

Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

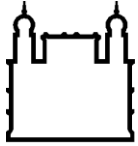
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

**CARACTERIZAÇÃO DA EXPRESSÃO DE DZIP1 E PUM2 EM
CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS HUMANAS DURANTE O
PROCESSO DE DIFERENCIAÇÃO CELULAR**

PATRÍCIA SHIGUNOV

CURITIBA – PR

2009



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

PATRÍCIA SHIGUNOV

CARACTERIZAÇÃO DA EXPRESSÃO DE DZIP1 E PUM2 EM CÉLULAS- TRONCO MESENQUIMAIS HUMANAS DURANTE O PROCESSO DE DIFERENCIAÇÃO CELULAR

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz
como parte dos requisitos para obtenção do título de
Mestre em Biologia Celular e Molecular.

Orientador (es): Dr. Bruno Dallagiovanna

Dr. Marco Aurélio Krieger

CURITIBA - PR

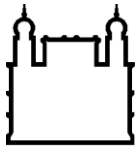
2009

SHIGUNOV, Patrícia

Caracterização da Expressão de DZIP1 e PUM2 em Células-Tronco Mesenquimais Humanas Durante o Processo de Diferenciação Celular / Patrícia Shigunov. Curitiba, 2009. 119p

Dissertação de Mestrado – Instituto Oswaldo Cruz, Biologia Celular e Molecular, 2009

1. Células-Tronco Mesenquimais Humanas. 2. Diferenciação Celular. 3. Regulação Pós-Transcricional. 4. DZIP1. 5. Pumilio 2.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

PATRÍCIA SHIGUNOV

CARACTERIZAÇÃO DA EXPRESSÃO DE DZIP1 E PUM2 EM CÉLULAS- TRONCO MESENQUIMAIS HUMANAS DURANTE O PROCESSO DE DIFERENCIAÇÃO CELULAR

Orientador: Dr. Bruno Dallagiovanna

Co-Orientador: Dr. Marco Aurélio Krieger

Aprovada em: 29/05/2009

EXAMINADORES:

Presidente da banca: Dr. Stênio Perdigão Fragoso (ICC/IBMP)

Dra. Andréa Rodrigues Ávila (ICC-IBMP)

Dra. Carmen Lúcia Kuniyoshi Rebelatto (PUC-PR)

Dra. Daniela Pavoni (ICC-IBMP)

Dra. Alexandra Cristina Senegaglia (PUC-PR)

Curitiba, 29 de Maio de 2009

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Nicolau e Claudinéia Shigunov, pelo amor, carinho e apoio em todos os passos da minha vida e, além disso, pelos ensinamentos que deram suporte para a formação do meu caráter e princípios

À minha irmã, Vanessa Shigunov, pela sua amizade e companheirismo.

Ao meu amado, Eduardo, pelo amor, atenção e paciência.

Ao Dr. Bruno Dallagiovanna pela oportunidade de me ensinar a conhecer o universo da ciência, pela orientação, confiança e acima de tudo pela amizade.

Ao Dr. Samuel Goldenberg, Dr. Marco A. Kriger, Dr. Stênio Perdigão Fragoso e Dra. Cláudia N. D. dos Santos pelo exemplo de profissionalismo.

Aos integrantes da Banca Examinadora, Dr. Stênio Perdigão Fragoso, Dra. Andréa Rodrigues Ávila e Dra. Carmen Lúcia Kuniyoshi Rebelatto, as suplentes Dra. Daniela Pavoni e Dra. Alexandra Cristina Senegaglia e ao revisor Dr. Augusto Ramos pela revisão criteriosa do presente trabalho.

Aos amigos de laboratório Alejandro Correa, Alessandra Aguiar, Andressa Schittini, Crisciele Kuligovski e Jaiesa Zych pelos auxílios e companheirismo. A vocês que sempre me apoiaram e possibilitaram a realização desse trabalho.

Aos colegas Nilson José Fidêncio e Paulo Arauco pelo auxílio técnico. Agradeço também o auxílio dos colegas Edilaine Azevedo e Luiz Casarotto.

A todos os amigos do Instituto de Biologia Molecular do Paraná pela prontidão em ajudar sempre que necessário e pela amizade.

Ao grupo de células-tronco da PUC pela colaboração e apoio durante os experimentos.

A todos aqueles que, embora não nomeados, contribuíram de forma direta ou indireta para a realização desta dissertação.

Ao CNPq, FIOCRUZ e ICC pelo apoio financeiro.

MUITO OBRIGADA!!!

Patrícia Shigunov

Para meus pais Nicolau e Claudinéia,
Para minha irmã, amiga e psicóloga Vanessa
E para meu amado Eduardo

LISTA DE ABREVIATURAS

- AP:** *Alkaline phosphatase* (Fosfatase alcalina)
- BCIP:** 5-Bromo-4 Cloro-3 Indolyl Fosfato
- BLAST:** *Basic Local Alignment Search Tool* (Ferramenta de busca de alinhamentos locais)
- BSA:** *Bovine serum albumin* (Albumina sérica bovina)
- cDNA:** DNA complementar
- CTs:** Células-tronco
- CTMs:** Células-tronco mesenquimais
- DAPI:** *4',6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride* (4',6-diamidino-2-fenilindol, dihidrocloro)
- DIC:** *Differential Interference Contrast* (Contraste por interferência diferencial)
- DNA:** *Deoxiribonucleic acid* (Ácido desoxiribonucléico)
- dNTPs:** Desoxirribonucleotídeos trifosfatados
- dpr:** Desvio padrão relativo
- DMSO:** Dimetilsulfóxido
- DNase:** Deoxirribonuclease
- EDTA:** Ácido etilenodiaminotetracético
- FITC:** *Fluorescein isothiocyanate* (Isotiocianato de fluoresceína)
- g:** Aceleração de gravidade
- ICC:** Instituto Carlos Chagas
- IFI:** Imunofluorescência indireta
- IPTG:** Isopropil 1 tio- β -D galactosídeo
- kb:** Quilo bases
- kDa:** Quilo Dalton
- MEM:** Meio essencial mínimo
- NBT:** *Nitro-blue-tetrazolium* (Nitroazul de tetrazólio)
- NCBI:** *National Center for Biotechnology Information*
- pb:** Pares de bases
- PBS:** *Phosphate buffered saline* (Solução salina tamponada com fosfato)
- PCR:** *Polymerase chain reaction* (Reação em cadeia da polimerase)
- pH:** Potencial hidrogeniônico
- PM:** Peso molecular
- pmol:** Picomol

RBPs: *RNA binding proteins* (Proteínas de união ao RNA)
RNA: *Ribonucleic acid* (ácido ribonucléico)
RNase: Ribonuclease
RNA_m: RNA mensageiro
rpm: Rotações por minuto
RT: *Reverse transcription* (Transcrição reversa)
SCU: Sangue de cordão umbilical e placentário
SDS: *Sodium dodecyl sulfate* (Dodecil sulfato de sódio)
SDS-PAGE: Eletroforese em gel de poliacrilamida / SDS
SFB: Soro fetal bovino
TA: Tecido adiposo
TBE: Tris-borato-EDTA
TBS: *Tris buffered saline* (Solução salina tamponada com tris)
Tween 20: Monolaurato de polioxietileno (20) sorbitana
U/ μ L: Unidades por microlitro
UTR: *Untranslated region* (Região não-traduzida)

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	xii
LISTA DE TABELAS	xiv
LISTA DE GRÁFICOS	xiv
RESUMO	xv
ABSTRACT	xvi
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Células-Tronco.....	1
1.2 Células-Tronco Embrionárias.....	3
1.3 Células-Tronco Adultas.....	5
1.4 As Células-Tronco Mesenquimais E Terapia Celular.....	7
1.5 Diferenciação Das Células-Tronco.....	9
1.6 Autorrenovação Das Células-Tronco.....	10
1.7 Proliferação Das Células-Tronco.....	11
1.8 Regulação Da Expressão Gênica.....	12
1.9 Regulação Em Nível Transcricional Da Manutenção Da Autorrenovação Em Células-Tronco	14
1.10 Regulação Em Nível Pós-Transcricional Da Manutenção Da Autorrenovação Em Células-Tronco.....	15
1.11 Proteínas De União Ao RNA E Mecanismos De Autorrenovação.....	18
1.12 Família PUF.....	18
1.13 Família DAZ.....	22
2. JUSTIFICATIVA	26
3. OBJETIVO	27
3.1 Objetivo Geral	27
3.2 Objetivos Específicos.....	27
4. MATERIAIS E MÉTODOS	28
4.1 Lista De Soluções.....	28
4.2 Aspectos Éticos.....	29
4.3 Locais De Coleta Do Material Para Isolamento Das Células-Tronco Mesenquimais.....	29
4.4 Isolamento, Caracterização E Cultura Das Células-Tronco Mesenquimais....	29
4.4.1 <i>Coleta, Isolamento E Cultura Das Células-Tronco De Medula Óssea</i>	29
4.4.2 <i>Coleta, Isolamento E Cultura Das Células-Tronco De Sangue Do Cordão Umbilical E Placentário</i>	30
4.4.3 <i>Coleta, Isolamento E Cultura Das Células-Tronco De Tecido</i>	31

<i>Adiposo</i>	32
4.5 Adipogênese <i>In Vitro</i>	32
4.6 Extração De RNA Total.....	32
4.7 Síntese De cDNA pela Transcriptase Reversa	32
4.8 Reação Em Cadeia Da Polimerase (RT-PCR).....	33
4.9 Purificação De Produto De PCR.....	34
4.10 Eletroforese De DNA.....	34
4.11 qRT/PCR.....	34
4.12 Coloração Das Vesículas Lipídicas Com Oil Red O.....	36
4.13 Marcação Intracelular– Análise Por Citometria De Fluxo.....	36
4.14 Imunofluorescência (IF)	37
4.15 Extrato Protéico De Células-Tronco.....	37
4.16 Eletroforese De Proteína (SDS-Page).....	38
4.17 <i>Western Blot</i>	38
4.18 Clonagem Pelo Sistema PGEM®-T Easy	39
4.19 Clonagem Pelo Sistema Gateway.....	41
4.19.1 Obtenção Dos Clones De Entrada.....	43
4.19.2 Obtenção Dos Clones Em Vetor De Expressão.....	44
4.20 Preparação De Células Cálcio-Competentes.....	44
4.21 Preparação De Células Eletro-Competentes.....	44
4.22 Transformação Das Bactérias.....	45
4.22.1 Choque-Térmico.....	45
4.22.2 Eletroporação.....	45
4.23 Seleção Dos Clones Recombinantes.....	46
4.23.1 PCR De Colônia.....	46
4.23.2 Técnica De Palitagem (<i>Tooth-Pick</i>).....	46
4.24 Mini-Preparação Dos Plasmídeos Com Insetos (Miniprep).....	47
4.25 Sequenciamento Dos Insetos Dos Plasmídeos.....	47
4.26 Expressão dos polipeptídeos recombinantes.....	47
4.27 Purificação dos polipeptídeos recombinantes.....	48
4.28 Purificação dos polipeptídeos recombinantes por eletroeluição.....	49
4.29 Obtenção de anti soro policlonal contra o polipeptídeo recombinante DZIP1.....	50
4.30 Purificação Do Anticorpo.....	51
5. RESULTADOS	52
5.1 Análise da Expressão dos transcritos das RBPs em CTMs.....	52
5.2 Análise da Expressão de DZIP1 nas CTMs.....	53

5.2.1	Produção de Soros Policlonais anti-DZIP1.....	53
5.2.1.1	Clonagem e Expressão do Peptídeo Recombinante DZIP1.....	53
5.2.1.2	Produção dos Soros anti-DZIP1.....	55
5.2.1.3	Detecção de DZIP1 nas CTMs.....	56
5.2.2	Detecção e imunofluorescência de DZIP1 em CTMs de TA.....	58
5.2.3	Quantificação das CTMs que Expressam DZIP1.....	59
5.2.4	Análise da Expressão de DZIP1 Durante a Adipogênese.....	61
5.2.4.1	Adipogênese <i>in vitro</i>	61
5.2.4.2	Expressão do transcrito de <i>dzip1</i> durante a adipogênese de CTMs de TA.....	63
5.2.4.3	Expressão da proteína DZIP1 durante a adipogênese	64
5.2.4.4	Imunolocalização de DZIP1 nas CTMs de TA durante a adipogênese.....	66
5.2.5	DZIP1 na Proliferação Celular.....	67
5.3	Análise de Expressão de PUM2.....	70
5.3.1	Produção de Soro anti-PUM2.....	70
5.3.1.1	Clonagem e Expressão do Peptídeo Recombinante PUM2.....	70
5.3.2	Detecção e imunofluorescência de PUM2 em CTMs de TA.....	71
5.3.3	Quantificação das CTMs que Expressam PUM2.....	72
5.3.4	Análise da Expressão de PUM2 Durante a Adipogênese.....	73
5.3.4.1	Expressão do transcrito de <i>pum2</i> durante a adipogênese de CTMs de TA.....	73
5.3.4.2	Expressão da proteína PUM2 durante a adipogênese.....	75
5.3.4.3	Imunolocalização de PUM2 nas CTMs de TA durante a adipogênese.....	76
5.3.5	PUM2 na Proliferação Celular.....	78
6.	DISCUSSÃO	79
7.	CONCLUSÕES	86
8.	REFERÊNCIAS	87
9.	ANEXOS	110
	ANEXO 1 – TABELAS DE INICIADORES.....	110
	ANEXO 2 – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.....	112
	ANEXO 3 – GRÁFICOS DE CITOMETRIA.....	116

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1	Titã grego Prometeu.....	1
Figura 1.2	Divisão celular das células-tronco.....	2
Figura 1.3	Isolamento de células-tronco embrionárias.....	3
Figura 1.4	Células-tronco de medula óssea.....	5
Figura 1.5	Esquema do mapa molecular das células-tronco.....	9
Figura 1.6	Esquema das principais vias de sinalização do controle da autorrenovação em células-tronco.....	11
Figura 1.7	Mecanismos de controle que atuam na síntese protéica.....	16
Figura 1.8	Biogênese de microRNAs.....	17
Figura 1.9	Estrutura do domínio PUF.....	19
Figura 1.10	Região consenso das sequências 3'UTR associadas com as proteínas PUF.....	19
Figura 1.11	Alinhamento das sequências dos domínios de união ao RNA de Pumilio de humano e camundongo.....	20
Figura 1.12	Diagrama esquemático da estrutura do gene de PUM1 e PUM2.....	21
Figura 1.13	Diagrama da sobreposição dos transcritos alvos de PUM1 e PUM2	21
Figura 1.14	Esquema da repressão da via MAPK por PUF.....	22
Figura 1.15	Esquema com alinhamento de nucleotídeos da sequência de cDNA de DZIPb, DZIPt2 e DZIPt1.....	24
Figura 1.16	Perfil de expressão de DZIP e DAZL durante a diferenciação de corpos embriões.....	25
Figura 4.1	Sítio de múltiplas clonagens do vetor pGEM®-T Easy.....	39
Figura 4.2	Mapa esquemático do vetor pGEM®-T easy.....	40
Figura 4.3	Mapa dos vetores pDONR TM 221 e pDEST TM 17.....	41
Figura 4.4	Desenho esquemático da recombinação entre os sítios attB e attP...	42
Figura 4.5	Fluxograma de trabalho para a obtenção de clone de expressão pelo sistema Gateway.....	43
Figura 5.1	Expressão dos transcritos de PUM1, PUM2, DZIP1, NOS1 e STAU nas CTM derivadas de MO, SCU e TA por RT-PCR.....	53
Figura 5.2	Expressão e Purificação da proteína recombinante de DZIP1.....	54
Figura 5.3	Determinação da concentração da proteína recombinante de DZIP.	55
Figura 5.4	Detecção do peptídeo recombinante de DZIP por <i>Western blot</i>	55
Figura 5.5	Detecção da proteína DZIP1 em CTMs com anticorpo anti-DZIP1 de camundongo.....	56
Figura 5.6	Detecção da proteína DZIP1 em CTMs com anticorpo anti-DZIP1 de coelho.....	57
Figura 5.7	Detecção de DZIP1 em extrato protéico de CTMs de TA com	58

	anticorpo comercial.....	
Figura 5.8	Imunofluorescência de DZIP1 em CTMs de TA.....	59
Figura 5.9	Modelo esquemático dos experimentos relacionados a diferenciação das CTMs derivadas de TA de quatro doadores.....	61
Figura 5.10	Microscopia ótica da coloração com Oil Red O das culturas de CTMs dos quatro pacientes.....	62
Figura 5.11	Detecção da proteína DZIP1 e β -actina em extrato protéico de CTMs durante a diferenciação celular.....	65
Figura 5.12	Imunofluorescência de DZIP1 em CTMs de TA durante a adipogênese.....	67
Figura 5.13	Desenho esquemático do ensaio para avaliar a expressão dos transcritos DZIP1 e PUM2 durante a proliferação celular.....	68
Figura 5.14	Expressão da proteína recombinante de PUM2.....	70
Figura 5.15	Detecção de PUM2 em extrato protéico de CTMs de TA com anticorpo comercial.....	71
Figura 5.16	Imunofluorescência de PUM2 em CTMs de TA.....	72
Figura 5.17	Detecção da proteína PUM2 e β -actina em extrato protéico de CTMs durante a diferenciação celular.....	75
Figura 5.18	Imunofluorescência de PUM2 em CTMs de TA durante a adipogênese.....	77
Figura 6.1	Uma das redes de interações das RBPs envolvidas na autorrenovação de CTEs	80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1	Relação dos benefícios da utilização das células-tronco adultas e embrionários em pacientes humanos.....	8
Tabela 1.2	Genes que codificam proteínas que potencialmente interagem com DAZ.....	23
Tabela 4.1	Mistura de reagentes para a síntese de cDNA.....	33
Tabela 4.2	Reação de ligação do produto de PCR ao vetor pGEM-T.....	39
Tabela 4.3	Protocolo de imunização dos camundongos.....	51
Tabela 5.1	Porcentagem de CTMs de TA que expressam DZIP1.....	60
Tabela 5.2	Porcentagem de CTMs de TA que expressam PUM2.....	73
Tabela 9.1	Iniciadores utilizados nas RT- PCR e qRT-PCR.....	110
Tabela 9.2	Iniciadores utilizados para a amplificação das regiões antigênicas e clonagem em Sistema <i>Gateway</i>	111

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 5.1	Quantificação das CTMs derivadas de TA que expressam a proteína DZIP1.....	60
Gráfico 5.2	Perfil de expressão dos transcritos de <i>dzip1</i> e <i>fabp4</i> durante a adipogênese das CTMs derivadas de TA.....	63
Gráfico 5.3	Representação gráfica da análise de intensidade da proteína DZIP1 durante a diferenciação.....	65
Gráfico 5.4	Número de células relativo a razão do dia 5/ dia0 da população que estava em 40% e 90% de confluência.....	69
Gráfico 5.5	Perfil de expressão do transcrito de <i>dzip1</i> nas culturas de células no dia 1 e dia 5.....	69
Gráfico 5.6	Quantificação das CTMs derivadas de TA que expressam a proteína PUM2.....	73
Gráfico 5.7	Perfil de expressão dos transcritos de <i>pum2</i> e <i>fabp4</i> durante a adipogênese das CTMs derivadas de TA.....	74
Gráfico 5.8	Perfil de expressão do transcrito de PUM2 nas culturas de células no dia 1 e dia 5.....	78
Gráfico 9.1	Todos os controles utilizados na marcação intracelular de DZIP1 e PUM2 nas CTMs de TA.....	116

RESUMO

As células-tronco (CTs) têm potencial de se diferenciar em vários tipos celulares servindo como um sistema de reparação de tecidos. Quando uma CT se divide mantém o mesmo potencial da célula que a originou em um mecanismo chamado de autorrenovação. O entendimento desse mecanismo ajudará a compreender a senescência e a perda do potencial de diferenciação das CTs. Em nível de regulação pós-transcricional, as proteínas DZIP1 e PUM2 estão envolvidas na autorrenovação de CT embrionárias e germinativas de diversos organismos, incluindo humanos. Contudo, o trabalho visou o estudo do envolvimento de PUM2 e DZIP1 nos mecanismos de autorrenovação e diferenciação em CTs mesenquimais humanas (CTMs). Por RT-PCR, foi observada a expressão dos transcritos de *dzip1* e *pum2* em CTMs derivadas de medula óssea (MO), sangue de cordão umbilical e placentário (SCU) e tecido adiposo (TA). A expressão dos transcritos também foram analisada durante a adipogênese das CTMs por qRT-PCR. Os resultados demonstram que o perfil de expressão dos dois transcritos sofre redução durante o processo, enquanto o transcrito de *fabp4* (marcador adipogênico) aumenta. Por citometria de fluxo foi verificada a porcentagem de CTMs de TA que expressam DZIP1 (mais de 90% da população) e PUM2 (cerca de 50% da população). A expressão das proteínas PUM2 e DZIP1 foi confirmada por *western blot* em extratos totais de CTMs. Durante a diferenciação celular, a expressão da proteína DZIP1 se manteve constante enquanto PUM2 sofreu redução após induzida da diferenciação. A discrepância entre os níveis de mRNA e da proteína DZIP1 sugere regulação pós-transcricional. As imunofluorescências de DZIP1 e PUM2 nas CTMs indicaram que essas proteínas são nucleares em células de culturas recém sub-cultivadas e a localização dessas são translocadas para o citoplasma ao longo do tempo da cultura. As células diferenciadas expressam as duas proteínas no citoplasma e/ou núcleo. Análise dos transcritos de *dzip1* e *pum2* também foi verificada em culturas com proliferação celular intensa e reduzida. *Dzip1* não apresentou mudanças significativas de expressão nas duas situações. No entanto, a expressão de *pum2* aumentou nas CTMs com proliferação intensa, sugerindo uma possível participação nesse processo. Ensaios futuros serão realizados para confirmar a participação de PUM2 na proliferação celular. Além disso, a interferência de *dzip1* e *pum2* por RNA será providenciada para análise funcional desses genes.

ABSTRACT

Stem Cells (SCs) have the potential of differentiating into several cellular types, serving as a repair system for the organism. The ability of stem cells to replicate themselves by dividing into the same non-specialized cell type over long periods is a mechanism known as self-renewal. The understanding of this mechanism will also help to understand the senescence and hence, the loss of SCs differentiation potential. PUMILIO2 and DZIP1 RNA binding proteins regulate the translation of specific mRNAs during self-renewal and differentiation of germ-line and embryonic stem cells of diverse organisms, including humans. In this work, we aimed to study the relevance of PUM2 and DZIP1 in self-renewal and differentiation of human mesenchymal stem cells (hMSCs). We have found that *dzip1* and *pum2* transcripts are expressed in hMSCs derived from bone marrow (BM), adipose tissue (AT) and umbilical cord blood (UC) by using RT-PCR analysis. We have found that more than 90% of the MSCs population express DZIP1 and about 50% express PUM2 by flow cytometry. The expression pattern of *pum2* and *dzip1* transcripts was followed during differentiation of adipose derived MSCs into adipocytes. Quantitative PCR analysis showed that mRNA levels of both genes drop during differentiation, showing an opposite pattern to the *fabp4* adipocyte marker. The presence of the PUM2 and DZIP1 proteins was confirmed by western blot of total protein extracts of AT derived hMSCs. During cell differentiation, the expression of the protein DZIP1 was constant while PUM2 decreased. The discrepancy between the levels of the *dzip1* mRNA and protein suggests a regulated transcriptional and post-transcriptional expression of these genes. DZIP1 and PUM2 in immunofluorescence assays in hMSCs indicated that they are nuclear in freshly plated cells and translocate to the cytoplasm over time. The differentiated cells present the two proteins in the cytoplasm and nucleus. The expression pattern of the *dzip1* and *pum2* transcripts was also followed in cultures of MSCs derived from AT undergoing intense and reduced cell proliferation. *Dzip1* showed no significant changes of expression in both situations. However, the expression of *pum2* is higher in hMSCs with intensive proliferation than with reduced proliferation suggesting a possible participation in this process. To pave the way to a better understanding of DZIP1 and PUM2 function in hMSCs, RNA interference experiments are in progress.

1. INTRODUÇÃO

Segundo a mitologia, o titã Prometeu foi quem criou os homens e também quem roubou o fogo dos deuses para presentear a sua criação. Todavia o fogo era exclusivo dos deuses e como castigo a Prometeu, Zeus ordenou que o acorrentassem por milhares de anos ao cume do monte Cáucaso, onde todos os dias um abutre iria dilacerar o seu fígado e o mesmo se regeneraria (Fig.1.1). Atualmente, a comunidade científica parece buscar o conceito lendário de regeneração a fim de torná-lo realidade, desenvolvendo terapias para restaurar a função de células e tecidos que foram danificadas ou sofrem com o envelhecimento (Stem Cells: Scientific Progress and Future Research Directions, 2001). A base do desenvolvimento dessas terapias são as células-tronco (CTs).

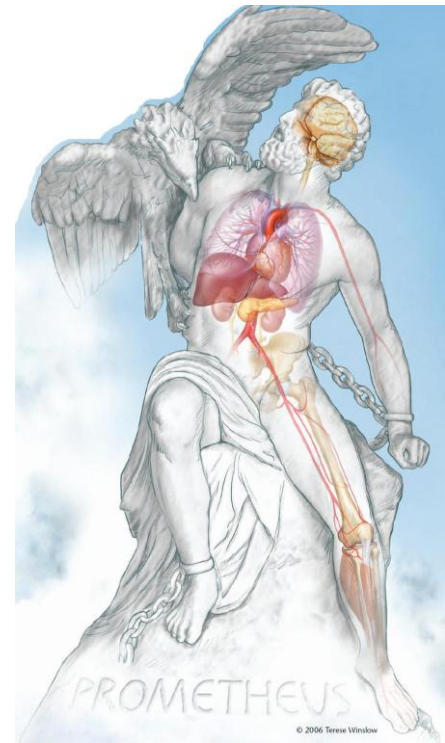


Figura 1.1 - Titã grego Prometeu e o abutre dilacerando seu fígado. (© 2001 Terese Winslow).

1.1 Células-tronco

As CTs são encontradas na maioria dos metazoários e estão presentes por toda a fase embrionária e adulta de um organismo. As CTs são definidas como células sem especialização (também conhecidas como indiferenciadas) que se renovam por longos períodos por meio da divisão celular (MARSHAK e cols., 2001). Uma propriedade funcional central de todos os tipos de CTs é sua capacidade de autorrenovação, na qual a mesma se divide para produzir duas células filhas com destinos iguais ou distintos (AMIT e cols, 2000). A divisão celular pode ser assimétrica e dessa forma uma célula permanece com o potencial de CTs e irá manter o *pool* de CTs e a outra célula torna-se um progenitor comissionado à diferenciação. No entanto, a divisão celular pode ser simétrica, onde as duas células filhas podem ter o mesmo destino seja ele a manutenção do potencial de CTs ou a diferenciação (KRAUSE e cols., 2001). O destino de cada célula é resultado de uma resposta a diversos fatores ambientais: estresse, fatores no microambiente, contato celular entre outros (Fig. 1.2) (CAI e cols., 2004).

As CTs podem ser caracterizadas de acordo com a plasticidade ou potencial de diferenciação (CHANDROSS & MEZEY, 2001) como:

Totipotência: habilidade de uma CT dar origem a todos os tipos de células do corpo e todos os tipos de células que formam os tecidos extra-embriônicos como a placenta, âmnio e córion. Exemplo de células totipotentes: células da mórula (NIH <http://stemcells.nih.gov/info/basics/basics1>).

Pluripotência: habilidade de uma CT dar origem a todos os tipos de células encontradas no corpo (mais de 200 tipos). As células pluripotentes não podem dar origem aos tecidos extra-embriônicos como a placenta, âmnio e córion. Exemplo de células pluripotentes: células da massa celular interna do blastocisto (NIH - <http://stemcells.nih.gov/info/basics/basics1>).

Multipotência: habilidade de uma CT se diferenciar em alguns tipos de célula do corpo. Geralmente, se restringe ao tipo celular de um mesmo folheto embrionário (endoderma, ectoderma e mesoderma). Exemplos de células multipotentes: CTs da medula óssea e CTs dos demais tecidos (NIH - <http://stemcells.nih.gov/info/basics/basics1>).

As CTs também podem ser classificadas de acordo com a sua fonte: CTs Embrionárias (CTEs) e CTs Adultas (CTAs).

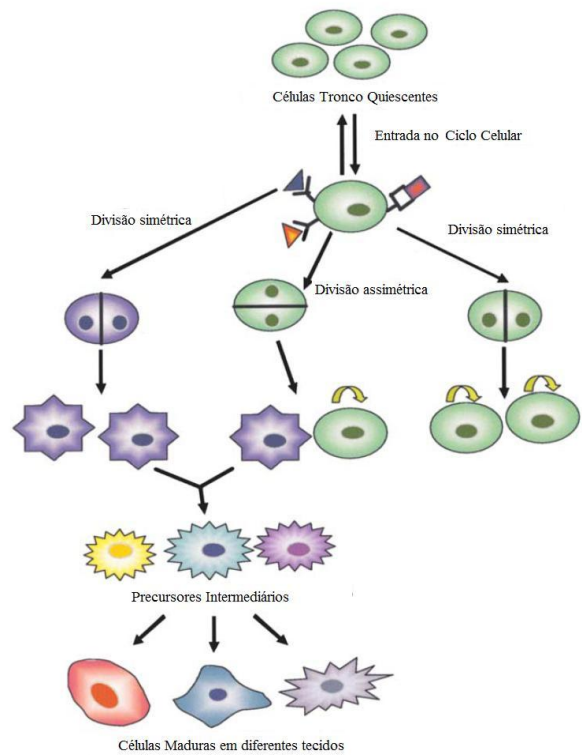


Figura 1.2 - Possíveis destinos das células-tronco durante a divisão celular. As células-tronco podem permanecer quiescentes ou entrar no ciclo celular por três maneiras: divisão assimétrica dando origem a duas células filhas (uma célula-tronco e uma precursora); ou por dois tipos de divisão simétrica em um deles gerando duas células filhas com propriedades de células-tronco ou duas células progenitoras. Adaptado de CAI e cols., 2004.

1.2 Células-tronco Embrionárias

As CTEs são pluripotentes e têm maior potencial de diferenciação que as CTAs, e isso pode ser justificado pelo fato dessas células na fase inicial do embrião terem a função de gerar milhares de células (autorrenovação) e essas se especializarem (diferenciação) para originar todos os tipos de tecidos de um organismo (THOMSON e cols., 1998).

O isolamento das CTEs para a pesquisa é realizado a partir de embriões derivados de óvulos fecundados *in vitro* nas clínicas de fertilização e doados com consentimento dos pais. O isolamento é feito de embriões com 4 a 5 dias de vida, denominados blastocistos. O blastocisto contém três estruturas: o trofoblasto, que é a camada de células que envolve o blastocisto; a blastocele, que é a

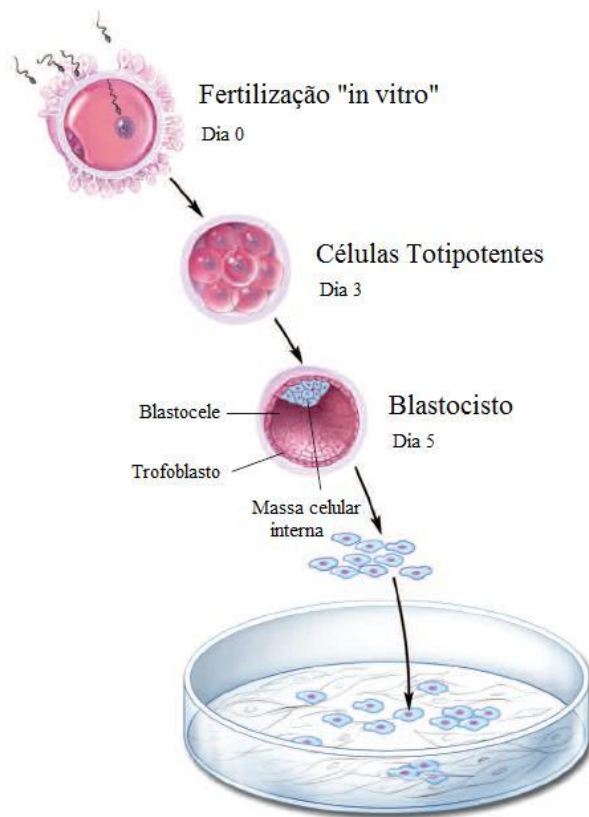


Figura 1.3 - Isolamento das CTEs. (© 2001 Terese Winslow).

massa celular interna, que é um grupo de aproximadamente 30 células localizada em uma extremidade da blastocele (EVANS & KAUFMAN, 1981). As CTEs são isoladas por transferência da massa celular interna do blastocisto para placas de cultivo celular contendo caldo nutritivo conhecido por meio de cultura (Fig. 1.3). As células se dividem e se espalham sobre a superfície da placa coberta com fibroblastos embrionários de camundongo ou humanos (*feeder layer*). Esses fibroblastos são irradiados e funcionam como uma camada nutritiva responsável pela manutenção da pluripotência das CTEs. Ao longo de vários dias, as células oriundas da massa celular interna proliferam e a superfície da placa fica inteiramente preenchida pelas células. Quando isso ocorre, as células são removidas cuidadosamente e distribuídas em novos frascos para continuar proliferando (THOMSON e cols., 1998). O número de vezes que as células são sub-cultivadas é definido por passagens, assim, se as células foram sub-cultivadas por duas vezes, diz-se que foram realizadas duas passagens.

Depois de seis meses ou mais, as 30 células originais da massa celular interna dão origem a milhões de CTEs (AMIT e cols., 2000).

O potencial das CTEs faz dessas células uma esperança principalmente para a medicina regenerativa, pois podem originar todos os tipos de células do corpo humano. A descoberta dessa característica das CTEs incentivou outras pesquisas na área de terapia celular como: recuperação de danos na medula espinhal ou músculo cardíaco, desenvolvimento de células produtoras de dopamina para tratar a doença de Parkinson ou células produtoras de insulina para diabéticos tipo I e muitas outras (PEDERSEN, 1999).

No entanto, as possíveis terapias baseadas nas CTEs apresentam alguns obstáculos sendo a principal delas a formação de teratomas. Devido a essas células proliferarem intensamente e possuírem um potencial de diferenciação latente, o controle delas se torna um desafio para os cientistas. O teratoma se caracteriza como um tumor misto constituído de elementos de diferentes tipos de tecido das três camadas embrionárias. Pesquisadores do mundo inteiro estão desenvolvendo técnicas para induzir a diferenciação *in vitro* das CTEs, na tentativa de direcionar estas para uma linhagem celular específica e impedir a formação de teratomas no organismo (ITSKOVITZ-ELDOR e cols., 2000).

Outra barreira para o desenvolvimento de terapias com as CTEs é a questão ética e religiosa. As pesquisas com CTEs recebem fortes críticas de diversos setores da sociedade, em especial dos religiosos. Por considerarem os embriões como uma vida em formação, religiosos conservadores afirmam que manipular ou sacrificar embriões de seres humanos é crime. Em países mais conservadores, as pesquisas estão paradas ou limitadas à utilização das CTAs. No Brasil, o Supremo Tribunal Federal liberou as pesquisas com CTEs no dia 29 de maio de 2008.

Além do grande potencial que as CTEs representam para a medicina, elas abrem a possibilidade de terapias celulares autólogas a partir da clonagem terapêutica (ODORICO e cols., 2001). Teoricamente, a técnica consiste na transferência do núcleo de uma célula somática para um óvulo anucleado, originando um embrião. Se o doador do núcleo for o próprio paciente não haveria a rejeição das CTEs derivadas desse embrião clone (ODORICO e cols., 2001). No entanto, a clonagem de seres humanos se encontra proibida no Brasil (lei de biossegurança 11.105/2005), seja ela terapêutica ou reprodutiva.

1.3 Células-tronco Adultas

As CTAs são células não diferenciadas, multipotentes e se encontram distribuídas nos diferentes tecidos do corpo. A principal função das CTAs no organismo é a manutenção e reparo do tecido em que se encontram.

A história da pesquisa com CTAs iniciou em 1960, quando pesquisadores descobriram que a medula óssea contém pelo menos dois tipos de CTAs (Fig. 1.4). A população chamada CTs hematopoéticas (CTHs) dá origem a todos os tipos de células sanguíneas do corpo, e as células estromais da medula óssea ou CTs mesenquimais (CTMs), que é uma população de células mistas que gera tecido ósseo, cartilaginoso, adiposo e conectivo fibroso (BIANCO e cols., 2001). De fato, as CTAs da medula óssea têm sido utilizadas em transplantes desde a década de 60 e esse procedimento médico da área da hematologia e oncologia envolve o transplante de CTHs provenientes da medula óssea (MO) ou sangue de cordão umbilical (SCU) de um doador para o paciente (transplante alogênico) ou o transplante autólogo de CTs da MO ou CTH periféricas obtidas da mobilização de CTs da MO com a utilização de fatores como fator estimulador de colônias granulocitárias (G-CSF). Esse transplante é indicado principalmente para o tratamento de doenças hematológicas, onco-hematológicas, imunodeficiências, algumas doenças genéticas hereditárias, alguns tumores sólidos e doenças auto-imune (THOMAS, 2005).

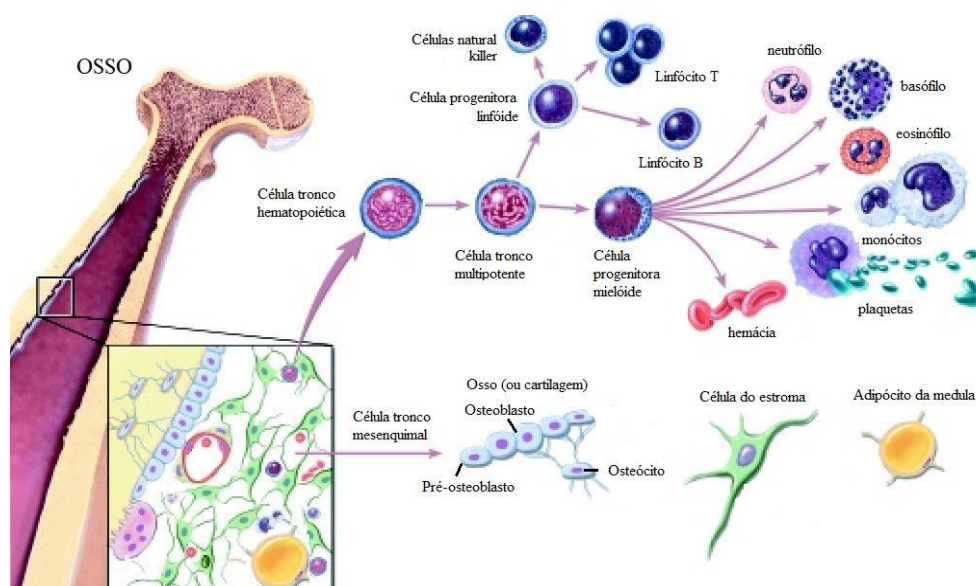


Figura 1.4 - Células-tronco derivadas de medula óssea: Células-tronco hematopoéticas e células-tronco mesenquimais. (© 2001 Terese Winslow).

As CTAs já foram isoladas de diversos tecidos como: cérebro (KILTY e cols, 1999), medula óssea (PLOEMACHER & BRONS 1988), sangue periférico (VILLARON e cols,

2004), sangue menstrual (PATEL e cols, 2008), cordão umbilical (ROMANOV e cols, 2003), sangue de cordão umbilical (LEE e cols, 2004), placenta (ZHANG e cols, 2006), polpa de dente (HUANG e cols, 2008), endométrio (GARGETT e cols, 2009), tecido adiposo (MA e cols, 2007), próstata (LAWSON e cols., 2007) e rim (GUPTA e cols, 2006), sugerindo que estas células estão amplamente distribuídas *in vivo*. As CTAs residem em áreas específicas de cada tecido onde elas podem permanecer quiescentes (sem divisão) por muitos anos até serem ativadas por elementos resultantes de doença ou lesão tecidual por exemplo. Meirelles e seus colaboradores (2006) afirmam que a distribuição das CTMs pós-natal em todo o organismo está relacionada com a existência de um nicho perivascular. A parede dos vasos sanguíneos abriga uma reserva de células progenitoras que pode ser parte integrante para elucidar a origem das CTMs e outras células-tronco adultas (CRISAN e cols., 2008).

As CTs *in vivo* podem se multiplicar por um longo período e podem dar origem a tipos de células maduras que tenham características, formas, estruturas especializadas e funções específicas. Seguem-se exemplos de alguns tipos celulares nos quais as CTAs podem se diferenciar:

- CTHs dão origem a todos os tipos de células sanguíneas: hemácias, linfócitos B, linfócitos T, células natural *killer*, neutrófilos, basófilos, eosinófilos, monócitos, macrófagos e plaquetas (PETERSEN e cols, 1999).
- CTMs dão origem a vários tipos de células: osteócitos, condrócitos, adipócitos e outras células do tecido conectivo (BIANCO e cols., 1999).
- CTs Neurais dão origem a três principais tipos de células: neurônios e duas categorias de células não neuronais - astrócitos e oligodendrócitos (CLARKE e cols., 2000).
- CTs da pele ocorrem na camada basal da epiderme e na base dos folículos pilosos. As células epidérmicas dão origem a queratinócitos, que migram para a superfície da pele e formam uma camada protetora (GHAZIZADEH & TAICHMAN, 2001).

As CTMs apresentam como propriedade física aderência ao plástico, morfologia alongada semelhante aos fibroblastos (KOTOBUKI e cols., 2004) e quanto à característica fenotípica, são destituídas de marcadores hematopoiéticos como CD45 e CD34 e geralmente expressam moléculas como CD29, CD44, CD105, CD90, CD73 (DOMINICI e cols, 2006). Recentemente foi identificado CD200, CD146 e SSEA-4 (GANG e cols., 2007). Funcionalmente, as CTMs devem ser capazes de se diferenciar em pelo menos três linhagens,

comumente diferenciadas em: adipócitos (PITTENGER e cols., 1999), condrócitos (YOO cols., 1998) e osteoblastos (JAISWAL cols., 1997).

1.4 As Células-tronco Mesenquimais e Terapia Celular

As CTs apresentam propriedades importantes de autorrenovação e plasticidade (PEKOVIC e HUTCHISON, 2008). Os mecanismos propostos pelos quais as CTs reparam os tecidos danificados são a diferenciação celular ou indiretamente por liberação de fatores que estimulam o tecido em geral (CAPLAN & DENNIS, 2006).

As CTMs secretam uma variedade de citocinas e fatores de crescimento que tem efeitos autócrinos e parácrinos. Esses fatores secretados suprimem o sistema imune local, inibem a fibrose e apoptose, potencializam a angiogênese e estimulam a mitose e diferenciação das CTs (CAPLAN & DENNIS, 2006). Baseado nesse plano, a utilização dessas células em terapias tem se mostrado promissora (tabela 1.1).

As CTMs estão sendo analisadas em ensaios clínicos de doença hepática, doença cardíaca, doença de Crohn e outros. Estes ensaios normalmente usam as células do próprio paciente, que se denomina de transplante autólogo, o que possibilita a redução de problemas como a rejeição (NIH - <http://stemcells.nih.gov/info/basics/basics1>). A doença enxerto contra hospedeiro é a maior complicação do transplante de medula óssea alogênico e uma barreira para ampliar a aplicação do alotransplante (SILVA e cols., 2005).

As CTMs derivadas da medula óssea têm sido utilizadas como estratégia para o reparo cardíaco após o dano do miocárdio, levando a uma melhora na regeneração cardíaca (TOMITA e cols., 1999; RAMAKRISHNAN e cols., 2003; BROFMAN, e cols., 2004). No entanto, essa melhora do paciente, em longo prazo, resume se a apenas qualidade de vida. O benefício da terapia poderia ser maximizado se as células transplantadas se integrassem completamente ao órgão. Somente uma pequena fração das CTMs transplantadas permanece viável no miocárdio, limitando seu benefício terapêutico (RANGAPPA e cols., 2003). Além disso, as CTMs indiferenciadas podem originar um tipo tecidual não desejado no local do transplante, o que poderia prejudicar a regeneração do tecido (WANG e cols., 2001). Contudo, estratégias foram desenvolvidas para reduzir esse problema e aumentar a integração das CTMs ao tecido a ser restaurado: realizar a pré-diferenciação das CTMs *in vitro* em linhagens celulares específicas do tecido alvo antes do transplante nos pacientes (NIH - <http://stemcells.nih.gov/info/basics/basics1>).

Adult Stem Cells	Embryonic Stem Cells
<p>Cancers:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Brain Cancer 2. Retinoblastoma 3. Ovarian Cancer 4. Skin Cancer: Merkel Cell Carcinoma 5. Testicular Cancer 6. Tumors Abdominal Organs Lymphoma 7. Non-Hodgkin's Lymphoma 8. Hodgkin's Lymphoma 9. Acute Lymphoblastic Leukemia 10. Acute Myelogenous Leukemia 11. Chronic Myelogenous Leukemia 12. Juvenile Myelomonocytic Leukemia 13. Chronic Myelomonocytic Leukemia 14. Cancer Of The Lymph Nodes: Angioimmunoblastic Lymphadenopathy 15. Multiple Myeloma 16. Myelodysplasia 17. Breast Cancer 18. Neuroblastoma 19. Renal Cell Carcinoma 20. Soft Tissue Sarcoma 21. Various Solid Tumors 22. Ewing's Sarcoma 23. Waldenstrom's Macroglobulinemia 24. Hemophagocytic Lymphohistiocytosis 25. Poems Syndrome 26. Myelofibrosis <p>Auto-Immune Diseases:</p> <ol style="list-style-type: none"> 27. Diabetes Type I (Juvenile) 28. Systemic Lupus 29. Sjogren's Syndrome 30. Myasthenia 31. Autoimmune Cytopenia 32. Scleromyxedema 33. Scleroderma 34. Crohn's Disease 35. Behcet's Disease 36. Rheumatoid Arthritis 37. Juvenile Arthritis 38. Multiple Sclerosis 39. Polychondritis 40. Systemic Vasculitis 41. Alopecia Universalis 42. Buerger's Disease 	<p>Cardiovascular:</p> <ol style="list-style-type: none"> 43. Acute Heart Damage 44. Chronic Coronary Artery Disease <p>Ocular:</p> <ol style="list-style-type: none"> 45. Corneal Regeneration <p>Immunodeficiencies:</p> <ol style="list-style-type: none"> 46. Severe Combined Immunodeficiency Syndrome 47. X-Linked Lymphoproliferative Syndrome 48. X-Linked Hyper Immunoglobulin M Syndrome <p>Neural Degenerative Diseases And Injuries:</p> <ol style="list-style-type: none"> 49. Parkinson's Disease 50. Spinal Cord Injury 51. Stroke Damage <p>Anemias And Other Blood Conditions:</p> <ol style="list-style-type: none"> 52. Sickle Cell Anemia 53. Sideroblastic Anemia 54. Aplastic Anemia 55. Red Cell Aplasia 56. Amegakaryocytic Thrombocytopenia 57. Thalassemia 58. Primary Amyloidosis 59. Diamond Blackfan Anemia 60. Fanconi's Anemia 61. Chronic Epstein-Barr Infection <p>Wounds And Injuries:</p> <ol style="list-style-type: none"> 62. Limb Gangrene 63. Surface Wound Healing 64. Jawbone Replacement 65. Skull Bone Repair <p>Other Metabolic Disorders:</p> <ol style="list-style-type: none"> 66. Hurler's Syndrome 67. Osteogenesis Imperfecta 68. Krabbe Leukodystrophy 69. Osteopetrosis 70. Cerebral X-Linked Adrenoleukodystrophy <p>Liver Disease</p> <ol style="list-style-type: none"> 71. Chronic Liver Failure 72. Liver Cirrhosis <p>Bladder Disease</p> <ol style="list-style-type: none"> 73. End-Stage Bladder Disease

Tabela 1.1 – Aplicações de CTAs no tratamento de algumas doenças em humanos. FONTE: <http://www.stemcellresearch.org/facts/asc-refs.pdf>.

1.5 Diferenciação das Células-tronco

Os processos que regulam a diferenciação são complexos, no entanto sabe-se que o microambiente ou nicho onde a célula se encontra tem um papel crítico no seu direcionamento (RANGAPPA e cols., 2003). A diferenciação das CTs em uma determinada linhagem pode ser alcançada por meio da utilização de um microambiente *in vitro* mimetizando o processo *in vivo* (HENG e cols., 2004). Para isso, os pesquisadores utilizam artifícios para a mimetização como citocinas recombinantes, fatores de crescimento, moléculas da matriz extracelular, meios de cultura, fatores sintéticos, entre outros (WONG e TUAN, 1993; HENG e cols., 2004). Outros métodos de diferenciação celular que podem ser utilizados são o meio condicionado de cultura de células somáticas diferenciadas, a co-cultura direta ou indireta, e outros. O meio condicionado poderia conter vários fatores solúveis que são capazes de direcionar a diferenciação das CTs *in vitro* (HENG e cols., 2004).

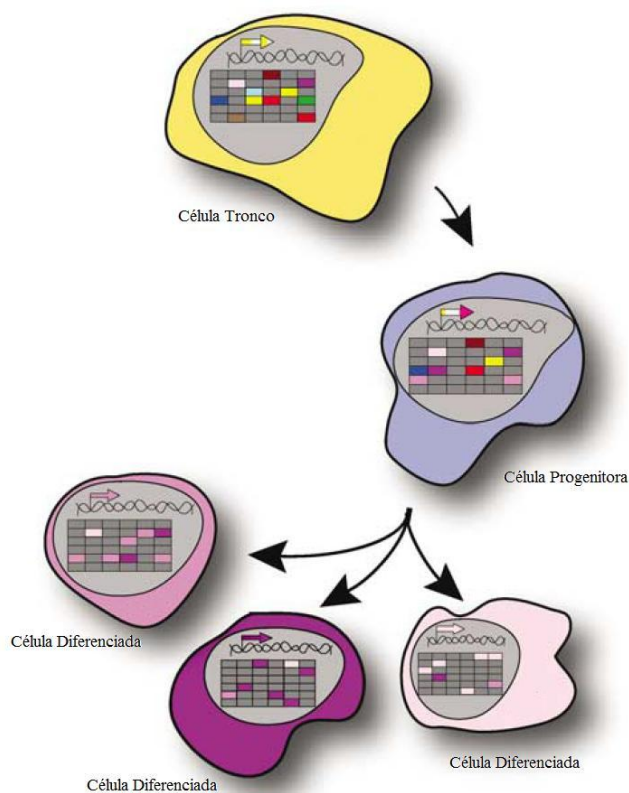


Figura 1.5 – Esquema do mapa molecular: As células-tronco alteram o padrão de expressão gênica ao longo do processo de diferenciação celular, enquanto alguns genes são reprimidos outros são ativados. Adaptado de MIKKERS & FRISÉN, 2005.

No entanto, a co-cultura direta permite o contato físico entre diferentes tipos celulares podendo levar à transdução de sinais moleculares que induzem a diferenciação de maneira mais eficiente. Além disso, a co-cultura fornece um ambiente fisiológico para a diferenciação das CTs *in vitro* mais semelhante às condições *in vivo*, como nos tecidos e órgãos (HENG cols., 2004).

Uma vez que o processo de diferenciação é iniciado pela ativação de vias específicas pelos fatores descritos acima, a especificação da linhagem é implementada por meio de redes de expressão gênica que dão a cada tipo celular um perfil transcricional único (MIKKERS & FRISÉN, 2005) (Fig. 1.5). Mais especificamente, genes associados com autorrenovação são silenciados, enquanto genes específicos a linhagem celular sofrem ativação transcricional

durante o processo (WU & SUN, 2006). Mudanças epigenéticas consistem em um dos mecanismos pelos quais os organismos geram diferentes tipos de tecidos (BAYLIN & SCHUEBEL, 2007). E, além dessas mudanças, outros mecanismos são responsáveis pela diferenciação como a regulação em nível transcricional e pós-transcricional de fatores-chaves (AVERY e cols., 2006).

A manutenção das CTMs é amplamente determinada pela expressão de determinados grupos de fatores de transcrição que atuam como reguladores. Por exemplo, a expressão de fatores de transcrição como Runx2 e osterix (OSX) são determinantes para a osteoblastogênese das CTMs (DUCY e cols., 1997, NAKASHIMA e cols., 2002). Em contraste, os receptores ativados por proliferadores de peroxissoma (*peroxisome proliferator activated receptor-g* - PPAR γ) é o principal elemento que impulsiona a diferenciação adipogênica das CTMs (ROSEN e cols., 2000).

1.6 Autorrenovação das Células-tronco

Diferentes vias de sinalização estão envolvidas na autorrenovação das CTs, embora os mecanismos pelos quais estes são controlados são relativamente desconhecidos. As principais vias envolvidas na autorrenovação estão esquematizadas na figura 1.6. A via do TGF/Activin/Nodal ativa SMAD-2/3 (proteínas que modulam a atividade de fatores de crescimento) que se associa com co-SMAD-4 para se translocarem para o núcleo e agirem como fatores transcricionais de elementos envolvidos na autorrenovação. Inversamente a isso, a via proteína morfogênica óssea (*Bone morphogenic protein* - BMP) ativa SMAD1/5/8 resultando na ativação da diferenciação (SHI & MASSAGUE, 2003). Já o papel da via de sinalização WNT (*Wingless-type*) tem se mostrado dividida entre a promoção da autorrenovação ou diferenciação e se o efeito é mediado pela β -catenina/TCF/LEF ou por outros elementos jusante a inibição de glicogênio sintetase kinase 3 β (*glycogen synthase kinase 3 β* - GSK-3 β) (SATO e cols., 2004). A via de sinalização do fator de crescimento de fibroblasto β (*fibroblast growth factor- β* - β FGF) auxilia a via TGF/activina/Nodal na autorrenovação, enquanto inibe a atividade de BMP (XU e cols., 2005). A fosfoinositida-3 (*phosphoinositide-3-kinase* - PI3K) é responsável pela sobrevivência das CTs jusante a sinalização dos neurotrofinos via receptores TRK (KIM e cols., 2005). A autorrenovação também pode ser ativada pelos sinais de esfingosina-1-fosfato (*Sphingosine-1-phosphate* - S1P), por meio dos receptores EDG acoplados as proteínas G, e intracelularmente por mecanismos indefinidos (PYNE & PYNE, 2000). As proteínas de membrana denominadas fatores de crescimento derivados de plaquetas (*Platelet derived-growth factor* - PDGF)

promovem a sinalização por S1P intracelular através da ativação da esfingosina quinase, que converte esfingosina em S1P (PEBAY e cols., 2005). A combinação de PDGF e S1P garante a autorrenovação nas CTs (AVERY e cols, 2006). A comunicação entre as vias de sinalização é altamente provável, exemplos podem ser conferidos na figura 1.6 (linhas azuis pontilhadas). é altamente provável, exemplos podem ser conferidos na figura 1.6 (linhas azuis pontilhadas).

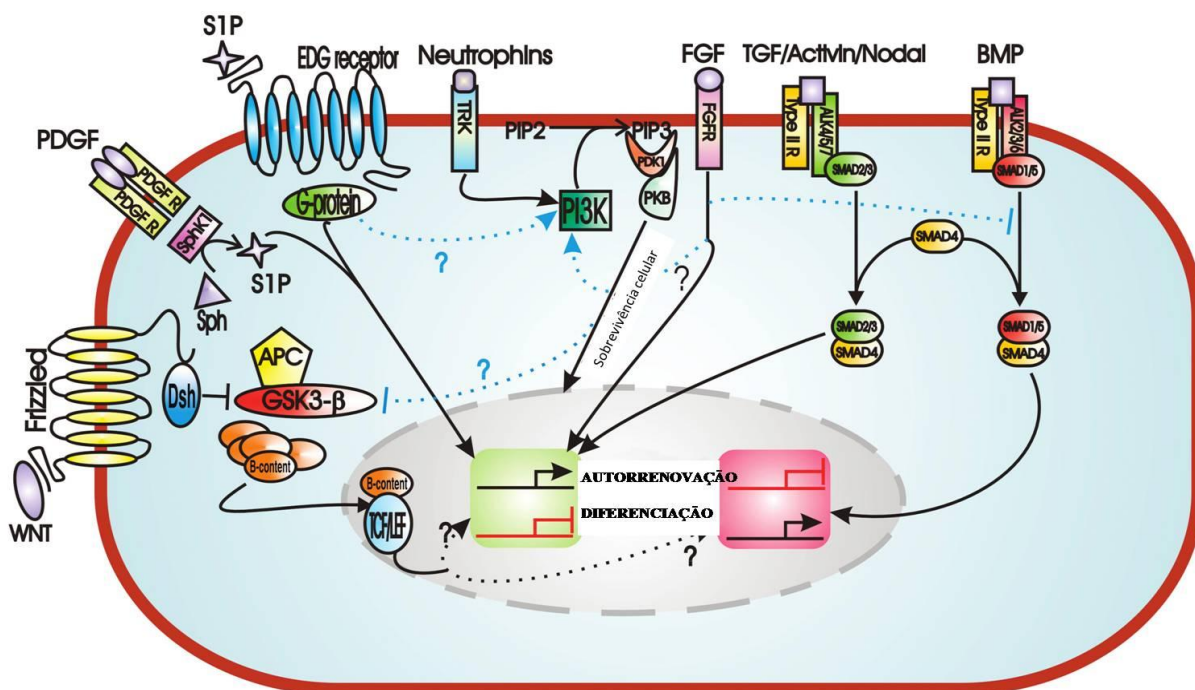


Figura 1.6 - Esquema das principais vias de sinalização do controle da autorrenovação em células-tronco.

FONTE: AVERY e cols., 2006.

1.7 Proliferação das Células-tronco

Uma barreira para a aplicação das CTAs em terapias é o número reduzido dessas células em cada tecido. As CTMs na medula óssea, por exemplo, apresentam frequência de aproximadamente 0,05% da fração celular (STRAUER & KORNOWSKI, 2003), enquanto que as CTMs no tecido adiposo representam cerca de 0,5% do tecido (De UGARTE e cols, 2003). Para gerar terapias eficientes, há a necessidade de expansão dessas células *in vitro* (GUILLOT e cols, 2007). No entanto, estudos recentes indicam que a expansão *in vitro* dessas células é limitada. Segundo DERUBEIS & CANCEDDA (2004), após a terceira passagem, as CTMs derivadas de medula óssea de camundongo senescem e perdem o seu potencial de diferenciação, num processo chamado de “envelhecimento *in vitro*”. O potencial de diferenciação das CTMs derivadas de medula óssea de camundongos em cardiomiócitos se restringe à quarta passagem (ZHANG e cols, 2005). As CTMs derivadas de tecido adiposo humano não apresentam diferenças em relação ao seu potencial de diferenciação até a décima

passagem, o que confere à população 34 duplicações. No entanto, a taxa de crescimento dessas células foi estável apenas até a quinta passagem e depois decresceu (WALL e cols., 2007). Por isso, surge a necessidade de pesquisa básica para entender os mecanismos envolvidos no processo de manutenção da autorrenovação para melhorar a aplicabilidade das CTMs em terapias.

Todas as CTs têm o potencial de diferenciar ou proliferar mitoticamente. Esses potenciais devem ser controlados para a população de CTs ser mantida. Se a diferenciação exceder a proliferação, a população de CTs pode se extinguir. A manutenção do estado primitivo e a diferenciação das CTs são processos controlados, envolvendo diferentes níveis de regulação da expressão gênica. Esta regulação é resultado da atividade de vários fatores, citocinas e moléculas da matriz extracelular (BAKSH e cols, 2004) como descrito anteriormente. Essas moléculas atuam em vias de regulação que levam a ativação ou repressão de genes envolvidos na diferenciação ou manutenção da autorrenovação. Além disso, as vias de sinalização que induzem a diferenciação das CTs em uma célula especializada precisam ser identificadas para procurar novas estratégias e melhorar a utilização dessas em terapias celulares (RANGAPPA cols., 2003).

As CTs em geral necessitam regular seu ciclo celular de maneira rápida e eficiente, pois sofrem divisões sucessivas e precisam controlar a autorrenovação, processos relativos ao período de quiescência ou senescência. As CTs devem manter a integridade do genoma evitando o acúmulo de mutações genômicas e neoplasias. Esse processo é controlado por cascatas regulatórias que durante a divisão celular determinam se a divisão será simétrica ou assimétrica. Essas células devem optar pela autorrenovação ou diferenciação e essa escolha se dá em resposta aos elementos extrínsecos do ambiente. Assim, o controle do ciclo celular, diferenciação, mecanismos de reparo do DNA, vias de sinalização da senescência ou apoptose são altamente regulados nas CTs, possivelmente por mecanismos similares (WHITE & DALTON, 2005).

1.8 Regulação da Expressão Gênica

A transcrição dos genes é realizada pelas enzimas RNA polimerase I (transcreve genes de RNAs ribossômicos), RNA polimerase II (transcreve genes que serão traduzidos em proteínas) e RNA polimerase III (transcreve pequenos RNAs, como o tRNA) (ALBERTS e cols., 2007).

Em geral, a regulação da expressão gênica em eucariotos é atribuída ao controle da transcrição pela RNA polimerase II. Entretanto, alguns trabalhos demonstram que em eucariotos superiores existe um controle pós-transcricional elaborado, onde cada etapa do metabolismo do mRNA está sujeita a uma regulação mRNA-específica (MOORE, 2005).

Após a formação de um transcrito primário, é necessário que este seja processado para originar um RNA mensageiro maduro. O mRNA possui características intrínsecas como uma região não traduzida na porção 3' e 5' (3'UTR e 5'UTR). Essas regiões são alvos para as proteínas reguladoras envolvidas em modulação pós-transcricional (MORRIS e cols., 1993). No processamento desse mRNA, uma guanosina metilada é adicionada a região 5' (conhecida como *cap*) e uma cauda poli-A na região 3'UTR. O *cap* e a cauda poli-A são importantes para a exportação do mRNA para o citoplasma, tradução e prevenção da degradação por exonucleases, garantindo a estabilidade do mRNA na célula. A incorporação destas duas estruturas reflete um dos primeiros níveis da regulação pós-transcricional.

Em eucariotos, a exportação de mRNA e proteínas do núcleo para o citoplasma é um processo regulado que permite o controle da expressão de proteínas durante o desenvolvimento e a diferenciação celular. As proteínas que são transportadas do núcleo para o citoplasma, e vice-versa, possuem sinais de localização nuclear e/ou sinais de exportação nuclear, e algumas delas podem carregar sub populações de mRNAs como parte de um complexo ribonucleoproteico (mRNP – mRNA-protein complex) (ALBERTS e cols, 2007).

No citoplasma, os mRNA maduros são reconhecidos pelo *cap* por um complexo eIF4F (eIF4E, eIF4A, eIF4B e eIF4G) responsável pelo início da síntese protéica em eucariotos. O eIF4F juntamente com o complexo 48S percorrem a região 5'-UTR até encontrarem o primeiro códon AUG, recrutando a subunidade ribossomal 60S e formando o complexo 80S, dando início ao processo de alongação da tradução. A interação do fator eIF4G e as proteínas de união à cauda poli-A (PABP – *poly(A) binding protein*) promove a circularização do mRNA pela aproximação das regiões 3'-UTR e 5'-UTR (MAZUMDER e cols, 2003), essa etapa é importante para a certificação da integridade do mRNA que será traduzido. Dessa forma, alguns repressores da síntese protéica se ligam a região 3'-UTR dos mRNAs e impedem a circularização do mesmo e conseqüentemente a síntese da proteína.

A estabilidade do mRNA maduro é conferida em parte pelas informações contidas na região 3' UTR e pela ação de moléculas que estimulam ou reprimem a tradução. Outro ponto de controle da expressão gênica envolve o acoplamento do mRNA com a maquinaria de tradução representada pelos ribossomos.

1.9 Regulação em Nível Transcricional da manutenção da autorrenovação em CTs

Um dos mecanismos envolvidos no controle da autorrenovação e diferenciação celular é a regulação em nível transcricional de certos genes. Fatores de transcrição que ativam a função de manutenção da autorrenovação das CTEs têm sido identificados e análises de suas expressões têm sido usadas para a caracterização das mesmas. Um desses fatores, Oct-3/4, regulador transcricional da família POU, é expresso em populações de células pluripotentes *in vivo* e *in vitro* (OKAMOTO e cols., 1990, ROSNER e cols., 1990 e YEOM e cols., 1996). Esse fator é necessário para a retenção da pluripotência em CTEs de camundongo (NICHOLS e cols 1998). Evidências demonstram que a baixa expressão desse fator induz a diferenciação celular (NICHOLS e cols., 1998, LEBWOWSKI e cols., 2001). Quando é realizado *knockdown* de Oct-3/4 em CTEs humanas por interferência de RNA, essas células se diferenciam em trofoblastos (HAY e cols, 2004). Diversos genes alvos de Oct-3/4 foram identificados como, por exemplo, Utf1 (NISHIMOTO e cols, 1999), Rex-1 (BEN-SHUSHAN e cols 1998), PDGF α R (KRAFT e cols, 1996), Otx-2 (NIWA e cols, 2000) e Nanog (MITSUI e cols, 2003, CHAMBERS e cols, 2003), mas suas funções na pluripotência e autorrenovação nas CTEs são pouco conhecidas.

Sox-2 ativa a transcrição de genes alvos como: FGF-4, em cooperação com Oct-3/4 (YUAN e cols, 1995). Quando foram investigados os possíveis alvos de Oct-3/4, o elemento FGF-4 foi encontrado como especificamente ativo nas CTs pluripotentes. Elementos vinculados com ambos os membros da família Sox e POU foram encontrados como potenciais, e posteriormente foi identificado Sox2 (YUAN e cols, 1995). A expressão de Sox2 é controlada por Oct-3/4 e Sox2, sugerindo um mecanismo de *feedback* positivo, que poderia estar relacionado com a manutenção da autorrenovação em CTEs (TOMIOKA e cols., 2002). Assim como Oct-3/4, a expressão de Sox2 notavelmente reduz com a diferenciação das CTEs (WEI e cols., 2005).

Nanog é um membro relativamente novo no grupo dos fatores transcricionais cujas funções são consideradas essenciais no processo de autorrenovação das CTEs. Nanog é um fator transcricional da família NK-2 e é provável que Nanog exerça regulação transcricional ao se ligar aos domínios homeobox jusante aos genes alvos (MITSUI e cols, 2003). Análogo à Oct-3/4 e Sox2, Nanog é expresso em altos níveis em CTEs e em baixos nas células diferenciadas (BHATTACHARYA e cols, 2004). Quando a expressão de Nanog é reduzida por siRNA em CTEs, verificou-se que a expressão de Oct-3/4 sofre uma redução significativa, além da célula perder os antígenos da superfície característicos e se diferenciar

em linhagens do endoderma e extra-embrionárias (HYSLOP e cols, 2005). Inversamente, a super expressão de Nanog em CTEs humanas pode manter as células no estado indiferenciado durante diversas passagens num sistema sem a camada *feeder* (alimentadora), e sem a necessidade de meios condicionados (DARR e cols, 2006). A transcrição de Nanog é regulada por meio da ligação de Oct-3/4 e Sox2 ao promotor de Nanog, como foi confirmado com ensaios de ligação *in vitro* e mutagênese (RODDA e cols., 2005). Contudo, em adição a estes achados, tem sido sugerido que o complexo Oct3/4 contém um fator indefinido, denominado de proteína de ligação ao elemento Sox específico de células pluripotentes (PSPB), que preferencialmente se liga aos elementos Oct/ Sox, indicando que a transcrição de Nanog pode ser regulada por interação de Oct-3/4 e Sox2, ou Oct-3/4 e PSPB (KURODA e cols 2005). Isso sugere que há uma competição entre Sox2 e PSPB na ligação ao promotor de Nanog e se questiona a necessidade de Sox2 na transcrição de Nanog. Em contraste, o *knockdown* de Sox2 por RNAi determinou uma relação significativa com os níveis transcricionais de Nanog e, portanto, Sox2 está diretamente implicado na regulação de Nanog (RODDA e cols, 2005).

Esses fatores se apresentam tão essenciais para a manutenção da pluripotência que tornou possível a reprogramação de células diferenciadas. Essa reprogramação é realizada com a introdução dos genes de quatro fatores Oct-3/4, Sox2, Klf-4 e c-Myc em fibroblastos (OKITA e cols, 2006). Quando esses fatores são expressos conjuntamente em células maduras, ocorre um processo de reprogramação celular e essas passam a desenvolver características de CTEs como: expressão de marcadores de CTs e formação de tumores contendo células das três camadas germinativas. As células reprogramadas são denominadas de CTs pluripotentes induzidas (*Induced pluripotent stem cells* ou iPS). As iPS trouxeram novas possibilidades para futuras terapias, principalmente por que descarta o uso de embriões. Atualmente, diversos grupos estudam as iPS e modificam o protocolo buscando os fatores e vetores ideais. Além disso, a utilização dessas células em terapias depende de um ponto extremamente crítico: o controle dessas células em relação à formação de teratomas.

1.10 Regulação em Nível Pós-Transcricional da autorrenovação em CTs

Nos últimos anos, vários estudos têm focado a caracterização da dinâmica de proteínas associadas à caracterização do genoma e transcriptoma ao longo do desenvolvimento de organismos. Avaliações da expressão gênica em nível de transcriptoma fornecem informações importantes sobre carga genética transcrita de um organismo em um

determinado estado, entretanto, ela não reflete diretamente a expressão das proteína deste ser vivo (CHEN & HARMON, 2006). A comparação do transcriptoma com o proteoma pode fornecer dados como possíveis mecanismos de regulação pós-transcricional. Vários mecanismos estão envolvidos no controle da síntese protéica, mecanismos estes que atuam desde a transcrição do gene até a obtenção da proteína na forma ativa (Fig.1.7).

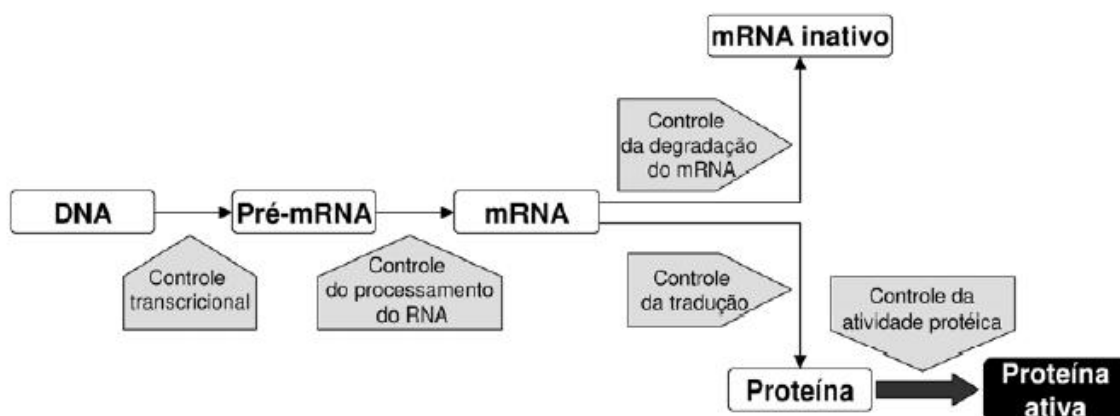


Figura 1.7 - Mecanismos de controle que atuam na síntese protéica. Estes mecanismos fazem com que um único gene dê origem a múltiplas proteínas com conformações e funções distintas. Adaptado de UNWIN & WHETTON, 2006.

Considerando que o mRNA é um intermediário nas mudanças fenotípicas numa célula, agindo como mensageiro para a síntese de proteína (UNWIN & WHETTON, 2006), os mecanismos que regulam a tradução do mRNA em proteína são altamente regulados. E alguns fatores devem ser levados em consideração quando se trata de mudanças na expressão de proteínas, como: processamento, localização e estabilidade do mRNA, proteínas reguladoras da tradução, razão de tradução, estabilidade da proteína, modificações pós-traducionais e localização celular da proteína (AUWETER e cols., 2006).

Dessa forma, a regulação em nível pós-transcricional também participa da manutenção do estado primitivo nas CTs. Em eucariotos superiores a regulação pós-transcricional dos mRNAs é mediada pela interação entre fatores em *trans*, como proteínas ou RNAs não codificantes, e em *cis*, podendo ser seqüências ou elementos estruturais nas regiões UTR (AUWETER e cols., 2006).

Os microRNAs (miRNA) são reguladores pós-transcricionais essenciais que determinam a identidade e destino celular. Com mais de 500 genes de miRNAs identificados experimentalmente no genoma humano, esses pequenos RNAs não codificantes tem um papel

central em diversos processos celulares (PAPAGIANNAKOPOULOS & KOSIK, 2008). Os miRNAs servem como um gatilho endógeno para a via de interferência de RNA (Fig. 1.8).

Esses pequenos RNAs passam por processamentos gerados por etapas de clivagens catalisadas por dois complexos distintos: Drosha, encontrado no núcleo, e Dicer encontrado no citoplasma (FILIPOWICZ e cols., 2008). Após a clivagem por Dicer, a forma madura do miRNA (~22 nucleotídeos) é incorporada a um complexo de silenciamento induzido por RNA (*RNA-induced silencing complex* – RISC) onde a 3'UTR do RNAm alvo estará associada ao maior complexo do RISC, Argonauta (FILIPOWICZ e cols., 2008). Os miRNAs podem interferir no transcrito por dois mecanismos diferentes: degradação do mRNA ou repressão da tradução (Fig. 1.8).

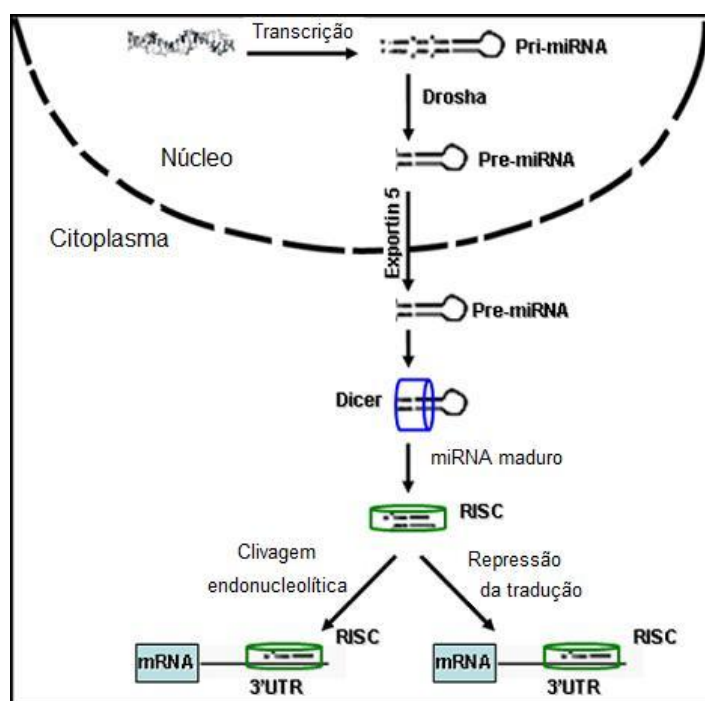


Figura 1.8 - Biogênese de microRNAs: o miRNA primário (pri-miRNA) é transcrito do genoma e forma uma estrutura em formato de grampo (*hairpin loop*) que são processados por Drosha para formar os pré-miRNAs. Os pré-miRNAs são exportados para o citoplasma pela exportina 5 e Dicer cliva o grampo para dar origem ao miRNA maduro de ~22 nucleotídeos. O miRNA maduro é incorporado por RISC para o silenciamento de RNAm alvos pela 3'UTR. Adaptado de PAPAGIANNAKOPOULOS & KOSIK, 2008.

Outros elementos que regulam pós-transcricionalmente são as proteínas com domínios de união ao RNA (RBPs – *RNA binding protein*) que se ligam aos transcritos estabilizando, reprimindo a tradução ou direcionando-os para uma via de degradação.

As RBPs são proteínas reguladoras que interagem com os mRNAs formando estruturas macromoleculares denominadas ribonucleopartículas de mensageiro (mRNPs) (KEENE, 2001; MOORE, 2005). As RBPs reconhecem e se ligam a transcritos funcionalmente relacionados para regular de forma coordenada seu processamento, localização celular e tradução (MOORE, 2005). A base destas redes de regulação mencionadas anteriormente são as mRNPs, sendo portanto sua caracterização fundamental para a compreensão dos mecanismos reguladores da expressão gênica.

1.11 Proteínas de união ao RNA e mecanismos de autorrenovação

Diversas famílias de RBPs têm sido identificadas no processo de autorrenovação das CTs. Estudos recentes têm demonstrado que a família de RBPs Musashi é repressora traducional e algumas dessas proteínas são expressas em células proliferativas do sistema nervoso central (KANEKO e cols., 2000), intestino (POTTEN e cols., 2003) e estômago (AKASAKA e cols., 2005). A proteína Musashi é expressa em CTs germinativas (CTGs) de *Drosophila melanogaster* e participa da manutenção da autorrenovação nessas células. A perda de Musashi nas CTGs do testículo de *D. melanogaster* resulta na diferenciação prematura das CTGs, indicando que Musashi tem papel intrínseco na manutenção das CTs (SIDDALL e cols., 2006).

As famílias conservadas de RBPs identificadas como PUF (*Pumilio / FBF family*) e DAZ (*Deleted in Azoospermia*) também têm se mostrado essenciais na manutenção e autorrenovação das CTs germinativas em eucariontes (XU e cols, 2001; SALVETTI e cols 2005; WICKENS e cols, 2002).

1.12 Família PUF

A característica estrutural típica das proteínas da família PUF é a presença do domínio de união ao RNA (conhecido como domínio homólogo a *Pumilio* ou PUM-HD), que inclui oito repetições imperfeitas de 36 aminoácidos (Fig. 1.9) (MACDONALD, 1992; WHARTON e cols, 1998; ZAMORE e cols., 1997; ZHANG e cols., 1997).

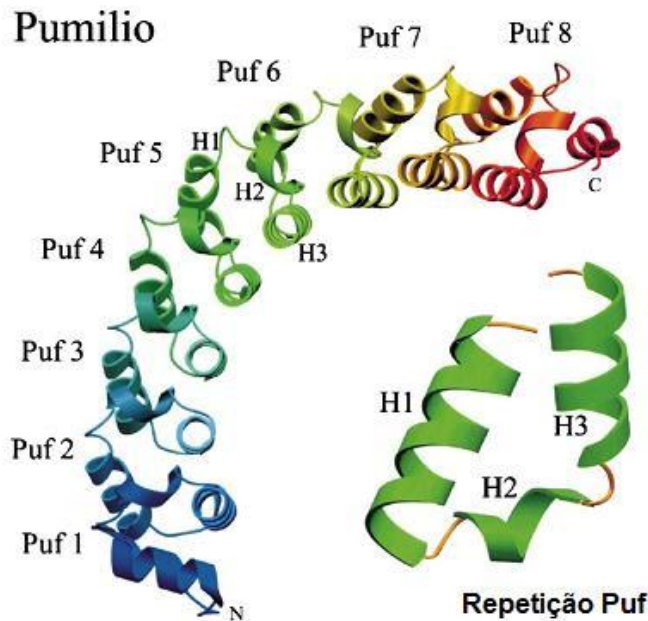


Figura 1.9 - Estrutura PUM-HD. O domínio PUF contém oito repetições seguidas (apresentadas em diferentes cores) que juntas formam um único domínio. Cada repetição é composta de três α hélices (H1, H2 e H3). Fonte: EDWARDS e cols., 2001.

As proteínas Pumilio contêm domínios capazes de reconhecer sequências nucleotídicas específicas na região 3'UTR de mRNAs alvos e agem na repressão da tradução durante o desenvolvimento e diferenciação das células. Interessantemente, a região consenso das sequências 3'UTR dos transcritos associados com as proteínas PUM1 e PUM2 humanas, Pum de *D. melanogaster* e Puf3, Puf4 e Puf5 de levedura, se apresenta bastante conservada (Figura 1.10).

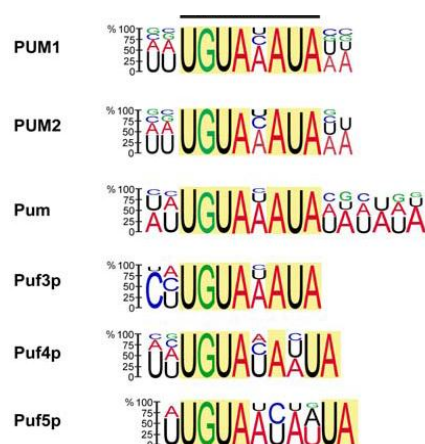


Figura 1.10 - Região consenso das sequências 3'UTR associadas com as proteínas hPUM1, hPUM2, Pum de *Drosophila* e Puf3, Puf4 e Puf5 de levedura. O tamanho das letras indica a probabilidade do aparecimento do nucleotídeo na posição do motivo. Nucleotídeos com menos do que 10% de frequência foram omitidos. FONTE: GALGANO e cols., 2008.

As proteínas Pumilio agem assimetricamente produzindo gradiente de proteína da região antero-posterior de organismos durante o desenvolvimento embrionário ou conduzem a divisão celular assimétrica por permitir a expressão diferencial da proteína nas células filhas (NAKAHATA e cols, 2001; OLIVAS & PARKER, 2000; SOUZA e cols, 1999; TADAUCHI e cols, 2001; ZHANG e cols., 1997). Em humanos, a família PUF é formada por dois membros: Pumilio1 (PUM1) e Pumilio2 (PUM2). Elas contêm 51 e 58% de similaridade com PUM de *D. melanogaster* (DANISLAV e cols., 2002). No entanto, a parte C-terminal dessas proteínas apresentam 78-79% de identidade com o correspondente PUM de mosca e apresentam alto grau de conservação evolutiva da estrutura do domínio de união ao RNA (Fig. 1.11).

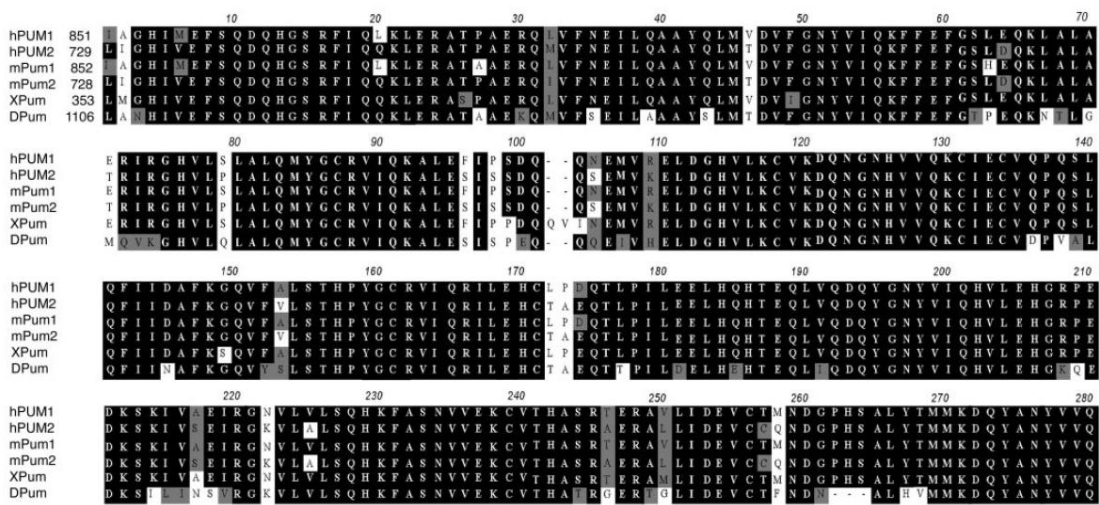


Figura 1.11 - Alinhamento das sequências dos domínios de união ao RNA de Pumilio de humano (hPum1 e hPum2), camundongo (mPum1 e mPum2), sapo (XPum) e mosca (DPum). Fonte: DANISLAV e cols., 2002.

PUM1 e PUM2 repartem 83% de similaridade, com 91% de identidade em relação ao domínio de união ao RNA. A estrutura do gene de PUM1 e PUM2 também é altamente conservada, com limites entre exons/introns idênticos e os tamanhos dos exons que codificam PUM-HD (Fig.1.12). Essas evidências sugerem que PUM1 e PUM2 são derivados de uma duplicação do gene *Pum* ancestral (DANISLAV e cols., 2002).

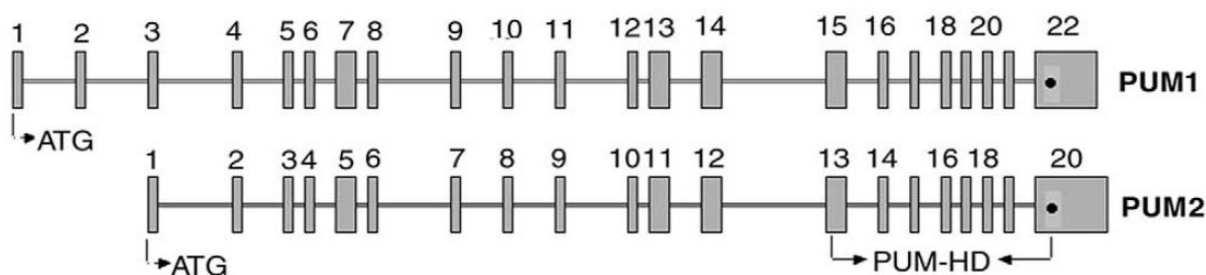


Figura 1.12 - Diagrama esquemático da estrutura dos genes PUM1 e PUM2. Fonte: DANISLAV e cols., 2002.

PUM1 e PUM2 são co-expressos em diversos tecidos sugerindo que essas proteínas possam ocasionalmente agir de maneira redundante (SPASSOV & JURECIC, 2003). Surpreendentemente, 507 (88%) dos genes alvos de PUM2 também foram definidos entre os alvos de PUM1, indicando que as proteínas PUM humanas têm muitas semelhanças quanto à especificidade do substrato e eventualmente atuam redundantemente em alvos comuns (Figura 1.13) (GALGANO e cols., 2008).

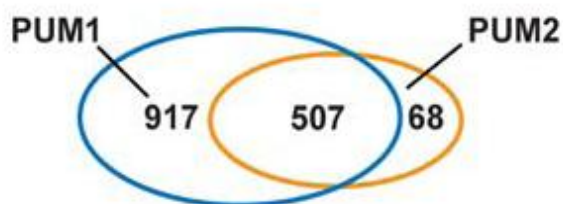


Figura 1.13 - Diagrama da sobreposição dos transcritos alvos de PUM1 e PUM2. FONTE: GALGANO e cols., 2008.

Baseado em alguns estudos de função da proteína PUM2, presume-se que esta esteja envolvida na fisiologia de células germinativas. Camundongos mutantes para *pum2* apresentaram testículos pequenos, embora a fertilidade pareça não ser afetada (XU e cols., 2007). Com base nestes resultados, foi proposto que PUM2 tem um papel na manutenção das células germinativas (XU e cols., 2007). PUM2 foi recentemente descrito como regulador negativo da expressão da proteína quinase ativada por mitógeno (*mitogen activated protein kinase 1* MAPK1, ERK2) e MAPK14 (*mitogen activated protein kinase 14*) em CTE humanas e células germinativas de *Caenorhabditis elegans*. MAPK1 e MAPK14 são quinases que participam da via MAPK / ERK, que reprime a autorrenovação das CTs (Fig.1.14) (LEE e cols., 2007) e, portanto, esses resultados sustentam o papel ancestral para

proteínas PUF na manutenção e autorrenovação das CTs (WICKENS e cols., 2002). Dados recentes sugerem papéis adicionais a PUM2 em neurônios como na manutenção da morfologia e função da sinapse.

A função da família PUF na manutenção do estado primitivo é conservada evolutivamente e provavelmente seja a função ancestral da família (WICKENS e cols., 2002; SPASSOV e JURECIC, 2003). Pumilio forma complexos multiprotéicos com outras proteínas reguladoras como DAZ *Like* [DAZL] (FOX e cols, 2005), BOULE [BOL] (URANO e cols, 2005), Staufen [STAU](DUBNAU e cols, 2003) e Nanos1 [NOS1], (WREDEN e cols, 1997 e FORBES & LEHMANN, 1998). Esses complexos estão envolvidos na manutenção das CTs embrionárias e na regulação do início da meiose em diversos organismos, incluindo humanos (FOX e cols 2005; MOORE e cols, 2003; XU e cols, 2001). PUM2 e NOS1 podem interagir num mecanismo conservado no desenvolvimento e manutenção das células germinativas em humanos e outros organismos (JARUZELSKA e cols, 2002). STAU e PUM fazem parte de uma via durante a formação da memória olfativa em *D. melanogaster* (DUBNAU e cols, 2003).

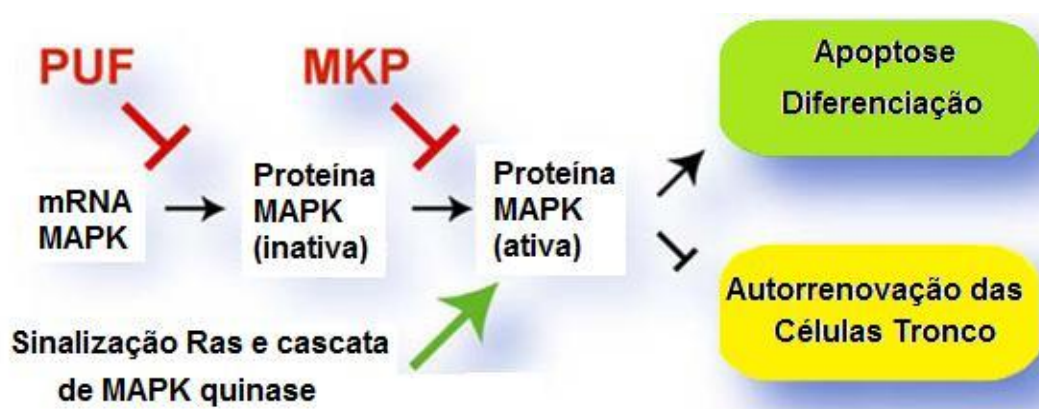


Figura 1.14 - Esquema da repressão da via MAPK por PUF. Proteínas PUF são responsáveis pela repressão pós-transcricional do mRNA MAPK; mecanicamente, isso poderia controlar sua tradução e estabilidade. FONTE: LEE e cols, 2007.

1.13 Família DAZ

Várias evidências sugerem que os genes da família DAZ têm funções essenciais na manutenção das CTs de linhagem germinativas e embrionárias humanas (MOORE e cols, 2003). Homens que possuem o *cluster* do gene DAZ deletado do cromossomo Y têm defeitos na espermatogênese. Esses homens frequentemente perdem todas as CTs germinativas

(REIJO e cols, 1995). Essa família consiste em três membros: DAZ, DAZL e BOL. Há interação entre os membros e outras proteínas (Tabela 1.2), estabelecendo complexos de regulação.

Essas proteínas de união ao RNA são altamente conservadas e são essenciais para a gametogênese em metazoários. Os membros dessa família agem no controle desse processo regulando a tradução de mRNAs específicos (REYNOLDS & COOKE, 2005).

Gene	Expressão	Motivo(s)
<i>pum2</i>	CTEs e células germinativas	Repetições PUF
<i>hpk3</i>	Super regulado em ovários e testículos	Nenhum
<i>bol</i>	Células germinativas masculinas	RRM, Repetições DAZ
<i>dzip1</i>	Tecidos específicos e testículos	Zinc Finger
<i>dzip2</i>	Células germinativas masculinas	Zinc Finger
<i>dzip3</i>	Não há conhecimento	Nenhum
<i>dazl</i>	Células germinativas	RRM, Repetições DAZ

Tabela 1.2 - Genes que codificam proteínas que potencialmente interagem com DAZ. FONTE: MOORE e cols, 2002.

A proteína que interage com DAZ (*DAZ-interacting protein* – DZIP1) co-localiza com as proteínas DAZ ou DAZL nas CTs embrionárias e germinativas e estas apresentam interações entre si formando um complexo de proteínas que se liga a mRNA (MOORE e cols, 2003). Esse complexo regula a tradução ou degradação de mRNA e pode estar envolvido no processo de manutenção e diferenciação dessas células.

DZIP codifica três isoformas de proteínas diferentes que contêm domínio zinc-finger (C2H2) (Figura 1.15). Os *splicing* alternativos geram DZIPt1 (ou DZIP1), DZIPt2 (DZIP2) e DZIPb (ou DZIP3). Comparação desses transcritos revela uma extensiva identidade das sequências de nucleotídeos. No entanto, diferenças significativas existem entre eles. Por exemplo, o transcrito de DZIP1 contém dois exons alternativos de 138 e 100 nucleotídeos, que resulta na adição de 46 aminoácidos na região N-terminal. O transcrito DZIP2 contém um exon alternativo de 57 nucleotídeo, que resulta na adição de 19 aminoácidos além do domínio zinc-finger C2H2.

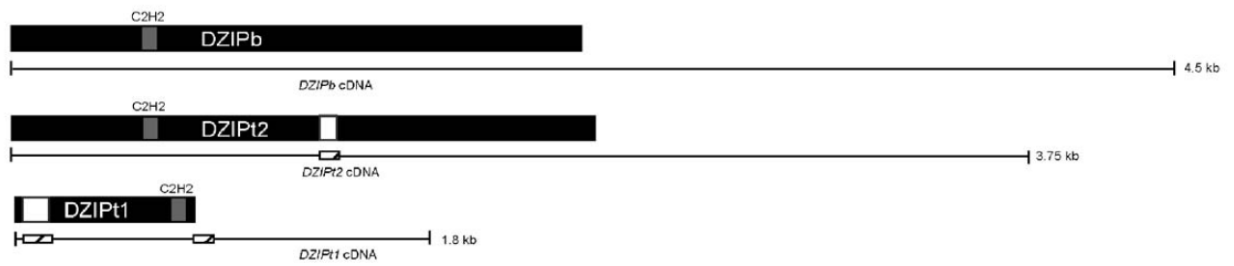


Figura 1.15 - Esquema contendo alinhamento de nucleotídeos da sequência de cDNA de DZIPb, DZIPt2 e DZIPt1. Linhas horizontais representam o cDNA dos diferentes transcritos de DZIP e a área das caixas representam os exons alternativos. Acima do cDNA estão representadas as proteínas codificantes. Regiões pretas representam os aminoácidos comuns, as regiões das caixas brancas representam os aminoácidos adicionais particular a cada isoforma de proteína, e regiões com as caixas cinza representam os domínios zinc-finger C2H2. FONTE: MOORE e cols., 2004.

DZIP1 também tem sido descrito como um dos reguladores do caminho de *Hedgehog* (Hh), essa via é responsável pelo desenvolvimento embrionário desde *D. melanogaster* a humanos. A interferência dessa rede Hh em humanos pode causar problemas como Holoprosencephalia (WALLIS e MUENKE, 2000), Postaxial polydactyly (RADHAKRISHNA e cols., 1997) e leva ao desenvolvimento de alguns tipos de câncer (carcinoma e meduloblastoma), conforme citado por GOODRICH e SCOTT (1998). Segundo WOLFF (2004), iguana (ortólogo de DZIP1) é essencial para a transdução de sinal na via Hedgehog em embriões de Zebrafish. A distribuição de iguana é exclusivamente citoplasmática, porém, quando a PKA (cAMP *dependent protein kinase*) é inativada há uma translocação nuclear de iguana (SEKIMIZU e cols, 2004; WOLFF e cols 2004). DZIP1 poderia estar envolvida na transdução de sinal núcleo-citoplasma dessa via e outras redes de regulação em CTMs humanas.

MOORE e seus colaboradores (2004) analisaram o perfil de expressão de DZIP e DAZL em CTEs humanas. Em contraste a DAZL, a expressão de DZIP (isoforma 1) se manteve constante no curso de diferenciação dos corpos embrióides (Fig. 1.16) (MOORE e cols., 2004).

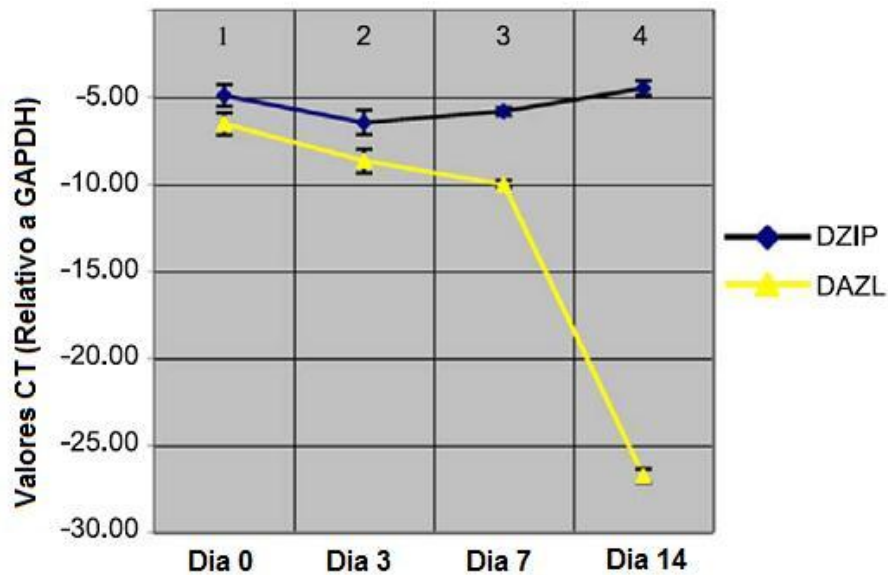


Figura 1.16 - Perfil de expressão de DZIP e DAZL durante a diferenciação de corpos embriões. FONTE: MOORE e cols., 2004.

Os estudos de mecanismos envolvidos na autorrenovação de CTs estão sendo explorados e desvendados, no entanto, há algumas questões que ainda não foram esclarecidas na literatura como: quais as proteínas envolvidas na regulação pós-transcricional da autorrenovação das CTMs humanas? DZIP1 e PUM2 são expressas nessas células? Toda a população de CTMs expressam essas proteínas ou apenas sub-populações? Quais os papéis dessas proteínas na manutenção da autorrenovação ou diferenciação? Qual a localização dessas proteínas durante o processo de diferenciação? Há flutuação na expressão delas durante esse processo? Dessa forma, novas pesquisas devem ser feitas a fim de elucidar mais uma peça do gigantesco quebra-cabeça chamado célula.

2. JUSTIFICATIVA

Uma propriedade funcional central de todos os tipos de CTs é sua capacidade de autorrenovação. Fatores intracelulares e extracelulares controlam mecanismos que direcionam a célula filha a se autorrenovar ou tornar-se comissionada a uma linhagem específica. Na terapia celular, essa característica de autorrenovação é utilizada para a expansão *in vitro* das CTs para obtenção de número de células suficiente para a reparação do tecido alvo. No entanto, estudos recentes indicam que a expansão *in vitro* dessas células é limitada. As CTMs senescem e perdem o seu potencial de diferenciação com o tempo e passagens da cultura. Sendo assim, surge a necessidade de pesquisa básica para entender mecanismos moleculares responsáveis pela capacidade de autorrenovação e diferenciação.

Os mecanismos que regulam a manutenção da autorrenovação celular não são bem conhecidos. Os poucos estudos existentes focam a regulação em nível transcricional. Porém, os resultados da comparação entre padrões de transcrito e proteômica de CTs destacam a importância da regulação pós-transcricional dos genes envolvidos na autorrenovação. Os mecanismos de regulação pós-transcricional são intermediados por proteínas de união ao RNA, as quais se ligam preferencialmente a elementos *cis* presentes nas regiões não traduzidas dos mRNAs. Desta forma regulam a vida média dos transcritos e quais deles serão finalmente traduzidos em proteína. Diferentes proteínas de união ao RNA são expressas em CTs durante a diferenciação. A rede de proteínas formada pelas famílias PUF e DAZ está envolvida na regulação pós-transcricional da autorrenovação das CTs. Porém, esses dados se restringem as CTs embrionárias e germinativas e se desconhecem os genes alvos destes fatores reguladores em CTMs. DZIP1 interage com DAZ e DAZL e está expressa em CTEs e germinativas humanas. DAZ é responsável pela manutenção da autorrenovação nessas células. PUM2 também interage com DAZ e está presente nas CTEs e germinativas humanas.

Neste contexto, o presente trabalho é inédito no estudo da expressão de DZIP1 e PUM2 nas CTMs humanas derivadas de tecido adiposo e durante a diferenciação dessas células em adipócitos. Os resultados obtidos com DZIP1 e PUM2 forneceram contribuições para a biologia das CTMs, além disso, o estudo abriu perspectivas para pesquisas futuras.

3. OBJETIVO

3.1 OBJETIVO GERAL

Estudar a expressão de DZIP1 e PUM2 nas CTs mesenquimais humanas derivadas de tecido adiposo durante a diferenciação celular em adipócitos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Verificar a expressão dos transcritos e proteínas de *dzip1* e *pum2* em CTMs humanas derivadas de medula óssea, tecido adiposo e sangue de cordão umbilical;
2. Analisar a expressão dos transcritos de *dzip1* e *pum2* durante a proliferação celular;
3. Analisar o perfil de expressão dos transcritos de *dzip1* e *pum2* durante a adipogênese;
4. Produzir anti-soros policlonais específicos contra as proteínas DZIP1 e PUM2 e realizar estudos de imuno-localização nas CTMs humanas derivadas de tecido adiposo;
5. Analisar o perfil de expressão das proteínas DZIP1 e PUM2 durante a adipogênese.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Lista de soluções

Meio LB (Luria – Bertani): Bacto-Triptona 10 g/L, NaCl 5 g/L, Extrato de levedura 5 g/L, NaCl 5g/L;

Solução de lise para CTs: Hepes 20 mM (pH 7,4), NaCl 100 mM, NaF 50 mM, 1% Triton x-100, 10% glicerol, 1 mM dithiothreitol, 1 µl cocktail de inibidores de protease;

Solução 2.5 mM dNTPs: mistura de 2.5 mM de cada desoxiribonucleotídeo trifosfatado (dATP, dCTP, dGTP e dTTP);

Tampão da Fosfatase Alcalina (AP-Buffer): Tris-HCl 100 mM (pH 9,5), NaCl 100 mM, MgCl₂ 5 mM;

Tampão de amostra para DNA 10x: Ficoll 25%, azul de bromofenol 0,25%, xilenocianol 0,25%;

TBE: tris-base 89 mM, ácido bórico 89 mM, EDTA 2 mM;

Brometo de Etídio: solução 2,5 µg/ml;

PBS 10x: KCl 2,7 mM, KH₂PO₄ 1,5 mM, Na₂HPO₄.7H₂O 4,3 mM, NaCl 137 mM;

Solução de descoloração: metanol 30%, ácido acético 10%;

Tampão de amostra de proteína 4x: Tris-HCl 160 mM pH 6,8, SDS 4%, β-mercaptoetanol 10%, glicerol 24%, azul de bromofenol 0,02%;

Tampão de lise celular para técnica da palitagem: glicerol 5%, SDS 0,5%, EDTA 5 mM, NaOH 50 mM, azul de bromofenol 0,01%;

Tampão para SDS-PAGE: tris-base 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0,1%;

TE: Tris-HCl 10 mM pH 8,0, EDTA 1 mM pH 8,0;

CEPAS DE BACTÉRIAS

E. coli BL21 (DE3- pLYs) – Promega

E. coli Rosetta (DE3) – Novagen

E. coli XL1blue – Stratagene

E. coli DH5α – Promega

4.2 Aspectos éticos

O presente trabalho é uma das etapas do projeto de pesquisa “Caracterização celular e molecular do potencial de diferenciação de CTMs adultas: aplicação em terapias celulares do sistema cardiovascular”, submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa - FIOCRUZ aprovado em 10 de outubro de 2007 sob o número 419/07.

4.3 Locais de coleta do material para isolamento das CTMs

Este projeto foi realizado no Instituto Carlos Chagas em colaboração com a Pontifícia Universidade Católica do Paraná. O grupo do laboratório de cultivo celular dessa universidade foi responsável pela coleta e isolamento das CTs. A medula óssea foi obtida de pacientes portadores de cardiomiopatia dilatada que participaram do “Estudo Multicêntrico randomizado de Terapia Celular em Cardiomiopatias” realizado na Irmandade da Santa Casa de Misericórdia – Curitiba/PR. Este estudo tem a liberação da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP – registro 11259). O sangue de cordão umbilical e placentário foi coletado no Centro Obstétrico do Hospital e Maternidade Victor Ferreira do Amaral – Curitiba - PR. O tecido adiposo foi obtido de pacientes submetidos à cirurgia bariátrica com dermolipectomia no Instituto de Medicina e Cirurgia do Paraná – Curitiba - PR. A coleta foi realizada após o esclarecimento dos objetivos do projeto de pesquisa aos doadores e obtenção do termo de consentimento livre e esclarecido dos mesmos (ANEXO 2).

4.4 Isolamento, caracterização e cultura das CTMs

4.4.1 Coleta, isolamento e cultura das células-tronco da medula óssea

Cerca de 5 mL da MO de cada doador foi utilizada para o estudo. A coleta da MO foi realizada por meio da punção da crista ilíaca posterior dos doadores, com auxílio de seringas contendo solução anticoagulante (heparina sódica) e transferida para tubos cônica contendo meio Iscove’s Modified Dulbecco’s (IMDM) (Gibco™ Invitrogen, NY, USA), diluída na proporção de 1 volume de MO : 1 volume de meio IMDM.

O isolamento das células mononucleares da MO foi realizado segundo o método descrito por BÖYUM (1968). O material foi colocado sobre uma solução de Ficoll-Hypaque ($d = 1.077 \text{ g / cm}^3$) (Sigma Chemical, St. Louis, USA) e centrifugado a $400 \times g$ por 30 minutos. Em seguida, o anel de células mononucleares, que fica na interfase entre o plasma e o Ficoll, foi retirado e passado para um tubo cônico. Este material foi lavado duas vezes com meio de cultura IMDM (Gibco™ Invitrogen, NY, USA) e em seguida as células foram contadas e plaqueadas numa densidade de 1×10^5 células por cm^2 em frascos de cultura de 75 cm^2 (TPP, Trasadingen, Switzerland) e cultivadas em meio IMDM suplementado com 15% de soro bovino fetal (SBF) (Gibco™ Invitrogen, NY, USA) e $100 \mu\text{g/mL}$ de estreptomicina (Gibco™ Invitrogen, NY, USA) e 100 U/mL de penicilina (Gibco™ Invitrogen, NY, USA). Os frascos foram incubados em estufa umidificada a 37°C com 5% de tensão de CO_2 . O meio dos cultivos foram trocados duas vezes por semana até alcançar a confluência celular. Quando confluentes, as células aderentes foram dissociadas utilizando tripsina - EDTA 0,25% e novamente plaqueadas numa concentração de $1,3 \times 10^4$ células por cm^2 (primeira passagem).

4.4.2 Coleta, isolamento e cultura das células-tronco de sangue do cordão umbilical e placentário

Alguns critérios de inclusão das candidatas a doação foram determinadas como: idade entre 18 e 36 anos, idade gestacional igual ou superior a 35 semanas, peso fetal igual ou superior a 2000 g, ausência de processos infecciosos durante a gestação ou doenças que possam interferir com a vitalidade placentária. Os critérios de exclusão foram: sofrimento fetal grave, feto com anormalidade congênita, infecção durante o trabalho de parto, presença de doenças que possam interferir com a vitalidade placentária, gestante com história pessoal de doença sistêmica auto-imune ou de neoplasia, entre outros. Estes critérios seguem a Resolução - RDC número 153, de 14 de junho de 2004, que determina o Regulamento Técnico para os procedimentos hemoterápicos.

A coleta de sangue de cordão umbilical e placentário foi realizada com auxílio de seringas contendo solução anticoagulante ácido citrato dextrose (ACD – JP Industria Farmacêutica – São Paulo - BR). Após a coleta, o volume aproximado de 50 mL de sangue foi diluído em uma proporção de 1:3 em meio IMDM para o isolamento.

As células mononucleares do cordão umbilical foram obtidas por separação em gradiente de densidade Ficoll-Hypaque ($d = 1.077 \text{ g / cm}^3$), como descrito anteriormente para

medula óssea. As células foram plaqueadas na densidade de 6×10^5 células por cm^2 em frascos de cultura de 75cm^2 e cultivadas com o mesmo meio descrito para medula óssea. Os frascos foram incubados em estufa umidificada a 37°C com 5% de tensão de CO_2 . Os meios dos cultivos foram trocados duas vezes por semana até alcançar a confluência celular. Quando confluentes, as células aderentes foram dissociada utilizando tripsina - EDTA 0,25% e novamente plaqueadas numa concentração de $1,3 \times 10^4$ células por cm^2 (primeira passagem).

4.4.3 Coleta, isolamento e cultura das células-tronco derivadas de tecido adiposo

O tecido adiposo foi adquirido de pacientes submetidos à cirurgia bariátrica com dermolipectomia.

As CTs derivadas de tecido adiposo foram isoladas usando digestão enzimática. Logo após a retirada do tecido adiposo, os fragmentos foram removidos com auxílio de pinça e bisturi, lavados com PBS para remover o excesso de hemácias, mascerados e digeridos com 1 mg/mL de colagenase tipo I (InvitrogenTM, NY, USA) numa proporção de 1 parte de tecido adiposo para 4 partes de colagenase por 30 minutos a 37°C sob agitação constante. Para eliminar os fragmentos não digeridos, o material foi filtrado duas vezes com filtro de $100 \mu\text{m}$ de membrana de nylon (BD FALCONTM, BD Biosciences Discovery Labware, Bedford, USA). Em seguida, a suspensão de células foi centrifugada a $800 \times g$ por 10 minutos e descartado o sobrenadante. O tampão hemolítico (NH_4Cl 155 mmol / L e Tris 20 mmol / L pH 7,3) foi adicionado ao precipitado por 10 minutos para lise das hemácias e centrifugado novamente à $800 \times g$ por 10 minutos. O sedimentado foi suspenso em PBS e filtrado (filtro com poro de $40 \mu\text{m}$). As células foram centrifugadas novamente e ressuspendidas em meio DMEM/F12 com 10% SBF e 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de estreptomicina e 100 U/mL de penicilina. As células foram contadas usando câmara de Neubauer e plaqueadas em uma concentração de $1,4 \times 10^5$ células / cm^2 em frascos de cultura de 75cm^2 . Os frascos foram incubados em estufa umidificada a 37°C com 5% de tensão de CO_2 . O meio de cultura foi trocado duas vezes por semana até alcançar a confluência celular. Quando confluentes, as células aderentes foram dissociadas utilizando tripsina - EDTA 0,25 % e novamente plaqueadas numa concentração de $1,3 \times 10^4$ células por cm^2 (primeira passagem).

Para este trabalho foram utilizadas amostras de três doadores de MO, três de SCU e nove de TA.

4.5 Adipogênese *in vitro*

As CTMs derivadas de tecido adiposo foram mantidas até a terceira passagem, dissociadas utilizando tripsina-EDTA 0,25%, replaqueadas em lamínulas e cultivadas em placas de 24 poços para a citotóxicidade e imunolocalização ou replaqueadas em placas de cultura de 6 poços para a extração de RNA total. A indução da diferenciação celular em adipócitos foi realizada utilizando o meio *Poietics*TM *Differentiation Basal Medium Adipogenic* (Cambrex Bio Science, MD, USA) e suplementado com hMSCs *Adipogenic SingleQuots* (Cambrex Bio Science, MD, USA) por 21 dias. A diferenciação adipogênica foi avaliada no 21^o dia pela presença de vacúolos contendo lipídios corados com Oil Red O (Sigma Chemical, St. Louis, USA) (PITTENGER e cols, 1999). Paralelo a esse desenho experimental, CTMs derivadas de tecido adiposo dos mesmos doadores foram mantidas nas mesmas condições com meio de cultura controle *Poietics*TM MSCGM (*Mesenchymal Stem Cell Growth Medium*) para os ensaios de citotóxicidade, imunolocalização e extração de RNA total.

4.6 Extração de RNA total

A partir da cultura de células em placas ou garrafas de cultivo celular, foi realizada a extração de RNA total usando o Kit RNeasy (QIAGEN) e tratado na coluna com DNase I (QIAGEN). A concentração das amostras foi determinada por espectrofotometria (GeneQuant, Amersham Biosciences) e armazenadas a -70°C.

4.7 Síntese de cDNA pela transcriptase reversa

O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado a partir de 1 µg de RNA total em um volume máximo de 9,6 µl. As amostras foram concentradas com kit Microcon 30 (Millipore) quando apresentavam baixa concentração de RNA. O RNA total foi incubado com 10 µM de iniciador oligo dT (USB Corporation) a 70°C por 10 minutos. Em seguida, o volume de 10,4 µl da mistura de reagentes (Tab. 4.1) foi adicionado e incubado a 42°C por duas horas.

Tabela 4.1 - Mistura de reagentes

Reagente	Quantidade
Buffer ImProm II (Promega) 5x	1 x
MgCl ₂	6 mM
dNTPs	0,5 mM
RNase Out (Promega)	2U
Transcriptase Reverse (Promega)	1U

Ao final da reação, 2 U de RNase H (Promega) foi incorporado a reação e incubado por 30 minutos a 37°C. A purificação do cDNA foi realizada com Microcon 30 (Millipore), adicionando 400 µl de água ultra pura, passando pela coluna do Microcon por 8-9 minutos a 12000 x g, invertendo a coluna em tubos de 1,5 mL e centrifugando por 3 minutos á 1000 x g. A reconstituição do volume foi feita para 250 µl com H₂O ultra pura, resultando na concentração final de 4 ng/µl. As amostras foram aliquotadas e armazenadas em -20°C.

4.8 Reação em cadeia da polimerase (RT-PCR)

Os oligonucleotídeos foram desenhados com base nas seqüências dos genes humanos disponíveis no NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) e sintetizados pela companhia *The midland certified Reagent* (Midland, Texas). A enzima de alta fidelidade Pfx (*Pfx* Ultra DNA Polimerase - InvitrogenTM, NY, USA) foi utilizada nas reações relacionadas as clonagens. A enzima de alta processividade, *Taq* DNA Polimerase (InvitrogenTM, NY, USA), foi utilizada nas demais reações.

Para cada reação em cadeia da polimerase foi utilizado: Tampão de PCR 1x; 2,5 mM MgCl₂ (somente quando utilizado *Taq* DNA polimerase); 1,25 mM dNTPs; 1 U DNA polimerase; 10 pmol iniciador *foward*, 10pmol iniciador *reverse* e 20 ng cDNA (exceto para a PCR de colônia e os controles sem DNA molde). A relação de oligonucleotídeos está no ANEXO 1.

As reações foram incubadas em termociclador (Termociclador Biocycler MyGeneTm – Series Peltier Thermal Cycler, Perkin-Elmer 9700 ou MWG de Biotech) com o seguinte programa: 94°C por 2 minutos; 30 ciclos de 94°C por 15 segundos; temperatura e tempo de anelamento específico a cada iniciador (ANEXO 1) e 72°C por 40 segundos.

4.9 Purificação de produto de PCR

O produto de PCR foi purificado com o kit de Purificação de PCR (PROMEGA), segundo instruções do fabricante. Resumidamente, os produtos passam através de coluna com resina, a coluna foi lavada com isopropanol e o produto purificado foi eluído com água ultra pura. A qualidade da purificação foi conferida em eletroforese em gel de agarose e a concentração determinada por espectrofotometria.

4.10 Eletroforese de DNA

Os fragmentos de DNA foram separados por massa molecular por meio de eletroforese em gel de agarose. A concentração do gel variou de acordo com o tamanho dos fragmentos de DNA analisados. As amostras foram preparadas com adição de tampão de amostra de DNA e submetidas ao gel submerso em tampão TBE e voltagem de 80 V. Após a migração do DNA no gel, o mesmo foi incubado em brometo de etídeo (0,2 mg/L) por 30 minutos e visualizado em sistema de fotodocumentação.

4.11 RT-qPCR

A análise quantitativa dos transcritos dos genes de interesse foi realizada por meio da PCR em tempo real. A técnica de PCR em tempo real possibilita a detecção da amplificação durante o curso de toda a reação. A detecção é possível devido ao *Sybr-Green*, elemento que emite fluorescência quando se associa com moléculas de dupla-fita. Enquanto o produto está sendo amplificado, o *Sybr-Green* se incorpora na molécula dupla-fita em síntese e emite a fluorescência que é simultaneamente detectada pelo aparelho. Sendo assim, a intensidade da fluorescência é proporcional à quantidade do produto amplificado presente em cada reação,

dessa forma, possibilita a quantificação de um fragmento específico de RNA ou DNA relativo ao dado de um gene com expressão constitutiva.

A qPCR foi realizada no aparelho ABI PRISM 7000® *Sequence Detection System* (Applied Biosystems). As amostras foram ensaiadas em volume de 20 µL de reação, contendo 20 ng do cDNA e 15 µL de *SYBR Green Master Mix* (Applied Biosystems®) com os iniciadores, conforme instruções do fabricante. Os ciclos da PCR consistiram de: 95°C por 10 minutos; 45 ciclos de 95°C por 15 segundos; 60°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto; seguido de mais um ciclo que corresponde a etapa que analisa a dissociação: 95 °C por 15 segundos; 60 °C por 1 minuto, 95 °C por 15 segundos e 60 °C por 15 segundos.

Para cada par de iniciadores utilizados foi necessário uma curva de diluições seriadas de amostras conhecidas. Os dados das reações com a curva fornecem valores com tendências de acordo com a diluição e com esses valores foi possível obter uma quantidade relativa à cada ciclo de amplificação. Todas as amostras foram feitas em triplicatas.

Quanto à análise dos dados, a média dos valores relativos de expressão de *pum2* ou *dzip1*, por exemplo, foi dividido pela média dos valores relativos da expressão de um gene que se expressa constitutivamente entre as amostras, no caso GAPDH (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase). Desta forma, as amostras diferentes são normalizadas de acordo com o gene constitutivo (gene normalizador). A curva de dissociação foi utilizada para verificar a especificidade do produto e consistiu do aumento da temperatura de 60 °C a 95 °C numa taxa de aproximadamente 1 °C/40 segundos, com leitura contínua da fluorescência.

A análise estatística realizada considerou o desvio padrão relativo entre as triplicatas dos dados dos genes em estudo com o gene normalizador. Para isso, o coeficiente de variação (cv) é dado pela fórmula:

$$CV = \left[\frac{\text{DesvPad}}{\text{Média Qnt}} \right]^2 + \left[\frac{\text{DesvPadGAPDH}}{\text{Média QntGAPDH}} \right]^2$$

Onde, DesvPad = Desvio Padrão da médias das quantidades relativas do gene; Média Qnt= Média das quantidades relativas do gene; DesvPadGAPDH = Desvio Padrão da médias das quantidades relativas de GAPDH e Média QntGAPDH= Média das quantidades relativas de GAPDH.

4.12 Coloração das vesículas lipídicas com Oil Red O

As células foram lavadas duas vezes com PBS e fixadas com Bouin (Biotec) por 10 minutos. O fixador foi retirado e as lamínulas com as células aderidas foram lavadas duas vezes com etanol 70 % e duas vezes com água ultra pura. As células foram incubadas em propilenoglicol 85 % por dois minutos e coradas com Oil Red O (Sigma-Aldrich) 0,5 % por 1 hora. Em seguida, as células foram incubadas novamente com propilenoglicol 85 % por 1 minuto e lavadas duas vezes com água ultra pura. O núcleo das células foi corado com hematoxilina-eosina (HE) (Biotec) por 30 segundos. As células foram lavadas duas vezes com água ultra pura, montadas em glicerol e seladas com esmalte em lâminas de microscopia ótica. As lâminas foram observadas no microscópio óptico Nikon Eclipse E600 com objetivas de 20x, 40x e 100x. Imagens digitais foram capturadas usando-se a câmara CoolSnap (Media Cybernetics) e analisadas com o programa Image Pro-Plus v.4.5.1.22 (Media Cybernetics).

4.13 Marcação intracelular de proteínas – Análise por citometria de fluxo

Após a tripsinização, as células lavadas duas vezes com tampão de lavagem (PBS 1x; 0,1 % BSA e 2 mM EDTA) e centrifugadas a 2000 x g por 5 minutos. As células foram incubadas durante 10-15 minutos à temperatura ambiente com a solução de fixação e permeabilização (proporção de volume 1 : 10 : 9 de Solução de fixação e permeabilização FACS Lysing, paraformaldeído 2% e água ultra pura, respectivamente). O volume dessa solução permeabilizante foi de 500 µl para cada 100.000 células. Após a incubação, cerca de 10 ml de solução de lavagem foram adicionados as células e distribuídos em tubos de 1,5 ml de acordo com o número de amostras do experimento. As amostras foram centrifugadas a 2000 x g por 5 minutos e lavadas novamente com 1 mL de tampão de lavagem. O sobrenadante foi descartado e as células sedimentadas foram incubadas com 10µl de anticorpo primário diluídos 1:50 (PUM2 – anti-cabra ou DZIP1 – anti-coelho) e incubados a 37°C por 1 hora. As células foram lavadas mais uma vez e incubadas a 37°C por 1 hora com 10 µl de anticorpo secundário anti-IgG com fluoróforo acoplado (Anti-cabra conjugado com FITC ou anti-coelho conjugado com FITC), diluído 1:100. Uma última lavagem foi realizada e as células foram suspendidas em 300µl do tampão de lavagem e armazenadas a 4°C até a leitura em citometro de fluxo FACS Calibur (Becton Dickinson). A análise foi realizada no *software FlowJo* (FlowJo, Ashland, USA).

Microscopia de imunofluorescência (IF)

A imunolocalização das proteínas nas células foi realizada por imunofluorescência indireta. As células foram lavadas três vezes com PBS pH 7,3 por 5 minutos e fixadas com paraformaldeído 4% durante 10 minutos. Em seguida, as lamínulas com as células foram lavadas uma vez com PBS e incubadas com 50 mM de cloreto de amônia em PBS 1x por 10 minutos. As células foram lavadas três vezes com PBS 1x durante 5 minutos e permeabilizadas com Triton X-100 0,5% diluído em PBS por 10 minutos a temperatura ambiente. As células foram novamente lavadas por três vezes com PBS durante 5 minutos e incubadas com 1% BSA em PBS por 16 horas a 4°C em câmara úmida. Em BSA 1%, os anticorpos foram diluídos 1:50 (PUM2 – anti-cabra ou DZIP1 – anti-coelho) e incubados por 1 hora a 37°C. Posteriormente, as células foram lavadas três vezes por 5 minutos com PBS e incubadas com o anticorpo secundário Alexa Fluor 488 (Sigma) diluído 1:400 por 30 minutos. As células foram lavadas três vezes por 5 minutos e incubadas com DAPI (1 µg/µl) diluído em PBS por 5 minutos, lavadas três vezes em PBS por 5 minutos e montadas com n-propilgalato (200 µg/ml) e seladas com esmalte sobre uma lâmina de microscopia óptica. As lâminas foram observadas no microscópio de fluorescência Nikon Eclipse E600 com objetivas de 20x, 40x e 100x. Imagens digitais foram capturadas usando-se a câmara CoolSnap (Media Cybernetics) e analisadas com o programa Image Pro-Plus v.4.5.1.22 (Media Cybernetics).

4.15 Extrato protéico das CTMs

Os extratos protéicos das CTMs foram obtidos a partir da suspensão das células, contagem e lise com solução de lise para CTs (20 mM Hepes (pH 7,4), 100 mM NaCl, 50 mM NaF, 1% Triton X-100, 10% glicerol, 1 mM dithiothreitol, 1 µl *cocktail* de inibidores de protease (1000 células/µl) por 1 hora a 4°C. Logo em seguida, o lisado foi centrifugado á 14000 x g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi transferido para tubo de 1,5ml, tampão de desnaturação foi acrescentado e incubados a 94°C por 10 minutos.

4.16 Eletroforese de proteína em gel de acrilamida desnaturante (SDS-PAGE)

As proteínas foram desnaturadas com tampão de amostra como descrito anteriormente e submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida, conforme descrito por Laemmli, 1970.

Para a determinação da concentração dos géis foi levado em consideração a massa molecular dos polipeptídeos analisados, utilizando 30 mA de corrente elétrica por gel. Após a eletroforese, as proteínas foram coradas com solução de *Coomassie Blue* R-250 por 30 minutos e o gel descorado com solução de descoloração (metanol 30 %, ácido acético 10 %).

4.17 Ensaio de *Western Blot*

A técnica de *Western blot* consiste na transferência de proteínas, previamente separadas por SDS-PAGE, para um suporte sólido (membrana de nitrocelulose) (TOWBIN e cols.,1979). Após a eletroforese, os polipeptídeos foram eletro transferidos para uma membrana de nitrocelulose (Hybond-ECL) utilizando 60V por duas horas a 4°C. Após a transferência, a membrana de nitrocelulose foi corada com solução de *Ponceau S* (Ponceau S 0,5 %, ácido acético 0,1 %) para verificar a qualidade da transferência sendo em seguida descorada com PBS / Tween 0,1 % e incubada em solução de bloqueio (5 % de leite desnatado em PBS / Tween 0,1 %) por 16 horas a 4°C. Após essa incubação, a membrana foi colocada em solução de bloqueio contendo o anticorpo primário diluído (anti-Histidina, anti-PUM2, anti-DZIP1 ou anti- β -actina), permanecendo por duas horas a 37°C sob agitação e, em seguida, lavada três vezes por 5 minutos com solução de bloqueio. Anticorpos secundários anti-IgG de camundongo, coelho ou cabra conjugado com fosfatase alcalina (Promega) ou conjugado com Peroxidase (ECL-Amershan) foram utilizados para revelação pelo método colorimétrico ou quimioluminescência, respectivamente. Esses anticorpos foram diluídos na proporção de 1:7500 e incubados junto com as membranas por 1 hora em temperatura ambiente. As membranas foram novamente lavadas com PBS / Tween 0,1 % por três vezes durante 5 minutos. Para revelação pelo método colorimétrico, a membrana foi incubada em 10 ml de tampão para fosfatase alcalina com 66 μ l de NBT (cromógeno) e 33 μ l de BCIP (substrato). Para revelação por quimioluminescência, as soluções do kit ECL-Amersham foram misturadas, como descrito pelo fabricante, e distribuídos sobre a membrana. Após incubação por 1 minuto, a solução foi retirada e um filme autorradiográfico (Hyperfilm ECL)

foi exposto por diferentes tempos. O filme foi revelado com solução reveladora (Kodak) e mergulhado em solução fixadora (Kodak).

A membrana revelada pelo método colorimétrico ou o filme revelado pelo método de quimioluminescência foi escaneado e a imagem resultante foi analisada pelo programa *Scion Image* v. 4.0.3.2 (Scion Corporation).

4.18 Clonagem pelo sistema PGEM®-T Easy (Promega)

O sistema pGEM®-T foi desenhado especificamente para a clonagem de produtos de PCR amplificados com a enzima Taq DNA polimerase (Polimerase de DNA de *Termus aquaticus*), a que adiciona um desoxi-nucleotídeo adenina nas extremidades 5' do fragmento amplificado. Dessa forma, o nucleotídeo timina presente na extremidade 3' do vetor interage com a adenina do produto da PCR e possibilita a ligação dos mesmos com a T4 DNA Ligase (Promega) (fig. 4.1).

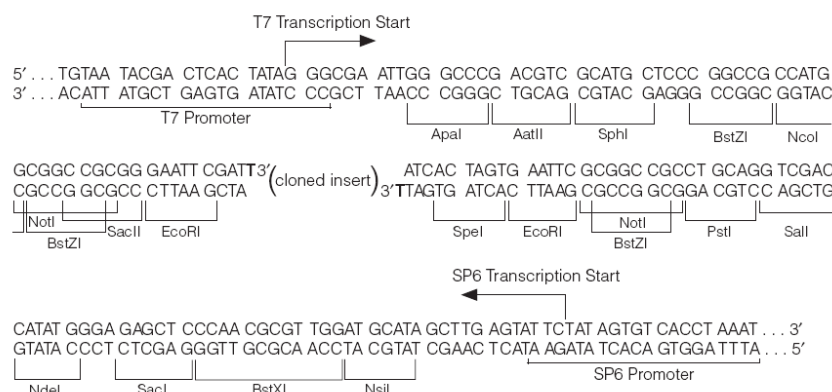


Figura 4.1 - Sítio de múltiplas clonagens do vetor pGEM®-T Easy

O sítio de clonagem se encontra dentro da sequência codificante para a enzima β -galactosidase (fig. 4.2), que hidrolisa o substrato X-gal (análogo da lactose) e gera um produto precipitado de cor azul nas bactérias. No entanto, quando o fragmento de DNA é inserido no sítio de clonagem, a sequência da enzima é interrompida e não gera o produto final azul. Dessa forma, a identificação dos clones é facilitada pela coloração: brancas são as colônias que contêm o vetor com o inserto e as azuis são bactérias com o vetor sem o inserto.

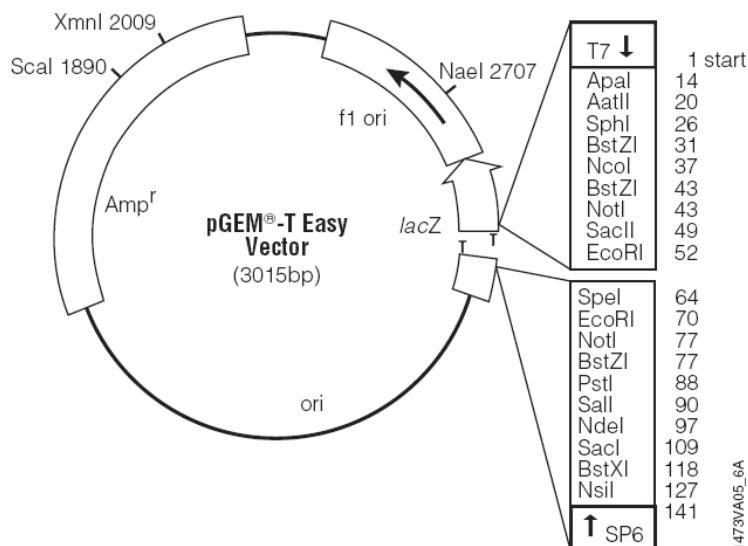


Figura 4.2 - Mapa esquemático do vetor pGEM®-T easy

Para a clonagem no sistema p-GEM®-T, os produtos de PCR foram purificados, como descrito anteriormente, e quantificados. A quantidade de DNA utilizada na reação foi calculada segundo a seguinte fórmula:

$$\frac{\text{ng do vetor} \times \text{kb do inserto}}{\text{kb do vetor}} \times \text{Razão Molar Inserto:vetor} = \text{ng do inserto}$$

A ligação ao vetor de clonagem pGEM®-T Easy foi dada pela reação da tabela 4.2. A reação foi incubada a 16°C por 18 horas. Ao fim da incubação, uma fração dessa reação (1-5µl) foi utilizada para transformar células eletrocompetentes de *E.coli* XL1-blue por eletroporação (item 4.22.2). Após esse procedimento, essas células transformadas foram cultivadas em placas contendo LB/ágar com ampicilina, IPTG (isopropil-tiogalactopiranosídeo) e X-GAL e mantidas por aproximadamente 18 horas em estufa a 37°C. Colônias brancas foram selecionadas e a presença do vetor com o inserto foi conferida por PCR de colônia (item 4.23.1) ou pela técnica de palitagem (*tooth-pick*) (item 4.23.2).

Reação	Quantidade
2x Rapid Ligation Buffer (Promega)	10µl
pGEM® -T Easy Vector (50ng/µl)	1µl
Produto de PCR purificado	x µl
T4 DNA Ligase (Promega, 3U/µl)	1µl
Água deionizada	x µl
Volume Total	20µl

Tabela 4.2 - Reação de ligação do produto de PCR ao vetor pGEM®-T

4.19 Clonagem pelo sistema Gateway®

Os produtos dos genes selecionados foram purificados e clonados em vetores do sistema de clonagem Gateway® (Invitrogen), cuja tecnologia é baseada em recombinação utilizando seqüências sítio específicas do bacteriófago lambda (LANDY, 1989), possibilitando uma rápida e eficiente análise funcional das proteínas de interesse.

O sistema Gateway® permite que, a partir do clone de entrada, seja feita a passagem do inserto, de forma rápida e eficiente, para um segundo vetor, denominado de destino, que pode ser dos mais variados tipos, de acordo com a necessidade da caracterização funcional, como mostra a figura abaixo.

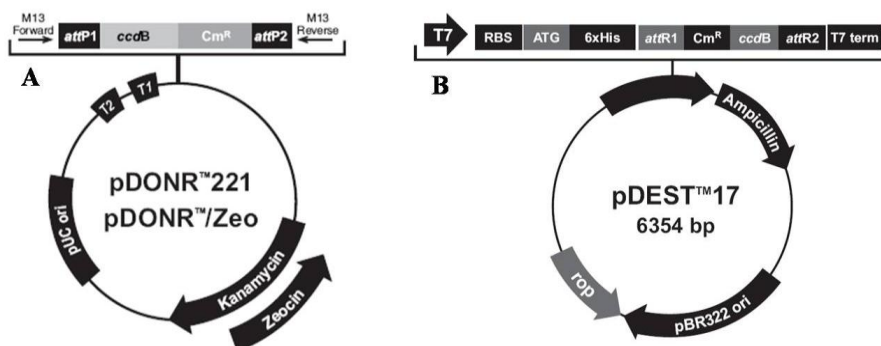


Figura 4.3 - Mapa dos vetores utilizados: A) Vetor de Entrada pDONR™221; B) Vetor de Expressão pDEST™17. (Adaptado do Manual Gateway® Technology - Invitrogen).

O primeiro passo para a utilização do sistema foi a construção dos iniciadores contendo a sequência *attB* (ANEXO 1 - Tabela 9.2) e em seguida a amplificação dos genes de interesse por RT-PCR. Dessa maneira, os produtos amplificados com as sequências *attB* podem ingressar nesta plataforma por meio do vetor de entrada pDONRTM221 (Invitrogen) (Fig. 4.3) que possibilita a clonagem direcional de produtos de PCR.

Os clones de entrada foram gerados a partir da recombinação entre os sítios *attB* (*attachment*), presentes nos produtos da PCR, e *attP* do vetor pDONRTM221, dando origem aos sítios *attL* no vetor e *attR* no produto intermediário (Fig. 4.4). A enzima utilizada nessa reação é formada por uma integrase do bacteriófago lambda (Int) e um fator de integração ao hospedeiro de *E. coli* (IHF) (BPClonaseTM enzyme mix). A transferência do inserto para o vetor de destino é facilitada pela recombinação dos sítios *attL* presentes no clone de entrada com os sítios *attR* do vetor de destino (LR ClonaseTM enzyme mix), dando origem ao clone para expressão do gene. Essas reações são específicas e direcionais.

A partir da obtenção dos clones de entrada, é possível inseri-los em diversas plataformas. Neste trabalho, foi realizado a recombinação com o vetor pDESTTM17 (Fig. 4.3), que é apropriado para a expressão heteróloga da proteína de interesse em *E. coli*, fusionada a uma sequência de seis histidinas em sua extremidade N-terminal.

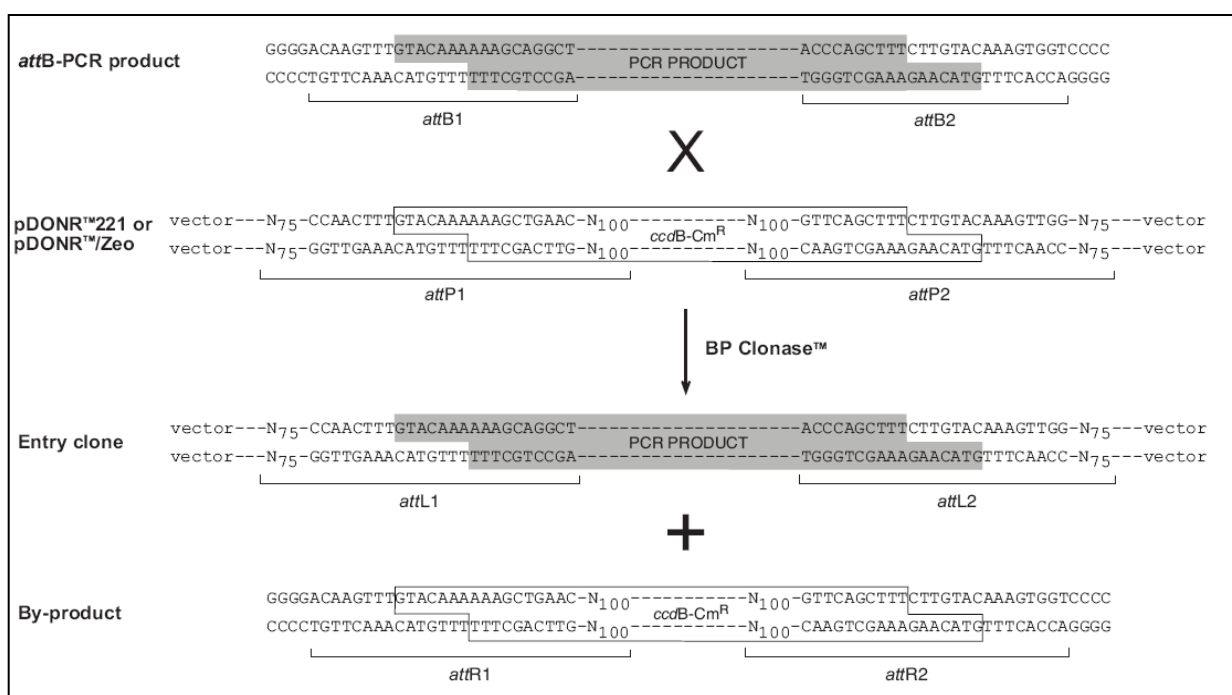


Figura 4.4 - Desenho esquemático da recombinação entre os sítios *attB* e *attP*.

4.19.1 Obtenção dos clones de entrada

A inserção dos produtos de PCR no vetor de entrada foi realizada conforme orientações do fabricante (*Gateway BP clonase 2 Enzyme mix*, Invitrogen). A reação consistiu em 150 ng do produto de PCR contendo o sítio attB, 150 ng do plasmídeo pDONR™221, 2 µl da mistura que contém a enzima BP clonase™II e completado até 8 µl com TE (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA, pH 8). As reações foram incubadas a 25°C por duas horas. Após esta etapa, foi adicionado 2 µg de proteinase K e a reação incubada por 10 minutos a 37°C. Ao concluir esse processo, foi seguido um fluxograma de trabalho (Figura 4.5) que se iniciou com a obtenção do vetor de entrada com o inserto, transformação das bactérias com o vetor junto ao inserto (itens 4.22 e 4.23), seleção de clones, verificação do inserto dos clones selecionados por PCR de colônia (item 4.23.1) ou pela técnica de palitagem (item 4.23.2), purificação do plasmídeo (item 4.24) e seqüenciamento do inserto (item 4.25).

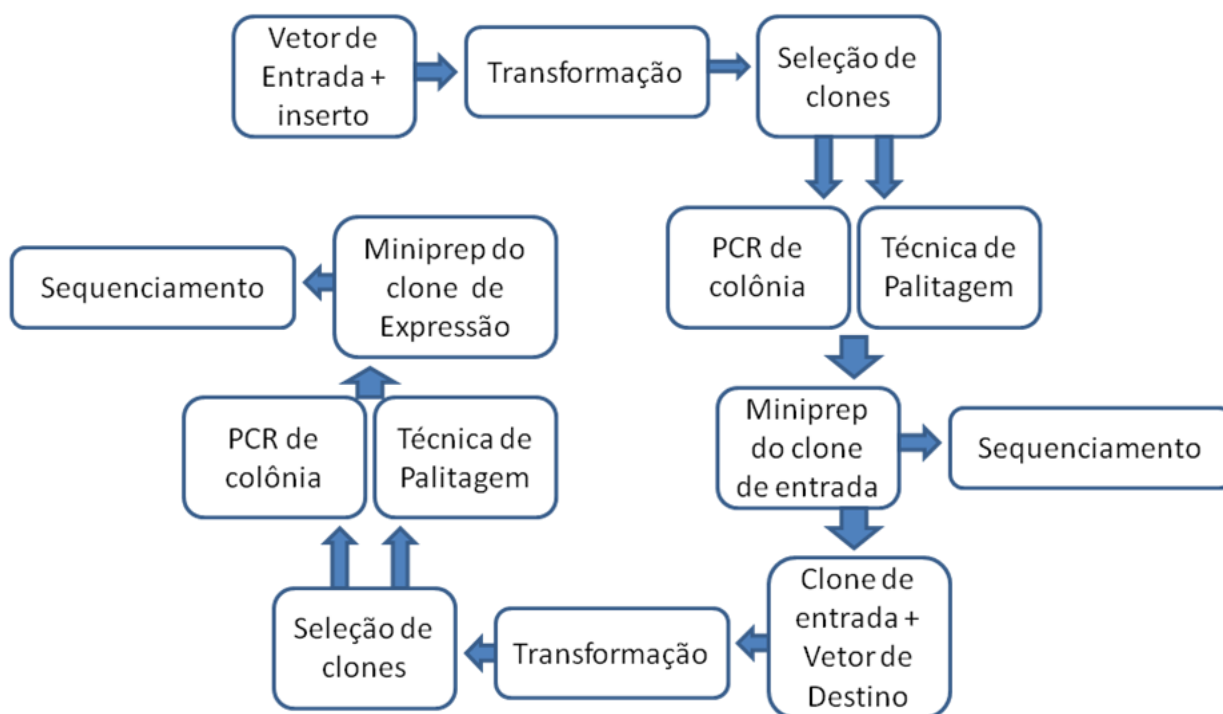


Figura 4.5 – Fluxograma de trabalho para a obtenção de clone de expressão pelo sistema Gateway.

4.19.2 Obtenção dos clones em vetor de expressão

A troca de insertos entre os plasmídeos de entrada e destino, denominada de reação LR, foi realizada conforme orientações do fabricante (Gateway LR clonase 2 Enzyme mix, Invitrogen). A reação foi preparada com 150 ng de pDONR contendo o gene de interesse, 150 ng do plasmídeo pDEST, 2 µl da mistura que contém a enzima LR clonaseTMII e completado até 8 µl com TE, por fim, incubada a 25°C por duas horas. Ao concluir esse processo, a obtenção do vetor de destino com o inserto seguiu o fluxograma de trabalho (Figura 5), ou seja, transformação das bactérias com o vetor junto ao inserto (item 4.22 e 4.23), seleção de clones, verificação do inserto dos clones selecionados por PCR de colônia (item 4.23.1) ou pela técnica de palitagem (item 4.23.2), purificação do plasmídeo (item 4.24) e seqüenciamento do inserto (item 4.25).

4.20 Preparação de células cálcio-competentes

O método com cloreto de cálcio (SAMBROOK e cols., 1989) foi utilizado para a preparação das células cálcio-competentes. A preparação se inicia com a seleção de uma colônia da cepa XL1-blue de *E. coli* que foi inoculada em 5 ml de meio LB contendo 12,5 µg / ml de tetraciclina. A cultura foi incubada por 16 horas a 37°C sob agitação constante. Um ml desta cultura foi transferido para 100 ml de meio LB (inóculo de 1:100) pré-aquecido a 37°C. As células foram incubadas a 37°C sob agitação constante até a fase de crescimento exponencial (densidade óptica₆₀₀ = 0,5). A cultura foi então centrifugada a 5000 x g por 10 minutos a 4°C e o pellet obtido foi suspenso em 50 ml de CaCl₂ 100 mM frio e mantido no gelo por 10 minutos. A suspensão foi submetida a uma nova centrifugação de 5.000 x g e as células foram suspensas em 2,0 ml de CaCl₂ 50 mM e, posteriormente, 20% de glicerol foi adicionado. Alíquotas foram feitas e armazenadas a -70°C.

4.21 Preparação de células eletro-competentes

A preparação se inicia com a seleção de uma colônia da cepa XL1-blue ou DH5-α de *E. coli* que foi inoculada em 5 ml de meio LB contendo antibiótico específico para cada cepa. A cultura foi incubada por 16 horas a 37°C sob agitação constante. Um ml desta cultura foi

transferido para 200 ml de meio LB enriquecido com 4 ml glicose 20% e 2ml de $MgCl_2$ (1 M) pré-aquecido a 37°C. As células foram incubadas a 37°C sob agitação constante até a fase de crescimento exponencial (densidade óptica₆₀₀ = 0,5). A cultura foi então centrifugada a 4500 x g por 20 minutos a 4°C e o sedimento obtido foi ressuscitado em 50 ml de glicerol 20 % resfriado. A suspensão foi submetida a uma nova centrifugação de 4500 x g por 20 minutos a 4°C e as células foram suspensas em 5 ml de glicerol 20 % gelado. As células foram centrifugadas a 4000 x g por 15 minutos a 4°C e 3 ml do sobrenadante foi retirado. As bactérias foram suspensas no sobrenadante restante, alíquotas foram feitas e armazenadas a -70°C.

4.22 Transformação das bactérias

4.22.1 Método de Choque-térmico

O volume de 1-5 µl das reações de ligação ou recombinação foi incubado com 50-200 µl de bactérias competentes por 30 minutos no gelo. Após este tempo, a mistura foi incubada a 42°C durante 30 segundos (choque térmico) e colocada novamente no gelo. Em seguida, meio LB foi adicionado ao tubo e as células foram cultivadas a 37°C por 1 hora antes da incubação em meio sólido. Volumes de 100 e 200 µl da cultura de bactérias transformadas foram espalhados em placas de Petri contendo meio de cultura seletivo (LB, Agar 15%, e antibiótico). As placas foram incubadas por 18 horas a 37°C. Clones contendo plasmídeos recombinantes foram selecionados de acordo com o resultado da técnica de palitagem (item 4.23.2) ou por PCR de colônia (item 4.23.1).

4.22.2 Eletroporação

As células eletro-competentes (50 a 200 µl) foram incubadas no gelo até o seu descongelamento. Após isso, cerca de 1 a 5 µl da ligação foi adicionado às células e a mistura foi transferida para o fundo da cubeta de eletroporação gelada. A cubeta foi encaixada na câmara de eletroporação do eletroporador (GenePulser) que foi programado para 25 µF, 200 Ω e 2,5 kV. Após a eletroporação, a cubeta foi retirada da câmara e cerca de 1ml de meio LB foi adicionado as células, essas foram transferidas para tubos de 1,5 mL e incubado a 37°C por 1 hora com agitação de 125 a 250 rpm. Volumes de 10 µl a 200 µl foram espalhadas em placas de Petri com meio de cultura seletivo (LB, Ágar 1,5% e antibióticos). As placas foram incubadas em estufa a 37°C durante 18 horas. Clones contendo plasmídeos recombinantes

foram selecionados de acordo com o resultado da técnica de palitagem (item 4.23.2) ou por PCR de colônia (item 4.23.1).

4.23 Seleção dos clones recombinantes

4.23.1 PCR de colônia

As colônias foram coletadas e suspensas em 50 µl de água ultra pura, em tubo de 1,5 ml. Da suspensão, cerca de 1 µl foi transferido para tubos de 0,5 ml com a mistura: Tampão de PCR 1x (Invitrogen); 25 mM MgCl₂; 1,25 mM dNTPs; 1U Taq polimerase (Invitrogen); 2 pmol iniciador *forward*, 2 pmol iniciador *reverse* num volume de 10 µl de reação. Os oligonucleotídeos estão relacionados na tabela 9.1 (ANEXO 1).

As reações foram incubadas no termociclador (Termociclador Biocycler MyGeneTm – Series Peltier Thermal Cycler, Perkin-Elmer 9700 ou MWG de Biotech) com o seguinte programa: 94°C por 2 minutos; 30 ciclos de 94°C por 15 segundos; temperatura e tempo de anelamento específico para cada iniciador (tabela 9.1 – ANEXO 1) e 72 °C por 40 segundos; 72 °C por 3 minutos.

Ao término da reação, as amostras foram submetidas a eletroforese em gel de agarose (concentração variou de acordo com o tamanho dos produtos da PCR) e visualizadas em trans-iluminador de UVP (Biorad).

4.23.2 Técnica de palitagem (tooth-pick)

As colônias foram coletadas com o auxílio de palitos de dente estéreis e transferidas para o fundo de tubos de 1,5 mL numerados e em seguida para a superfície do meio LB solidificado em placa de petri (placa-mãe) que possuía um mapa numérico correspondente ao número dos tubos. Esse procedimento teve como objetivo a obtenção de uma réplica das colônias que foram analisadas. A cada um dos tubos foram acrescentados 10 µl do tampão de lise (5 µl NaOH 10 M, 50 µl Glicerol, 10 µl EDTA 15 M, 50 µl SDS 10 % e 885 µl água ultra pura e azul de bromofenol). Os tubos foram incubados em banho-maria a 65 °C por 10 min. As amostras foram analisadas por eletroforese em gel de agarose a 1 %, usando o plasmídeo original como controle. Ao fim da eletroforese, o gel foi corado com brometo de etídeo (0,5

µg / ml) por aproximadamente 20 minutos e lavado com água ultrapura e analisado em luz ultravioleta. O gel foi fotografado no sistema de foto-documentação UVP (Biorad).

4.24 Mini-Preparação dos plasmídeos com insertos (miniprep)

As colônias selecionadas foram adicionadas em 5 ml de meio LB contendo o antibiótico apropriado e cultivadas por 18 h a 37°C sob constante agitação. As células obtidas foram centrifugadas a 12.000 x g por 1 minuto e o sedimento obtido foi utilizado para a extração dos plasmídeos através do sistema “QIAprep spin miniprep” (QIAGEN) conforme orientações do fabricante. Após a obtenção dos plasmídeos, fez-se a mensuração da concentração por espectrofotometria.

4.25 Sequenciamento dos insertos clonados

As sequências dos insertos contidos nos plasmídeos foram obtidas com a utilização de 200 ng de DNA e os oligonucleotídeos iniciadores T3 (AATTAACCCTCACTAAAGGG) e T7 (GTAATACGACTCACTATAGGGC) usando o protocolo para *BigDye™ Terminator Ready Reaction Mix* (SANGER, NICKLEN e COULSON, 1977). As reações foram aplicadas no seqüenciador automático 3.100 *Genetic Analyzer* da *Applied Biosystems* de seqüência capilar.

4.26 Expressão dos polipeptídeos recombinantes

Os plasmídeos de expressão contendo os insertos referentes ao gene *dzip1* e *pum2* foram utilizados para transformar células da linhagem de *E.coli* BL21(DE3) pLys. A expressão dos peptídeos foi feita primeiramente em pequena escala com o objetivo de otimizar as condições de expressão e verificar a solubilidade das mesmas. Dessa maneira, células foram cultivadas até alcançarem a fase logarítmica de crescimento (densidade óptica₆₀₀ = 0,6-0,8). Sendo assim, a expressão da peptídeo foi induzida adicionando diferentes concentrações de IPTG e as células mantidas em diferentes temperaturas (20 e 30°C). Uma

vez estabelecidas às condições mais adequadas, a expressão foi realizada em larga escala. As células foram cultivadas em 500 mL de meio LB com cloranfenicol (25 mg / l) e ampicilina (100 mg / l) e ao atingirem a fase logarítmica de crescimento foi adicionado 0,1 mM de IPTG para induzir a expressão do peptídeo. A cultura foi mantida a 37°C sob agitação por duas horas. Uma alíquota de 1 mL foi retirada desta cultura antes da adição de IPTG e mantida nas mesmas condições de incubação foi denominada de amostra não induzida e serviu como controle negativo. Após este período, a cultura foi centrifugada a 5000 x g por 15 minutos a 10°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuscitado em tampão de sonicação (Tris-HCl 50 mM, pH 8) e sonicado por 4 ciclos de 15 segundos com intervalos de 1 minuto em potência 8 (Ultrasonic homogeizer, Cole-Parmer) no gelo. Após esse procedimento, foi retirada uma alíquota de 50 µl, denominada de amostra total. O restante foi centrifugado a 10.000 x g por 15 minutos a 4°C para obtenção das frações denominadas solúveis e insolúveis. A fração solúvel foi constituída pelo sobrenadante obtido após a centrifugação, o qual foi armazenado a -20°C. O precipitado foi ressuscitado em tampão de solubilização (uréia 8 M, imidazol 10 mM, NaCl 300 mM) e em seguida foi sonicado e centrifugado, conforme descrito acima. O sobrenadante desta centrifugação foi denominado fração insolúvel, e armazenado a - 20°C. Alíquotas das frações (solúvel, insolúvel e controle não-induzido) foram submetidas à eletroforese de proteína (SDS-PAGE) (item 4.16).

4.27 Purificação dos polipeptídeos recombinantes por cromatografia de afinidade

A clonagem dos genes de interesse no vetor de expressão pDESTTM17 possibilitou a expressão do polipeptídeo fusionado a resíduos de seis histidinas na porção amino-terminal. Dessa forma, os polipeptídeos recombinantes foram purificados por cromatografia de afinidade em coluna de níquel (Ni-NTA) (QIAexpress System, Qiagen). O Ni-NTA interage com os íons (Zn^{2+} , Ni^{2+} e Mn^{2+}) e estes com a cauda de histidina. A eluição dos polipeptídeos foi obtida pela adição de imidazol ou pela acidificação do pH.

O imidazol é um análogo estrutural a histidina que se liga a resina de Ni-NTA deslocando o peptídeo recombinante. O processo de purificação baseado no imidazol inicia-se com a lavagem das colunas e equilíbrio das mesmas com a solução de lise (NaH_2PO_4 50 mM, NaCl 300 mM e imidazol 10 mM). Depois, os extratos protéicos são adicionados à coluna permitindo a fixação dos polipeptídeos contendo cauda de histidina à resina e a solução que não se liga é coletada e armazenada, sendo denominada de fluido descartado (FD). Para

retirar as proteínas contaminantes da resina, foram feitas cinco lavagens com 10 ml de solução de lavagem (50 mM NaH_2PO_4 , 300 mM NaCl e 20 mM imidazol), sendo que o material proveniente das lavagens foi também armazenado para verificação da qualidade do processo de purificação. Seguindo o processo de purificação foram realizadas cinco eluições utilizando 0,5 ml de solução de eluição (NaH_2PO_4 50 mM, NaCl 300 mM e imidazol 250 mM) e armazenadas a -20°C .

A purificação utilizando o decréscimo de pH inicia-se também com a lavagem das colunas e equilíbrio das mesmas com a solução de lise (NaH_2PO_4 100 mM, Tris-HCl 10 mM, uréia 8 M, pH 8). Depois os extratos protéicos foram adicionados à coluna permitindo a fixação dos polipeptídeos, sendo o restante coletado e armazenado, sendo denominado de fluido descartado (FD). As lavagens foram feitas com 10 ml de solução de lavagem (NaH_2PO_4 100 mM, Tris-HCl 10 mM e uréia 8 M pH 6,3), sendo que os materiais provenientes das lavagens foram armazenados para verificação da qualidade do processo de purificação. Para as eluições foi utilizado a solução de eluição (NaH_2PO_4 100 mM, Tris-HCl 10 mM e uréia 8 M) sendo que, a cada duas eluições com 0,5 ml da solução citada, o pH foi sendo reduzido, na seguinte ordem: 5,9; 4,5; 4,0 e 3,5. Os eluados foram armazenados a -20°C .

4.28 Purificação dos polipeptídeos recombinantes por eletroeluição

A qualidade da purificação é analisada por SDS-PAGE (item 4.16) com a visualização das amostras FD, lavados e eluados. Para obter polipeptídeos recombinantes com maior grau de pureza, as frações eluídas foram aplicadas em gel SDS-PAGE preparativo. A concentração de acrilamida utilizada foi de 15%, utilizando 15 mA de corrente elétrica por gel. Após a corrida, o gel foi corado com KCl 100 mM gelado, e a banda referente ao polipeptídeo de interesse cortada do gel. Para retirar o polipeptídeo desejado da matriz do gel de acrilamida foi utilizado o processo de eletroeluição. O material cortado foi colocado em uma membrana de diálise (Sigma-Aldrich) e adicionou-se 1 ml de tampão de SDS-PAGE (Tris 25 mM, Glicina 192 mM, SDS 0,1%). As extremidades da membrana foram seladas, incubadas em cuba eletroforética contendo tampão SDS-PAGE e submetidas a uma corrente de 50 mA por duas horas. Após este período, o líquido presente no interior da membrana foi coletado e uma fração foi submetida à eletroforese (item 4.16). Com as imagens dos géis, foi determinada a concentração do polipeptídeo com o auxílio do programa *Lab Works* 3.0.2 (UVP Inc). Este *software* permite obtenção das intensidades de sinal das bandas das imagens permitindo,

dessa forma, a determinação da concentração relativa de cada polipeptídeo, através da comparação com o marcador de massa molecular, do qual possui concentração conhecida (BenchMark Ladder™, Invitrogen).

4.29 Obtenção de anti soro policlonal contra o polipeptídeo recombinante DZIP1

Os camundongos utilizados foram provenientes do biotério do ICC (Instituto Carlos Chagas), e foram manipulados segundo os princípios do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA, 1999). Todos os animais receberam cuidados profissionais em concordância com os “Princípios de cuidados com animais de laboratório” formulado pela Sociedade Nacional de Pesquisa Médica e o Guia de Cuidados com Animais de Laboratório, preparado pela Academia Nacional de Ciências e publicado pelo Instituto Nacional de Saúde Americano (NIH Publicação N° 80-23, revisão 1985).

O polipeptídeo recombinante DZIP1 purificado foi inoculado em dois camundongos da linhagem BALBc (45 dias) para produção de anticorpos anti-DZIP1 humano. Quatro aplicações foram realizadas em intervalos de 7 dias (o protocolo de imunização está retratado na tabela 4.3) e a obtenção do soro após sete dias da última inoculação. Os animais foram sedados utilizando-se 0,2 mg de cetamina (Syntec) e 2 mg de xilasina (Vetbrands) e o sangue foi coletado por punção cardíaca. Para a obtenção do soro, o sangue foi incubado por 5 minutos a 37°C e em seguida colocado no gelo por 30 minutos e por fim centrifugado por 10 minutos a 1.500 x g. Alíquotas do soro foram feitas e armazenadas a -20° C.

O segundo soro foi obtido de coelhos por inoculação do polipeptídeo recombinante de DZIP1 purificado por cromatografia de afinidade em coluna de níquel e gel SDS-PAGE preparativo. As imunizações em coelhos foram feitas pelo serviço de produção de anticorpos do laboratório de imunologia do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

<i>Inoculação</i>	<i>Emulsificante</i>	<i>[] pept. rec. DZIP1*</i>	<i>Via</i>
1°	Adjuvante completo de Freund (Sigma)	20µg	intra-peritonial
2°	Alu-Gel S (Serva)	20µg	sub-cutânea
3°	Alu-Gel S (Serva)	20µg	intra-peritonial
4°	PBS 1x	20µg	intra-venosa

Tabela 4.3 - Protocolo de imunização dos camundongos.

* Polipeptídeo recombinante de DZIP1

4.30 Purificação do anticorpo

Os polipeptídeos recombinantes utilizados para a imunização dos coelhos foram desnaturados e submetidos a eletroforese de proteína. Os polipeptídeos foram eletrotransferidos para membrana de nitrocelulose utilizando 60 V por duas horas a 4°C. Após a transferência a membrana foi incubada em solução de *Ponceau S* (Ponceau S 0,5%, ácido acético 0,1%) e os polipeptídeos foram coradas. A região da membrana com o polipeptídeo recombinante foi incisada e incubada em solução de bloqueio por uma hora sob agitação. Em seguida, a região da membrana cortada foi incubada com soro do coelho a 4°C durante 18 horas sob agitação. Junto ao soro foi adicionado extrato protéico de *E.coli* BL21(DE3) para bloquear a interação do soro com possíveis resíduos bacterianos na membrana. Após o anticorpo específico ao polipeptídeo recombinante ligar-se a membrana, a mesma foi lavada com PBS / *tween* 0,1% e o anticorpo foi eluído com glicina 0,2 M pH 3,0 e imediatamente neutralizado com Tris 1 M pH 9,5. Cerca de 10 µg de BSA purificado foi adicionado para cada ml da solução com o anticorpo. O pH da solução final com o anticorpo permaneceu entre 7 e 7,5. O anticorpo foi alíquotado e armazenado a -20°C.

5. RESULTADOS

5.1 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DOS TRANSCRITOS DAS RBPS EM CTMs

As seqüências dos transcritos dos genes *dazl* (NM_004081), *dazl* (NM_001351), *bol* (NM_197970), *pum1* (NM_001020658.1), *pum2* (NM_015317), *dzip1* (NM_014934), *nos1* (NM_199461) e *stau1* (NM_004602) foram obtidas no NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). A partir dessas seqüências foram desenhados os iniciadores para cada gene.

Para a extração de RNA total foram utilizadas no mínimo 3 amostras de CTMs derivadas das três fontes. A partir do RNA total foram feitos os cDNAs.

A análise da expressão dos transcritos foi realizada por RT-PCR nas CTMs de 3 doadores de MO e SCU e 4 doadores de TA (Fig.5.1). A expressão dos transcritos de *daz*, *dazl* e *bou* (dados não apresentados) não foi detectada em nenhuma amostra. No entanto, a expressão dos transcritos de *pum1*, *pum2*, *dzip1*, *nos1* e *stau1* foi detectada nas CTMs derivadas de MO, SCU e TA humanos. A expressão de *pum1*, *pum2*, *dzip1* e *stau1* foi detectada nas três fontes de CTMs e nas células dos diferentes doadores, enquanto que a expressão de *nos1* se mostrou variável em relação aos doadores (Fig.5.1). Para a continuação do trabalho foi resolvido focar a pesquisa em dois genes dentre os que foram expressos nas CTMs derivadas de todas as fontes e doadores. Dessa forma, restaram *dzip1*, *stau1*, *pum1* e *pum2*. *Stau1* é um alvo muito estudado e há muitos grupos de pesquisadores empenhados em seu estudo, sendo assim *Dzip1* foi escolhido, pois há poucos dados publicados. *Pum1* é expresso em diversos tecidos e não há dados que indique a relação direta desse gene com a autorrenovação em CTs. *Pum2*, no entanto, foi descrito como possível “stemness factor” (WICKENS e cols., 2002, SPASSOV & JURECIC, 2003), dessa forma foi escolhido para o restante do estudo. Como o presente trabalho teve como objetivo o estudo de DZIP1 e PUM2 em nível de transcrito e proteína nas CTMs, foi necessária a produção de anticorpos específicos para os mesmos.

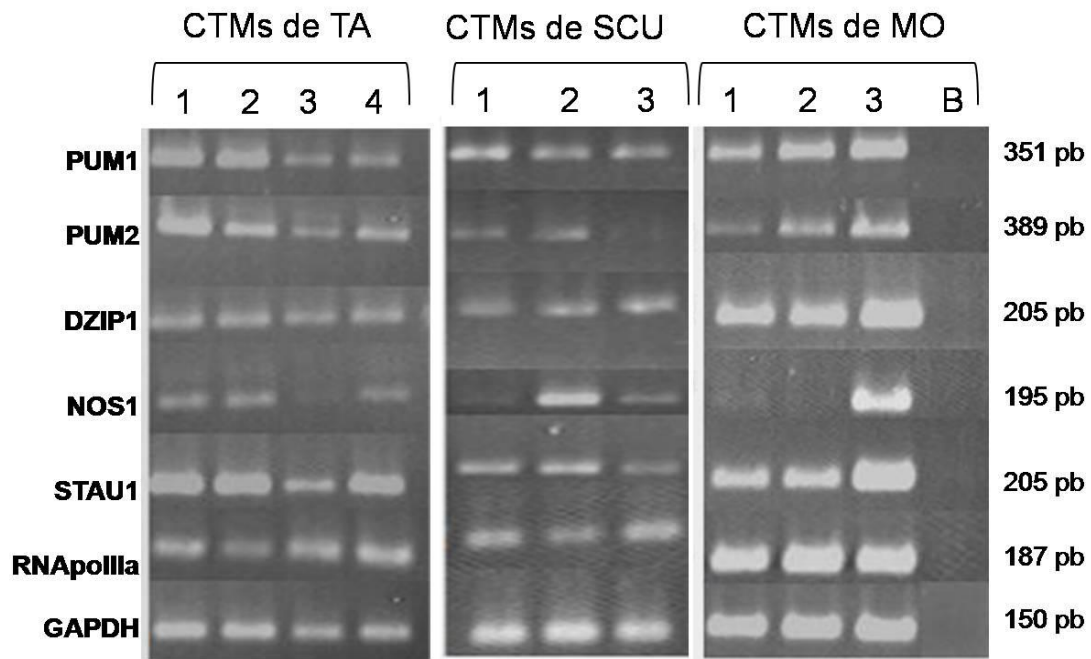


Figura 5.1 - Expressão dos transcritos de *pum1*, *pum2*, *dzip1*, *nos1* e *stau1* nas CTMs derivadas de TA, SCU e MO por RT-PCR. Para cada reação 20 ng de cDNA foi usado. A expressão de *rnapol iia* e *gapdh* foi utilizada como controle. 1-4 Numeração relativa aos diferentes doadores para cada fonte; Fontes de CTMs:; Tecido Adiposo (TA); Sangue de Cordão Umbilical (SCU) e medula óssea (MO); B – Branco (sem cDNA).

5.2 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE DZIP1 NAS CTMs

5.2.1 Produção de Soros Policlonais Anti-DZIP1

5.2.1.1 Clonagem E Expressão Do Peptídeo Recombinante *Dzip1*

A sequência do gene de *dzip1* humano foi analisada utilizando o *software* DNASTAR. A ferramenta *Protean* foi utilizada para determinar a região mais antigênica e a ferramenta *Clustalw* foi utilizada para selecionar a sequência diferente das outras isoformas (*dzip2* e *dzip3*), pois o objetivo final é a produção de anticorpo específico para DZIP1. Pouco se sabe sobre as isoformas *dzip2* e *dzip3*. Dessa forma, *dzip1*, que já foi detectado em outros tecidos, foi o objetivo desse trabalho. Após determinar a região que contemplasse essas duas características (região antigênica e diferente das outras isoformas), iniciadores foram desenhados com uma sequência extra (*attB*) para a clonagem em sistema *Gateway* (Invitrogen) para a expressão do peptídeo recombinante fusionado com uma cauda contendo seis histidinas.

A expressão e purificação do peptídeo recombinante de DZIP1 foram realizadas como descrito em materiais e métodos e as etapas estão demonstradas na figura 5.2. Em gel SDS-PAGE 15% foram analisados os extratos de proteínas de bactérias transformadas com o plasmídeo contendo a sequência selecionada de *dzip1* e induzidas com IPTG (Isopropil 1 tio-β-D galactosídeo), além das frações separadas após a sonicação e purificação por coluna de níquel-agarose (NI-NTA -QIAGEN). Além disso, o peptídeo recombinante foi detectado por ensaio de western blot com anticorpo específico para a cauda de histidina (Fig. 5.2). A massa molecular do peptídeo recombinante de DZIP1 foi de aproximadamente 30 kDa (peptídeo recombinante de DZIP1sem stop códon ~27 kDa + 0,6 kDa 6xHis).

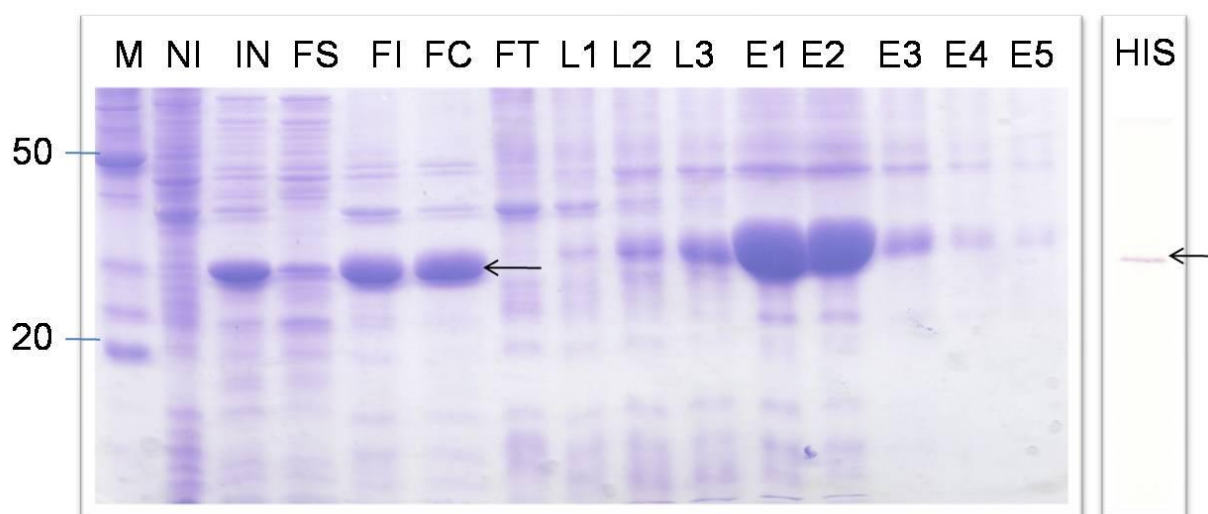


Figura 5.2 - Expressão e purificação do peptídeo recombinante de DZIP1: Gel SDS-PAGE 15% corado com Coomassie blue. M- Marcador de massa molecular em kDa (BenchMark™ Protein Ladder), NI – Extratos totais das bactérias transformadas (BL-21) e não induzidas, IN - Extratos totais das bactérias transformadas e induzidas, FS – Extrato da fração solúvel, FI- Extrato da fração insolúvel; FC- Sobrenadante da purificação dos corpos de inclusão, FT- *Flow through*, L – Lavado 1, 2 e 3, E – Eluições 1, 2, 3, 4 e 5; HIS - Detecção do peptídeo recombinante de DZIP1 com anti-His (1:1000) por *western blot*.

A determinação semi-quantitativa do peptídeo recombinante DZIP1 presente na primeira eluição foi realizada por densitometria utilizando uma curva crescente de albumina sérica bovina (BSA) como referência. Um e cinco microlitros da primeira eluição da purificação do peptídeo recombinante de DZIP1 foram aplicados em gel SDS-PAGE 15% e corados com Coomassie blue (Fig. 5.3). Cada microlitro da primeira eluição da purificação do peptídeo contém, aproximadamente, 500 ng do peptídeo recombinante DZIP1.

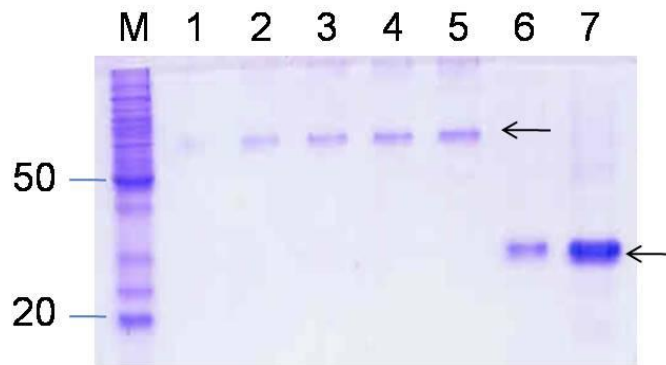


Figura 5.3 – Determinação da concentração do peptídeo recombinante de DZIP em gel de SDS-PAGE 15% corado com *Coomassie blue*: M- Marcador de peso molecular em kDa (*BenchMark™ Protein Ladder*), 1- 100 ng, 2- 200 ng, 3- 300 ng, 4- 400 ng, 5- 500 ng de BSA, 6- 1 µl da 1º Eluição de DZIP e 7- 5 µl da 1º Eluição de DZIP.

5.2.1.2 Produção Dos Soros Anti-DZIP1

Após a purificação e quantificação do peptídeo recombinante de DZIP1, inoculações em camundongos BALB-c foram realizadas conforme materiais e métodos. A especificidade do anti-soro para o peptídeo recombinante de DZIP1 e a proteína nativa em CTMs, assim como o soro pré-imune foram avaliadas por ensaios de *western blot* e Imunofluorescência.

Os soros anti-DZIP1 dos dois camundongos foram testados por ensaio de *western blot* em extrato total de proteína das bactérias transformadas e induzidas (Fig.5.4). Diferentes diluições dos soros foram analisadas, mostrando que o soro do camundongo 2 apresentou maior especificidade e maior detecção para o peptídeo recombinante que o soro do camundongo 1. Dessa forma, o soro do camundongo 2 foi avaliado nos experimentos de *western blot* e imunolocalização de DZIP1 em CTMs.

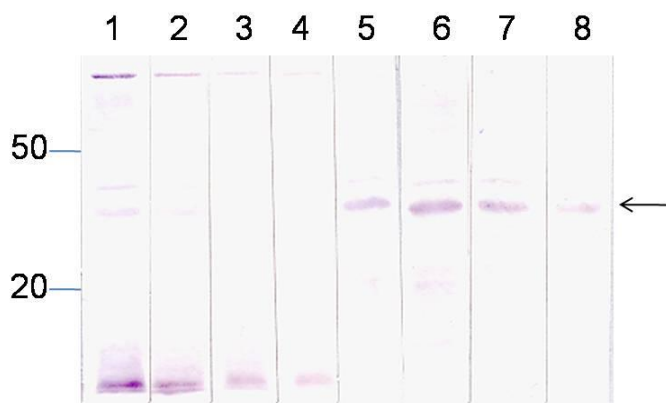


Figura 5.4 - Detecção do peptídeo recombinante de DZIP1 por *western blot* (fosfatase alcalina) de SDS-PAGE 15%: 1 a 8 extrato de bactérias transformadas e induzidas, nas colunas 1 a 4 foram utilizados soro do camundongo (1) e 5 á 8 soro do camundongo (2). As diluições dos soros para as colunas 1 e 5 (1:200), 2 e 6 (1:500), 3 e 7 (1:1000), 4 e 8 (1:2000). Marcador de massa molecular em kDa (*BenchMark™ Protein Ladder*).

5.2.1.3 Detecção de DZIP1 nas CTMs

A análise da expressão da proteína DZIP1 nas CTMs foi realizada por meio de western blot. Extratos totais de proteína de CTMs derivadas da MO, TA e SCU foram aplicadas em gel de SDS-PAGE 8%, e após a corrida de eletroforese, foi realizada a transferência para membrana de nitrocelulose como descrito em materiais e métodos. O resultado obtido com o soro anti-DZIP1 (produzido em camundongo) mostrou claramente a presença de uma proteína específica com tamanho aproximado de 96 kDa nos extratos protéicos de CTMs derivadas de MO, TA e SCU (Fig.5.5).



Figura 5.5 – Detecção da proteína DZIP1 em CTMs por *western blot* (quimioluminescência) de SDS-PAGE 8%: DZIP (107kDa) foi detectado em extrato de CTMs derivadas de medula óssea (MO), tecido adiposo (TA) e sangue de cordão umbilical (SCU) com anti-DZIP1(1:200) e não foi reconhecida pelo soro pré-imune (1:200). M – Marcador de massa molecular em kDa (SDS6H2 - Sigma-Aldrich).

Ensaio de imunofluorescência utilizando soro anti-DZIP1 e soro pré-imune derivados do camundongo (2) foram realizados em CTMs. Os resultados com o soro anti-DZIP1 apresentaram marcação nuclear, porém os resultados com o pré-imune não foram aceitáveis, pois apresentou marcação semelhante ao soro anti-DZIP1. Vários protocolos de imunofluorescência, diluições dos soros e tempos de exposição foram testados, no entanto os resultados com o pré-imune se mantiveram insatisfatórios. Como o volume do soro obtido do camundongo foi insuficiente para realizar a purificação do anticorpo, uma nova imunização com o peptídeo recombinante DZIP1 foi feita em coelhos para a obtenção de soro em maior volume. Para isso, a expressão e purificação em larga escala foram realizadas como descrito

anteriormente, no entanto, uma nova etapa foi adicionada ao processo de purificação que foi a separação do peptídeo recombinante de DZIP1 purificado por gel preparativo.

O soro anti-DZIP1 e pré-imune do coelho imunizado foram testados por *western blot* em extratos de CTMs derivadas da MO, TA e SCU (Fig. 5.6). Uma única proteína (tamanho aproximado de 96 kDa) foi detectada com o soro anti-DZIP1 e ausente na reação com soro pré-imune.

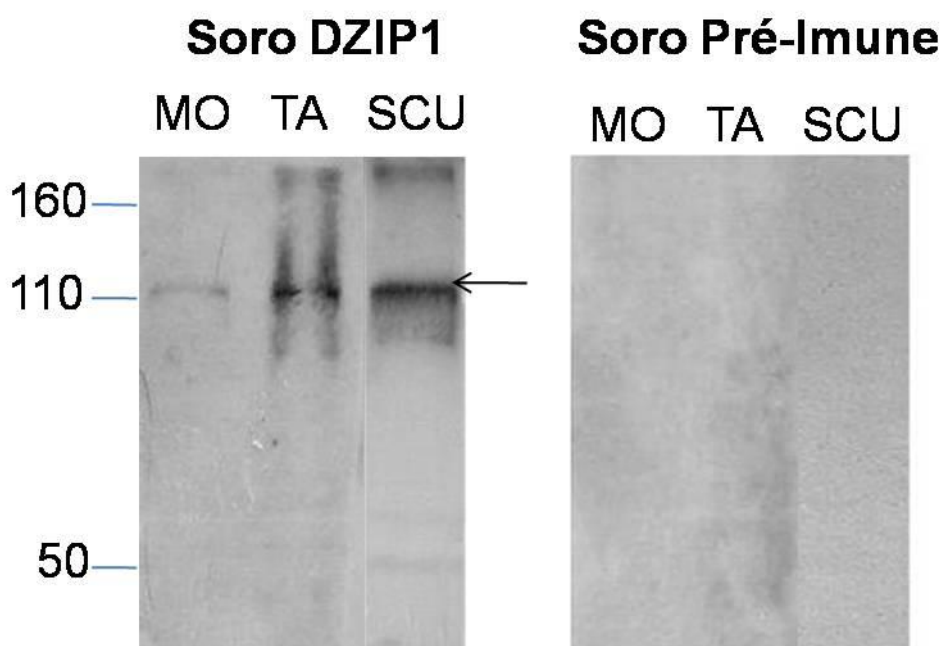


Figura 5.6 - Detecção de DZIP1 em extrato protéico de CTMs derivadas de medula óssea (MO), tecido adiposo (TA) e sangue de cordão umbilical (SCU) por *western blot* (quimioluminescência) com o anticorpo anti-DZIP1 (1:150) e pré-imune produzido em coelho (1:150). Marcador de massa molecular em kDa (SDS6H2 - Sigma-Aldrich).

Ensaio de imunofluorescência com o soro anti-DZIP1 produzido em coelho foram realizados. O resultado com o soro anti-DZIP1 apresentou, novamente, marcação nuclear. No entanto, a marcação com o soro pré-imune se manteve insatisfatório. Vários testes foram realizados a fim de reduzir o sinal inespecífico do pré-imune, a etapa de bloqueio foi experimentada com diferentes elementos (BSA1%, BSA5%, soro de cabra, soro bovino fetal, soro de cavalo, glicina 0,25M e cloreto de amônia 50 mM) e incubada por diferentes tempos. As diluições dos soros anti-DZIP1 e pré-imune foram testados (1:10, 1:20, 1:50, 1:100, 1:150, 1:200, 1:500 e 1:1000), assim como diferentes anticorpos secundários e tempos de exposição para captura das imagens, no entanto, os resultados não foram plausíveis. A partir desses dados, optou-se pela purificação do anticorpo. Porém, quando o anticorpo purificado (1:10,

1:20 e 1:50) foi testado em ensaio de *western blot* para o peptídeo recombinante, houve ausência de sinal. Dessa forma, o anticorpo anti-DZIP1 humano comercial (Santa Cruz *Biotechnology* - USA) foi adquirido para a realização dos ensaios restantes de *western blot*, imunolocalização e marcação intracelular de DZIP1 em CTMs.

5.2.2 Detecção e imunofluorescência de DZIP1 em CTMs derivadas de TA

Devido à inviabilidade dinâmica, espacial e financeira em realizar o restante do estudo com as CTMs das três fontes disponíveis (MO, TA e SCU) em nosso laboratório, foi escolhido apenas uma fonte. A eficiência de isolamento das CTMs derivadas de SCU é de apenas 30% (REBELATTO e cols., 2008), dessa forma, foi descartada a possibilidade de estudo com essa fonte de CTMs. No entanto, o critério utilizado para a escolha entre as fontes MO e TA foi a disponibilidade de doadores para o tecido. Como foi possível a obtenção de um maior número de doadores de TA, esta fonte de CTMs foi escolhida para este estudo.

A análise da expressão da proteína DZIP1 nas CTMs de TA foi realizada por meio de *western blot* com o anticorpo anti-DZIP1 humano. Extratos totais de proteína de CTMs derivadas de TA foram aplicados em gel de SDS-PAGE 8% e em seguida foi realizada a transferência para membrana de nitrocelulose como descrito em materiais e métodos. O resultado obtido para DZIP1 apresenta uma única proteína com tamanho aproximado de 96 kDa (Fig. 5.7). A detecção de β -actina foi realizado na mesma membrana e utilizada como controle da reação com a identificação de uma única proteína com a massa molecular aproximado de 43 kDa (Fig. 5.7).

Além da detecção de DZIP1 nas CTMs por *western blot*, a localização dessa proteína foi realizada por imunofluorescência com o anticorpo anti-DZIP1 na diluição de 1:20. As imagens mostram claramente marcação nuclear das CTMs derivadas de TA (Fig. 5.8).

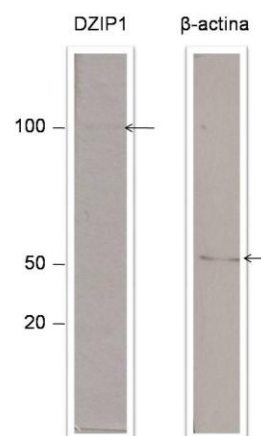


Fig. 5.7 – Detecção de DZIP1 em extrato protéico de CTMs derivadas de TA por *Western blot* com o anticorpo anti-DZIP1 (1:200). A detecção de β -actina (1:200) foi utilizada como controle. Marcador de massa molecular em kDa (BenchMark™ *Protein Ladder*)

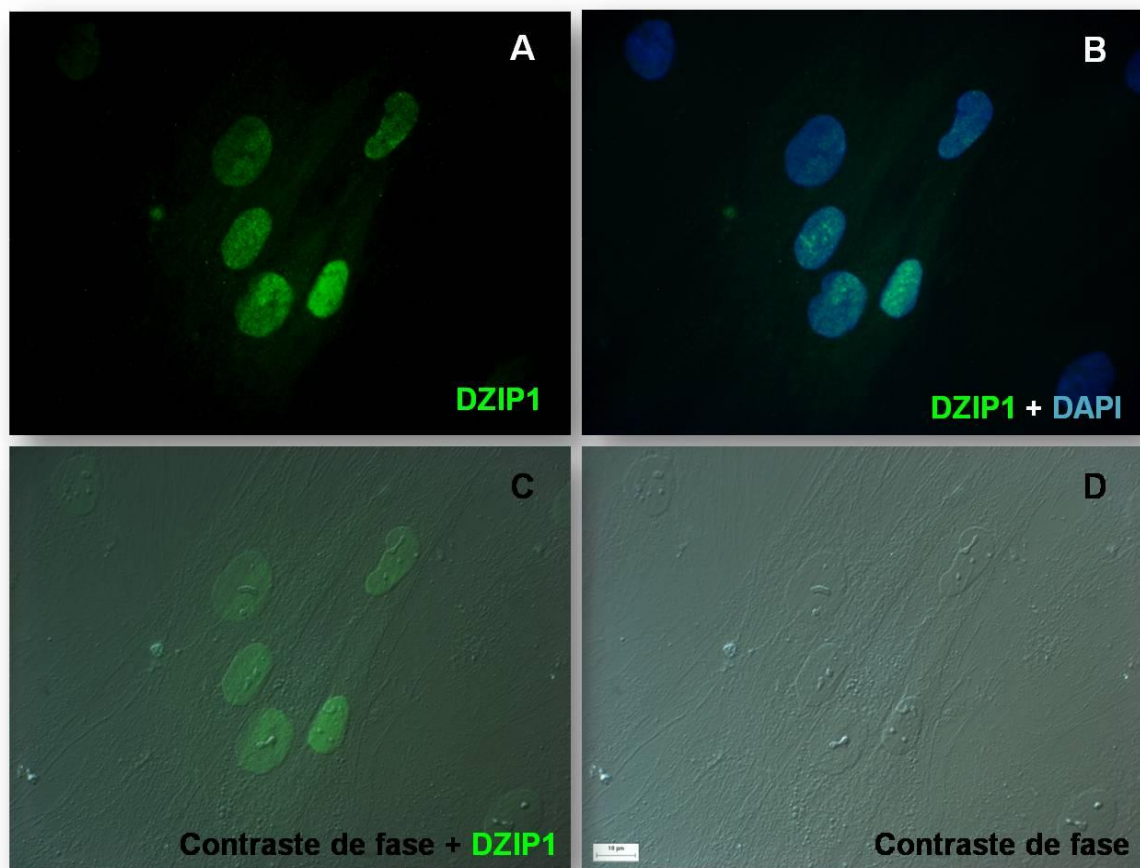


Figura 5.8 – Imunolocalização de DZIP1 nas CTMs de TA: A) DZIP1 (Alexa 488); B) Sobreposição de DZIP1 com DAPI (Marcador de núcleo); C) Sobreposição de DZIP1 com contraste de fase; e D) Contraste de fase. A barra representa 10 µm.

5.2.3 Quantificação das CTMs que expressam DZIP1

As CTMs têm sido descritas como uma população heterogênea (DELORME e cols, 2006). Para determinar a porcentagem de CTMs que expressam DZIP1, a marcação intracelular dessa proteína foi realizada em CTMs derivadas de TA utilizando o anticorpo anti-DZIP1. Em seguida, anticorpos secundários (anti-coelho) conjugados com fluoróforos FITC (*fluorescein isothiocyanate*) foram incubados com as células como descrito em materiais e métodos. Esse fluoróforo emite um sinal que é detectado pelo citômetro de fluxo FACS Calibur (Becton Dickinson) que o traduz em informações numéricas. O FITC é excitado por um *laser* e emite fluorescência com comprimentos de onda de aproximadamente 495 nm/521 nm que são detectadas pelo aparelho. Na tabela 5.1 estão mostradas as porcentagens de células que expressam DZIP1 e todos os dados utilizados para o ajuste do aparelho. FL1 e FL2 são os canais pelos quais os sinais foram detectados, FL1 é o canal que detecta FITC e FL2 é o canal que detecta outros comprimentos de onda (fluoróforo PE -

ficoeritrina). Para ajustar e identificar o tamanho e granulosidade das células foram utilizadas células fixadas e sem marcação. O controle positivo para o canal FL1 foi ajustado com a marcação de CD90 (proteína de membrana presente na maioria das CTMs) conjugado com FITC e o canal FL2 foi ajustado com a marcação de CD105 (proteína de membrana presente na maioria das CTMs) conjugado com PE. Os anticorpos secundários foram certificados que são específicos através dos isotipos. A porcentagem de células detectadas no canal FL1 de todos os controles inclusive a porcentagem de CTMs derivadas de TA de dois doadores, AD4 e AD5, que expressam DZIP1 está na tabela 5.1. O gráfico 5.1 é a representação da distribuição das células com o isotipo, as quais foram utilizadas para determinar a *gate* (parâmetros delimitados) e das CTMs dos doadores AD4 e AD5, das quais 99,1 e 92,9% das células apresentaram a proteína DZIP1, respectivamente. Dessa forma, pode-se concluir que a maior parte da população de CTMs derivadas de TA expressa DZIP1.

Células	FL1+
Sem marcação	0
CD90 FITC	94,4
CD105 PE	0,58
isotipo rabbit	0,42
DZIP + AD4	99,1
DZIP + AD5	92,9

Tabela 5.1 - Porcentagem de CTMs de TA que expressam DZIP1. AD4 e AD5 – Identificação dos doadores de TA.

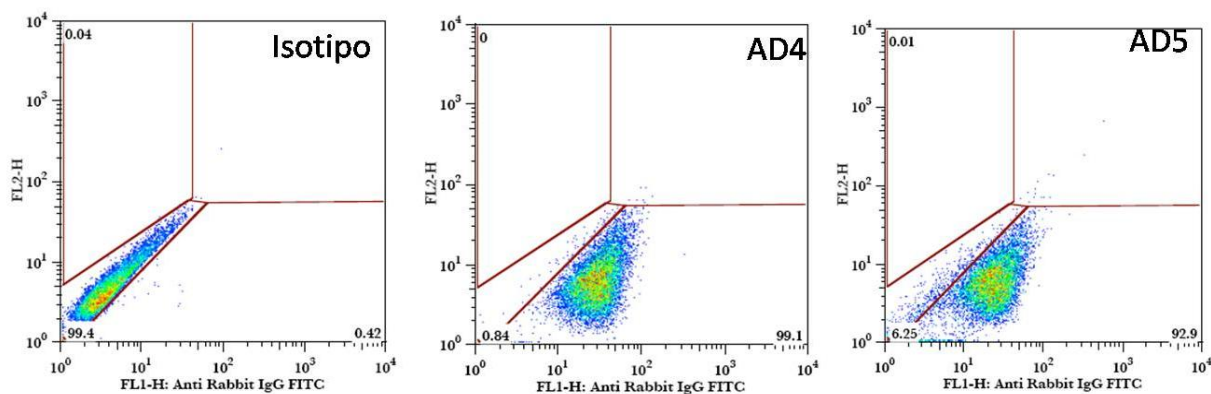


Gráfico 5.1 - Quantificação das CTMs derivadas de TA que expressam a proteína DZIP1 por marcação intracelular e análise por citometria de fluxo (FACS). Isotipo – utilizado para determinar a *gate*.

5.2.4 Análise da expressão de DZIP1 durante a adipogênese

A análise do perfil de expressão de DZIP1 foi realizada durante a diferenciação adipocítica das CTMs derivadas de TA. A adipogênese foi escolhida devido ao fato que as células diferenciadas em adipócitos desenvolvem vesículas lipídicas facilmente identificadas em microscopia ótica e há diferentes recursos para evidenciar e quantificar o número de células diferenciadas. O desenho do experimento compreende a diferenciação das CTMs utilizando meio de cultura comercial Poietics™ *Differentiation Basal Medium Adipogenic* e suplementado com hMSCs *Adipogenic SingleQuots* (CAMBREX) num período de 21 dias. E em paralelo, CTMs sob as mesmas condições foram mantidas com meio de cultura controle Poietics™ MSCGM (*Mesenchymal Stem Cell Growth Medium*). Antes de optar por esse meio comercial, um meio de indução adipogênica foi testado, esse meio continha: 1 µM/L dexametasona, 5 µg/ml insulina, 60 µmol/L indometacina em meio DMEM-F12 com 15% de SBF (modificado de MEIRELLES e cols., 2006). No entanto, poucas células se diferenciaram e dessa forma o meio Poietics™ foi selecionado nos ensaios para reduzir possíveis variáveis. Nos dias 0, 7, 14 e 21 foram realizadas a extração de RNA e extrato protéico das células induzidas com o meio adipogênico (IND) e células controle (C) (Fig. 5.9). Ao final do experimento, as células IND e CT foram coradas com Oil Red O para evidenciar as vesículas de lipídeos.

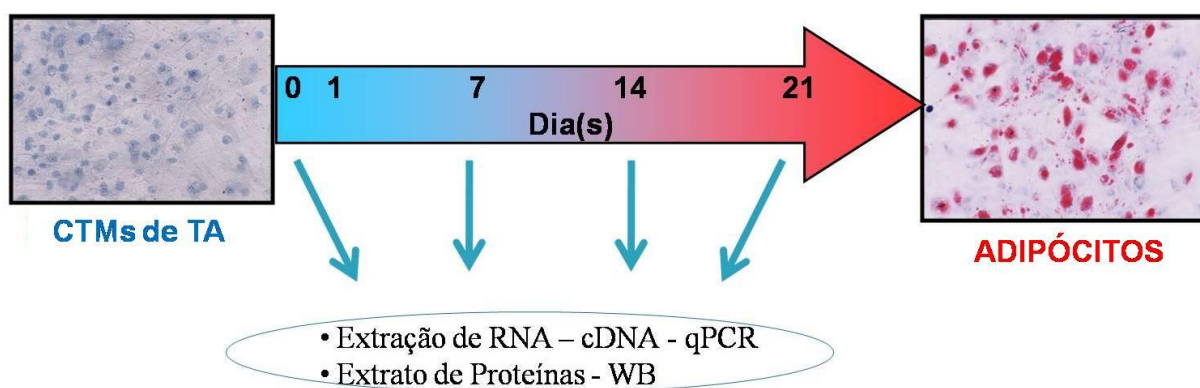


Figura 5.9 - Modelo esquemático dos experimentos relacionados a diferenciação das CTMs derivadas de TA de quatro doadores.

5.2.4.1 Adipogênese *in vitro*

A qualidade da diferenciação nas CTMs derivadas de TA dos doadores AD1, AD2, AD3 e AD4 foi avaliada no 21º dia comparando as CTMs controle e CTMs induzidas após a coloração com Oil Red O. Esse corante se incorpora aos lipídeos, dessa forma as vesículas lipídicas características dos adipócitos se coram de vermelho (Fig. 5.10). As CTMs induzidas

dos doadores AD1, AD2 e AD4 aparentemente apresentaram vesículas lipídicas em maior número de células que as CTMs do doador AD3, além disso, as vesículas das células destes três doadores se apresentaram mais robustas. A plasticidade das CTMs varia de acordo com o doador, dessa forma há CTMs de certos doadores que apresentam maior potencial de diferenciação, enquanto CTMs de outros doadores tem essa plasticidade reduzida. É interessante ressaltar que a diferenciação celular acontece em apenas uma porcentagem da população de CTMs e isso varia de acordo com a fonte e doadores.

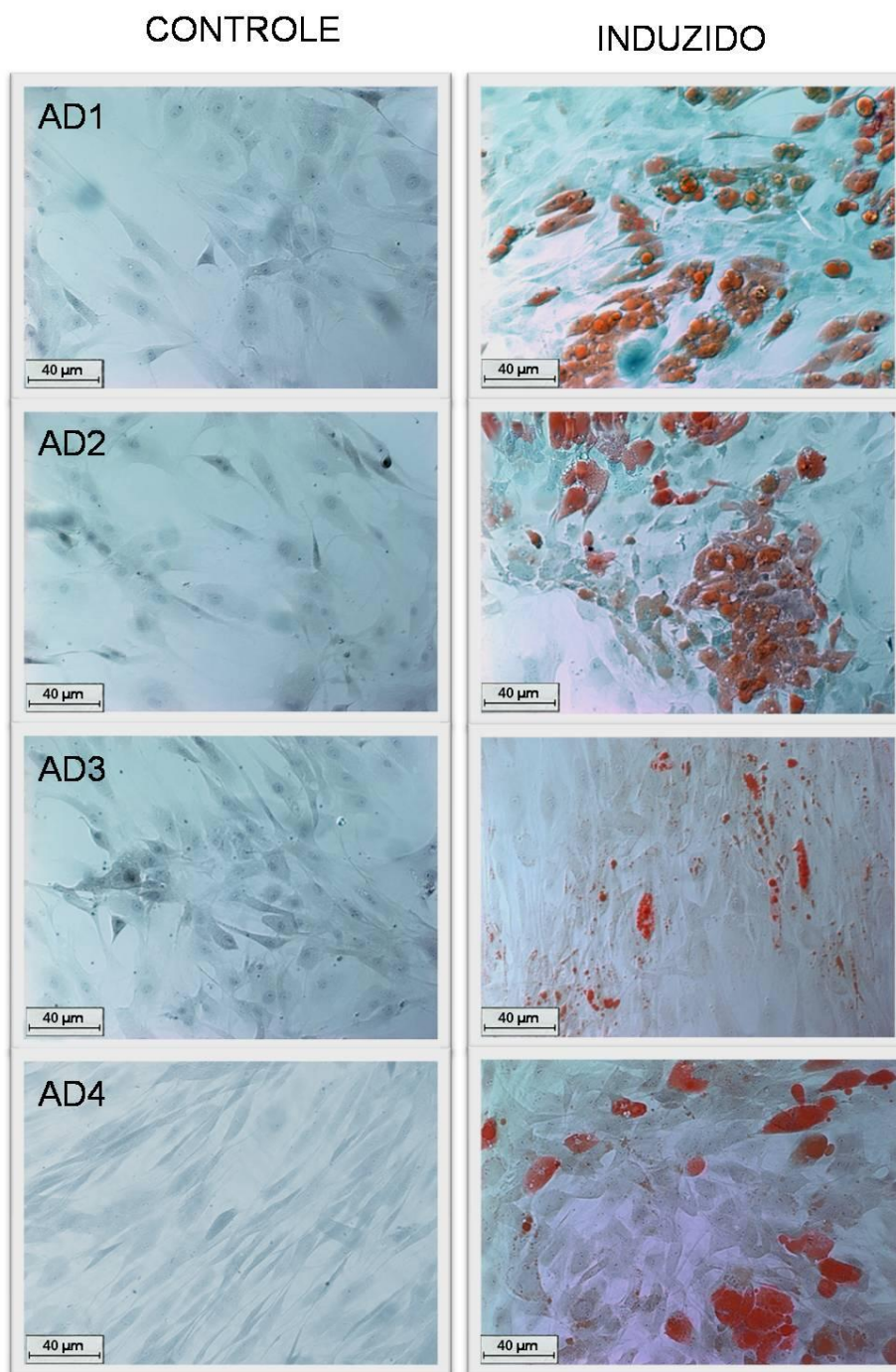


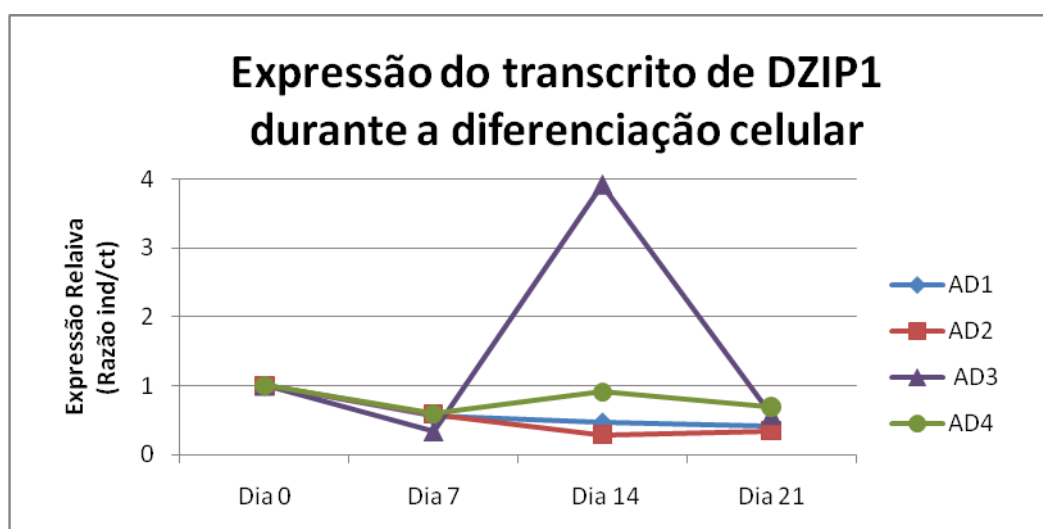
Figura 5.10 - Microscopia ótica da coloração com Oil Red O das culturas das CTMs não induzidas (controle) e induzidas a diferenciação adipogênica no 21^o dia. AD1, AD2, AD3 e AD4 refere-se aos 4 doadores analisados.

5.2.4.2 Expressão do transcrito de *dzip1* durante a adipogênese em CTMs de TA

DZIP1 é descrita como proteína envolvida na manutenção de células-tronco germinativas ou embrionárias de certos organismos (MOORE e cols, 2003). Essa proteína poderia estar também envolvida com a autorrenovação das CTMs. Então, a análise da expressão desse transcrito durante o processo de diferenciação celular possibilitou o direcionamento dessa suposição.

O perfil da expressão do transcrito de *dzip1* foi analisado nas CTMs de quatro doadores (AD1, AD2, AD3, AD4) induzidas à diferenciação em adipócitos em três experimentos independentes. Durante a diferenciação, a extração de RNA total foi realizada das células nos dias 0, 7, 14 e 21 após iniciada a indução.

Por RT-qPCR, os transcritos de *dzip1* e *fabp4* foram analisados. *Fabp4* foi utilizado como controle positivo da adipogênese, pois resulta em uma proteína que está envolvida no transporte de lipídeos e está descrito como um marcador molecular para adipócitos (ROSEN e cols., 2000). Os valores adquiridos das reações foram normalizados com os dados referentes ao *gapdh* (transcrito referência). Os resultados estão representados nos gráficos 5.2, onde a expressão do transcrito de *dzip1* apresenta o mesmo perfil para as células dos doadores AD1, AD2 e AD4. Observou-se também que quando as células se diferenciam e passam a expressar *fabp4*, a expressão de DZIP1 sofre uma redução de pelo menos metade em relação às células controle. O perfil de expressão desse transcrito nas células do doador AD3 diferiu dos outros doadores. Conforme visto, as células desse mesmo doador foram as quais, aparentemente, apresentaram vesículas pouco robustas e em menor número de células (Fig. 5.10).



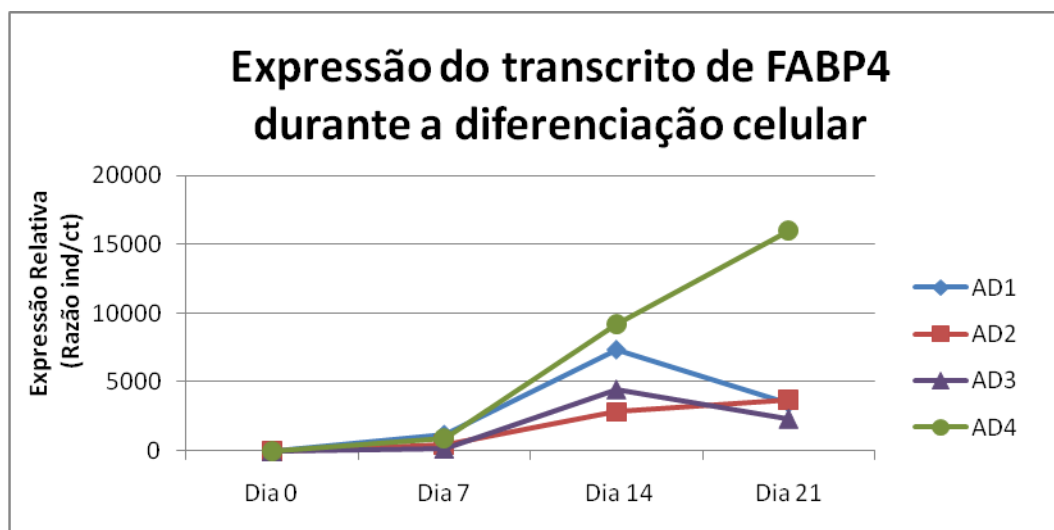
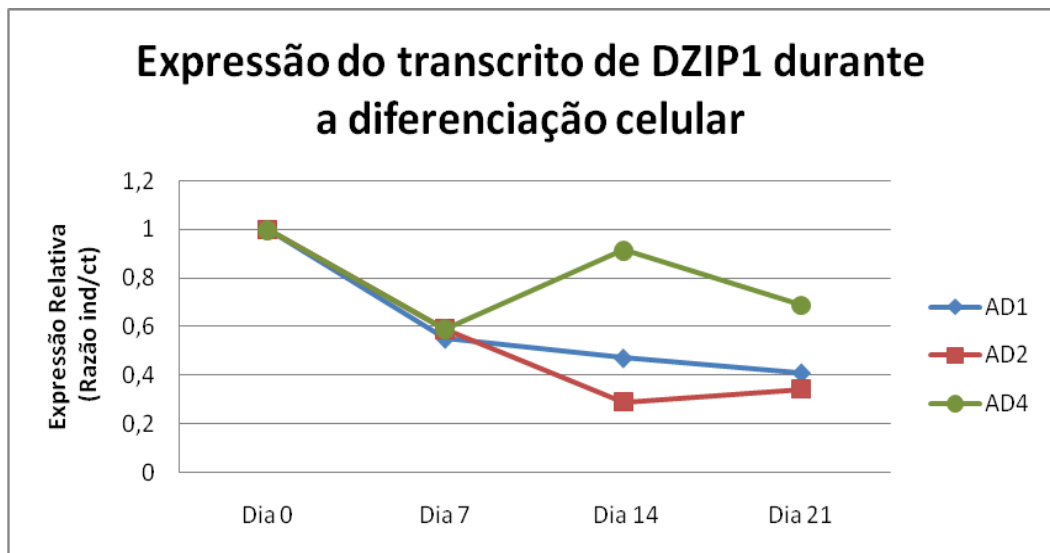


Gráfico 5.2 - Perfil de expressão dos transcritos de *dzip1* e *fabp4* durante a adipogênese das CTMs derivadas de TA de quatro doadores (AD1, AD2, AD3 e AD4) por RT-PCR quantitativo. Para melhor visualização do perfil de expressão de *dzip1*, no gráfico central estão representados os dados dos três doadores (AD1, AD2 e AD4) que apresentaram o mesmo perfil. Normalizados com referência a expressão de *gapdh*.

5.2.4.3 Expressão da proteína DZIP1 durante a adipogênese em CTMs de TA

Em paralelo a análise da expressão do transcrito de *dzip1* foi verificada a expressão da proteína por *western blot* nas CTMs do doador AD4. A detecção da proteína DZIP1 foi analisada em extrato protéico de CTMs controle nos dias 0, 7, 14 e 21 (Controle) e extratos de CTMs induzidas a adipogênese nos dias 7, 14 e 21 após a indução (IND 7 dias, IND 14 dias e IND 21 dias). A detecção de β -actina foi utilizada como normalizadora. Na figura 5.11, o resultado mostra que a proteína DZIP1 tem expressão constante nas CTMs durante a diferenciação. No gráfico 5.3 está representada a quantificação da intensidade das bandas de DZIP1 em relação à intensidade das bandas da proteína β -actina. Notadamente, verifica-se

uma estabilidade na expressão de DZIP1 nas culturas do controle (não induzidas) e induzidas a diferenciação celular (Gráf. 5.3).

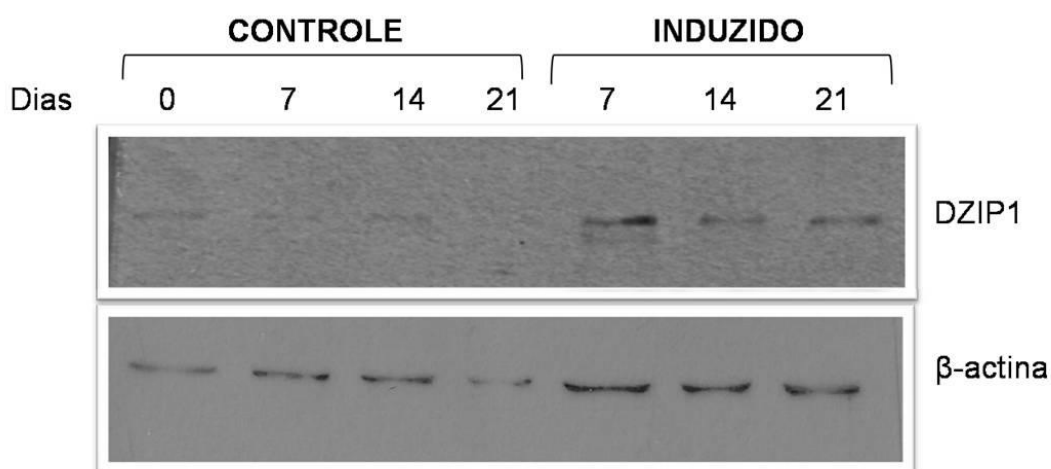


Figura 5.11 - Detecção da proteína, DZIP1 (96 kDa) e β-actina (43 kDa) em extrato protéico de CTMs durante a diferenciação celular: extratos das CTMs controle (dia 0, 7, 14 e 21) e induzidas a adipogênese (dia 7, 14 e 21) por ensaio de *western blot*. Diluições anti- β-actina (1:200) e anti-DZIP1 (1:200). Cada canaleta contém extrato protéico referente a 18.000 células.

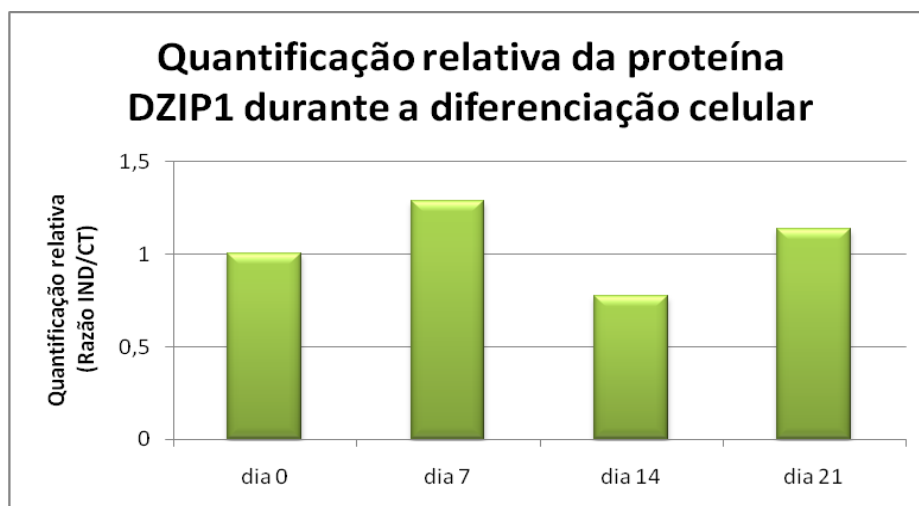


Gráfico 5.3 - Representação gráfica da análise de intensidade da proteína DZIP1 em relação a β-actina detectadas por *western blot* em extratos de proteínas de CTMs controle (dia 0, 7, 14 e 21) e induzidas (dia 7, 14 e 21). Valores foram normalizados com os valores de β-actina e em seguida foi efetuada a razão entre os dados de intensidade das bandas das células induzidas pelo controle.

5.2.4.4 *Imunolocalização de DZIP1 nas CTMs de TA durante a adipogênese*

A localização da proteína DZIP1 foi verificada nas CTMs mantidas com meio controle durante 21 dias e nas CTMs induzidas à adipogênese com meio apropriado durante o mesmo período. As células foram cultivadas em lamínulas circulares de vidro e 24 horas após o procedimento foi iniciado o processo de diferenciação com a adição do meio de cultura com os fatores de diferenciação. As células controle foram mantidas com o meio de cultura próprio de células-tronco e manipuladas paralelamente as células induzidas para a possibilidade de comparações. No sétimo, décimo quarto e vigésimo primeiro dia, as células foram fixadas e as imunofluorescência (IF) para DZIP1 realizadas utilizando o anticorpo anti-DZIP1 humano (Santa Cruz Biotechnology). Controles negativos do ensaio de IF foram feitos, ou seja, as células foram incubadas com os anticorpos secundários (anti-IgG de coelho). Os controles negativos da IF foram tratados igualmente a todas as amostras desde o ensaio de imunofluorescência até a captura e ajuste da imagem e se mantiveram sem sinal. Os resultados da IF de DZIP1 mostram nitidamente a existência de grupos distintos de células na população geral de CTMs. Essa distinção é notada no campo claro a partir do sétimo dia das culturas controle e induzida, onde um grupo de células apresenta granulosidade citoplasmática acentuada. Ao vigésimo primeiro dia podem-se diferenciar três populações nas células que foram induzidas: um grupo com pouca granulosidade; um grupo com granulosidade acentuada e outro grupo com vesículas lipídicas (as células diferenciadas em adipócitos).

A partir do sétimo dia, observa-se uma sub-população de células com maior granulosidade na cultura controle e induzida a adipogênese. E essas células com grânulos apresentam a proteína DZIP1 no citoplasma (Fig. 5.12). Nas células induzidas a adipogênese apresentam DZIP1 no núcleo e citoplasma. As células diferenciadas em adipócitos (com vesículas lipídicas) expressam DZIP1 no citoplasma e em alguns casos no núcleo (Fig. 5.12).

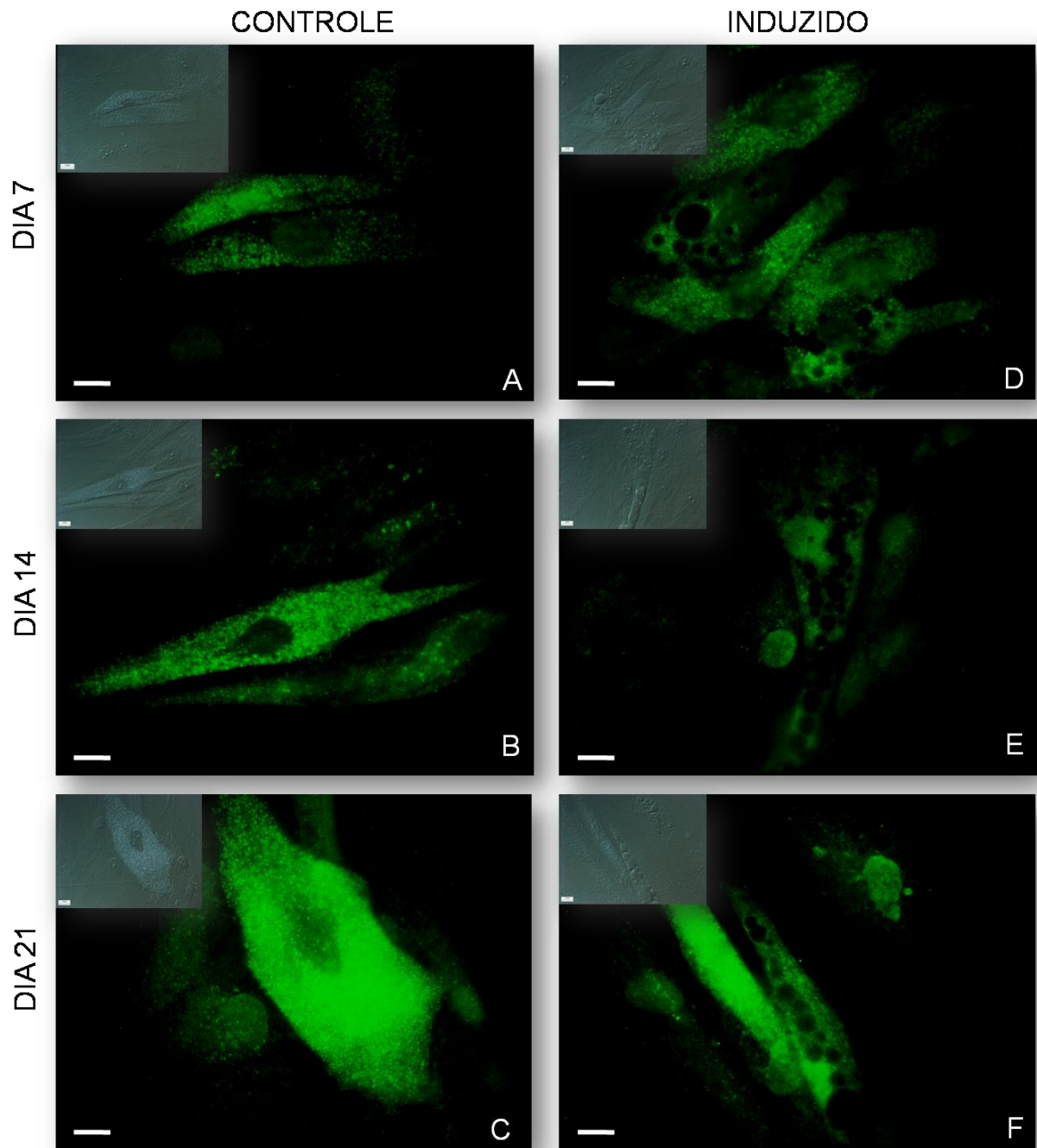


Figura 5.12 - Imunolocalização de DZIP1 em CTMs de TA controle dia 7 (A), dia 14 (B), dia 21 (C) e as células induzidas dia 7 (D), dia 14 (E) e dia 21 (F). A barra representa 10 μ m. Contraste de fase está localizado no canto superior esquerdo de cada imagem.

5.2.5 DZIP1 Na Proliferação Celular

A expressão de *dzip1* foi avaliada durante a proliferação celular em ritmo acelerado e reduzido da população de CTMs. Para isso, o mesmo número de células (4000 células) foi plaqueado em poços de placas de cultura com diâmetro de 16,2 mm (placas com 24 poços) e

34,5 mm (placas com 6 poços). Sendo assim, as células que foram cultivadas numa área maior se apresentaram no primeiro dia com confluência relativa a 40% e obtiveram proliferação intensa. Enquanto que as células presentes na menor área apresentaram 90% de confluência e obtiveram proliferação reduzida (Fig. 5.4). No primeiro e quinto dia após o plaqueamento, as células foram contabilizadas e o RNA total extraído das mesmas para síntese de cDNA.

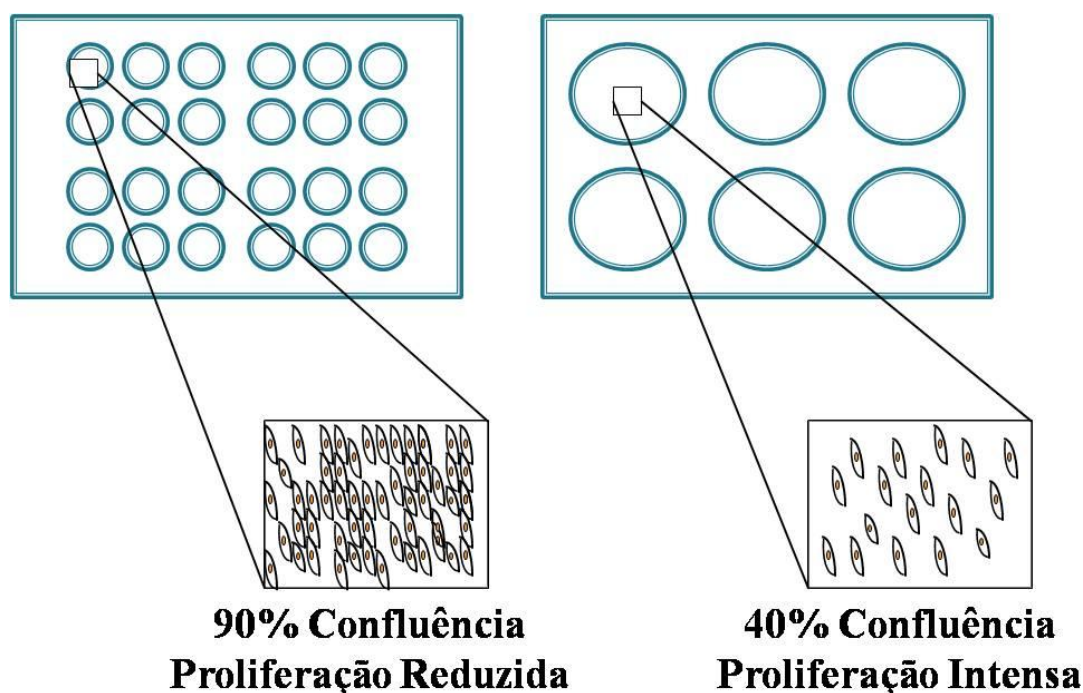


Figura 5.13 - Desenho esquemático do ensaio para avaliar a expressão dos transcritos DZIP1 e PUM2 durante a proliferação celular. O mesmo número de células foi plaqueado em áreas distintas para simular uma cultura de células em proliferação reduzida e intensa.

Para melhor visualização dos dados, o número de células contabilizado no quinto dia foi dividido pelo número de células do primeiro dia (Graf. 5.4). Dessa forma, os dados relativos ao quinto dia foram evidenciados, pois o principal objetivo dessa contagem de células foi verificar as diferenças na proliferação das células em menor e maior confluência. A população de CTMs dos cinco doadores (AD1, AD2, AD3, AD4 e AD5) que foi plaqueada em menor confluência apresentou quase o dobro de células no quinto dia em relação à população de células foi plaqueada em 90% de confluência. Certificando que as células plaqueadas em menor confluência teve proliferação celular maior que a população de células plaqueadas em maior confluência.

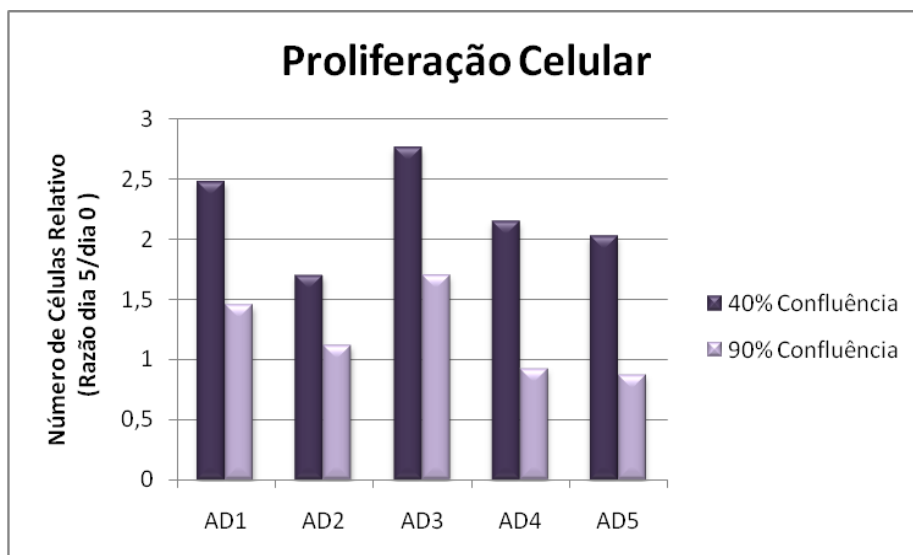


Gráfico 5.4 - Número de células relativo a razão do dia 5/ dia 0 da população que estava plaqueada em 40% e 90% de confluência.

A análise da expressão dos transcritos de DZIP1 foi realizada nas amostras do primeiro e quinto dia das culturas de células em 40% e 90% de confluência (proliferação intensa e reduzida, respectivamente) por RT-qPCR.

O perfil de expressão do transcrito de DZIP1 na população em proliferação intensa e reduzida apresentou variações que não foram significativas (Graf. 5.5).

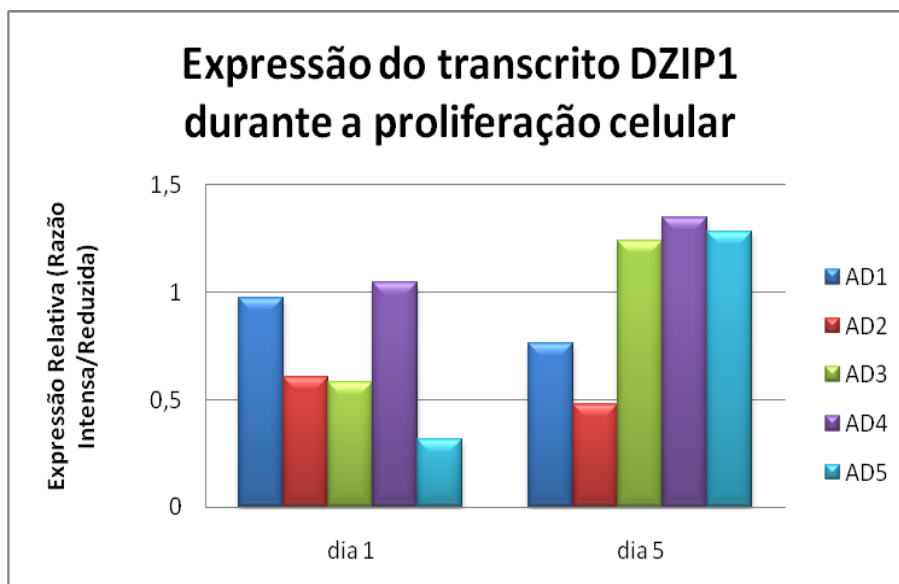


Gráfico 5.5 - Perfil de expressão do transcrito de DZIP1 nas culturas de células no dia 1 e dia 5. Razão dos dados referentes a proliferação intensa sobre a reduzida de CTMs derivadas de TA de cinco doadores.

5.3 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE PUM2 NAS CTMs

5.3.1 Produção De Soro Anti-PUM2

5.3.1.1 Clonagem E Expressão Do Peptídeo Recombinante *Pum2*

A sequência do gene de *pum2* humano foi analisada utilizando o software DNASTAR. A ferramenta *Protean* foi utilizada para determinar a região mais antigênica e a ferramenta *Clustalw* foi utilizada para selecionar a sequência diferente de *pum1*, já que esses genes são altamente conservados. Após determinar a região que contemplasse essas duas características (região antigênica e diferente de *pum1*), iniciadores foram construídos com uma sequência extra (*attB*) para a clonagem em sistema *Gateway* (Invitrogen) para a expressão do peptídeo recombinante fusionado com uma cauda contendo seis histidinas.

O processo de expressão do peptídeo recombinante de PUM2 teve muitos obstáculos. A cepa *E. coli* BL-21 foi utilizada inicialmente para a expressão desse peptídeo, no entanto, diferentes protocolos foram testados e em nenhum foi obtido êxito na indução da expressão. Em um último esforço de tentar expressar o peptídeo, cepas *E. coli* Rosetta foram transformadas com o vetor e induzidas a expressar o peptídeo recombinante de PUM2 a 30 e 37°C (Fig.5.14). Essa cepa expressa maior quantidade de tRNA específicos para códons pouco abundantes em *E. coli*, e isso pode ter possibilitado o sucesso da expressão. O peptídeo recombinante apresentou massa molecular aproximada de 27 kDa (PUM2 sem *stop* códon ~23 kDa + 0,6

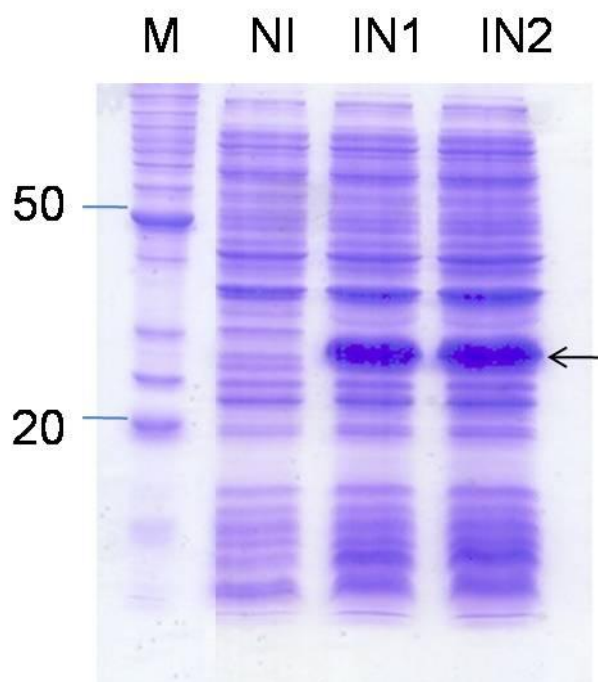


Figura 5.14 - Expressão do peptídeo recombinante de PUM2: Gel SDS-PAGE 15% corado com *coomassie blue*, M- Marcador de massa molecular em kDa (BenchMark™ *Protein Ladder*), NI – Extrato total de proteínas das bactérias transformadas (Rosetta) e não induzidas, IN 1- Extrato total de proteínas das bactérias transformadas e induzidas à 30°C, IN 2 – Extrato total de proteínas das bactérias transformadas e induzidas à 37°C.

kDa 6xHis). Sobretudo, antes dessa última tentativa de expressão, o anticorpo comercial de PUM2 (Santa Cruz *Biotechnology* - USA) já havia sido adquirido para os ensaios de *western blot*, imunofluorescência e marcação intracelular de PUM2 em CTMs, sendo desnecessária a expressão em larga escala do peptídeo e imunização de animais.

5.3.2 Detecção e imunofluorescência de PUM2 em CTMs derivadas de TA

A análise da expressão da proteína PUM2 nas CTMs foi realizada através de *western blot* com o anticorpo anti-PUM2 humano. Extratos totais de proteína de CTMs derivadas de TA foram aplicados em gel de SDS-PAGE 8%, após a corrida de eletroforese, foi realizada a transferência para membrana de nitrocelulose como descrito em materiais e métodos. O resultado obtido por quimioluminescência para PUM2 apresenta uma única proteína com tamanho aproximado de 114 kDa (Fig. 5.15). Em paralelo, a detecção de β -actina foi utilizada como normalizadora da reação com a identificação de uma única proteína com massa molecular aproximado de 43 kDa (Fig. 5.15).

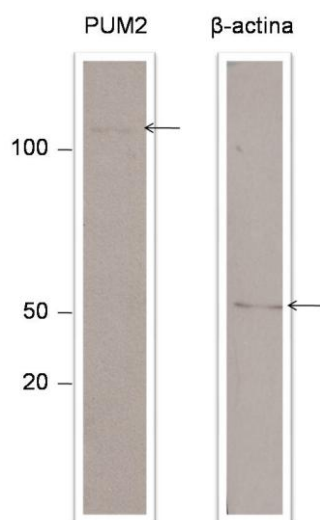


Fig. 5.15 – Detecção de PUM2 em extrato protéico de CTMs derivadas de TA por *Western blot* (quimioluminescência) com o anticorpo anti-PUM2 (1:200). A reação foi normalizada com a detecção β - actina (1:150). Marcador de massa molecular em kDa (BenchMark™ *Protein Ladder*).

Além da detecção de PUM2 nas CTMs por *western blot*, a localização dessa proteína foi realizada por imunofluorescência com o anticorpo anti-PUM2 (Santa Cruz *Biotechnology* - USA) na diluição de 1:20. As imagens mostram claramente marcação nuclear das CTMs derivadas de TA (Fig. 5.16).

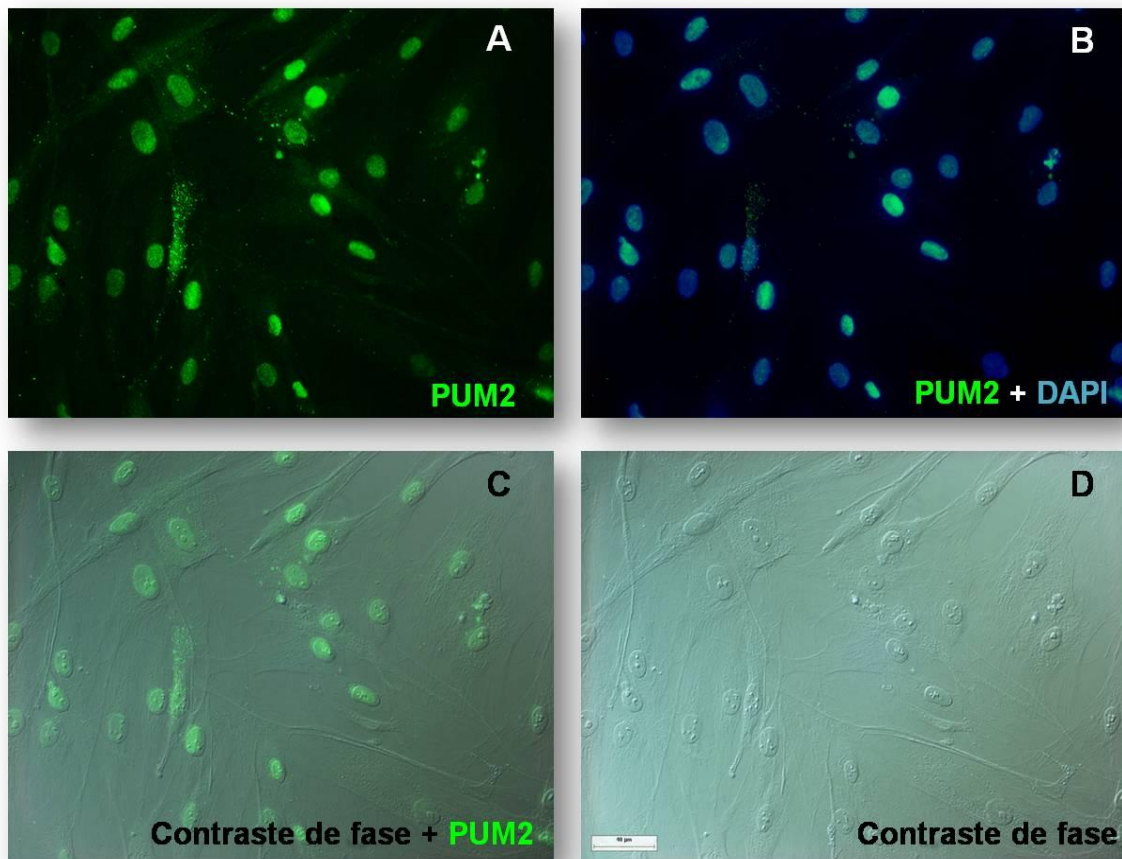


Figura 5.16 – Imunolocalização de PUM2 em CTMs de TA: A) PUM2 (Alexa 488); B) Sobreposição de PUM2 com DAPI (Marcador de núcleo); C) Sobreposição de PUM2 com contraste de fase; e D) Contraste de fase. A barra representa 40 μ m.

5.3.3 Quantificação Das CTMs Que Expressam PUM2

Para determinar a porcentagem de CTMs que expressam PUM2, marcação intracelular dessa proteína foi realizada em CTMs derivadas de TA utilizando o anticorpo anti-PUM2 humano. O mesmo procedimento utilizado para DZIP1 foi feito para analisar a porcentagem de células que expressam PUM2. A porcentagem de células detectadas no canal FL1 de todos os controles inclusive a porcentagem de CTMs derivadas de tecido adiposo de dois doadores, AD4 e AD5, que expressam PUM2 está na tabela 5.2. O gráfico 5.6 é a representação da distribuição das células somente com o anticorpo secundário (anti-IgG de cabra), as quais foram utilizadas para determinar a *gate*, e das CTMs dos doadores AD4 e AD5, das quais 56,1 e 57,2% das células apresentaram a proteína PUM2, respectivamente. Dessa forma, pode-se concluir que metade da população de CTMs derivadas de TA expressa PUM2. Os gráficos referentes aos controles estão nos gráficos do ANEXO 3.

Células	FL1+
Sem marcação	0,1
CD90 FITC	98,9
CD105 PE	0,63
sem primário + anti-goat	1,98
PUM2 + AD4	56,1
PUM2 +AD5	57,2

Tabela 5.2 Porcentagem de CTMs de TA que expressam PUM2. AD4 e AD5 – numeração dos doadores.

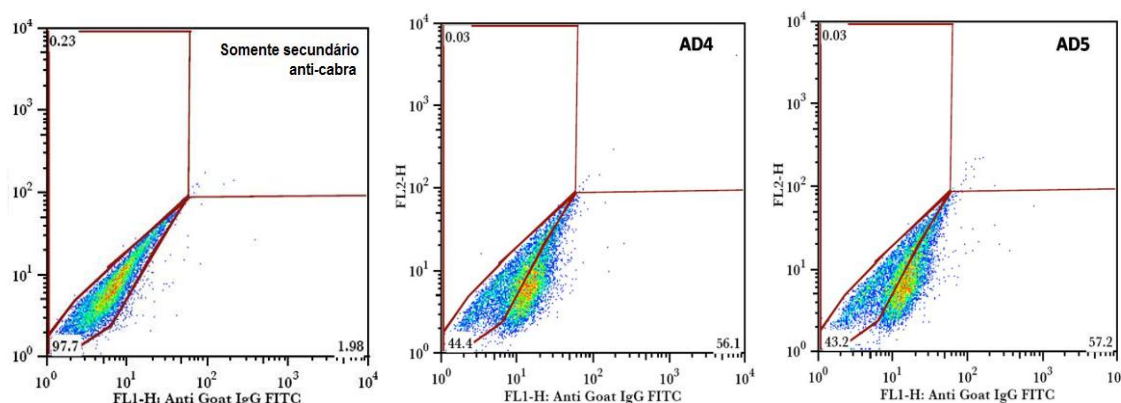


Gráfico 5.6 - Quantificação das CTMs derivadas de TA que expressam a proteína PUM2 por marcação intracelular e análise por citometria de fluxo (FACS). Isotipo – utilizado para determinar a *gate*. A porcentagem de 56,1 das células do doador AD4 apresenta PUM2 (representado pelo eixo x ou FL1) enquanto que 57,2% das células do doador AD5.

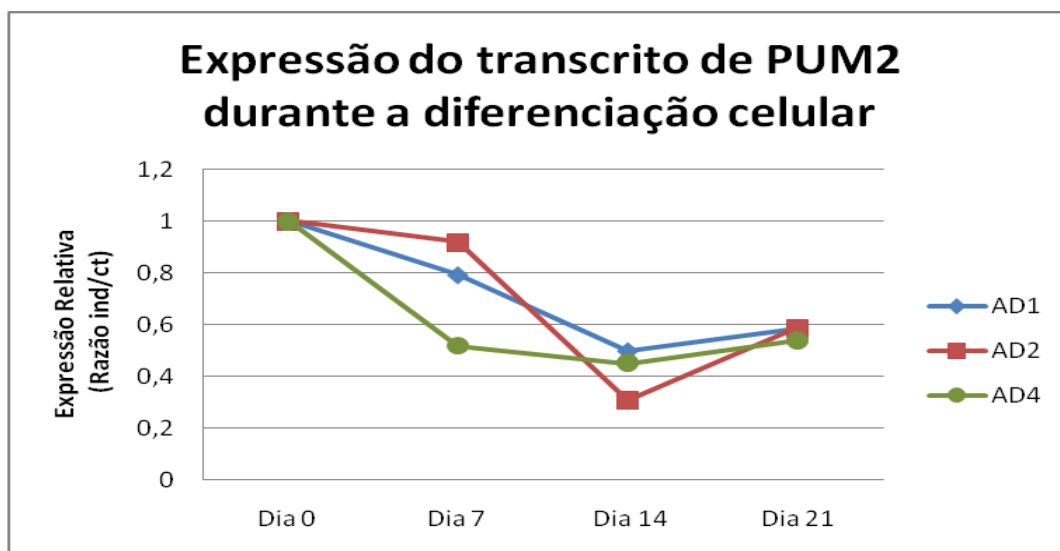
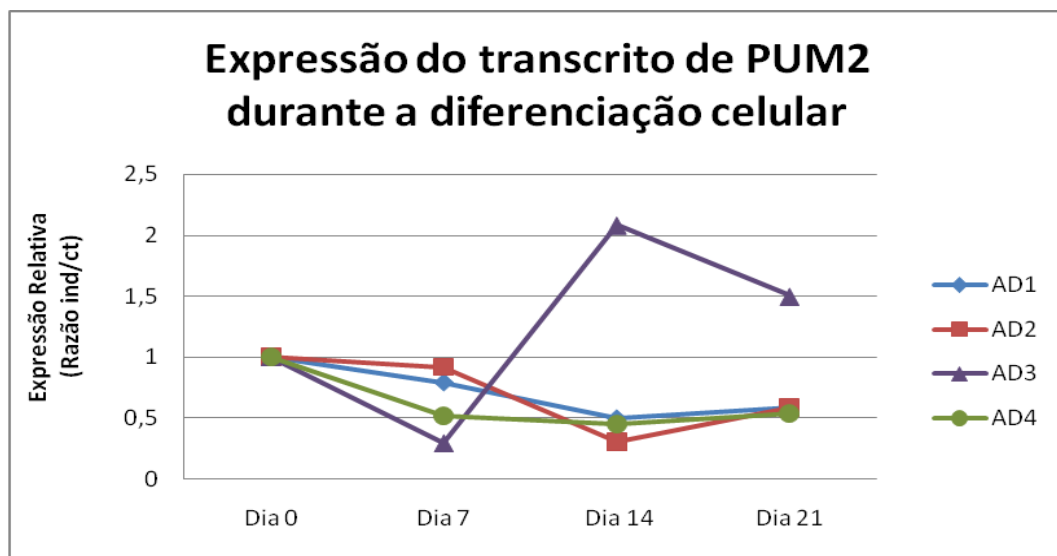
5.3.4 Análise da expressão de PUM2 durante a diferenciação celular

O mesmo desenho experimental utilizado para analisar a expressão de DZIP1 foi utilizado para analisar a expressão de PUM2. Inclusive foram utilizadas as CTMs de TA dos mesmos doadores.

5.3.4.1 Expressão do transcrito de *pum2* durante a adipogênese em CTMs de TA

O perfil da expressão de *pum2* foi analisado nas CTMs de quatro doadores (AD1, AD2, AD3, AD4) induzidas à diferenciação em adipócitos em três experimentos independentes. Durante a diferenciação, a extração de RNA total foi realizada das células nos dias 0, 7, 14 e 21 após iniciado a indução.

Por RT-qPCR, o nível de expressão dos transcritos de *pum2* e *fabp4* foi analisado. *Fabp4* foi utilizado como controle positivo da adipogênese. Os valores adquiridos das reações foram normalizados com os dados referentes ao *gapdh* (transcrito referência). Os resultados estão representados nos gráficos 5.7, onde a expressão do transcrito de *pum2* assim como de *dzip1* apresenta o mesmo perfil para as células dos doadores AD1, AD2 e AD4, ou seja, ao passo que as células se diferenciam e passam a expressar *fabp4*, a expressão de *pum2* sofre uma redução pela metade em relação às células controle. O perfil de expressão desse transcrito nas células do doador AD3 diferiu dos outros doadores.



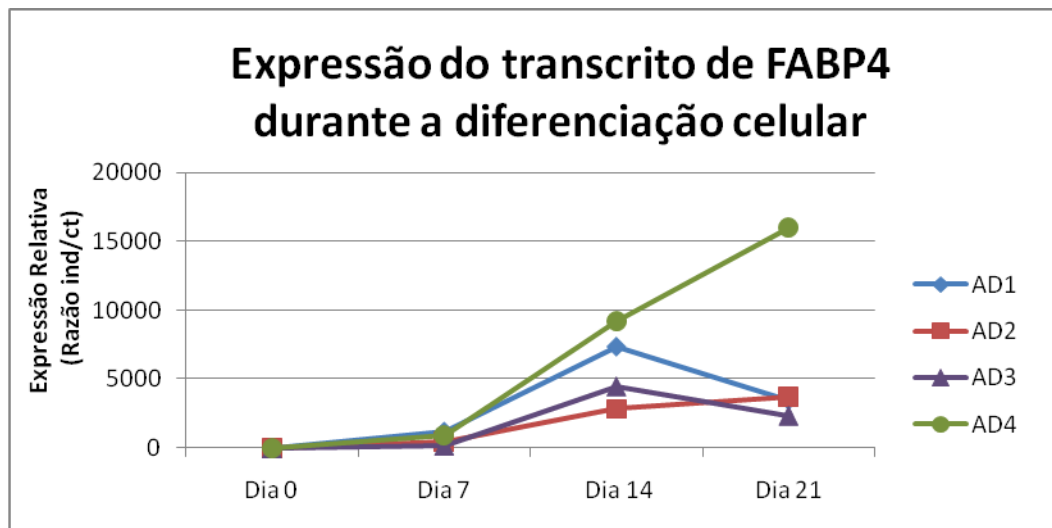


Gráfico 5.7 - Perfil de expressão dos transcritos de *pum2* e *fabp4* durante a adipogênese das CTMs derivadas de TA de quatro doadores (AD1, AD2, AD3 e AD4) (gráfico superior) por RT-PCR quantitativo. Para melhor visualização do perfil de expressão de *pum2*, no gráfico central estão representados os dados dos três doadores (AD1, AD2 e AD4) com o mesmo perfil. Normalizados com *gapdh*.

5.3.4.2 Expressão da proteína PUM2 durante a adipogênese em CTMs de TA

Em paralelo a análise da expressão do transcrito de *pum2* foi verificada a expressão da proteína por *western blot*. A detecção de PUM2 foi analisada em extrato protéico de CTMs controle nos dias 0, 7, 14 e 21 (Controle) e extratos de CTMs induzidas a adipogênese nos dias 7, 14 e 21 após a indução (IND 7 dias, IND 14 dias e IND 21 dias). A detecção de β -actina foi utilizada como normalizadora. Na figura 5.17, o resultado mostra que PUM2 tem expressão quase imperceptível nas CTMs controle e nas CTMs induzidas sofre uma queda no 14^o e 21^o dia.

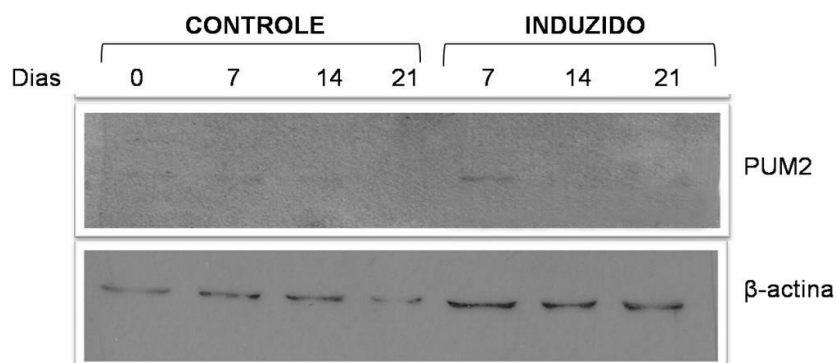


Figura 5.17 - Detecção da proteína, PUM2 (114 kDa) e β -actina (43 kDa) em extrato protéico de CTMs durante a diferenciação celular: extratos de CTMs Controle (dias 0, 7, 14 e 21) e induzidas a adipogênese (dias 7, 14 e 21) por ensaio de *western blot* com anti- β -actina (1:200) e anti-PUM2 (1:200). Cada canaleta contém extrato protéico referente a 18.000 células.

5.3.4.3 *Imunolocalização de PUM2 nas CTMs durante a adipogênese*

A localização da proteína PUM2 foi verificada nas CTMs mantidas com meio controle durante 21 dias e nas CTMs induzidas a adipogênese com meio apropriado durante o mesmo período. Controles negativos do ensaio de IF foram feitos, ou seja, as células foram incubadas com os anticorpos secundários (anti-IgG de cabra) na ausência do anticorpo primário. Os controles negativos da IF foram tratados igualmente a todas as amostras desde o ensaio de imunofluorescência até a captura e ajuste da imagem e se mantiveram sem sinal. Os resultados da IF de PUM2 também apresenta a existência de grupos distintos de células na população geral de CTMs. Essa distinção é notada no campo claro a partir do sétimo dia das culturas controle e induzida, onde um grupo de células apresenta granulosidade citoplasmática acentuada. Nas células induzidas ao 21^o dia, podem-se diferenciar três populações: um grupo com pouca granulosidade; um grupo com granulosidade acentuada e outro grupo com vesículas lipídicas (as células diferenciadas em adipócitos).

PUM2 apresentou localização nuclear em culturas recém plaqueadas, porém, no sétimo dia de cultura, essa proteína se apresenta no citoplasma das células do controle (Fig. 5.18 A-C). Nas células induzidas a adipogênese, PUM2 se localiza no núcleo e citoplasma. Notadamente, uma queda da intensidade de PUM2 é verificada nas células induzidas, corroborando com os resultados de western blot, onde a partir do 14^o dia a expressão de PUM2 sofre diminuição.

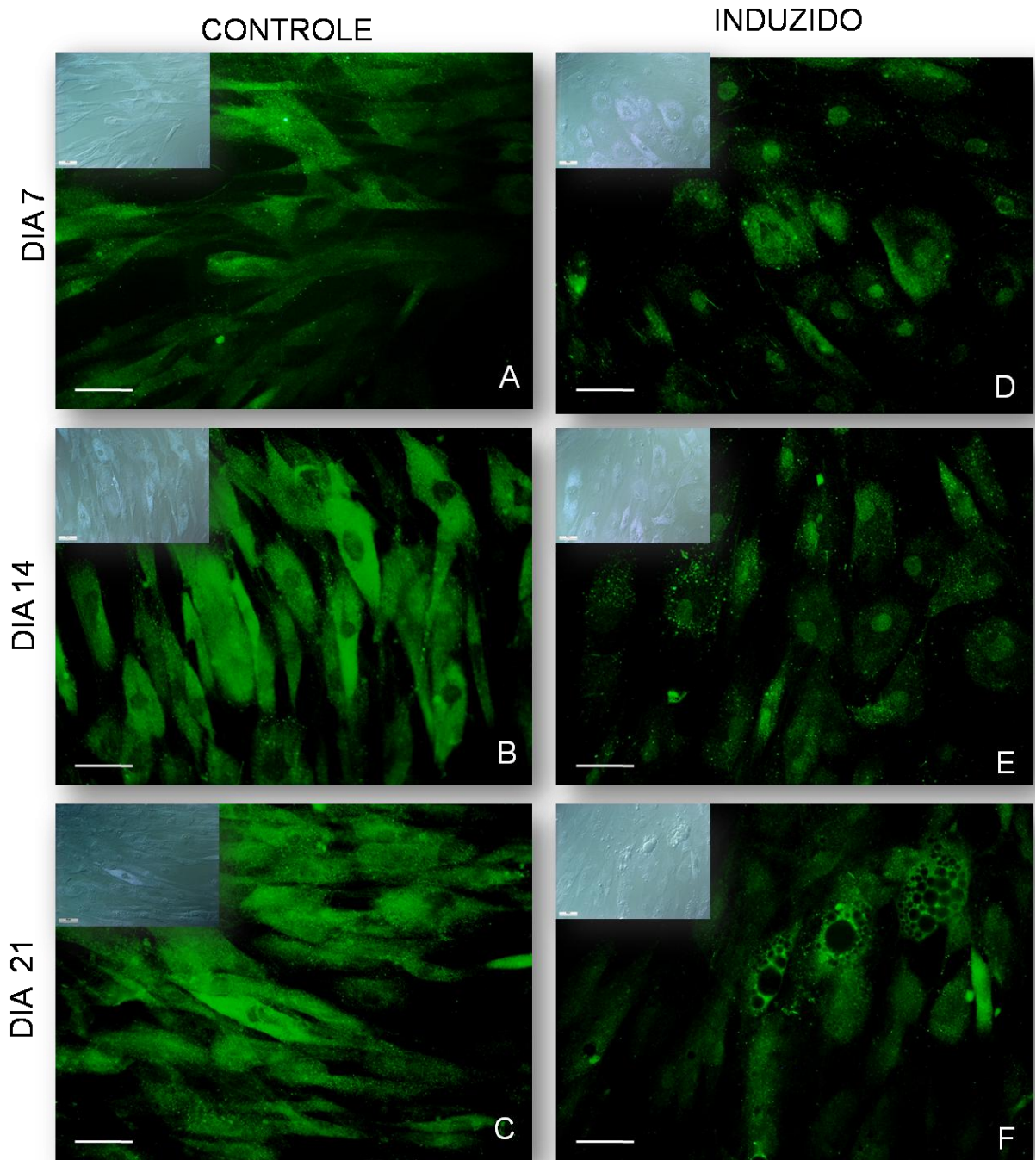


Figura 5.18 - Imunolocalização de PUM2 em CTMs de TA controle no dia 7 (A), dia 14 (B), dia 21 (C) e as células induzidas dia 7 (D), dia 14 (E) e dia 21 (F). A barra representa 40 μm . Contraste de fase está localizado no canto superior esquerdo de cada imagem.

5.3.5 PUM2 Na Proliferação Celular

A expressão de *pum2* também foi avaliada durante a proliferação intensa e reduzida da população de CTMs. O desenho experimental e células foram os mesmos utilizados para a análise de *dzip1* (item 5.3.3).

A análise da expressão do transcrito *pum2* foi realizada nas células do primeiro e quinto dia das culturas em 40% e 90% de confluência (proliferação intensa e reduzida, respectivamente) por RT-qPCR.

O perfil de expressão de *pum2* nas células de quatro doadores (AD2, AD3, AD4 e AD5) manteve o mesmo padrão (Graf. 5.8). Ou seja, no primeiro dia, houve equivalência no nível de expressão do transcrito de *pum2* nas culturas com proliferação intensa e reduzida, enquanto no quinto dia a expressão desse transcrito aumentou nas culturas com proliferação intensa. Curiosamente, a expressão de *pum2* das células do doador AD1 não acompanhou o perfil dos outros quatro doadores podendo ter sido uma questão de variabilidade biológica ou problemas técnicos (dado não apresentado).

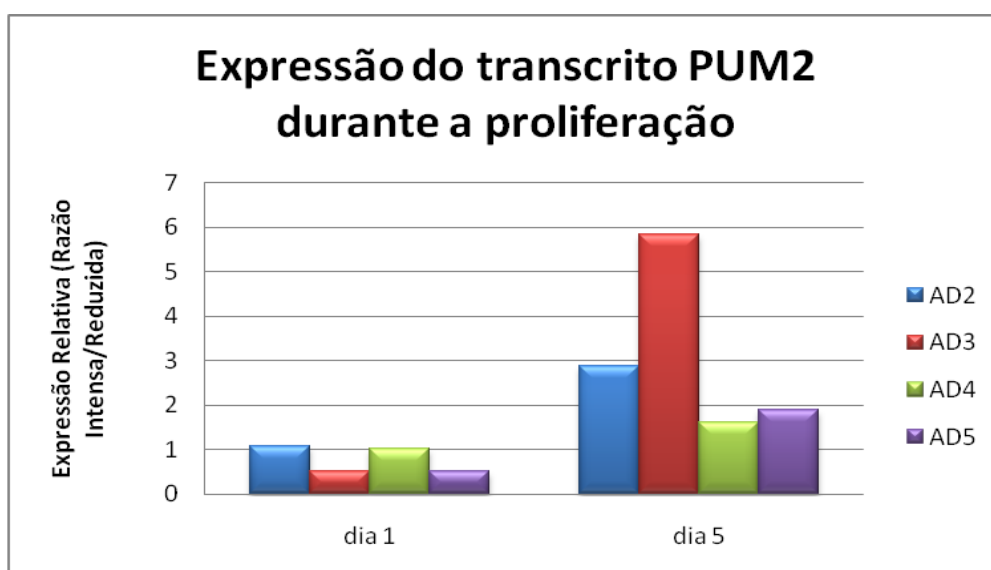


Gráfico 5.8 - Perfil de expressão do transcrito de PUM2 nas culturas de células no dia 1 e dia 5. Razão dos dados referentes a proliferação intensa sobre a reduzida de CTMs de quatro doadores.

6. DISCUSSÃO

Diferentes redes de regulação pós-transcricional participam da regulação da autorrenovação das CTMs (UNWIN & WHETTON, 2005). Uma das redes de interações entre as RBPs têm as proteínas pumilio como elemento central interagindo com NOS1, STAU1, BOU, DAZL e DAZ, e essas duas últimas interagindo com DZIP1. Essa rede de interações foi esquematizada para simples visualização (Fig. 6.1), pois essas interações podem acontecer isoladamente dependendo do tecido e organismo. Ou seja, NOS1 e PUM interagem e participam no desenvolvimento e função das células-tronco germinativas de *D. melanogaster* (FORBES & LEHMANN, 1998) enquanto que STAU1 e PUM participam de uma via responsável pela memória olfativa em *D. melanogaster* (DUBNAU e cols., 2003). Além disso, PUM2 também interage com DAZ e DAZL em células-tronco embrionárias e germinativas humanas (MOORE e cols., 2003). E por fim, DZIP1 pode se associar com DAZ e outros cofatores em um complexo de proteínas de união ao RNA que agem em células embrionárias e células germinativas (MOORE e cols, 2004). A expressão dos transcritos das RBPs *pum1*, *pum2*, *dzip1*, *nos1* e *stau1* foi detectada nas CTMs derivadas de MO, SCU e TA humanas. No entanto, a expressão dos transcritos de *daz*, *dazl* e *bou* não foi detectada em nenhuma dessas células. Dessa forma, pode-se sugerir que na ausência dessas RBPs, PUM2 possa interagir com outros *partners* na regulação pós-transcricional em CTMs. As RBPs formam complexos com mRNA denominados mRNPs, tais complexos são dinâmicos e combinatórios. Pode-se citar uma combinação para esse sistema, como por exemplo: um complexo é funcional em algumas vias na presença de uma proteína, e na ausência dessa, o complexo é ativado por outros elementos e, portanto, funcional para uma via não convencional. MOORE e seus colaboradores (2004) analisaram o perfil de expressão de DZIP1 e DAZL em CTEs humanas. *Daz* e *dazl* não foram identificados nas CTMs, dessa forma DZIP1 poderia estar interagindo com outros *partners*. Existe a possibilidade de DZIP1 estar interagindo com PUM2, pois essas proteínas são expressas nas CTMs e poderiam estar participando de um complexo que controla mecanismos de autorrenovação ou diferenciação celular. Na tentativa de justificar a possibilidade dessa interação é relevante lembrar que o padrão de expressão de *dzip1* e *pum2* durante a adipogênese foi igual sugerindo uma possível co-regulação transcricional desses genes. Além disso, a localização nuclear de DZIP1 e PUM2 sugere uma provável interação. Para confirmar essa suposição, a co-localização de DZIP1 e PUM2 por imunofluorescência utilizando microscópio confocal será realizado em CTMs. Além disso, ensaios de *pull down* com o domínio de interação proteína-proteína de DZIP1 ou PUM2 imobilizado em coluna será realizado utilizando extrato protéico de CTMs. Dessa forma, será possível analisar as proteínas que interagem com DZIP1 e com o anticorpo

anti-PUM2 verificar a interação entre essas proteínas. Além dessa técnica, ensaios de imunoprecipitação utilizando anticorpo anti-DZIP1 (produzido em coelho) e anti-PUM2 (produzido em cabra) fornecerão dados sobre os possíveis complexos formados por essas proteínas.

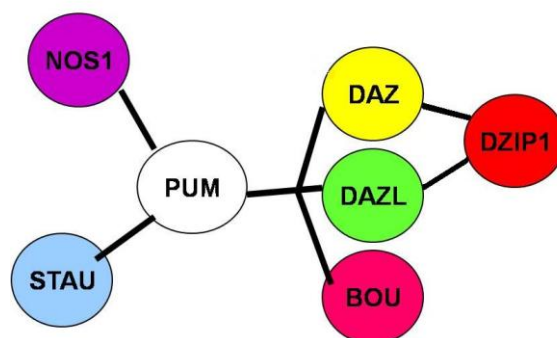


Figura 6.1 – Uma das redes de interações das RBPs envolvidas na autorrenovação de CTEs e germinativas têm como elemento central Pumilio.

Dados preliminares de adipogênese *in vitro* com CTMs de TA comparando a eficiência do meio de indução Poietics™ (Cambrex) e do meio de indução descrito por MEIRELLES e seus colaboradores (2006), demonstraram que esse último meio obteve maior sucesso que o meio Poietics™ (REBELATTO e cols., 2008). No presente trabalho, as CTMs de dois doadores foram induzidos a adipogênese *in vitro* utilizando o meio de indução segundo Meirelles (dados não mostrados). No entanto, as células induzidas à diferenciação com esse meio obtiveram baixa taxa de diferenciação, ou seja, poucas células apresentaram vesículas lipídicas e essas se mostraram bastante reduzidas. Uma possível explicação para essa baixa taxa de células diferenciadas é a existência de alta variabilidade biológica entre as CTMs dos doadores, dessa forma as CTMs desses doadores podem não ter apresentado dados satisfatórios devido à sua reduzida plasticidade adipogênica. Outra possível explicação é a variação no lote dos insumos do meio de indução, como por exemplo, o soro bovino fetal.

A porcentagem de células que se diferenciam num ensaio adipogênico *in vitro* é difícil ser determinada, no entanto é nítida a existência de um conjunto de CTMs que não se diferencia em adipócitos. Dessa maneira, o estudo de diferenciação celular se torna um desafio, pois sempre haverá a existência de um ruído relativo às células que não se diferenciaram. O corante Oil Red O utilizado nos ensaios de citotóxicidade apenas possibilita corar as vesículas lipídicas e posteriormente fazer uma análise de morfometria da imagem. O grupo do laboratório de células-tronco do ICC está padronizando uma técnica utilizando vermelho nilo, esse é um marcador lipofílico fluorescente que é excitado com 515-560 nm e

emite comprimento de onda maior que 590 nm (GREENSPAN e cols, 1985). O vermelho nilo marca as vesículas lipídicas dos adipócitos e, portanto, por meio de citometria de fluxo, é possível quantificar a porcentagem de células diferenciadas em adipócitos. Além disso, há outra possibilidade para contornar o problema de ruídos de populações distintas que é a separação dessas por citometria de fluxo (*Flow Cytometry Sorter*).

Uma sub-população foi identificada nas CTMs derivadas de TA, esta se caracteriza por granulosidade citoplasmática acentuada que é evidenciada a partir do sétimo dia de cultura das células submetidas ao meio Poietics™ (Cambrex). É interessante ressaltar que as CTMs são mantidas com o meio DMEM/F12 suplementado com 10% de SBF ao longo das passagens, no entanto quando se realiza o ensaio de diferenciação celular, tanto o controle quanto o induzido, passam a ser mantidos com o meio Poietics™ diferindo apenas os fatores adipogênicos no meio das células induzidas. Essa sub-população foi observada somente nas células mantidas com esse meio Poietics™, dessa forma pode haver algum elemento no meio que esteja alterando o fenótipo desse grupo de células. Nos últimos anos, a idéia de que as CTMs são uma população homogênea vem sendo dissipada. Uma variedade de tipos celulares pode ser identificada na fração aderente de células mononucleares da medula óssea incluindo células-tronco parecidas com embrionárias e primitivas, CTMs, progenitoras comissionadas e células maduras como osteoblasto e fibroblasto (RATAJCZAK e cols., 2004, D'IPPOLITO e cols., 2006, RATAJCZAK, 2008). COLTER e seus colaboradores (2000) identificaram na população de CTMs derivadas de medula óssea três tipos de células morfológicamente distintos: células em forma de espeto (*spindle-shaped cells*), células grandes e planas e células redondas e muito pequenas. Essas células redondas rapidamente se autorrenovam (COLTER e cols, 2001). A sub-população granulosa identificada no presente trabalho ainda não foi descrita na literatura, dessa forma é interessante a concretização desse achado e talvez a definição de sua plasticidade e autorrenovação para possíveis aplicações em terapias celulares.

A expressão de DZIP1 foi analisada em vários órgãos e tecidos e somente identificado nas CGs e CTEs (MOORE e cols., 2004). No presente trabalho, a expressão de *dzip1* foi identificada também em CTMs derivadas de medula óssea, tecido adiposo e sangue de cordão umbilical. Mais de 90% da população de CTMs derivadas de TA expressa a proteína DZIP1. Dados indiretos sugerem que DZIP1 tem atividade na manutenção da autorrenovação das CTGs e CTEs, pois essa proteína interage com DAZ e DAZL (MOORE e cols, 2004). Segundo Moore (2004), *dzip1* se mantém constante durante a diferenciação das células-tronco embrionárias em corpos embrióides, enquanto DAZL sofre redução considerável a partir do

sétimo dia. No presente trabalho, a expressão do transcrito e proteína DZIP1 foi analisada durante a adipogênese das CTMs. Esse transcrito sofre redução no nível de expressão nas CTMs de TA induzidas à adipogênese a partir do sétimo dia. No entanto, quando foi analisado o perfil de expressão da proteína, notou-se que a presença de DZIP1 parece ser constante, dessa forma se DZIP1 está envolvido em algum mecanismo de manutenção da autorrenovação ou diferenciação, sua atividade é dependente de sua ativação e/ou localização celular. A distinção nos níveis de expressão do transcrito para a proteína reflete a existência de regulação transcricional e pós transcricional. Resultados prévios localizaram as proteínas DAZ e DAZL durante os estágios de diferenciação de células germinativas masculinas e durante a espermatogênese (REIJO e cols, 2000). DZIP1 se localiza no núcleo e citoplasma em células germinativas primordiais em um padrão idêntico aos das proteínas DAZ e DAZL (MOORE e cols 2004, REIJO e cols, 2000). Em testículo humano, as proteínas DAZ e DAZL têm localização nuclear e citoplasmática nas espermatogônias e no início da meiose dos espermatócitos elas se deslocam para o citoplasma (REIJO e cols, 2000). Já a localização de DZIP1 nessas células indica que a proteína é predominantemente nuclear com alguns casos de localização no citoplasma da espermatogônia. (MOORE e cols 2004). Aqui, DZIP1 foi identificado predominantemente no núcleo das CTMs derivadas de TA em culturas mantidas com o meio DMEM/F12. Entretanto, ao longo da cultura das CTMs com o meio Poietic™ (Cambrex), a localização de DZIP1 é citoplasmática e evidente nas células granulosa descritas anteriormente. Contudo, nas células diferenciadas em adipócitos, DZIP1 se localiza no núcleo e citoplasma.

Durante o desenvolvimento animal, o destino das células se dá em resposta a gradientes de sinais moleculares no embrião. Membros da família Hedgehog controlam uma variedade de processos durante o desenvolvimento embrionário, que abrange desde a padronização dos segmentos de *D. melanogaster* até a organogênese, assimetria direito-esquerdo e padronização dorsoventral da coluna vertebral e a parte anterior do cérebro em vertebrados (McMAHON e cols. 2003). SEKIMIZU e seus colaboradores (2004) identificaram no *locus iguana* em zebrafish, um gene que quando mutado resulta em um fenótipo parecido com o resultante da interferência da via Hedgehog. Esse *locus* codifica DZIP1, uma proteína requerida para a regulação adequada da via de sinalização Hedgehog. Segundo WOLFF (2004), *iguana* (ortólogo de DZIP1) é essencial para a transdução de sinal na via Hedgehog em embriões de *Zebrafish*. A distribuição de *iguana* é exclusivamente citoplasmática, porém, quando a PKA (*cAMP dependent protein kinase*) é inativada há uma translocação nuclear de *Iguana* (SEKIMIZU e cols, 2004; WOLFF e cols 2004). *Iguana* foi descrita como “porteiro nuclear” (*Nuclear gatekeeper*) responsável pelo deslocamento núcleo-

citoplasma de elementos dessa via. A proteína iguana se localiza no citoplasma, mas ela é translocada para o núcleo em resposta aos mesmos sinais que ativam Gli (proteína da via Hedgehog). Essa translocação poderia ser dirigida pela interação de iguana com Gli, então a localização nuclear de Iguana seria para a modulação da atividade nuclear de Gli ou somente para o transporte dessa proteína (WOLFF e cols., 2004). A via Hedgehog tem um papel central no controle da proliferação e diferenciação de CTMs e adultas (KATOH & KATOH, 2006). Dessa forma, a localização de DZIP1 nas CTMs também poderia ser dependente de fosforilação. DZIP1 poderia estar regulando a distribuição intracelular de Gli dependendo do seu estado de fosforilação e, portanto fazendo a translocação de proteínas e/ou mRNA núcleo-citoplasma nas CTMs após o início da diferenciação celular.

As proteínas da família PUF são RBPs que se unem a região 3'UTR de alguns mRNA e modulam sua estabilidade em diversos eucariotos. WICKENS e seus colaboradores (2002) sugerem que as proteínas dessa família têm uma função primordial na sustentação da proliferação mitótica de células-tronco.

PUM e NANOS estabelecem a polaridade embrionária em *D. melanogaster*, pois promovem a deadenilação de mRNA *hunchback*, através disso reprimem a tradução do mRNA (WREDEN e cols., 1997). Além disso, essas proteínas têm função crítica no desenvolvimento das células-tronco germinativas de *D. melanogaster* (FORBES & LEHMANN, 1998). PUM2 está expresso em aproximadamente 50% da população de CTMs isoladas de TA. Considerando que a cultura de CTMs é heterogênea pode-se sugerir uma delimitação de uma sub-população através da expressão dessa proteína.

A relação entre a autorrenovação e a diferenciação das CTMs é inversamente proporcional, ou seja, quanto maior o seu comissionamento para uma linhagem madura, menor é sua atividade proliferativa. Segundo SALVETTI e seus colaboradores (2005), as proteínas PUF ativam uma função chave na sustentação da proliferação mitótica e autorrenovação nas células-tronco germinativas e somáticas. Sendo assim, esse trabalho analisou a expressão do transcrito de *pum2* em populações de CTMs em proliferação celular intensa e reduzida. O resultado demonstrou que a expressão de *pum2* é maior nas células em proliferação celular intensa. Esses resultados sugerem que PUM2 poderia estar envolvido em mecanismos de regulação da proliferação das CTMs. Um método colorimétrico com BrdU (bromodioxuridina) está sendo padronizado para obter dados quantitativos que corroborem com os dados atuais. Esse imunoensaio permite a quantificação da incorporação do BrdU ao DNA recém sintetizado de células proliferativas.

PUM2 se co-localiza com DAZ e DAZL no citoplasma e núcleo das espermatogônias, mas também está presente no citoplasma de espermátocitos jovens e maduros e nos oócitos (MOORE, 2003). Além desse artigo de Moore, não há descrição de PUM2 localizado no núcleo, dessa forma seria interessante fazer ensaios que confirmem a localização nuclear dessa proteína. Para isso, o fracionamento celular será realizado para analisar a proteína no núcleo das CTMs.

A localização de PUM2 nas CTMs de TA é nuclear, tal resultado não era esperado. As CTMs utilizadas para o ensaio de imunofluorescência eram recém plaqueadas, isso significa que as células estavam aderidas ao plástico do frasco de cultura e para a transferência das mesmas para as lamínulas foi necessário soltá-las do plástico com a adição de tripsina. Nesse processo, as células são lavadas com tampões e submetidas à tripsinização o que gera estresse metabólico nas mesmas. No entanto, VESSEY e seus colaboradores (2006) relatam a presença de PUM2 em grânulos de estresse em neurônios e não descrevem a modificação na localização núcleo-citoplasma. Dessa forma, a localização nuclear de PUM2 em CTMs de TA parece não estar relacionado com o estresse metabólico. Outro elemento que poderia justificar a localização nuclear de PUM2 nas CTMs derivadas de TA é a presença de algum fator no meio de cultura DMEM/F12 suplementado. Pois quando se observa os resultados de imunofluorescência do controle durante a diferenciação celular, na qual se utiliza o meio Poietic™ (Cambrex), a localização de PUM2 é citoplasmática.

PUM2 é expresso durante o desenvolvimento neuronal e essa proteína se encontra em partículas discretas no corpo celular e no compartimento dendrítico do neurônio. Durante o estresse metabólico dos neurônios, PUM2 está presente em grânulos de estresse (VESSEY e cols., 2006) como descrito anteriormente. A sub-população de células granulosas citadas anteriormente, expressa PUM2 em maior intensidade do que nas células pouco granulosas. Lembrando que essas células granulosas foram notadas nas culturas mantidas com o meio Poietic™ (Cambrex). Portanto, pode-se supor que o meio Poietic™ (Cambrex) possua algum fator que altere o fenótipo das CTMs, fazendo com que surjam grânulos de estresse citoplasmáticos em uma fração da população. E, deste modo, PUM2 poderia estar fazendo parte desses grânulos e por isso se apresenta mais evidente nessa sub-população.

Em células-tronco embrionárias, PUM2 se liga a elementos 3'UTR dos mRNA de *erk2* (*extracellular signal-regulated kinase*) e *p38α* (homólogos às MAPK humana – *mitogen-activated protein*) (LEE e cols., 2007). ERK2 e *p38α* promovem a sinalização da diferenciação e inibição da autorrenovação (BURDON e cols., 2002). Dessa forma, PUM2 poderia estar regulando a tradução desses mRNAs nas CTMs e quando induzida a

diferenciação a expressão de PUM2 diminui, deixando *erk2* e *p38a* livres para serem traduzidos.

Quando a célula está se comissionando para a linhagem adipocítica, a célula reduz sua proliferação, então se PUM2 está envolvida nesse processo o nível de expressão dela deve reduzir também. No resultado do ensaio de western blot, a expressão de PUM2 nas CTMs induzidas não é mais detectada a partir do 14^o dia, essa ausência de sinal pode ser explicada, pois a proliferação reduz. A intensidade de PUM2 reduziu nas CTMs induzidas assim como houve modificação em sua localização. E, por fim, a expressão de *pum2* nas CTMs com proliferação intensa aumentou. Os dados de western blot, imunofluorescência e proliferação celular se corroboram, dessa forma PUM2 parece estar envolvida no controle da proliferação das CTMs.

Todos esses resultados permitiram abrir um leque de possibilidades para estudar a biologia molecular das CTMs com mais detalhes e principalmente a regulação em nível pós-transcricional de mecanismos chaves da autorrenovação e diferenciação celular. Dessa forma, ensaios de *knockdown* de *dzip1* e *pum2* por interferência de RNA em CTMs estão sendo providenciados para esclarecer a função desses elementos nessas células.

7. CONCLUSÕES

1. Os transcritos de *dzip1*, *pum2*, *pum1*, *nanos* e *stau* são expressos em CTMs derivadas de MO, TA e SCU.
2. A proteína DZIP1 é expressa em CTMs derivadas de MO, TA e SCU. E mais de 90% da população de CTMs derivadas de TA expressam DZIP1.
3. A expressão do transcrito de *dzip1* diminui após o início da adipogênese enquanto a expressão da proteína se mantém constante durante a diferenciação.
4. DZIP1 se localiza no núcleo das CTMs de TA e se transloca para o citoplasma ao longo do tempo. As células diferenciadas em adipócitos também expressam DZIP1 no núcleo e/ou citoplasma.
5. A proteína PUM2 é expressa em CTMs derivadas de TA e metade da população expressa essa proteína.
6. A expressão do transcrito e proteína PUM2 diminui após o início da adipogênese.
7. PUM2 se localiza no núcleo das CTMs de TA e se transloca para o citoplasma ao longo do tempo. As CTMs induzidas á adipogênese apresentam PUM2 com localização nuclear e citoplasma e com menor intensidade que as células do controle.
8. A expressão do transcrito de *pum2* aumenta nas populações de CTMs em proliferação intensa em relação á população com proliferação reduzida.

8. REFERENCIAS

NIH - **Stem Cell Basics: Introduction In Stem Cell Information** [World Wide Web site]. Bethesda, MD: National Institutes of Health, U.S. Department of Health and Human Services, 2006. Avaliado em 10 de março de 2009 de <http://stemcells.nih.gov/info/basics/basics1>.

Department of Health and Human Services. **Regenerative Medicine**. August 2006. <http://info/scireport/2006report.htm>

Department of Health and Human Services. **Stem Cells: Scientific Progress and Future Research Directions**. June 2001. <http://info/scireport/2001report>.

ALBERTS, B., JOHNSON, A., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K. & WALTER, P. (2007) **Molecular Biology of the Cell**, 5 edição.

AKASAKA, Y., SAIKAWA, Y., FUJITA, K., KUBOTA, T., ISHIKAWA, Y., FUJIMOTO, A., ISHII, T., OKANO, H. & KITAJIMA, M. (2005) **Expression of a candidate marker for progenitor cells, Musashi-1, in the proliferative regions of human antrum and its decreased expression in intestinal metaplasia**. *Histopathology* 47, 348–356.

AMIT, M., CARPENTER, M.K., INOKUMA, M.S., CHIU, C.P., HARRIS, C.P., WAKNITZ, M.A., ITSKOVITZ-ELDOR, J., THOMSON, J.A. (2000). **Clonally derived human embryonic stem cell lines maintain pluripotency and proliferative potential for prolonged periods of culture**. *Dev. Biol.* 227, 271-278.

AVERY, S., INNIS, K., & MOORE, H., **The Regulation of Self-Renewal in Human Embryonic Stem Cells** - *Stem Cells And Development* 15:729–740 (2006)

AUWETER, S.D., OBERSTRASS, F.C. AND ALLAIN, F.H.T. (2006) **Sequence-specific binding of single-stranded RNA: is there a code for recognition?** *Nucleic Acids Res.* 34: 4943-4959.

BAKSH, D., SONG, L., TUAN, R.S. (2004) **Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy,** *J Cell Mol Med.* Jul-Sep;8(3):301-16.

BAYLIN, S.B. e SCHUEBEL, K.E. **The epigenomic era opens.** *Nature* 448:548-9, 2007

BEN-SHUSHAN E., THOMPSON J.R., GUDAS L.J., BERGMAN, Y. **Rex-1, a gene encoding a transcription factor expressed in the early embryo, is regulated via Oct-3/4 and Oct-6 binding to an octamer site and a novel protein, Rox-1, binding to an adjacent site.** *Mol Cell Biol.* 1998 Apr;18(4):1866-78

BHATTACHARYA, B.T., MIURA, R., BRANDENBERGER, J., MEJIDO, Y., LUO, A.X., YANG, B.H., JOSHI, I., GINIS, R.S., THIES, M., AMIT, I., LYONS, B.G., CONDIE, J., ITSKOVITZ-ELDOR, M.S., RAO AND R.K. PURI. (2004). **Gene expression in human embryonic stem cell lines: unique molecular signature.** *Blood* 103:2956–2964.

BIANCO, P., RIMINUCCI, M., KUZNETSOV, S., AND ROBEY, P.G. (1999). **Multipotential cells in the bone marrow stroma: regulation in the context of organ physiology.** *Crit. Rev. Eukaryotic. Gene Expr.* 9, 159-173.

BIANCO, P., RIMINUCCI, M., GRONTHOS, S., AND ROBEY, P.G. (2001). **Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications.** *Stem Cells.* 19, 180-192.

BÖYUM A., (1968) **Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of monuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g.**- *Scand J Clin Lab Invest Suppl.* 1968;97:77-89

BROFMAN, PR; CARVALHO, KA; GUARITA-SOUZA, LC; REBELATTO, C; HANSEN, P; SENEGAGLIA, AC; MYAGUE, N; FURUTA, M; FRANCISCO, JC; OLANDOSKI, M.

Transplante celular: análise funcional, imunocitoquímica e histopatológica em modelo experimental de miocardiopatia isquêmica utilizando diferentes células. *Rev Bras Cardiovasc* 19: 261-266. 2004.

BURDON, T., SMITH, A., SAVATIER, P., (2002) **Signalling, cell cycle and pluripotency in embryonic stem cells**, *Trends Cell Biol* 12: 432-438.

CAI, J., WEISS, M. L., & RAO, M. S., **In search of “stemness”**, *Experimental Hematology* 32 (2004) 585–598

CAPLAN, A.I. & DENNIS J.E.; **Mesenchymal stem cells as trophic mediators.** *J Cell Biochem.* 2006 Aug 1;98(5):1076-84

CHAMBERS, I., COLBY, D., ROBERTSON, M., NICHOLS, J., LEE, S., TWEEDIE, S., SMITH, A. **Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells.** *Cell.* 2003 May 30;113(5):643-55.

CHANDROSS, K.J. AND MEZEY, E. (2001). **Plasticity of adult bone marrow stem cells.** Mattson, M.P. and Van Zant, G. eds. (Greenwich, CT: JAI Press).

CHEN, S. & HARMON, A.C. **Advances in plant proteomics.** *Proteomics*, v. 6, p. 5504-5516, 2006.

CLARKE, D.L., JOHANSSON, C.B., WILBERTZ, J., VERESS, B., NILSSON, E., KARLSTRÖM, H., LENDAHL, U., AND FRISEN, J. (2000). **Generalized potential of adult neural stem cells.** *Science*. 288, 1660-1663.

COLTER, D., CLASS, R., DIGIROLAMO, C. M. & PROCKOP, D. J. **Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow.** (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 3213–3218.

COLTER, D. C., SEKIYA, I. & PROCKOP, D. J., **Identification of a subpopulation of rapidly selfrenewing and multipotential adult stem cells in colonies of human marrow stromal cells,** *PNAS*, July 3, 2001; vol. 98 no. 14, 7841–7845.

CRISAN, M., YAP, S., CASTEILLA, L., CHEN, C.W., CORSELLI, M., PARK, T.S., ANDRIOLO, G., SUN, B., ZHENG, B., ZHANG, L., NOROTTE, C., TENG, P.N., TRAAS, J., SCHUGAR, R., DEASY, B.M., BADYLAK, S., BUHRING, H.J., GIACOBINO, J.P., LAZZARI, L., HUARD, J., PÉAULT, B., **A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs.** *Cell - Stem Cell*. 2008 Sep 11;3(3):301-13

DANISLAV, S., SPASSOV, R., JURECIC **Cloning and comparative sequence analysis of PUM1 and PUM2 genes, human members of the Pumilio family of RNA-binding proteins,** *Gene* 299 (2002) 195–204.

DARR H., MAYSHAR, Y.. AND BENVENISTY, N. (2006). **Overexpression of NANOG in human ES cells enables feederfree growth while inducing primitive ectoderm features.** *Development* 133:1193–1201.

DELORME B., CHATEAUVIEUX S., CHARBORD P., **The concept of mesenchymal stem cells.** *Regen Med*. 2006 Jul;1(4):497-509

DERUBEIS, A.R. & CANCEDDA, R. (2004) **Bone marrow stromal cells (BMSCs) in bone engineering: limitations and recent advances.** *Ann Biomed Eng* 32:160Y165, 2004.

DE UGARTE, D.A., MORIZONO, K., ELBARBARY, A., ALFONSO, Z., ZUK P.A., ZHU M., DRAGOO J.L., ASHJIAN P., THOMAS B., BENHAIM P., CHEN I., FRASER J., **Comparison of multi-lineage cells from human adipose tissue and bone marrow.** *Cells Tissues Organs*. 2003;174(3):101-9.

D'IPPOLITO, G., HOWARD, G.A., ROOS, B.A., SCHILLER, P.C.: **Isolation and characterization of marrow-isolated adult multilineage inducible (MIAMI) cells.** *Exp Hematol* (2006) 34:1608-1610.

DOMINICI, M., LE BLANC, K., MUELLER, I., SLAPER-CORTENBACH, I., MARINI, F., KRAUSE, D., DEANS R., KEATING, A., PROCKOP, D.J., HORWITZ, E., **Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells.** The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. (2006)8(4):315-7.

DUBNAU J., CHIANG A.S., GRADY L., BARDITCH J., GOSSWEILER S., MCNEIL J., SMITH P., BULDOC F., SCOTT R., CERTA U., BROGER C., TULLY T. **The staufen/pumilio pathway is involved in Drosophila long-term memory.** *Curr Biol* 2003; 13:286-96.

DUBNAU, J., CHIANG, A.S., GRADY, L., BARDITCH, J., GOSSWEILER, S., MCNEIL, J., SMITH, P., BULDOC, F., SCOTT, R., CERTA, U., BROGER, C., FLUCKIGER, A.C., MARCY, G., MARCHAND, M., NÉGRE, D., COSSET, F.L., MITALIPOV, S., WOLF, D., SAVATIER, P., DEHAY, C. (2006) **Cell cycle features of primate embryonic stem cells.** *Stem Cells* Mar;24(3):547-56.

DUCY, P., ZHANG, R., GEOFFROY, V., RIDALL, A. L. AND KARSENTY, G. (1997) **Osf2/Cbfa1: a transcriptional activator of osteoblast differentiation.** *Cell* 89, 747–754. 12

EDWARDS, T.A., PYLE, S.E., WHARTON, R.P., AGGARWAL, A.K. **Structure of Pumilio reveals similarity between RNA and peptide binding motifs**, *Cell*. 2001 Apr 20;105(2):281-9

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

FILIPOWICZ, W., BHATTACHARYYA, S.N., SONENBERG, N.: **Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight?** *Nat Rev Genet* 2008, 9:102-114.

FORBES, A., LEHMANN, R., **Nanos and Pumilio have critical roles in the development and function of Drosophila germline stem cells**. *Development*. 1998 Feb;125(4):679-90.

FOX, M., URANO, J., REIJO-PERA, R.A. (2005) **Identification and characterization of RNA sequences to which human PUMILIO-2 (PUM2) and deleted in Azoospermia-like (DAZL) bind** / *Genomics* / Jan; 85(1):92-105.

GALGANO, A., FORRER, M., JASKIEWICZ, L., KANITZ, A., ZAVOLAN, M., GERBER, A.P. **Comparative analysis of mRNA targets for human PUF-family proteins suggests extensive interaction with the miRNA regulatory system**. *PLoS ONE*. 2008 Sep 8;3(9):e3164

GANG, E.J., BOSNAKOVSKI, D., FIGUEIREDO, C.A., VISSER, J.W., PERLINGEIRO, R.C. **SSEA-4 identifies mesenchymal stem cells from bone marrow**. *Blood*. 2007 Feb 15;109(4):1743-51. Epub 2006 Oct 24.

GARGETT, C.E., SCHWAB, K.E., ZILLWOOD, R.M., NGUYEN, H.P., WU D. **Isolation and Culture of Epithelial Progenitors and Mesenchymal Stem Cells from Human Endometrium**, *Biol Reprod.* 2009 Feb 18

GHAZIZADEH, S. AND TAICHMAN, L.B. (2001). **Multiple classes of stem cells in cutaneous epithelium: a lineage analysis of adult mouse skin.** *EMBO J.* 20, 1215-1222.

GOODRISCH, L. V. & SCOTT, M. P. (1998) **Hedgehog and patched in neural development and disease.** *Neuron* 21, 1243-1257

GREENSPAN, P, MAYER, EP, FOWLER, SD. **Nile red: a selective fluorescent stain for intracellular lipid droplets.** *J Cell Biol.* 1985 Mar;100(3):965-73.

GUILLOT, P.V., CUI, W., FISK, N.M., POLAK, D.J. (2007) **Stem cell differentiation and expansion for clinical applications of tissue engineering -** *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 11 (5) , 935–944 doi:10.1111/j.1582-4934.2007.00106.x

GUPTA, S., VERFAILLIE, C., CHMIELEWSKI, D., KREN S., EIDMAN, K., CONNAIRE, J., HEREMANS, Y., LUND, T., BLACKSTAD, M., JIANG, Y., LUTTUN, A., ROSENBERG, M.E., **Isolation and characterization of kidney-derived stem cells.** *J Am Soc Nephrol.* 2006 Nov;17(11):3028-40. Epub 2006 Sep 20

HAY, D.C., L. SUTHERLAND, J. CLARK, & T. BURDON. (2004). **Oct-4 knockdown induces similar patterns of endoderm and trophoblast differentiation markers in human and mouse embryonic stem cells.** *Stem Cells* 22:225–235.

HENG, BC, LIU, H, CAO, T. **Feeder cell density-a key parameter in human embryonic stem cell culture.** *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 2004 Sep-Oct;40(8-9):255-7

HUANG, A.H., CHEN, Y.K., LIN, L.M., SHIEH, T.Y., CHAN, A.W., **Isolation and characterization of dental pulp stem cells from a supernumerary tooth.** *J Oral Pathol Med.* 2008 Oct;37(9):571-4. Epub 2008 Mar 6

HYSLOP, L., M. STOJKOVIC, L. ARMSTRONG, T. WALTER, P. STOJKOVIC, S. PRZYBORSKI, M. HERBERT, A. MURDOCH, T. STRACHAN AND M. LAKO. (2005). **Downregulation of NANOG induces differentiation of human embryonic stem cells to extraembryonic lineages.** *Stem Cells* 23:1035–1043.

ITSKOVITZ-ELDOR, J., SCHULDINER, M., KARSENTI, D., EDEN, A., YANUKA, O., AMIT, M., SOREQ, H., AND BENVENISTY, N. (2000). **Differentiation of human embryonic stem cells into embryoid bodies comprising the three embryonic germ layers.** *Mol. Med.* 6, 88-95.

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

JARUZELSKA, J., KOTECKI, M., KUSZ, K., SPIK, A., FIRPO, M., REIJO-PERA, R.A. (2002) **Conservation of a Pumilio-Nanos complex from drosophila germ plasm to human germ cells** / *Development Genes and Evolution*, Dezembro 2002, 120-126.

KANEKO, Y., SAKAKIBARA, S., IMAI, T., SUZUKI, A., NAKAMURA, Y., SAWAMOTO, K., OGAWA, Y., TOYAMA, Y., MIYATA, T.&OKANO, H. (2000) **Musashi1: an evolutionally conserved marker for CNS progenitor cells including neural stem cells.** *Dev. Neurosci.* 22, 139–153.

KATOH, Y. & KATOH, M. **Hedgehog signaling pathway and gastrointestinal stem cell signaling network (review).** *Int J Mol Med.* 2006 Dec;18(6):1019-23

KEENE, J. (2001) **Ribonucleoprotein infrastructure: regulating the flow of genetic information between the genome and the proteome.** *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 98: 7018-7024.

KILTY, I.C., BARRACLOUGH, R., SCHMIDT, G., RUDLAND, P.S., **Isolation of a potential neural stem cell line from the internal capsule of an adult transgenic rat brain,** *J Neurochem.* 1999 Nov;73(5):1859-70.

KIM, S.J., SH CHEON, S.J. YOO, J, KWON, J.H. PARK, C.G. KIM, K. RHEE, S. YOU, J.Y. LEE, S.I. ROH & H.S. YOON. (2005). **Contribution of the PI3K/Akt/PKB signal pathway to maintenance of self-renewal in human embryonic stem cells.** *FEBS Lett* 579:534–540.

KOTOBUKI, N., HIROSE, M., TAKAKURA, Y., OHGUSHI, H., **Cultured autologous human cells for hard tissue regeneration: preparation and characterization of mesenchymal stem cells from bone marrow.** *Artif Organs.* 2004 Jan;28(1):33-9

KRAFT. H.J., MOSSELMAN, S., SMITS, H.A., HOHENSTEIN, P., PIEK, E., CHEN, Q., ARTZT, K., VAN ZOELLEN, E.J. **Oct-4 regulates alternative platelet-derived growth factor alpha receptor gene promoter in human embryonal carcinoma cells.** *J Biol Chem.* 1996 May 31;271(22):12873-8)

KRAUSE, D.S., THEISE, N.D., COLLECTOR, M.I., HENEGARIU, O., HWANG, S., GARDNER, R., NEUTZEL, S., AND SHARKIS, S.J. (2001). **Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell.** *Cell.* 105, 369-377.

KURODA, T., M. TADA, H. KUBOTA, H. KIMURA, S.Y. HATANO, H. SUEMORI, N. NAKATSUJI, T. TADA. (2005). **Octamer and Sox elements are required for transcriptional cis regulation of Nanog gene expression.** *Mol Cell Biol* 25: 2475–2485.

LAEMMLI, U.K., **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.** *Nature*. 1970 Aug 15;227(5259):680-5

LAWSON, D.A., XIN L., LUKACS R.U., CHENG D., WITTE O.N. **Isolation and functional characterization of murine prostate stem cells.** *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Jan 2;104(1):181-6. Epub 2006 Dec 21.

LANDY, A., **Dynamic, structural, and regulatory aspects of lambda site-specific recombination.,** *Annu Rev Biochem*. 1989;58:913-49

LEBWOWSKI, J.S., GOLD, J., XU, C., FUNK, W., CHIU, C.P., CARPENTER, M.K. **Human embryonic stem cells: culture, differentiation, and genetic modification for regenerative medicine applications.** *Cancer J*. 7 suppl. 2, S83-S93 (2001)

LEE, O.K., KUO, T.K., CHEN, W.M., LEE, K.D., HSIEH, S.L., CHEN, T.H., **Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood.** *Blood*. 2004 Mar 1;103(5):1669-75. Epub 2003 Oct 23.

LEE, M.H., HOOK, B., PAN, G., KERSHNER, A.M., MERRITT, C., SEYDOUX, G., THOMSON, J.A., WICKENS, M., KIMBLE, J., (2007) **Conserved regulation of MAP kinase expression by PUF RNA-binding proteins,** *PLoS Genet*. 2007 Dec 28;3(12):e233

MA, Y., LI, Q., ZHAO, D.Q., WANG, S.F., LI, W.Z., MIN, J., GU, Y., **Isolation, cultivation of adipose-derived mesenchymal stem cells and its chondrogenic ability**, *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi*. 2007 May;23(5):463-5

MACDONALD, P.M., 1992. **The *Drosophila pumilio* gene: an unusually long transcription unit and an unusual protein**. *Development* 114, 221–232.

MCMAHON, A., INGHAM, P. AND TABIN, C. (2003). **The developmental roles and clinical significance of Hedgehog signaling**. *Curr. Top. Dev. Biol.* **53**, 1- 114.

MARSHAK, D.R., GOTTLIEB, D., KIGER, A.A., FULLER, M.T., KUNATH, T., HOGAN, B., GARDNER, R.L., SMITH, A., KLAR, A.J.S., HENRIQUE, D., D'URSO, G., DATTA, S., HOLLIDAY, R., ASTLE, C.M., CHEN, J., HARRISON, D.E., XIE, T., SPRADLING, A., ANDREWS, P.W., PRZYBORSKI, S.A., THOMSON, J.A., KUNATH, T., STRUMPF, D., ROSSANT, J., TANAKA, S., ORKIN, S.H., MELCHERS, F., ROLINK, A., KELLER, G., PITTENGER, M.F., MARSHAK, D.R., FLAKE, A.W., PANICKER, M.M., RAO, M., WATT, F.M., GROMPE, M., FINEGOLD, M.J., KRITZIK, M.R., SARVETNICK, N., AND WINTON, D.J. (2001). **Stem cell biology**, *Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press*.

MAZUMDER, B., SESHADRI, V., FOX, P.L. **Translational control by the 3'-UTR: the ends specify the means**. *Trends Biochem Sci*. 2003 Feb;28(2):91-8. Review.

MEIRELLES, L.S., CHAGASTELLES, P.C., NARDI, N.B., **Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues**. *J Cell Sci*. 2006 Jun 1;119(Pt 11):2204-13.

MIKKERS, H. & FRISEN, J. (2005) **Deconstructing stemness**, *The EMBO Journal* 24, 2715–2719

MITSUI K., TOKUZAWA Y., ITOH H., SEGAWA K., MURAKAMI M., TAKAHASHI K., MARUYAMA M., MAEDA M., YAMANAKA S., **The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells.** *Cell.* 2003 May 30;113(5):631-42

MOORE, F.L., JARUZELSKA, J., FOX, M.S., URANO, J., FIRPO, M.T., TUREK, P.J., DORFMAN, D.M., REIJO-PERA, R.A. (2003) **Human Pumilio-2 is expressed in embryonic stem cells and germ cells and interacts with DAZ (Deleted in AZoospermia) and DAZ-Like proteins** - *PNAS*, January 21, 2003, vol. 100, no. 2 , 538-543. (MOORE e cols, 2003)

MOORE, F.L., JARUZELSKA. J., DORFMAN. D.M., REIJO-PERA, R.A. (2004) **Identification of a novel gene, DZIP (DAZ-Interacting protein), that encodes a protein that interacts with DAZ (deleted in azoospermia) and is expressed in embryonic stem cells and germ cells** / *Genomics* vol. 83, n^o5, pp. 834-843.

MOORE, M.J. **From birth to death: the complex lives of eukaryotic mRNAs.** 2005. *Science* 309: 1514-1518.

MORRIS, D. R.; KAKEGAWA, T.; KASPAR, R. L.; WHITE, M. W. **Polypyrimidine tracts and their binding proteins: regulatory sites for posttranscriptional modulation of gene expression.** *Biochemistry*, 32, 2931–2937, 1993.

NAKAHATA, S., KATSU, Y., MITA, K., INOUE, K., NAGAHAMA, Y., YAMASHITA, M., 2001. **Biochemical identification of Xenopus Pumilio as a sequencespecific Cyclin B1 mRNA-binding protein that physically interacts with a Nanos homolog (Xcat-2) and a cytoplasmic polyadenylation elementbinding Protein (CPEB).** *J. Biol. Chem.* 276, 20945–20953.

NAKASHIMA, K.,ZHOU, X.,KUNKEL,G.,ZHANG,Z., DENG, J. M., BEHRINGER, R. R. AND DE CROMBRUGGHE, B. (2002) **The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation.** *Cell* 108, 17–29.

NICHOLS, J., ZEVIK, B., ANASTASSIADIS, K., NIWA, H., KLEWE-NEBENIUS, D., CHAMBERS, I., SCHÖLER, H., SMITH, A., **Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4.** *Cell* 95, 379-391(1998)

NISHIMOTO, M., FUKUSHIMA, A., OKUDA, A., MURAMATSU, M., **The gene for the embryonic stem cell coactivator UTF1 carries a regulatory element which selectively interacts with a complex composed of Oct-3/4 and Sox-2.** *Mol Cell Biol.* 1999 Aug;19(8):5453-65)

NIWA, H., MIYAZAKI, J., SMITH, A.G., **Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells.** *Nat Genet.* 2000 Apr;24(4):372-6).

ODORICO, J.S., KAUFMAN, D.S., AND THOMSON, J.A. (2001). **Multilineage Differentiation from Human Embryonic Stem Cell Lines.** *Stem Cells.* 19, 193-204.

OKAMOTO, K., OKAZAWA, H., OKUDA, A., SAKAI, M., MURAMATSU, M., HAMADA, H., **A novel actamer binding transcription factor is differentially expressed in mouse embryonic stem cells.** *Cell* 60, 461-472(1990),

OKITA, K., ICHISAKA, T., YAMANAKA, S., (2006) **Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells.** *Nature.* 2007 Jul 19;448(7151):313-7.

OLIVAS, W., PARKER, R., 2000. **The puf3 protein is a transcript-specific regulator of mRNA degradation in yeast.** *EMBO J.* 19, 6602–6611.

PAPAGIANNAKOPOULOS, T. & KOSIK, K. S., **MicroRNAs: regulators of oncogenesis and stemness,** *BMC Medicine* 2008, 6:15 doi:10.1186/1741-7015-6-15

PATEL, A.N., PARK, E., KUZMAN, M., BENETTI, F., SILVA, F.J., ALLICKSON, J.G., **Multipotent menstrual blood stromal stem cells: isolation, characterization, and differentiation.** *Cell Transplant.* 2008;17(3):303-11.

PEDERSEN, R.A. (1999). **Embryonic stem cells for medicine.** *Sci. Am.* 280, 68-73.

PEKOVIC, V. & HUTCHISON, C.J., **Adult stem cell maintenance and tissue regeneration in the ageing context: the role for A-type lamins as intrinsic modulators of ageing in adult stem cells and their niches,** *J. Anat.* (2008) 213 , pp5–25

PEBAY, A., R.C. WONG, S.M. PITSON, E.J. WOLVETANG, G.S. PEH, A. FILIPCZYK, K.L. KOH, I. TELLIS, L.T. NGUYEN & M.F. PERA. (2005). **Essential roles of sphingosine-1-phosphate and platelet-derived growth factor in the maintenance of human embryonic stem cells.** *Stem Cells* 23:1541–1548.

PETERSEN, B.E., BOWEN, W.C., PATRENE, K.D., MARS, W.M., SULLIVAN, A.K., MURASE, N., BOGGS, S.S., GREENBERGER, J.S., AND GOFF, J.P. (1999). **Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells.** *Science.* 284, 1168-1170.

PITTENGER, M.F.; MACKAY, A.M.; BECK, S.C.; JAISWAL R.K.; DOUGLAS, R.; MOSCA, J.D.; MOORMAN, M.A.; SIMONETTI, D.W.; CRAIG, S.; MARSHAK,

D.R.(1999) **Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells.** *Science*, 284:143-7.

PLOEMACHER, R.E., BRONS, N.H., **Isolation of hemopoietic stem cell subsets from murine bone marrow: I. Radioprotective ability of purified cell suspensions differing in the proportion of day-7 and day-12 CFU-S.** *Exp Hematol.* 1988 Jan;16(1):21-6.

POTTEN, C. S., BOOTH, C., TUDOR, G. L., BOOTH, D., BRADY, G., HURLEY, P., ASHTON, G., CLARKE, R., SAKAKIBARA, S. & OKANO, H. (2003) **Identification of a putative intestinal stem cell and early lineage marker; musashi-1.** *Differentiation* 71, 28–41

PYNE, S. & N.J. PYNE (2000). **Sphingosine 1-phosphate signalling in mammalian cells.** *Biochem J* 349:385– 402

RADHAKRISHNA, U., WILD, A., GRZESCHIK, K.-H & ANTONARAKIS, S. E. (1997) **Mutation in Gli3 in postaxial polydactyly type A.** *Nat. Genet.* 17, 269-271.

RAMAKRISHNAN, S; KOTHARI, SS; BAHL, VK. **Stem cells and myocardial regeneration.** *Indian Heart J*, 55: 119-24. 2003.

RANGAPPA, S; FEN, C; LEE, EH; BONGSO, A; WEI, EK. **Transformation of adult mesenchymal stem cells isolated from the fatty tissue into cardiomyocytes.** *Ann Thorac Surg*, 75:775-9. 2003.

RATAJCZAK, M.Z., KUCIA, M., MAJKA, M., RECA, R., RATAJCZAK, J.: **Heterogeneous populations of bone marrow stem cells – are we spotting on the same cells from the different angles?** *Folia Histochem Cytobiol* 2004, **42(3)**:139-146.

RATAJCZAK, M.Z., ZUBA-SURMA, E.K., WYSOCZYNSKI, M., RATAJCZAK, J., KUCIA, M.: **Very small embryonic-like stem cells: characterization, developmental origin, and biological significance.** *Exp Hematol* 2008, **36**:742-751.

REBELATTO, C.K., AGUIAR, A.M., MORETÃO, M.P., SENEGAGLIA, A.C., HANSEN, P., BARCHIKI, F., OLIVEIRA, J., MARTINS, J., KULIGOVSKI, C., MANSUR, F., CHRISTOFIS, A., AMARAL, V.F., BROFMAN, P.S., GOLDENBERG, S., NAKAO, L.S., CORREA, A. (2008) **Dissimilar differentiation potential of mesenchymal stem cells isolated from bone marrow, umbilical cord blood and adipose tissue.** *Experimental Biology and Medicine* 2008; 0: 0712-RM-356v1

REIJO, R., LEE, T.Y., SALO, P., ALAGAPPAN, R., BROWN, L.G., ROSENBERG, M., ROZEN, S., JAFFE, T., STRAUS, D., HOVATTA, O., (1995) **Diverse spermatogenic defects in humans caused by Y chromosome deletions encompassing a novel RNA-binding protein gene.** *Nat Genet.* 1995 Aug;10(4):383-93

REIJO, R.A., DORFMAN, D.M., SLEE, R., RENSHAW, A.A., LOUGHLIN, K.R., COOKE, H., PAGE, D.C. **DAZ family proteins exist throughout male germ cell development and transit from nucleus to cytoplasm at meiosis in humans and mice.** *Biol Reprod.* 2000 Nov;63(5):1490-6.

REYNOLDS, N., COOKE, H.J. **Role of the DAZ genes in male fertility.** *Reprod Biomed Online.* 2005 Jan;10(1):72-80

RODDA, D.J., J.L. CHEW, L.H. LIM, Y.H. LOH, B. WANG, H.H. NG AND P. ROBSON. (2005). **Transcriptional regulation of nanog by OCT4 and SOX2.** *J Biol Chem* 280:24731–24737

ROMANOV, Y.A., SVINTSITSKAYA, V.A., SMIRNOV, V.N., **Searching for alternative sources of postnatal human mesenchymal stem cells: candidate MSC-like cells from umbilical cord.** *Stem Cells*. 2003;21(1):105-10.

ROSEN, E. D., WALKEY, C. J., PUIGSERVER, P. & SPIEGELMAN, B. M. (2000) **Transcriptional regulation of adipogenesis.** *Genes Dev.* 14, 1293–1307.

ROSNER, M.H., VIGANO, M.A., OZATO, K., TIMMONS, P.M., POIRIER, F., RIGBY, P.W., STAUDT, L.M., **A POU-domain transcription factor in early stem cells and germ cells of the mammalian embryo.** *Nature* 345, 686-692 (1990).

SALVETTI, A., ROSSI, L., LENA, A., BATISTONI, R., DERI, P., RAINALDI, G., LOCCI, M.T., EVANGELISTA, M., GREMIGNI, V. (2005) **DjPum, a homologue of Drosophila Pumilio, is essential to planarian stem cell maintenance /** *Development* 132, 1863-1874.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: A laboratory manual.** *Cold Spring Harbor, N.Y. USA*, 1989.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 74(12) p. 5463-5467, 1977.

SATO, N., L. MEIJER, L. SKALTSOUNIS, P. GREENGARD & A.H. BRIVANLOU (2004). **Maintenance of pluripotency in human and mouse embryonic stem cells through activation of Wnt signaling by a pharmacological GSK-3-specific inhibitor.** *Nature Med* 10:55–63.

SEKIMIZU, K., NISHIOKA, N., SASAKI, H., TAKEDA, H., KARLSTROM, R.O., KAWAKAMI, A., **The zebrafish iguana locus encodes Dzip1, a novel zinc-finger protein**

required for proper regulation of Hedgehog signaling. *Development.* 2004 Jun;131(11):2521-32.

SHI, Y., & J., MASSAGUE (2003). **Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus.** *Cell* 113:685–700.

SIDDALL, N.A., MCLAUGHLIN, E.A., MARRINER, N.L., HIME, G.R. **The RNA-binding protein Musashi is required intrinsically to maintain stem cell identity.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 May 30;103(22):8402-7. Epub 2006 May 22

SILVA, M. M., BOUZAS, L.F.S. & FILGUEIRA, A.L., **Manifestações tegumentares da doença enxerto contra hospedeiro em pacientes transplantados de medula óssea,** *An Bras Dermatol.* 2005;80(1):69-80.

SOUZA, G.M., DA SILVA, A.M., KUSPA, A., 1999. **Starvation promotes Dictyostelium development by relieving PufA inhibition of PKA translation through the YakA kinase pathway.** *Development* 126, 3263–3274.

SPASSOV, D.S., JURECIC, R. (2003) **Mouse Pum1 and PUM2 genes, members of the Pumilio family of RNA-binding proteins, show differential expression in fetal and adult hematopoietic stem cells and progenitors.** *Blood Cells Mol Dis.* 2003 Jan-Feb;30(1):55-69

STRAUER, B.E., KORNOWSKI, R., **Stem cell therapy in perspective.** *Circulation.* 2003 Feb 25;107(7):929-34

TADAUCHI, T., MATSUMOTO, K., HERSKOWITZ, I., IRIE, K., 2001. **Posttranscriptional regulation through the HO 30-UTR by Mpt5, a yeast homolog of Pumilio and FBF.** *EMBO J.* 20, 552–561.

THOMAS, E.D., **History, current results, and research in marrow transplantation.** *Perspect Biol Med.* 2005 Winter;38(2):230-7

TOMIOKA, M., M. NISHIMOTO, S. MIYAGI, T. KATAYANAGI, N. FUKUI, H. NIWA, M. MURAMATSU, A. OKUDA. (2002). **Identification of Sox-2 regulatory region which is under the control of Oct-3/4-Sox-2 complex.** *Nucleic Acids Res* 30:3202–3213

TOMITA, S; LI, RK; WEISEL, RD; MICKLE, DA; KIM, EJ; SAKAI, T; JIA, ZQ. **Autologous transplantation of bone marrow cells improves damaged heart function.** *Circulation*, 100: II247-56. 1999.

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

TOWBIN, H.; STAEHELIN, T.; GORDON, J. **Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications.** *Proc Natl Acad Sci USA.* 76: 4350-4354, 1979.

UNWIN, R.D., WHETTON, A.D., **Systematic proteome and transcriptome analysis of stem cell populations.** *Cell Cycle.* 2006 Aug;5(15):1587-91. Epub 2006 Aug 1.

UNWIN, R.D., SMITH, D.L., BLINCO, D., WILSON, C.L., MILLER, C.J., EVANS, C.A., JAWORSKA, E., BALDWIN, S.A., BARNES, K., PIERCE, A., SPOONCER, E., WHETTON, A.D., **Quantitative proteomics reveals post-translational control as a regulatory factor in primary hematopoietic stem cells.** *Blood* 2006; 107:4687-94.

URANO, J., FOX, M.S., REIJO-PERA, R.A. (2005) **Interaction of the conserved meiotic regulators, BOULE (BOL) and PUMILIO-2 (PUM2).** *Mol Reprod Dev.* 2005 Jul;71(3):290-8

VESSEY, J.P., VACCANI, A., XIE Y., DAHM, R., KARRA, D., KIEBLER, M.A., MACCHI, P. - **Dendritic localization of the translational repressor Pumilio 2 and its contribution to dendritic stress granules.** *J Neurosci* 2006; 26:6496-508.

VILLARON, E.M., ALMEIDA, J., LÓPEZ-HOLGADO, N., ALCOCEBA, M., SÁNCHEZ-ABARCA, L.I., SANCHEZ-GUIJO, F.M., ALBERCA, M., PÉREZ-SIMON, J.A., SAN MIGUEL, J.F., DEL CAÑIZO, M.C. **Mesenchymal stem cells are present in peripheral blood and can engraft after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation.** *Haematologica.* 2004 Dec;89(12):1421-7.

WALL, M.E., BERNACKI, S.H., LOBOA, E.G. **Effects of serial passaging on the adipogenic and osteogenic differentiation potential of adipose-derived human mesenchymal stem cells.** *Tissue Eng.* 2007 Jun;13(6):1291-8.

WALLIS, D. & MUENKE, M. (2000) **Mutations in holoprosencephaly.** *Hum. Mutat.* 16, 99-108.

WANG, X., ZAMORE, P.D., HALL, T.M., 2001. **Crystal structure of a Pumilio homology domain.** *Mol. Cell* 7, 855–865.

WEI, C.L., T. MIURA, P. ROBSON, S.L. LIM, X.Q. XU, M.Y. LEE, S. GUPTA, L. STANTON, Y. LUO, J. SCHMITT, S. THIES, W. WANG, I. KHREBTUKOVA, D. ZHOU, E.T. LIU, Y.J. RUAN, M. RAO AND B. LIM. (2005). **Transcriptome profiling of human and murine ESCs identifies divergent paths required to maintain the stem cell state.** *Stem Cells* 23:166–185.

WHARTON, R.P., SONODA, J., LEE, T., PATTERSON, M., MURATA, Y., 1998. **The Pumilio RNA-binding domain is also a translational regulator.** *Mol. Cell* 1, 863–872.

WHITE, J., DALTON, S., **Cell cycle control of embryonic stem cells.** *Stem Cell Rev.* 2005;1(2):131-8

WICKENS, M., BERNSTEIN, D.S., KIMBLE, J., PARKER, R. (2002) **A PUF family portrait: 3'UTR regulation as a way of life,** *Trends Genet.* Mar; 18(3):150-7.

WOLFF, C., ROY, S., LEWIS, K.E., SCHAUERTE, H., JOERG-RAUCH, G., KIRN, A., WEILER, C., GEISLER, R., HAFFTER, P., INGHAM, P.W. (2004) **iguana encodes a novel zinc-finger protein with coiled-coil domains essential for Hedgehog signal transduction in the zebrafish embryo / GENES & DEVELOPMENT** 18:1565-1576, 2004

WONG, M. & TUAN, R.S. **Nuserum, a synthetic serum replacement, supports chondrogenesis of embryonic chick limb bud mesenchymal cells in micromass culture,** In *Vitro Cell Dev Biol Anim.* 1993 Dec;29A(12):917-22

WREDEN, C., VERROTTI, A.C., SCHISA, J.A., LIEBERFARB, M.E., STRICKLAND, S., **Nanos and pumilio establish embryonic polarity in Drosophila by promoting posterior deadenylation of hunchback mRNA.** *Development.* 1997 Aug;124(15):3015-23

WU, H. e SUN, Y.E. **Epigenetic regulation of stem cell differentiation.** *Pediatric Research* 59(4): 21-25R, 2006.

XU, E.Y., MOORE, F.L., REIJO-PERA, R.A. (2001) **A gene family required for human germ cell development evolved from an ancient meiotic gene conserved in metazoans.** / *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 Jun 19.

XU, R.H., R.M. PECK, D.S. LI, X. FENG, T. LUDWIG, J.A. THOMSON. (2005). **Basic FGF and suppression of BMP signaling sustain undifferentiated proliferation of human ES cells.** *Nature Methods* 2:185–190.

XU, E.Y., CHANG, R., SALMON, N.A., REIJO PERA, R.A. (2007) **A gene trap mutation of a murine homolog of the Drosophila stem cell factor Pumilio results in smaller testes but does not affect litter size or fertility.** *Mol Reprod Dev* 74: 912–921.

YEOM, Y.I., FUHRMANN, G., OVITT, C.E., BREHM, A., OHBO, K., GROSS, M., HÜBNER, K., SCHÖLER, H.R., **Germline regulatory element of Oct-4 specific for the totipotent cycle of embryonal cells.** *Development* 122, 881-894(1996)

YOO, JU; BARTHEL, TS; NISHIMURA, K; SOLCHAGA, L; CAPLAN, AL; GOLDBERG, VM; JOHNSTONE, B. **The chondrogenic potential of human bone-marrow-derived mesenchymal progenitors cells.** *Journal of Bone and Joint Surgery, American* Volume 80: 1745-1757, 1998.

YUAN, H., CORBI, N., BASILICO, C., DAILEY, L. **Developmental-specific activity of the FGF-4 enhancer requires the synergistic action of Sox2 and Oct-3.** *Genes Dev.* 1995 Nov 1;9(21):2635-45

ZAMORE, P.D., WILLIAMSON, J.R., LEHMANN, R., 1997. **The Pumilio protein binds RNA through a conserved domain that defines a new class of RNA-binding proteins.** *RNA* 3, 1421–1433.

ZHANG, F.B., LI, L., FANG, B., ZHU, D.L., YANG, H.T., GAO, P.J. **Passage-restricted differentiation potential of mesenchymal stem cells into cardiomyocyte-like cells.** *Biochem Biophys Res Commun.* 2005 Oct 28;336(3):784-92

ZHANG, T., CHEN, D.X., FANG, N., LIU, Z.L., QI, Y., LIU, J.W. **Isolation and enrichment of hematopoietic stem/progenitor cells from human placenta tissue,** *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi.* 2006 Oct;14(5):955-8

ZHANG, B., GALLEGOS, M., PUOTI, A., DURKIN, E., FIELDS, S., KIMBLE, J., WICKENS, M.P., 1997. **A conserved RNA-binding protein that regulates sexual fates in the C. elegans hermaphrodite germ line.** *Nature* 390, 477–484

9. ANEXOS

ANEXO1

Nome do Iniciador	Sequência do Iniciador	Tamanho do amplicon (pb)	Temp. anel.*	Gene ID
FABP4F	5'ATGGGATGGAAAATCAACCA3'	97	60°C	NM_2167
FABP4R	5'GTGGAAGTGACGCCTTTCAT3'			
BOUF	5'CTGGAACAATGTATCTAACAAC 3'	451	60° C	NM_197970
BOUR	5'ATTGGCTCAGGCTGCATCACAG 3'			
DAZF	5'CTGTATATAATTATCAGGCATTTTC 3'	360	60° C	NM_004081
DAZR	5'ATGCTTCGGTCCACAGATTTCTCC 3'			
DAZLF	5'TCTGGACTAATCCAAACACTG 3'	424	60° C	NM_001351
DAZLR	5'TGCACTCTTTTATCCTTGAAG 3'			
DZIPF1	5' TGGAAGATCCTTTTCCCAG 3'	205	56° C	NM_014934
DZIPR1	5' GTGTCCTCGATTTTCGCTTC 3'			
PUM1F1	5' AAACCTGAGAAGTTTGAATTG 3'	351	56° C	NM_0010206
PUM1R1	5'GCAAGACCAAAAGCAGAGTTG 3			58.1
PUM2F2	5'AGGATCAGTATGGCAATTATG 3'	389	58° C	NM_015317
PUM2R2	5'ATACTTTTCCAACCTTGCCAG 3'			
NANOSF	5' GGCGGGTATTCCCCGCTTG 3'	195	60° C	NM_199461
NANOSR	5' AGCACCATTTCCAAGTTATAC3'			
STAUF	5'CCCATAGTCAAGCCACAGAC3'	205	60° C	NM_004602
STAUR	5'CTTCTTGTTGGTGCCCGTTC3'			
GAPDHF	5' GGCGATGCTGGCGCTGAGTAC 3'	150	55° C	NM_002046.3
GAPDHR	5' TGGTTCACACCCATGACGA 3'			
RNApolIIaF	5' TACCACGTCATCTCCTTTGATGGCT 3'	187	55° C	X_74870
RNApolIIaR	5'GTGCGGCTGCTTCCATAA3'			

Tabela 2.1 – Iniciadores utilizados nas RT- PCR e qRT-PCR

* Temperatura de anelamento

Nome dos Iniciadores	Descrição	Sequência do Iniciador com sítio attb	Ampl.*	Tm. anel.*	Gene ID
BDPUM2AF	Região antigênica de PUM2 e	5'GGGGACAAGTTTGTACAAA AAAGCAGGCTTCAAATTGGAT TCTCGATTTAGG3'	435 pb	55°C á 50°C	NM_015317
BDPUM2AR	diferente de PUM1	5'GGGGACCACTTTGTACAAG AAAGCTGGGTCTCCTGAAGAG TCCATTGGTAC3'			
BDDZIPZR	Região antigênica de DZIP1 e	5'GGGGACCACTTTGTACAAG AAAGCTGGGTCAGGAGGGGT CGTAATAGTTG3'	481 pb	58°C; 55°C e 54°C	NM_014934
BDDZIPLF	diferente de DZIP Like	5'GGGGACAAGTTTGTACAAA AAAGCAGGCTTCAACAAGGG CAGCTTCGGGAAG3'			

Tabela 2.2– Iniciadores utilizados para a amplificação das regiões antigênicas e clonagem em Sistema Gateway (sem *stop* códon)

* Tm. anel. = Temperatura de anelamento

* Ampl. = Tamanho do amplicon

ANEXO 2

INSTITUTO DE BIOLOGIA MOLECULAR DO PARANÁ FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

Caracterização celular e molecular do potencial de diferenciação de células-tronco mesenquimais adultas

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

1 - Eu, _____, RG, _____ estou sendo convidado(a) a participar do projeto chamado: " Caracterização celular e molecular do potencial de diferenciação de células-tronco mesenquimais adultas" e a minha participação é voluntária.

2 – As células-tronco são células que possuem a capacidade de se dividir e de se transformar (num processo também conhecido por diferenciação celular) em outros tecidos do corpo, como ossos, nervos, músculos e sangue. Devido a essa característica, as células-tronco possuem um potencial aplicação terapêutica, sendo úteis para uso em terapia celular de doenças cardiovasculares, neurodegenerativas, diabetes tipo-1, acidentes vasculares cerebrais, doenças hematológicas, traumas na medula espinhal e nefropatias. O principal objetivo das pesquisas com células-tronco é usá-las para recuperar tecidos danificados. Para isso é necessário compreender os mecanismos que levam a diferenciação dessas células em diferentes tecidos adultos. Eu entendo que este projeto está sendo desenvolvido em conjunto com o Instituto de Biologia Molecular do Paraná e a Pontifícia Universidade Católica do Paraná e que os médicos e pesquisadores estão empenhados na pesquisa básica da capacidade das células-tronco mesenquimais em se transformar em células adultas de diversos tecidos.

3 - Eu entendo que será necessária a coleta do **sangue de cordão umbilical e placentário** para obtenção de células-tronco que serão utilizadas nesta pesquisa. As células obtidas do sangue de cordão umbilical e placentário serão apenas estudadas em laboratório e **não serão utilizadas para qualquer fim terapêutico ou comercial**.

4 - Eu entendo que no momento da publicação dos resultados obtidos nesta pesquisa, não aparecerá meu nome e sim um código, justamente para preservar minha identidade.

5 – Eu estou ciente que a qualquer momento posso desistir de participar do projeto.

6 - Eu li o texto acima e compreendi a natureza e objetivo do estudo do qual fui convidado a participar e concordo voluntariamente em participar.

Curitiba, ___ / ___ / ___ .

Assinatura do participante = _____

Assinatura do responsável = _____

Assinatura do pesquisador = _____

**INSTITUTO DE BIOLOGIA MOLECULAR DO PARANÁ
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ**

**Caracterização celular e molecular do potencial de diferenciação de células-tronco
mesenquimais adultas**

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

1 - Eu, _____, RG, _____ estou sendo convidado a participar do projeto chamado: "Caracterização celular e molecular do potencial de diferenciação de células-tronco mesenquimais adultas" e a minha participação é voluntária.

2 – As células-tronco são células que possuem a capacidade de se dividir e de se transformar (num processo também conhecido por diferenciação celular) em outros tecidos do corpo, como ossos, nervos, músculos e sangue. Devido a essa característica, as células-tronco possuem um potencial na aplicação terapêutica, sendo úteis para uso em terapia celular de doenças cardiovasculares, neurodegenerativas, diabetes tipo-1, acidentes vasculares cerebrais, doenças hematológicas, traumas na medula espinhal e nefropatias. O principal objetivo das pesquisas com células-tronco é usá-las para recuperar tecidos danificados. Para isso é necessário compreender os mecanismos que levam a diferenciação dessas células em diferentes tecidos adultos. Eu entendo que este projeto está sendo desenvolvido em conjunto com o Instituto de Biologia Molecular do Paraná e a Pontifícia Universidade Católica do Paraná e que os médicos e pesquisadores estão empenhados na pesquisa básica da capacidade das células-tronco mesenquimais em se transformar em células adultas de diversos tecidos.

3 - Eu entendo que estou sendo submetido à cirurgia bariátrica (bypass hipofuncionante reversível Lazzarotto e Souza) associado à dermolipectomia abdominal no qual serão retirados cerca de **500 gramas do tecido adiposo** para este estudo. As células-tronco mesenquimais obtidas do tecido adiposo serão apenas estudadas em laboratório e **não serão utilizadas para qualquer fim terapêutico ou comercial.**

4 - Eu entendo que no momento da publicação dos resultados obtidos nesta pesquisa, não aparecerá meu nome e sim um código, justamente para preservar minha identidade.

5 - Eu estou ciente que a qualquer momento posso desistir de participar do projeto.

6 - Eu li o texto acima e compreendi a natureza e objetivo do estudo do qual fui convidado a participar e concordo voluntariamente em participar.

Curitiba, ___ / ___ / ___ .

Assinatura do participante = _____

Assinatura do responsável = _____

Assinatura do pesquisador = _____

**INSTITUTO DE BIOLOGIA MOLECULAR DO PARANÁ
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ**

**Caracterização celular e molecular do potencial de diferenciação de células-tronco
mesenquimais adultas**

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

1 - Eu, _____, RG, _____, estou sendo convidado(a) a participar do projeto chamado: " Caracterização celular e molecular do potencial de diferenciação de células-tronco mesenquimais adultas" e a minha participação é voluntária.

2 - As células-tronco são células que possuem a capacidade de se dividir e de se transformar (num processo também conhecido por diferenciação celular) em outros tecidos do corpo, como ossos, nervos, músculos e sangue. Devido a essa característica, as células-tronco possuem um potencial na aplicação terapêutica, sendo úteis para uso em terapia celular de

doenças cardiovasculares, neurodegenerativas, diabetes tipo-1, acidentes vasculares cerebrais, doenças hematológicas, traumas na medula espinhal e nefropatias. O principal objetivo das pesquisas com células-tronco é usá-las para recuperar tecidos danificados. Para isso é necessário compreender os mecanismos que levam a diferenciação dessas células em diferentes tecidos adultos. Eu entendo que este projeto está sendo desenvolvido em conjunto com o Instituto de Biologia Molecular do Paraná e a Pontifícia Universidade Católica do Paraná e que os médicos e pesquisadores estão empenhados na pesquisa básica da capacidade das células-tronco mesenquimais em se transformar em células adultas de diversos tecidos.

3 - Eu entendo que do volume total da minha **medula óssea** coletada para o projeto “Estudo Multicêntrico, Randomizado de Terapia Celular em Cardiopatias-Cardiopatía Dilatada”, serão retirados 5mL para serem destinados para esta pesquisa. As células obtidas destes 5mL de medula óssea serão apenas estudadas em laboratório e **não serão utilizadas para qualquer fim terapêutico ou comercial**.

5 – Eu entendo que no momento da publicação dos resultados obtidos nesta pesquisa, não aparecerá meu nome e sim um código, justamente para preservar minha identidade.

6 - Eu li o texto acima e compreendi a natureza e objetivo do estudo do qual fui convidado a participar e concordo voluntariamente em participar.

Curitiba, ___ / ___ / ___ .

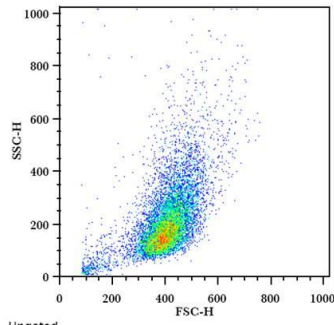
Assinatura do participante = _____

Assinatura do responsável = _____

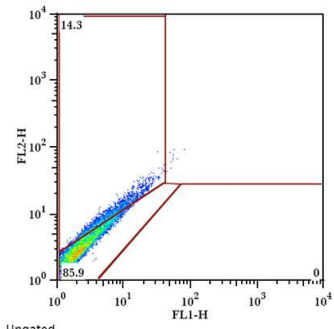
Assinatura do pesquisador = _____

ANEXO 3

Sem marcação

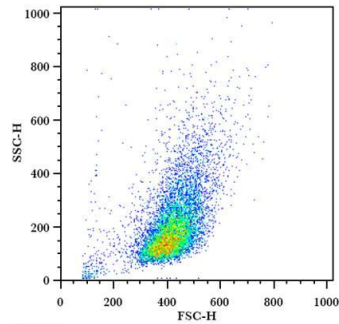


Ungated
060409_INTRACELULAR.009
Event Count: 10000

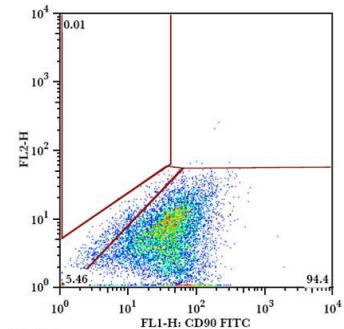


Ungated
060409_INTRACELULAR.009
Event Count: 10000

CD90 - FITC

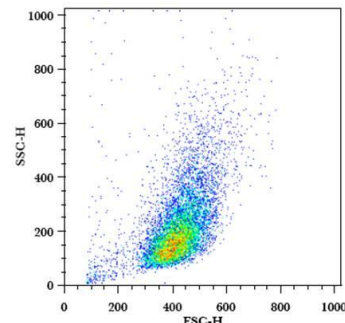


Ungated
060409_INTRACELULAR.010
Event Count: 10000

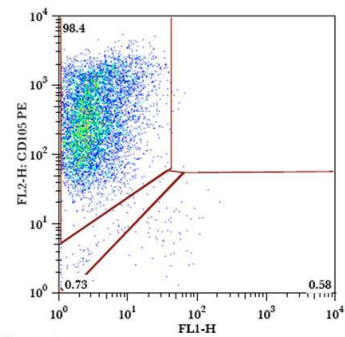


Ungated
060409_INTRACELULAR.010
Event Count: 10000

CD105 - PE

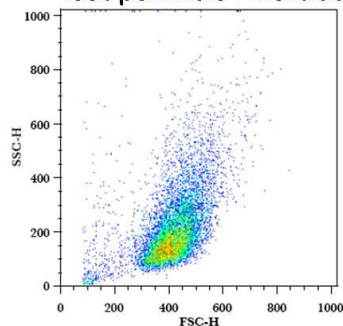


Ungated
060409_INTRACELULAR.011
Event Count: 10000

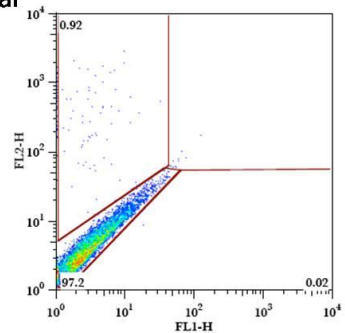


Ungated
060409_INTRACELULAR.011
Event Count: 10000

Isotipo FITC e PE extracelular

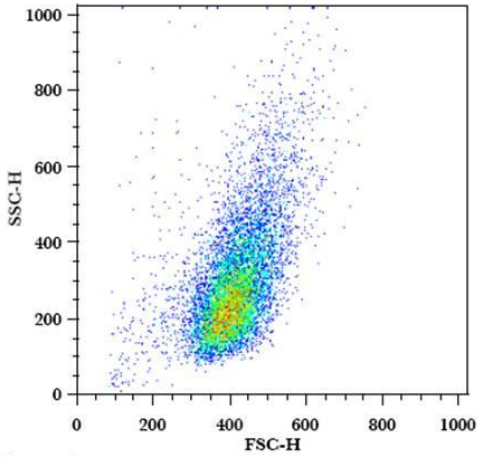


Ungated
060409_INTRACELULAR.012
Event Count: 10000

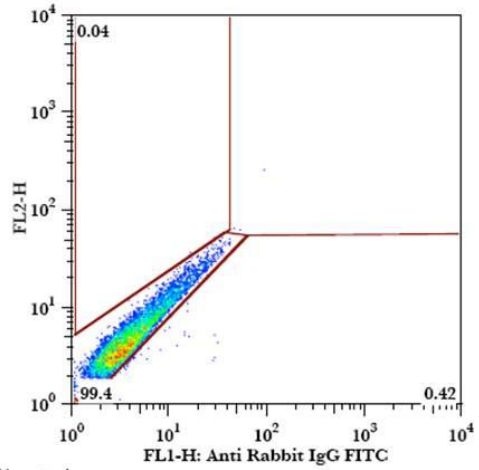


Ungated
060409_INTRACELULAR.012
Event Count: 10000

Isotipo coelho

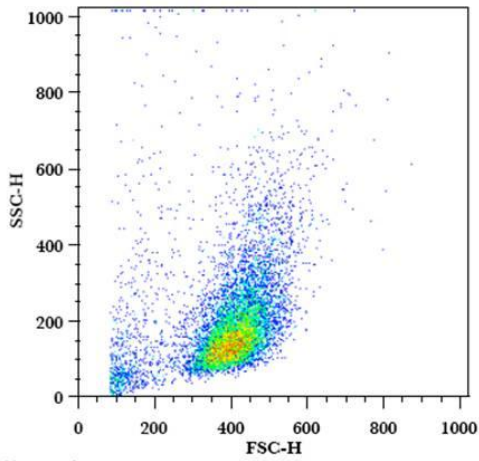


Ungated
060409_INTRACELULAR.015
Event Count: 10000

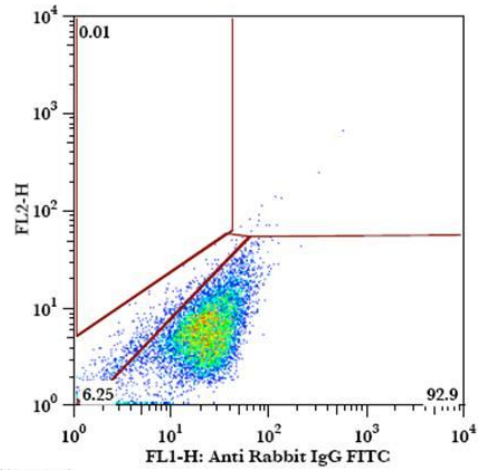


Ungated
060409_INTRACELULAR.015
Event Count: 10000

DZIP1 – AD50

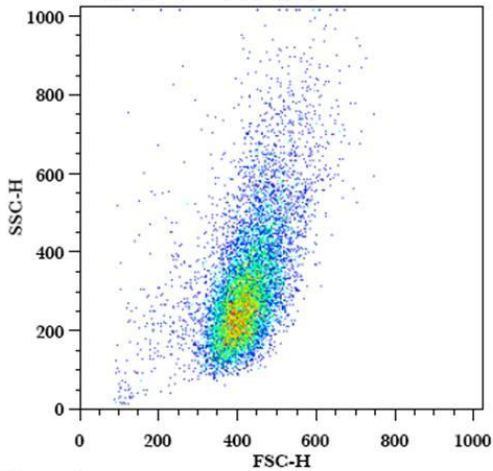


Ungated
060409_INTRACELULAR.017
Event Count: 10000

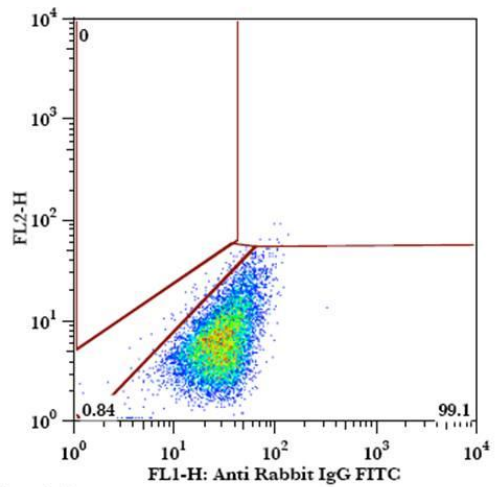


Ungated
060409_INTRACELULAR.017
Event Count: 10000

DZIP1 – AD52

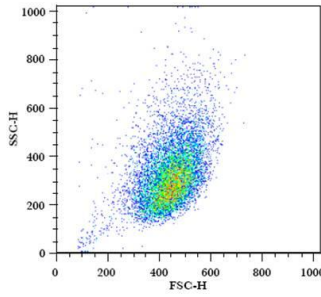


Ungated
060409_INTRACELULAR.018
Event Count: 10000

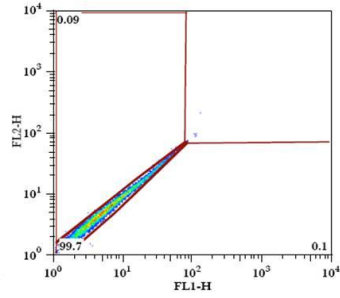


Ungated
060409_INTRACELULAR.018
Event Count: 10000

Sem marcação

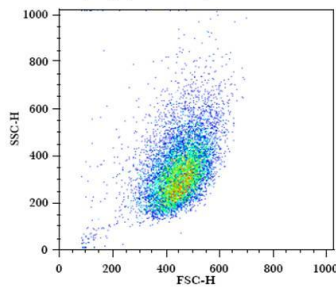


Ungated
AD52_P7.001
Event Count: 10000

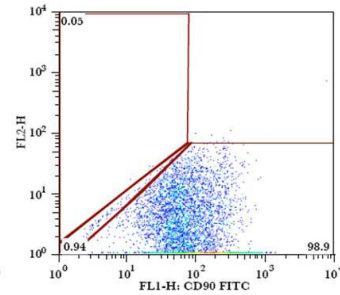


Ungated
AD52_P7.001
Event Count: 10000

CD90 - FITC

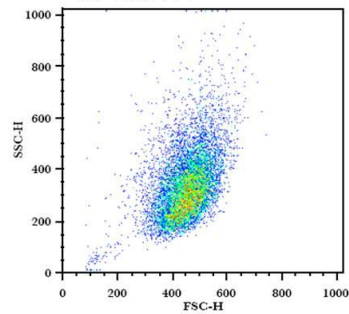


Ungated
AD52_P7.002
Event Count: 10000

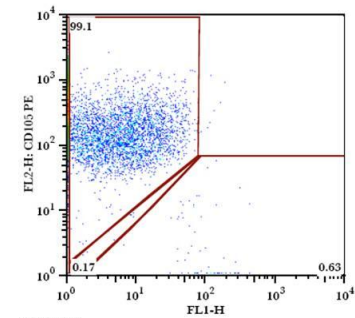


Ungated
AD52_P7.002
Event Count: 10000

CD105 PE

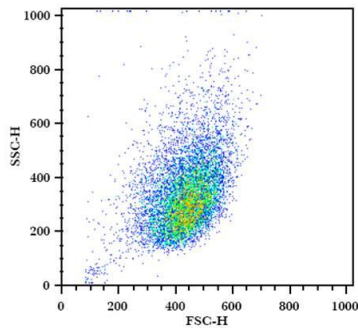


Ungated
AD52_P7.003
Event Count: 10000

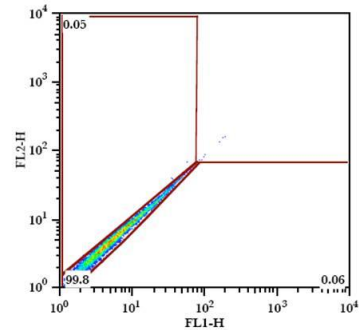


Ungated
AD52_P7.003
Event Count: 10000

Isotipo FITC e PE extracelular

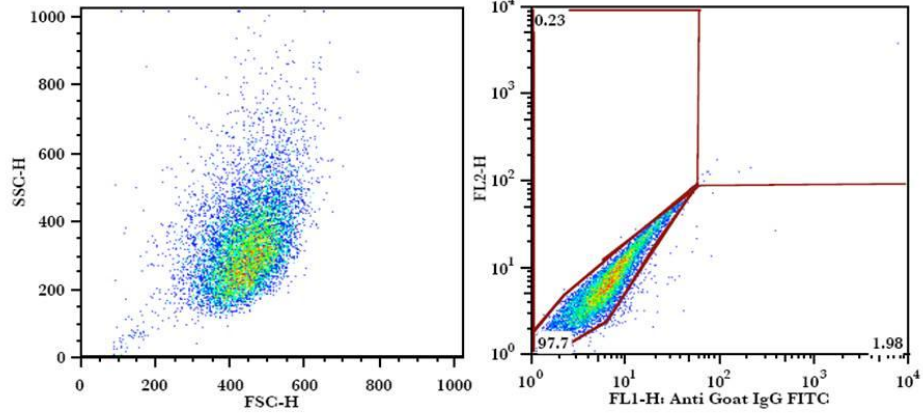


Ungated
AD52_P7.004
Event Count: 10000



Ungated
AD52_P7.004
Event Count: 10000

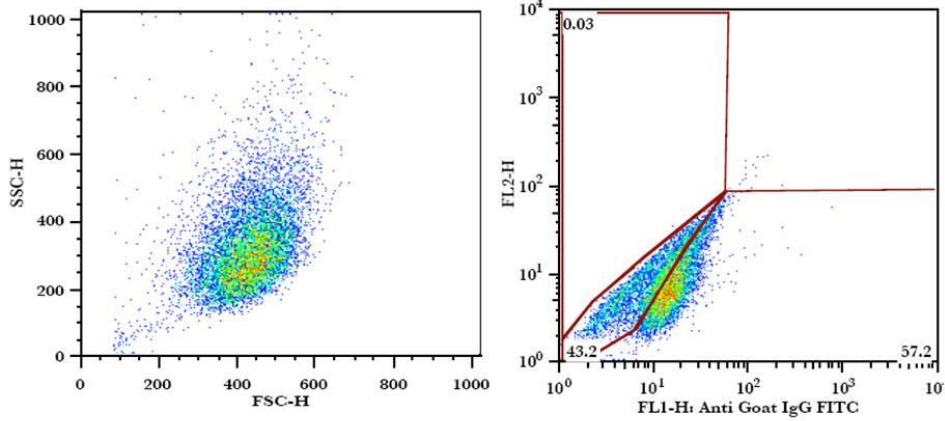
Somente secundário anti-goat



Ungated
AD52_P7.005
Event Count: 10000

Ungated
AD52_P7.005
Event Count: 10000

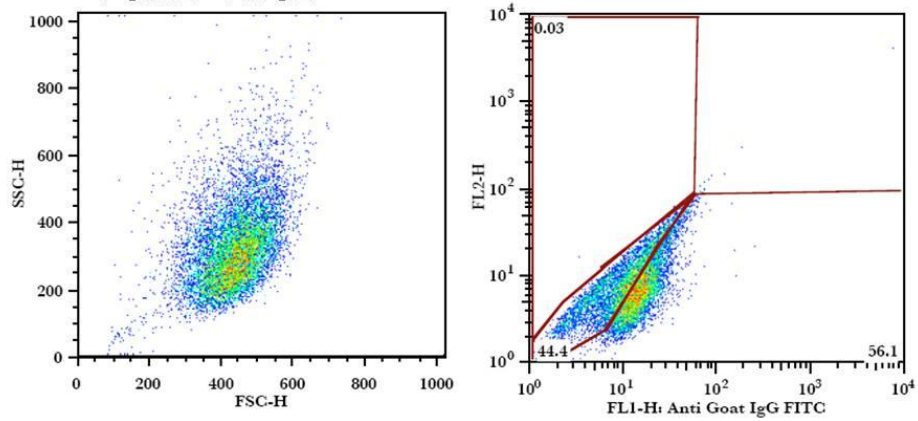
PUM2 – AD50



Ungated
AD52_P7.006
Event Count: 10000

Ungated
AD52_P7.006
Event Count: 10000

PUM2 - AD52



Ungated
AD52_P7.007
Event Count: 10000

Ungated
AD52_P7.007
Event Count: 10000