemente, tem sido demonstrado o potencial dessas células em se diferenciarem em outros

tipos celulares como hepatócitos (Lagasse *et al.*, 2000) e células da glia (Eglitis e Mezey, 1997; Hess *et al.*, 2004). Recentemente, observou-se que as HSC podem se diferenciar em células endoteliais, o que pode resultar na aceleração da vascularização e da cicatrização de lesões em pacientes diabéticos (Pedroso DC *et al.*, 2011).

#### 1.4.2. Células-tronco mesenquimais

As células-tronco mesenquimais (MSC do inglês *Mesenchymal Stem Cell*) foram primeiramente descritas como a porção de células aderentes extraídas da medula óssea, denominadas células formadoras de colônias fibroblásticas (Friedenstein *et al.*, 1970). Mais adiante, em 2001, Caplan e colaboradores as denominaram como MSC; uma população de células presentes no estroma da medula óssea, capazes de auto-renovação e diferenciação em três tipos celulares de origem mesodérmica como ostoblastos, condrócitos e adipócitos (Caplan e Bruder, 2001).

Além da medula óssea, as MSC são encontradas na maioria dos órgãos do corpo, incluindo fígado, pulmões, coração, intestinos, pele, músculos e polpa dentária. Células com características semelhantes às células-tronco mesenquimais da medula óssea foram também isoladas de diversos tecidos como, por exemplo, do tecido adiposo (Zuk *et al.*, 2001), pele (Toma *et al.*, 2001), pulmões (Sabatini *et al.*, 2005), líquido amniótico (De Coppi *et al.*, 2007) e polpa dentária (Huang *et al.*, 2009).

De acordo com estudos prévios, as MSC são consideradas grandes candidatas para terapia celular, devido aos seguintes critérios: (i) dependendo do local escolhido, as mesmas podem ser facilmente extraídas, podendo ser isoladas do próprio paciente; (ii) há a possibilidade de obtenção de uma quantidade adequada de células para transplante devido ao alto grau de proliferação celular, *in vitro*; (iii) são multipotentes, com alta capacidade de

diferenciação celular; (iv) a manipulação destas células é relativamente fácil; (v) têm a capacidade de integrar com o tecido hospedeiro e com o tecido adjacente (Yarak e Okamoto, 2010).

Devido ao grande número de estudos descrevendo a presença de células-tronco mesenquimais em diferentes tecidos, a Sociedade Internacional para Terapia Celular propôs critérios mínimos para a definição de células-tronco mesenquimais (Dominici *et al.*, 2006): (i) tais células devem ser aderentes a superfícies plásticas, quando mantidas em condições de cultivo padronizadas, (ii) devem expressar os antígenos de superfície CD73, CD90, CD105 e não expressarem os antígenos CD45, CD34, CD14, CD19 e HLA-DR, (iii) quando estimuladas, *in vitro*, devem se diferenciar em osteoblastos, condrócitos e adipócitos.

Deve-se ressaltar que o interesse em MSC para aplicações clínicas reside mais em suas ações parácrinas na reparação tecidual do que na sua capacidade de diferenciação (Togel *et al.*, 2007). Na verdade, as MSC expressam baixos níveis de moléculas do Complexo Maior de Histocompatibilidade Classe II (MHC II do inglês *Major Histocompatibility Complex II*) e, provavelmente são imunogenicamente fracas, sugerindo que o tratamento imunossupressor adotado após o transplante/implante das mesmas no organismo, pode ser atenuado ou até mesmo não ser necessário. Além disso, elas têm se mostrado capazes de modular a resposta imune de células, *in vitro*, diminuindo o potencial de inflamação (Spitkovsky e Hescheler, 2008).

Estudos pré-clínicos e clínicos, utilizando MSC como alternativa de tratamento, mostraram resultados promissores. Contudo, os resultados relatados ainda são controversos, indicando a necessidade de mais estudos, principalmente no que concerne aos mecanismos moleculares que orquestram o potencial terapêutico dessas células. Esta análise incidirá sobre os avanços na compreensão da biologia de MSC e suas aplicações em terapia celular (Chagastelles *et al.*, 2010)

### 1.4.2.1. Células-tronco mesenquimais e o tecido adiposo

O isolamento de células-tronco de alguns tecidos adultos é bastante laborioso, o que torna a utilização dessas células, de certa forma, limitada. Nesse contexto, as células-tronco adultas mais utilizadas para estudos nessa área são as células extraídas da medula óssea e/ou do tecido adiposo (Romanov *et al.*, 2005). Porém, a frequência e a taxa de proliferação das células-tronco no tecido adiposo são maiores do que na medula óssea (2% para tecido adiposo e 0,002% para medula óssea), sendo considerada a fonte mais abundante e acessível de células-tronco adultas (Strem *et al.*, 2005; Mizuno, 2009).

O tecido adiposo é formado de duas partes: tecido adiposo marrom e tecido adiposo branco. Em humanos adultos, o tecido adiposo marrom é praticamente ausente. Por outro lado, o depósito localizado de tecido adiposo branco está presente em diversas áreas do organismo, envolvendo e/ou infiltrando órgãos e estruturas internas. Além de adipócitos, este tecido contém uma matriz de tecido conjuntivo (fibras colágenas e reticulares), tecido nervoso, células do estroma vascular, nódulos linfáticos, células do sistema imunológico (leucócitos, macrófagos), fibroblastos e células-tronco. Ao longo dos últimos anos, tem sido observado que o tecido adiposo não é apenas um armazenador e fornecedor de energia, mas também uma estrutura dinâmica, que produz hormônios, envolvidos em uma variedade de processos fisiológicos e fisiopatológicos (Fruhbeck *et al.*, 2001).

As células-tronco derivadas do tecido adiposo (ASC do inglês *Adipose Stem Cells*) podem ser purificadas por uma variedade de técnicas e processos enzimáticos, utilizadas para obter a fração estromal vascular (Wilson *et al.*, 2011). Em 1960, Rodbell e colaboradores, apresentaram o primeiro método para isolar células-tronco do tecido adiposo. Primeiramente, este método foi realizado somente com o tecido adiposo de amostras de animais de laboratório

(ratos e coelhos). Mais tarde, este método foi modificado para uso com amostras de tecido adiposo humano (Rodbell, 1967).

Em 2001, Zuk e colaboradores isolaram células-tronco a partir da fração estromal do tecido adiposo humano (hASC do inglês *human Adipose Stem Cells*), capazes de se diferenciarem em osteoblastos, condrócitos, adipócitos e mioblastos, e com características semelhantes às células-tronco mesenquimais da medula óssea (Zuk *et al.*, 2001). Finalmente, em 2008, foi observado que essas células podiam ser mantidas em cultura, com muitos estágios de crescimento, por mais de um mês (Zhu *et al.*, 2008).

Além disso, o potencial de diferenciação dessas células extraídas do tecido adiposo, em outros tipos celulares, já foi demonstrado em vários trabalhos: células endoteliais (Planat-Benard *et al.*, 2004), cardiomiócitos (Strem *et al.*, 2005; Chun-zhi Shi *et al.*, 2011), células pancreáticas (Timper *et al.*, 2006), neurônios (Anghileri *et al.*, 2008) e hepatócitos (Aurich *et al.*, 2009; Kubo *et al.*, 2011). Choi e colaboradores avaliaram a segurança clínica de ASC colonizadas em biomaterial, implantadas em camundongos *nude* para o reparo de defeito ósseo. Os dados encontrados nesse estudo reforçaram a segurança na utilização dessas células, bem como seu potencial osteogênico. A eficácia pré-clínica e os testes de segurança realizados neste estudo forneceram dados relevantes para a normalização e execução das exigências regulamentares para terapias emergentes com células tronco em ortopedia (Choi *et al.*, 2011).

### **1.5. Utilização de células-tronco na angiogênese**

Os vasos sanguíneos são constituídos de um revestimento de células endoteliais envolvido por células (pericitos e células musculares lisas vasculares), e desempenham um papel essencial na manutenção da homeostase tecidual, levando oxigênio e nutrientes para órgãos distantes (Maes *et al.*, 2005).



A capacidade de explorar a angiogênese e vascularização como uma estratégia terapêutica é um enorme benefício para uma ampla gama de aplicações médicas. Nesse sentido, as células endoteliais são de grande interesse devido ao seu potencial em terapia celular para doenças vasculares em tecidos isquêmicos, para vascularização em enxertos na engenharia de tecido e para o transporte de produtos farmacêuticos através das barreiras endoteliais. No entanto, a limitada disponibilidade e capacidade de proliferação de células endoteliais maduras dificulta o desenvolvimento dessas aplicações. Terapias baseadas em células, até agora, não produziram uma resposta de cura robusta em ensaios clínicos para uma variedade de doenças isquêmicas, enquanto que os materiais desenvolvidos pela engenharia de tecidos para substituir tecidos lesados (matrizes) ainda são de tamanho limitado, pois a falta de vascularização no interior do implante compromete a nutrição e a remoção de metabólitos pelas células, o que pode levar a falência do implante (Phelps e Garcia, 2009).

Com base no potencial de regeneração, os recentes avanços na tecnologia das células-tronco têm permitido aos pesquisadores obter células endoteliais a partir de células-tronco. Para isto, algumas substâncias como o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF do inglês *Vascular Endothelial Growth Factor*) e o fator de crescimento fibroblástico básico (bFGF do inglês *basic Fibroblast Growth Factor*) têm sido bastante utilizadas para induzir essa diferenciação (Wright *et al.*, 2002).

Cao e colaboradores, em 2005, mostraram que ASC têm características de células progenitoras endoteliais e, *in vitro*, quando cultivadas com VEGF, passam a expressar marcadores endoteliais. *In vivo*, as ASC se diferenciam em tecido endotelial, em resposta a estímulos locais, o que contribui para neoangiogênese em modelos de isquemia de membro posterior. Os autores concluíram, portanto, que o tecido adiposo contém células-tronco que, quando estimuladas, podem ser uma fonte potencial de células endoteliais para terapias celulares pró-angiogênicas (Cao *et al.*, 2005).

## 1.6. Células-tronco e a segurança para uso clínico

A utilização da terapia celular apresenta ainda alguns fatores de risco e a avaliação destes riscos deve ser um pré-requisito antes do uso clínico de células-tronco como tratamento. Em primeiro lugar, existem os fatores de risco associados às propriedades intrínsecas celulares de um tipo particular de célula ou classe de células-tronco, como, por exemplo, a origem da célula (autóloga x alogênica, doador saudável x doador doente) e as características celulares (potencial tumorigênico, capacidade de proliferação, viabilidade celular a longo prazo, substâncias secretadas e *status* de diferenciação). Em segundo lugar, estão os fatores extrínsecos introduzidos pela aquisição, manipulação, cultivo, e/ou o armazenamento das células e, finalmente, os fatores de risco associados com as características clínicas (procedimentos cirúrgicos, necessidade ou não de imunossupressão, local e modo de administração e co-morbidades) (Herberts *et al.*, 2011).

Outro fator de risco que merece atenção, é a potencialidade de ocorrência de desdiferenciação. Até o momento, é desconhecido se a desdiferenciação de células-tronco pode ocorrer *in vitro* e/ou *in vivo*. A desdiferenciação de células somáticas ou rediferenciação em outro tipo celular diferente do que se pretende, tem sido descrita, mas se isso tem consequências clínicas adversas ainda permanece incerto. Além disso, já foi observado que pode ocorrer a diferenciação de MSC em tipos de células mesenquimais talvez indesejáveis, tais como osteócitos e adipócitos. Estruturas encapsuladas contendo calcificação e/ou ossificação no coração foram observadas em animais tratados com células-tronco mesenquimais derivadas de medula óssea utilizadas para tratamento de infarto do miocárdio. Pode-se concluir que a diferenciação foi portanto, inadequada, e este evento pode contribuir para outros riscos ainda desconhecidos (Pessina e Gribaldo, 2006). A indução à diferenciação de uma cultura de células-tronco poderia não apenas induzir transformação maligna,

mas, em teoria, também poderia induzir alterações celulares, tais como padrões de excreção alterados ou moléculas de superfície celular que possam influenciar *in vivo*, podendo isto ter consequências adversas ou tóxicas inesperadas (Breitbach *et al.*, 2007).

Nesse contexto, a utilização de ASC na medicina regenerativa se torna mais segura após ser comprovada a diferenciação celular específica que se deseja. Embora na última década tenham sido obtidos avanços substanciais no entendimento da biologia de células-tronco, os recentes avanços tecnológicos em biologia molecular e a compreensão dos mecanismos moleculares que regulam a auto-renovação e diferenciação das ASC, bem como sua interação com o nicho celular, continuam aquém do necessário para uma aplicação segura.

Sendo assim, o desafio maior na área de células-tronco é compreender quais genes e/ou redes de genes respondem por diferenças no funcionamento dos diversos tipos de células-tronco, bem como no processo de diferenciação. Até o momento, tem havido inúmeras tentativas de caracterizar essas células utilizando estudos transcriptômicos e proteômicos e vários grupos de pesquisa têm analisado os perfis de expressão gênica dos diferentes tipos de células-tronco (Ivanova *et al.*, 2002; Zeng *et al.*, 2004).

Cada tipo de célula do corpo humano, incluindo células-tronco, tem um conjunto único de informações, mantido pelos genes reguladores que levam à diferença de expressão gênica. De acordo com o Consórcio Internacional do Genoma Humano, o número de genes no genoma humano é estimado entre 20.000 e 25.000 e os 274 diferentes tipos de células no corpo humano são definidos pela expressão combinatória deste número limitado de genes. O circuito de regulação da transcrição em células é mantido por uma interação dinâmica de múltiplos mecanismos de regulação, incluindo regulação epigenética, regulação pós-transcricional e regulação da expressão gênica pos-traducional. Todavia, o entendimento da diferenciação celular requer uma

compreensão global da elaborada rede dos genes reguladores do genoma, epigenoma, transcriptoma, microRNAoma e proteoma (Ahn *et al.*, 2010).

### 1.7. Análise global da expressão gênica

Nesse contexto, diversas metodologias foram e vêm sendo desenvolvidas para a identificação em larga escala de genes diferencialmente expressos entre diferentes linhagens celulares. Dentre as mais utilizadas, a técnica de *Microarray* fornece uma poderosa plataforma de análise do padrão de expressão de milhares de genes simultaneamente, possibilitando a comparação entre diferentes amostras. Esta metodologia permite a análise de amostras representativas de diferentes estágios do desenvolvimento, diferentes tipos celulares ou histológicos, diferentes sensibilidades a drogas ou entre tecidos normais e patologias.

Sendo assim, muitos trabalhos relatam o uso de *Microarrays* na pesquisa de células-tronco. Em 2009, Kim e colaboradores identificaram alguns genes expressos em células CD34+, encontrando tanto genes já conhecidos quanto novos genes de diferentes categorias, envolvidos na hematopoiese (Kim *et al.*, 2009). Dessa maneira, propuseram um primeiro mapa transcricional de células CD34+, o que contribuiu para uma melhor compreensão da expressão gênica dessas células e também revelou que o início da hematopoiese é um processo altamente regulado, que conta com a participação de mais da metade dos genes humanos até então descritos e distribuídos em várias funções.

Outro trabalho ainda utilizando a referida técnica, investigou os mecanismos de regulação, mediados por micro RNAs (miRNAs do inglês *microRNAs*) durante o processo de diferenciação de células-tronco mesenquimais, em quatro estágios diferentes de diferenciação condrogênica, induzida por TGF- $\beta$  (do inglês *Transforming Growth Factor beta*) (Yang *et al.*, 2011).

Apesar do sucesso da utilização da referida técnica na identificação de genes diferencialmente expressos, a utilização de *Microarray* possui algumas limitações. A quantidade de genes analisados se restringe ao painel gênico fixado na lâmina. Além disso, a produção de lâminas de *Microarrays* de DNA complementar (cDNA do inglês *Complementary DNA*) é laboriosa e demanda alto investimento financeiro para a aquisição de *scanners* e do robô utilizado para a fixação do DNA à lâmina. É necessária a participação de profissionais especializados para a realização da normalização e análise estatística dos dados gerados pelas hibridizações e há grande dificuldade na comparação entre experimentos diferentes.

Outra metodologia que permite a análise do padrão de expressão em larga escala foi desenvolvida por Velculescu e colaboradores, em 1995. A técnica de Análise Serial da Expressão Gênica (SAGE do inglês *Serial Analysis of Gene Expression*) baseia-se na quantificação de *tags*, ou seja, pequenas sequências de 14 nucleotídeos, oriundas de bibliotecas de cDNA, construídas a partir de RNA mensageiro (mRNA do inglês *Messenger RNA*) proveniente dos tecidos a serem estudados. Assim, a partir de uma amostra de tecido, pode-se obter um perfil de genes expressos e representados pelas *tags*. Por conseguinte, o número de vezes que determinada *tag* aparece em cada amostra reflete sua expressão relativa. A expressão gênica de duas amostras pode então ser comparada, utilizando-se de um programa computacional que identifica e registra o número de vezes que determinada sequência aparece na amostra. Outras vantagens desta técnica são o possível cruzamento de dados de experimentos diferentes e a criação de bancos de dados públicos de seqüências expressas e identificadas a partir de bibliotecas de SAGE.

Richards e colaboradores, em 2004, utilizaram a técnica de SAGE para obter os perfis do transcriptoma de duas linhagens de células-tronco embrionárias humanas, HES3 e HES4. O perfil transcricional das duas linhagens de células humanas foram bastante semelhantes. A diferença mais

visível entre as duas linhagens foi a ausência de expressão de REX1 (gene que codifica um fator de transcrição expresso, no embrião, que é regulado através por Oct-4/3 e Oct-6) em HES4. Tomados em conjunto, os dados oriundos das bibliotecas SAGE de HES3 e HES4 permitiram concluir que existe um perfil geral e comum de expressão gênica das células-tronco embrionárias humanas. Além disso, foi possível observar que os genes envolvidos na manutenção da pluripotencialidade têm a expressão restrita às células-tronco embrionárias. Isso permitiu detectar genes conhecidamente específicos de células-tronco embrionárias que expressam fatores de transcrição tais como Oct3/4, Sox2 e Rex1, bem como identificar vários novos genes que podem vir a ser utilizados como marcadores moleculares deste tipo de célula (Richards *et al.*, 2004).

No entanto a construção de bibliotecas de SAGE, além de extremamente laboriosa, demanda também a utilização de um programa computacional especializado para o processamento dos dados gerados. Assim, alternativas para a identificação em larga escala de genes diferencialmente expressos tornam-se necessárias e nesse contexto, técnicas de hibridização subtrativa surgem como alternativas promissoras e atrativas para tais fins. Sem a necessidade de conhecimento prévio de suas características funcionais ou bioquímicas, bem como de utilização de ferramentas computacionais específicas, destacam-se as metodologias de Biblioteca Subtrativa Suprimida (SSH do inglês *Supression Subtractive Hybridization*) (Diatchenko *et al.*, 1996) e de Hibridização Subtrativa Rápida (RaSH do inglês *Rapid Subtractive Hybridization*) (Jiang *et al.*, 2000).

### **1.7.1. Técnicas de hibridização subtrativa**

#### **1.7.1.1. Hibridização subtrativa**

A técnica de SSH (*Supression Subtractive Hybridization*) foi desenvolvida em 1996, por Diatchenko e colaboradores e consiste em analisar a expressão diferencial entre duas amostras de cDNA, subtraindo os transcritos comuns e isolando transcritos presentes exclusivamente em uma das amostras. A técnica permite, por exemplo, a análise de células submetidas a diferentes condições de cultivo (antes e depois do tratamento com drogas ou outros fatores) ou sincronizadas em diferentes etapas do ciclo celular, possibilitando a clonagem de cDNAs obtidos a partir de genes que foram diferencialmente expressos para posterior sequenciamento, identificação e caracterização (Diatchenko *et al.*, 1996).

Nesta técnica, duas amostras de cDNA são sintetizadas a partir de mRNA. Uma das amostras, denominada *tester*, é originada a partir do RNA da linhagem celular ou tecido cujos genes se quer identificar. Já a outra amostra, denominada *driver*, é obtida a partir do mRNA da linhagem celular ou tecido utilizado para a comparação e cujos genes, comumente expressos, devem ser subtraídos. Em seguida, seqüências adaptadoras são ligadas apenas às extremidades das moléculas de cDNA derivadas da amostra *tester*. Então, as moléculas de cDNA da amostra *tester* são desnaturadas e renaturadas na presença de um excesso de moléculas da amostra de cDNA *driver*. Três tipos de moléculas híbridas são então formados após a renaturação: *tester-tester*, *tester-driver* e *driver-driver*. As moléculas *tester-tester* representam transcritos expressos exclusivamente na amostra de interesse, as moléculas *tester-driver* representam transcritos comuns às duas amostras e as moléculas *driver-driver* correspondem a transcritos expressos apenas na amostra utilizada para comparação. As moléculas *tester-tester* são, por sua vez, seletivamente amplificadas, através de uma reação de Polimerização em Cadeia (PCR do inglês *Polymerase Chain Reaction*), contendo oligonucleotídeos correspondentes à seqüência adaptadora ligada apenas na extremidade das moléculas de cDNA derivadas da amostra *tester*. O produto dessa reação é então clonado, gerando uma biblioteca

subtraída, enriquecida de genes diferencialmente expressos na amostra em estudo.

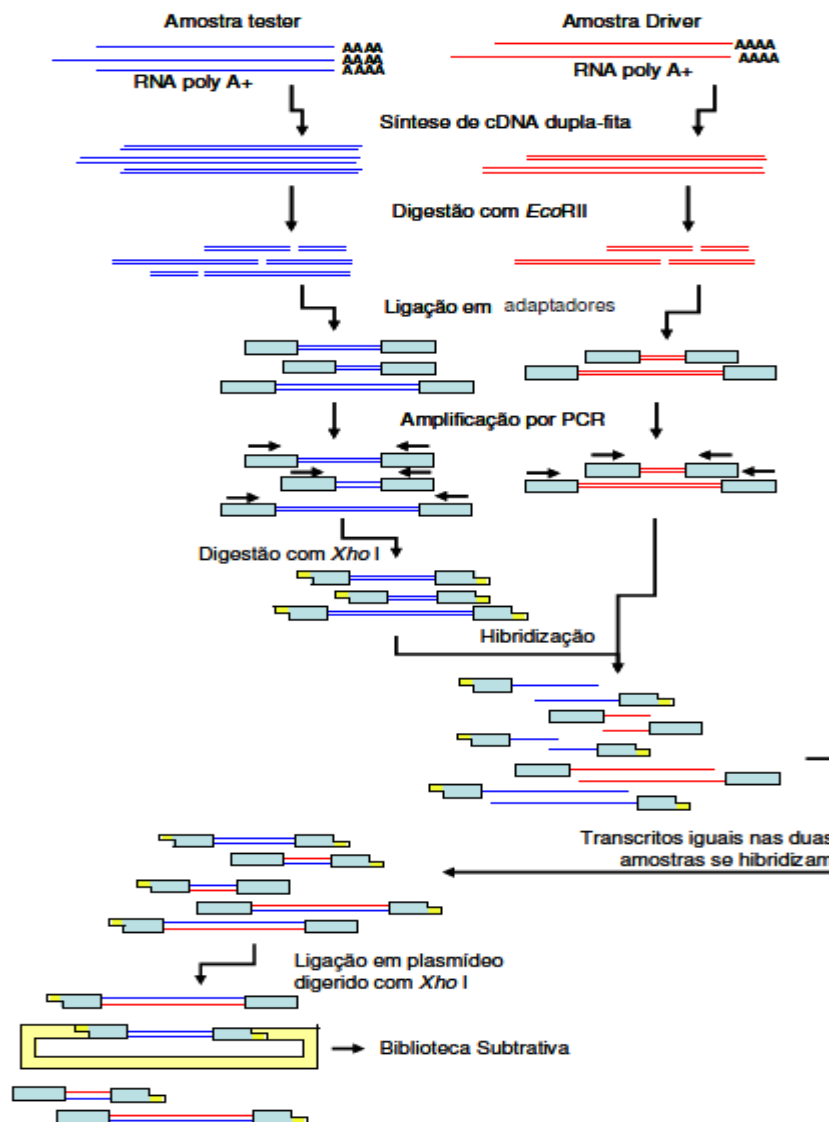
A comparação de seqüências oriundas da biblioteca subtraída, com seqüências depositadas em bancos de dados públicos permite então identificar os genes diferencialmente expressos. A desvantagem apresentada por esta técnica reside no fato de que a quantidade de amostras *tester* e *driver* disponíveis para todo o procedimento pode limitar a obtenção dos dados.

#### 1.7.1.2. Hibridização subtrativa rápida (RaSH)

A técnica de RaSH (*Rapid Subtractive Hybridization*) (Jiang *et al.*, 2000) foi desenvolvida a partir de uma adaptação da técnica anteriormente descrita, a SSH. Assim, duas amostras de cDNA, *tester* e *driver*, são sintetizadas a partir de mRNA. As moléculas de cDNA de ambas as amostras são submetidas a digestão por uma endonuclease de restrição, para gerar fragmentos de menor tamanho e, ao contrário da técnica de SSH, seqüências adaptadoras, as quais possuem a seqüência nucleotídica reconhecida pela endonuclease de restrição *Xho I*, são ligadas às extremidades das moléculas de cDNA de ambas as amostras. Após a ligação dos adaptadores, é realizada uma reação de amplificação da amostra, através da técnica de PCR, utilizando oligonucleotídeos complementares à seqüência contida nos adaptadores. Essa etapa permite a obtenção de uma maior quantidade dos fragmentos representados em ambas as amostras de cDNA, facilitando a etapa de subtração, o que não ocorre com SSH. Em seguida, somente os amplicons originados a partir da amostra *tester* são digeridos com a enzima *Xho I*, gerando extremidades coesivas. Após a digestão enzimática, os produtos amplificados da amostra *tester* são desnaturados e renaturados na presença de um excesso de fragmentos amplificados a partir da amostra *driver*. Como descrito anteriormente para a técnica de SSH, três tipos de fragmentos híbridos são



formados, contudo, apenas os híbridos *tester-tester* são selecionados através de clonagem em vetor com extremidades coesivas, o qual também foi, previamente digerido por *Xho* I. Um esquema ilustrativo da técnica de RaSH está representado na Figura 3.



**Figura 3 - Esquema representativo da técnica de RaSH:** As bibliotecas de cDNA dupla-fita são obtidas de hASC e destas induzidas à diferenciação endotelial. Adaptadores com sítio para enzima de restrição são ligados às duas bibliotecas. Somente a biblioteca utilizada como *tester* sofre digestão com enzima de restrição correspondente. A biblioteca *tester* é hibridizada com excesso da biblioteca *driver*. Assim, transcritos presentes nas duas bibliotecas formam híbridos. Somente transcritos presentes na biblioteca *tester* apresentarão os sítios complementares nas duas extremidades e poderão ser clonados e posteriormente seqüenciados.

Assim, a técnica de RaSH apresenta algumas vantagens em relação às apresentadas anteriormente, como a redução no custo e tempo de preparo da biblioteca subtrativa, além da facilidade na execução dos experimentos e maior eficácia de subtração. Esta metodologia não necessita do uso de programas computacionais específicos para a identificação e validação dos genes diferencialmente expressos. Programas computacionais públicos como, por exemplo, o BLAST (do inglês, *Basic Local Alignment Search Tool*), o qual se encontra disponível na página do NCBI (do inglês, *National Center for Biotechnology Information* - [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)), são suficientes para as análises.

Jiang e colaboradores, em 2000, utilizaram a técnica para analisar o padrão de expressão diferencial de células de melanoma humano tratadas com IFN- $\beta$  e Mezeréina, um ativador de proteína quinase C. Uma biblioteca de cDNA *tester* foi construída a partir de mRNA extraído de células tratadas com as referidas drogas e a biblioteca *driver* foi construída a partir de material de células não tratadas. Assim, a técnica propiciou a identificação de 23 genes, diferencialmente expressos e associados ao respectivo tratamento, dentre os 70 genes analisados (Jiang *et al.*, 2000).

Outros estudos, utilizando a mesma técnica, conseguiram identificar e confirmar, por *Northern Blot* Reverso, 15 genes com expressão aumentada (Su *et al.*, 2002) e 10 com expressão reduzida (Su *et al.*, 2003) em astrócitos contaminados com HIV-1. Comparando duas linhagens celulares de melanoma humano com potenciais metastáticos diferentes, Boukerche e colaboradores, em 2004, também, através da técnica de RaSH e validação por *Northern Blot* Reverso, identificaram 8 genes diferencialmente expressos em linhagens celulares de alto potencial metastático, sendo 2 deles desconhecidos e outros 2 cuja participação na progressão tumoral ainda não havia sido descrita (Boukerche *et al.*, 2004). Recentemente, a técnica foi utilizada para identificar

novos genes que parecem ser diferencialmente expressos em células tumorais ósseas, comparando-as com células normais (Babeto *et al.*, 2011).

Enfim, os dados obtidos através desta técnica demonstram a grande utilidade da mesma na identificação de genes diferencialmente expressos entre amostras de origens diversas e sob diferentes contextos. O sequenciamento direto dos clones gerados pela técnica RaSH e a análise das seqüências geradas podem facilitar o processo de identificação de genes. Alternativamente, os dados obtidos com o uso da referida técnica podem ser ainda validados através da técnica de PCR em Tempo Real, identificando o nível de transcrição destes genes, relacionando com o nível encontrado para os genes expressos na amostra de referência.

### **1.8. Justificativa de realização do trabalho**

Diante do exposto, observa-se que a utilização de células-tronco derivadas de tecido adiposo e submetidas à indução à diferenciação endotelial, mostra-se bastante promissora para aplicação na medicina regenerativa, como alternativa para auxiliar na vascularização de novos tecidos ou implantes teciduais.

No entanto, a compreensão dos mecanismos moleculares que regulam a auto-renovação e diferenciação dessas células, bem como sua interação com a célula nicho, é altamente relevante. Deve-se garantir a segurança clínica, antes, durante e após a utilização destas células, certificando-se de que a diferenciação ocorrerá e será estabelecida exclusivamente para a linhagem desejada, no caso, endotélio.

Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo identificar genes característicos do tecido vascular, assim como buscar novos possíveis genes marcadores da diferenciação endotelial, para assegurar a utilização de ASC no auxílio da angiogênese em terapia celular e na medicina regenerativa.

## **2. OBJETIVOS**

## 2. Objetivos

### 2.1 Objetivo Geral

- Identificar e validar genes diferencialmente expressos em células endoteliais obtidas a partir da diferenciação de células-tronco derivadas do tecido adiposo humano, através da utilização da técnica de RaSH e de PCR em Tempo Real.

### 2.2. Objetivos específicos

- Isolar, cultivar e caracterizar as hASC;
- Induzir a diferenciação endotelial de hASC e caracterizá-la, fenotipicamente;
- Identificar genes diferencialmente expressos nas células diferenciadas, utilizando a técnica de RaSH;
- Validar, por PCR em Tempo Real, a expressão diferencial de genes identificados nas células induzidas à diferenciação.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **3.1. Isolamento e cultivo de células-tronco mesenquimais de tecido adiposo humano**

#### **3.1.1. Obtenção do tecido adiposo**

As células-tronco mesenquimais humanas derivadas do tecido adiposo (hASC) foram isoladas a partir de amostras deste tecido retiradas durante procedimentos cirúrgicos de lipoaspiração. Esses procedimentos foram realizados na Clínica de Cirurgia Plástica Dr. Luiz Lamana, coordenada pelo Dr. Luiz Lamana dos Santos, em Belo Horizonte, Minas Gerais, o qual, gentilmente, às cedeu para que fossem utilizadas no presente trabalho. O produto de lipoaspiração de diferentes partes do corpo (flancos esquerdo e direito, regiões supra e infra-umbilical) foi acondicionado em quatro seringas esterilizadas de 20 mL e encaminhado ao Laboratório de Imunologia Celular e Molecular do ICB/UFMG. Todos os procedimentos de coleta, transporte e processamento foram realizados de acordo com as normas aprovadas pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG (Parecer: ETIC 623/09).

#### **3.1.2. Processamento do tecido adiposo e obtenção das células-tronco**

Em capela de fluxo laminar, a amostra do tecido adiposo, recém obtida, foi transferida para tubos do tipo “Falcon” de 50 mL, acrescida de PBS 0,15M pH 7,2 e lavada por homogeneização, seguida de centrifugação por 10 minutos a 10°C. Após a centrifugação, observou-se a presença de uma solução bifásica, cuja fase inferior continha hemácias e a fase superior continha a fração adipocitária. A fração superior foi então aspirada com o auxílio de uma pipeta *Pasteur*, transferida para um novo tubo “Falcon” de 50 mL e tratada com Colagenase D (0,15%) (Invitrogen), na proporção de 1:1 por 2 horas, em estufa a

37°C e 5% CO<sub>2</sub>. No decorrer deste período, a cada 15 minutos, as amostras foram vigorosamente homogeneizadas. Decorridas 2 horas, os tubos foram centrifugados por 10 minutos a 1.400 rpm a 10°C para separar a fração adipocitária e a fração estromal vascular do tecido adiposo. A fração superior adipocitária foi desprezada e a fração estromal vascular foi suspensa em meio de cultura basal (especificação no final desta subseção), redistribuída em frascos de cultivo celular T-25 e mantida em estufa a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>. Após 2 dias, o conteúdo dos frascos T-25 foi transferido para tubos “Falcon” de 50 mL e centrifugado nas mesmas condições anteriormente descritas. O precipitado formado foi novamente suspenso em meio basal e acondicionado em novos frascos T-25, enquanto que o sobrenadante foi descartado. Em seguida, e a cada 2 dias, o meio de cultivo foi trocado e as células foram lavadas com PBS 0,15M, seguindo o mesmo procedimento descrito anteriormente, para a remoção das células não aderidas à superfície do frasco. Quando as células atingiram a confluência de aproximadamente 100%, o meio de cultivo foi retirado, as células foram lavadas com PBS 0,15M e, em seguida, tratadas com 1,5 mL de tripsina-EDTA (0,05%) (Gibco), por 10 minutos. A ação da tripsina foi inativada com a adição de 8 mL de meio basal. A suspensão foi então dividida em dois novos frascos T-75. A cada dois dias, o meio de cultivo foi trocado e à medida que as células atingiam a confluência desejada, de aproximadamente 100%, a expansão das mesmas era realizada. Esse procedimento foi repetido até que as células alcançassem a 4ª passagem para serem então utilizadas neste trabalho (Zuk *et al.*, 2001).

- **Meio de cultivo basal:** D-MEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*, Gibco) suplementado com 5 mM de Bicarbonato de Sódio (Merck), 10% de Soro Fetal Bovino (Gibco), penicilina G 100 U/mL, estreptomicina 100 U/mL e anfotericina B 0,25 µg/mL (PSA, Gibco). O pH do meio foi ajustado para



7,2 e, em seguida, o meio foi filtrado com membrana de difluoreto de polivinilideno de 0,22  $\mu\text{m}$  (Millipore).

### 3.1.3. Análise da viabilidade e proliferação celular

O ensaio de MTT (tetrazólio 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio bromide), realizado segundo descrito por Mosmann, em 1983, é um método colorimétrico sensível, que mensura a viabilidade e a proliferação celular. Este ensaio baseia-se na capacidade de enzimas desidrogenases, presentes nas mitocôndrias de células viáveis, em converter o MTT, sal solúvel em água, no Cristal de Formazan, produto insolúvel em água. A quantidade de Cristais de Formazan produzida é diretamente proporcional ao número de células viáveis. Estes cristais são solubilizados em solução SDS 10%-HCl e a absorção, em comprimento de onda de 595 nm, é determinada em espectrofotômetro (Mosmann, 1983).

Sendo assim, para se determinar a viabilidade das hASCs, essas células foram semeadas em placas de 24 poços, na densidade de  $1 \times 10^5$  células/mL/poço, as quais foram incubadas por aproximadamente 18 horas, em estufa a  $37^\circ\text{C}$  e 5%  $\text{CO}_2$ , para que as células pudessem se aderir à superfície da placa. Após esse período, o meio de cultivo foi retirado com o auxílio de uma micropipeta e 210  $\mu\text{L}$  de meio de cultivo basal foram então adicionados às células. Em seguida, foram acrescentados 170  $\mu\text{L}$  da solução de MTT 5 mg/mL (Sigma), e a placa foi incubada por 2 horas em estufa a  $37^\circ\text{C}$  e 5%  $\text{CO}_2$ . Após este período, as células foram observadas em microscópio óptico, para a visualização dos Cristais de Formazan. Os cristais formados foram solubilizados com adição de 210  $\mu\text{L}$  de SDS 10%-HCl a cada poço, seguido de incubação das células em estufa a  $37^\circ\text{C}$  e 5%  $\text{CO}_2$ , por 18 horas. Após esse período, transferiu-se 100  $\mu\text{L}$  de células, presentes em cada poço, para uma placa de 96 poços e a leitura dos valores de

absorbância da solução resultante foi realizada a 595 nm, em espectrofotômetro. As leituras foram feitas em triplicata.

Durante o experimento, todos os passos envolvendo o reagente MTT foram executados em condições mínimas de luminosidade, com o objetivo de manter sua reatividade. Os resultados obtidos foram plotados em uma representação gráfica, utilizando-se o programa *GraphPad Prism*® 5 (GraphPad Software).

#### 3.1.4. Avaliação da produção da fosfatase alcalina

A fosfatase alcalina é uma enzima produzida por células indiferenciadas e por isso, é utilizada como um marcador de células-tronco (O'connor *et al.*, 2008). Sendo assim, o ensaio de produção de fosfatase alcalina foi realizado para verificar se as células mantidas em cultivo mantinham os níveis de produção dessa enzima.

A produção de fosfatase alcalina foi avaliada através do ensaio de BCIP-NBT, o qual é baseado na reação cromogênica iniciada pela clivagem do grupamento fosfato presente no BCIP (5-bromo 4-cloro 3-indolilfosfato p-toluidina) pela fosfatase alcalina, presente nas células que a produzem. A reação produz um próton que reduz o NBT (nitroblue tetrazólio clorídrico) e forma um precipitado insolúvel de cor púrpura (Valerio *et al.*, 2004).

Para este ensaio, as hASC foram semeadas em placas de 24 poços na densidade de  $1 \times 10^5$  células/mL/poço. As placas foram incubadas por aproximadamente 18 horas, em estufa a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>. Após esse período, o meio de cultivo foi retirado, as células foram lavadas duas vezes com PBS 0,15M e incubadas por 2 horas, com 200 µL da solução BCIP-NBT (Gibco), a qual foi preparada de acordo com as instruções do fabricante. Em seguida observou-se a formação dos precipitados de cor púrpura através do

microscópio óptico. Em seguida, foram então adicionados 210  $\mu\text{L}$  de SDS 10%-HCl para a solubilização dos precipitados púrpuros. As placas foram incubadas em estufa a 37° C e 5%  $\text{CO}_2$  por mais 18 horas. Após a solubilização, 100  $\mu\text{L}$  de cada poço foram colocados em uma placa de 96 poços e a absorbância da solução foi medida no espectrofotômetro a 595 nm. As leituras foram feitas em triplicata.

Da mesma maneira que utilizado para o ensaio de MTT, durante o experimento todos os passos envolvendo os reagentes BCIP e NBT foram executados em condições mínimas de luminosidade, com o objetivo de manter a sua reatividade. Os resultados obtidos foram também plotados em uma representação gráfica, utilizando-se o programa *GraphPad Prism*© 5 (GraphPad Software).

### **3.1.5. Caracterização das células-tronco de tecido adiposo humano por citometria de fluxo**

Para caracterizar a cultura de células obtida anteriormente, como sendo uma cultura composta de células-tronco, as hASC foram submetidas à citometria de fluxo através da análise da presença das moléculas de superfície celular CD29, CD44 e CD73, que são consideradas marcadores característicos de células-tronco mesenquimais (Dominici *et al.*, 2006) . Para verificar se havia contaminação da cultura de células-tronco mesenquimais com células-tronco hematopoiéticas, também foi analisada a presença das moléculas de superfície celular CD34 e CD45, que são marcadores característicos de células-tronco hematopoiéticas. As células foram também caracterizadas em relação à expressão do MHC I e II, HLA-ABC e HLA-DR, respectivamente.

### 3.1.5.1. Marcação celular com anticorpos primário e secundário

Para o ensaio de citometria de fluxo, uma densidade de  $5 \times 10^5$  células de hASC/mL/poço, acrescidas de  $0,4 \mu\text{g}$  de um dos anticorpos primários descritos na Tabela 1, foram incubadas por 30 minutos a  $4^\circ\text{C}$  em uma placa de 96 poços, com fundo em “U”. Após esse período, as células foram lavadas com PBS  $0,15\text{M}$ , acrescidas de  $0,4 \mu\text{g}$  do anticorpo secundário policlonal de cabra, anti IgG de camundongo conjugado com FITC (Fluoresceína Isotiocianato) (Calbiochen), e incubadas por mais 30 minutos a  $4^\circ\text{C}$ . Os anticorpos que já possuíam ligação com algum fluorocromo não foram incubados com anticorpo secundário. Após a última incubação, as células foram novamente lavadas com PBS  $0,15\text{M}$  e depois fixadas com formaldeído 2%. Como controle negativo de fluorescência, foi adicionado o anticorpo secundário às células não marcadas com o anticorpo primário. Para estabelecer a população a ser analisada, células sem qualquer tipo de marcação foram fixadas e utilizadas para gerar o gráfico de tamanho *versus* granulosidade.

Tabela 1: Anticorpos primários utilizados para citometria de fluxo

Antígeno	Tipo	Espécie	Conjugado	Fornecedor	Diluição
CD29	Monoclonal	Camundongo	-	Santa Cruz	1:25
CD34	Monoclonal	Camundongo	-	Abcam	1:16
CD44	Monoclonal	Camundongo	-	Santa Cruz	1;16
CD45	Monoclonal	Camundongo	-	BD Biosciences	1:25
CD73	Monoclonal	Camundongo	PE	BD Biosciences	1:10
HLA-ABC	Monoclonal	Camundongo	FITC	Abcam	1:10
HLA-DR	Monoclonal	Camundongo	FITC	Abcam	1:10

### 3.1.5.2. Leitura no citômetro de fluxo (FACScan)

A obtenção dos dados foi realizada utilizando-se o programa CELLQuest (BD Facscalibur). Foram adquiridos 20.000 eventos e os dados obtidos foram analisados utilizando-se o programa WinMDI 2.9 (Windows Multiple Document Interface for Flow Cytometry, 2000).

A partir do gráfico de tamanho *versus* granulosidade, gerado pela análise das células que não foram submetidas a nenhum tipo de marcação, a população de células a ser estudada foi delimitada. Em seguida, um gráfico de histograma foi criado para delimitar a região do controle negativo de fluorescência, referente às células que foram incubadas apenas com o anticorpo secundário. A partir da definição destes parâmetros, foram realizadas as análises das células marcadas com os anticorpos primários e secundários, segundo descrito em 2001 por Zuk e colaboradores (Zuk *et al.*, 2001).

## 3.2. Indução à diferenciação endotelial

Para promover a diferenciação endotelial, as hASC foram cultivadas com o meio de diferenciação endotelial (descrito no final desta subseção) por 14 dias e mantidas em estufa a 37° C e 5% CO<sub>2</sub>. O meio foi trocado a cada dois dias e após 14 dias, alguns ensaios foram feitos para comprovar a diferenciação.

- **Meio de cultura para diferenciação endotelial:** D-MEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*, Gibco) suplementado com 5 mM de Bicarbonato de Sódio (Merck), 2% de Soro Fetal Bovino (Gibco), 50 ng/mL de VEGF (Invitrogen), 10 ng/mL de bFGF (Invitrogen), penicilina G 100 U/mL, estreptomicina 100 U/mL e anfotericina B 0,25 µg/mL (PSA, Gibco) (Cao *et al.*, 2005). O pH do meio foi ajustado para 7,2 e, em seguida, o meio foi

filtrado com membrana de difluoreto de polivinilideno de 0,22  $\mu\text{m}$  (Millipore).

### **3.2.1. Avaliação da proliferação e viabilidade celular após a indução à diferenciação endotelial**

Para avaliar a proliferação e a viabilidade celular, após a diferenciação endotelial, foi realizado o ensaio de MTT. Para isso, as células foram cultivadas em placa de cultivo de 24 poços e induzidas à diferenciação endotelial por 14 dias. Como controle negativo, células também foram cultivadas em placa com meio de cultivo basal.

O ensaio de MTT foi realizado conforme descrito no item 3.1.3. A absorbância obtida das células cultivadas em meio de cultivo basal foi considerada 100%, de acordo com o proposto por Mosmann em 1983 (Mosmann, 1983).

### **3.2.2. Avaliação da produção da fosfatase alcalina após a indução à diferenciação endotelial**

Para avaliar a produção da fosfatase alcalina após a diferenciação endotelial foi realizado o ensaio de BCIP/NBT com as células cultivadas em placa de cultivo e induzidas à diferenciação por 14 dias. Assim como no ensaio de proliferação celular, células cultivadas em placa com meio de cultivo basal foram utilizadas como controle negativo.

O ensaio de BCIP/NBT foi realizado conforme descrito no item 3.1.4. A absorbância obtida das células cultivadas em meio de cultivo basal foi considerada 100%.

### 3.2.3. Análises estatísticas

A significância da diferença dos resultados de viabilidade celular e produção de fosfatase alcalina encontrados entre os grupos (células indiferenciadas e diferenciadas), foi calculada pelo teste One-Way ANOVA, seguido do teste “Bonferroni”, ambos disponíveis no programa *GraphPad Prism* 5.0 (GraphPad Software). Um valor de  $p < 0,05$  foi utilizado como limite da significância estatística.

### 3.2.4. Avaliação da presença de marcadores de células endoteliais através de ensaio de imunofluorescência

A comprovação da diferenciação endotelial pode ser realizada através da detecção da expressão de moléculas específicas de células endoteliais, utilizando-se a técnica de imunofluorescência (Cao *et al.*, 2005). Para a realização dessa técnica, foram utilizados anticorpos contra moléculas específicas de interesse. Para a detecção das moléculas de interesse foram utilizados um anticorpo (primário) e um segundo anticorpo conjugado a um fluorocromo ou apenas o anticorpo primário já conjugado.

As células hASC foram cultivadas sobre uma lamínula em uma placa de 6 poços, em meio de diferenciação endotelial. Após a indução dessas células à diferenciação, as mesmas foram fixadas com paraformaldeído 4%, por 15 minutos, à temperatura ambiente. Em seguida, as células foram lavadas 3 vezes com PBS 0,15M e foi feita a permeabilização da membrana plasmática, utilizando-se solução de PBS/Triton-100X 0,1%, por 10 minutos. Após a permeabilização, as células foram novamente lavadas com PBS 0,15M (três vezes de 5 minutos) e foi feito o bloqueio da reação com PBS/BSA 1% e soro fetal de cabra 5%, por 1 hora, à temperatura ambiente. Posteriormente, as

células foram incubadas, por 12 horas, com anticorpo primário correspondente, diluído em PBS/BSA 1%. Os anticorpos primários utilizados encontram-se descritos na tabela 2.

Após a incubação com anticorpo primário, as células foram novamente lavadas com PBS 0,15M (3 vezes de 5 minutos) e, em seguida, foram incubadas com anticorpo secundário monoclonal de cabra, contra IgG de camundongo, conjugado com fluorocromo Alexa Fluor 488 (Molecular Probes), diluído em PBS/BSA 1%, na proporção de 1:500, por 1 hora em câmara úmida, protegido da luz, à temperatura ambiente. Os anticorpos que já possuíam ligação com algum fluorocromo não foram incubados com o anticorpo secundário. Controles negativos foram feitos utilizando-se apenas o anticorpo secundário.

Posteriormente, para a marcação do núcleo, as células foram incubadas com a sonda *Hoechst* (Sigma), 0,2 µg/mL, por 20 minutos ou com Iodeto de Propídio (PI) (Sigma), 0,5 µg/mL, por 5 minutos. Em seguida, foram feitas novas lavagens das lamínulas, com PBS 0,15M (três vezes de 10 minutos), e a montagem das lâminas foi feita utilizando-se líquido de montagem *Hydromount* (National Diagnostics).

As lâminas montadas foram então visualizadas e analisadas através do Microscópio Confocal (*Zeiss LSM 510 Meta*) do Centro de Microscopia Eletrônica CEMEL do Departamento de Morfologia do ICB/UFMG, utilizando-se o programa *Carl Zeiss Laser Scanning Microscope LSM 510©* (Oswald, Boxberger *et al.*, 2004). As amostras foram excitadas a um comprimento de onda de 488 nm e observadas a 505-550 nm para detecção de Alexa 488.



Tabela 2: Anticorpos primários utilizados para imunofluorescência

Antígeno	Tipo	Clone	Espécie	Conjugado	Fornecedor	Diluição
vWF	Monoclonal	VW92-3	Camundongo	-	Abcam	1:200
VE-caderina	Policlonal	-	Coelho	FITC	Abcam	1:20

### 3.3. Identificação de genes diferencialmente expressos através de Hibridização subtrativa rápida (RaSH)

Para a identificação dos genes expressos nas células-tronco induzidas à diferenciação endotelial, foi utilizada a técnica de Hibridização Subtrativa Rápida (RaSH) conforme proposto por Jiang e colaboradores, em 2000 (Jiang *et al.*, 2000).

Todos os procedimentos de biologia molecular empregados no presente trabalho foram realizados de acordo com métodos pré-estabelecidos (Sambrook *et al.*, 2001), com algumas modificações (especificadas junto aos métodos), e/ou segundo a recomendação do fabricante dos *kits*.

A qualidade dos materiais genéticos utilizados, incluindo sua concentração e pureza, foi estimada através de resolução eletroforética em gel de agarose a 1% e também por leitura em espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm. As enzimas de modificação e restrição, quando utilizadas, seguiram as recomendações do fabricante.

Todas as amostras de material genético foram resolvidas em gel de agarose a 1%, assim como segue. Às amostras, foi adicionado tampão de amostra 5X {Glicerol 50%; Azul de bromofenol 0,20%; TBE 2,5X [TBE (10X): 54 g de Tris; 27,5 g de ácido bórico; 20 mL de EDTA 0,5 M (pH 8,0 - 8,5); água destilada qsp 1L]} e o mesmo foi resolvido em gel de agarose a 1% em tampão TBE 0,5X, contendo 3,5% de brometo de etídeo (0,5 µg/mL). As resoluções

eletroforéticas foram realizadas a 100 V durante aproximadamente 1 hora. O material genético foi visualizado em fotodocumentador, onde o gel foi fotografado sobre um transluminador de luz ultravioleta a 320 nm, através do sistema de documentação fotográfica *Kodak Digital Science™ DC40 Camera* (Kodak). A foto foi processada pelo programa *Electrophoresis Documentation and Analysis System* (Kodak). O tamanho dos fragmentos foi estimado comparando-se ao marcador de DNA de peso molecular 1 Kb *Plus DNA Ladder* (Invitrogen).

### 3.3.1. Extração de RNA total

O RNA total foi isolado tanto das culturas de células indiferenciadas quanto das culturas de células induzidas à diferenciação quando as mesmas apresentavam-se com cerca de 100% de confluência em frasco de cultura T-25, cultivadas em meio de cultivo basal ou em meio de diferenciação endotelial por 14 dias, utilizando-se o reagente Trizol (Gibco), seguindo o procedimento recomendado pelo fabricante. A partir disso, seguiu-se com o procedimento de precipitação do RNA obtido como se segue. A solução contendo o RNA extraído foi acondicionada em tubos do tipo “Eppendorf” de 2 mL e submetida à homogeneização por agitação, quando foram então adicionados 200 µL de clorofórmio (Merck) e a solução foi vigorosamente agitada por cerca de 20 segundos. Posteriormente, os tubos foram centrifugados por 15 minutos, a 12.000 rpm e 4°C. A fase aquosa e incolor, situada na parte superior do tubo, foi transferida para um novo tubo, no qual foram adicionados 500 µL de álcool isopropílico (Merck). Os tubos foram então incubados à temperatura de -80°C por aproximadamente 4 horas. Após esse período, os tubos foram centrifugados por 10 minutos, a 12.000 rpm e 4°C. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e adicionou-se 1 mL de etanol (Merck) 75% gelado. As amostras foram centrifugadas por 10 minutos, a 7.500 rpm e 4°C. Então, descartou-se

novamente o sobrenadante e, após seco à temperatura ambiente, o precipitado formado foi suspenso em 50 µL de H<sub>2</sub>O, ultra pura e esterilizada. Por fim, a suspensão foi homogeneizada a 40°C por 10 minutos.

A concentração do RNA total obtido foi então determinada pela leitura da absorbância a 260/280 nm. A relação entre as leituras realizadas a 260 e a 280 nm foi utilizada como parâmetro na estimativa do grau de pureza do referido RNA. Para que a amostra fosse considerada pura, o valor desta relação deveria estar entre 1,8 e 2,0. A integridade do RNA total obtido foi verificada através de eletroforese em gel de agarose assim como descrito no item 3.3.

Foi verificada também a possibilidade de contaminação da amostra de RNA total obtida com o DNA proveniente das células previamente processadas, através de amplificação por PCR, utilizando-se oligonucleotídeos complementares às extremidades 5' e 3' da seqüência codificadora do gene constitutivo GAPDH, seguindo os seguintes parâmetros: 1 ciclo de 4 minutos a 94°C, seguido por 25 ciclos de 1 minuto a 94°C, 30 segundos a 60°C e 1 minuto a 72°C e, para finalizar, 1 ciclo de 3 minutos a 72°C.

O resultado da reação de PCR foi também verificado através de resolução eletroforética (item 3.3).

### 3.3.2. Síntese de cDNA dupla fita

O procedimento a seguir foi aplicado para síntese de cDNA, a partir de 20 µg das amostras de RNA total obtidos das duas linhagens celulares (indiferenciada e diferenciada).

A primeira fita de cDNA foi sintetizada utilizando-se o *kit SuperScript<sup>TM</sup>-III First-Strand Syntesis System for RT-PCR* (Invitrogen), de acordo com as recomendações do fabricante como segue. Dois microgramas de cada amostra de RNA total foram incubados com 0,5 µg do oligonucleotídeo oligo(dT)<sub>18</sub> a

70°C por 10 minutos. Em seguida, as amostras foram incubadas a 4°C, por 2 horas, quando então adicionou-se às amostras tampão PCR 1X (Tris-HCl 20 mM pH 8,4 e KCl 50 mM), MgCl<sub>2</sub> 5 mM, dNTPs (0,5 mM de cada) e DTT 5 mM e as amostras foram incubadas a 42°C por 5 minutos. Em seguida, foram adicionadas 200 U da enzima *SuperScript III RNaseH Reverse Transcriptase* (Invitrogen) e as amostras foram incubadas por mais 50 minutos a 42°C.

Após a síntese da primeira fita de cDNA, o RNA contido no híbrido DNA/RNA obtido com a primeira reação foi degradado por incubação com 2 U de RNase H (Invitrogen) a 37°C, por 20 minutos. Para cada reação de síntese da primeira fita foi feito um controle negativo, o qual continha todos os reagentes exceto a enzima transcriptase reversa.

Para a síntese da segunda fita, foram adicionados ao volume total obtido na reação para a obtenção da primeira fita, 0,3 mM de dNTPs, 1 U de DNA ligase (10 U/μL) (Invitrogen), 40 U de DNA polimerase I de *E. Coli* (10 U/μL) e 1 U de Rnase H (2 U/μL), em um volume final de 100 μL. Esta reação foi incubada por 2 horas a 16°C e depois foram acrescentadas 5 U de T4 DNA ligase (Invitrogen). Ao final, ao cDNA obtido foi acrescentado 1 volume de fenol-clorofórmio (1:1) e submetido a homogeneização vigorosa. Em seguida, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo ao qual foram adicionados 2,5 volumes de etanol absoluto (Synth) e 200 mM de NaOAc. Após esta etapa, a mistura foi incubada durante 30 minutos a -20°C e posteriormente centrifugada por 5 minutos a 13.000 rpm. Acrescentou-se ao DNA precipitado, 600 μL de etanol (Synth) 70% gelado, seguindo-se de centrifugação sob as mesmas condições. O sobrenadante foi descartado e o cDNA foi seco à temperatura ambiente. Ao final a amostra foi suspensa em 10 μL de H<sub>2</sub>O, ultra pura e esterilizada (Sambrook *et al.*, 2001).

### 3.3.2.1. Preparação dos fragmentos para hibridização - Digestão do cDNA e ligação dos adaptadores

As amostras de cDNA dupla fita das duas linhagens celulares (indiferenciada e diferenciada) foram submetidas à reação de digestão, utilizando-se 20 U da endonuclease de restrição *Mbo* I (Fermentas) por 3 horas a 37°C, seguida da adição de nova alíquota de 20 U da enzima, após esse período, e incubação por aproximadamente 18 horas. Em seguida, realizou-se a purificação do cDNA também pelo método “fenol/clorofórmio”, seguido de precipitação por etanol e ressuspensão em 10 µL de H<sub>2</sub>O, ultra pura e estéril (item 3.3.2) (Sambrook *et al.*, 2001).

Seqüências adaptadoras [XDPN-14 (5' CTGATCACTCGAGA 3'); XDPN-12 (5' GATCTCTCGAGT 3')] (Jiang *et al.*, 2000), em uma concentração final de 10 µM, contendo um sítio artificial de restrição para a endonuclease de restrição *Xho* I, foram adicionadas às referidas amostras para que se ligassem aos fragmentos de cDNA digeridos. As reações foram incubadas a 55°C, por 1 minuto, sendo então resfriadas em 2°C a cada 2 minutos, até atingirem a temperatura de 14°C.

Para a ligação das seqüências adaptadoras às extremidades dos cDNAs digeridos, foram adicionadas a cada amostra 15 U da enzima T4 ligase (Invitrogen) e estas foram submetidas à temperatura de 4°C durante 16 horas, utilizando uma proporção equimolar de “3:1” de adaptadores para fragmentos.

Para certificar de que os oligonucleotídeos XDPN-12 e XDPN-14 foram ligados aos adaptadores, e aumentar a quantidade de amostra, um volume de 40 µL de cada ligação, diluído em 100 µL de H<sub>2</sub>O ultra pura e esterilizada, foi utilizado para amplificação, por PCR, utilizando o oligonucleotídeo XDPN-18 (5' CTGATCACTCGAGAGATC 3') (Jaing *et al.*, 2000), o qual é complementar às seqüências dos adaptadores XDNP-14 e XDPN-12.

Visando a obtenção de maior massa de produto recém amplificado, foram então realizadas outras 20 reações de PCR, utilizando-se: 1  $\mu$ L da reação de ligação diluída, 5X *Colorless GoTaq<sup>®</sup> Reaction Buffer* PCR, 1  $\mu$ M dNTPs, 10  $\mu$ M do oligonucleotídeo XDPN-18 e 1 U da enzima *GoTaq<sup>®</sup> DNA Polymerase* (Promega). As reações foram submetidas a 1 ciclo de 5 minutos a 94°C, seguido por 25 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 55°C, 1 minuto a 72°C e 1 ciclo de 3 minutos a 72°C. Após a amplificação, as 20 reações foram unificadas em um mesmo tubo e submetidas aos procedimento de purificação, precipitação conforme item 3.3.1 (Sambrook *et al.*, 2001). Após este procedimento, as amostras foram quantificadas pela determinação da absorbância a 260/280 nm (item 3.3) e os fragmentos foram analisados em gel de agarose a 1% (item 3.3).

Os fragmentos da amostra escolhida como *tester* (diferenciada) foram submetidos à digestão enzimática com 20 U da endonuclease de restrição *Xho I* (Invitrogen), durante 2 horas a 37°C. Após a digestão, os fragmentos foram purificados com solução fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25:24:1) seguidos de precipitação e ressuspensão 10  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O, ultra pura e estéril (item 3.3.1) (Sambrook *et al.*, 2001).

### 3.3.3. Hibridização e construção da biblioteca subtrativa

Para a preparação da biblioteca subtrativa, 100 ng do cDNA *tester* foram misturados com 5  $\mu$ g de cDNA *driver* (amostra de células indiferenciadas), em 10  $\mu$ L de solução de hibridização (NaCl 0,5 M, Tris 50 mM pH 7,5, SDS 0,2% e formamida 40% V/V), fervidos por 5 minutos e incubados a 42°C por 48 horas. Ao final, a mistura de hibridização foi purificada pelo método “fenol/clorofórmio”, seguido de precipitação por etanol (item 3.3.1) e ressuspensão em 20  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O, ultra pura e estéril (Sambrook *et al.*, 2001).

A mistura foi então submetida a uma reação de ligação ao plasmídeo *pBlueScript-II-SK* (Fermentas), o qual foi previamente digerido com a endonuclease *Xho* I (Invitrogen). A reação de ligação foi composta de 10 µL da enzima T4 DNA Ligase (Invitrogen), submetida à temperatura de 4°C durante 16 horas utilizando-se uma proporção equimolar de “3:1” de inserto para plasmídeo.

### 3.3.3.1. Confeção de *Escherichia coli* eletrocompetente

Para o preparo de bactérias eletrocompetentes, 100 µL de uma cultura de *Escherichia coli* DH5α, contendo aproximadamente 10<sup>8</sup> unidades formadoras de colônia (UFC), foram inoculados em 5 mL de meio LB, sem antibiótico, e incubados a 37°C, durante 18 horas, sob agitação. Em seguida, uma alíquota de 3 mL desta cultura foi inoculada em 300 mL de LB e incubada a 37°C, sob agitação, até atingir uma densidade óptica a 600 nm (DO<sub>600nm</sub>) entre 0,2 e 0,3. Uma vez alcançada a DO desejada, a cultura foi resfriada, em gelo, por 30 minutos e redistribuída em seis tubos “Falcon” de 50 mL, com 40 mL de cultura em cada. Posteriormente, cada cultura foi centrifugada a 4.000 rpm, durante 20 minutos a 4°C e o sobrenadante descartado. Assim, para a lavagem do precipitado celular, a cada tubo foram adicionados 40 mL de uma solução, esterilizada e gelada, de glicerol 10% para suspensão das células. Os tubos foram novamente centrifugados a 4.000 rpm por 20 minutos a 4°C e o sobrenadante descartado.

Esse processo de centrifugação e lavagem foi repetido mais três vezes e, após a última lavagem, o precipitado celular unificado foi suspenso em 1 mL da solução de glicerol 10% e alíquotas de 100 µL foram estocadas a -70°C.

Para análise da eficiência de transformação, uma alíquota de 100 µL com células eletrocompetentes, congelada a -70°C, foi colocada no gelo durante 5

minutos. Em seguida adicionou-se 10 ng do plasmídeo pUC18 (Amp<sup>r</sup>) e a mistura foi incubada por 10 minutos no gelo. Em seguida a mistura foi transferida para cubetas de eletroporação (2 mm) (BioAgency), previamente resfriadas. As amostras foram submetidas a um pulso de 2,5 kV, capacitância de 25  $\mu$ F e resistência de 200  $\Omega$  utilizando-se um eletroporador *GenePulser XCellTM Electroporation System Quick Guide* (Bio-RAD). Imediatamente após o pulso, adicionou-se às células 1 mL de meio LB incubadas à temperatura de 37°C, sem agitação, por duas horas. Diluições de 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-4</sup> e 10<sup>-6</sup> foram semeadas em meio LB ágar suplementado com ampicilina (100  $\mu$ g/mL) e incubadas a 37°C durante 18 horas.

### 3.3.3.2. Transformação de *E.coli* eletrocompetentes

A reação de ligação conduzida conforme descrito no item 3.3.3 foi utilizada para transformar células eletrocompetentes de *E. coli* DH5 $\alpha$  preparadas de acordo com o protocolo descrito no item 3.3.3.1, com eficiência de 1 x 10<sup>8</sup> UFC por micrograma de DNA.

A transformação foi conduzida por eletroporação, seguindo-se os mesmos parâmetros descritos no item 3.3.3.1. Para tanto, uma alíquota de 5  $\mu$ L do produto de ligação foi misturada com 50  $\mu$ L de células eletrocompetentes e incubados no gelo por 10 minutos. A eletroporação foi realizada no aparelho *GenePulser XCellTM Electroporation System Quick Guide* (Bio-RAD). Para o controle negativo, 50  $\mu$ L de células eletrocompetentes foram transformadas sem adição de qualquer plasmídeo.



### 3.3.3.3. Seleção de clones para seqüenciamento

O processo de seleção dos transformantes consistiu em transferir uma alíquota de 100 µL da suspensão de células eletroporadas, de cada amostra, para placas de Petri contendo meio LB ágar suplementado com ampicilina (100 µg/mL), X-Gal (0,8 µL/mL) e IPTG (0,4 µL /mL). As culturas foram mantidas a 37°C por aproximadamente 16 horas. Após este período as placas foram avaliadas quanto à presença de clones recombinantes. As colônias foram selecionadas fenotipicamente (resistência à ampicilina e seleção “azul/branco”, baseado no sistema *lacZ*). Para comprovar a seleção fenotípica, as colônias selecionadas (brancas) foram submetidas à etapa seguinte que consistiu na extração do DNA plasmidiano.

### 3.3.3.4. Extração do DNA plasmidiano

Para proceder com a seleção e as análises dos clones obtidos, partiu-se para a extração dos plasmídeos *pBlueScript-II-SK* contendo os fragmentos hibridizados ligados ao mesmo. As colônias selecionadas foram transferidas, isoladamente, para tubos tipo “Falcon” de 50 mL contendo 5 mL de meio LB suplementado com ampicilina (100 µg/mL). As culturas foram incubadas a 37°C por aproximadamente 18 horas, sob agitação. Após a incubação, foi preparada uma cultura estoque em glicerol 80% (1 mL da cultura e 1 mL de glicerol 80%), sendo estas armazenadas a -70°C. Uma alíquota de 1,5 mL de cada cultura foi também transferida para tubos do tipo “Eppendorf” de 2 mL e procedeu-se com a extração de plasmídeos pelo método de lise alcalina como descrito por Sambrook e colaboradores em 2001, com algumas modificações como segue.

Após a centrifugação das culturas, por 7 minutos a 13.000 rpm e 25°C, as células foram coletadas e suspensas em 200 µL da solução I (50 mM glicose; 10

mM tris-HCl, pH 7,4). Em seguida, adicionou-se 200 µL da solução II (1% SDS, 0,2 M NaOH) e após a inversão dos tubos (10 a 15 vezes) foram adicionados 200 µL de solução III (3 M NaOAc; pH 5,2). A mistura foi centrifugada a 13.000 rpm por 15 minutos e o sobrenadante foi coletado e transferido para novos tubos. Ao sobrenadante, adicionou-se 420 µL de isopropanol (Synth) gelado. Os tubos foram então incubados por 4 horas a -70°C e após esse período, foram centrifugados e o sobrenadante descartado. Logo após, o precipitado foi lavado com etanol (Synth) 70% gelado e suspenso em 50 µL de água ultra pura esterilizada. Por fim, a suspensão foi tratada com RNase A (100 µg/mL) a 37°C, por meia hora.

A presença e qualidade dos plasmídeos foram verificadas através de eletroforese (item 3.3) e as seqüências nucleotídicas dos insertos clonados no plasmídeo, foram confirmadas através de PCR utilizando-se o oligonucleotídeo XDPN-18, assim como descrito no item 3.3.2.1.

#### 3.3.4. Reação de sequenciamento e análises *in silico*

As seqüências nucleotídicas dos insertos clonados no plasmídeo *pBlueScript-II-SK* foram identificadas através de sequenciamento, utilizando-se os oligonucleotídeos M13 *forward* (5' GTAAAACGACGGCCAG 3') e M13 *reverse* (5' CAGGAAACAGCTATGAC 3'). Para isto, todos os clones anteriormente selecionados, foram submetidos ao sequenciamento dos insertos contidos no plasmídeo *pBlueScript-II-SK*, sendo que cada um dos clones teve seu inserto sequenciado pelo menos três vezes no sentido senso (utilizando o oligonucleotídeo M13 *forward*) e três vezes no sentido antisenso (utilizando o oligonucleotídeo M13 *reverse*). Cada amostra foi amplificada utilizando-se o *kit BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing* (Applied Biosystems), como segue: 0,5 µL de "Reaction Mix"; 1,5 µL de tampão de diluição 5X; 2 µL do

oligonucleotídeo M13 *forward* ou *reverse* (0,8 pMoles/ $\mu$ L); 1  $\mu$ L de DNA (100 ng/ $\mu$ L); 5  $\mu$ L de água ultra pura esterilizada. A reação ocorreu em um termociclador modelo ATC 401 (NYX TECHNIK, Inc.) sob as seguintes condições: 1 ciclo de 5 minutos a 96°C, seguido por 44 ciclos de 15 segundos a 96°C, 15 segundos a 55°C e extensão por 4 minutos a 60°C.

Logo após, os produtos da reação foram então precipitados e lavados, com o objetivo de remover os nucleotídios marcados não incorporados ao DNA amplificado. Para isto, a cada amostra foi adicionado: 1  $\mu$ L de EDTA 125 mM; 1  $\mu$ L de NaOAc 3M; 25  $\mu$ L de etanol 100%. A mistura foi homogeneizada e incubada por 15 minutos à temperatura ambiente. Seguiu-se então com a centrifugação a 13.000 rpm, por 30 minutos e posterior descarte do sobrenadante. Adicionou-se então 35  $\mu$ L de etanol 70% em cada tubo e os mesmos foram centrifugados a 7.500 rpm por 15 minutos à temperatura de 4°C. O sobrenadante foi novamente descartado. A amostra, precipitada e seca, foi armazenada a -20°C até a sua aplicação no Seqüenciador ABI3130 (Applied Biosystems).

As seqüências obtidas foram comparadas utilizando-se o programa *CAP3 Sequence Assembly Program* (<http://pbil.univ-lyon1.fr/cap3.php>), onde se obteve um *contig* único de cada clone, eliminando-se assim prováveis erros do sequenciamento. O *contig* final foi então analisado utilizando-se o algoritmo BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) disponível no NCBI (*National Center for Biotechnology Information*; (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)). Para a comparação entre seqüências de ácidos nucléicos utilizou-se o programa "BLASTn" e para a comparação entre a seqüência de aminoácidos correspondente, o "BLASTx".

### 3.3.5. PCR em Tempo Real para a validação dos genes identificados

Para validação experimental dos genes isolados pela técnica de RaSH e identificados por análises de similaridade, foram selecionados genes expressos exclusivamente nas células diferenciadas, ou seja, genes identificados através dos experimentos nos quais o cDNA das células diferenciadas em células endoteliais foi utilizado como *tester* e o cDNA das células tronco, ou seja, indiferenciadas, foi utilizado como *driver*.

#### 3.3.5.1. Elaboração de oligonucleotídeos

Para as reações de PCR em Tempo Real, foram elaborados, com o auxílio do programa *PrimerExpress* versão 3.0 (Applied Biosystems), um par de oligonucleotídeos específicos para cada gene previamente isolado pela técnica de hibridização subtrativa rápida (RaSH) e identificado pelas análises de similaridade. Os parâmetros utilizados pelo programa *PrimerExpress* para a elaboração dos oligonucleotídeos foram: amplificar fragmentos cujo peso molecular variasse entre 50 e 200 bp, apresentasse teor de GC entre 30 e 80%, não apresentasse complementaridade entre si ou mesmo que formasse estruturas secundárias estáveis e apresentasse temperatura de anelamento entre 58°C e 60°C.

#### 3.3.5.2. Seleção do controle endógeno

A realização de ensaios de quantificação relativa entre amostras submetidas a diferentes tratamentos depende da seleção de um gene cujos níveis transcricionais permaneçam inalterados e/ou constantes. Este gene, considerado o controle endógeno da reação, é empregado como fator de

normalização para a análise da expressão dos genes de interesse (Livak e Schmittgen, 2001). Sendo assim, para a realização do presente trabalho, o gene GAPDH foi selecionado para servir como o controle endógeno. Os parâmetros de utilização dos reagentes e de amplificação estão descritos na Tabela 3 e na Tabela 4, respectivamente.

Tabela 3: Parâmetros de utilização dos reagentes

Reagente	Concentração do estoque	Concentração de trabalho	Concentração final da reação	Volume por reação
Master Mix	2x	2x	1x	5,0 $\mu$ L
Iniciador senso	100 pmol/ $\mu$ L	2,5 pmol/ $\mu$ L	0,16 pmol/ $\mu$ L	1,0 $\mu$ L
Iniciador Anti-senso	100 pmol/ $\mu$ L	2,5 pmol/ $\mu$ L	0,16 pmol/ $\mu$ L	1,0 $\mu$ L
Amostra de cDNA	Resultante da transcrição reversa	Estoque diluído 10x	-	3,0 $\mu$ L (ausente para Controle negativo)
Água	-	-	-	Qsp 10 $\mu$ L

Tabela 4: Parâmetros de amplificação dos reagentes

Etapa da reação de Real Time	Subetapa da reação de Real Time	Temperatura	Tempo
Ativação da Taq Polimerase - Estágio cíclico (45 repetições)	-	95°C	10 min
	Desnaturação	95°C	15 seg
	Anelamento e extensão de iniciadores	60°C	1 min
Análise de dissociação contínua	Desnaturação	95°C	15 seg
	Renaturação	60°C	1 min
	Desnaturação	95°C	30 eg

### 3.3.5.3. Determinação da eficiência de amplificação dos iniciadores

A eficiência de amplificação para os iniciadores utilizados (tabela 5) foi estimada por meio de reações de Real Time, contendo cDNA submetido a diluições seriadas de 4 vezes (1:1, 1:10, 1:100 e 1:1000). Para cada par de iniciadores, foi utilizada uma amostra de cDNA correspondente a uma linhagem celular (célula-tronco ou endotelial). As reações foram realizadas em triplicatas para cada uma das quatro diluições das amostras de cDNA. A partir dos Ct (*Cycle threshold*) obtidos, foi possível determinar os valores de eficiência de amplificação para cada par de iniciadores utilizados (Rasmussen, 2001).

A eficiência de amplificação foi calculada realizando-se reações utilizando as quatro diluições seriadas de cDNA como molde. Assim, foi construída uma curva-padrão, onde a média dos Ct obtidos, em cada concentração, variava em função do logaritmo da concentração de cDNA. O coeficiente angular da reta obtida ( $a$ , em  $y=ax+b$ ) foi utilizado para cálculo da eficiência de amplificação dos moldes, obtida através da seguinte fórmula:  $ef = 10^{-1/a}$  (sendo  $ef$  = eficiência,  $a$  = coeficiente angular da reta). Foram aceitos valores de eficiência entre 1,70 e 2,30.

Tabela 5: Seqüências dos oligonucleotídeos utilizados nas reações de PCR em Tempo Real

Gene	Oligonucleotídeo senso	Oligonucleotídeo anti-senso
ELAVL1	5' AGACGCCAACTTGTACATCAG 3'	5' ATAAACGCAACCCCTCTGG 3'
LAMB2	5' GTTGGAAGTATTGTGCAGC 3'	5' CTCAAGGCAGACAGGATTAGG 3'
SC5DL	5' TGGATTGTTTGAAGTTCGTTAG 3'	5' ATATGGTGAGGTTTATGTAGGCG 3'
VEGFA	5' CGAGTACATCTTCAAGCCATCC 3'	5' TGGTGAGGTTTGTATCCGC 3'
HARS	5' CCAAGGGCACAAGAGACTATAG 3'	5' CCCCATACTTTCCCATCAGTG 3'
GAPDH	5' ACATCGCTCAGACACCATG 3'	5' TGTAGTTGAGGTCAATGAAGGG 3'

#### 3.3.5.4. Reação de PCR em Tempo Real

Foram realizados experimentos de PCR em Tempo Real através da amplificação por PCR de um produto de **Transcrição Reversa** (cDNA). Para isto, o cDNA foi sintetizado utilizando-se o *Kit RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis* (Fermentas), utilizando-se o RNA total extraído de células indiferenciadas e induzidas à diferenciação. Para isto, em cada reação foi utilizado 1 µg do RNA total extraído, 1 µL do oligonucleotídeo Oligo (dT)<sub>18</sub> e o volume completado com água DEPC para 12 µL, sendo esta reação mantida por 5 minutos a 65°C. Logo após, foram adicionados 4 µL do *Reaction Buffer 5X*, 1 µL de *RiboLock™ RNase Inhibitor* (20 u/µL), 2 µL de *dNTP Mix* (10 mM) e 1 µL de *RevertAid™ H Minus M-MuLV Reverse Transcriptase* (200 U/µL), sendo esta reação (20 µL) mantida durante 60 minutos a 42°C para síntese do cDNA e 5 minutos a 70°C para término da reação. O cDNA sintetizado foi então utilizado para a PCR em Tempo Real.

Como controles negativos da PCR em Tempo Real foram utilizados RNAs totais extraídos das células indiferenciadas e induzidas à diferenciação, em uma reação de PCR em Tempo Real sem a enzima *RevertAid™ H Minus M-MuLV Reverse Transcriptase*, para verificação da presença de algum DNA genômico ou plasmidiano na amostra. Como controle positivo da PCR em Tempo Real, utilizou-se 100 ng de RNA específico do gene GAPDH, em uma reação contendo 1 µL do oligonucleotídeo Oligo (dT)<sub>18</sub>, conforme descrito anteriormente.

A partir dos cDNAs obtidos, seguiu-se com uma reação de PCR utilizando-se os oligonucleotídeos específicos para os genes identificados nas amostras de cDNA das duas linhagens celulares e também do controle negativo. Foi utilizado em cada reação 0,25 µL de *GoTaq® DNA Polymerase* (Promega), 2,5 µL de *5X GoTaq® Green Reaction Buffer* (Promega) contendo

MgCl<sub>2</sub> (7,5 mM), 0,5 µL de dNTP (10 mM), 17,75 µL de H<sub>2</sub>O ultra-pura esterilizada, 1µL do oligonucleotídeo *forward* (100 pMoles/µL), 1µL do oligonucleotídeo *reverse* (100 pMoles/µL) e 2 µL do cDNA obtido a partir de 1 µg de RNA total. Para a amostra de cDNA do controle positivo, 1,5 µL dos oligonucleotídeos *forward* e *reverse*, específicos para GAPDH, (10 µM) e 2 µL do cDNA diluído 1:1.000 foram utilizados. A PCR foi realizada em aparelho *GeneAmp® PCR System 9700* (Applied Biosystems) com o seguinte programa: 1 ciclo de 3 minutos a 94°C, seguido por 35 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos para o anelamento em gradiente a 58-62°C, extensão de 45 segundos a 72°C e, para finalizar, 1 ciclo de 45 segundos a 72°C.

O programa SDS 2.4 (Applied Biosystems) foi utilizado para a análise dos dados obtidos. O programa gera um gráfico onde se pode observar a intensidade de fluorescência em função do número de ciclos de amplificação. Um limiar (*threshold*) é definido, onde a intensidade da fluorescência é estatisticamente diferente da fluorescência de basal (*background*) e a curva encontra-se na fase logarítmica de amplificação. O ciclo da reação no qual a fluorescência da amostra intercepta o *threshold* é chamado Ct (*Cycle Threshold*). Assim, a comparação entre a expressão gênica de diferentes amostras é realizada através da comparação entre os Cts. Amostras com Cts menores apresentam maior quantidade do gene alvo no cDNA molde inicial presente na reação.

#### **3.3.5.5. Cálculo da expressão gênica diferencial dos genes avaliados**

As curvas de amplificação ( $\Delta Rn$  versus Ciclo), diagramadas em tempo real pelo programa SDS 2.4 (Applied Biosystems) durante o processamento das reações no termociclador *7500 Real-Time PCR System*, foram utilizadas como



parâmetros para a definição do limiar de detecção dos produtos amplificados. Este limiar foi configurado para cruzar a fase exponencial logarítmica das curvas de amplificação, etapa em que a fluorescência detectada é resultado do acúmulo de produtos amplificados, acima dos níveis de fluorescência basal.

Os resultados brutos obtidos foram expressos em valores de Ct, os quais refletem o número de ciclos de amplificação necessários para que o sinal fluorescente emitido atinja o limiar de detecção. A média dos Cts obtidos para o gene alvo, relativo à célula diferenciada, foi subtraída da média calculada para os Ct do gene GAPDH, referente à mesma célula diferenciada. O valor gerado, denominado  $\Delta\text{Ct}$ , representa a normalização das amplificações do gene alvo em relação às amplificações do gene de controle endógeno selecionado. A diferença entre o valor de  $\Delta\text{Ct}$  para a condição de célula diferenciada e o valor de  $\Delta\text{Ct}$  para a condição controle, célula-tronco, (chamada  $\Delta\Delta\text{Ct}$ ) foi calculada e utilizada para a determinação de  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ . Este valor representa o quanto a transcrição do gene de interesse foi aumentada pela indução à diferenciação endotelial. A significância das alterações detectadas foi avaliada com o emprego de análise estatística realizada utilizando-se *GraphPad Prism*© 5 (GraphPad Software).

## **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

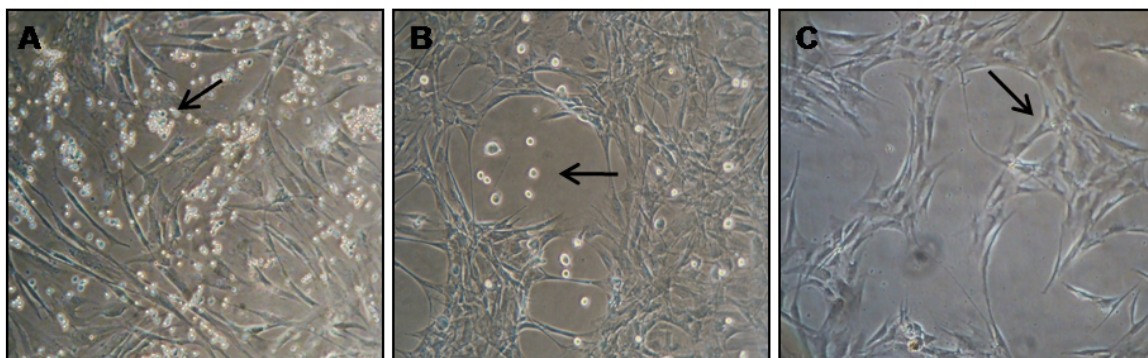
## 4.I. Isolamento e caracterização das células-tronco

### 4.I.1. Extração e cultivo das hASC

Com o intuito de identificar genes diferencialmente expressos após a diferenciação de hASC para célula endotelial e identificar possíveis novos marcadores envolvidos no estabelecimento dessa diferenciação, o primeiro passo foi isolar as células-tronco derivadas do tecido adiposo.

Para isto as hASC foram extraídas conforme descrito em Materiais e Métodos, item 3.1.2. Na primeira passagem obteve-se uma população heterogênea, composta por células aderentes, com formato fusiforme e células não aderentes, com formato arredondado (Figura 4A). Na Figura 4B, correspondente à cultura das células em segunda passagem, é possível observar ainda a presença de células não aderentes de formato arredondado. Ao longo do cultivo, com a troca de meio e a expansão da população celular, o número de células não aderentes foi diminuindo, predominando, ao final, uma população de células, aderentes à superfície plástica, fusiformes e com potencial de auto-renovação e de formação de colônias. A partir da quarta passagem não mais observou-se células não aderentes (Figura 4C).

Corroborando com os dados de Zuk e colaboradores (2001) e assim como o observado por vários trabalhos que isolaram células-tronco a partir do tecido adiposo (Aust *et al.*, 2004; Rodriguez *et al.*, 2005; Lin *et al.*, 2006), as hASC, isoladas no presente trabalho, demonstraram-se capazes de aderir à superfície plástica da placa de cultivo, de formar colônias e de se replicarem com uma alta taxa.



**Figura 4: Aspectos morfológicos da cultura de células extraídas do tecido adiposo humano até a 4ª passagem:** (A) hASC na 1ª passagem; presença de uma pequena população de células não aderentes (seta). Aumento: 100X. (B) hASC na 2ª passagem; presença de uma população de células não aderentes (seta). Aumento: 100X. (C) hASC na 4ª passagem, ausência de células não aderentes, população homogênea de células aderentes, fusiformes e capazes de formar colônias (seta). Aumento: 150X.

#### 4.I.2. Avaliação da viabilidade celular

O ensaio do MTT consiste na metabolização do reagente MTT por enzimas desidrogenases presentes nas mitocôndrias de células viáveis, levando à formação de Cristais de Formazan (Mosmann, 1983). Sendo assim, para verificar se as células previamente isoladas mantinham-se viáveis até a 4ª passagem, realizamos este ensaio.

Após a realização do ensaio de MTT com as hASC previamente isoladas e cultivadas até a 4ª passagem, foi possível observar que houve a formação dos respectivos cristais (Figura 5), fato este que demonstra que as células extraídas do tecido adiposo humano e cultivadas em meio de cultivo basal apresentavam-se viáveis após as 4 passagens necessárias para homogeneização da cultura.

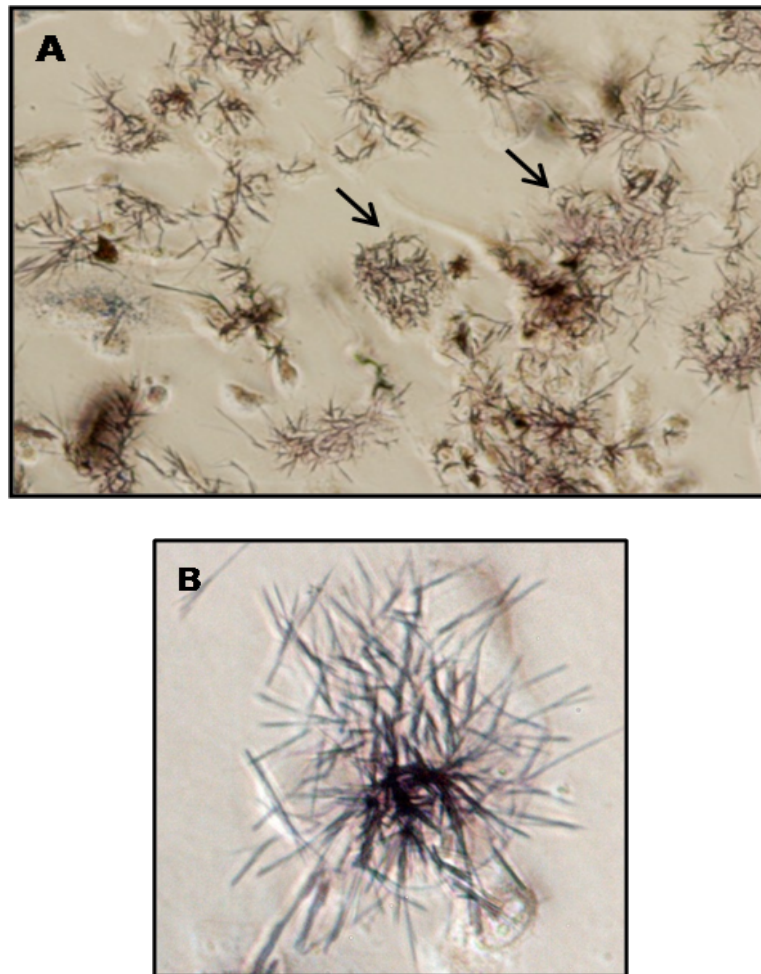
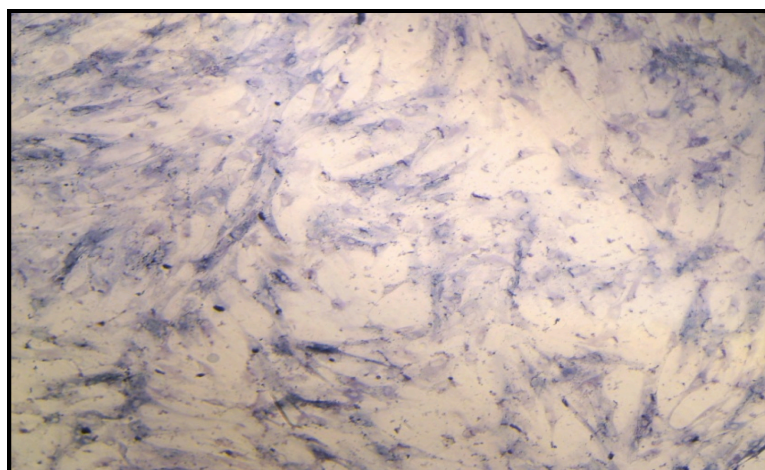


Figura 5: Visualização dos Cristais de Formazan obtidos com o ensaio de MTT realizado com a cultura em 4<sup>a</sup> passagem de hASC previamente isoladas: (A) hASC cultivadas em placa de cultura. Aumento: 100X. (B) Aumento: 300X. As setas apontam alguns cristais de formazan.

#### 4.I.3. Avaliação da produção de fosfatase alcalina

A fosfatase alcalina é uma enzima presente em células indiferenciadas e por isso, é utilizada como um marcador de células-tronco (O'connor *et al.*, 2008). Sendo assim, o ensaio de produção de fosfatase alcalina foi realizado para verificar se as células previamente isoladas e cultivadas até a 4<sup>a</sup> passagem, mantinham os níveis de produção dessa enzima.

No ensaio de produção da fosfatase alcalina, o precipitado púrpuro é formado quando a enzima cliva o grupamento fosfato presente no BCIP, produzindo um próton que reduz o NBT. Com auxílio do microscópio óptico foi possível observar a presença de precipitado púrpuro nas células cultivadas já na 4ª passagem (Figura 6), o que mostra que a cultura de células analisadas era constituída de células-tronco, produtoras de fosfatase alcalina.



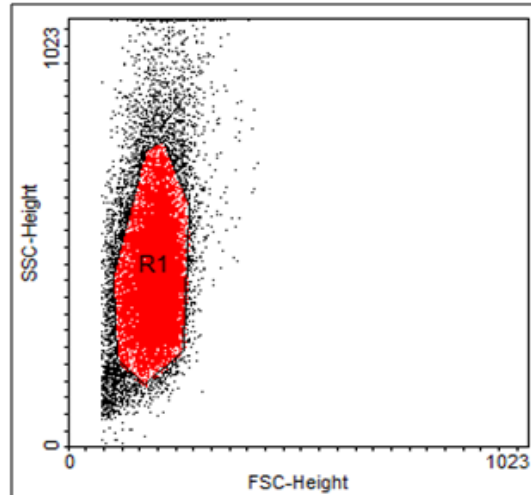
200x

**Figura 6: Verificação da produção de fosfatase alcalina pelas hASC, na 4ª passagem de cultivo:** A coloração púrpura é resultado da atividade da fosfatase alcalina produzida pelas células. Aumento: 200X.

#### **4.I.4. Caracterização fenotípica por citometria de fluxo**

Uma população de células pode ser definida pelos tipos de antígenos expressos na membrana plasmática. Seguindo isso, com o intuito de avaliar se os marcadores celulares das hASC em cultivo eram marcadores característicos de células-tronco, foi realizada a análise fenotípica das células na 4ª passagem, obtidas a partir do processamento enzimático do tecido adiposo. As células foram incubadas com anticorpos específicos para os seguintes marcadores: CD29, CD34, CD44, CD45, CD73, HLA-DR, HLA-ABC.

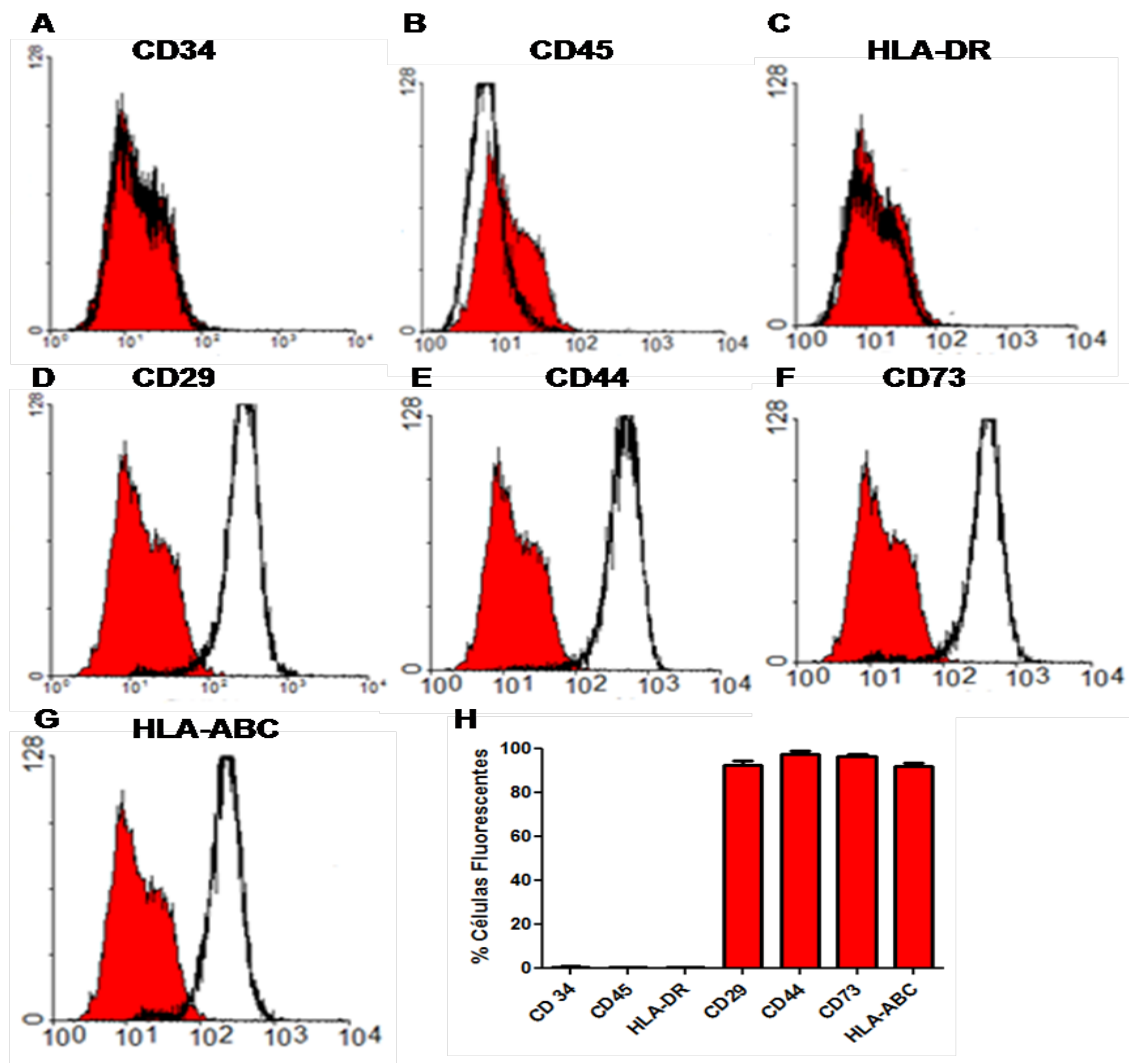
A população escolhida para a análise dos marcadores de superfície foi determinada a partir de um gráfico de tamanho *versus* granulosidade, obtido de células que não foram colocadas em contato com nenhum anticorpo, ou seja, sem nenhum tipo de marcação (Figura 7).



**Figura 7:** Gráfico de tamanho *versus* granulosidade da população de hASC: R1: população escolhida para análise dos marcadores.

A análise dos histogramas demonstrou que: aproximadamente 92% das células expressavam CD29, 97% expressavam CD44, 96% expressavam CD73 e 92% expressavam HLA-ABC. Já o CD34, CD45 e HLA-DR estavam sendo expressos em menos de 1% das células (Figura 8).





**Figura 8: Análise fenotípica das hASC através de citometria de fluxo:** Os histogramas apresentam o número de eventos *versus* intensidade de fluorescência. A curva vermelha é o controle negativo da fluorescência, a curva em preto, apresenta a população de células avaliada para um marcador específico e o seu deslocamento para direita indica a ocorrência da marcação. (A) Avaliação da presença do marcador CD34; (B) Avaliação da presença do marcador CD45; (C) Avaliação da presença do marcador HLA-DR; (D) Avaliação da presença do marcador CD29; (E) Avaliação da ausência do marcador CD44; (F) Avaliação da ausência do marcador CD73; (G) Avaliação da ausência do marcador HLA-ABC. (H) Representação gráfica do percentual de células fluorescentes dentro da população R1.



Os resultados obtidos na caracterização fenotípica corroboram com o perfil fenotípico proposto por Zuk (2001), Aust (2004) e Wagner (2005) e é o aceito pela Sociedade Internacional de Terapia Celular.

Ao final do experimento, concluímos que o isolamento enzimático de células-tronco de tecido adiposo e o cultivo destas até a 4ª passagem, possibilitaram a obtenção de uma cultura homogênea composta de células fusiformes e aderentes à superfície plástica, viáveis e produtoras de fosfatase alcalina. Além disso, as células expressam marcadores característicos de células-tronco mesenquimais (CD29, CD44, CD73) e, por outro lado, não expressam marcadores de células-tronco hematopoiéticas (CD34, CD45 e HLA-ABC).

## **4.II. Indução de hASC à diferenciação endotelial**

### **4.II.1. Diferenciação endotelial**

Com o objetivo de obtenção de células endoteliais a partir das hASC previamente isoladas e caracterizadas, a indução à diferenciação endotelial se fez através da adição dos fatores VEGF e bFGF, os quais têm sido utilizados como indutores de diferenciação endotelial (Cao *et al.*, 2005). A utilização desses fatores na indução de células não diferenciadas em células endoteliais já foi demonstrada por diversos autores utilizando células-tronco humanas de diversas fontes como medula óssea (Oswald *et al.*, 2004), tecido adiposo (Cao *et al.*, 2005), líquido amniótico (Zhang *et al.*, 2009) e sangue periférico (Ria *et al.*, 2008).

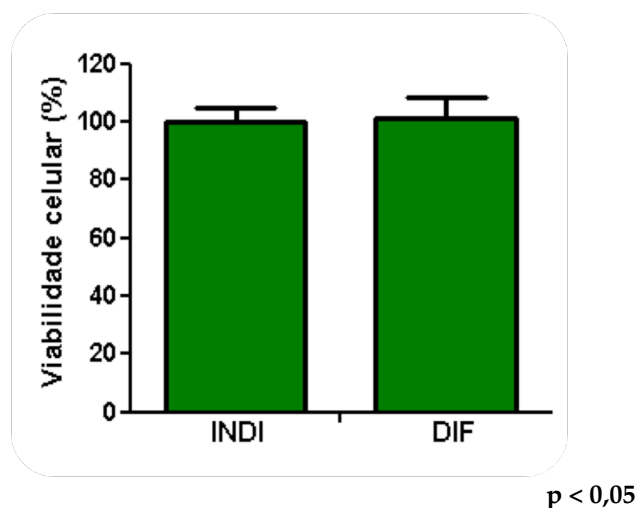
### **4.II.2. Avaliação da viabilidade e proliferação celular após a diferenciação endotelial**

É conhecido que as capacidades de proliferação e diferenciação estão mutuamente relacionadas. Populações de células-tronco possuem alto potencial proliferativo que gradualmente diminui à medida que as células tornam-se comprometidas com o processo de diferenciação. Entretanto, há um estágio intermediário, na maioria dos tecidos, no qual a proliferação e diferenciação estão equilibradas. Nesse estágio encontram-se as células precursoras ou progenitoras. No entanto, a capacidade de auto-renovação é exclusiva das células-tronco e é perdida à medida que essas células se comprometem com uma linhagem celular (Mountford, 2008).

Neste contexto, com o objetivo de avaliar a viabilidade das células-tronco induzidas à diferenciação e a capacidade proliferativa destas, realizou-se o ensaio de MTT, após o processo de diferenciação.

Com os resultados obtidos, observou-se que após os 14 dias de indução à diferenciação, não houve uma redução estatisticamente significativa na proliferação das hASC cultivadas em meio de cultivo para diferenciação endotelial, em relação às células cultivadas em meio de cultivo basal. Possivelmente, isto se deve ao fato de que talvez o tempo de indução à diferenciação não tenha sido ainda suficiente para acarretar no total comprometimento das hASC com a diferenciação, neste caso, a diferenciação em tecido endotelial.

Os Cristais de Formazan foram observados e posteriormente foram solubilizados com SDS-HCl 10% e foi feita a leitura de absorbância a 595 nm. Os dados de absorção foram comparados com os dados obtidos das células antes de serem induzidas à diferenciação e foi possível observar que, após 14 dias de indução à diferenciação, as células ainda mantiveram-se viáveis (Figura 9).



**Figura 9:** Representação gráfica da quantidade de células viáveis na cultura de hASC e após estas serem induzidas à diferenciação endotelial por 14 dias: Em ambas as condições, as culturas apresentaram viabilidade de aproximadamente 100%, não havendo, assim, diferença estatisticamente significativa entre elas. Eixo y: Porcentagem de viabilidade celular. Eixo x: INDI (amostra de células indiferenciadas); DIF (amostra de células diferenciadas).

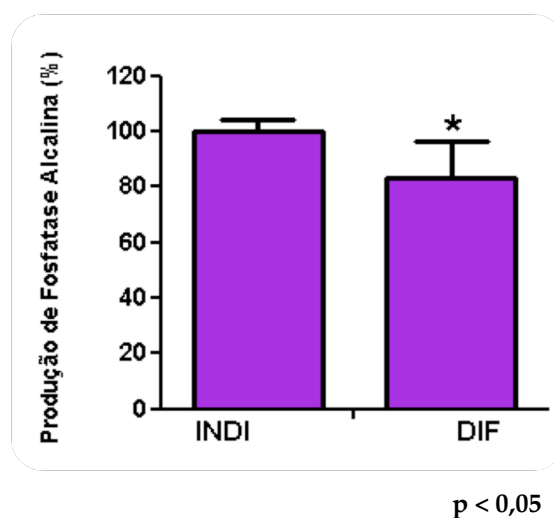
#### **4.II.3. Avaliação da produção da fosfatase alcalina após a diferenciação endotelial**

A fosfatase alcalina é uma enzima presente em células-tronco embrionárias e adultas como um marcador do estágio de indiferenciação (O'connor *et al.*, 2008). No entanto, no indivíduo adulto, existem quatro isoformas dessa enzima, específicas para o fígado, osso, placenta e intestino, mas não para células endoteliais (Moss, 1992). A redução da quantidade de enzima fosfatase alcalina foi demonstrada por Breyner e colaboradores em 2009 durante a diferenciação condrogênica. Sendo assim, essa redução pode ser considerada um indicativo da alteração fenotípica sofrida pelas células quando cultivadas em meio indutor.

Nesse contexto, a produção da fosfatase alcalina foi avaliada após o processo de diferenciação e, com base nos dados obtidos, pôde-se inferir que

houve redução na produção da enzima em hASC cultivadas em meio de diferenciação, após 14 dias de cultivo.

As células induzidas à diferenciação após 14 dias foram avaliadas quanto à produção de fosfatase alcalina, em comparação com as hASC. Os cristais de cor púrpura foram observados e posteriormente foram solubilizados com SDS-HCl 10% e foi feita a leitura de absorbância a 595 nm. Os dados de absorção foram comparados com os dados obtidos das células antes de serem diferenciadas.

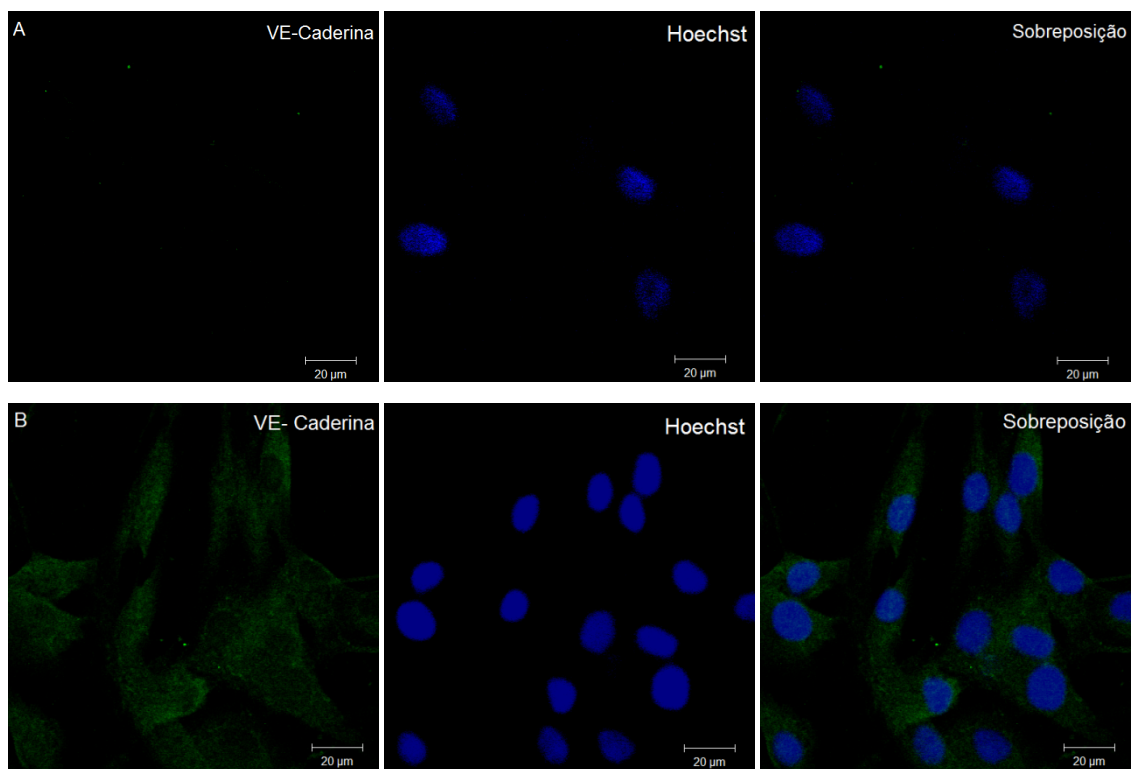


**Figura 10: Representação gráfica da produção de fosfatase alcalina na cultura de hASC e após estas serem induzidas à diferenciação endotelial por 14 dias:** Observa-se que houve redução estatisticamente significativa de cerca de 20% quando as células passaram para um estágio já comprometido com a diferenciação, em comparação com a condição inicial de células tronco. Eixo y: Porcentagem de produção de fosfatase alcalina. Eixo x: INDI (amostra de células indiferenciadas); DIF (amostra de células diferenciadas).

#### 4.II.4. Análise de marcadores de células endoteliais após a diferenciação endotelial através de imunofluorescência

Para determinar se após o processo de diferenciação as hASC passaram a expressar marcadores de células endoteliais, foi realizado o ensaio de imunofluorescência, utilizando-se anticorpos específicos para as proteínas vWF e VE-caderina. Esse ensaio foi realizado com células cultivadas em meio de cultivo basal e células cultivadas em meio de diferenciação endotelial após 14 dias de indução.

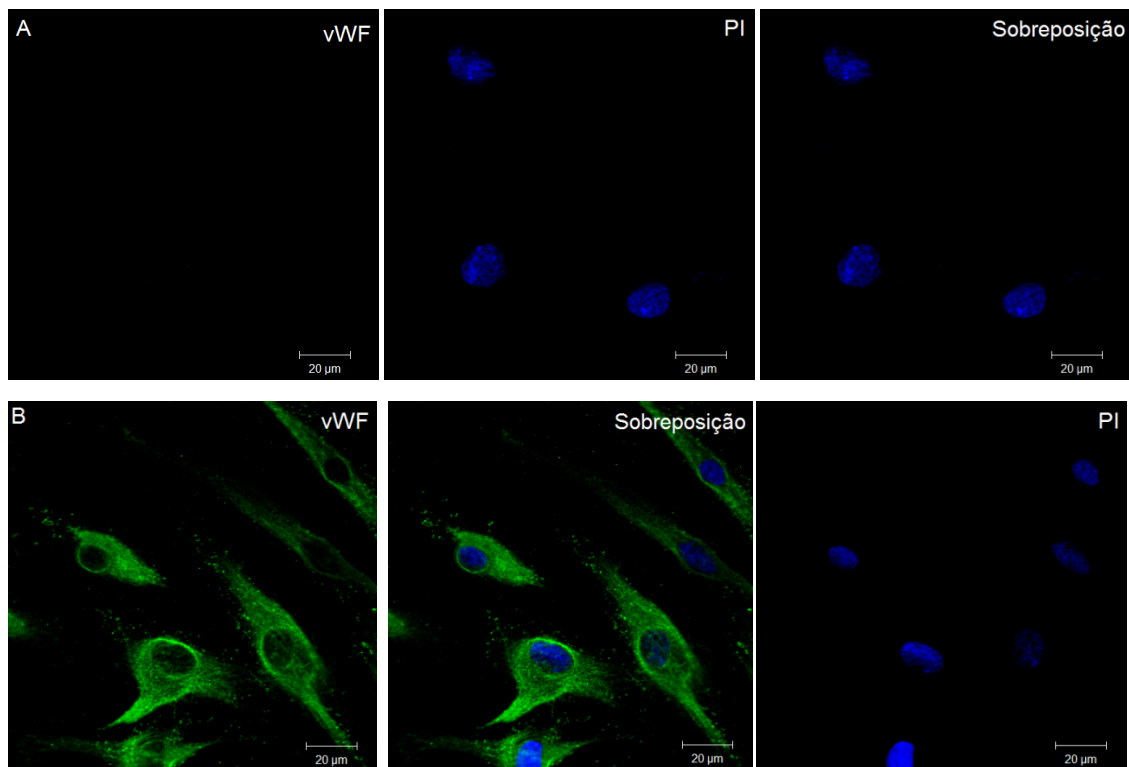
Verificou-se, através de microscopia confocal, que as células cultivadas em meio de cultivo basal não apresentaram marcação para o vWF e a VE-Caderina. Já as células cultivadas em meio de diferenciação após 14 dias expressavam ambas as proteínas (Figuras 10 e 11).



**Figura 10:** Análise de imunofluorescência para a proteína VE-Caderina. (A) hASC cultivadas em meio de

**Figura 11:** Análise de imunofluorescência para a proteína VE-Caderina: (A) hASC cultivadas em meio de cultivo basal. (B) hASC cultivadas em meio de diferenciação endotelial durante 14 dias.

A VE-caderina é uma glicoproteína de superfície celular constitutivamente expressa no endotélio vascular. Essa glicoproteína promove a adesão entre células endoteliais através de interações  $\text{Ca}^{2+}$ -dependentes e regula a permeabilidade vascular (Menon *et al.*, 2006; Vestweber, 2008). A inativação do gene codificador de VE-Caderina provoca alterações graves no desenvolvimento vascular. Em animais mutantes, as células endoteliais são capazes de formar um plexo vascular primitivo e na ausência, a vasculatura não sofre remodelação e os vasos tendem a regredir até a falência, levando à morte dos embriões (Gory-Fauré *et al.*, 1999). Sendo assim, a presença da VE-Caderina em células endoteliais é essencial para o contato entre as células e para a formação de uma rede vascular madura e estável.



**Figura 12: Análise de imunofluorescência para a proteína vWF:** (A) hASC cultivadas em meio de cultura basal. (B) hASC cultivadas em meio de diferenciação endotelial após 14 dias.

A molécula vWF é uma glicoproteína plasmática, sintetizada por células endoteliais e importante na manutenção da hemostasia, atuando na adesão de plaquetas à parede de vasos que sofreram lesão e sendo a proteína transportadora e estabilizadora do fator VIII, essencial no processo de coagulação. Além disso, o vWF pode auxiliar no ancoramento de células endoteliais à membrana extracelular. Defeitos quali ou quantitativos na expressão do gene codificador dessa proteína, podem levar à doença hemorrágica grave (De Wit e Van Mourik, 2001).

Diante disso e, uma vez que VE-caderina e vWF são amplamente utilizados como marcadores de diferenciação endotelial, os resultados obtidos demonstram que houve o comprometimento das hASC para a diferenciação endotelial, já que ambas as proteínas foram expressas. (Oswald *et al.*, 2004; Kuwana *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2009).

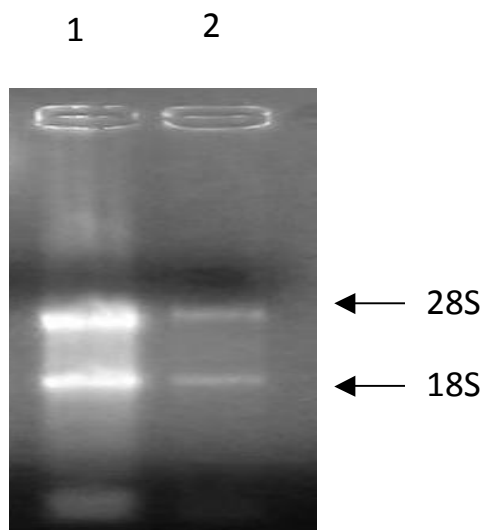
#### **4.III. Identificação de genes diferencialmente expressos após a diferenciação endotelial - RaSH**

##### **4.III.1. Extração de RNA e análise da integridade e pureza**

Após o isolamento e a indução das hASC à diferenciação endotelial durante 14 dias e a fim de identificar genes expressos exclusivamente nas células já diferenciadas, fez-se uso da técnica de RaSH, a qual foi desenvolvida em 2001, por Jiang e colaboradores, com o objetivo de identificar genes diferencialmente expressos em amostras submetidas à diferentes condições.

Para tanto, como um primeiro passo, foi construída uma biblioteca subtrativa, contendo amostra de material genético de ambas as linhagens (indiferenciada e diferenciada). Para a construção da biblioteca subtrativa, primeiramente, realizou-se a extração do RNA total de ambos os cultivos celulares: não submetido à diferenciação e submetido à diferenciação, fazendo

uso dos indutores VEGF e bFGF. Após a extração do RNA, foi realizada a análise das condições das amostras e, com base na imagem do gel (Figura 13), observamos a integridade do RNA extraído das células indiferenciadas e diferenciadas.

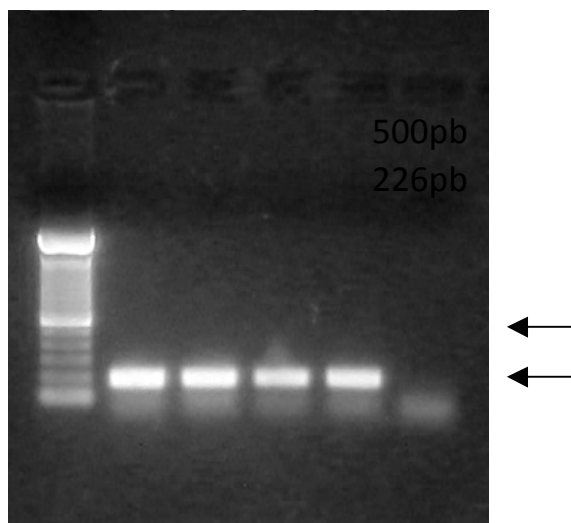


**Figura 13: Análise do RNA extraído das células indiferenciadas e diferenciadas:** Eletroforese em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio, mostrando as três bandas referentes a 5S, 18S e 28S. Coluna 1, RNA total de cultura de células indiferenciadas; coluna 2, RNA total de cultura de células induzidas à diferenciação endotelial após 14 dias.

#### 4.III.2. Síntese de cDNA fita dupla e comprovação por PCR

Posteriormente à extração do RNA e à análise da integridade do mesmo, 20 µg do RNA total extraído foram utilizados para a síntese de cDNA. A síntese do cDNA foi comprovada através de amplificação por PCR utilizando-se oligonucleotídeos específicos para o gene constitutivo GAPDH (Figura 14).





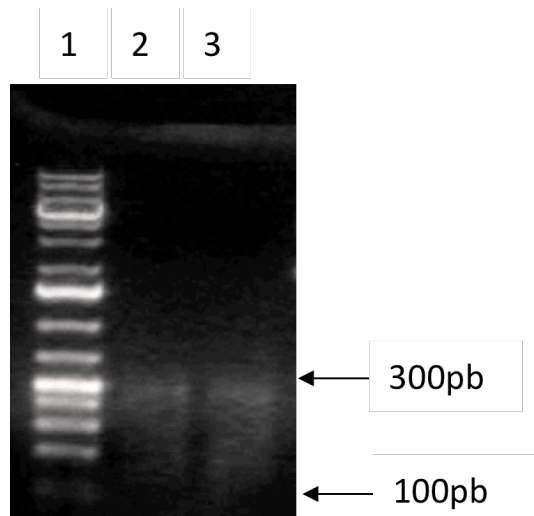
**Figura 14: Comprovação da síntese de cDNA através de PCR:** Eletroforese em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio, mostrando a banda referente ao amplicon de 226pb, específico para GAPDH. Coluna 1, Marcador de peso molecular: 1 Kb *Plus DNA Ladder* (Invitrogen); Coluna 2, Controle positivo da reação de síntese de cDNA, utilizando-se como molde, cDNA de hASC, com oligonucleotídeos específicos para GAPDH; Coluna 3, Controle positivo da reação de PCR; Coluna 4, Produto da amplificação do cDNA de células indiferenciadas; Coluna 5, Produto da amplificação do cDNA de células diferenciadas; Coluna 6, Controle negativo da reação de PCR.

#### 4.III.3. Digestão enzimática das seqüências de cDNA pela endonuclease de restrição *Mbo I*

Após a síntese do cDNA, referente às duas linhagens (indiferenciada e diferenciada), estes foram submetidos à digestão enzimática com a endonuclease de restrição *Mbo I*. Para visualizar os fragmentos originados, ambas as amostras foram resolvidas em gel de agarose (Figura 15).

Pode-se observar pela imagem do gel, que após a fragmentação do cDNA, houve a presença de uma arraste variando de 100 a 300 pb, perfil este já esperado, uma vez que a enzima *Mbo I*, reconhece uma seqüência nucleotídica

composta de apenas quatro pares de base. Sendo assim, esta enzima, tendo alta frequência de corte, tem a probabilidade de reconhecer um sítio a cada 256 pares de base.



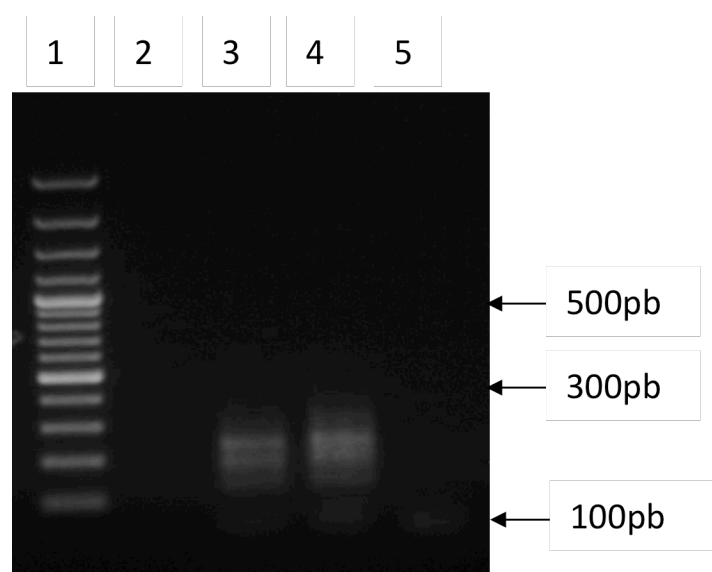
**Figura 15: Visualização da digestão das amostras de células indiferenciadas e diferenciadas após 14 dias, com a enzima de restrição *Mbo* I:** Eletroforese em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio, mostrando um arraste correspondente aos fragmentos gerados após digestão enzimática. Coluna 1, Marcador de peso molecular: 1 Kb *Plus DNA Ladder* (Invitrogen); Coluna 2, Amostra de células indiferenciada; Coluna 3, Amostra de célula diferenciada.

#### 4.III.4. Ligação dos adaptadores aos fragmentos gerados

Logo após a digestão do cDNA proveniente das células indiferenciadas e diferenciadas, os mesmos foram ligados a dois adaptadores (XDPN-12 e XDPN-14), com o intuito de inserir na amostra que seria definida como *tester*, um sítio de corte para outra enzima que seria posteriormente utilizada. Além disso, a ligação dos adaptadores serviria também para a realização de amplificação e aumento da quantidade de amostra de ambas as células.

A ligação foi confirmada através de amplificação por PCR com o oligonucleotídeo específico (XDPN-18), o qual apresenta complementaridade para ambos os adaptadores.

Foi observada a ocorrência da ligação dos adaptadores, uma vez que, após a reação de PCR com o oligonucleotídeo específico (XDPN-18), houve uma intensificação das bandas correspondentes aos fragmentos gerados, uma vez que pela imagem do gel, observamos que houve intensificação no arraste variando de 100 a 300 pares de base. Como controle, realizou-se a amplificação de uma amostra de cDNA de células indiferenciadas que não foram submetidas à reação de ligação aos adaptadores e observou-se uma menor intensidade das bandas.



**Figura 16: Comprovação da ligação dos adaptadores através da amplificação dos fragmentos com oligonucleotídeo específico (XDPN-18) para os adaptadores (XDPN-12 e XDPN-14):** Eletroforese em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio, mostrando arrastes referentes às amostras de cDNA fragmentados, ligados a adaptadores e amplificados. Coluna 1: Marcador de peso molecular: 1 Kb *Plus DNA Ladder* (Invitrogen); Coluna 2, Amostra de fragmentos de cDNA de células indiferenciadas que não foram submetidas à reação de ligação aos adaptadores; Coluna 3, Amostra de fragmentos de cDNA de células indiferenciadas ligadas aos adaptadores; Coluna 4, Amostra de fragmentos de células diferenciadas ligadas aos adaptadores; Coluna 5, Controle negativo da reação.

#### 4.III.5. Hibridização subtrativa

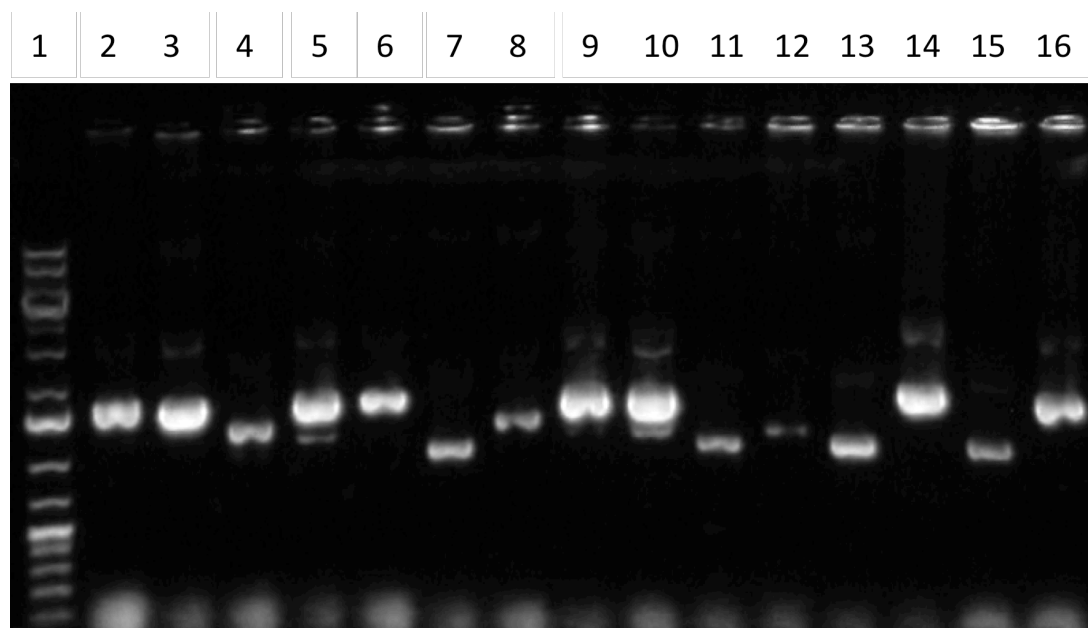
Para a realização da Hibridização Subtrativa Rápida, o protocolo original da metodologia de RaSH, descrito por Jiang e colaboradores em 2000, faz uso de 100 ng de amostra *tester* e 3 µg de amostra *driver* para a subtração, proporcionando, assim, um excesso de 30 vezes mais de amostra *driver*, dificultando a obtenção de falso-positivo, já que a maioria das amostras obtidas seria contida de *driver-driver* e o que se quer identificar, são amostras contendo fragmentos *tester-tester*. Neste contexto, e com o intuito de impor maior estringência à subtração, neste trabalho foram utilizados 5 µg de amostra *driver*, para 100 ng de *tester*. Assim, cada molécula *tester* teria, portanto, 50 vezes mais chances de se hibridizar com moléculas *driver* do que com outras moléculas *tester*. Com isso, o que se pretendia era diminuir a geração de falso-positivos e obter genes que estariam presentes exclusivamente na amostra *tester*.

Esta mistura de hibridização foi então ligada ao vetor *pBlueScript-II-SK* também previamente digerido com a enzima *Xho I*, e os produtos de ligação foram utilizados para transformar células eletrocompetentes de *E. coli* DH5α. A seleção de colônias de *E. coli* transformadas com esses plasmídeos foi baseada no Sistema *LacZ*.

#### 4.III.6. Extração do DNA plasmidiano das colônias selecionadas

A visualização das colônias foi feita com aproximadamente 24 horas após a transformação. Foram obtidos 128 clones, os quais foram isolados e submetidos à extração do DNA plasmidiano contendo fragmentos de amostra de célula diferenciada (*tester-tester*). Na Figura 17 encontram-se algumas amostras de DNA plasmidiano de clones previamente selecionados. Pela análise da resolução eletroforética das amostras, foi possível observar que a

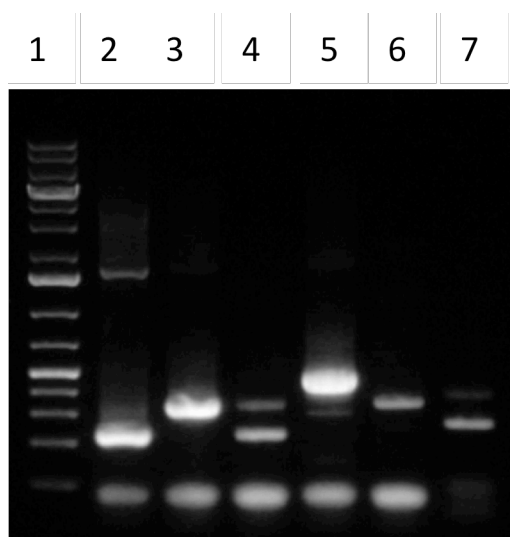
extração dos plasmídeos foi bem sucedida, sendo conservada a integridade de cada um.



**Figura 17: Avaliação da integridade do DNA plasmidiano extraído de alguns clones selecionados:** Eletroforese em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio contendo amostras referentes a DNA plasmidiano de alguns clones selecionados após a hibridização. Coluna 1: Marcador de peso molecular: 1 Kb *Plus DNA Ladder* (Invitrogen). Colunas de 2 a 16: DNA plasmidiano das amostras (1 a 15) selecionadas após a transformação de bactérias eletrocompetentes.

#### 4.III.7. Amplificação das sequências ligadas ao plasmídeo

Para verificar se as amostras de DNA plasmidiano extraídas das colônias selecionadas continham inserto, foi realizada uma reação de PCR, utilizando-se os oligonucleotídeos M13 *Forward* e *Reverse*. Como controle positivo foi utilizado um plasmídeo íntegro, ou seja, sem inserto. Após a realização da PCR, os fragmentos amplificados foram resolvidos por eletroforese, em gel de agarose, e foi possível observar a presença de insertos contendo pesos moleculares variados (Figura 18).



**Figura 18: Análise do produto de amplificação por PCR de algumas amostras:** Eletroforese em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio contendo amostras 4, 12, 14, 18, 20, 27. Coluna 1: Marcador de peso molecular: 1 Kb *Plus DNA Ladder*; Colunas de 2 a 7, Amostras 4, 12, 14, 18, 20, 27 respectivamente.

#### 4.III.8. Análise das seqüências geradas

Para a análise das seqüências relativas aos fragmentos contidos nos plasmídeos de clones selecionados, o presente trabalho fez uso de um sistema *in silico*, a qual possibilita a identificação de seqüências repetitivas e de seqüências contaminantes de outros organismos, além de possibilitar a identificação de similaridade do produto sequenciado com seqüências depositadas em bancos de dados públicos, revelando sua provável função.

Sendo assim, após amplificação dos insertos contidos nos clones previamente isolados, as amostras foram submetidas ao seqüenciamento e em seguida à análise de similaridade a bancos de dados públicos de seqüências completas de mRNA (*RefSeq*) através do BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) e alguns genes foram identificados. (Tabela 6).

Tabela 6: Genes identificados pela técnica de RaSH

Clone	Gene ( <i>GenBank</i> )	N. de acesso ( <i>GenBank</i> )	Identidade (%)	e-value
1	Embryonic lethal, abnormal vision (Hu antigen R) (ELAVL1)	NM_001419.2	95	4e-40
1	Laminina (LAMB2)	NM_002292.3	97	3e-44
1	Sterol-C5-desaturase (ERG3 delta-5-desaturase) SC5DL	NM_001024956.2	99	3e-50
1	Vascular endothelial growth factor A (VEGFA)	NM_001025370.1	90	4e-28
1	Histidyl-tRNA synthetase (HARS)	NM_002109.3	96	1e-51
1	18S ribosomal RNA	NR_003286.1	96	1e-51
121	28S ribosomal RNA	NR_003287.1	> 95	

Das 128 amostras submetidas ao sequenciamento, 121 amostras corresponderam a sequências gênicas codificadores de “28S ribossomal RNA”. A grande quantidade desse gene pode ter sido consequência de possível ocorrência de contaminação da amostra sujeitada à síntese de cDNA. O RNA total extraído foi submetido à síntese do cDNA utilizando-se oligonucleotídeo Oligo d(T)<sub>18</sub>, o qual se hibridizada com a cauda poliA presente no mRNA. No entanto, esse oligonucleotídeo pode apresentar similaridade, mesmo que parcial, com RNAs presentes na amostra extraída, e, desta maneira, levar a síntese de cDNA referente a esses RNAs. Desta maneira, a amostra é contaminada, ficando composta não somente de cDNA de mRNA, como também cDNA referente à outros RNA. Além disso, têm-se também a hipótese de que, com a extração de RNA total, pode ter ocorrido extração de RNA com cauda poliA nuclear e citoplasmáticos, podendo ter ocorrido o isolamento de alguns mRNA associados a ribossomos (polissomos). Se preparações de polissomos forem utilizadas, além de mRNA, existem também partículas ribonucleoprotéicas no citosol que também contêm mRNA com cauda poliA, mas que não são traduzidas. Esse RNA pode ser estocado para uso em outro

momento. Portanto, o isolamento do RNA total não corresponde somente à população de mRNAs ativos, podendo ser, dessa forma, um contaminante da amostra (Lewin, 2008).

Das amostras correspondentes a RNA ribossomais, foi obtida uma sequência similar ao gene codificador de “18S Ribossomal RNA”. Seguindo as mesmas hipóteses propostas para a ocorrência de similaridade para “28S ribossomal”, também este (18S) pode ser um contaminante da amostra.

Os outros seis genes identificados apresentaram similaridade a genes com função já descrita, com mais de 90% de identidade.

Um destes genes identificados pela técnica RaSH, foi o gene codificador de LAMB-2, que é uma proteína pertencente à família das lamininas, as quais funcionam como componentes estruturais e são essenciais para a morfogênese, mas, além disso interagem com receptores da superfície celular como integrinas. Por virtude de suas interações, essas moléculas iniciam eventos intracelulares de sinalização que regulam a organização e diferenciação celular (Patrick *et al.*, 2000). Porém, ainda não foi descrita nenhuma relação deste gene e/ou desta proteína com a linhagem endotelial especificamente.

Outro gene identificado pelas análises de similaridade, foi o gene codificador de Histidil-tRNA-sintetase (HARS), proteína responsável pelo correto posicionamento de histidina ao respectivo tRNA (Freist *et al.*, 1998). Assim como para LAMB-2, não foi descrita nenhuma relação deste gene especificamente para células endoteliais ou algum processo relacionado a elas.

Seguindo as análises de similaridade, foi encontrado também o gene codificador da proteína SC5DL, enzima que participa da biossíntese do colesterol (esterol-C5-desaturase) e catalisa a conversão de latosterol em 7-dehidrocolesterol (Krakowiak *et al.*, 2003). Ainda não foi demonstrada nenhuma associação da expressão deste gene com células endoteliais ou com o processo de diferenciação celular nesta linhagem.



Das sequências obtidas e analisadas, uma delas se repetiu e foi identificada em duas amostras (ELAVL1).

Interações entre proteínas ligantes de RNA e genes não são bem compreendidos, especialmente na regulação da angiogênese. ELAVL1 é uma destas proteínas que se liga a regiões ricas em AU de mRNAs lábeis, facilitando a sua tradução em proteína e tem sido a hipótese de ser um gene que influencia a manutenção de tumores. Níveis elevados de ELAVL1 no citoplasma correlacionam-se diretamente com a invasão crescente e com o mau prognóstico para muitos cânceres, incluindo os de mama. Isto, porque ELAVL1 controla a expressão de vários genes envolvidos na angiogênese, incluindo VEGF (Matthew *et al.*, 2010).

Um aspecto importante da biologia vascular é a identificação de genes reguladores de condições de *stress*, os quais desempenham papéis críticos na mediação da resposta inflamatória. Em um estudo realizado por Won Jong e colaboradores, em 2009, foi reportado que a expressão do gene codificador da proteína ELAVL1 em células endoteliais da veia umbilical humana é regulada pela tensão de cisalhamento e tratamento com estatina. Esse gene, por sua vez, regula outros genes sensíveis ao *stress*, como óxido nítrico sintase endotelial (eNOS do inglês *endothelial Nitric Oxide Synthases*) e a proteína morfogenética óssea 4 (BMP-4 do inglês *Bone Morphogenetic Protein - 4*) (Won Jong Rhee *et al.*, 2009). Em outros trabalhos, verificou-se que ELAVL1 aumenta a estabilidade de mRNA de Receptor Semelhante a Toll 4 (TLR4) nas células do músculo liso vascular (VSMC do inglês *Vascular Smooth Muscle Cell*), além de regular a estabilidade do Fator de crescimento endotelial vascular (c-fos) (Pullmann R Jr *et al.*, 2005; Lin *et al.*, 2006).

Neste contexto, com relação à esse gene, pode-se inferir que a indução à diferenciação endotelial ocorreu de forma satisfatória, já que ELAVL1 é um gene controla a expressão de vários genes envolvidos na angiogênese.

Outro gene identificado pela análise do seqüenciamento foi gene codificador do Fator de crescimento vascular endotelial A (VEGF do inglês *Vascular Endothelial Growth Factor A*). A molécula codificada por esse gene é uma glicoproteína homodimérica com peso molecular de 45 kDa. A família do VEGF inclui VEGF-A (normalmente referido apenas como VEGF), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D. O gene codificador dessa proteína tem sido extensivamente estudado, já que as proteínas homodiméricas acima citadas são importantes proteínas de sinalização, envolvidas na vasculogênese e angiogênese. (Hanahan e Folkman, 1996). O processo de angiogênese é fundamental para o desenvolvimento e progressão do câncer e o aumento da expressão de VEGF também tem sido associado com processos metastáticos. A aprovação recente de agentes anti-angiogênicos para o tratamento de câncer de mama, cólon, pulmão e câncer de rim demonstra o valor clínico dessa modalidade terapêutica. Em 2010 um estudo demonstrou que o resveratrol, substância usada para tratamento de câncer, causou proliferação de células endoteliais em cultura em monocamada, mas agiu como um agente anti-angiogênico em um modelo tridimensional de co-cultura de angiogênese do tumor, provavelmente através de regulação negativa de VEGF (Trapp *et al.*, 2010).

Com base nesse gene identificado após a indução à diferenciação endotelial e em suas funções relacionadas a processos angiogênicos, pode-se presumir a ocorrência do processo de diferenciação.

#### **4.IV. Validação dos genes encontrados por PCR em Tempo Real**

A técnica de RaSH foi utilizada em cerca de uma dezena de trabalhos somente, desde seu desenvolvimento. Assim, ainda não há informações suficientes sobre a eficiência desta metodologia. Mesmo realizando-se a hibridização subtrativa em condições altamente estridentes e após a eliminação de genes presentes nas bibliotecas controles através da análise *in*

*silico*, os genes identificados pela técnica RaSH ainda podem corresponder a falso-positivos. De acordo com os autores que descreveram a técnica (Jiang H *et al.*, 2000), apenas 23 (~33%) dos 70 clones que foram gerados pelo uso da mesma e analisados por *Northern Reverso* apresentaram diferença de expressão superior a 1,8 vezes.

Frente a isso, torna-se clara a necessidade de validação experimental dos resultados obtidos pelo RaSH por outra metodologia. Neste contexto, neste trabalho fez-se uso da técnica de PCR em Tempo Real para a validação experimental de genes diferencialmente expressos selecionados através da técnica de RaSH.

Assim, para validação experimental foram selecionados genes expressos exclusivamente nas células induzidas à diferenciação endotelial, ou seja, os genes identificados através dos experimentos nos quais o cDNA destas células diferenciadas foi utilizado como *tester*.

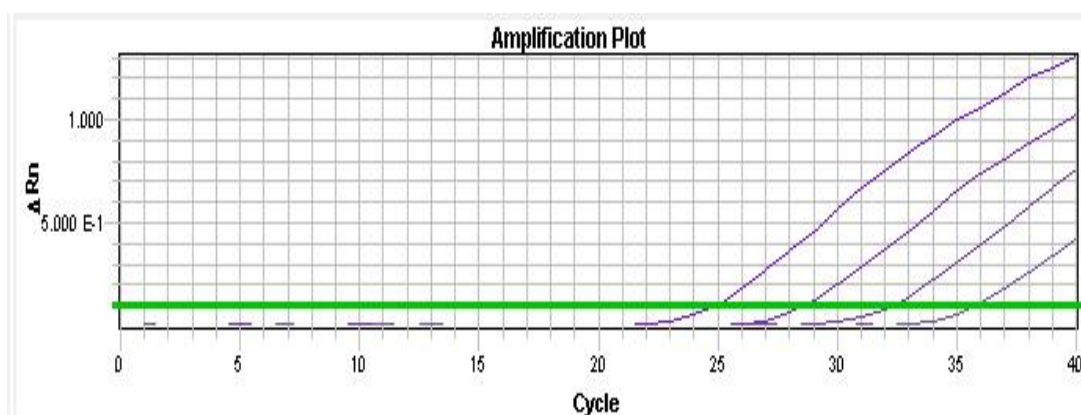
#### **4.IV.1. Teste de eficiência dos oligonucleotídeos**

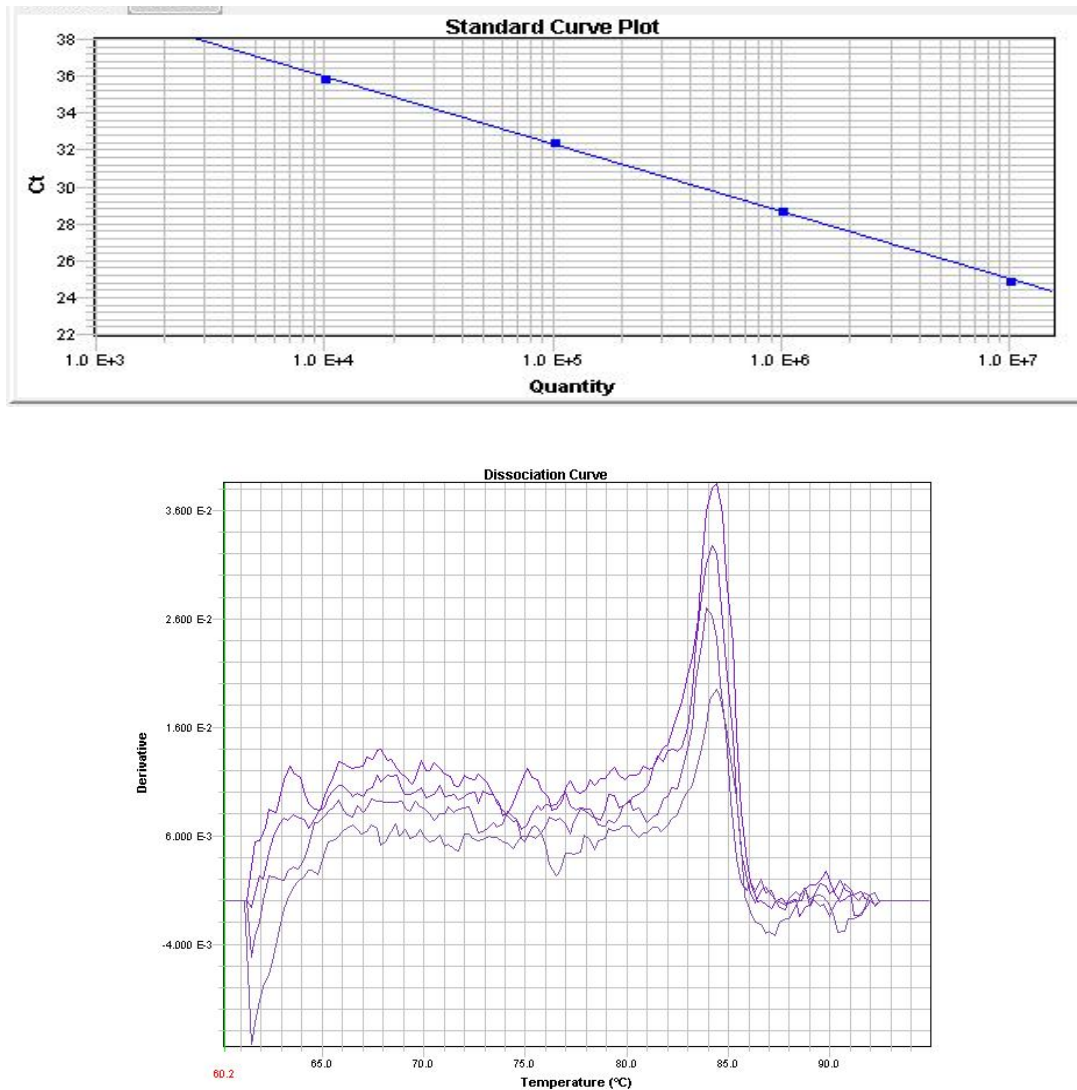
Os oligonucleotídeos foram desenhados com o auxílio do programa *PrimerExpress* versão 3.0 (Applied BioSystems) para cada candidato, como descrito em Material e Métodos, item 3.3.5.1. O método de detecção escolhido foi o sistema *SYBR® Green* (Applied BioSystems), o qual baseia-se na fluorescência emitida pelo corante ao intercalar-se em DNA dupla fita, à medida em que ocorre a amplificação do DNA. Devido à sua inespecificidade, as reações utilizando *SYBR® Green* foram devidamente padronizadas para cada gene candidato, a fim de se reduzir a ocorrência de amplificação inespecífica e a formação de dímeros de oligonucleotídeos.

A concentração ideal de oligonucleotídeos para as reações de PCR em Tempo Real foi obtida através de reações utilizando-se diferentes concentrações de oligonucleotídeos e concentração fixa de cDNA. Foi escolhida a menor

concentração que conferisse maior fluorescência, sem a formação de dímeros e variação no Ct. Pelo fato de ter sido escolhida a quantificação relativa entre as amostras, a eficiência de amplificação dos oligonucleotídeos teve de ser calculada. Assim a eficiência foi calculada realizando-se reações utilizando quatro diluições seriadas de cDNA como molde (1:1, 1:10, 1:100 e 1:1000) (Figura 19A). A partir disso, foi construída uma curva-padrão, onde a média dos Ct obtidos em cada concentração variava em função do logaritmo da concentração de cDNA. O coeficiente angular da reta obtida (a, em  $y=ax+b$ ) (Figura 19B) foi utilizado para cálculo da eficiência de amplificação dos oligonucleotídeos, obtida através da seguinte fórmula:  $ef = 10^{-1/a}$  (sendo ef = eficiência, a = coeficiente angular da reta). Foram aceitos valores de eficiência entre 1,70 e 2,30.

Na Figura 19C, estão representadas as curvas de dissociação geradas com o par de oligonucleotídeos utilizados para amplificação do gene codificador de VEGFA. É possível observar a formação de picos máximos de fluorescência próximos, relativos à temperatura média de hibridização do produto amplificado.





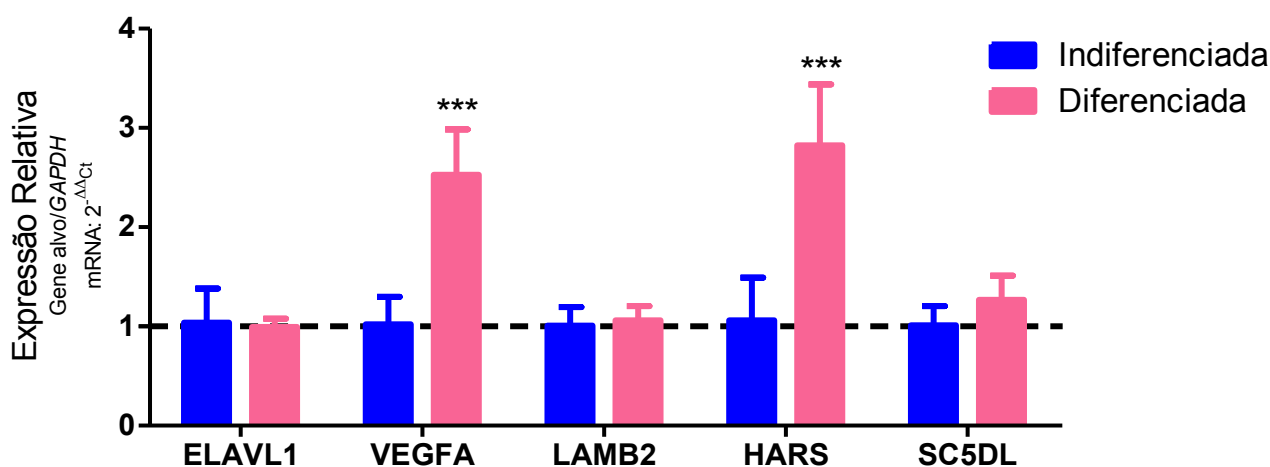
**Figura 19 – Exemplo de padronização das reações de PCR em tempo real:** 19A: Resultado das ampliações com emprego dos oligonucleotídeos para o gene codificadores de VEGFA. É possível observar as curvas de amplificação referentes a cada diluição de cDNA testada. É notável a relação inversa existente entre a quantidade de cDNA empregada na reação e o valor alcançado de Ct. 19B: Regressão linear baseada nas médias dos Cts para ampliações relativas ao gene VEGFA. No gráfico, as unidades do eixo x representam o logaritmo de diluições seriadas de 4 vezes. É mostrado o coeficiente de correlação (R2). Eficiência = 2,03. 19C: Curvas de dissociação contínua obtidas para os transcritos relativos ao gene VEGFA. É possível observar picos aproximados de fluorescência entre as reações, indicando a presença de um fragmento de DNA amplificado específico, cuja média da temperatura de dissociação está entre 83 e 85°C.

#### 4.IV.2. Os genes candidatos validados

A realização de ensaios de quantificação relativa (Ct – *Cycle threshold* - comparativo) entre amostras submetidas a diferentes tratamentos depende da seleção de um gene cujos níveis transcricionais permaneçam inalterados. Este gene, considerado o controle endógeno das reações de PCR em Tempo Real, é empregado como fator de normalização para a análise da expressão dos genes de interesse (Livak e Schmittgen, 2001), e deve preferencialmente estar presente em cópia única no DNA cromossômico e exercer função essencial à sobrevivência do organismo. Sendo assim, para a realização do presente trabalho, o gene GAPDH se apresentou como excelente candidato a normalizador.

Os resultados obtidos foram expressos em valores de Ct, os quais refletem o número de ciclos de amplificação necessários para que o sinal fluorescente emitido atinja o limiar de detecção. Da média dos Cts obtidos para o gene alvo, relativa à condição de indução à diferenciação endotelial, foi subtraída a média calculada para os Cts do gene GAPDH. O valor gerado, denominado  $\Delta Ct$ , representa a normalização das amplificações do gene alvo em relação às amplificações do gene de controle endógeno selecionado. O mesmo procedimento de normalização foi adotado para o gene alvo em relação à condição calibradora (células indiferenciadas). A diferença entre o valor de  $\Delta Ct$  para a célula diferenciada e o valor de  $\Delta Ct$  para a célula indiferenciada (chamada  $\Delta\Delta Ct$ ) foi calculada e utilizada para a determinação da potência  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . Este valor representa o quanto a transcrição do gene de interesse foi alterada após os 14 dias de indução à diferenciação endotelial.

Os resultados foram plotados em gráfico com a utilização do programa *GraphPad Prism v5.0* (Figura 20).



\*\*\*p<0,001

**Figura 20: Análise da expressão gênica dos cinco genes identificados em amostras de células-tronco induzidas à diferenciação endotelial:** A diferença de expressão gênica foi obtida com base na razão entre a expressão na linhagem diferenciada e na linhagem indiferenciada, obtidas em experimentos de PCR em Tempo Real. Os candidatos foram testados no mesmo cDNA utilizado para a construção da biblioteca subtrativa.

Pela análise do gráfico (Figura 20) pode-se observar que os genes (SC5DL e LAMB2) identificados pelo RaSH, não mostraram diferença de expressão gênica estatisticamente significativa entre as linhagens (célula-tronco e induzida à diferenciação), podendo este resultado ser um indício de que a técnica, mesmo que com algumas vantagens anteriormente mencionadas, pode apresentar resultados falso-positivos.

Com relação ao gene codificador de ELAVL1, mesmo que tenha sido mencionada a relação desta proteína com a linhagem endotelial, por PCR em Tempo Real observa-se que a expressão deste gene foi ligeiramente maior para a amostra de células indiferenciadas. Sendo assim, a priori não se deve relacionar a expressão deste gene, especificamente para células endoteliais

(Pullmann R Jr *et al.*, 2005; Lin *et al.*, 2006; Won Jong Rhee *et al.*, 2009; Matthew *et al.*, 2010).

Pela análise do gráfico, pode-se observar que houve diferença de expressão gênica, estatisticamente significativa, entre as duas linhagens (diferenciada e indiferenciada), somente para os genes codificadores das proteínas VEGFA e HARS, sendo que houve aumento de expressão desses genes nas células diferenciadas de 1,5 e 1,78 vezes respectivamente.

Como explicitado anteriormente, VEGFA (normalmente referido apenas como VEGF), é uma importante proteína de sinalização, envolvida na vasculogênese e angiogênese (Hanahan e Folkman, 1996; Nowak *et al.*, 2008). Uma vez que esses processos estão relacionados à linhagem endotelial, pode-se concluir que houve a indução de hASC à diferenciação endotelial, e que este gene é indicador da ocorrência dessa diferenciação.

Por outro lado, é interessante notar a diferença de expressão gênica para o gene codificador da proteína HARS. Mesmo que ainda não tenha sido descrita nenhuma relação desta proteína com a linhagem endotelial e suas funções, uma vez que por PCR em Tempo Real observa-se expressão aumentada para amostra de células diferenciadas, pode ser esta a primeira vez que este gene é identificado como tendo alguma relação com a linhagem endotelial ou com o processo de diferenciação celular nesta linhagem.

Enfim, por esse resultado, os genes codificadores das proteínas VEGFA e HARS podem ser considerados possíveis genes marcadores de diferenciação endotelial.



## 5. CONCLUSÕES

A partir da execução dos experimentos deste trabalho, foi possível observar que:

- O processo de isolamento das células tronco do tecido adiposo, permitiu a obtenção de uma cultura de células viáveis, aderentes, fusiformes, produtoras de fosfatase alcalina e com fenótipo característico de células tronco mesenquimais, corroborando com o que é proposto pela Sociedade Internacional de Terapia Celular.

- O cultivo das hASC em meio de cultivo de indução à diferenciação endotelial durante 14 dias, proporcionou a obtenção de células ainda viáveis e com fenótipo característico de células endoteliais;

- A aplicação da técnica de RaSH e posterior análise de similaridade, possibilitou a identificação de 5 genes (ELAVL1, LAMB2, SC5DL, HARS e VEGFA); sendo que destes, LAMB2, SC5DL, HARS nunca haviam sido descritos na literatura como estando relacionados com o processo de diferenciação para a linhagem endotelial;

- Foram identificados também 121 genes codificadores de 28S e 1 de 18S Ribossomal, indicando a obtenção de falso-positivos pela técnica de RaSH;

- Dos 5 genes identificados, dois deles (VEGFA e HARS), demonstraram expressão diferencial de 1,5 e 1,78 vezes maior do que na célula indiferenciada, respectivamente, dados estes obtidos e validados pela técnica de PCR em Tempo Real.

## **6. PERSPECTIVAS**

Este trabalho abre perspectivas para:

- Obtenção de uma linhagem celular mutante (*knockout*) para o gene HARS, identificado pela técnica de RaSH e validado por PCR em Tempo Real. A verificação dos eventos decorrentes da ausência de tal gene possibilitará o conhecimento da participação deste gene com o processo de diferenciação endotelial, bem como com a conseqüente ocorrência de angiogênese.
- Obtenção de uma linhagem celular com super expressão, para o gene HARS. A verificação dos eventos decorrentes da super expressão de tal gene possibilitará o conhecimento da participação deste gene com o processo de diferenciação endotelial, bem como com a conseqüente ocorrência de angiogênese.
- Refazer a técnica de RaSH, com o intuito de isolar e identificar outros genes possivelmente relacionados com o processo de diferenciação endotelial.

## **7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

AHN SM, SIMPSON R, LEE B. Genomics and proteomics in stem cell research: the road ahead. *Anat Cell Biol*, 43(1):1-14, 2010.

ALISON MR, ISLAM S. Attributes of adult stem cells. *J Pathol*, 217:144-60, 2009.

ANGHILERI E, MARCONI S, PIGNATELLI A, CIFELLI P, GALIÉ M, SBARBATI A, KRAMPERA M, BELLUZZI O, BONETTI B. Neuronal differentiation potential of human adipose-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev*, 17(5): 909-916, 2008.

ARAI S., MINJARES, C., NAGAFUCHI, S., MIYAZAKI, T. Improved experimental procedures for achieving efficient germ line transmission of nonobese diabetic (NOD) derived embryonic stem cells. *Exp. Diabesity Res.*, 5(3): 219-226, 2004.

AURICH H, SGODDA M, KALTWASSER P, VETTER M, WEISE A, LIEHR T, BRULPORT M, HENGSTLER JG, DOLLINGER MM, FLEIG WE, CHRIST B. Hepatocyte differentiation of mesenchymal stem cells from human adipose tissue in vitro promotes hepatic integration in vivo. *Gut*, 58(4): 570-581, 2009.

AUST L, DEVLIN B, FOSTER SJ, HALVORSEN YD, HICOK K, DU LANEY T, SEN A, WILLINGMYRE GD, GIMBLE JM. Yield of human adipose-derived adult stem cells from liposuction aspirates. *Cytotherapy*, 6(1): 7-14, 2004.

BABETO E, CONCEIÇÃO AL, VALSECHI MC, PEITL JUNIOR P, DE CAMPOS ZUCCARI DA, DE LIMA LG, BONILHA JL, DE FREITAS CALMON M, CORDEIRO JA, RAHAL P. Differentially expressed genes in giant cell tumor of bone. *Virchows Arch*, 458(4): 467-76, 2011.

BORLONGAN, C.V., KANEKO, Y., MAKI, M., YU, S.J., ALI, M., ALLICKSON, J.G., SANBERG, C.D., KUZMIN-NICHOLS, N., SANBERG, P.R. Menstrual blood cells display stem cell-like phenotypic markers and exert neuroprotection following transplantation in experimental stroke. *Stem Cells Dev*, 19(4): 439-452, 2010.

BOUKERCHE H, SU ZZ, KANG DC, FISHER PB. Identification and cloning of genes displaying elevated expression as a consequence of metastatic progression in human melanoma cells by rapid subtraction hybridization. *Gene*, 343:191-201, 2004.

BREITBACH M, BOSTANI T, ROELL W, XIA Y, DEWALD O, NYGREN JM, FRIES JWU, TIEMANN K, BOHLEN H, HESCHELER J. Potential risks of bone marrow cell transplantation into infarcted hearts. *Blood*, 110:1362-1369, 2007.

CAO Y, SUN Z, LIAO L, MENG Y, HAN Q, ZHAO RC. Human adipose tissue-derived stem cells differentiate into endothelial cells in vitro and improve postnatal neovascularization in vivo. *Biochem Biophys Res Commun*, 1;332(2):370-9, 2005.

CAPLAN AI, BRUDER SP. Mesenchymal stem cells: building blocks for molecular medicine in the 21st century. *Trends Mol Med*, 7(6):259-64, 2001.

CHAGASTELLES PC, NARDI NB, CAMASSOLA M. Biology and applications of mesenchymal stem cells. *Sci Prog.*, 93(Pt 2):113-27, 2010.

CHAMBERS I, SMITH A. Self-renewal of teratocarcinoma and embryonic stem cells. *Oncogene*, 23:7150-7160, 2004.

CHOI HJ, KIM JM, KWON E, CHE JH, LEE JI, CHO SR, KANG SK, RA JC, KANG BC. Establishment of efficacy and safety assessment of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells (hATMSCs) in a nude rat femoral segmental defect model. *J Korean Med Sci.*, 26(4):482-91, 2011.

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*, 25(1): 100-1066, 2007.

DE WIT, T. R. AND J. A. VAN MOURIK. Biosynthesis, processing and secretion of von Willebrand factor: biological implications. *Best Pract Res Clin Haematol*, 14(2): 241-255, 2001.

DIATCHENKO L, LAU YF, CAMPBELL AP. Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissuespecific cDNA probes and libraries. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93:6025-30, 1996.

DOMINICI M, LE BLANC K, MUELLER I, SLAPER-CORTENBACH I, MARINI F, KRAUSE D, DEANS R, KEATING A, PROCKOP DJ, HORWITZ E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. *The International*

Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8(4): 315-317, 2006.

EGLITIS, M. A. E E. MEZEY. Hematopoietic cells differentiate into both microglia and macroglia in the brains of adult mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(8): 4080-4085, 1997.

EVANS, M.J. AND M.H. KAUFMAN. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, 292:154-156, 1981.

FISCHBACH, G. D. E R. L. FISCHBACH. Stem cells: science, policy, and ethics. *J Clin Invest*, 114(10): 1364-1370, 2004.

FREIST W, VERHEY JF, RÜHLMANN A, GAUSS DH, ARNEZ JG. Histidyl-tRNA synthetase. *Biol Chem.*,380(6):623-46, 1999.

FRIEDENSTEIN AJ, CHAILAKHJAN RK, LALYKINA KS. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet*, 3(4): 393-403, 1970.

FRUHBECK G , GOMEZ-AMBROSI J, MURUZABAL FJ, BURRELL MA. The adipocyte: a model for integration of endocrine and metabolic signaling in energy metabolism regulation. *Am J Physiol Endocrinol Metab.*, 280:E827-47, 2001.

FU X., FANG, L., LI, X., CHENG, B., SHENG, Z. Enhanced wound-healing quality with bone marrow mesenchymal stem cells autografting after skin injury. *Wound Repair Regen*, 14(3):325-335, 2006.

GEPSTEIN, L. Derivation and potential applications of human embryonic stem cells. *Circ Res*, 91(10): 866-876, 2002.

GOKHALE, P. J. E P. W. ANDREWS. Human embryonic stem cells: 10 years on. *Lab Invest*, 89(3): 259-262, 2009.

GORY-FAURÉ S, PRANDINI MH, POINTU H, ROULLOT V, PIGNOT-PAINTRAND I, VERNET M, HUBER P. Role of vascular endothelial-cadherin in vascular morphogenesis. *Development*, 126(10): 2093-2102, 1999.



GRANERO-MOLTO, F., WEIS, J.A., LONGOBARDI, L., SPAGNOLI, A. Role of mesenchymal stem cells in regenerative medicine: application to bone and cartilage repair. *Expert Opin. Biol. Ther.*, 8(3):255-268, 2008.

HANAHAN D, FOLKMAN J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell.*, 86(3):353-64, 1996.

HERBERTS CA, KWA MS, HERMSEN HP. Risk factors in the development of stem cell therapy. *J Transl Med.*, 9:29, 2011.

HESS DC, ABE T, HILL WD, STUDDARD AM, CAROTHERS J, MASUYA M, FLEMING PA, DRAKE CJ, OGAWA M. Hematopoietic origin of microglial and perivascular cells in brain. *Exp Neurol*, 186(2): 134-144, 2004.

HIPP, J. E A. ATALA. Sources of stem cells for regenerative medicine. *Stem Cell Rev*, 4(1): 3-11, 2008.

HUANG GT, GRONTHOS S, SHI S. Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine. *J Dent Res.*, 88(9):792-806, 2009.

ITOH M, KIURU M, CAIRO MS, CHRISTIANO AM. Generation of keratinocytes from normal and recessive dystrophic epidermolysis bullosa-induced pluripotent stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 108(21):8797-802, 2011.

IVANOVA, N.B., J.T. DIMOS, C. SCHANIEL, J.A. HACKNEY, K.A. MOORE, AND I.R. LEMISCHKA. A stem cell molecular signature. *Science*, 298:601-604. 21, 2002.

JIANG H, KANG DC, ALEXANDRE D, FISHER PB. RaSH, a rapid subtraction hybridization approach for identifying and cloning differentially expressed genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97:12684-9, 2000.

KAWAMOTO, H. E Y. KATSURA. A new paradigm for hematopoietic cell lineages: revision of the classical concept of the myeloid-lymphoid dichotomy. *Trends Immunol*, 30(5): 193-200, 2009.

KIM YC, WU Q, CHEN J, XUAN Z, JUNG YC, ZHANG MQ, ROWLEY JD, WANG SM. The transcriptome of human CD34+ hematopoietic stem-progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 106(20):8278-83, 2009.

KOH GY, KLUG MG , SOONPAA MH , FIELD LJ. Differentiation and long-term survival of C2C12 myoblast graft in heart. *J Clin Invest*, 92: 1548-1554.48,49, 1993.

KRAKOWIAK PA, WASSIF CA, KRATZ L, COZMA D, KOVÁROVÁ M, HARRIS G, GRINBERG A, YANG Y, HUNTER AG, TSOKOS M, KELLEY RI, PORTER FD. Lathosterolosis: an inborn error of human and murine cholesterol synthesis due to lathosterol 5-desaturase deficiency. *Hum Mol Genet.*, 12(13):1631-41, 2003.

KRAUSE DS, FACKLER MJ, CIVIN CI, MAY WS. CD34: structure, biology, and clinical utility. *Blood.*, 87(1):1-13, 1996.

KUBO N, NARUMI S, KIJIMA H, MIZUKAMI H, YAGIHASHI S, HAKAMADA K, NAKANE A. Efficacy of Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells for Fulminant Hepatitis in Mice Induced by Concanavalin A. *J Gastroenterol Hepatol.*, 2011.

KUWANA M, OKAZAKI Y, KODAMA H, SATOH T, KAWAKAMI Y, IKEDA Y. Endothelial differentiation potential of human monocyte-derived multipotential cells. *Stem Cells*, 24(12): 2733-2743, 2006.

LAGASSE E, CONNORS H, AL-DHALIMY M, REITSMA M, DOHSE M, OSBORNE L, WANG X, FINEGOLD M, WEISSMAN IL, GROMPE M. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nat Med*, 6(11): 1229-1234, 2000.

LAU K., PAUS, R., TIEDE, S., DAY, P., BAYAT, A. Exploring the role of stem cells in cutaneous wound healing. *Exp. Dermatol.*, 18(11):921-933, 2009.

LEE, H.J., LIM, I.J., LEE, M.C., KIM, S.U. Human neural stem cells genetically modified to overexpress brain-derived neurotrophic factor promote functional recovery and neuroprotection in a mouse stroke model. *J. Neurosci.Res.*, 88(15):3282-3294, 2010.

LEWIN, B. The Messenger RNA. In: LEWIN, B. *Genes IX*. 9<sup>th</sup> ed. Sudbury: Jones and Bartlett Publishers, 2008. p. 127-150.

LIN FY, CHEN YH, LIN YW, TSAI JS, CHEN JW, WANG HJ, CHEN YL, LI CY, LIN SJ. The role of human antigen R, an RNA-binding protein, in mediating the

stabilization of toll-like receptor 4 mRNA induced by endotoxin: a novel mechanism involved in vascular inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26:2622–2629, 2006.

LIN Y, LIU L, LI Z, QIAO J, WU L, TANG W, ZHENG X, CHEN X, YAN Z, TIAN W. Pluripotency potential of human adipose-derived stem cells marked with exogenous green fluorescent protein. *Mol Cell Biochem*, 291(1-2): 1-10, 2006.

LIVAK, K.J., SCHMITTGEN, T.D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  Method. *MET.* v. 25, p. 402–408, 2001.

LO KC, CHUANG WW, LAMB DJ. Stem cell research: the facts, the myths and the promises. *J Urol*, 170(6): 2453-2458, 2003.

LUO, G., CHENG, W., HE, W., WANG, X., TAN, J., FITZGERALD, M., LI, X., WU, J. Promotion of cutaneous wound healing by local application of mesenchymal stem cells derived from human umbilical cord blood. *Wound Repair Regen.*, 18(5):506-513, 2010.

MAES C, CARMELIET P, MOERMANS K, STOCKMANS I, SMETS N, COLLEN D, BOUILLON R, CARMELIET G. Impaired angiogenesis and endochondral bone formation in mice lacking the vascular endothelial growth factor isoforms VEGF164 and VEGF188. *Mech Dev*, 111(1-2): 61-73, 2002.

MARELLI D, DESROSIERS C, EL-ALFY M, KAO RL, CHIU RC. Cell transplantation for myocardial repair: an experimental approach. *Cell Transplant*, 1: 383–390. 49, 1992.

MARTIN G R. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78:7634-7638, 1981.

MATTHEW M. GUBIN, ROBERT CALALUCE, J. WADE DAVIS, JOSEPH D. MAGEE, CONNIE S. STROUSE, DANIEL P. SHAW, LIXIN MA, ASHLEY BROWN, TIMOTHY HOFFMAN, TAMMY L. ROLD AND ULUS ATASOY. Overexpression of the RNA binding protein HuR impairs tumor growth in triple negative breast cancer associated with deficient angiogenesis. *Cell Cycle*, 2010.

MENON C, GHARTEY A, CANTER R, FELDMAN M, FRAKER DL. Tumor necrosis factor-alpha damages tumor blood vessel integrity by targeting VE-cadherin. *Ann Surg*, 244(5): 781-791, 2006.

MIZUNO, H. Adipose-derived stem cells for tissue repair and regeneration: ten years of research and a literature review. *J Nippon Med Sch*, 76(2): 56-66, 2009.

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

MOSS, D. W. Perspectives in alkaline phosphatase research. *Clin Chem*, 38 (12): 2486-2492, 1992.

MOUNTFORD, J. C. Human embryonic stem cells: origins, characteristics and potential for regenerative therapy. *Transfus Med*, 18(1): 1-12, 2008.

NANDOE TEWARIE, R.D., HURTADO, A., LEVI, A.D., GROTENHUIS, J.A., OUDEGA, M. Bone marrow stromal cells for repair of the spinal cord: towards clinical application. *Cell Transplant.*, 15(7):563-577, 2006.

NARSINH KH, SUN N, SANCHEZ-FREIRE V, LEE AS, ALMEIDA P, HU S, JAN T, WILSON KD, LEONG D, ROSENBERG J, YAO M, ROBBINS RC, WU JC. Single cell transcriptional profiling reveals heterogeneity of human induced pluripotent stem cells. *J Clin Invest.*, 121(3):1217-21, 2011.

NAVEIRAS O, DALEY GQ. Stem cells and their niche: a matter of fate. *Cell Mol Life Sci* 63:760–766, 2006.

NUSSBAUM J, MINAMI E, LAFLAMME MA, VIRAG JA, WARE CB, MASINO A, MUSKHELI V, PABON L, REINECKE H, MURRY CE. Transplantation of undifferentiated murine embryonic stem cells in the heart: teratoma formation and immune response. *FASEB J*, 21(7): 1345-1357, 2007.

O'CONNOR MD, KARDEL MD, IOSFINA I, YOUSSEF D, LU M, LI MM, VERCAUTEREN S, NAGY A, EAVES CJ. Alkaline phosphatase-positive colony formation is a sensitive, specific, and quantitative indicator of undifferentiated human embryonic stem cells. *Stem Cells*, 26(5): 1109-1116, 2008.

OKITA K, SHIH CC, FORMAN SJ, CHU P, SLOVAK M. Human embryonic stem cells are prone to generate primitive, undifferentiated tumors in engrafted

human fetal tissues in severe combined immunodeficient mice. *Stem Cells and Development*, 16:893-902, 2007.

OSWALD J, BOXBERGER S, JORGENSEN B, FELDMANN S, EHNINGER G, BORNHÄUSER M, WERNER C. Mesenchymal stem cells can be differentiated into endothelial cells in vitro. *Stem Cells*, 22(3): 377-384, 2004.

Patel, A.N., Geffner, L., Vina, R.F., Saslavsky, J., Urschel, H.C.Jr, Kormos, R., Benetti, F. Surgical treatment for congestive heart failure with autologous adult stem cell transplantation: a prospective randomized study. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, 130(6):1631-1638, 2005.

PATRICK TUNGGAL, NEIL SMYTH, MATS PAULSSON, MARK-CHRISTOPH OTT Laminins: Structure and Genetic Regulation microscopy research and technique. *Microsc Res Tech.*, 51(3):214-27, 2000.

PEDROSO DC, TELLECHEA A, MOURA L, FIDALGO-CARVALHO I, DUARTE J, CARVALHO E, FERREIRA L. Improved survival, vascular differentiation and wound healing potential of stem cells co-cultured with endothelial cells. *PLoS One*, 6(1):e16114, 2011.

PEREIRA, L.V. The importance of the use of stem cells for public health. *Ciências & Saúde Coletiva*, v.13, p.7-14, 2008.

PESSINA A, GRIBALDO L. The key role of adult stem cells: Therapeutic perspectives. *Current Medical Research and Opinion*, 22:2287-2300, 2006.

PHELPS EA, GARCIA AJ. Update on therapeutic vascularization strategies. *Regen Med.*, 4(1):65-80, 2009.

PIACIBELLO, W., SANAVIO, F., SEVERINO, A., DANE, A., GAMMAITONI, L., FAGIOLI, F., PERISSINOTTO, E., CAVALLONI, G., KOLLET, O., LAPIDOT, T. Engraftment in nonobese diabetic severe combined immunodeficient mice of human CD34+ cord blood cells after ex vivo expansion: evidence for the amplification and self-renewal of repopulating stem cells. *Blood*, 93(11):3736-3749, 1999.

PITINI, V., ALTAVILLA, G., ARRIGO, C. Surgical treatment for congestive heart failure with autologous adult stem cell transplantation. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, 131(5): 1213-1214, 2006.

PLANAT-BENARD V, SILVESTRE JS, COUSIN B, ANDRÉ M, NIBBELINK M, TAMARAT R, CLERGUE M, MANNEVILLE C, SAILLAN-BARREAU C, DURIEZ M, TEDGUI A, LEVY B, PÉNICAUD L, CASTEILLA L. Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells: physiological and therapeutic perspectives. *Circulation*, v.109, n.5, Feb 10, p.656-63, 2004.

PULLMANN R JR, JUHASZOVA M, LÓPEZ DE SILANES I, KAWAI T, MAZAN-MAMCZARZ K, HALUSHKA MK, GOROSPE M. Enhanced proliferation of cultured human vascular smooth muscle cells linked to increased function of RNA-binding protein HuR. *J Biol Chem*, 280:22819–22826, 2005.

RASMUSSEN, R. Quantification on the LightCycler. *Rapid Cycle Real-Time PCR, Methods and Applications*. Springer Press, Heidelberg, P21-34, 2001.

RIA R, PICCOLI C, CIRULLI T, FALZETTI F, MANGIALARDI G, GUIDOLIN D, TABILIO A, DI RENZO N, GUARINI A, RIBATTI D, DAMMACCO F, VACCA A. Endothelial differentiation of hematopoietic stem and progenitor cells from patients with multiple myeloma. *Clin Cancer Res*, v.14, n.6, Mar 15, p.1678-85, 2008.

RICHARDS M, TAN SP, TAN JH, CHAN WK, BONGSO A. The transcriptome profile of human embryonic stem cells as defined by SAGE. *Stem Cells*, 22(1):51-64, 2004.

RODBELL M. Metabolism of isolated fat cells. V. Preparation of "ghosts" and their properties; adenyl cyclase and other enzymes. *J Biol Chem*, 242:5744-50, 1967.

RODRIGUEZ AM, ELABD C, AMRI EZ, AILHAUD G, DANI C. The human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Biochimie*, 87(1): 125-128, 2005.

ROMANOV YA, DAREVSKAYA AN, MERZLIKINA NV, BURAVKOVA LB. Mesenchymal stem cells from human bone marrow and adipose tissue: isolation, characterization, and differentiation potentialities. *Bull Exp Biol Med*, 140(1): 138-143, 2005.

SABATINI F, PETECCHIA L, TAVIAN M, JODON DE VILLEROCHÉ V, ROSSI GA, BROUTY-BOYÉ D. Human bronchial fibroblasts exhibit a mesenchymal

stem cell phenotype and multilineage differentiating potentialities. *Lab Invest*, 85(8): 962-971, 2005.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2 ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y, 2001.

SARIC T , HESCHELER J: Stem cells and nuclear reprogramming. *Minimally Invasive Therapy and Allied Technologies*, 17:64-78, 2008.

SCHLECHTA B, WIEDEMANN D, KITTINGER C, JANDROSITZ A, BONAROS NE, HUBER JC, PREISEGGER KH, KOCHER AA. Ex-vivo expanded umbilical cord blood stem cells retain capacity for myocardial regeneration. *Circ J.*, 74(1):188-94, 2010.

SHI CZ, ZHANG XP, LV ZW, ZHANG HL, XU JZ, YIN ZF, YAN YQ, WANG CQ. Adipose tissue-derived stem cells embedded with eNOS restore cardiac function in acute myocardial infarction model. *Int J Cardiol.*, 2011.

SPITKOVSKY, D. AND HESCHELER, J. Adult mesenchymal stromal stem cells for therapeutic applications. *Minim. Invasive Ther. Allied Technol*, 17, 79–90, 2008.

STREM BM, HICOK KC, ZHU M, WULUR I, ALFONSO Z, SCHREIBER RE, FRASER JK, HEDRICK MH. Multipotential differentiation of adipose tissue-derived stem cells. *Keio J Med*, 54(3): 132-141, 2005.

SU HL, LI SS. Molecular features of human ubiquitin-like SUMO genes and their encoded proteins. *Genes Chromosomes Cancer*, 21:296:65-73, 2002.

SU ZZ, CHEN Y, KANG DC. Customized rapid subtraction hybridization (RaSH) gene microarrays identify overlapping expression changes in human fetal astrocytes resulting from human immunodeficiency virus-1 infection or tumor necrosis factor-alpha treatment. *Gene*, 306:67-78, 2003.

TAKAHASHI K, OKITA K, NAKAGAWA M, YAMANAKA S. Induction of pluripotent stem cells from fibroblast cultures. *Nat Protoc.* 2(12):3081-9, 2007.



TAKAHASHI, K. E S. YAMANAKA. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 126(4): 663-676, 2006.

THOMSON, J.A., J. ITSKOVITZ-ELDOR, S.S. SHAPIRO, M.A. WAKNITZ, J.J. SWIERGIEL, V.S. MARSHALL, AND J.M. JONES. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, 282:1145-1147, 1998.

THOMSON, J.A., J. KALISHMAN, T.G. GOLOS, M. DURNING, C.P. HARRIS, R.A. BECKER, AND J.P. HEARN. Isolation of a primate embryonic stem cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92:7844- 7848, 1995.

TIMPER K, SEBOEK D, EBERHARDT M, LINSCHIED P, CHRIST-CRAIN M, KELLER U, MÜLLER B, ZULEWSKI H. Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells differentiate into insulin, somatostatin, and glucagon expressing cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 341(4): 1135-1140, 2006.

TOGEL F., WEISS, K., YANG, Y., HU, Z., ZHANG, P. AND WESTENFELDER, C. Vasculotropic, paracrine actions of infused mesenchymal stem cells are important to the recovery from acute kidney injury. *Am. J. Physiol. Renal Physiol*, 292, F1626–F1635, 2007.

TOMA JG, AKHAVAN M, FERNANDES KJ, BARNABÉ-HEIDER F, SADIKOT A, KAPLAN DR, MILLER FD. Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin. *Nat Cell Biol*, 3(9): 778-784, 2001.

TRAPP V, PARMAKHTIAR B, PAPAZIAN V, WILLMOTT L, FRUEHAUF JP. Anti-angiogenic effects of resveratrol mediated by decreased VEGF and increased TSP1 expression in melanoma-endothelial cell co-culture. *Angiogenesis*, 13(4):305-15, 2010.

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

VAQUERO, J., ZURITA, M. Bone marrow stromal cells for spinal cord repair: a challenge for contemporary neurobiology. *Histol. Histopathol.*, 24(1):107-116, 2009.



VESTWEBER, D. VE-cadherin: the major endothelial adhesion molecule controlling cellular junctions and blood vessel formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 28(2): 223-232, 2008.

VILQUIN, J.T., ROSSET, P. Mesenchymal stem cells in bone and cartilage repair: current status. *Regen. Med.*, 1(4):589-604, 2006.

WILSON A, BUTLER PE, SEIFALIAN AM. Adipose-derived stem cells for clinical applications *Cell Prolif.*, 44(1):86-98, 2011.

WOLFF, E.F., GAO, X.B., YAO, K.V., ANDREWS, Z.B., DU, H., ELSWORTH, J.D., TAYLOR, H.S. Endometrial stem cell transplantation restores dopamine production in a Parkinson's disease model. *J. Cell. Mol. Med.*, 2010.

WON JONG RHEEA, CHIH-WEN NIA, ZHILAN ZHENG, KYUNGHWA CHANG, HANJOONG JOA, AND GANG BAO. HuR regulates the expression of stress-sensitive genes and mediates inflammatory response in human umbilical vein endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010.

WRIGHT TJ, LEACH L, SHAW PE, JONES P. Dynamics of vascular endothelial cadherin and b-catenin localization by vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis in human umbilical vein cells. *Exp Cell Res*, 280: 159-168, 2002.

XU N, PAPAGIANNAKOPOULOS T, PAN G, THOMSON JA, KOSIK KS. MicroRNA-145 regulates OCT4, SOX2, and KLF4 and represses pluripotency in human embryonic stem cells. *Cell*, 137(4):647-58, 2009.

YAMAZAKI, Y., KANNO, H., MAEDA, K., YOSHIDA, T., KOBAYASHI, N., KUBO, A., YAMAGUCHI, Y., SAITO, T. Engrafted VHL peptide-delivered bone marrow stromal cells promote spinal cord repair in rats. *Neuroreport*, 21(4): 287-292, 2010.

YANG B, GUO H, ZHANG Y, DONG S, YING D. The microRNA expression profiles of mouse mesenchymal stem cell during chondrogenic differentiation. *BMB Rep.*, 44(1):28-33, 2011.

YANG, M., WEI, X., LI, J., HEINEL, L.A., ROSENWASSER, R., IACOVITTI, L. Changes in host blood factors and brain glia accompanying the functional

recovery after systemic administration of bone marrow stem cells in ischemic stroke rats. *Cell Transplant.*, 19(9):1073-1084, 2010.

YARAK S, OKAMOTO OK. Human adipose-derived stem cells: current challenges and clinical perspectives. *An Bras Dermatol.*, 85(5):647-56, 2010.

YU J, VODYANIK MA, SMUGA-OTTO K, ANTOSIEWICZ-BOURGET J, FRANE JL, TIAN S, NIE J, JONSDOTTIR GA, RUOTTI V, STEWART R, SLUKVIN II, THOMSON JA. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*, 318(5858):1917-20, 2007.

ZENG, X., T. MIURA, Y. LUO, B. BHATTACHARYA, B. CONDIE, J. CHEN, I. GINIS, I. LYONS. Properties of pluripotent human embryonic stem cells BG01 and BG02. *Stem Cells*, 22:292-312, 2004.

ZHANG P, BAXTER J, VINOD K, TULENKO TN, DI MUZIO PJ. Endothelial differentiation of amniotic fluid-derived stem cells: synergism of biochemical and shear force stimuli. *Stem Cells Dev*, 18(9): 1299-1308, 2009.

ZHU Y, LIU T, SONG K, FAN X, MA X, CUI Z. Adipose derived stem cell: a better stem cell than BMSC. *Cell Biochem Funct.*, 26:664-75, 2008.

ZUK PA, ZHU M, MIZUNO H, HUANG J, FUTRELL JW, KATZ AJ, BENHAIM P, LORENZ HP, HEDRICK MH. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng*, 7(2): 211-228, 2001.