



FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ

**Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina
Investigativa**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**Geração e caracterização de linhagens de células-
tronco mesenquimais de camundongo
geneticamente modificadas para expressão ectópica
de *hIGF-1* ou de *hG-CSF***

Gabrielle Viana Martins Gonçalves

Salvador-Bahia

2015

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ

**Geração e caracterização de linhagens de células-
tronco mesenquimais de camundongo
geneticamente modificadas para expressão ectópica
de *hIGF-1* ou *hG-CSF***

Gabrielle Viana Martins Gonçalves

Dissertação apresentada ao programa de Pós-
Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina
Investigativa do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz
– CPqGM – como requisito para obtenção do título
de Mestre em Biotecnologia

Orientadora: Dra. Milena Botelho Pereira Soares

Co-orientadora: Dra. Rejane Hughes Carvalho

Salvador-Bahia

2015

Geração e caracterização de linhagens de células-tronco mesenquimais de camundongo geneticamente modificadas para expressão ectópica de *hIGF-1* ou *hG-CSF*

Gabrielle Viana Martins Gonçalves

Folha de Aprovação

Comissão Examinadora

Pesquisador Titular Pesquisador Titular

FIOCRUZ/CPqGM

Pesquisador Titular Pesquisador Titular

FIOCRUZ/CPqGM

Pesquisador Titular Pesquisador Titular

FIOCRUZ/CPqGM

GONÇALVES, Gabrielle Viana Martins. **Geração e caracterização de linhagens de células-tronco mesenquimais de camundongo geneticamente modificadas para expressão ectópica de *hIGF-1* ou *hG-CSF***. 87 f. il. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) - Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2015.

RESUMO

As células-tronco mesenquimais (CTM) constituem uma ferramenta promissora para o campo de terapia celular. Além de seu potencial de diferenciação em diferentes tipos celulares, as CTM apresentam a habilidade de secretar moléculas bioativas e, assim, exercer múltiplos efeitos biológicos, tais como indução da regeneração de tecidos lesionados, redução de fibrose e modulação do sistema imune. A superexpressão dos fatores de crescimento G-CSF e IGF-1, conhecidos por seus efeitos sobre os processos de imunomodulação, sobrevivência celular e reparo tecidual, pode ampliar as ações terapêuticas das CTM. O objetivo deste trabalho consiste em gerar e caracterizar linhagens de CTM de camundongo superexpressando hG-CSF ou hIGF-1. Um sistema lentiviral de segunda geração foi utilizado para modificação de CTM para expressão ectópica dos genes de interesse. As sequências codificantes de hG-CSF e hIGF-1 foram amplificadas por PCR e subclonadas em um vetor lentiviral de transferência, contendo um promotor constitutivo. As partículas lentivirais foram produzidas a partir da co-transfecção de células da linhagem HEK293FT com os vetores constituintes do sistema lentiviral. Em seguida, as CTM obtidas da medula óssea de camundongos transgênicos para proteína fluorescente verde (GFP) foram transduzidas com partículas lentivirais infectantes contendo hG-CSF ou hIGF-1. A expressão gênica de hG-CSF ou hIGF-1 pelas linhagens geradas foi quantificada por qRT-PCR, e a produção da proteína por ELISA. As linhagens foram caracterizadas por imunofenotipagem e avaliadas quanto ao seu potencial de diferenciação celular. Foram geradas duas linhagens de CTM superexpressando hG-CSF e três linhagens superexpressando hIGF-1. Todas demonstraram por qRT-PCR, estar efetivamente expressando os genes de interesse. Foi possível detectar e quantificar a síntese proteica de G-CSF e IGF-1. Todas as linhagens geradas foram capazes de se diferenciar em osteócitos, condrócitos e adipócitos, demonstrando a manutenção de seu fenótipo estromal. Neste contexto, este trabalho resultou em ferramentas funcionais para a avaliação dos efeitos terapêuticos de IGF-1 e G-CSF combinados à CTM, em modelos de lesões animais, em comparação com CTM não-modificadas geneticamente. Além disso, estas ferramentas poderão ser empregadas em estudos de pesquisa básica, para melhor compreensão dos efeitos de hIGF-1 e hG-CSF sobre a biologia das CTM.

Palavras-chave: Pesquisa com Células-Tronco, Fator de Crescimento semelhante a insulina I, Células Mesenquimais Estromais, Transplante de Células-Tronco Mesenquimais.

GONÇALVES, Gabrielle Viana Martins. **Generation and characterization of mouse mesenchymal stem cells lines genetically modified for the ectopic expression of hG-CSF and hIGF-1.** 87 f. II. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) - Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2015.

ABSTRACT

Mesenchymal stem cells (MSCs) are a promising tool for the cell therapy field. In addition to their potential for differentiation into different cell types, MSCs have the ability to secrete bioactive molecules and thus exert multiple biological effects such as induction of the injured tissue regeneration, fibrosis reduction and modulation of the immune system. The overexpression of the growth factors G-CSF and IGF-1, known for their effects on immune modulation processes, cell survival and tissue repair, can result in a magnification of MSCs' therapeutic actions. The objective of this work is to generate and characterize mouse MSCs lines overexpressing hG-CSF or hIGF-1. A second generation lentiviral system was used to modify MSCs derived from mice for the ectopic expression of the genes of interest. The coding sequences of hG-CSF and hIGF-1 were amplified by PCR and subcloned into a lentiviral transfer vector containing a constitutive promoter. The lentiviral particles were produced from the co-transfection of HEK293FT lineage cells with the lentiviral vectors. Subsequently, MSCs obtained from the bone marrow of transgenic mice for green fluorescent protein (GFP) were transduced with infectious lentiviral particles containing hG-CSF or hIGF-1. The gene expression of hG-CSF or hIGF-1 by the generated cell lines was quantified by qRT-PCR, and the protein production by ELISA. The lineages were characterized by immunophenotyping and evaluated for their potential of cellular differentiation. Two lines of MSCs overexpressing hG-CSF and three lines overexpressing hIGF-1 were generated. All the cell lines demonstrated to be effectively expressing the genes of interest by qRT-PCR. It was possible to detect and quantify the protein synthesis of G-CSF and IGF-1. Moreover, all the generated lines were capable of differentiating into osteocytes, chondrocytes and adipocytes, indicating the conservation of their stromal phenotype even after genetic modification. In this context, this study resulted in functional tools for evaluating the IGF-1 and G-CSF therapeutic effects when combined with MSCs, to be tested in experimental animal models in comparison to non-genetically modified MSCs. Furthermore, these tools may be employed for basic research studies, for a better understanding of the effects of hIGF-1 and hG-CSF on MSCs' biology.

Keywords: Stem Cell Research, Insulin-Like Growth Factor I, Granulocyte-colony stimulating factor, Mesenchymal Stromal Cells, Mice, Mesenchymal Stem Cell Transplantation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Plasticidade das células-tronco	12
Figura 2: Gráfico de estudos clínicos	14
Figura 3: Representação esquemática da cascata de sinalização de G-CSF.....	23
Figura 4: Representação esquemática das ações hematopoiéticas de G-CSF	24
Figura 5: Representação esquemática da cascata de sinalização de IGF-1	26
Figura 6: Representação esquemática de plasmídeos lentivirais.....	28
Figura 7: Representação esquemática da produção de vetores lentivirais.....	31
Figura 8: Desenho experimental.....	33
Figura 9: Representação esquemática dos vetores pBLAST49-hIGF-1 e pORF9-hG-CSFb ...	34
Figura 10: Representação esquemática dos vetores lentivirais	36
Figura 11: Representação esquemática da subclonagem.....	41
Figura 12: Amplificação de <i>hG-CSF</i> e <i>hIGF-1</i>	48
Figura 13: Análise de restrição	50
Figura 14: Eletroferogramas sequenciamento IGF-1 e G-CSF	51
Figura 15: Sequencia consenso de G-CSF	52
Figura 16: Sequencia consenso de IGF-1	52
Figura 17: Eficiência da transfecção por citometria de fluxo.....	53
Figura 18: Visualização da transfecção com o vetor lentiviral pEGIP.....	53
Figura 19: Titulação dos estoques lentivirais	54
Figura 20: Visualização da transdução de HEK293 FT	55
Figura 21: Seleção das células transduzidas com puromicina.....	56
Figura 22: Análise de expressão dos genes de interesse nas linhagens geradas.....	57

Figura 23: ELISA BMSC_GCSF	58
Figura 24: ELISA BMSC_IGF-1	59
Figura 25: Indução de diferenciação	61
Figura 26: Alinhamento IGF-1 humano, bovino e camundongo	66

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Iniciadores utilizados para amplificação de <i>hG-CSF</i> e <i>hIGF-1</i>	38
Quadro 2: Iniciadores utilizados no sequenciamento de <i>hG-CSF</i> e <i>hIGF-1</i>	40
Quadro 3: Primers utilizados na qRT-PCR	44
Quadro 4: Conjunto de antígenos e conjugados utilizados na imunofenotipagem	45
Quadro 5: Imunofenotipagem das linhagens geradas.....	60

LISTA DE ABREVIATURAS

CTH - Células-tronco hematopoiéticas

CTM- Células-tronco mesenquimais

DECH - Doença do enxerto contra hospedeiro

DMEM- MeioEagleModificadopor Dulbecco

GFP- Proteína fluorescente verde

GH- Hormônio do crescimento

GM-CSF- Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos

hG-CSF- Fator humano estimulador de colônias de granulócitos

HGF- Fator de crescimento de hepatócitos

hIGF-1-Fator humano de crescimento semelhante à insulina 1

HLA-DR- Antígeno leucocitário humano DR

IL-1 β - Interleucina 1 beta

ISCT- Sociedade internacional de terapia celular

LIF- Fator inibidor de leucemia

LTR- Repetição terminal longa

MHC- Complexo principal de histocompatibilidade

PBS- Tampão fosfato salino

SDF-1- Fator derivado da célula estromal 1

SFB- Soro fetal bovino

VEGF - Fator de crescimento do endotélio vascular

VEV- Vírus da estomatite vesicular

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
1.1. CÉLULAS-TRONCO.....	11
1.2. CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS.....	15
1.3. G-CSF.....	22
1.4. IGF-1.....	25
1.5. MODIFICAÇÃO GENÉTICA DE CTM PARA SUPEREXPRESSÃO DE FATORES.....	26
2. OBJETIVOS	32
2.1. OBJETIVO GERAL.....	32
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	32
3. MATERIAIS E MÉTODOS	33
3.1. DESENHO EXPERIMENTAL.....	33
3.2. OBTENÇÃO DAS SEQUÊNCIAS CODIFICANTES DE hIGF-1 E HG-CSF.....	34
3.3. SISTEMA DE EXPRESSÃO LENTIVIRAL DE SEGUNDA GERAÇÃO.....	35
3.4. AMPLIFICAÇÃO DAS SEQUÊNCIAS CODIFICANTES DE hIGF-1 E hG-CSF.....	37
3.5. CLONAGEM.....	38
3.5.1. Digestão	38
3.5.2. Ligação e transformação	39
3.5.3. Análise de restrição	39
3.5.4. Sequenciamento dos plasmídeos extraídos	40
3.6. PRODUÇÃO LENTIVIRAL.....	42
3.7. TITULAÇÃO LENTIVIRAL.....	43
3.8. TRANSDUÇÃO DAS CÉLULAS-ALVO.....	43
3.9. CARACTERIZAÇÃO.....	43
3.9.1. qRT PCR	44
3.9.2. Elisa	45
3.9.3. Imunofenotipagem	45
3.9.4. Indução de diferenciação	46
3.10. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	47
4. RESULTADOS	48
4.1. AMPLIFICAÇÃO DAS SEQUÊNCIAS CODIFICANTES DE HIGF-1 E HG-CSF.....	48

4.2. CLONAGEM.....	49
4.2.1. Digestão.....	49
4.2.2. Ligação e transformação.....	49
4.2.3. Análise de restrição.....	49
4.3. SEQUENCIAMENTO	50
4.4. PRODUÇÃO LENTIVIRAL.....	52
4.5. TITULAÇÃO LENTIVIRAL.....	54
4.6. TRANSDUÇÃO LENTIVIRAL	55
4.7. CARACTERIZAÇÃO	57
4.7.1. qRT-PCR	57
4.7.2. Elisa.....	58
4.7.4. Imunofenotipagem.....	59
4.7.4. Indução de diferenciação	60
5. DISCUSSÃO.....	62
6. CONCLUSÃO	68
7. REFERÊNCIAS	69
8. ANEXOS.....	80
8.1. SOLUÇÕES.....	80
8.2. SEQUENCIAMENTO DE PEGIP_IGF-1	81
8.3. SEQUENCIAMENTO DE PEGIP_G-CSF.....	83

1.INTRODUÇÃO

1.1. CÉLULAS-TRONCO

Por definição, células-tronco são células indiferenciadas, capazes de auto-renovação e diferenciação em, no mínimo, um tipo celular (HALL;WATT, 1989). A auto-renovação é o processo em que uma célula-tronco mãe se divide, simétrica ou assimetricamente, para gerar ao menos uma célula-filha, a qual retém o potencial de diferenciação similar ao da célula-tronco mãe (HE et al., 2009).

Como a maioria das células maduras têm um tempo de vida limitado, as duas propriedades inerentes às células-tronco, tanto a capacidade de repor células específicas senescentes, como a de perpetuar-se através da autorrenovação, são fundamentais para manutenção da homeostase tecidual ao longo da vida de um organismo (WATT; HOGAN, 2000). Estas características tornam as células-tronco extremamente importantes para o campo da terapia celular e da medicina regenerativa.

As células-tronco são frequentemente subclassificadas de acordo com seu potencial de diferenciação em um ou mais tipos celulares, ou de acordo com sua espécie e tecido de origem. Os tipos de células-tronco apresentam diferentes níveis de plasticidade, ou seja, variam em sua capacidade de gerar células tecido-específicas. Sendo assim, estas podem ser qualificadas como: totipotentes, pluripotentes, multipotentes ou unipotentes (Figura 1).

As células-tronco totipotentes são o tipo mais versátil, com potencial de gerar qualquer e todas as células que compõem o organismo. O zigoto, resultado da união de um espermatozóide com um ovócito (MOORE; PERSUAD, 2008), é totipotente, assim como as células que compõem o embrião primário (MITALIPOV; WOLF, 2009). Conforme a evolução do estágio de desenvolvimento embrionário, a potencialidade de diferenciação de suas células vai decaindo (Figura 1).

De dois a onze dias após a concepção, o zigoto se divide em, aproximadamente, 150 células, que formam uma "bola oca", chamada blastocisto. O blastocisto é constituído por uma massa de células indiferenciadas (MOORE; PERSUAD, 2008), que é utilizada para estabelecer linhagens de células-tronco embrionárias pluripotentes (Figura 1). Células pluripotentes se caracterizam por originar todos os tipos celulares, no entanto, ao contrário das células totipotentes, estas não são capazes de se desenvolver num feto ou animal adulto (MITALIPOV; WOLF, 2009).

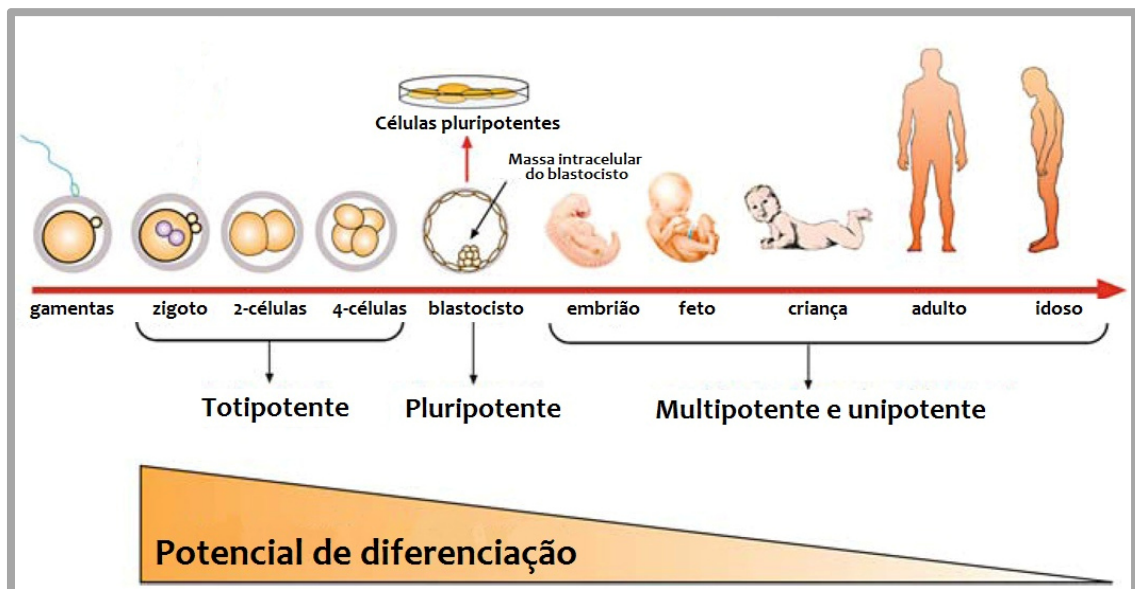


Figura 1: Plasticidade das células-tronco. A ontogenia começa a partir de uma única célula, o zigoto. O zigoto e cada blastômero do embrião primário são totipotentes, com o potencial de desenvolver um organismo inteiro. Conforme o desenvolvimento se desenrola, a plasticidade de células-tronco declina gradualmente, resultando em células pluripotentes, multipotentes, unipotentes e células somáticas terminalmente diferenciadas (adaptado de MITALIPOV; WOLF, 2009).

Células progenitoras que são capazes de se diferenciar em mais de um tipo celular maduro são consideradas multipotentes. Células-tronco somáticas, como hematopoiéticas ou mesenquimais, se enquadram nesta categoria. Já as células denominadas unipotentes são capazes de gerar apenas um tipo celular, o próprio. O seu potencial de auto-renovação é exatamente o que as distingue das células não-tronco (MITALIPOV; WOLF, 2009). As células-tronco epiteliais são um exemplo de unipotência. A maioria dos tecidos epiteliais se autorrenova devido a presença de células progenitoras epiteliais (BLANPAIN et al., 2007).

Apesar da importância do potencial de diferenciação das células-tronco para sua classificação, pesquisas demonstram que uma categorização que tem por fundamento somente essas características pode induzir equívocos. De acordo com a literatura, podemos afirmar que a distinção entre pluripotência e multipotência está ficando cada vez mais confusa, uma

vez que algumas células têm apresentado uma plasticidade maior do que o previamente esperado (JIANG et al., 2002). Isto ocorre com as células-tronco mesenquimais que vêm demonstrando capacidade de transdiferenciação em diversos tipos celulares (WAGERS; WEISSMAN, 2004). Esta contradição é abordada no decorrer do trabalho.

Com isso, a classificação mais empregada para distinguir os tipos de células-tronco é baseada em sua origem ou localização. Dependendo de sua procedência, estas podem ser incluídas em duas categorias: células-tronco embrionárias ou células-tronco não-embrionárias, sendo a última mais frequentemente aplicada nas técnicas de terapia celular regenerativa (VATS et al., 2002).

As células-tronco embrionárias são derivadas da massa interna do blastocisto, ou embrioblasto, (Figura 1) e são capazes de se diferenciar em tipos celulares das três camadas germinativas: endoderme, ectoderme e mesoderme. Em 1981, foram publicados dois protocolos de cultivo de células-tronco embrionárias de blastocistos de camundongos (KAUFMAN et al., 1981; MARTIN, 1981), viabilizando, portanto, a manutenção destas células *in vitro* sem alterações aparentes em seu potencial de diferenciação. A reintrodução destas células em blastocistos resultam em camundongos quiméricos funcionais, o que demonstra que as células-tronco embrionárias contribuem para o desenvolvimento de todas as linhagens celulares, inclusive a germinativa (BRADLEY et al., 1984).

O estabelecimento de linhagens de células-tronco embrionárias humanas derivadas de embriões fertilizados *in vitro*, assim como a comprovação de seu potencial de diferenciação (THOMSON, 1998), implicaram em grandes discussões relacionadas à possibilidade de sua aplicação na medicina regenerativa. No entanto, controvérsias éticas, assim como seu potencial oncogênico (STEVENS, 1967) e imunogênico (DRUKKER et al., 2002), dificultaram a pesquisa e aplicações clínicas utilizando estas células.

As células-tronco não-embrionárias são também chamadas de células-tronco adultas ou células-tronco somáticas, grupo que inclui células-tronco hematopoiéticas (CTH), células-tronco mesenquimais (CTM), epiteliais, neurais, dentre outras (KÖRBLING; ESTROV, 2003). As células-tronco adultas compõem órgãos ou tecidos completamente desenvolvidos e têm por função manter a especificidade e integridade do tecido através da regeneração e reposição celular homeostática (WAGERS; WEISSMAN, 2004).

Dentre as células-tronco multipotentes, as hematopoiéticas integram a população melhor caracterizada até os dias atuais. Estas são responsáveis por gerar todas as linhagens

celulares encontradas no sangue maduro: eritro-mielóide e linfóide. A medula óssea adulta, o sangue do cordão umbilical e o sangue periférico são fontes de células-tronco hematopoiéticas, que permitem tanto a manipulação experimental em estudos pré-clínicos, assim como a obtenção de células para transplantes em pacientes com determinadas doenças hematológicas, imunodeficiências ou falhas funcionais medulares (COPELAN, 2004).

Idealmente, a obtenção de células-tronco para utilização na medicina regenerativa deve ser proveniente de fontes acessíveis, coletadas por meio de procedimentos pouco invasivos. As células devem estar disponíveis em abundância, além da comprovação prévia de sua segurança e eficácia em transplantes autólogos ou alogênicos. Um tipo de célula-tronco adulta tem gerado bastante interesse no campo da terapia celular por conta das suas propriedades biológicas: a célula-tronco mesenquimal (CTM), que é o objeto de pesquisa desta dissertação.

Em 2011, existiam 206 estudos registrados no banco de dados público de ensaios clínicos (<http://clinicaltrials.gov/>) utilizando células-tronco mesenquimais para uma grande variedade de disfunções, como diabete, esclerose múltipla, doenças do coração, pulmão, cérebro, fígado, lesão da medula óssea, entre outras (Figura 2). Muitos dos estudos finalizados

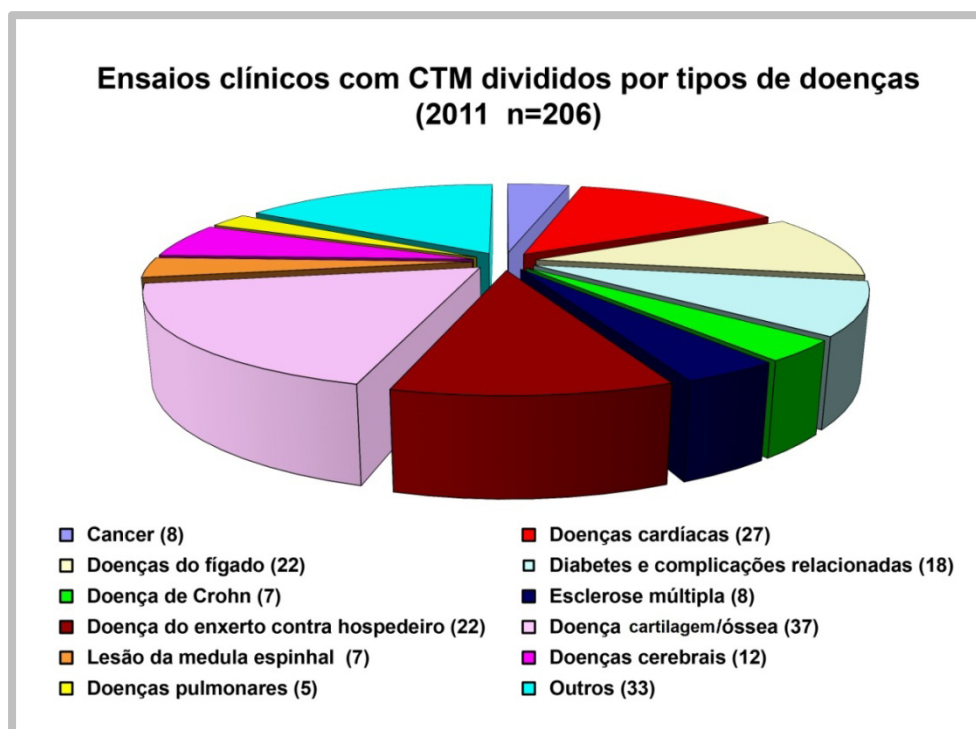


Figura 2: Número de estudos clínicos, classificados por tipo de doença, envolvendo células-tronco mesenquimais, em andamento no ano de 2011 (adaptado de WANG et al., 2012).

demonstraram a eficácia da infusão de CTMs para doenças como isquemia do miocárdio, cirrose, infarto, esclerose lateral amiotrófica e doença do enxerto contra o hospedeiro (WANG et al., 2012).

1.2. CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS

Na década de 1960, Friedenstein e colaboradores descreveram, pela primeira vez, a existência de outro tipo de células progenitoras presentes na medula óssea, além das CTH. Em um ensaio *in vivo*, eles demonstraram que células da medula óssea carregadas em câmaras e implantadas em ratos começaram a formar osteoblastos cubóides e nódulos mineralizados semelhantes a osso (FRIEDENSTEIN; PIATETZKY; PETRAKOVA, 1966).

Através de experimentos *in vitro*, eles demonstraram que quando células da medula óssea eram plaqueadas em baixa densidade, poucas delas aderiam, proliferavam e geravam colônias. Por conta da grande aderência de células-tronco mesenquimais às placas de cultura, foi possível eliminar as células não-aderentes, principalmente as CTH e sua progênie. Algumas das células que permaneceram aderidas apresentavam morfologia fusiforme, similares a fibroblastos, e eram capazes de formar colônias derivadas de uma única célula. Esta característica foi definida por Friedenstein como "unidades fibroblásticas formadoras de colônia" (do inglês colony forming units-fibroblastic - CFU-f) (FRIEDENSTEIN et al., 1974).

Quando as CFU-f foram implantadas *in vivo*, elas diferenciaram em tecido de osso e estroma medular, confirmando que o ambiente da medula óssea compõem o nicho de duas populações progenitoras distintas. Estas células foram então nomeadas células-tronco estromais (OWEN; FRIEDENSTEIN, 1988).

As observações iniciais de Friedenstein foram ampliadas por outros pesquisadores, que demonstraram a multipotencialidade destas células à partir de sua diferenciação em osteoblastos, condroblastos e adipócitos. Com base em sua plasticidade, estas células foram denominadas células-tronco mesenquimais (do inglês mesenchymal stem cells) (CAPLAN, 1991; HAYNESWORTH et al., 1992). Ainda hoje, nota-se que não existe um consenso quanto a nomenclatura destas células. Portanto, neste trabalho, nós adotamos o termo células-tronco mesenquimais (CTM).

Embora as CTM tenham sido isoladas originalmente da medula óssea, sabe-se, atualmente, que elas estão presentes no tecido conectivo de muitos órgãos, como: tecido

adiposo (ZUK et al., 2001), músculo esquelético (WILLIAMS et al., 1999), pulmão fetal (HUA et al., 2009), fluído amniótico (ANKER et al., 2003), placenta (ANKER et al., 2004), além de fígado e sangue fetais (CAMPAGNOLI et al., 2001). No entanto, os processos de identificação e isolamento de CTM *in vivo* ainda são prejudicados pela ausência de marcadores específicos para CTM. Deste modo, o isolamento ainda baseia-se na propriedade de aderência ao plástico, o que resulta numa população heterogênea de células aderentes.

Em humanos, as CTM são geralmente isoladas à partir de um aspirado da medula óssea provenientes da crista ilíaca superior da pelve (PITTENGER et al., 1999). Já em roedores, estas células são obtidas da diáfise da tibia ou fêmur (PEREIRA et al., 1995). Visto que as CTM representam a menor fração do total de células nucleadas da medula, estas são selecionadas e expandidas utilizando técnicas de cultura celular (CAMPAGNOLI et al., 2001).

Frequentemente, o aspirado da medula óssea é submetido a fracionamento por gradiente de densidade utilizando soluções como Percoll. Em seguida, as células são plaqueadas e cultivadas em meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) na presença de 10% de soro fetal bovino (SFB) (PITTENGER et al., 1999). As culturas primárias são mantidas por 12-16 dias, até que as células hematopoiéticas não-aderentes sejam eliminadas. É importante ressaltar que além da fonte de obtenção, os métodos de isolamento, as condições de cultura, o número de passagens e a idade do doador são fatores que influenciam nas funções biológicas de CTM, que podem, deste modo, afetar sua eficácia terapêutica (PHINNEY; PROCKOP, 2007).

Dada a heterogeneidade de CTM e os diferentes métodos de isolamento e cultivo descritos na literatura, o comitê de células-tronco mesenquimais e teciduais da Sociedade Internacional de Terapia Celular (ISCT) propôs critérios mínimos para sua identificação. Para que células sejam qualificadas como CTM humanas, estas devem ter a habilidade de (1) aderir ao plástico em condições de cultivo padronizadas, (2) Apresentar uma expressão de no mínimo 95% dos marcadores CD105, CD73 e CD90, assim como não expressar, ou apresentar uma expressão menor do que 2% dos marcadores CD45, CD34, CD14 ou CD11b, CD79 ou CD19 e HLA-DR, (3) diferenciar *in vitro* em osteoblastos, condroblastos e adipócitos (DOMINICI et al., 2006).

A terapia com células-tronco consiste no transplante autólogo ou alogênico destas em pacientes ou modelos animais, através da infusão local ou sistêmica. Por conta de todas as

propriedades biológicas descritas anteriormente, CTM já são utilizadas em práticas clínicas para regeneração do tecido ósseo, e podem também ser úteis para o tratamento de uma ampla variedade de doenças (HORWITZ et al., 1999).

Quarto e colaboradores (2001) relataram o sucesso no tratamento de pacientes com defeitos ósseos submetidos a tratamento com CTM autólogas. A capacidade de diferenciação de CTM em osso, cartilagem e gordura induziu diferentes investigadores a empregá-las no tratamento de doenças do tecido ósseo, cartilagem e tendões (KRAMPERA et al., 2006).

O transplante de CTM alogênicas tem sido empregado em crianças com osteogênese imperfeita. Os estudos evidenciam que há integração das CTM enxertadas no tecido ósseo, assim como diferenciação em osteoblastos funcionais. Foram observadas também evoluções significativas como: aumento da estatura e da densidade mineral óssea das crianças tratadas, chegando próximo aos números esperados para crianças saudáveis (HORWITZ et al., 1999; HORWITZ et al., 2002; LE BLANC et al., 2005).

Alguns estudos têm indicado que CTM podem originar células de outras linhagens além da mesenquimal. Inicialmente, foi demonstrado que CTM implantadas em cérebros de camundongos neonatos foram capazes de se diferenciar em astrócitos (KOPEN; PROCKOP; PHINNEY, 1999). Em 2007, Yan e colaboradores demonstraram que CTM injetadas nos pulmões de camundongos submetidos a irradiação torácica foram capazes de se diferenciar em células pulmonares funcionais, como células epiteliais e endoteliais (YAN et al., 2007). Outros estudos utilizando modelos animais de lesão pulmonar indicaram a transdiferenciação de CTM em pneumócitos tipo I (KOTTON et al., 2001) ou aquisição de características fenotípicas das principais células que compõem o parênquima pulmonar, como de fibroblastos, miofibroblastos e de células epiteliais (ROJAS et al., 2005).

As CTM submetidas a condições específicas podem se transdiferenciar em células da macroglia, hepatócitos, e neurônios. Em 1999, Petersen e colaboradores apontaram as CTM da medula óssea de ratos como potenciais fontes de células ovais hepáticas (PETERSEN et al., 1999). Outro estudo demonstrou a capacidade de diferenciação de CTM em hepatócitos, em resposta à indução com HGF, além de sua funcional integração aos fígados de camundongos transplantados (AURICH et al., 2006).

Kopen e colaboradores (1999) foram os primeiros a demonstrar que CTM injetadas no sistema nervoso central de camundongos recém-nascidos apresentavam características morfológicas e fenotípicas de neurônios e astrócitos. Outro trabalho mostrou que uma

população de células neurais foi gerada à partir de CTM modificadas geneticamente para expressão do domínio intracelular Notch, e induzida com determinados fatores trópicos (DEZAWA et al., 2004). A habilidade de transdiferenciação de CTM em linhagens neurais levanta a possibilidade de utilização destas no tratamento de doenças neurodegenerativas como AVC, Parkinson e lesões traumáticas (SANCHEZ-RAMOS et al., 2000).

Orlic e colaboradores (2001) relataram sucesso na regeneração do miocárdio de camundongos infartados, após o tratamento com CTM. Os resultados sugerem que CTM podem ser úteis na terapêutica de doenças coronárias. Em seguida, outro grupo de pesquisadores demonstrou saldos impressionantes na regeneração do miocárdio em cinco pacientes que sofreram infarto e foram tratados com CTM autólogas (STAMM et al., 2003). Um estudo clínico envolvendo um grupo de 69 pacientes que foi submetido à intervenção coronária percutânea, com até 12 horas após o infarto do miocárdio, foi randomizado para receber infusão de CTM autólogas ou placebo. Os dados evidenciam que o tratamento com CTM resultou em significativa melhora na função ventricular esquerda (CHEN et al., 2004).

Por outro lado, existe um trabalho no qual pesquisadores demonstram que as CTM adotam um fenótipo cardíaco, expressando marcadores cardioespecíficos, porém falham na diferenciação em cardiomiócitos funcionais *in vitro*. Com base nos dados obtidos neste estudo, é concebível que algumas das melhoras cardíacas que são descritas após infusão com CTM em doenças do coração não estejam relacionadas com a geração de novos cardiomiócitos (ROSE et al., 2008). Tais resultados legitimam a necessidade de mais estudos que esclareçam os mecanismos de ação de CTM no reparo tecidual.

Acredita-se que as CTM podem melhorar as condições após o infarto por pelo menos 3 mecanismos: (1) Aumento da vascularização através da diferenciação em células endoteliais; (2) reparo miogênico através da diferenciação em cardiomiócitos; (3) produção de citocinas e outros fatores que promovem o reparo miogênico e previnem fibrose (ORLIC et al., 2001). Logo, os efeitos benéficos das CTM são mediados não somente através de sua diferenciação em cardiomiócitos, mas também devido a sua capacidade de secretar uma grande quantidade de moléculas bioativas.

Takahashi e colaboradores (2006) demonstraram a produção de várias citocinas por células mononucleares da medula óssea, incluindo VEGF, IL-1 β , PDGF e IGF-1. Estas citocinas contribuíram para melhora da função cardíaca em ratos submetidos ao infarto do miocárdio. Após o tratamento dos animais com o sobrenadante de células mononucleares da

medula óssea, foram observados inibição de apoptose de cardiomiócitos, preservação da capacidade contráctil do miocárdio e indução de angiogênese.

Apesar das evidências sobre a capacidade de CTM se diferenciarem e se transdiferenciarem em células oriundas de outras camadas do folheto germinativo, além da mesoderme, a sua contribuição real na regeneração, através de significativa integração tecidual e diferenciação em tipos celulares tecido-específicos, ainda é controversa. Contudo, estudos mais recentes vêm mostrando que as CTM contribuem para o reparo tecidual também através da secreção de fatores, que estimulam a proliferação e diferenciação de células progenitoras encontradas nos tecidos, reduzem as reações inflamatórias, dentre outras funções. Esta habilidade de alteração do microambiente local pode contribuir mais significativamente no processo de reparo tecidual do que a sua capacidade de diferenciação (PHINNEY; PROCKOP, 2007).

A modulação do sistema imune por CTM foi observada pela primeira vez em 2000, quando Liechty e colaboradores constataram que CTM apresentavam uma característica imunológica que permitia a sua permanência em um ambiente xenogênico (LIECHTY et al., 2000). Em seguida, foi constatado que CTM de macaco alteram a reatividade linfocítica sobre células alogênicas, através da supressão da proliferação de células T (BARTHOLOMEW et al., 2002). O conceito de imunossupressão por CTM vem desde então sendo investigado por diferentes laboratórios, já que estes achados poderiam ultrapassar a barreira que existe na realização de transplantes alogênicos. Estes estudos redirecionaram o foco sobre as funções terapêuticas de CTM, gerando interesse na caracterização de suas atividades imunorregulatórias.

As CTM apresentam um fenótipo de baixo potencial imunogênico revelando baixos níveis de expressão de MHC classe II e de moléculas co-estimulatórias como CD40, CD80 e CD86 (TSE et al., 2003). A expressão reduzida de moléculas co-estimulatórias pode explicar o mecanismo pelo qual CTM evadem-se do sistema imune após transplante em um hospedeiro alogênico. Esta característica favorece a possibilidade de explorar as CTM como "doadoras universais", sem necessidade de imunossupressão. Existem muitos trabalhos descrevendo a utilização clínica de CTM alogênicas com incompatibilidade imunológica, que revelam baixa evidência de imuno-rejeição ou desenvolvimento de doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH) (HORWITZ et al., 1999; KOC et al., 2002; NASEF et al., 2003). Com isso, a pesquisa tem focado em elucidar o papel destas células na modulação do sistema

imune, assim como o seu papel farmacológico através da secreção de moléculas biologicamente importantes no contexto da regeneração tecidual.

O papel das CTM, no estroma medular, principalmente na manutenção do nicho hematopoiético, vem sendo bastante estudado, com o objetivo de empregar CTM em terapias de células estromais (MAJUMDAR et al., 1998). Rafi e colaboradores demonstraram que a hematopoiese em culturas de células endoteliais derivadas da medula óssea é dependente de fatores como G-CSF, GM-CSF, LIF e ligante c-Kit (RAFII et al., 1997). Estes achados foram fundamentais para o emprego de CTM no transplante de medula óssea. O racional do co-transplante utilizando CTM seria sua contribuição para integração do enxerto hematopoiético assim como a prevenção de DECH, principalmente por conta de suas propriedades imunorregulatórias (BATTIWALLA; HEMATTI, 2009).

Linfócitos T de humanos ou de camundongos cultivados na presença de CTM não proliferam, mesmo após indução mitogênica ou de estímulos antigênicos. Análises do ciclo celular demonstraram que estas células estavam estacionadas na fase G0-G1, impedindo a divisão celular (GLENNIE et al., 2005). Resultados similares foram encontrados para outros integrantes do sistema imune, como: linfócitos B (CORCIONE et al., 2006), células natural killer (NK) (SPAGGIARI et al., 2006).

As CTM demonstraram-se também capazes de afetar outras funções das células do sistema imunológico como: alterar a citotoxicidade e a secreção de citocinas de células T (RASMUSSEN et al., 2003) e células NK (SPAGGIARI et al., 2006); afetar as propriedades quimiotáticas de linfócitos B, assim como sua maturação e secreção de anticorpos (CORCIONE et al., 2006); influenciar sobre a ativação, maturação e apresentação de antígenos de células dendríticas (BEYTH et al., 2005).

As CTM estimulam outros tipos celulares tanto pelo contato célula-célula, como pela liberação de uma ampla variedade de citocinas e fatores de crescimento. Análises proteômicas das moléculas secretadas por CTM (secretoma) revelaram que a maioria das proteínas escaneadas e moléculas detectadas eram fatores de crescimento, citocinas e quimiocinas (PAREKKADAN et al., 2007). Algumas das moléculas secretadas, incluindo, VEGF, HGF, IGF-1 e G-CSF podem aumentar a proliferação endotelial e epitelial, inibir apoptose e inflamação excessiva, além de promover angiogênese (BARANIAK; MCDEVITT, 2010). Desse modo, a eficácia terapêutica atribuída as CTM depende de seu potencial local ou de sua atividade parácrina. Atualmente, considera-se que as terapias empregadas no tratamento

cardíaco utilizando CTM operam sobretudo, facilitando o processo de reparo endógeno (WANG; LI, 2007).

As propriedades imunomodulatórias de CTM fazem delas excelentes agentes imunossupressores, que podem ser utilizados no transplante de medula, órgãos sólidos, também no tratamento de doenças inflamatórias, câncer, DECH, e outras doenças do sistema imune. Além disso, a secreção de tantos fatores de crescimento e moléculas biologicamente ativas, podem ser direcionadas através de citocinas tipicamente presentes no local lesionado. Isto sugere que a secreção destes fatores seja contextual, ou seja, a produção de citocinas por CTM deve ser dependente de demandas específicas, como tipo e grau da lesão (WAGNER et al., 2009).

Uma técnica para aprimorar e direcionar a eficiência terapêutica de CTM, com base em sua propriedade "farmacológica", tem sido modificar geneticamente estas células para superexpressão de proteínas relevantes no desencadeamento de uma doença específica. O principal objetivo desta técnica é suplementar o repertório de secreção de CTM não modificadas com um fator definido, o qual tenha ação reparatória no tecido lesionado (WAGNER et al., 2009).

Está bem estabelecido que CTM estimulam a recuperação e regeneração através da secreção de diversos fatores pró-regenerativos. Estudos *in vitro* documentaram a secreção de fatores anti-inflamatórios, angiogênicos, neurotróficos, imunomoduladores e antifibróticos (CAPLAN; DENNIS, 2006). Neste trabalho nós enfocaremos nas atividades parácrinas e autócrinas dos fatores de crescimento G-CSF e IGF-1, ambos produzidos e secretados por CTM humanas (SCHINKOTHE; BLOCH; SCHMIDT, 2008).

Considerando todas as propriedades inerentes as CTM descritas anteriormente, assim como as aplicações terapêuticas já em curso, a presente pesquisa tem como objetivo gerar linhagens de células-tronco mesenquimais de camundongo para superexpressão de dois fatores de crescimento humanos, IGF-1 e G-CSF. A modificação genética de CTM para uma maior transcrição de cada fator poderia contribuir direta ou indiretamente com efeitos benéficos no reparo de tecidos lesionados, através de atividades anti-apoptóticas, mitogênicas, motogênicas e angiogênicas.

1.3. G-CSF

O G-CSF é uma citocina conhecida por induzir a mobilização de células derivadas da medula óssea para o sangue periférico (METCALF, 1989). A glicoproteína humana, G-CSF, existe em duas formas, uma com 174 e outra com 180 aminoácidos. A forma ativa é a de 174 aminoácidos com uma cisteína livre na posição 17, e duas pontes dissulfeto entre as cisteínas 36-42 e 64-74, que são necessárias para atividade biológica de G-CSF (DEMETRI; GRIFFIN, 1991).

As ações de G-CSF são mediadas pela interação com seu receptor específico de alta afinidade, o G-CSFR, expresso na superfície da membrana de células da linhagem hematopoiética, tais como: monócitos, neutrófilos maduros, algumas linhagens linfóides, progenitores mielóide e determinadas linhagens de células leucêmicas (AVALOS, 1996). Esse receptor também foi encontrado em células de origem não hematopoiética, como células endoteliais e miócitos (CALHOUN et al., 1999; LI et al., 2006).

A região citoplasmática de GSF-R pode ser subdividida em um domínio proximal a membrana, que contém dois subdomínios conservados, conhecidos como "box 1" e "box 2", e um domínio distal à membrana, que contém uma sequência de aminoácidos menos conservada, "box 3" (FUKUNAGA et al., 1990). A ligação de G-CSF desencadeia diferentes vias de sinalização e respostas biológicas que estão associadas às vias janus quinase (JAK), STAT/Ras, proteína quinase ativadora de mitogênese (MAPK) e fosfatidil-inositol-3 quinase (PI3K), e AKT (Figura 3). Foi observado que G-CSF pode induzir a expressão de genes como *SOCS3* e *GATA-3*, envolvidos na regulação do sistema imune. *GATA-3* controla a diferenciação de células T helper, direcionando uma resposta Th2. *SOCS3* regula a ativação e diferenciação de linfócitos T (revisado em XIAO et al., 2007).

Um trabalho recente demonstrou que o G-CSF atenua a citotoxicidade de células NK (SU et al., 2012). O G-CSF tem um importante papel na defesa do sistema imune contra infecções, inflamação e processos de reparo (ANDERLINI et al., 1998). Em um modelo animal de hepatite fulminante, foi mostrado que G-CSF reduziu os danos hepáticos e aumentou a capacidade de proliferação do fígado (THEOCHARIS et al., 2003). Estes dados demonstram a capacidade imunorregulatória desta citocina e corroboram sua importância como um agente com grande potencial terapêutico para diversas doenças. Apesar da grande disponibilidade do G-CSF para uso clínico, muitas questões considerando as respostas biológicas desencadeadas por este fator ainda continuam obscuras.

Sabe-se que as CTM da medula óssea mantém a hematopoiese, através da secreção de diversas citocinas hematopoiéticas, uma delas é G-CSF (SCHINKOTHE; BLOCH; SCHMIDT, 2007), que afeta a proliferação e diferenciação de progenitores de neutrófilos e linhagens granulocíticas (AVALOS et al., 1990) (Figura 4). Com isso, o G-CSF é bastante empregado em transplantes de medula óssea, com o objetivo de aumentar a quantidade de células hematopoiéticas. O G-CSF recombinante é utilizado também para o tratamento de neutropenias crônicas em pacientes recebendo terapia mielossupressiva (MORSTYN et al., 1989).

Com o objetivo de melhorar a mobilidade das células residentes da medula óssea, uma injeção intravenosa de G-CSF foi aplicada em modelos murinos. O tratamento demonstrou um aumento na mobilidade de células-tronco e progenitoras residentes da medula óssea para a

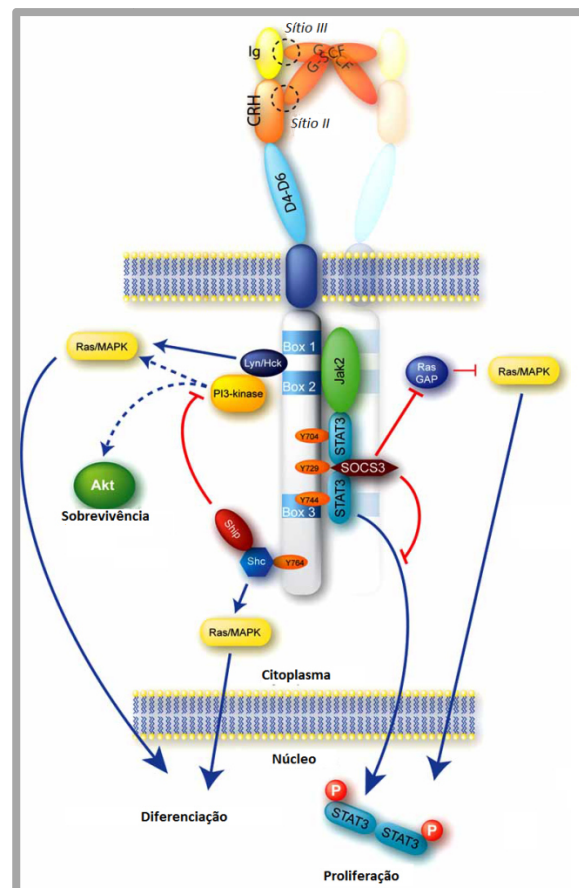


Figura 3: Representação esquemática da cascata de sinalização desencadeada por G-CSF. A dimerização do receptor de G-CSF, G-CSFR, causa a ativação de diferentes vias de sinalização, como Jak/STAT, MAPK e AKT via PI3-quinase, que induzem diferenciação, proliferação e sobrevivência celular (Adaptado de KLOCKE et al., 2006).

circulação sanguínea. Os autores sugerem que o G-CSF induz a quimiotaxia mediada pelo fator derivado de células estromais, o SDF-1, através do aumento da expressão de seu receptor de superfície, CXCR4, em células-tronco hematopoiéticas. Este estudo esclarece um dos mecanismos envolvidos na regulação biológica da mobilização de células progenitoras da medula óssea para circulação (PETIT et al., 2002).

Diversos trabalhos demonstram que o tratamento com G-CSF resulta em melhora cardíaca e redução da mortalidade após infarto do miocárdio em camundongos, possivelmente, através de regeneração do miocárdio e angiogênese (MINATOGUCHI et al., 2004; ADACHI et al., 2004 KAWADA et al., 2004). Um dos estudos publicados por nosso grupo, neste contexto, avaliou os efeitos de G-CSF na terapia da cardiomiopatia chagásica crônica. Os resultados demonstraram melhoras cardíacas estruturais, como redução de inflamação e fibrose, além de aumento do número de células inflamatórias apoptóticas (MACAMBIRA et al., 2009).

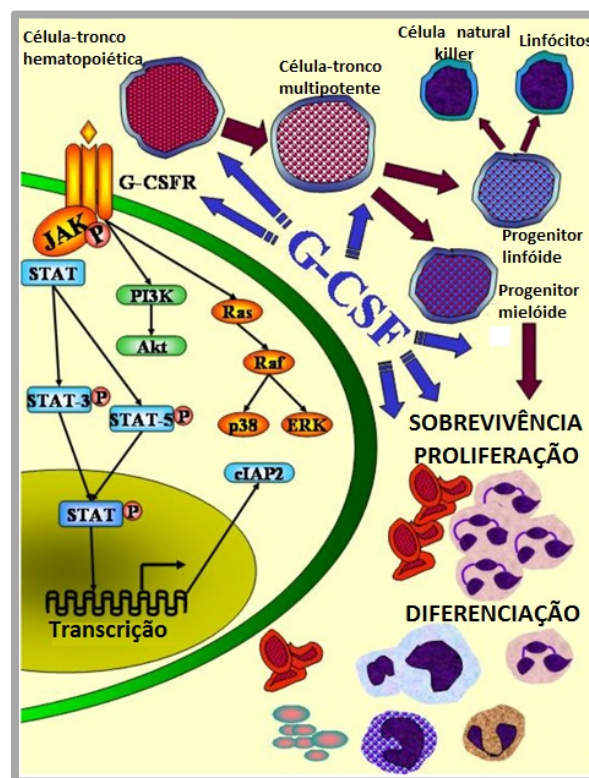


Figura 4: Representação esquemática das ações hematopoiéticas de G-CSF. G-CSF está diretamente envolvido na regulação de proliferação, sobrevivência e diferenciação de células hematopoiéticas. A via JAK2/STAT3 induz o aumento da expressão do inibidor de apoptose cIAP2 em neutrófilos humanos, o que resulta na sua sobrevivência. A ativação de STAT3 está relacionada à diferenciação mielóide. STAT5 parece estar envolvido na proliferação dependente de G-CSF (Adaptado de SOLAROGLU; JADHAV; ZHANG, 2007).

1.4. IGF-1

Os fatores de crescimento semelhante à insulina e seus receptores estão envolvidos na regulação proteica e exercem um potencial mitogênico e de diferenciação na maioria dos tipos celulares. O IGF-1 e o IGF-II pertencem a um sistema integrado de fatores de crescimento que inclui: três hormônios (insulina, IGF-1 e IGF-II), três receptores, e seis proteínas ligadoras de IGF. A principal função endócrina do IGF-1 é mediar os efeitos de crescimento do hormônio de crescimento, o GH (FLORINI; EWTON; COOLICAN, 1996).

O GH é responsável pela síntese e liberação de IGF-1 no fígado, controlando desta forma, o crescimento e diferenciação de diversos tecidos do corpo. A maior parte do IGF-1 circulante está ligada à proteínas ligadoras de IGF, que o protege contra proteólise e modulam sua interação com o receptor IGF-1R (DUAN, 2002).

IGF se liga com grande afinidade a dois receptores: o IGF-1R, que apresenta um alto grau de homologia com o receptor de insulina, e o IGF-2R (DAUGHADAY; ROTWEIN, 1989). Os efeitos da ligação de IGF-1 com seu receptor IGF-1R, ao menos *in vitro*, consiste em rápidos efeitos anabólicos no metabolismo de carboidratos e proteínas, ou efeitos de proliferação e diferenciação à longo prazo (JONES; CLEMMONS, 1995). Já *in vivo*, a cascata de sinalização ativada, após a ligação do IGF-1 com seu receptor, tem um papel central na regulação do desenvolvimento fetal e diferenciação celular (LIU et al., 1993).

A formação do complexo IGF-1/IGF-1R, ou seja, a ligação de IGF-1 à subunidade- α extracelular, induz a ativação de tirosinas quinases da subunidade- β que promovem a sinalização da cascata de proteínas PI3K/AKT/mTOR e RAS/RAF/MAPK (LAVIOLA; NATALICCHIO; GIORGINO, 2007). A ativação da via de sinalização PI3K/AKT, que também é conhecida como PKB, tem como função principal a síntese de óxido nítrico (NO) para anular moléculas pró-apoptóticas (KOOIJMAN, 2006). Já a ativação da via mitogênica de MAPK aumenta a diferenciação e proliferação celular (LEROITH, 1995) (figura 5).

Por conta de seus efeitos parácrinos, o IGF-1 aumenta a eficácia de transplantes através de diferentes funções. Um estudo demonstrou que o IGF-1 aumentou os benefícios provenientes do transplante de mioblastos em modelos de infarto crônico do miocárdio, através da prevenção de apoptose, indução de angiogênese e crescimento de mioblastos (KANEMITSU et al., 2006). Foi demonstrado também que IGF-1 aumenta a eficiência terapêutica do transplante de CTM em ratos, principalmente através da mobilização de CTM para área infartada do coração (GUO et al., 2008).

Li e colaboradores (2007) demonstraram que o IGF-1, assim como o G-CSF, aumenta a resposta migratória de células-tronco mesenquimais, através do aumento da expressão do receptor de SDF-1, CXCR4. O trabalho de Haider e colaboradores (2008) corrobora estes resultados, além de demonstrar extensiva angio- e miogênese no coração infartado.

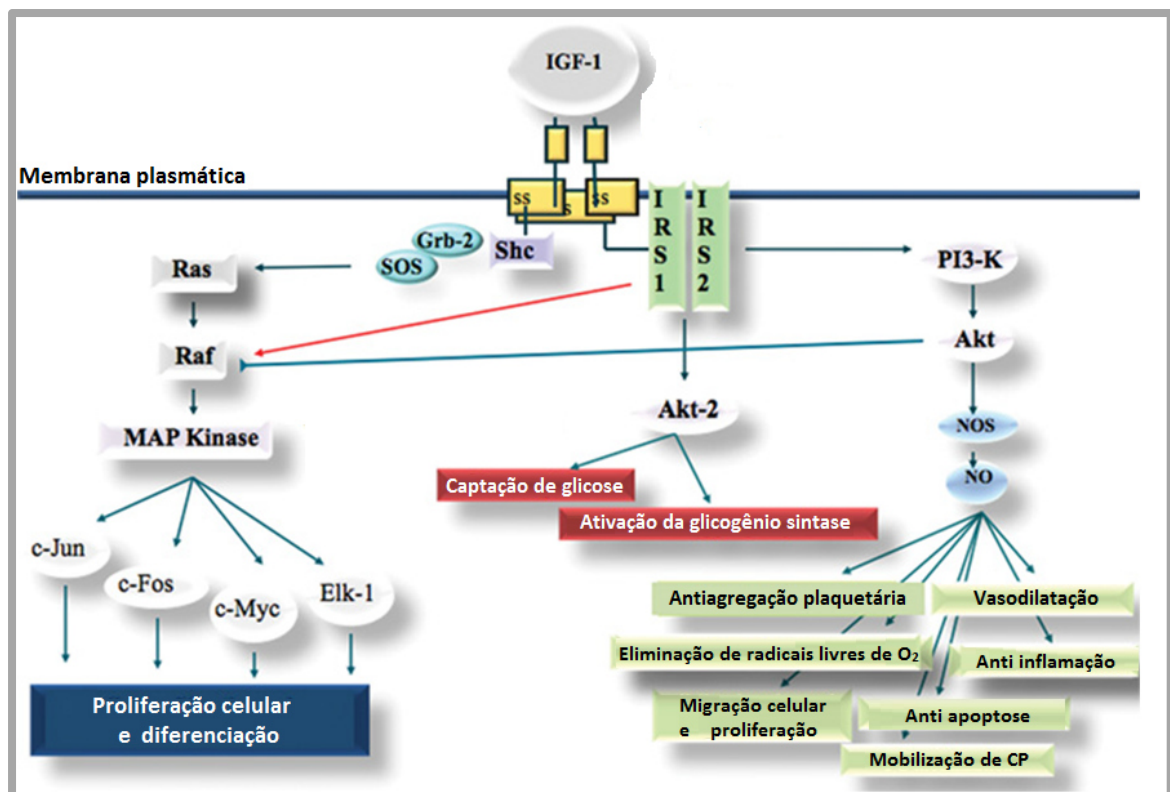


Figura 5: Representação esquemática da cascata de sinalização desencadeada por IGF-1. A ligação de IGF-1 em seu receptor específico resulta na auto-fosforilação de resíduos de tirosina, que induzem o recrutamento das proteínas adaptadoras Shc e IRS para subunidade intracelular β . Este processo ativa diferentes cascatas de sinalização através das vias PI3K-AKT e RAS/RAF/MEK/ERK, o que resulta no estímulo a tradução de determinadas proteínas, que implicam na progressão do ciclo celular, proliferação e crescimento aumentado e inibição de apoptose (Adaptado de CONTI et al., 2011). CP-células progenitoras.

1.5. MODIFICAÇÃO GENÉTICA DE CTM PARA SUPEREXPRESSÃO DE FATORES

Apesar dos grandes avanços no tratamento de diferentes doenças empregando CTM em ensaios pré-clínicos, sabemos das barreiras existentes quanto à sua aplicação terapêutica. Um dos principais problemas enfrentados é a extensiva perda de células após o transplante. Uma vez injetadas, as CTM apresentam baixa taxa de sobrevivência e integração ao tecido hospedeiro. O ambiente de lesão à que estas células são submetidas pode afetar sua biologia

através de fatores endógenos presentes em microambientes sujeitos a processos de inflamação e estresse oxidativo, que podem, por exemplo, induzir a apoptose de uma grande parte das células injetadas (SHI; LI, 2008).

A biotecnologia proporciona ferramentas que permitem superar limitações ainda existentes quanto às aplicações terapêuticas com CTM. Através da combinação da terapia celular com a terapia gênica, é possível aperfeiçoar as funções e a viabilidade de CTM. A engenharia genética de CTM aprimorou sua habilidade de migrar para os sítios específicos de doença, aumentou sua sobrevivência, a taxa de integração ao tecido lesionado e diferenciação (GNECCHI et al., 2008). Por exemplo, foi observado que CTM modificadas geneticamente para expressão de determinados genes anti-apoptóticos apresentaram melhoras funcionais expressivas na recuperação pós-infarto do miocárdio (GNECCHI et al., 2006; LI et al., 2007).

O conceito de terapia gênica consiste na modificação genética de células-alvo como forma de tratar doenças. Os procedimentos envolvem, em geral, a introdução de genes de interesse responsáveis pela produção de moléculas com fins terapêuticos. O transgene (gene de interesse) é transportado por um vetor constituído de DNA ou RNA, que carrega ainda outros elementos genéticos importantes para sua manutenção e expressão (NARDI et al., 2002).

Os vetores disponíveis para modificação gênica são subdivididos em vetores virais e não-virais. O grupo de vetores não-virais inclui o DNA na forma plasmidial, chamado DNA nu (do inglês "naked DNA") e lipossomas (LI; HUANG, 2000). Mesmo que vetores não-virais possam ser produzidos em grandes quantidades, e apresentem baixa toxicidade ou problemas imunológicos, a transferência gênica ainda é ineficiente (SOMIA; VERMA, 2000).

Dentre todos os sistemas de transferência gênica, os virais são os mais utilizados, devido principalmente à alta eficiência de transdução celular alcançada. Além disso, os sistemas virais utilizam vírus deficientes em replicação, através da deleção de genes responsáveis pela replicação viral. Esta característica garante a segurança do processo, já que o vírus é capaz de transferir seu material genético para células-alvo, mas não tem a habilidade de se replicar e dar continuidade a seu ciclo infeccioso (NARDI et al., 2002).

Os principais vírus utilizados como vetores de transferência gênica são: adenovírus, vírus adeno-associado e retrovírus (SOMIA; VERMA, 2000). O último grupo abrange os lentivírus, vetor empregado no desenvolvimento deste trabalho.

Os vetores adenovirais são obtidos da Família Parvoviridae. Estes mantêm a

habilidade de transduzir células em divisão ou quiescentes com eficiência e apresentam um amplo tropismo por células humanas. É relativamente fácil obter altos títulos de vetores recombinantes. No entanto, a grande imunogenicidade e a expressão transiente relacionadas a esses vetores limitam sua aplicação (NARDI et al., 2002; SOMIA; VERMA, 2000).

Já os vírus adeno-associados, são dependentes de genes extras para replicação, os quais são fornecidos por adenovírus. Apesar de apresentarem algumas vantagens como integração sítio-específica e ausência de patogenicidade, seus genes estruturais são citotóxicos para células empacotadoras, o que dificulta a obtenção de altos títulos de vetores recombinantes. Além disso, existe uma limitação no tamanho do transgene carregado e a possível perda de integração sítio-dirigida (NARDI et al., 2002; SOMIA; VERMA, 2000).

Os retrovírus são de grande relevância para técnica de transferência gênica. Este grupo apresenta genoma de RNA, constituído por três genes essenciais, os quais podem ser providos de forma separada para célula empacotadora, ou seja, alocados em plasmídeos distintos. 1) *gag* codifica a proteína estrutural; 2) *pol* codifica a transcriptase reversa/integrase; 3) *env* codifica a glicoproteína viral do envelope. O fato de separar os genes *gag* e *pol* de *env* oferece mais segurança, visto que, quanto mais plasmídeos houver no sistema, menor é a chance de haver recombinação ou geração de retrovírus competentes para replicação (figura 6). A maior limitação dos vetores retrovirais consiste em sua inability de infectar células quiescentes (SOMIA; VERMA, 2000).

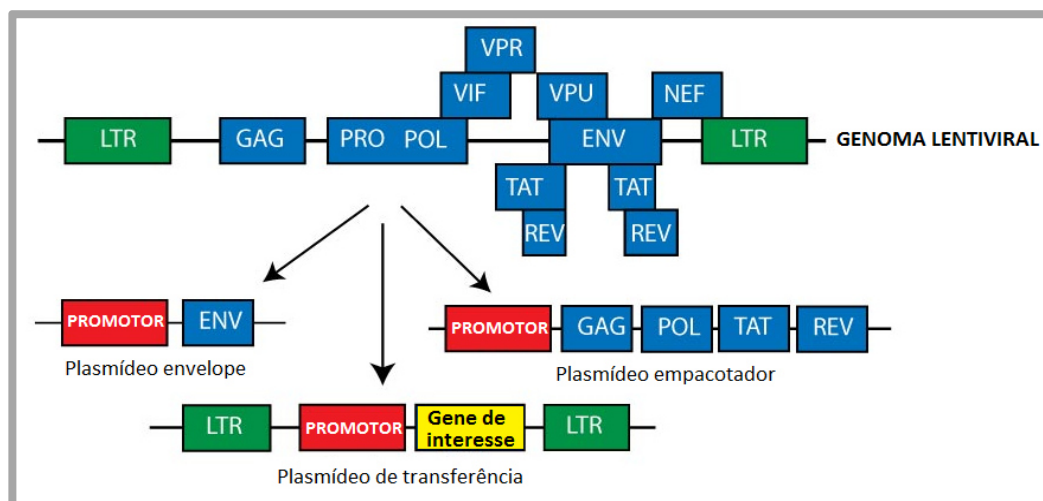


Figura 6: Representação esquemática de plasmídeos lentivirais baseados no genoma do HIV. (Adaptado de addgene.org).

Por outro lado, os lentivirus, que assim como os retrovírus fazem parte da família *retroviridae*, adquiriram a propriedade de transduzir células pós-mitóticas. A maioria dos vetores lentivirais baseia-se no genoma do HIV, sendo portanto, mais complexos. Além dos genes estruturais flanqueados por duas sequências terminais repetidas (LTR - do inglês long terminal repeats), estão presentes também, pelo menos, dois genes acessórios *tat* e *rev*, fundamentais para propagação *in vitro* (figura 6) (SOMIA; VERMA, 2000).

O produto do gene *env*, restringiria vetores baseados em HIV a infectar apenas células que expressam CD4. Por conta disso, geralmente, este gene é substituído com sequências *env* de outros vírus de RNA que abrangem um amplo espectro de infecção, assim como a glicoproteína do vírus da estomatite vesicular (VEV) (VERMA; SOMIA, 1997).

O ciclo replicativo do vírus é iniciado quando glicoproteínas do envelope viral interagem com seus receptores específicos, permitindo a adsorção do envelope com a membrana plasmática celular e liberação do capsídeo viral no citoplasma. A transcriptase reversa utiliza o RNA viral como molde para retro transcrevê-lo em DNA, que é transportado para o núcleo e integrado ao genoma da célula hospedeira através da formação de um complexo de pré-integração (KLARMANN et al., 2003). A maquinaria de transcrição celular é responsável pela síntese de RNA viral, que são encapsulados, formando então novas partículas virais. A integração do provírus no genoma celular permite que este seja replicado junto com o DNA hospedeiro e que essa sequência seja transferida para a progênie da célula infectada (figura 7) (TENÓRIO et al., 2008).

Para gerar vetores lentivirais que são utilizados na terapia gênica, o ciclo replicativo natural dos lentivírus é explorado. O transgene é clonado no vetor de transferência, que juntamente com os outros vetores componentes do sistema são essenciais para geração da partícula viral. No caso de um sistema lentiviral de segunda geração, como o utilizado neste trabalho, além do vetor de transferência, constituem o sistema, os vetores empacotador e envelope. O transgene é então incorporado ao núcleo da célula empacotadora, onde ele é transcrito em RNA. O transcrito de interesse é encapsulado em uma partícula retroviral, a qual é liberada da célula empacotadora. As partículas virais são então ministradas às células-alvo, nas quais o transgene deve se integrar, ser transcrito e sintetizado (figura 7) (VERMA; SOMIA, 1997).

Com isso, este trabalho consiste na modificação gênica de CTM de camundongo para superexpressão de hIGF-1 ou hG-CSF, através da utilização de um sistema lentiviral de

segunda geração. Com o objetivo de aprimorar a terapia com CTM, nós propomos a combinação da terapia celular com a terapia gênica. Como descrito previamente, os genes propostos exercem diferentes atividade biológicas, a maioria protetora, que nos impulsionam à utilizá-los como agentes terapêuticos.

Os trabalhos citados anteriormente envolvendo a superexpressão de um gene específico em CTM apresentaram resultados benéficos, como maior mobilidade para o local de lesão, maior sobrevivência, integração e diferenciação. Estes efeitos reduzem as dificuldades encontradas no emprego clínico de CTM.

Sabendo que as CTM exercem boa parte de seus efeitos terapêuticos através da secreção de diversos fatores, nossa hipótese é de que as linhagens geradas modificadas para superexpressão de IGF-1 ou G-CSF contribuam significativamente para os efeitos parácrinos mediados por CTM. Esperamos, portanto, que a eficiência terapêutica das linhagens geradas seja maior do que a observada em CTM não modificadas. Além disso, as linhagens geradas poderão ser utilizadas como ferramenta de pesquisa básica para elucidar os efeitos biológicos de IGF-1 e G-CSF em CTM, assim como para caracterizar e descrever os mecanismos de ação destas citocinas.

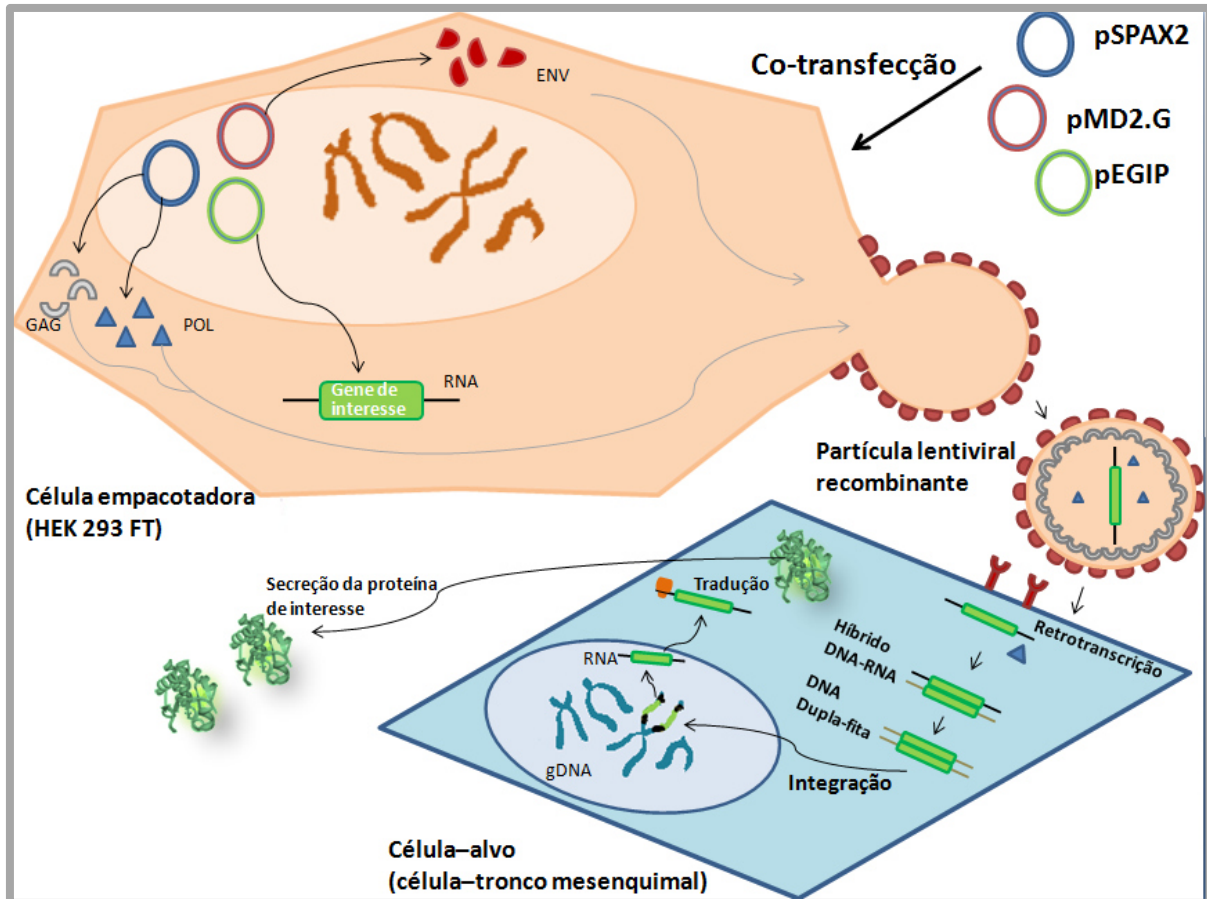


Figura 7: Representação esquemática da produção de vetores lentivirais. O ciclo de vida natural dos lentivirus é explorado para geração de partículas lentivirais recombinantes. a) A célula empacotadora (HEK 293 FT) é co-transfectada com o vetor de expressão (pEGIP), contendo o transgene de interesse, e com os outros vetores (pSPAX2 e pMD2.G) que contém os genes necessários (*gag* e *pol*) para montagem das partículas lentivirais. As partículas virais são coletadas e utilizadas para transdução da célula-alvo (célula-tronco mesenquimal). Os lentivirus ligam-se às células-alvo através da interação das glicoproteínas do envelope com seus receptores específicos. Após a adsorção da partícula lentiviral com a membrana plasmática, o capsídeo viral é desfeito. O processo de retro-transcrição se inicia, em seguida, levando à formação de uma fita-dupla de DNA contendo o gene de interesse e os genes necessários para integração. Com o gene de interesse integrado ao gDNA da célula-alvo, a maquinaria da célula hospedeira é responsável por transcrever e traduzir a proteína recombinante.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Gerar linhagens de células-tronco mesenquimais da medula óssea de camundongos C57BL/6 modificadas geneticamente para superexpressão de *hIGF-1* ou *hG-CSF*.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- A) Produzir os lentivirus utilizados para modificação genética das CTM.
- B) Transduzir as CTM e clonar linhagens de CTM geneticamente modificadas.
- C) Confirmar a superexpressão de *hIGF-1* e *hG-CSF* nas linhagens geradas à nível transcricional e proteico.
- D) Caracterizar morfolologicamente, fenotipicamente e funcionalmente as linhagens de CTM geneticamente modificadas.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. DESENHO EXPERIMENTAL

Com o objetivo de gerar linhagens de células-tronco mesenquimais de camundongo superexpressando os fatores de crescimento hIGF-1 ou hG-CSF, foi utilizada uma linhagem de CTM previamente isolada da medula óssea de camundongo C57BL/6 transgênico para expressão da proteína fluorescente verde (GFP). A modificação genética desta linhagem para superexpressão de cada fator de interesse foi realizada através de sistema lentiviral de segunda geração. Em seguida, as células foram submetidas à seleção por puromicina a fim de triar somente as células que foram transduzidas para os transgenes de interesse. Após a seleção, as células resistentes foram submetidas à diluição limitante e em seguida, cultivadas em meio apropriado, com o propósito de obter linhagens de origem monoclonal. Uma vez geradas, as linhagens transduzidas para superexpressão de IGF-1 ou G-CSF foram caracterizadas para confirmação da superexpressão dos fatores estabelecidos, assim como para manutenção de seu fenótipo mesenquimal e multipotencialidade (Figura 8). Por fim, as linhagens geradas neste trabalho foram criopreservadas para utilização em ensaios de eficácia terapêutica em modelos de lesões animais em pesquisas pré-clínicas.

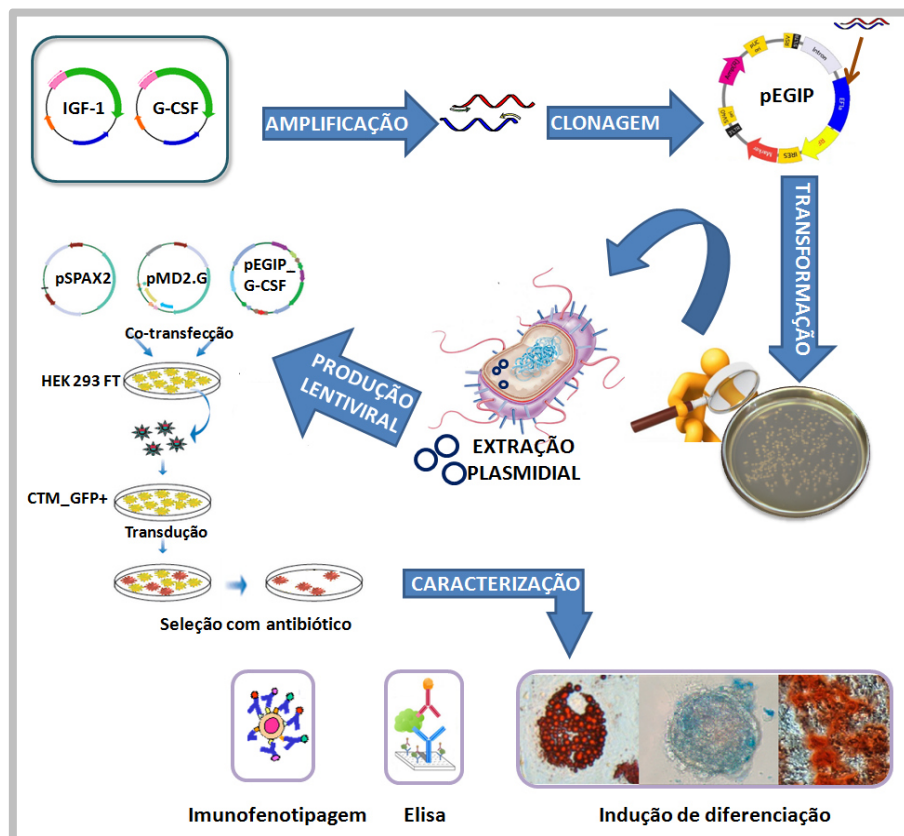


Figura 8: Desenho experimental para geração das células-tronco mesenquimais modificadas geneticamente para superexpressão de hIGF-1 ou hG-CSF.

3.2. OBTENÇÃO DAS SEQUÊNCIAS CODIFICANTES DE HIGF-1 E HG-CSF

Foram adquiridos da InvivoGen (San diego, CA, USA), dois vetores de expressão contendo as seqüências codificantes de hIGF-1 e hG-CSF: pORF9-hGCSFb e pBLAST49-hIGF1A. Estes plasmídeos foram utilizados como molde para reação de amplificação dos genes de interesse para posterior subclonagem no vetor de expressão do sistema lentiviral (figura 9).

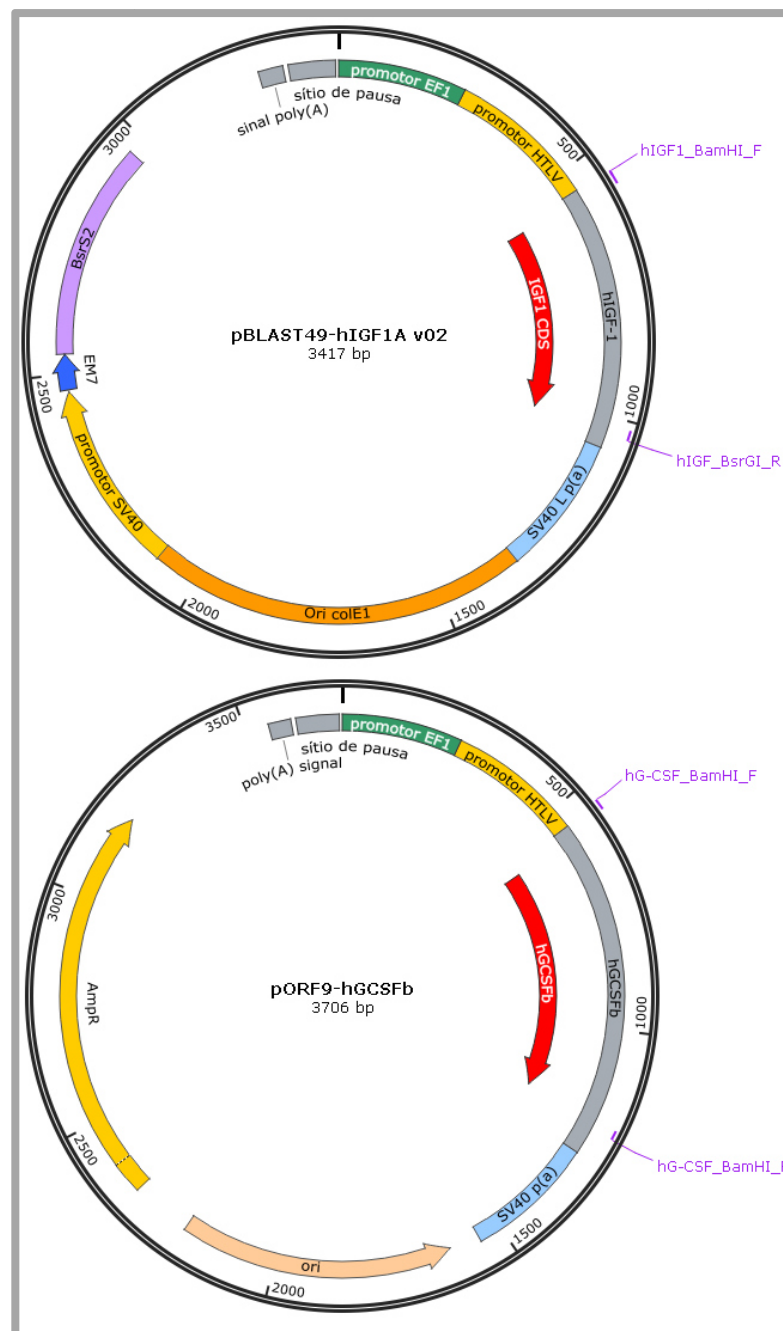


Figura 9: Representação esquemática dos vetores pBLAST49-hIGF-1 e pORF9-hG-CSFb, identificando o sítio de anelamento dos iniciadores específicos para amplificação dos genes de interesse.

3.3. SISTEMA DE EXPRESSÃO LENTIVIRAL DE SEGUNDA GERAÇÃO

Os vetores lentivirais utilizados para geração das partículas virais foram adquiridos da Addgene®(Cambridge, MA, EUA) e são derivados do genoma do HIV-1. Os vetores são incompetentes para replicação, sendo, portanto, seguros para utilização em laboratórios de pesquisa. Os componentes desse sistema incluem 3 vetores (Figura 10):

1) Um plasmídeo de expressão ou transferência (pEGIP), no qual o gene de interesse foi subclonado, sob a regulação do promotor constitutivo $EFl\alpha$. O sítio de inserção dos genes de interesse (localização do gene *GFP*) é flanqueado pelas sequências de reconhecimento das endonucleases BamHI e BsrGI. Este plasmídeo permite a seleção para integração do gene de interesse por puromicina, através da tradução da sequência codificante *puroR*. O cassete de expressão da proteína de interesse é flanqueado pelas sequências 5'LTR e 3'LTR, que são responsáveis pela integração da dupla-fita de DNA no genoma da célula hospedeira. A sequência *psi*(Ψ) é responsável por sinalizar o empacotamento da sequência flanqueada por LTR. Logo em seguida, estão as sequências *RRE*, que responde à ligação de REV, e *cPPT/CTS*, elemento responsável por aperfeiçoar a importação do genoma viral para o núcleo da célula hospedeira. Além dos segmentos lentivirais, o vetor pEGIP contém elementos gênicos bacterianos como a sequência de replicação plasmidial (*ori*), que possibilita a expansão do vetor de expressão, e a sequência de resistência à ampicilina (*AmpR*), que permite selecionar as bactérias transformadas.

2) Um plasmídeo empacotador (psPAX2), que contém o promotor CAG para eficiente expressão das proteínas GAG, POL, TAT e REV;

3) Um plasmídeo envelope (pMD2.G), responsável pela produção da glicoproteína G do vírus da estomatite vesicular (VEV), que apresenta um alto tropismo por membranas lipídicas.

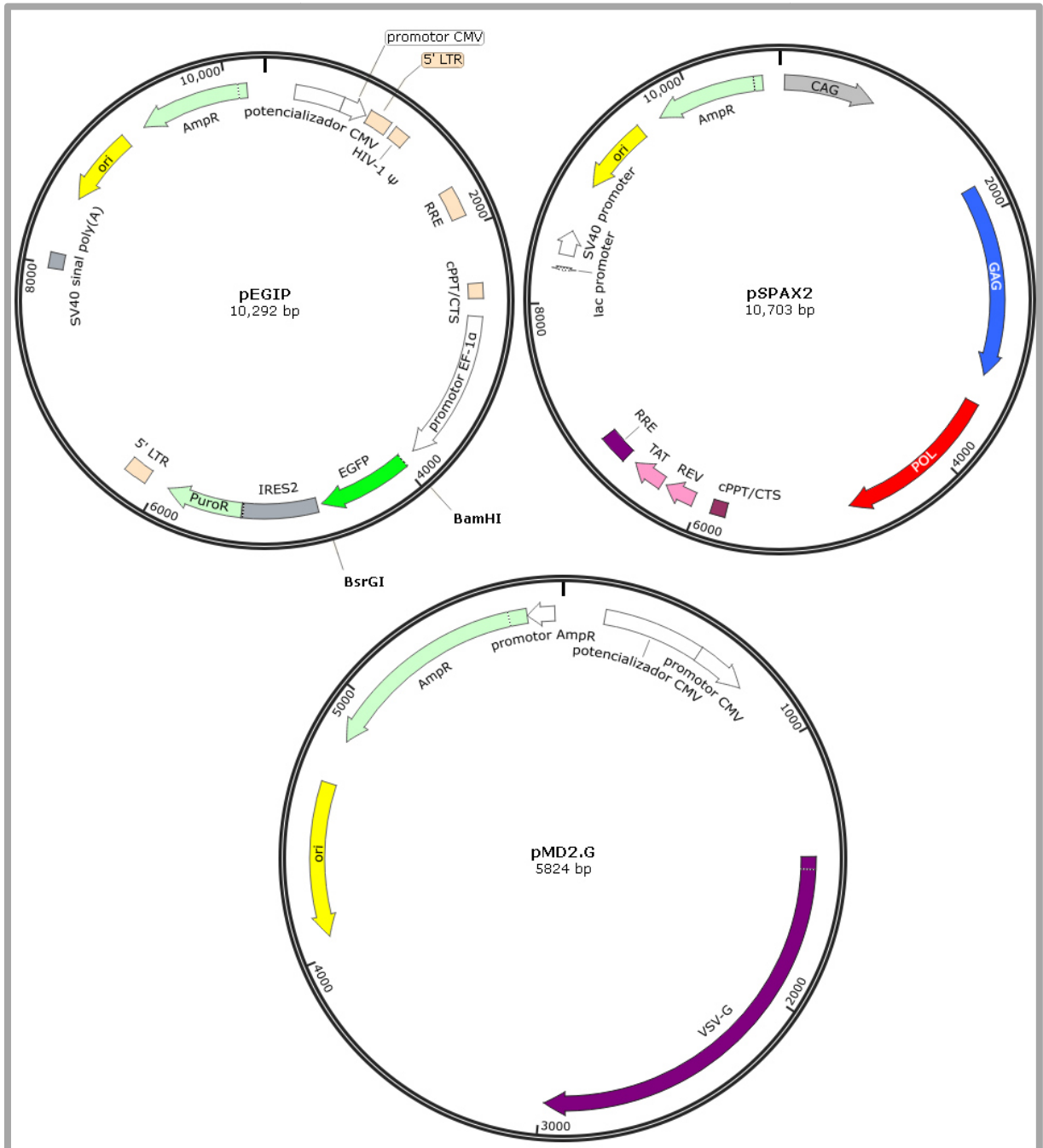


Figura 10: Representação esquemática dos vetores lentivirais necessários para produção dos lentivirus.

3.4. AMPLIFICAÇÃO DAS SEQUÊNCIAS CODIFICANTES DE hIGF-1 E hG-CSF

Iniciadores específicos foram desenhados para amplificação de *hIGF-1* e *hG-CSF*. Com o objetivo de subclonar os amplicons obtidos no vetor de expressão lentiviral pEGIP, os iniciadores necessários para reação de PCR foram desenhados com sítios para as enzimas de restrição BamHI e BsrGI. Dessa maneira, os iniciadores "forward" apresentam um sítio para enzima de restrição BamHI antes do início da sequência codificante de hIGF-1 ou hG-CSF. Enquanto que os iniciadores "reverse" apresentam um sítio para enzima de restrição BsrGI, logo após o término da sequência codificante de hIGF-1 e hG-CSF (Quadro1). Assim, os amplicons de hIGF-1 ou hG-CSF contêm as sequências de reconhecimento das endonucleases específicas, também presentes no vetor de expressão pEGIP, possibilitando a ligação dos amplicons sintetizados no vetor de expressão.

A reação de amplificação de *hIGF-1* e *hG-CSF* foi realizada utilizando os seguintes reagentes: Tampão de Reação para *Platinum Taq DNA polimerase 1x (Invitrogen)*, $MgCl_2$ a 1,5 mM, 0,2 mM de cada dNTP, e 2,0 pmol do iniciador "forward" hIGF-1_BamHI_F1 ou hG-CSF_BamHI_F1, e 2,0 pmol do iniciador reverso hIGF-1_BsrGI_R1 ou hG-CSF_BsrGI_R1, para reação de amplificação de *hIGF-1* ou *hG-CSF* respectivamente. As condições de ciclagem aplicadas foram: 95°C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos de 95°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos e 72°C por 45 segundos. Após os 35 ciclos, é realizada uma etapa de extensão final à 72°C por 5 minutos. Os termocicladores utilizados foram Veriti® , ProFlex™ (*Applied Biosystems*, CA, USA) ou MasterCycler gradient® (Eppendorf, EUA)

Em seguida, uma alíquota do produto da reação foi submetida à eletroforese a fim de avaliar a eficiência da reação de amplificação, assim como a presença do fragmento de massa molecular esperada. A eletroforese foi realizada em gel de agarose (*Sigma-Aldrich*, EUA) 1,5% em tampão TBE 1X (Anexo), onde foram aplicados 5,0 µL do produto da reação, corado com 1,0 µl de Blue Green Loading Dye (*Thermo Fisher Scientific™*, EUA). Além disso, 1,0 µl de marcador de peso molecular de 100pb ou 1kb (*Ludwig*, Biotec Ltda, Porto Alegre, RS) foi aplicado para estimar o tamanho do fragmento amplificado. O gel foi encubado em solução tampão TBE 1X em cuba horizontal modelo Minigel System FB-SB-70 (*Thermo Fisher Scientific™*, EUA) ou Sub-Cell® GT Cell (*BIO-RAD*, EUA) e submetido à 100-120 Volts fornecidos pela fonte de energia PowerPac™ Basic Power supply (*Bio-Rad*, EUA) para corrida eletroforética até que o marcador de peso molecular percorresse a distância adequada. Em seguida o gel foi fotografado no foto documentador *Gel Logic 112*, utilizando o *Molecular Imaging Software*, versão 5.0.4.46 (*CareStream*, EUA).

Verificado o sucesso da amplificação do fragmento de interesse, o produto da reação foi purificado utilizando o *NucleoSpin Gel and PCR Clean-up*® kit (*Macherey-Nagel, Alemanha*), segundo as orientações do fabricante. Os amplicons foram armazenados à -20°C até o momento de uso.

Quadro1: Iniciadores desenhados para amplificação de *hIGF-1* e *hG-CSF*

INICIADORES	SEQUÊNCIA 5'-3'	AMPLICON(pb)
hIGF1_BamHI_F	TAACGGATCCCCGGTCACCATGGGAAA	502 pb
hIGF_BsrGI_R	AATCTTGTACAGAGGGTCTTCCTACATCCT	
hG-CSF_BamHI_F	TAACGGATCCCTACCTGAGATCACCG	696 pb
hG-CSF_BsrGI_R	AATCTTGTACAGATAAATACATGGGATGG	

3.5. CLONAGEM

3.5.1. Digestão

As sequências codificantes de interesse obtidas a partir das reações de amplificação, assim como o vetor de expressão pEGIP, foram submetidos a distintas reações de digestão com as endonucleases de restrição BsrGI e BamHI. Este procedimento tem o objetivo de gerar quantidade suficiente dos insertos de interesse com extremidade coesiva adequada para subclonagem no vetor de expressão pEGIP, também previamente digerido com as mesmas enzimas de restrição.

As reações de digestão dos insertos foram realizadas separadamente, contendo um volume final de 50 µl, 25U da enzima BamHI, 25U da enzima BsrGI, 1x NEBuffer 2.1, 100 µg/ml de BSA, e 5 µg de vetor de expressão para reação de digestão do pEGIP; 4 µg do purificado da reação de amplificação de hIGF-1, para reação de digestão do primeiro inserto de interesse; e na reação de digestão do segundo inserto de interesse foram utilizados 4µg do purificado da reação de amplificação de hG-CSF. Todos os reagentes utilizados nesta reação foram adquiridos da New England BioLabs Inc, (NEB, EUA). As reações foram submetidas à 37°C por duas horas. Em seguida, estas reações foram purificadas utilizando o kit *NucleoSpin Gel and PCR Clean-up*® kit (*Macherey-Nagel, Alemanha*), já que não é possível inativar a endonuclease BamHI por calor.

3.5.2. Ligação e transformação

Em seguida, os insertos de interesse digeridos foram subclonados no vetor de expressão pEGIP, também previamente digerido como descrito acima. As reações de ligação foram preparadas para um volume final de 20 µl, contendo 1X T4 DNA ligase reaction buffer, 20U de T4 DNA ligase (ambos da NEB, EUA), e uma razão molar inserto:vetor de 3:1. Com isso, foram utilizados 50 ng do vetor de expressão e 7,9 ng de IGF-1 digerido para gerar o plasmídeo recombinante pEGIP_IGF-1; e 50 ng do vetor de expressão e 10,9 ng de G-CSF para gerar o plasmídeo recombinante pEGIP_G-CSF. A seguinte equação foi utilizada para determinar a quantidade de inserto e vetor utilizados na reação:

$$\frac{\text{ng do vetor} \times \text{tamanho do inserto (kb)} \times \text{razão molar inserto:vetor}}{\text{tamanho do vetor (kb)}} = \text{ng do inserto}$$

Cada reação de ligação foi incubada à 16°C por 18 horas, e posteriormente inativada à 65°C por 10 minutos. À partir de então, os plasmídeos construídos estavam prontos para serem propagados através da transformação bacteriana de *Escherichia coli*, cepa DH5α, por choque-térmico. As bactérias foram tratadas com cloreto de cálcio (CaCl₂) para se tornarem quimiocompetentes (SAMBROOK E RUSSEL, 2001). Com o objetivo de obter grandes quantidades das construções para posterior produção lentiviral, células competentes foram transformadas com o plasmídeo pEGIP_IGF-1 ou pEGIP_G-CSF, de acordo com o protocolo de Inoue e colaboradores (1990).

O vetor pEGIP contém a sequência do gene que confere resistência à ampicilina, permitindo a seleção de bactérias que foram transformadas e receberam o vetor. Com isso, após a transformação, as bactérias foram plaqueadas em placas de petri, contendo 15 ml de meio LB sólido (Anexo) com 50 µg/ml de ampicilina. As placas foram incubadas em estufa a 37°C por 18 horas, com o objetivo de proporcionar o crescimento das colônias resistentes em ambiente adequado.

3.5.3. Análise de restrição

Após o período de incubação, cresceram colônias resistentes e algumas delas foram selecionadas e repicadas individualmente em tubo falcon 15 ml contendo 5 ml de meio LB com 50 µg/ml de ampicilina. Os tubos foram incubados "overnight" (16-18 horas), à 37°C,

sob agitação de 250 rpm, até que as culturas atingissem uma OD₆₀₀ entre 1-2. Após esta etapa, 4 ml de meio LB com as bactérias em cultura foram utilizados para extração de seus plasmídeos com o NucleoSpin®Plasmid (Macherey-nagel, EUA), seguindo as instruções do fabricante.

Os plasmídeos extraídos foram submetidos a uma reação de digestão com as enzimas de restrição específicas, conforme as condições descritas na seção 3.5.1, para avaliar o sucesso da ligação dos insertos *hIGF-1* ou *hG-CSF* no vetor pEGIP.

Os resultados da análise de restrição definiram as culturas que seriam utilizadas para propagação das construções recombinantes e posterior extração plasmidial. Com isso, as culturas selecionadas foram diluídas na proporção 1:100 em 200 ml de meio LB, contendo 100µg/ml de ampicilina e dispostas em condições adequadas para proliferação como descrito previamente, até atingir uma OD₆₀₀ entre 2-6. Em seguida, a cultura foi utilizada para extração dos plasmídeos recombinantes, segundo as instruções do fabricante do kit NucleoBond® Xtra Midi / Maxi (Macherey-nagel, EUA).

3.5.4. Sequenciamento dos plasmídeos extraídos

Os plasmídeos extraídos contendo fragmentos de *hIGF-1* ou *hG-CSF* foram sequenciados para confirmar a integridade das sequências nucleotídicas dos insertos presentes nos vetores de expressão. Novos iniciadores foram utilizados para a reação de sequenciamento. Estes oligonucleotídeos foram desenhados para que se pareassem à sequência do vetor de expressão que flanqueia a região de inserção dos fragmentos de *hIGF-1* e *hG-CSF* (Quadro2) (figura 11).

Quadro 2: Iniciadores desenhados para sequenciamento dos insertos de interesse subclonados no vetor de expressão lentiviral pEGIP.

INICIADORES	SEQUÊNCIA 5'-3'	AMPLICON (pb)
T7	TAATACGACTCACTATAGGG	861 pb
Overexp_Seq_R	ACACCGGCCTTATTCCAAG	

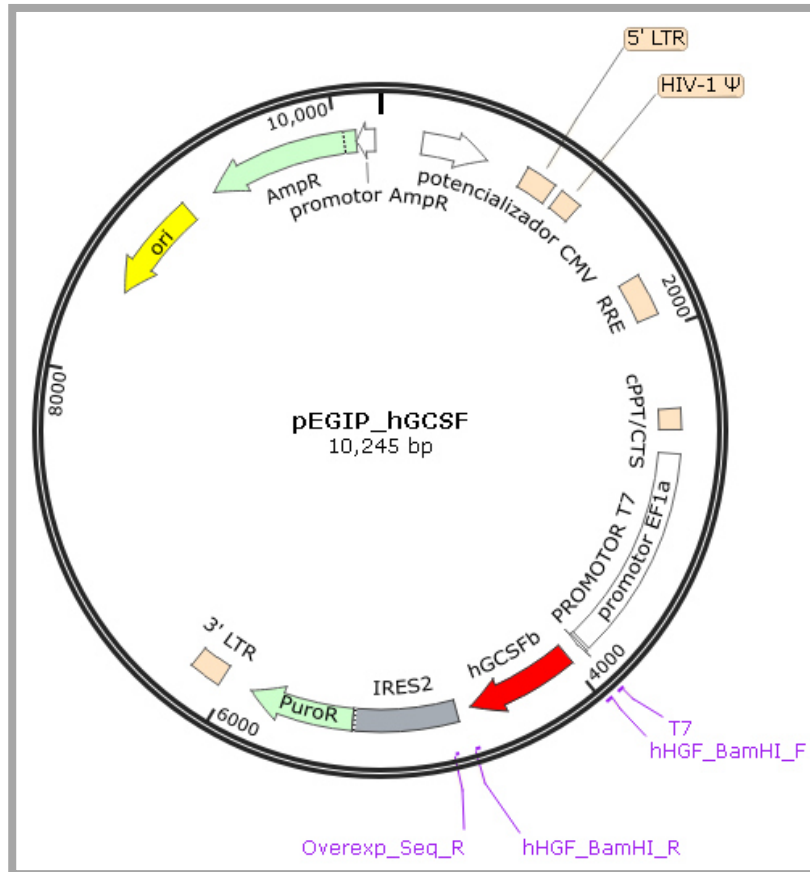


Figura 11: Representação esquemática da subclonagem da sequência codificante de hG-CSF no vetor de expressão lentiviral pEGIP. Os primers utilizados para sequenciar o fragmento de interesse flanqueiam a região de ligação.

Os plasmídeos extraídos foram sequenciados na plataforma de sequenciamento da FIOCRUZ, utilizando o sequenciador ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, EUA). Para cada reação de sequenciamento foram necessários 250 ng de amostra do DNA plasmidial extraído, 2,0 pmol dos primers T7 ou Overexp_seq_R, e os reagentes fornecidos no kit Big Dye terminator Cycle Sequencing Kit v3.1 (Applied Biosystems, EUA). As reações foram realizadas segundo as instruções do fabricante.

Os eletroferogramas gerados foram analisados utilizando os softwares Mega versão 5.03 (TAMURA et al., 2011) ou SeqMan versão 7 (DNASTAR, EUA). As sequências foram comparadas e alinhadas com as sequências referências de *hIGF-1* e *hG-CSF*, contidas nos vetores pORF9-hGCSFb e pBLAST49-hIGF1A adquiridos da InvivoGen (San Diego, CA, USA). É importante ressaltar que não foram aceitos nenhum tipo de mutação nas sequências de interesse, nem mesmo mutações pontuais silenciosas.

3.6. PRODUÇÃO LENTIVIRAL

Para geração de lentivirus baseados em HIV-1, incompetentes para replicação, e utilizados para entregar e expressar os genes de interesse nas células-alvo, nós utilizamos a linhagem empacotadora HEK 293 FT, tipicamente empregada para produção lentiviral.

As células HEK 293 FT foram plaqueadas em placas de cultura de poliestireno 96x21 MM (2×10^6 células/placa) e cultivadas em 10 ml de meio Gibco® DMEM (Thermo Fisher Scientific™, EUA) completado com 10% de SFB HyClone (Thermo Fisher Scientific™, EUA), 24 horas antes da transfecção. Cerca de duas horas antes da transfecção transiente, o meio das células foi trocado. Em seguida, o mix de transfecção foi preparado em tubo falcon 15 ml, no qual foram adicionados, 20 µg do vetor de expressão pEGIP_IGF-1 ou pEGIP_G-CSF ou pEGIP_GFP (controle), 15 µg do vetor pSPAX e 7 µg do vetor pMD2.G, que foram misturados com a adição de cloreto de cálcio 2,5 M para uma concentração final de 125 mM e precipitados com o gotejamento de 500 µl de tampão 2x HBS pH 7,11 (Anexo), sob agitação no vortex.

A solução contendo o precipitado de DNA, de pEGIP_GFP, pEGIP_IGF-1 ou pEGIP_G-CSF, foi dispensada gota à gota sobre o meio de cultura das células plaqueadas. Em seguida, as células foram incubadas por 24 horas, quando o meio foi substituído por DMEM suplementado com 2% de SFB. Num intervalo de 48 horas, o meio das células foi coletado duas vezes, de 24 em 24 horas, e armazenado em tubo falcon 50 ml, à 4°C, por no máximo 7 dias, ou até o momento da concentração das partículas virais.

Com o objetivo de descartar qualquer resquício de célula, o sobrenadante coletado foi centrifugado à 1500 rpm, por 10 minutos, e em seguida filtrado em filtro de 33mm de diâmetro, com poro 0,45 µm (Merck, Alemanha). A ultracentrifugação para concentração das partículas virais é realizada à 25.000 rpm por 2 horas, à 4°C. Ao finalizar este procedimento, o sobrenadante é descartado e o precipitado viral ressuscitado em 200 µl de PBS (Anexo), mantido à 4°C por 16 horas, para aumentar a eficiência da ressuspensão, e em seguida, alíquotado e estocado à -80°C.

A eficiência de transfecção foi avaliada através da quantificação da expressão do gene repórter GFP, contido no vetor de expressão pEGIP não modificado. Para isto, após 72 horas da transfecção de HEK 293FT com pEGIP_GFP, as células foram tripsinizadas para análise por citometria de fluxo, no equipamento BD LSRFortessa™ (Becton Dickinson, EUA), utilizando o software CellQuest Pro Versão 5.1 (Becton Dickinson, EUA).

3.7. TITULAÇÃO LENTIVIRAL

O título biológico dos estoques lentivirais foi estimado através da titulação dos lentivirus controle (pEGIP_GFP) por diluições seriadas para transdução e posterior análise por citometria de fluxo para detecção de células GFP positivas. Para titulação foram plaqueadas 2×10^5 células HEK 293FT/poço em placa de 6 poços. Após 24 horas, foi realizada uma diluição seriada de 1x, 1/10x, 1/100x e 1/1.000x do estoque lentiviral produzido com pEGIP_GFP. Foi adicionado $6 \mu\text{g/ml}$ de polibrene e $5 \mu\text{l}$ de cada diluição nas células plaqueadas. 72 horas após a transdução, a porcentagem de células GFP+, ou seja, células transduzidas, foi analisada por citometria de fluxo. Para calcular o título biológico (unidades transformantes/ml) foi empregada a seguinte fórmula:

$$\text{UT/ml} = \frac{(\text{n}^\circ \text{ de células transduzidas}) \times (\text{fator de diluição}) \times (\text{percentual de células GFP+})}{\text{Volume da diluição adicionada}}$$

3.8. TRANSDUÇÃO DAS CÉLULAS-ALVO

As CTM de camundongo C57BL/6 GFP+ (P8) foram plaqueadas em placas de cultura de poliestireno de 6 poços em um total de 2×10^5 células por poço, cultivadas em meio DMEM com 10% SFB, e incubadas à 37°C , 5% CO_2 em estufa por 24 horas para garantir a aderência celular ao plástico. Em seguida as células foram transduzidas por um período de 24 horas, utilizando MOI de 1 ou 10, na presença de $6 \mu\text{g/ml}$ de polibreno.

Com o objetivo de selecionar as células que foram infectadas, foi adicionado ao meio de cultura $2 \mu\text{g/ml}$ de puromicina 48 horas após a transdução. Quando as células controle, CTM não transduzidas, são todas eliminadas, aproximadamente 7 dias de seleção, o antibiótico é retirado do cultivo.

A fim de que as linhagens geradas sejam de origem monoclonal, as células transduzidas foram submetidas à uma diluição limitante. Em uma placa de 96 poços foram plaqueadas 1 célula por poço. À partir de então, as células foram expandidas para criopreservação e caracterização.

3.9. CARACTERIZAÇÃO

Os clones obtidos de CTM_hIGF-1 ou CTM_hG-CSF foram avaliados para expressão e síntese proteica dos genes de interesse, assim como para manutenção do fenótipo tronco-mesenquimal após a modificação gênica.

3.9.1. qRT PCR

Para quantificar a expressão de *hIGF-1* ou *hG-CSF* o RNA total de 5×10^6 células transduzidas e controle foram extraídos pelo método do Trizol® (Thermo Fisher Scientific™, EUA), de acordo com o protocolo recomendado pelo fabricante. O RNA total extraído foi estocado à -80°C .

Para a reação de transcrição reversa foram utilizados 1µg do RNA de cada clone ou controle, 1x Reverse transcription buffer, 1x dNTPs, 1x random primers, 25U de MultScribe™ Reverse Transcriptase. Todos os reagentes foram obtidos pela Thermo Fisher Scientific™, EUA. As condições de ciclagem utilizadas foram: 10 minutos à 25°C , seguidos de 120 minutos à 37°C , nos termocicladores Veriti® , ProFlex™ (ambos da Applied Biosystems, CA, USA) ou MasterCycler gradient® (Eppendorf, EUA). O cDNA sintetizado foi armazenado à -20°C até o momento de uso.

As reações de PCR em tempo real foram realizadas em triplicata, normalizadas pelo gene endógeno da beta-2 microglobulina (B2M). Para quantificação da expressão gênica de *hG-CSF* ou *hIGF-1* foram utilizados os primers qPCR-GCSF-F1 e qPCR-GCSF-R1 ou qPCR-IGF-1_F3 e qPCR-IGF-1_R3. Foram utilizados 5 µl dos cDNA sintetizados à partir do RNA total de cada clone e controle. As reações foram preparadas com SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems ®, EUA), sob às seguintes condições de ciclagem: 95°C - 5minutos, 40 ciclos de 95°C - 15segundos e 60°C - 1 minuto. Em seguida, foi adicionada a etapa de "melting": 95°C - 15 segundos, 60°C - 1 minuto, 95°C - 30 segundos, 95° - 15 segundos. O equipamento utilizado foi ABI Prism 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems ®, EUA).

Quadro 3: Tabela de primer utilizados nas reações de qRT-PCR.

INICIADORES	SEQUÊNCIA 5'-3'	AMPLICON(pb)
qPCR-GCSF-F1	CTGGCAGCAGATGGAAGAACT	133 pb
qPCR-GCSF-R1	CAGGAAGCTCTGCAGATGGGA	
qPCR-IGF-1_F3	TCTCTTCTACCTGGCGCTGT	134 pb
qPCR-IGF-1_R3	GCTTGTTGAAATAAAAGCCCCTGT	
mmB2M - F	GGTCTTTCTGGTGCTTGTCTCA	115 pb
mmB2M - R	GCAGTTCAGTATGTTCCGGCTTC	

3.9.2.Elisa

Com o objetivo de avaliar a quantidade de proteínas de interesse sintetizadas pelos clones modificados geneticamente, a mensuração foi realizada pela metodologia ELISA sanduíche através da dosagem de h-GCSF ou hIGF-1 secretada, presente nos sobrenadantes de cultura de cada clone e controle. A coleta dos sobrenadantes foi realizada com 24 ou 48 horas de cultivo, e armazenados à -20°C até o momento de uso. A detecção de hIGF-1 foi realizada com o kit Human IGF-I DuoSet (R&D Systems, Inc. EUA), enquanto que a detecção de hG-CSF foi realizada utilizando o Human G-CSF Quantikine ELISA Kit (R&D Systems, Inc. EUA), segundo as instruções do fabricante.

3.9.3.Imunofenotipagem

Para avaliação da manutenção do fenótipo mesenquimal dos clones gerados, assim como dos controles, estes foram submetidos à imunofenotipagem por citometria de fluxo. Para análise, foram tripsinizadas 10^6 células de cada clone gerado e do controle (P21). As células foram incubadas por 30 minutos, à 4°C com anticorpos conjugados à ficoeritrina (PE), cianina (CY) ou alofocianina (APC), contra CD 11b, CD 73, CD 105, CD 45, CD 29, (BioLegend, EUA), CD 90, Sca-1, CD 44 (Becton Dickinson, EUA) (Quadro 4). A detecção dos marcadores específicos conjugados aos anticorpos foi realizada no equipamento BD LSRFortessa™ (Becton Dickinson, EUA), utilizando o software BD FACSDiva™ versão 6.1.3 (Becton Dickinson, EUA).

Quadro 4: Especificação dos conjuntos de antígenos e conjugados utilizados na imunofenotipagem por citometria de fluxo.

MARCADORES	CONJUGADOS
CD 73	PE-A
CD 44	
CD29	
CD 105	APC-A
CD11b	
Sca-1	APC-CY7-A
CD 45	PE-CY5-A

3.9.4. Indução de diferenciação

Ensaio de diferenciação foram realizados para avaliar a conservação da multipotência das linhagens modificadas geneticamente para superexpressão dos genes de interesse. Os clones gerados superexpressando *hIGF-1* e *hG-CSF*, assim como as células controles (CTM não transduzidas), foram cultivadas em placa de 24 poços com lamínulas 13 mm em meio completo (10^4 células/poço). Após atingirem 50-60% de confluência, todo o meio foi removido e substituído por meio de indução adipogênica StemPro Adipogenesis Differentiation Kit ou meio de diferenciação osteogênica StemPro Osteogenesis DifferentiationKit ou meio de diferenciação condrogênica StemPro Chondrogenesis DifferentiationKit (Thermo Fisher Scientific™, EUA). Metade do meio de diferenciação foi trocado a cada dois dias, e a evolução da diferenciação foi acompanhada utilizando um microscópio invertido CKX 41 (OLYMPUS, Japão). Durante o processo de diferenciação foi mantido um grupo controle cultivado em meio completo.

Para observar a deposição de gordura, após quinze dias em cultivo, as células diferenciadas em adipócitos e seus controles foram fixados em paraformaldeído 4% por 15 minutos em temperatura ambiente, lavadas em água destilada e incubadas em álcool 70% por 3 minutos. A seguir, foram coradas com solução de Oil red por 5 minutos e lavadas com álcool 70%. A deposição de cálcio foi observada através da coloração com vermelho de Alizarina 2%. Após fixação em paraformaldeído 4% por 30 minutos e lavagem com água destilada, as células foram coradas com solução de vermelho de Alizarina 2% por 3 minutos, e em seguida, foram feitas duas lavagens com água destilada.

Para avaliação da síntese de proteoglicanos, as células foram fixadas com paraformaldeído 4% por 30 minutos, lavadas com PBS e coradas com solução de Alcian Blue (Thermo Fisher Scientific™, EUA) em HCl 0,1 N por 30 minutos. Em seguida, as células foram lavadas 3 vezes com solução de HCl 0,1 N e, em seguida, foi adicionado água destilada para neutralização da acidez. As imagens das células diferenciadas em condrócitos, adipócitos, osteócitos e seus controles foram adquiridas utilizando um microscópio AX70 (OLYMPUS, Japão) e o software ImagePro Plus 7.0 (Media Cybernetics, EUA).

3.10. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para as análises estatísticas dos dados gerados, o software GraphPad Prism versão 5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA) foi utilizado. Os resultados foram expressos como média \pm EPM. O teste estatístico ANOVA-one way foi empregado para análise dos dados de qRTPCR, enquanto que o teste ANOVA-two way foi utilizado para analisar os resultados provenientes dos ensaios ELISA. Considerou-se estatisticamente significante as análises que apresentaram um p valor menor ou igual à 0,05.

4. RESULTADOS

4.1. AMPLIFICAÇÃO DAS SEQUÊNCIAS CODIFICANTES DE HIGF-1 E HG-CSF

Após a reação de PCR, utilizando pORF9-hGCSFb e pBLAST49-hIGF1A como fita-molde para amplificação de hG-CSF e hIGF-1, foi possível detectar, em gel de agarose 1,5%, a presença de bandas de DNA, com o tamanho correspondente ao esperado para os genes de interesse (Figura 12). Como mencionado anteriormente, os amplicons obtidos apresentam sítios de restrição para as endonucleases BsrGI e BamHI, de forma a permitir sua subclonagem no vetor de expressão lentiviral pEGIP. Os sítios para as enzimas de restrição foram incorporados à sequência codificante de cada gene de interesse preservando seus códons originais de iniciação e terminação, através dos iniciadores desenhados para amplificação

Uma vez verificado o sucesso da reação de amplificação e produção das sequências codificantes dos genes de interesse em grandes quantidades, foi possível prosseguir para etapa de clonagem.

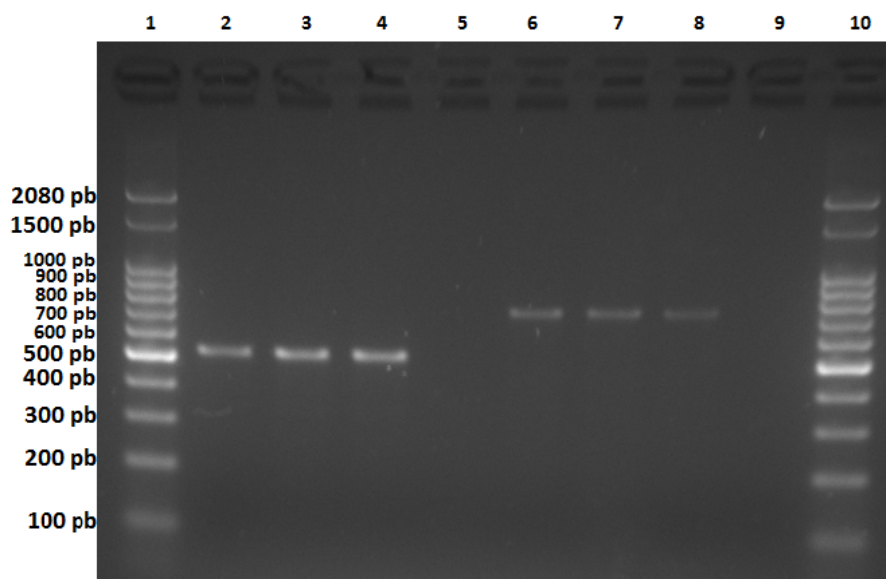


Figura 12: Gel de agarose 1,5%. Marcador de peso molecular (1,10); bandas de 502 pb correspondente à amplificação de hIGF-1 (2,3,4); controle negativo da amplificação de hIGF-1 (5); bandas de 696 pb correspondentes à amplificação de hG-CSF (6,7,8); controle negativo da amplificação de hG-CSF (9).

4.2. CLONAGEM

4.2.1. Digestão

Os amplicons de interesse obtidos na etapa anterior foram devidamente purificados e em seguida, submetidos à digestão com as enzimas de restrição BamHI e BsrGI. O vetor de expressão lentiviral pEGIP também foi submetido à digestão com as mesmas endonucleases com o objetivo de gerar extremidades coesivas, possibilitando a reação de ligação do inserto de interesse no vetor pEGIP

4.2.2. Ligação e transformação

Os produtos da digestão, tanto dos genes de interesse *hIGF-1* e *hG-CSF*, quanto do vetor pEGIP foram purificados e em seguida quantificados em espectrofotômetro. Foram obtidas quantidades suficientes dos produtos digeridos para emprego na reação de ligação.

A construção dos vetores recombinantes foi então denominada pEGIP_IGF-1 e pEGIP_G-CSF. Células competentes DH5 α foram transformadas com as construções recombinantes. Bactérias que receberam o construto, o qual confere resistência à ampicilina, cresceram em meio LB com o antibiótico. Três colônias resistentes provenientes de cada transformação foram selecionadas e submetidas ao crescimento individual, nas condições adequadas, como descrito em Materiais e métodos. Em seguida, seus DNAs plasmidiais foram extraídos e submetidos à clivagem com as mesmas endonucleases utilizadas para subclonagem, com o objetivo de checar a presença dos insertos de interesse.

4.2.3. Análise de restrição

A análise de restrição utilizando as enzimas BamHI e BsrGI avaliou a presença dos insertos de interesse nos plasmídeos extraídos dos clones selecionados por apresentarem resistência à ampicilina. Nesta análise, o tamanho do inserto clivado do vetor pEGIP, pelas endonucleases específicas, foi avaliado em gel de agarose 0,8%. A figura 13 representa o perfil de restrição de um de cada três clones transformados para cada construto.

A presença e o tamanho dos insertos confirmam o sucesso das etapas de clonagem e

transformação das bactérias. Os fragmentos de DNA gerados após a clivagem das construções pEGIP_IGF-1 e pEGIP_G-CSF, apresentaram os tamanhos esperados. Este resultado definiu que os clones 1 provenientes tanto da transformação de *E.coli* com pEGIP_IGF-1, como com pEGIP_G-CSF, seriam expandidos em meio adequado, para propagação das construções de interesse.

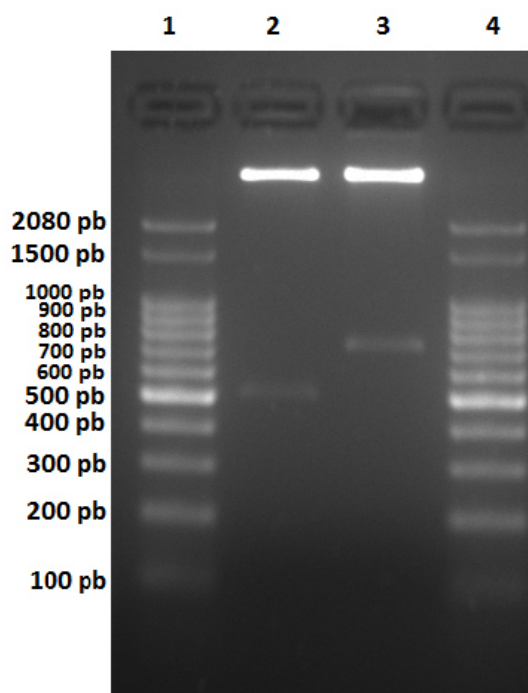


Figura 13: Gel de agarose 0,8%. Análise de restrição das construções geradas. Marcador de peso molecular (1,4); Digestão de pEGIP_IGF-1 com BamHI e BsrGI gerou uma banda de 487 pb, referente à hIGF-1, e uma banda mais intensa, referente ao vetor pEGIP linearizado (2); Digestão de pEGIP_G-CSF com BamHI e BsrGI gerou uma banda de 681 pb, referente à hG-CSF, e uma banda mais intensa, referente ao vetor pEGIP linearizado (3).

4.3. SEQUENCIAMENTO

As construções de interesse foram sequenciadas com objetivo de confirmar a integridade da sequência de nucleotídeos do quadro aberto de leitura (do inglês ORF, open reading frame) de *hIGF-1* e *hG-CSF*. Os eletroferogramas resultantes do sequenciamento (Figura 14) não demonstraram nenhuma alteração no material genético dos genes de interesse, nenhum tipo de mutação foi encontrado.

As seqüências obtidas no sequenciamento, chamadas seqüência consenso, foram submetidas a um processo de busca por similaridade em diversos bancos de dados, utilizando o programa público BLAST. Estas buscas demonstraram 100% de similaridade com as seqüências que codificam os genes humanos *G-CSF* e *IGF-1* (dado não apresentado). Além disso, foi realizado um alinhamento, utilizando o software Mega5.03, entre as seqüências consenso (Figura 15 e 16) e as seqüências fornecidas pela INVITROGEN, correspondentes à ORF de *G-CSF* (pORF9-hGCSFb) e *IGF-1* (pBLAST49-hIGF1A) (dado não apresentado).

Estas análises garantem a integridade dos insertos de interesse presentes nas construções geradas, assim como a eficiência de leitura de todas as bases nucleotídicas, necessárias para montagem das proteínas de interesse de maneira correta.

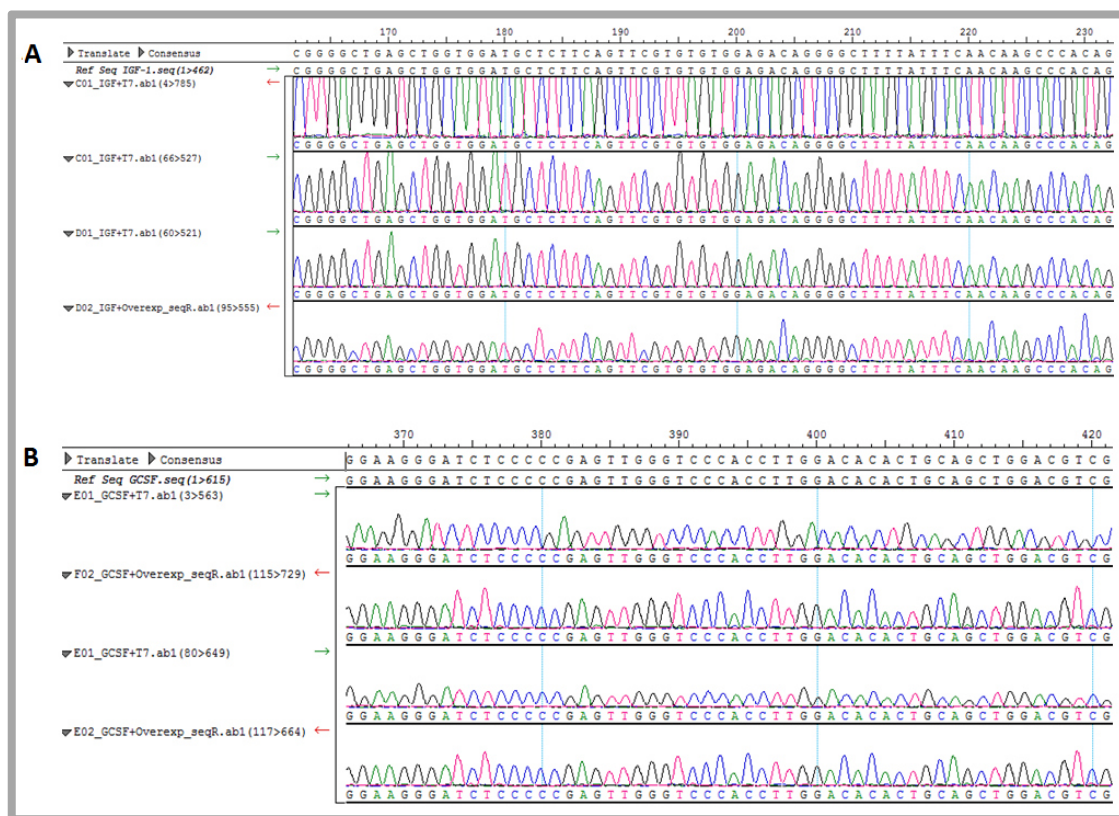


Figura 14: Fragmentos representativos dos eletroferogramas gerados como resultado do sequenciamento das construções pEGIP_IGF-1 (A) e pEGIP_G-CSF (B).

```

ATGGCTGGACCTGCCACCCAGAGCCCCATGAAGCTGATGGCCCTGCAGCTGCT
GCTGTGGCACAGTGCACCTCTGGACAGTGCAGGAAGCCACCCCTGGGCCCTG
CCAGCTCCCTGCCCCAGAGCTTCTGCTCAAGTGCTTAGAGCAAGTGAGGAAG
ATCCAGGGCGATGGCGCAGCGCTCCAGGAGAAGCTGTGTGCCACCTACAAGC
TGTGCCACCCGAGGAGCTGGTGTGCTCGGACACTCTCTGGGCATCCCCTGG
GCTCCCCTGAGCAGCTGCCCCAGCCAGGCCCTGCAGCTGGCAGGCTGCTTGAG
CCAACTCCATAGCGGCCTTTCTCTACCAGGGGCTCCTGCAGGCCCTGGAAG
GGATCTCCCCGAGTTGGGTCCACCTTGACACACTGCAGCTGGACGTGCGCC
GACTTTGCCACCACCATCTGGCAGCAGATGGAAGAAGTGGGAATGGCCCTGC
CCTGCAGCCCACCCAGGGTGCCATGCCGGCCTTCGCCTTGCTTCCAGCGCCG
GGCAGGAGGGGTCTAGTTGCCTCCCATCTGCAGAGCTTCTGGAGGTGTCGT
ACCGCGTTCTACGCCACCTTGCCAGCCCTGA

```

Figura 15: Sequência consenso de G-CSF obtida à partir do sequenciamento do construto pEGIP_G-CSF.

```

ATGGGAAAAATCAGCAGTCTTCCAACCAATTATTTAAGTGCTGCTTTTGTGAT
TTCTGAAGGTGAAGATGCACACCATGTCCTCCTCGCATCTCTTCTACCTGGCG
CTGTGCCTGCTCACCTTACCAGCTCTGCCACGGCTGGACCGGAGACGCTCTGC
GGGGCTGAGCTGGTGGATGCTCTTCAAGTTCGTGTGTGGAGACAGGGGCTTTT
ATTTCAACAAGCCCACAGGGTATGGCTCCAGCAGTCGGAGGGCGCCTCAGAC
AGGCATCGTGGATGAGTGTGCTTCCGGAGCTGTGATCTAAGGAGGCTGGAG
ATGTATTGCGCACCCCTCAAGCCTGCCAAGTCAGCTCGCTCTGTCCGTGCCAG
CGCCACACCGACATGCCAAGACCCAGAAGGAAGTACATTTGAAGAACGCAA
GTAGAGGGAGTGCAGGAAACAAGAACTACAGGATGTAG

```

Figura 16: Sequência consenso de IGF-1 obtida à partir do sequenciamento do construto pEGIP_IGF-1.

4.4. PRODUÇÃO LENTIVIRAL

A fim de avaliar a eficiência de transfecção das construções plasmidiais em células HEK293FT, foi realizada uma transfecção transiente utilizando o vetor pEGIP sem nenhuma recombinação, contendo o gene original da proteína GFP (pEGIP_GFP), juntamente com os outros dois vetores lentivirais, pSPAX e pMD2.G, necessários para produção das partículas lentivirais. A eficiência da transfecção foi mensurada 72 horas após o procedimento, por citometria de fluxo, através da detecção de células GFP positivas (Figura 17 e 18).

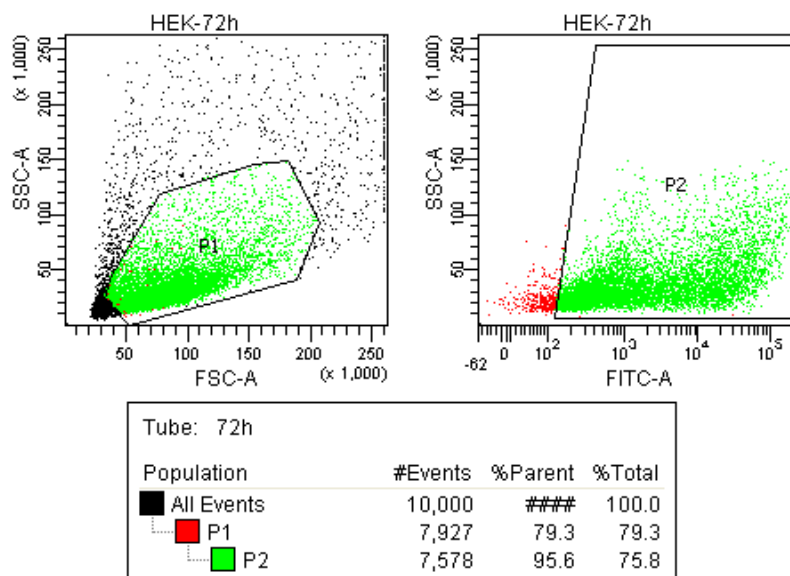


Figura 17: Dot plots gerados após análise por citometria de fluxo. No gráfico de tamanho (FSC) em função da granulidade (SSC), o "gate" representa os eventos que foram considerados como células viáveis, adequadas para análise de fluorescência GFP. O dot plot gerado no canal FITC-A demonstrou que 95,6% das células consideradas viáveis eram positivas para proteína GFP.

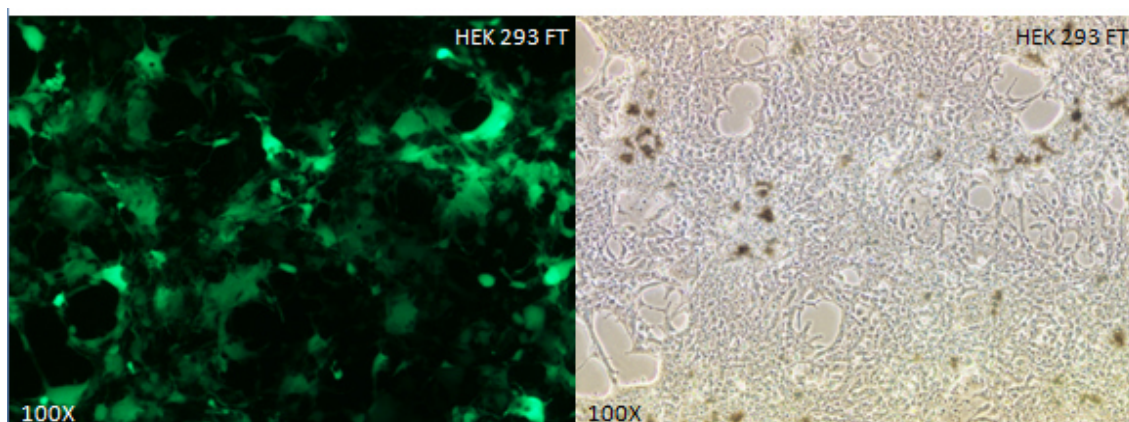


Figura 18: Visualização de fluorescência no microscópio invertido Eclipse Ti-E (Nikon), 72 horas após a transfecção com o vetor lentiviral pEGIP.

Este resultado foi extrapolado para as construções pEGIP_IGF-1 e pEGIP_G-CSF, já que no lugar da sequência codificante de GFP, estes apresentam as sequências dos genes de interesse. Por fim, foi constatado que a transfecção apresentou uma eficiência de 95,6%

4.5. TITULAÇÃO LENTIVIRAL

O cálculo do título biológico foi feito através das células detectadas por citometria de fluxo como GFP positivas, 72 horas após a transdução com a partícula lentiviral produzida com o construto controle, pEGIP_GFP, em diferentes diluições. Dentre o total de células transduzidas com o estoque viral concentrado (1x), 14,6% expressavam GFP. Dentre as células que foram transduzidas com as alíquotas diluídas do estoque viral, foram observadas 1%, 0,3% e 0,1 % de células GFP positivas para as diluições de 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} respectivamente (Figura 19 e 20).

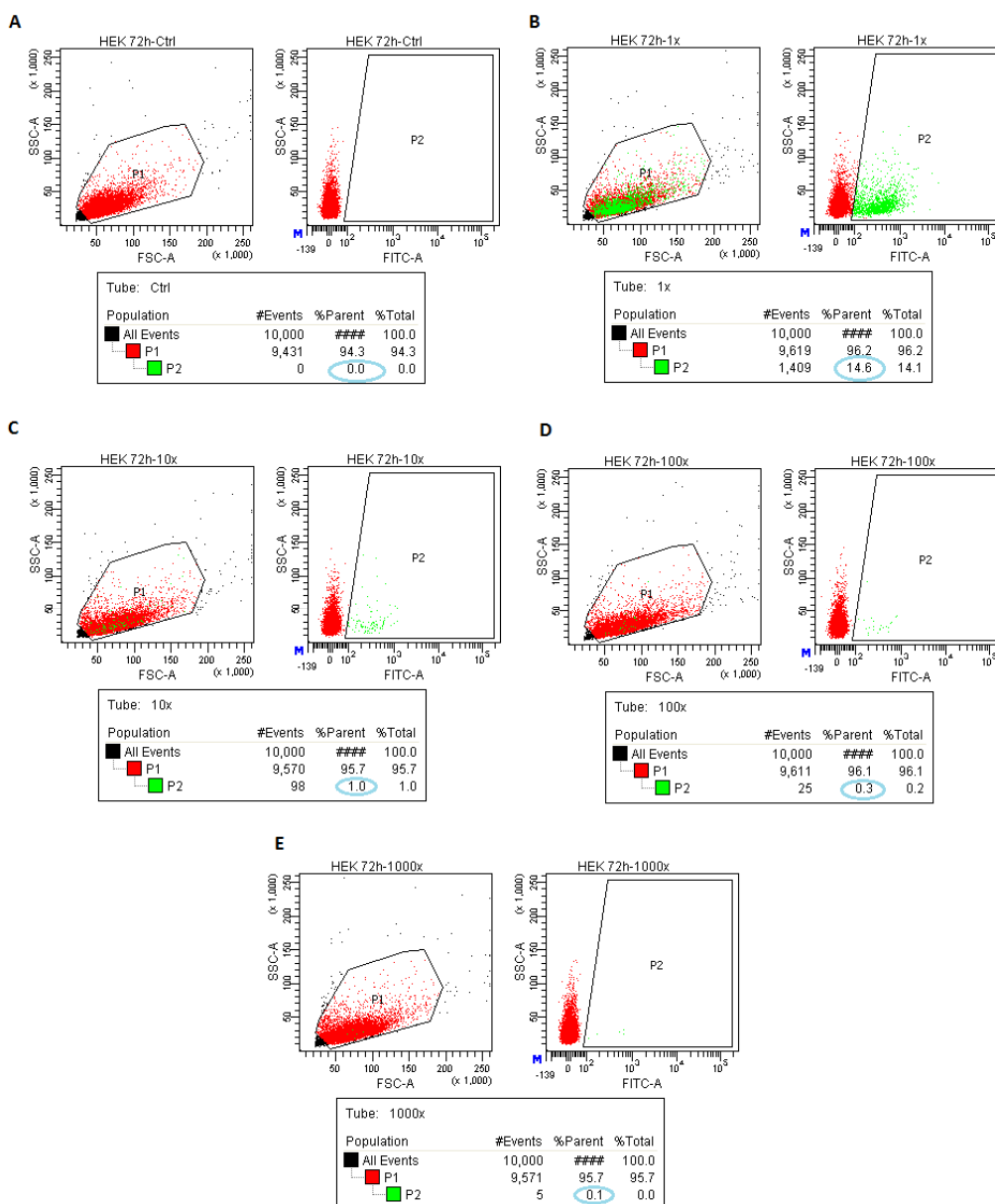


Figura 19: Dot plots gerados após detecção de células GFP positivas por citometria de fluxo para titulação dos estoques lentivirais. (A) Controle, células não-transduzidas; (B) Células transduzidas com o estoque viral, 1x concentrado; (C) Células transduzidas com alíquota do estoque viral à 10^{-1} X; (D) Células transduzidas com alíquota do estoque viral 10^{-2} X; (E) Células transduzidas com alíquota do estoque viral à 10^{-3} X.

O título das partículas lentivirais produzidas com o construto pEGIP_GFP foi de 10^7 UT/ml. Este mesmo título foi considerado para os outros estoques lentivirais gerados com as construções pEGIP_GCSF e pEGIP_IGF-1, visto que não é possível titular estes estoques por citometria de fluxo, já que eles não contém o gene repórter GFP.

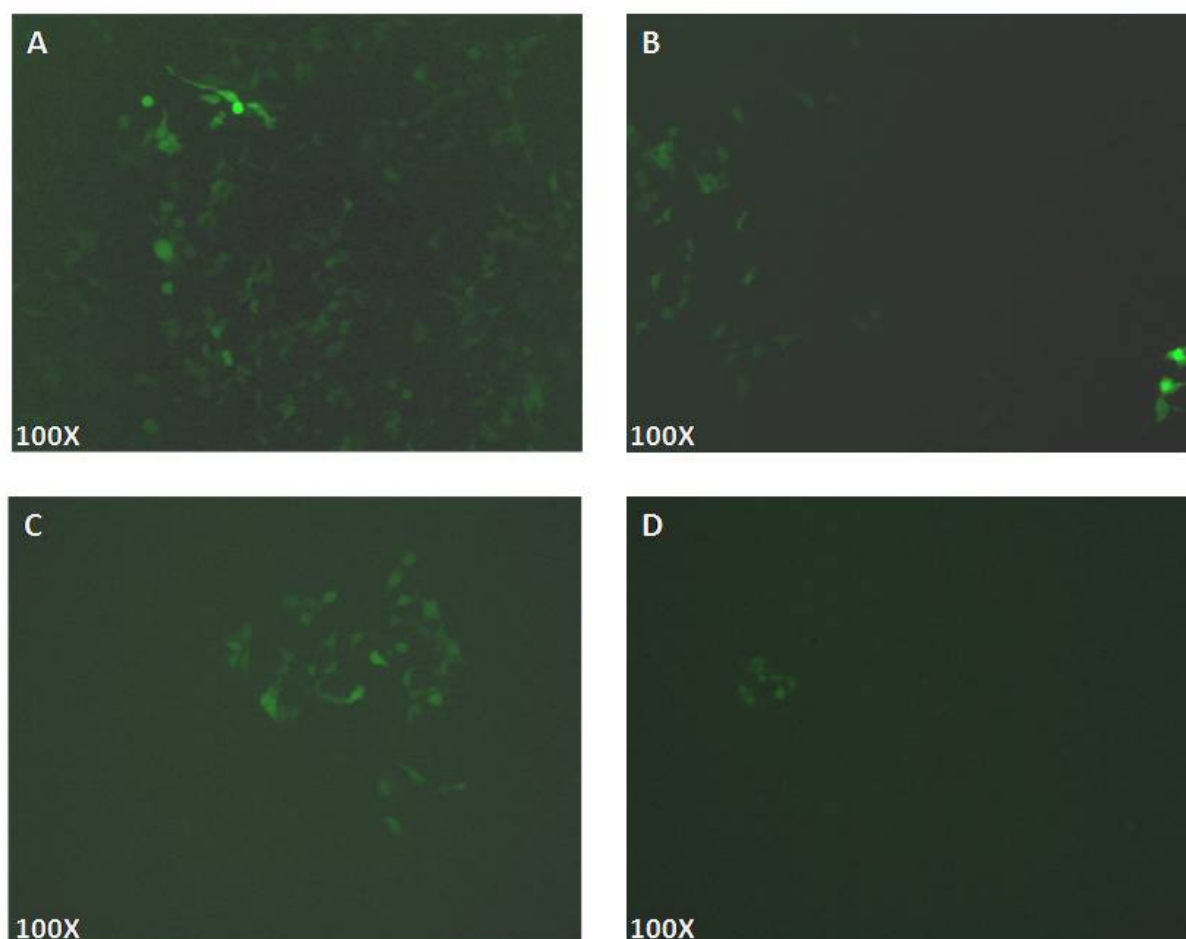


Figura 20: Visualização de fluorescência no microscópio invertido Eclipse Ti-E (Nikon), 72 horas após a transdução de HEK293 FT com alíquotas do estoque viral pEGIP_GFP 1x concentrado (A) ; 10^{-1} x diluído (B); 10^{-2} x diluído; 10^{-3} x diluído (D).

4.6. TRANSDUÇÃO LENTIVIRAL

Quarenta e oito horas após a transdução das células-tronco mesenquimais de camundongo com as partículas lentivirais geradas, com MOI de 1 ou 10, estas células foram submetidas à uma pressão seletiva com puromicina ($2\mu\text{g/ml}$) para triagem das células que foram infectadas com as partículas lentivirais produzidas. A seleção foi realizada por

aproximadamente 7 dias, até que todas as células-tronco mesenquimais de camundongo não-transduzidas fossem eliminadas. A figura 21 demonstra o processo de seleção das células que receberam os transgenes de interesse.

Após o tratamento com puromicina foi possível selecionar somente as células que foram infectadas com as partículas lentivirais produzidas. Dessa maneira, conseguimos obter um grupo de células-tronco mesenquimais de camundongo superexpressando G-CSF humano e outro grupo superexpressando IGF-1 humano. No entanto, com o objetivo de gerar linhagens geneticamente modificadas de origem monoclonal, estes grupos foram submetidos à uma diluição limitante. Assim, foi possível obter dois clones superexpressando hG-CSF e três clones superexpressando hIGF-1, os quais foram nomeados da seguinte forma: BMSC_G-CSF#1, BMSC_G-CSF#2, BMSC_IGF-1#1, BMSC_IGF-1#2 e BMSC_IGF-1#3. Todos são provenientes de CTM transduzidas com MOI de 10

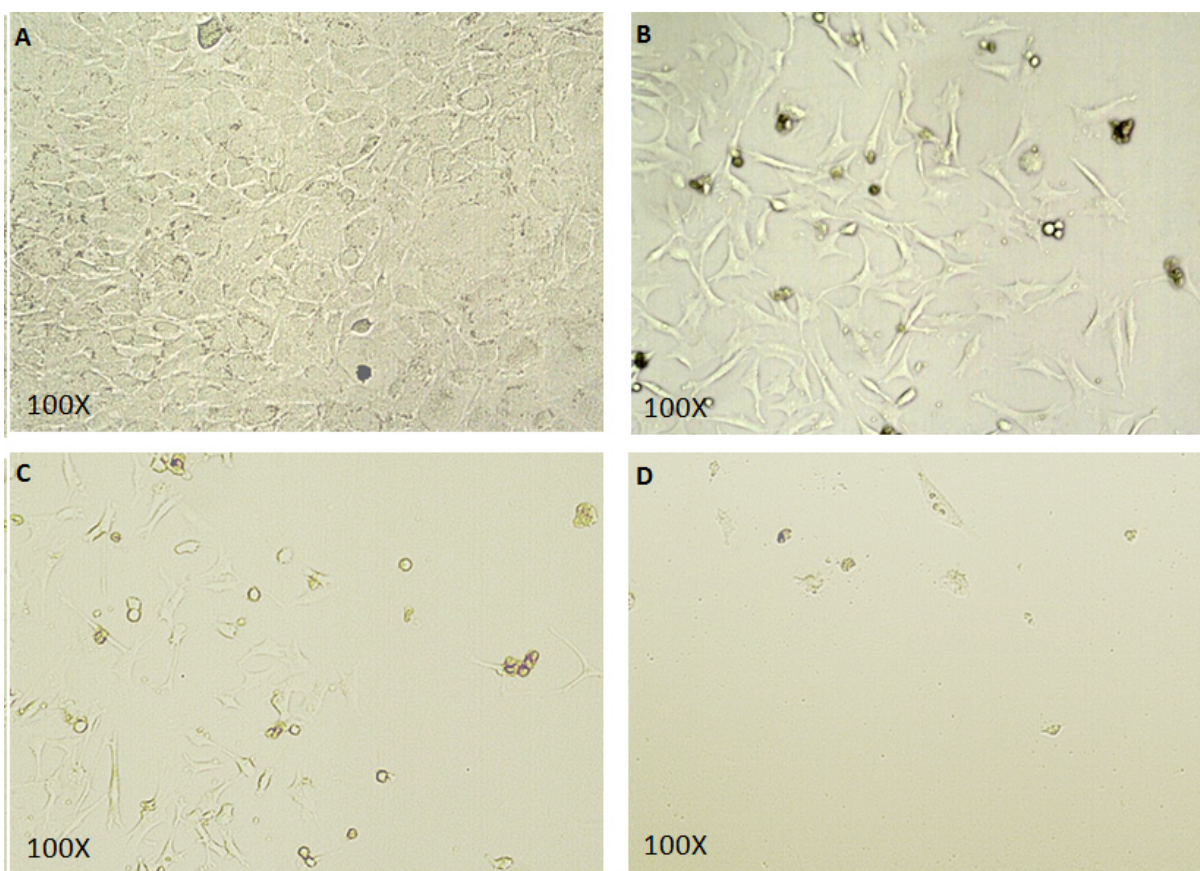


Figura 21: Imagens microscópicas do processo de seleção com puromicina das células que foram transduzidas com os lentivirus produzidos. (A) Células controles, BMSC Θ , não transduzidas, crescidas em meio sem puromicina; (B) CTM transduzidas com os lentivirus produzidos para superexpressão de hG-CSF, utilizando MOI de 10; (C) CTM transduzidas com os lentivirus produzidos para superexpressão de hG-CSF, utilizando MOI de 1; (D) Células controles, BMSC Θ , não transduzidas, crescidas em meio com puromicina.

4.7. CARACTERIZAÇÃO

4.7.1. qRT-PCR

Reações de qRT-PCR foram realizadas com as amostras BMSC_G-CSF#1, BMSC_G-CSF#2, BMSC_IGF-1#1, BMSC_IGF-1#2, BMSC_IGF-1#3 e BMSC_Ø, com o objetivo de quantificar e determinar a linhagem celular geneticamente modificada que mais expressa o gene de interesse ectópico. O gene utilizado como normalizador foi o *B2M* (Figura 22).

Todas as linhagens geneticamente modificadas geradas demonstraram estar efetivamente expressando os genes ectópicos *hIGF-1* ou *hG-CSF*. Os clones BMSC_G-CSF#2 e BMSC_IGF-1#1 apresentaram uma maior expressão de G-CSF e IGF-1, respectivamente, quando comparados com os outros clones gerados. Estes resultados comprovam o sucesso na geração de linhagens de células-tronco mesenquimais murinas modificadas geneticamente para superexpressão de *hIGF-1* ou *hG-CSF*.

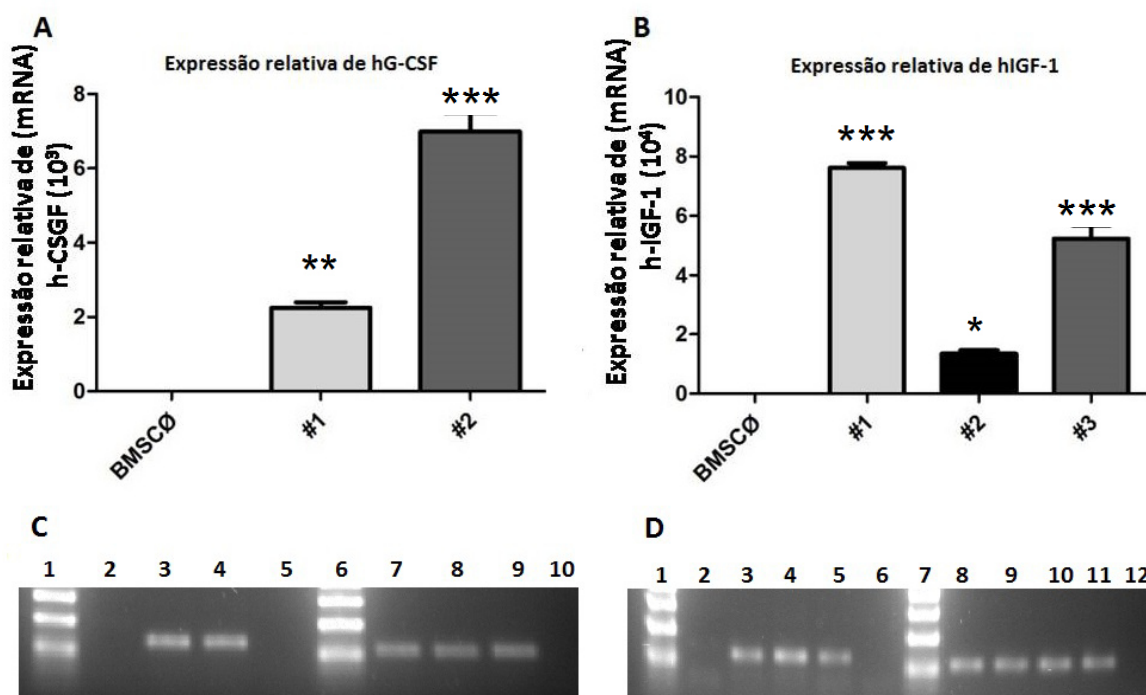


Figura 22: Análise de expressão dos genes ectópicos hG-CSF e hIGF-1 nas linhagens de CTM geradas. (A) Expressão relativa de hG-CSF nos clones BMSC_GCSF#1 e BMSC_GCSF#2 em comparação com o controle, BMSC_Ø; R^2 0,97. Estatisticamente significativo comparado com BMSC_Ø (B) Expressão relativa de hIGF-1 nos clones BMSC_IGF-1#1, BMSC_IGF-1#2 e BMSC_IGF-1#3 em comparação com o controle, BMSC_Ø; R^2 0,98. * Estatisticamente significativo comparado com BMSC_Ø. (C) Imagem de gel de agarose 1,5 % da amplificação de hG-CSF nos dois clones gerados e controle. 1- Marcador de peso molecular; 2- BMSC_Ø; 3- BMSC_G-CSF#1; 4- BMSC_G-CSF#2; 5- Controle negativo; 6- Marcador de peso molecular; 7- Controle endógeno B2M em BMSC_Ø; 8- Controle endógeno B2M em BMSC_G-CSF#1; 9- Controle endógeno B2M em BMSC_G-CSF#2; 10- Controle negativo; (D) Imagem de gel de agarose 1,5 % da amplificação de hIGF-1 nos três clones gerados e controle. 1- Marcador de peso molecular; 2- BMSC_Ø; 3- BMSC_IGF-1#1; 4- BMSC_IGF-1#2; 5- BMSC_IGF-1#3; 6- Controle negativo; 7- Marcador de peso molecular; 8- Controle endógeno B2M em BMSC_Ø; 9- Controle endógeno B2M em BMSC_IGF-1#1; 10- Controle endógeno B2M em BMSC_IGF-1#2; 11- Controle endógeno B2M em BMSC_IGF-1#3; 12- Controle negativo. * $p < 0,05$; ** $p < 0,0005$; *** $p < 0,0005$

4.7.2. Elisa

Com o objetivo de avaliar a expressão proteica de hG-CSF nas linhagens geradas, os sobrenadantes de cultura dos clones BMSC_GCSF#1 e BMSC_GCSF#2, assim como da linhagem controle BMSC_Ø, foram submetidos à análise por ELISA com 24 e 48 horas de cultura (Figura 23). É possível detectar a produção de G-CSF humano em todos os clones gerados, em ambos "time-points". Como esperado, não foi possível detectar a proteína G-CSF humana na linhagem controle.

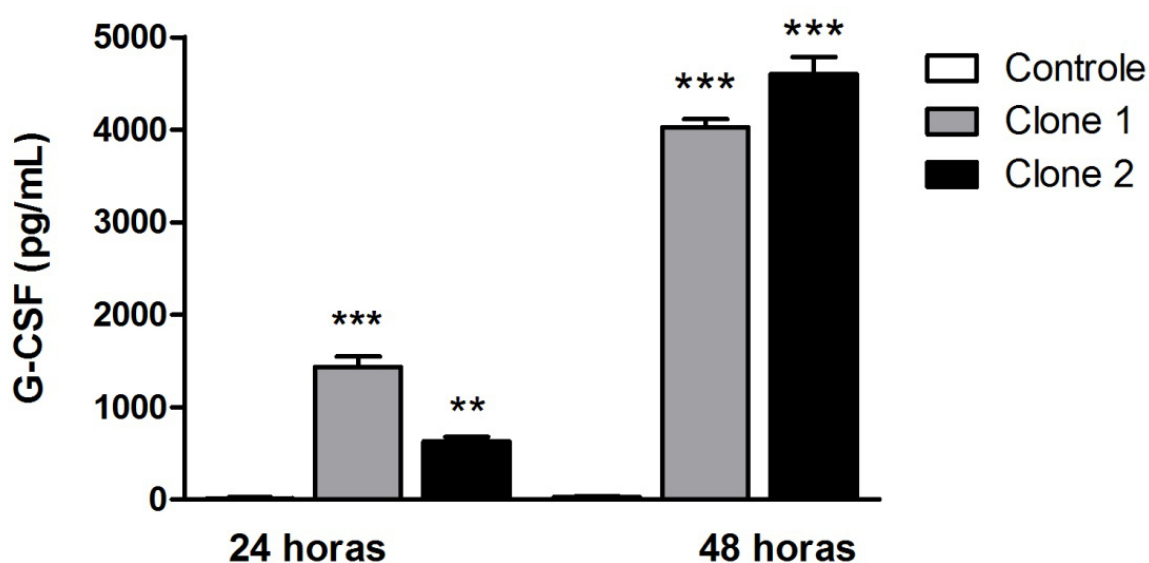


Figura 23: Análise dos níveis proteicos de hG-CSF nas linhagens geradas em comparação com a linhagem controle, BMSC_Ø. * Estatisticamente significativo comparado com o controle. * $p < 0,05$; ** $p < 0,0005$; *** $p < 0,0005$.

Os sobrenadantes das linhagens superexpressando IGF-1 humano também foram submetidos à análise por ELISA com 24 e 48 horas de cultura. Foi possível detectar a produção de IGF-1 em todos os clones gerados, no entanto, IGF-1 também foi detectado na linhagem controle BMSC_Ø. Apesar da quantidade de IGF-1 humano encontrada na linhagem controle ser menor do que o observado nos clones gerados, esta diferença não foi estatisticamente significativa. Por conta desta detecção não esperada, também foi avaliada a presença de IGF-1 em soro, meio sem soro e meio com 10% de soro fetal bovino. Somente no meio sem soro, não foi observada a presença de IGF-1 (figura 24).

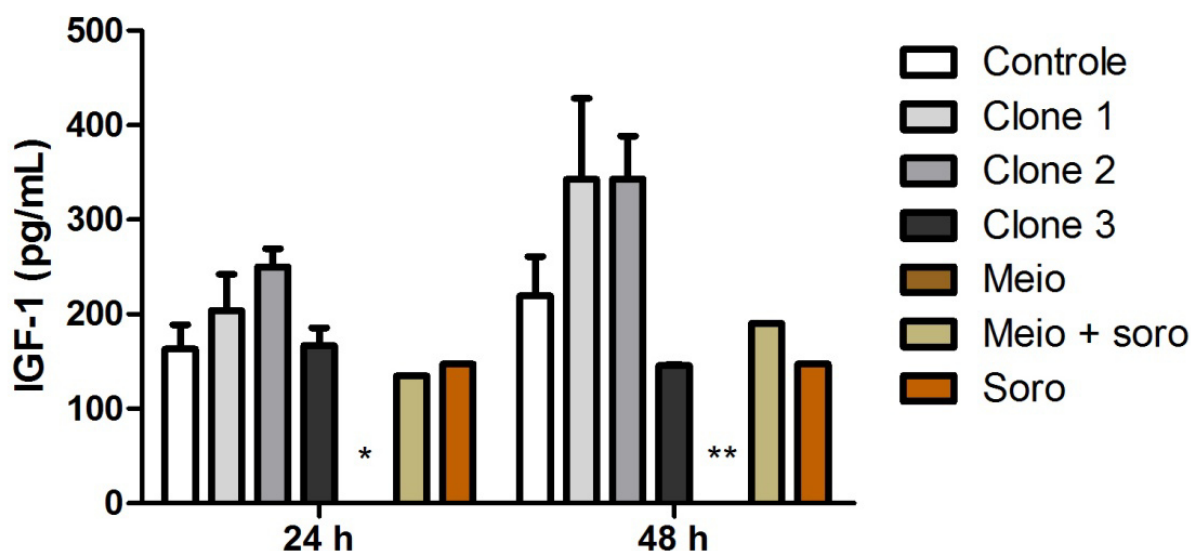


Figura 24: Análise dos níveis proteicos de IGF-1 nas linhagens geradas, meio DMEM, meio DMEM com 10% de soro fetal bovino e em soro fetal bovino, em comparação com a linhagem controle, BMSC_Θ . * Estatisticamente significativa comparado com o controle. * $p < 0,05$; ** $p < 0,0005$; *** $p < 0,0005$.

4.7.4. Imunofenotipagem

As linhagens geradas superexpressando hG-CSF e hIGF-1, assim com a linhagem controle, BMSC_Θ (P21) foram submetidas à imunofenotipagem por citometria de fluxo para avaliação da permanência do fenótipo tronco-mesenquimal após a modificação genética. Como as linhagens geradas alcançaram um número de passagem muito alto, por conta do processo de seleção clonal, nós realizamos também a imunofenotipagem de uma linhagem controle com passagem mais baixa, BMSC_Θ (P6), com o objetivo de comparação.

A expressão de GFP, CD 29, Sca-1, CD 105, CD 73 e CD 90 foi variada dentre as linhagens analisadas. BMSC_Θ (P6) e BMSC_IGF-1#1 apresentaram uma expressão homogênea de GFP. BMSC_G-CSF#2 foi negativa, enquanto que as outras linhagens demonstraram ser uma população heterogênea para expressão de GFP. BMSC_IGF-1#2, BMSC_IGF-1#3 e BMSC_Θ (P6), foram positivas para todos os marcadores comumente expressos em CTM de camundongo, CD 29, Sca-1 e CD 44 (BOXALL et al., 2012). BMSC_Θ (P6) também se demonstrou positiva para expressão de CD 105, CD 73 e CD 90, marcadores que compõem o critério de definição de CTM humanas (DOMINICI et al., 2006), porém sua

expressão é variável em diferentes espécies de animais e linhagens de camundongo (BOXALL et al., 2012; KOLF et al., 2007). Todas as linhagens analisadas foram negativas para expressão de marcadores hematopoiéticos, tais como como CD 11b e CD 45.

Quadro 5: Imunofenotipagem das linhagens geradas

MARCADORES	BMSC θ (P6)	BMSC θ (P21)	BMSC_ G-CSF#1 (P22)	BMSC_ G-CSF#2 (P17)	BMSC_ IGF-1#1 (P22)	BMSC_ IGF-1#2 (P24)	BMSC_ IGF-1#3 (P24)
GFP	92%	27%	70%	4%	93%	61%	5%
CD 29	100%	35%	9%	7%	33%	100%	100%
SCA-1	97%	48%	73%	16%	46%	91%	84%
CD44	100%	100%	100%	99%	100%	95%	97%
CD 105	63%	11%	9%	6%	4%	0%	0%
CD 73	96%	20%	36%	37%	53%	81%	93%
CD 90	76%	2%	5%	0%	0%	1%	0%
CD 45	0%	0%	1%	0%	0%	0%	0%
CD 11b	0%	3%	4%	3%	0%	0%	0%

4.7.4. Indução de diferenciação

Todos os clones de células-tronco mesenquimais murinas modificados para superexpressão de *hG-CSF* e *hIGF-1* se demonstraram capazes de diferenciar em adipócitos, condrócitos, e osteócitos, como é possível observar na figura 24, que exibe imagens representativas da diferenciação de um dos clones gerados para superexpressão de cada fator de crescimento.

A capacidade de diferenciação das linhagens superexpressando *hG-CSF*, *hIGF-1* e controle, em adipócitos, condrócitos e osteócitos sugere a manutenção do fenótipo tronco mesenquimal mesmo após a alteração gênica das CTM.

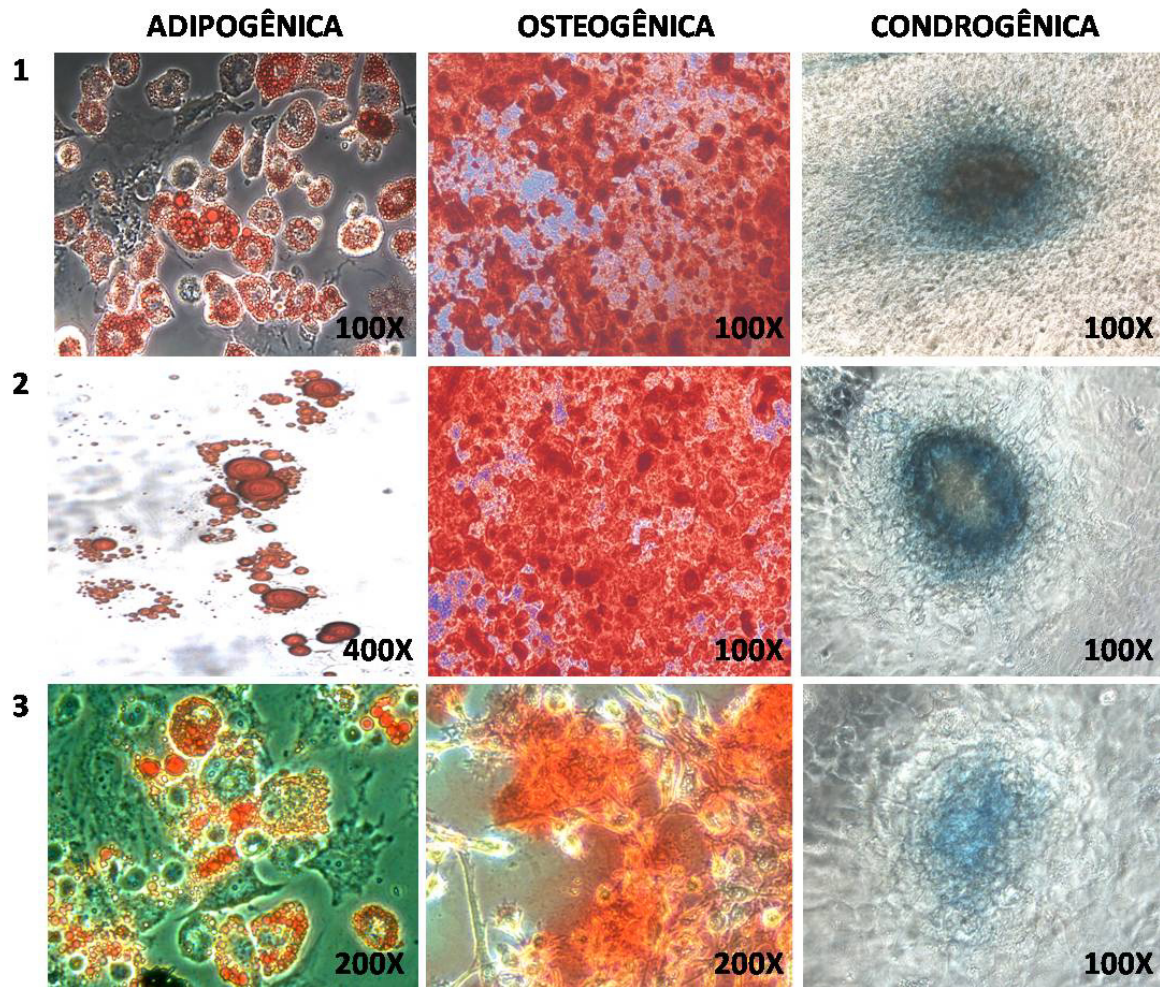


Figura 25: Imagens microscópicas obtidas durante o processo de indução de diferenciação adipogênico, osteogênico ou condrogênico das linhagens geneticamente modificadas para superexpressão de: (1) BMSC_IGF-1#1 cultivada em meios de diferenciação adipogênico, osteogênico ou condrogênico; (2) BMSC_G-CSF#1 cultivada em meios de diferenciação adipogênico, osteogênico ou condrogênico; (3) BMSC_θ cultivada em meios de diferenciação adipogênico, osteogênico ou condrogênico.

5. DISCUSSÃO

As aplicações clínicas com CTM são dificultadas, principalmente, pelo limitado desempenho do potencial terapêutico destas células *in vivo*. Estudos vêm mostrando a baixa taxa de sobrevivência, retenção e integração de CTM ao tecido lesionado pós-transplante (SHI; LI, 2008), principalmente devido à hostilidade própria de um ambiente de inflamação ao qual estas células são submetidas. Propriedades inerentes a estas células, que a princípio seriam favoráveis ao uso clínico, como a habilidade de se diferenciar em células de linhagens mesenquimais e não-mesenquimais (KOPEN; PROCKOP; PHINNEY, 1999; KOTTON et al., 2010; ROJAS et al., 2005 YAN et al., 2007); as atividades parácrinas sob diferentes tipos celulares (TAKAHASHI et al., 2006); as atividades imunorregulatórias (BARTHOLOMEW et al., 2002; LIECHTY et al., 2000); e sua característica hipoinmunogênica (TSE et al., 2013), são prejudicadas por conta da dificuldade de manutenção destas células em um microambiente tão desfavorável, como o de inflamação.

Posto isto, pesquisadores vêm analisando a capacidade protetora e terapêutica de genes alvos combinados às propriedades de CTM. Sabendo que até o presente, nenhum estudo demonstrou uma integração eficaz de CTM transplantadas ao tecido lesionado, a longo prazo, e que a perda de células injetadas localmente é atribuída à morte celular (KEAN et al., 2013), cientistas avaliam a engenharia genética de CTM como um mecanismo para aumentar a viabilidade destas células *in vivo*. A modificação de CTM para expressão de genes citoprotetores ou anti-apoptóticos, tem demonstrado aumentar, significativamente, a sobrevivência destas células, pós-transplante.

Seguindo esta linha, nesta pesquisa nós geramos linhagens de CTM derivadas de camundongo geneticamente modificadas para expressão ectópica de *hIGF-1* e *hG-CSF*, que são responsáveis por codificar citocinas ativadoras de vias de sobrevivência celular, proliferação e diferenciação (TOGEL et al., 2007; HARADA et al., 2005). Fundamentados na literatura, que evidencia as atividades protetoras de IGF-1 e G-CSF, acreditamos que as linhagens de CTM modificadas geneticamente para expressão ectópica de *hIGF-1* ou *hG-CSF* apresentarão um potencial terapêutico maior do que linhagens de CTM controle, quando testadas em diferentes modelos de lesão animal. CTM apresentam perfis de secretoma que são relativamente constantes entre diferentes doadores (CAPLAN; DENNIS, 2006), inclusive IGF-1 e G-CSF são constitutivamente expressos e secretados por estas células (SCHINKOTHE; BLOCH; SCHMIDT, 2010).

A manipulação genética de CTM foi realizada através de sistema lentiviral, que vem se provando particularmente eficiente para transdução de CTM (MCMAHON et al., 2006). Além da alta eficiência na transdução, inclusive de células pós-mitóticas e com baixas taxas de proliferação (SOMIA; VERMA, 2000), vetores lentivirais não afetam a viabilidade nem o potencial de diferenciação de CTM (MCGINLEY et al., 2011), dados também demonstrados em nossos resultados.

O plasmídeo pEGIP, utilizado como controle e como base para geração das construções, contém o promotor constitutivo EF1 α . Esse promotor possibilita a expressão contínua dos genes sob sua regulação (KIM et al., 1990) e dificilmente sofre influência de silenciamento por metilação, processo comumente observado quando genes são inseridos em células-tronco sob o controle de promotores como o CMV, muito utilizado em diversos plasmídeos para alterações gênicas de outros tipos celulares (MEILINGER et al., 2009; QIN et al., 2010).

Além da integração dos genes de interesse no genoma da célula hospedeira, da estabilidade, e de uma expressão contínua, foi fundamental garantir a correta transcrição dos genes pelas CTM. Para tanto, as construções lentivirais geradas foram sequenciadas, assegurando que a transcrição fosse iniciada no quadro de leitura apropriado, e que a síntese das proteínas de interesse não apresentassem nenhuma alteração em sua cadeia polipeptídica, certificando sua funcionalidade.

Uma outra questão considerada foi a preservação das características e propriedades das CTMs. O sistema lentiviral é integrativo, mas não sítio-específico, ou seja, os genes são inseridos no genoma da célula-alvo de maneira aleatória, o que pode ser disruptivo para a célula. Entretanto, estudos indicam a manutenção da plasticidade de CTM após modificações genéticas utilizando lentivirus. McMahon et al. (2006) demonstraram que vetores lentivirais não afetaram a via de diferenciação adipogênica de CTM. Já Van e colaboradores (2006) relataram ainda a conservação da expressão do transgene de interesse, neste caso o GFP, após a diferenciação de CTM em adipócitos e osteócitos.

Nossos resultados demonstram que as CTM modificadas geneticamente para expressão ectópica hIGF-1 e hG-CSF mantiveram as características que definem CTM, mesmo após a manipulação gênica utilizando sistema lentiviral de segunda geração. Além de manter a aderência plástica em cultura, todos os clones gerados foram capazes de se diferenciar em células adipogênicas, condrogênicas e osteogênicas, embora uma comparação

quantitativa das taxas de diferenciação entre as linhagens geradas e controles não tenha sido realizada.

Apesar de não haver um painel de epítomos de superfície que definam CTM isoladas da medula óssea de camundongo, assim como existe para CTM provenientes da medula óssea humana (DOMINICI et al., 2006), marcadores como CD 29, Sca-1 E CD44 são comumente presentes em CTM murinas (BOXALL, et al.2009; MAZZON et al., 2015). Como descrito na introdução, o critério corrente que define CTM humanas destaca a expressão positiva dos marcadores CD73, CD 90 e CD105 (DOMINICI et al., 2006). CTM obtidas de camundongo são similares às humanas mas diferem no fenótipo, ou seja, não expressam ou são heterogêneas para expressão de CD73 e CD90 (BOXALL et al.,2012; PEISTER et al., 2004; SCHURGERS et al., 2010), dados que corroboram nossos resultados.

Ainda que CD105 seja considerado um importante marcador de CTM, alguns artigos demonstram que sua expressão varia, dependendo da origem de isolamento, o tempo de cultura *in vitro*, a confluência e o estado de diferenciação das células (ANDERSON et al., 2013; GAEBEL et al., 2011). De acordo com estas publicações, nós observamos uma baixa taxa de expressão de CD105 nas células com passagens mais altas, enquanto que as CTM em P6 revelaram uma taxa de expressão de CD105 mais significativa (65%).

A expressão de Sca-1 foi variada entre as linhagens geradas. Este fato também foi constatado nos trabalhos de Badoo e colaboradores (2003) e Meirelles e colaboradores (2003). No último, eles avaliam o imunofenótipo de CTM isoladas da medula óssea de camundongos e cultivadas por longos períodos. Eles sugerem uma correlação entre o aumento da expressão de Sca-1, de acordo com o tempo de cultura. No entanto, o mesmo não pode ser afirmado com base em nossos resultados, visto que a linhagem BMSC Θ (P6) apresentou uma expressão de 97% de Sca-1, enquanto que a linhagem BMSC Θ (P21) apresentou uma expressão consideravelmente menor, 48%. Além disso as linhagens geradas que apresentaram uma alta passagem não apresentaram uma expressão homogênea de Sca-1, como pode ser observado por exemplo em BMSC_IGF-1#2 (P24) que demonstrou uma expressão de 91%, enquanto que BMSC_IGF-1#1 (P22) apresentou uma expressão de 46%. Ao contrário, nossos dados não sugerem uma relação entre o número de passagem e o nível de expressão de Sca-1. De outra perspectiva, o grupo sugere que a expressão de Sca-1 possa ser influenciada pelo ciclo celular e que esta molécula possa ser sensível a tripsina (MEIRELLES et al., 2003).

Neste contexto, Kolf e colaboradores (2007) revisam que existe uma inconsistência na expressão de epítomos de superfície como CD105, CD90, CD29, e Sca-1, relato que confirma

nossos dados. Por outro lado, todas as linhagens geradas apresentaram baixa expressão de antígenos, geralmente associados a células hematopoiéticas, como CD45 e CD11b (BADOO et al., 2003), o que sugere uma cultura livre de contaminantes hematopoiéticos.

É possível constatar que a expressão de GFP é bastante variável entre os clones gerados e as células controle. Harting e colaboradores (2009) também relatam uma perda da expressão de GFP em células isoladas de roedores transgênicos para GFP. Eles sugerem que a expressão deste gene repórter não esteja onipresente em células progenitoras isoladas de animais transgênicos, de acordo com a expansão celular. Sendo assim, é plausível que tenha ocorrido uma perda de GFP durante o cultivo das linhagens analisadas, visto que uma das linhagens controles, BMSC Ø, numa passagem mais baixa, P6, apresentou uma alta expressão de GFP, atingindo 92%. Além disso o trabalho de Taghizadeh e Sherley (2008) reporta a citotoxicidade da proteína repórter GFP, que foi associada à morte celular, e a possíveis efeitos de metilação, que causariam o silenciamento epigenético do gene.

Os resultados obtidos pela análise de PCR em tempo real nas linhagens geradas revelaram que houve uma robusta produção de hIGF-1 ou hG-CSF a nível transcricional. A quantificação da expressão de *hIGF-1* e *hG-CSF* está associada com a quantidade de eventos integrativos que ocorreram nas CTM transduzidas. Sendo assim, os resultados sugerem que o clone 2 de BMSC_G-CSF e os clones 1 e 3 de BMSC_IGF-1 são oriundos de células que foram infectadas com uma maior quantidade de partículas lentivirais.

Os resultados de ELISA dos clones superexpressando IGF-1 humano sugerem que existe uma reatividade cruzada com IGF-1 bovino presente no soro, e IGF-1 de camundongo, visto que é possível detectar IGF-1 tanto na linhagem controle, quanto no soro. É possível observar um sutil aumento da quantidade de IGF-1 na linhagem controle em comparação com o detectado no soro, tanto no tempo de cultura de 24 quanto em 48 horas, o que indica a possibilidade de uma reação cruzada não somente com IGF-1 presente no soro bovino fetal mas também com o IGF-1 de camundongo.

Apesar dos fornecedores do kit atestarem que os anticorpos não apresentam reatividade cruzada com IGF-1 recombinante de camundongo, nossos dados de qRT-PCR indicam o contrário, visto que os resultados não revelam expressão de IGF-1 na linhagem controle, BMSC Ø. O manual do kit utilizado não fornece nenhuma informação sobre reatividade cruzada com IGF-1 bovino, nem revela o domínio da proteína IGF-1 ao qual os anticorpos fornecidos se ligam. No entanto, de acordo com o observado, Singh e Armstrong (1997) evidenciam a presença de IGF-1 no soro fetal bovino. Além disso é possível observar

no alinhamento realizado com o programa MUSCLE EMBL-EBI, utilizando as sequências de IGF-1 registradas sob os acessos XP_005206554.1 para *Bos taurus*, NP_001104745.1 para *Mus musculus* e NP_000609.1 para *Homo sapiens* (figura 23) uma alta similaridade entre as sequências de aminoácidos de IGF-1 humano, de camundongo e bovino. Em conjunto, essas análises suportam o que foi observado nos ensaios realizados, ressaltando a possibilidade de reatividade cruzada com IGF-1 de camundongo e humano.

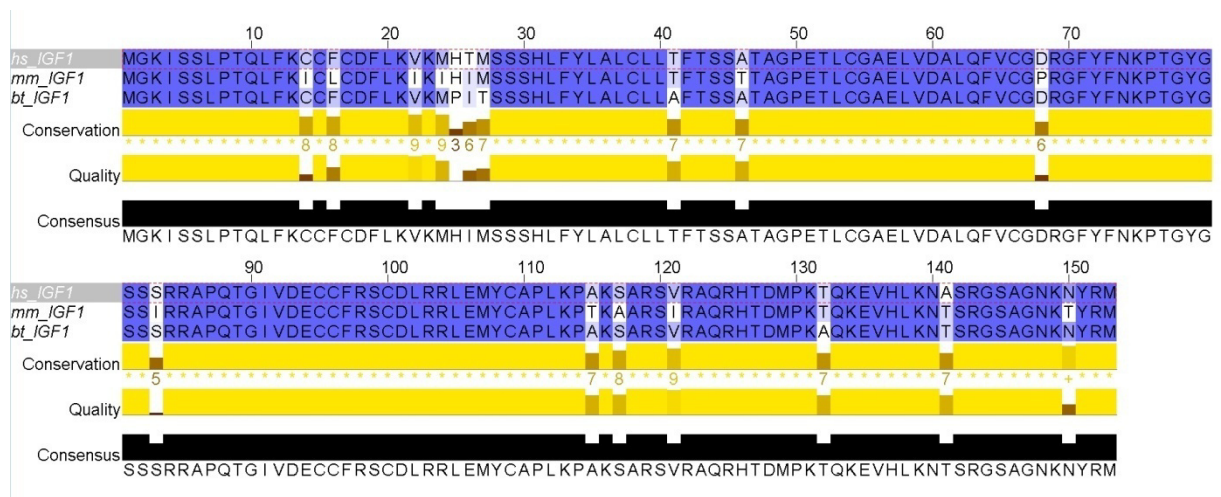


Figura 26: Alinhamento dos aminoácidos de IGF-1 humano (hs_IGF-1), IGF-1 de camundongo (mm_IGF-1) e IGF-1 bovino (bt_IGF-1).

Sobre a metodologia empregada para produção das linhagens geneticamente modificadas, esta apresenta vantagens e desvantagens que devem ser balanceadas de acordo com o propósito de aplicação do produto gerado. Com uma característica integrativa (KLARMANN, 2003), os lentivirus possibilitam a expressão permanente do transgene de interesse. De uma perspectiva logística, esta é uma interessante estratégia para que as linhagens geradas, após serem expandidas e criopreservadas estejam prontas para o emprego em ensaios pré-clínicos, algo que não poderia ser alcançado, por exemplo, utilizando adenovírus para terapia gênica com CTM, visto que o transgene é mantido na forma episomal, sendo, portanto, transientemente expresso (SOMIA; VERMA, 2000). Neste contexto, nosso grupo de pesquisa vem empregando as linhagens geradas em modelos experimentais de cardiomiopatia chagásica e de lesão da medula espinhal em camundongos. Vale ressaltar que as linhagens foram geradas a partir de células isoladas de camundongos C57BL6 transgênicos para GFP, o que possibilita o rastreamento destas células em ensaios pré-clínicos.

Em contrapartida, a integração de sequências virais e do transgene ao genoma hospedeiro trazem algumas preocupações no que diz respeito a segurança clínica por conta da possibilidade de mutagênese insercional, que poderia levar, em longo prazo, a uma anomalia da função celular, resultando em oncogênese. Sabe-se que o evento de integração induz mecanismos de reparo no DNA, o que pode trazer conseqüências deletérias para célula hospedeira e sua habilidade de manutenção da integridade genômica (WEITZMAN et al., 2004; SINCLAIR et al., 2014). Apesar de nenhum efeito adverso ter sido relatado em acompanhamentos de curto prazo, existe a necessidade de monitoramentos mais longos, que é a maneira mais robusta de identificar o potencial oncogênico de vetores lentivirais (CONNOLLY, 2002).

Outra importante implicação do emprego de CTM geneticamente modificadas na terapia clínica é a duração da expressão do transgene de interesse. Em muitos casos, uma expressão transiente do gene é suficiente para alcançar o efeito terapêutico desejado, enquanto que a expressão prolongada pode resultar em efeitos indesejáveis. Por outro lado, a expressão permanente é mais apropriada para o caso de doenças degenerativas, como o Parkinson, e monogênicas de herança recessiva, como fibrose cística e hemofilia. Vetores lentivirais seriam apropriados para estas situações. No entanto, tais aspectos de segurança envolvendo a utilização clínica de células geneticamente modificadas devem ser considerados, além da possibilidade de silenciamento gênico epigenético.

Sendo assim, as linhagens geradas neste trabalho podem ser utilizadas como ferramenta para determinação da potencialidade terapêutica de IGF-1 e G-CSF combinados com células-tronco mesenquimais em ensaios pré-clínicos de modelos de lesão animal. No caso de resultados promissores, que impulsionem e justifiquem estudos mais avançados em ensaios clínicos, metodologias alternativas e mais seguras para geração destas células deverão ser consideradas.

6. CONCLUSÃO

Neste trabalho nós obtivemos sucesso na geração e caracterização das linhagens de CTM de camundongo geneticamente modificadas para expressão ectópica de hIGF-1 e hG-CSF, sendo o fenótipo estromal destas células mantido.

7. REFERÊNCIAS

- ADACHI, Y. et al. G-CSF treatment increases side population cell infiltration after myocardial infarction in mice. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v.36, n.5, p.707-710, 2004.
- ANDERLINI, P. et al. Biologic and clinical effects of granulocyte colony-stimulating factor in normal individuals. **Blood**, v. 88, n. 8, p. 2819-25, 1996.
- ANDERSON, P. et al. CD105(endoglin)-negative murine mesenchymal stromal cells define a new multipotent subpopulation with distinct differentiation and immunomodulatory capacities. **PLOS One**. v.8, n.10, p.769-779, 2013.
- AURICH, I. et al. Functional integration of hepatocytes derived from human mesenchymal stem cells into mouse livers. **Gut**, v. 56, n. 3, p.405-415, 2007.
- AVALOS, B. R. Molecular analysis of the granulocyte colony-stimulating factor receptor. **Blood**, v. 88, n. 3, p. 761-777, 1996.
- AVALOS, B. R. et al. Human granulocyte colony-stimulating factor: biologic activities and receptor characterization on hematopoietic cells and small cell lung cancer cell lines. **Blood**, v. 75, n. 4, p. 851-857, 1990.
- BADDOO, M. et al. Characterization of mesenchymal stem cells isolated from murine bone marrow by negative selection. **Journal of Cell Biochemistry**. v.89 n.6, p.1235-1249, 2003.
- BAO-GUO, X. et al. Cell biology and clinical promise of G-CSF: immunomodulation and neuroprotection. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**. v. 11, n.6, p. 1272-1290, 2007.
- BARANIAK, P. R.; MCDEVITT, T. C. Stem cell paracrine actions and tissue regeneration. **Regenerative Medicine**, v. 5, n. 1, p. 121-143, 2010.
- BARRY, F. P.; MURPHY, J. M. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 36, n.4, p. 568-584, 2004.
- BARTHOLOMEW, A. et al. Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. **Experimental Hematology**, v. 30, n. 1, p. 42-48, 2002.
- BATTIWALLA, M.; HEMATTI, P. Mesenchymal stem cells in hematopoietic stem cell transplantation. **Cytotherapy**, v. 11, n. 5, p. 503-15, 2009.
- BELL, G.I. ET AL. Sequences of liver cDNAs encoding two different mouse insulin-like growth factor I precursors. **Nucleic Acids Research**. v.14, n.20, p.7873-7882, 1986.
- BEYTH, S. et al. Human mesenchymal stem cells alter antigen-presenting cell maturation and induce T-cell unresponsiveness. **Blood**, v. 105, n. 5, p. 2214-2219, 2005.
- BIANCO, P. et al. Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. **Stem Cells**, v. 19, n. 3, p. 180-192, 2001.

- BLANPAIN, C.; HORSLEY, V.; FUCHS, E. Epithelial stem cells: turning over new leaves. **Cell**, v. 128, n. 3, p. 445-458, 2007.
- BOXALL, S. A.; JONES, E. Markers for characterization of bone marrow multipotential stromal cells. **StemCells**, 2012.
- CALHOUN, D. A. et al.. Distribution of granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) and G-CSF-receptor mRNA and protein in the human fetus. **Pediatric Research**, v. 46, n. 3, p. 333-338, 1999.
- CAMPAGNOLI, C. et al.. Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. **Blood**, v. 98, n. 8, p. 2396-2402, 2001.
- CAPLAN, A. I. Mesenchymal stem cells. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 9, n. 5, p. 641-650, 1991.
- CAPLAN, A. I.; DENNIS, J. E. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 98, n. 5, p. 1076-1084, 2006.
- CHAMBERLAIN, J. R. et al.. Gene targeting in stem cells from individuals with osteogenesis imperfecta. **Science**, v. 303, n. 5661, p. 1198-1201, 2004.
- CHEN, S. L. et al.. Effect on left ventricular function of intracoronary transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cell in patients with acute myocardial infarction. **American Journal of Cardiology**, v. 94, n. 1, p. 92-95, 2004.
- CHEN, W.S. et al.. Growth retardation and increased apoptosis in mice with homozygous disruption of the Akt1 gene. **Genes Development**, v. 15, n. 17, p. 2203-2208, 2001.
- CONNOLLY, J. B. Lentiviruses in gene therapy clinical research. **Gene Therapy**, v. 9, n. 24, p. 1730-1734, 2002.
- CONTI, E. et al.. IGF-1 and atherothrombosis: relevance to pathophysiology and therapy. **Clinical Science**, v. 120, n. 9, p. 377-402, 2011.
- COPELAN, E. A. Hematopoietic stem-cell transplantation. **New England Journal of Medicine**, v. 354, n. 17, p. 1813-1826, 2006.
- CORCIONE, A. et al.. Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. **Blood**, v. 107, n. 1, p. 367-372, 2006.
- DAUGHADAY, W. H.; ROTWEIN, P. Insulin-like growth factors I and II. Peptide, messenger ribonucleic acid and gene structures, serum, and tissue concentrations. **Endocrine Reviews**, v. 10, n. 1, p. 68-91, 1989.
- DEMETRI, G. D.; GRIFFIN, J. D. Granulocyte colony-stimulating factor and its receptor. **Blood**, v. 78, n. 11, p. 2791-2808, 1991.
- DEZAWA, M. et al.. Specific induction of neuronal cells from bone marrow stromal cells and application for autologous transplantation. **Journal of Clinical Invest**, v. 113, n. 12, p. 1701-10, 2004.

- DOMINICI, M. et al.. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v. 8, n. 4, p. 315-317, 2006
- DRUKKER, M. et al.. Characterization of the expression of MHC proteins in human embryonic stem cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.99, n.15, p.9864-9869, 2002 .
- DUAN, C. Specifying the cellular responses to IGF signals: roles of IGF-binding proteins. **Journal of Endocrinology**, v.175, n.1, p 41-54, 2002.
- EAVES, C. J. et al.. Molecular analysis of primitive hematopoietic cell proliferation control mechanisms. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.628, p.298-306, 1991.
- FLORINI, J. R.; EWTON, D. Z.; COOLICAN, S. A. Growth hormone and the insulin-like growth factor system in myogenesis. **Endocrine Reviews**, v. 17, n. 5, p. 481-517, 1996.
- FORTIER, L. A. Stem cells: classifications, controversies, and clinical applications. **Veterinary Surgery**, v. 34, n. 5, p. 415-423, 2005.
- FRIEDENSTEIN, A. J. et al.. Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. Cloning in vitro and retransplantation in vivo. **Transplantation**, v.17, n.4, p.331-340, 1974.
- FRIEDENSTEIN, A. J.; PIATETZKY, S., II; PETRAKOVA, K. V. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. **Journal of Embryology and Experimental Morphology**, v.16, n.3, p.381-390,1966.
- FUKUNAGA, R. et al.. Expression cloning of a receptor for murine granulocyte colony-stimulating factor. **Cell**, v.61, n.2, p.341-350,1990.
- GAEBEL, R. et al.. Cell origin of human mesenchymal stemcells determines adifferent healingperformancein cardiac regeneration. **PLOS One**, v.6, n.2, 2011.
- GARCIA-CASTRO, J. et al.. Mesenchymal stem cells and their use as cell replacement therapy and disease modelling tool. **Journal of Cell Molecular Medicine**, v. 12, n.6b, p. 2552-2565,2008.
- GLENNIE, S.et al.. Bone marrow mesenchymal stem cells induce division arrest anergy of activated T cells. **Blood**, v.105, n.7, p. 2821-2827, 2005.
- GNECCHI, M. et al.. Evidence supporting paracrine hypothesis for Akt-modified mesenchymal stem cell-mediated cardiac protection and functional improvement. **FASEB Journal**, v. 20, n. 6, p. 661-669, 2006.
- GNECCHI, M. et al.. Paracrine mechanisms in adult stem cell signaling and therapy. **Circulation Research**. v. 103, n. 11 p. 1204-1219, 2008.
- GRUBER, R. et al.. Bone marrow stromal cells can provide a local environment that favors migration and formation of tubular structures of endothelial cells. **Tissue Engineering**, v 11, n. 5-6, p. 896-903, 2005.

- GUO, J. et al.. Insulin-like growth factor 1 improves the efficacy of mesenchymal stem cells transplantation in a rat model of myocardial infarction. **Journal Biomedical Science**, v. 15, n. 1, p. 89-97, 2008.
- HAIDER, H. K. et al.. Nonviral vector gene modification of stem cells for myocardial repair. **Molecular Medicine**, v. 14, n. 1-2, p. 79-86, 2008.
- HARADA, M. et al.. G-CSF prevents cardiac remodeling after myocardial infarction by activating the Jak-Stat pathway in cardiomyocytes. **Nature Medicine**, v. 11, n. 3, p. 305-311, 2005.
- HARTING, M. T. et al.. Isolation of mesenchymal stem cells (MSCs) from green fluorescent protein positive (GFP+) transgenic rodents: the grass is not always green(er). **Stem Cells and Development**, v. 18, n. 1, p. 127-135, 2009
- HAYNESWORTH, S. E. et al.. Characterization of cells with osteogenic potential from human marrow. **Bone**, v. 13, n. 1, p. 81-8, 1992.
- HORWITZ, E. M. et al.. Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: Implications for cell therapy of bone. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 13, p. 8932-8937, 2002.
- HORWITZ, E. M. et al.. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v. 7, n. 5, p. 393-5, 2005.
- HORWITZ, E. M. et al.. Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta. **Nature Medicine**, v. 5, n. 3, p. 309-13, 1999.
- HUA, J. et al.. Characterization of mesenchymal stem cells (MSCs) from human fetal lung: potential differentiation of germ cells. **Tissue and Cell**, v. 41, n. 6, p. 448-455, 2009.
- IEISHI, K. et al.. The effect of G-CSF in a myocardial ischemia reperfusion model rat. **Journal of Medical Investigation**, v. 54, n. 1-2, p. 177-183, 2007.
- INOUE, H.; NOJIMA, H.; OKAYAMA, H. High efficiency transformation of Escherichia coli with plasmids. **Gene**, v. 96, n. 1, p. 23-28, 1990.
- IN 'T ANKER, P.S. et al.. Amniotic fluid as a novel source of mesenchymal stem cells for therapeutic transplantation. **Blood**, v. 102, n. 4, p. 1548-1549, 2003.
- IN 'T ANKER, P.S. et al.. Isolation of mesenchymal stem cells of fetal or maternal origin from human placenta. **Stem Cells**, v. 22, n. 7, p. 1338-1345, 2004.
- ITO, K.; SUDA, T. Metabolic requirements for the maintenance of self-renewing stem cells. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 15, n. 4, p. 243-256, 2014.
- JONES, J. I.; CLEMMONS, D. R. Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. **Endocrine Reviews**, v.16, n.1, p.3-34, 1995.

- KANEMITSU, N. et al.. Insulin-like growth factor-1 enhances the efficacy of myoblast transplantation with its multiple functions in the chronic myocardial infarction rat model. **Journal of Heart and Lung Transplantation**, v. 25, n. 10, p. 1253-1262, 2006.
- KAWADA, H. et al.. Nonhematopoietic mesenchymal stem cells can be mobilized and differentiate into cardiomyocytes after myocardial infarction. **Blood**, v. 104, n. 12, p. 3581-3587, 2004.
- KEAN, T.J. et al.. MSCs: Delivery routes and engraftment, cell-targeting strategies, and immune modulation. **Stem Cells International**, v. 2013, p. 732742, 2013
- KIM, D.W. et al.. Use of the human elongation factor 1 alpha promoter as a versatile and efficient expression system. **Gene**, v. 91, n. 2, p. 217-223, 1990.
- KLARMANN, G. J. et al.. Incorporation of uracil into minus strand DNA affects the specificity of plus strand synthesis initiation during lentiviral reverse transcription. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 10, p. 7902-7909, 2003.
- KLOCKE, R. et al.. Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) for cardio- and cerebrovascular regenerative applications. **Current Medicinal Chemistry**, v. 15, n. 10, p. 968-977, 2008.
- KOC, O. N. et al.. Allogeneic mesenchymal stem cell infusion for treatment of metachromatic leukodystrophy (MLD) and Hurler syndrome (MPS-IH). **Bone Marrow Transplant**, v. 30, n. 4, p. 215-222, 2002.
- KOLF, C. M. et al. Mesenchymal stromal cells. Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation. **Arthritis Research & Therapy**, v. 9, n. 1, p. 204, 2007
- KOOIJMAN, R. Regulation of apoptosis by insulin-like growth factor (IGF)-I. **Cytokine & Growth Factor Review**, v. 17, n. 4, p. 305-323, 2006.
- KØRBLING, M.; ESTROV, Z. Adult stem cells for tissue repair - a new therapeutic concept? **New England Journal of Medicine**, v. 349, n. 6, p. 570-582, 2003.
- KOPEN, G. C.; PROCKOP, D. J.; PHINNEY, D. G. Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. **Proceedings of the National Academy Sciences**, v. 96, n. 19, p. 10711-10716, 1999.
- KOTTON, D. N. et al.. Bone marrow-derived cells as progenitors of lung alveolar epithelium. **Development**, v. 128, n. 24, p. 5181-5188, 2001.
- KRAMPERA, M. et al.. Mesenchymal stem cells for bone, cartilage, tendon and skeletal muscle repair. **Bone**, v. 39, n. 4, p. 678-83, 2006.
- LAVIOLA, L.; NATALICCHIO, A.; GIORGINO, F. The IGF-I signaling pathway. **Current Pharmaceutical Design**, v. 13, n. 7, p. 663-669, 2007.

- LE BLANC, K. et al.. Fetal mesenchymal stem-cell engraftment in bone after in utero transplantation in a patient with severe osteogenesis imperfecta. **Transplantation**, v. 79, n. 11, p. 1607-1614, 2005.
- LEROITH, D. et al.. Molecular and cellular aspects of the insulin-like growth factor I receptor. **Endocrine Review**, v. 16, n. 2, p. 143-163, 1995.
- LI, S.; HUANG, L. Nonviral gene therapy: promises and challenges. **Gene Therapy**, v.7, n.1, p.31-34, 2000.
- LI, W. et al.. Bcl-2 engineered MSCs inhibited apoptosis and improved heart function. **Stem Cells**, v.25, n.8, p. 2118-2127, 2007.
- LI, Y. et al.. Treatment with granulocyte colony-stimulating factor ameliorates chronic heart failure. **Laboratory Investigation**, v.86, n.1, p.32-44, 2006.
- LI, Y. et al.. Insulin-like growth factor 1 enhances the migratory capacity of mesenchymal stem cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 356, n. 3, p. 780-784, 2007.
- LIECHTY, K. W. et al.. Human mesenchymal stem cells engraft and demonstrate site-specific differentiation after in utero transplantation in sheep. **Nature Medicine**, v. 6, n. 11, p. 1282-1286, 2000.
- LIU, J. P. et al.. Mice carrying null mutations of the genes encoding insulin-like growth factor I (Igf-1) and type 1 IGF receptor (Igf1r). **Cell**, v. 75, n. 1, p. 59-72, 1993.
- LIU, T. B. et al.. Enhanced IGF-1 expression improves smooth muscle cell engraftment after cell transplantation. **American Journal of Physiology: Heart and Circulatory Physiology**, v. 287, n. 6, p. 2840-2849, 2009.
- MACAMBIRA, S. G. et al.. Granulocyte colony-stimulating factor treatment in chronic Chagas disease: preservation and improvement of cardiac structure and function. **FASEB Journal**, v. 23, n. 11, p. 3843-3850, 2009.
- MAJUMDAR, M. K. et al.. Phenotypic and functional comparison of cultures of marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) and stromal cells. **Journal Cell Physiology**, v. 176, n. 1, p. 57-66, 1998.
- MAZZON, C. The critical role of agrin in the hematopoietic stem cell niche. **Blood**, v. 118, n. 10, p. 2733-2742, 2011.
- MCMAHON J. M. Gene transfer into rat mesenchymal stem cells: a comparative study of viral and nonviral vectors. **Stem Cells and Development**, v. 15, n. 1, p. 87-96, 2006.
- MEILINGER, D. et al.. Np95 interacts with de novo DNA methyltransferases, Dnmt3a and Dnmt3b, and mediates epigenetic silencing of the viral CMV promoter in embryonic stem cells. **EMBO Reports**, v.10, n.11, p.1259-1264, 2009.
- MEIRELLES, L. D. S. et al.. Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells. **Cytokine Growth Factor Review**, v. 20, n. 5-6, p. 419-427, 2009.

- METCALF, D. Haemopoietic growth factors. **Lancet**, v. 1, n. 8642, p. 825-827, 1989.
- MINATOBUCHI, S. et al.. Acceleration of the healing process and myocardial regeneration may be important as a mechanism of improvement of cardiac function and remodeling by post infarction granulocyte colony-stimulating factor treatment. **Circulation**, v. 109, n. 21, p. 2572-2580, 2004.
- MITALIPOV, S.; WOLF, D. Totipotency, pluripotency and nuclear reprogramming. **Advances in Biochemical Engineering Biotechnology**, v. 114, p. 185-99, 2009.
- MOORE, L. K.; PERSUAD, T. V. N. Embriologia básica: introdução a embriologia humana. 7. ed. Rio de Janeiro: **Elsevier**, 2008.
- MORSTYN, G. et al.. Treatment of chemotherapy-induced neutropenia by subcutaneously administered granulocyte colony-stimulating factor with optimization of dose and duration of therapy. **Journal of Clinical Oncology**, v. 7, n. 10, p. 1554-1562, 1989.
- MUGURUMA, Y. et al.. Reconstitution of the functional human hematopoietic microenvironment derived from human mesenchymal stem cells in the murine bone marrow compartment. **Blood**, v. 107, n. 5, p. 1878-87, 2006.
- NAGATA, S. Gene structure and function of granulocyte colony-stimulating factor. **Bioessays**, v. 10, n. 4, p. 113-117, 1989.
- NARDI, N. et al. Terapia gênica. **Ciência e Saúde Coletiva**, v. 7, n. 1, p. 109-116, 2002.
- NASEF, A. et al.. Leukemia inhibitory factor: Role in human mesenchymal stem cells mediated immunosuppression. **Cellular Immunology**, v. 253, n. 1-2, p. 16-22, 2008.
- NAUTA, A. J.; FIBBE, W. E. Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. **Blood**, v. 110, n. 10, p. 3499-3506, 2007.
- ORLIC, D. et al.. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. **Nature**, v. 410, n. 6829, p. 701-705, 2001.
- ORLIC, D. et al.. Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. **Proceedings of National Academy Sciences**. v. 98, n. 18, p. 10344-10349, 2001.
- ORTIZ, L. A. et al.. Mesenchymal stem cell engraftment in lung is enhanced in response to bleomycin exposure and ameliorates its fibrotic effects. **Proceedings of National Academy Sciences**, v. 100, n. 14, p. 8407-8411, 2003.
- OWEN, M.; FRIEDENSTEIN, A. J. Stromal stem cells: marrow-derived osteogenic precursors. **Ciba Foundation Symposium**, v. 136, p. 42-60, 1988.
- PEREIRA, R. F. et al.. Cultured adherent cells from marrow can serve as long-lasting precursor cells for bone, cartilage, and lung in irradiated mice. **Proceedings of National Academy Sciences**, v. 92, n. 11, p. 4857-4861, 1995.
- PAREKKADAN, B. et al.. Mesenchymal stem cell-derived molecules reverse fulminant hepatic failure. **PLOS One**, v. 2, n. 9, p. 941, 2007.

- PEISTER, A. et al.. Adult stem cells from bone marrow (MSCs) isolated from different strains of inbred mice vary in surface epitopes, rates of proliferation, and differentiation potential. **Blood**, v. 103, n. 5, p. 1662-1668, 2004
- PETERSEN, B. E. et al.. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. **Science**, v. 284, n. 5417, p. 1168-1170, 1999.
- PETIT, I. et al.. G-CSF induces stem cell mobilization by decreasing bone marrow SDF-1 and up-regulating CXCR4. **Nature Immunology**, v. 3, n. 7, p. 687-694, 2002.
- PHINNEY, D. G. Building a consensus regarding the nature and origin of mesenchymal stem cells. **Journal Cellular Biochemistry Supplement**, v. 38, p. 7-12, 2002.
- PHINNEY, D. G. et al.. Biological activities encoded by the murine mesenchymal stem cell transcriptome provide a basis for their developmental potential and broad therapeutic efficacy. **Stem Cells**, v. 24, n. 1, p. 186-98, 2006.
- PHINNEY, D. G.; PROCKOP, D. J. Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair--current views. **Stem Cells**, v. 25, n. 11, p. 2896-2902, 2007.
- PITTENGER, M. F. et al.. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. **Science**, v. 284, n. 5411, p. 143-147, 1999.
- PROCKOP, D. J. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. **Science**, v. 276, n. 5309, p. 71-74, 1997.
- QUARTO, R. et al.. Repair of large bone defects with the use of autologous bone marrow stromal cells. **New England Journal of Medicine**, v. 344, n. 5, p. 385-286, 2001.
- QIN, J. Y. et al.. Systematic Comparison of Constitutive Promoters and the Doxycycline-Inducible Promoter. **PLOS One**, v. 5, n. 5, p. 106-111, 2010.
- RAFII, S. et al.. Regulation of hematopoiesis by microvascular endothelium. **Leukemia & Lymphoma**, v. 27, n. 5-6, p. 375-386, 1997.
- RAMASAMY, R. et al.. Mesenchymal stem cells inhibit dendritic cell differentiation and function by preventing entry into the cell cycle. **Transplantation**, v. 83, n. 1, p. 71-76, 2007.
- RASMUSSEN, I. et al.. Mesenchymal stem cells inhibit the formation of cytotoxic T lymphocytes, but not activated cytotoxic T lymphocytes or natural killer cells. **Transplantation**, v. 76, n. 8, p. 1208-1213, 2003.
- ROJAS, M. et al.. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells in repair of the injured lung. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 33, n. 2, p. 145-52, 2005.
- ROSE, R. A. et al.. Bone marrow-derived mesenchymal stromal cells express cardiac-specific markers, retain the stromal phenotype, and do not become functional cardiomyocytes in vitro. **Stem Cells**, v. 26, n. 11, p. 2884-2892, 2008.
- SANCHEZ-RAMOS, J. et al.. Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro. **Experimental Neurology**, v. 164, n. 2, p. 247-256, 2000.

- SCHIAFFINO, S.; MAMMUCARI, C. Regulation of skeletal muscle growth by the IGF1-Akt/PKB pathway: insights from genetic models. **Skelet Muscle**, v. 1, n. 1, p. 4, 2011.
- SCHINKOTHE, T.; BLOCH, W.; SCHMIDT, A. In vitro secreting profile of human mesenchymal stem cells. **Stem Cells and Development**, v. 17, n. 1, p. 199-206, 2008.
- SCHURGERS, E. et al.. Discrepancy between the in vitro and in vivo effects of murine mesenchymal stem cells on T-cell proliferation and collagen-induced arthritis. **Arthritis Research & Therapy**, v. 12, n. 1, p. R31, 2010.
- SHI, R. Z.; LI, Q. P. Improving outcome of transplanted mesenchymal stem cells for ischemic heart disease. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 376, n. 2, p. 247-250, 2008.
- SINGH, B.; ARMSTRONG, D.T. Insulin-like growth factor-1, a component of serum that enables porcine cumulus cells to expand in response to follicle-stimulating hormone in vitro. **Biology of Reproduction**, v. 56, n. 6, p. 1370-1375, 1997.
- SOLAROGLU, I.; JADHAV, V.; ZHANG, J. H. Neuroprotective effect of granulocyte-colony stimulating factor. **Frontiers in Bioscience**, v. 12, p. 712-724, 2007.
- SOMIA, N.; VERMA, I. M. Gene therapy: trials and tribulations. **Nature Review Genetics**, v. 1, n. 2, p. 91-99, 2000.
- STAMM, C. et al.. Autologous bone-marrow stem-cell transplantation for myocardial regeneration. **Lancet**, v. 361, n. 9351, p. 45-46, 2003.
- STEVENS, L. C. Origin of testicular teratomas from primordial germ cells in mice. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 38, p. 549-552, 1967.
- SU, Y. C. et al.. G-CSF downregulates natural killer cell-mediated cytotoxicity in donors for hematopoietic SCT. **Bone Marrow Transplantation**, v. 47, n. 1, p. 73-81, 2012.
- TAGHIZADEH, R.R.; SHERLEY, J. L. CFP and YFP, but not GFP, provide stable fluorescent marking of rat hepatic adult stem cells. **Journal of Biomedicine Biotechnology**, v. 2008, p. 453590, 2008.
- TAKAHASHI, M. et al.. Cytokines produced by bone marrow cells can contribute to functional improvement of the infarcted heart by protecting cardiomyocytes from ischemic injury. **American Journal Physiology: Heart and Circulatory Physiology**, v. 291, n. 2, p. 886-893, 2006.
- TENÓRIO, L. Z. et al.. A potencialidade dos lentivírus na terapia gênica. **Revista da Sociedade Brasileira de Clínica Médica**, v. 6, n. 6, p. 260-267, 2008.
- THEOCHARIS, S. E. et al.. Granulocyte-colony stimulating factor administration ameliorates liver regeneration in animal model of fulminant hepatic failure and encephalopathy. **Digestive Diseases Sciences**, v. 48, n. 9, p. 1797-1803, 2003.
- THOMSON, J. A. et al.. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. **Science**, v. 6, n. 282, p. 1145-1147, 1998.

- TOGEL, F. et al.. Vasculotropic, paracrine actions of infused mesenchymal stem cells are important to the recovery from acute kidney injury. **American Journal of Physiology Renal Physiology**, v. 292, n. 5, p. 1626-1635, 2007.
- TROPEL, P. et al.. Isolation and characterisation of mesenchymal stem cells from adult mouse bone marrow. **Experimental Cell Research**, v. 295, n. 2, p. 395-406, 2004.
- TSE, W. T. et al.. Suppression of allogeneic t-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation. **Transplantation**, v.75, n. 3, p. 389-97, 2003.
- TSUBOKAWA, T. et al.. Impact of anti-apoptotic and anti-oxidative effects of bone marrow mesenchymal stem cells with transient overexpression of heme oxygenase-1 on myocardial ischemia. **American Journal of Physiology: Heart and Circulatory Physiology**, v. 298, n. 5, p. 1320-1329, 2010.
- VAN, D. A. Efficient lentiviral transduction and improved engraftment of human bone marrow mesenchymal cells. **Stem Cells**, v. 24, n. 4, p. 896-907, 2006.
- VATS, A. et al.. Stem cells: sources and applications. **Clinical Otolaryngology and Allied Sciences**, v. 27, n. 4, p. 227-32, 2002.
- VERMA, I. M.; SOMIA, N. Gene therapy - promises, problems and prospects. **Nature**, v. 389, n. 6648, p. 239-242, 1997.
- VERMA, I. M.; SOMIA, N. Gene therapy --promises, problems and prospects. **Nature**. v. 389, n. 6648, p. 239-242, 1997.
- WAGNER, J. et al.. Optimizing mesenchymal stem cell-based therapeutics. **Current Opinion Biotechnology**. v. 20, n. 5, p. 531-536, 2009.
- WAGERS, A. J.; WEISSMAN, I. L. Plasticity of adult stem cells. **Cell**, v. 116, n. 5, p. 639-648, 2004.
- WANG, S. et al.. Clinical applications of mesenchymal stem cells. **Journal Hematology and Oncology**. v. 5, n. 19. p. 5-19, 2012.
- WANG, X. J.; LI, Q. P. The roles of mesenchymal stem cells (MSCs) therapy in ischemic heart diseases. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 359, n. 2, p. 189-93, 2007.
- WATT, F. M.; HOGAN, B. L. Out of Eden: stem cells and their niches. **Science**, v. 287, n. 5457, p. 1427-1430, 2000.
- WEITZMAN, M. D. Interactions of viruses with the cellular DNA repair machinery. **DNA Repair (Amst)**. v. 3, n. 8-9, p. 1165-1173, 2004.
- WILLIAMS, J. T. et al.. Cells isolated from adult human skeletal muscle capable of differentiating into multiple mesodermal phenotypes. **American Journal of Surgery**, v.65, n. 1, p. 22-26, 1999.

YAN, X. et al.. Injured microenvironment directly guides the differentiation of engrafted Flk-1(+) mesenchymal stem cell in lung. **Experimental Hematology**, v. 35, n. 9, p. 1466-1475, 2007.

YU, Y. S. et al.. AKT-modified autologous intracoronary mesenchymal stem cells prevent remodeling and repair in swine infarcted myocardium. **Chinese Medical Journal**, v. 123, n. 13, p. 1702-1708, 2010.

ZUK, P. A. et al.. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. **Tissue Engineering**, v. 7, n. 2, p. 211-28, 2001.

8. ANEXOS

8.1.SOLUÇÕES

Meio LB

Tryptone 1%

Extrato de levedura 0,5%

Cloreto de sódio 1%

Ajustar pH 7,5 com NaOHaq

Autoclavar por 20' a 120°

HBS 1X

Cloreto de sódio 274 mM

HEPES 40 mM

Fosfato Monoácido de sódio 2,8 mM

TBE 1X

Tris base 89mM

Ácido bórico 89mM

EDTA 2mM

PBS 1X

NaCl 137 mM

KCl 2.7 mM

Na₂HPO₄ 10 mM

KH₂PO₄ 2 mM

