

Diego Amarante da Silva

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE GENES *NEPH* EM
CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DA PLACENTA
HUMANA**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção de grau de Mestre em Biologia Celular e do Desenvolvimento.

Orientador: Prof. Dr. Márcio Alvarez-Silva

Co-orientadora: Dr^a. Sílvia Beatriz Visoni

Florianópolis
2012

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Silva, Diego Amarante da
Avaliação da expressão de genes NEPH em células-tronco
mesenquimais da placenta humana [dissertação] / Diego
Amarante da Silva ; orientador, Márcio Alvarez-Silva ; co-
orientador, Sílvia Beatriz Visoni. - Florianópolis, SC, 2012.
110 p. ; 21cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-
Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento.

Inclui referências

1. Biologia Celular e do Desenvolvimento. 2. Células-
tronco mesenquimais. 3. Placenta. 4. NEPH1. 5. NEPH2. I.
Alvarez-Silva, Márcio. II. Visoni, Sílvia Beatriz. III.
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-
Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento. IV.
Título.

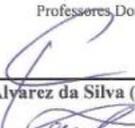
**“Avaliação da expressão de genes NEPH
em células-tronco mesenquimais da
placenta humana”**

por

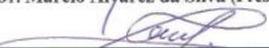
Diego Amarante da Silva

Dissertação julgada e aprovada em sua
forma final pelos membros titulares da
Banca Examinadora (Port.
04/PPGBCD/2012) do Programa de Pós-
Graduação em Biologia Celular e do
Desenvolvimento - UFSC, composta pelos
Professores, Doutores:

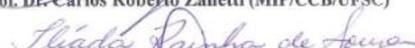
Banca Examinadora:



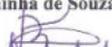
Prof. Dr. Márcio Alvarez da Silva (Presidente/BEG/UFSC)



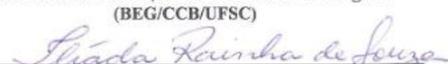
Prof. Dr. Carlos Roberto Zanetti (MIP/CCB/UFSC)



Prof. Dra. Iliada Rainha de Souza (BEG/CCB/UFSC)



**Prof. Dra. Cláudia Beatriz Nedel Mendes de Aguiar
(BEG/CCB/UFSC)**



Prof. Dra. Iliada Rainha de Souza
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do
Desenvolvimento

Florianópolis, 14 de junho 2012.

Dedico este trabalho aos meus pais Mauro Matos da Silva e Derci Amarante da Silva, exemplos de amor, garra e ética, bases da minha educação, que semearam e cuidaram com dedicação do meu crescimento pessoal e profissional.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao meu orientador Prof. Dr. Márcio Alvarez-Silva por ter me acolhido e incluído neste maravilhoso grupo de pesquisa e por ter tentado me acalmar, por mais difícil que fosse, e me mostrar uma solução para os problemas enfrentados no percurso deste trabalho.

À minha co-orientadora e amiga Dr^a. Sílvia Beatriz Visoni, minha eterna gratidão pela paciência, pelos conselhos, pelos puxões de orelha, pelas discussões e sugestões que contribuíram tanto para o desenvolvimento deste trabalho quanto para meu crescimento como pessoa.

Aos meus pais, Mauro Matos da Silva e Derci Amarante da Silva e demais familiares pela fé depositada em mim e por acreditarem na minha capacidade, muitas vezes desacreditada por mim mesmo. Obrigado por todas as orações, pedidos, pensamentos e depósitos bancários a mim dedicados.

Aos demais professores do LACERT, Dr^a. Andréa Gonaçalves Trentin, Dr. Giordano Wosgrau Calloni e Dr. Ricardo Castilho Garcez pelo incentivo, confiança e apoio à minha formação científica.

A todos os colegas/amigos integrantes e ex-integrantes do LACERT, os quais não mencionarei nomes, porém todos vocês sabem da sua participação no desenvolvimento deste trabalho, seja através de uma conversa amiga, de um ombro ouvinte, de uma cerveja, ou até mesmo “colocando a mão na massa”, vocês são a minha segunda família, sem os quais eu não conseguiria chegar até aqui.

A todos os meus amigos adquiridos aqui em Florianópolis e aos já antigos que, perto ou longe, sempre me deram força e foram de extrema importância para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao meu companheiro Guilherme Mulinari por ter me dado força e me aguentado durante várias fases difíceis e de extrema irritação. Obrigado por me aturar e me apoiar sempre.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa concedida, e também às agências financiadoras FAPESC, CNPq, Ministério da Ciência e Tecnologia (MCT/INFRA), INTT, e PRONEX/CNPq.

RESUMO

A Célula-tronco (CT) é definida pela capacidade de autorrenovação e habilidade de se diferenciar em diversos fenótipos celulares. Nos últimos anos, vários estudos têm buscado a identificação e caracterização de CTs em tecidos adultos e extra-embriônicos visando o desenvolvimento de alternativas para regeneração e reparo tecidual. Dentre as fontes de CTs adultas destaca-se a placenta, que além de desempenhar um papel crucial no desenvolvimento fetal, também é um importante reservatório de CTs mesenquimais (CTMs). A diferenciação de CTMs é um fenômeno ainda não totalmente esclarecido e influenciado pela atuação de diversas moléculas e pelo microambiente. Um grupo de proteínas de adesão conservadas evolutivamente que pode estar envolvido neste processo é o da família NEPH. Composta por NEPH1, NEPH2 e NEPH3, estas proteínas fazem parte da superfamília das imunoglobulinas (IgSF) e regulam a morfogênese de diferentes tecidos. Os ortólogos de *NEPH* têm sido amplamente caracterizados em vertebrados, onde atuam em diversos processos como no desenvolvimento neural, formação de sinapses e fusão de mioblastos. Além disso, vários estudos descrevem a expressão de *NEPH1* e *NEPH2* em diversos tecidos, o que apoia a hipótese de que tal expressão possa estar envolvida na diferenciação de CTs. Com isso, o enfoque deste trabalho foi comparar os níveis de expressão dos genes *NEPH* entre CTMs obtidas da placenta humana, no estado indiferenciado assim como após a indução à diferenciação adipogênica. As células da placenta utilizadas neste estudo apresentaram a expressão de marcadores de CTMs, a morfologia fibroblastóide esperada, bem como foram capazes de se diferenciar para o fenótipo adipogênico quando cultivadas em meio indutivo, caracterizando uma população de CTMs. Os resultados obtidos por RT-PCR em tempo real demonstraram que tanto as CTMs indiferenciadas quanto as induzidas para adipogênese apresentaram a expressão dos genes *NEPH1* e *NEPH2*, sendo a expressão do gene *NEPH1* 75% mais alta nas CTMs induzidas à adipogênese do que nas células indiferenciadas. Com isso, sugerimos um papel do gene *NEPH1* no processo de diferenciação das CTMs da placenta humana para adipócito.

Palavras-chave: Células-tronco mesenquimais. Placenta. *NEPH1*.
NEPH2. RNAi.

ABSTRACT

The stem cell (SC), by definition, is undifferentiated and has the ability of self-renewal. SCs are also able to differentiate into diverse cell lineages. In recent years, several studies have searching for the characterization of SCs in adult and extra-embryonic tissues that could guide to develop strategies for tissue regeneration and repair. Among these tissues the placenta is an important source of adult SCs, being a reservoir of mesenchymal SCs (MSCs). Several biological signals and the environment influence the differentiation of MSCs, although this phenomenon is not yet fully understood. The NEPH protein family, which includes NEPH1, NEPH2 and NEPH3, is a group of evolutionarily conserved adhesion molecules that may be involved in this MSCs differentiation. These proteins are part of the immunoglobulin superfamily (IgSF) and regulate the morphogenesis of different tissues. The role of *NEPH* orthologs have been extensively characterized in vertebrates, where they act in neural development, synapse formation and myoblasts fusion. Moreover, several studies have described the expression of *NEPH1* and *NEPH2* in several tissues, supporting the hypothesis that they might be involved in SCs differentiation. Thus, the objective of this study was to compare the expression of *NEPH* genes between undifferentiated and differentiated MSCs obtained from human placenta. The placental cells used in this study comprise a population of MSCs, being characterized by the typical fibroblastic morphology, expression of MSCs markers and ability to differentiate into adipocytes when cultured in an inductive medium. Real time RT-PCR analysis demonstrated that both undifferentiated MSCs and MSCs differentiated into adipocytes express *NEPH1* and *NEPH2* genes. However, the expression of *NEPH1* gene was 75% higher in MSCs differentiated into adipocytes than in the undifferentiated cells. In summary, our results suggest that *NEPH1* gene may play a role in the differentiation of MSCs into adipocytes.

Key words: Mesenchymal Stem Cells. Placenta. *NEPH1*. *NEPH2*. RNAi.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Processos de divisão de CTs.....	24
Figura 2: Anatomia da placenta humana.....	28
Figura 3: Mapa do plasmídeo pCX-EGFP.....	48
Figura 4: Sequências complementares entre os oligonucleotídeos e o plasmídeo <i>psiSTRIKE</i>	54
Figura 5: Morfologia das CTMs da placenta humana.....	57
Figura 6: Imunofenotipagem de CTMs de placenta humana.....	58
Figura 7: CTM de placenta humana induzida à adipogênese.....	60
Figura 8: Expressão dos genes <i>NEPH1</i> e <i>NEPH2</i> em CTMs de placenta humana induzidas à diferenciação adipogênica.....	61
Figura 9: Eficiência de amplificação de PCR em tempo real.....	64
Figura 10: Eficiência de amplificação de PCR em tempo real para os oligonucleotídeos iniciadores de <i>NEPH2</i>	65
Figura 11: Curva de dissociação e eletroforese de <i>NEPH1</i> e <i>GAPDH</i>	66
Figura 12: Avaliação da expressão de <i>NEPH1</i> em CTMs da placenta humana submetidas à diferenciação adipogênica.....	67
Figura 13: Eletroforese do plasmídeo pCX-EGFP.....	69
Figura 14: Transfecção das CTMs com o plasmídeo pCX-EGFP utilizando lipofectamina.....	70
Figura 15: Transfecção das CTMs com plasmídeo pCX-EGFP utilizando eletroporação.....	71
Figura 16: Curva de diluição da puromicina.....	73
Figura 17: Eletroforese dos oligonucleotídeos de anelamento.....	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Marcadores utilizados para caracterização imunofenotípica das CTMs da placenta humana através de citometria de fluxo.....	39
Tabela 2: Sequência de oligonucleotídeos iniciadores utilizados para os experimentos de RT-PCR.....	43
Tabela 3: Sequência de oligonucleotídeos iniciadores utilizados para os experimentos de RT-PCR em tempo real.....	44
Tabela 4: Esquema das diferentes condições testadas para transfectar as CTMs de placenta humana com o plasmídeo pCX-EGFP via HiPerFect. Os volumes são dados por poço de placa de 24 poços.....	50
Tabela 5: Esquema de pulsos testados na eletroporação para transfecção das CTMs de placenta humana com o plasmídeo pCX-EGFP.....	52
Tabela 6: Sequências de oligonucleotídeos desenhadas para o silenciamento do gene <i>NEPH1</i>	55
Tabela 7: Cts observados nos experimentos de determinação da temperatura de anelamento ideal dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados para RT-PCR em tempo real.....	63
Tabela 8: Cts gerados nos experimentos de determinação da eficiência de amplificação dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados para RT-PCR em tempo real.....	63

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CaCl ₂	Cloreto de Cálcio
cDNA	DNA Complementar
CEPSH	Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos
CO ₂	Dióxido de Carbono
CT	Célula-tronco
Ct	<i>Threshold cycle</i>
CTM	Células-tronco Mesenquimal
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
dNTP	Desóxirribonucleotídeos Trifosfatados
dsRNA	RNA de fita dupla
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-acético
FITC	Fluoresceína Isotiocianato
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato Desidrogenase
GFP	Proteína Verde Fluorescente
H ₃ BO ₃	Ácido Bórico
HCl	Ácido Clorídrico
HU	Hospital Universitário
HSN	Neurônio motor específico hermafrodita
IBMX	Isobutil-metilxantina
IgSF	Superfamília das Imunoglobulinas (<i>Immunoglobulin Superfamily</i>)
IMDM	<i>Iscove's Modified Dulbecco's Medium</i>
KCl	Cloreto de Potássio
LACERT	Laboratório de Células-tronco e Regeneração Tecidual
LB	<i>Lysogeny Broth</i>
LIAA	Laboratório de Imunologia Aplicada à Aquicultura
LPL	Lipoproteína Lipase
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
miRNA	Micro RNA
mRNA	RNA Mensageiro
NaCl	Cloreto de Sódio
NaHCO ₃	Bicarbonato de Sódio
NaOH	Hidróxido de Sódio

NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NEPH	<i>Nephrin-like protein</i>
PBS	Salina Tamponada por Fosfato
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PE	Ficoeritrina
PerCP	Complexo Proteína-Clorofila-Peridinina
PPAR γ 2	<i>Peroxisome Proliferator-activated Receptor-γ-2</i>
RNAi	RNA de Interferência
RT	Transcriptase Reversa
RISC	Complexo Indutor de Silenciamento por RNA
SBF	Soro Bovino Fetal
siRNA	Pequeno RNA interferente
TAE	Tris-acetato-EDTA
TE	Tris EDTA
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
T _m	Temperatura de <i>melting</i>
UFC-F	Unidade de Colônia Formadora de fibroblastos
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	22
1.1 CÉLULAS-TRONCO.....	23
1.1.1 Células-tronco Mesenquimais	25
1.2 PLACENTA HUMANA.....	27
1.2.1 Células-Tronco da placenta	29
1.3 DIFERENCIAÇÃO DAS CÉLULAS-TRONCO.....	30
1.4 PROTEÍNAS NEPH.....	30
1.4.1 Superfamília das imunoglobulinas	30
1.4.2 Estrutura e função das proteínas NEPH nos rins	31
1.4.3 Funções extrarrenais das Proteínas NEPH	32
2 OBJETIVOS	35
2.1 OBJETIVO GERAL.....	35
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	35
3 MATERIAIS E MÉTODOS	37
3.1 OBTENÇÃO E ISOLAMENTO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DE PLACENTA HUMANA.....	37
3.1.1 Cultura das células-tronco mesenquimais obtidas da placenta humana	38
3.2 IMUNOFENOTIPAGEM DAS CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS.....	38
3.3 INDUÇÃO DA DIFERENCIAÇÃO ADIPOGÊNICA.....	39
3.4 COLORAÇÃO DAS CÉLULAS DIFERENCIADAS.....	40
3.5 REAÇÃO DA TRANSCRIPTASE REVERSA SEGUIDA PELA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (RT-PCR).....	40
3.5.1 Síntese de cDNA	41
3.5.2 PCR	42
3.5.3 PCR em tempo real	43
3.5.4 Eletroforese em gel de agarose	45
3.6 TRANSFEÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DE PLACENTA HUMANA COM PLASMÍDEOS.....	46
3.6.1 Amplificação do plasmídeo	46
3.6.2 Transfecção	49
3.7 INTRODUÇÃO DA TÉCNICA DE RNAi EM CÉLULAS- TRONCO MESENQUIMAIS DE PLACENTA HUMANA.....	52
3.7.1 Curva de diluição da puromicina	53
3.7.2 Construção e inserção dos oligonucleotídeos de silenciamento	

no plasmídeo <i>psiSTRIKE</i>	54
3.7.3 Transformação de bactérias para amplificação do plasmídeo <i>psiSTRIKENN</i>	56
3.8 TRATAMENTO ESTATÍSTICO.....	56
4 RESULTADOS	57
4.1 CARACTERIZAÇÃO DAS CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DA PLACENTA HUMANA.....	57
4.2 INDUÇÃO DAS CTMs DA PLACENTA HUMANA A DIFERENCIAÇÃO ADIPOGÊNICA.....	59
4.3 RT-PCR.....	61
4.4 PCR EM TEMPO REAL.....	61
4.4.1 Temperatura de anelamento e eficiência de amplificação.....	62
4.4.2 Análise da expressão de <i>NEPH1</i>	67
4.5 TRANSFEÇÃO DE CTMs DE PLACENTA HUMANA COM PLASMÍDEO.....	68
4.5.1 Obtenção dos plasmídeo.....	68
4.5.2 Transfecção.....	69
4.6 EXPERIMENTOS PRELIMINARES DE SILENCIAMENTO DO GENE <i>NEPH1</i> EM CTMs DA PLACENTA HUMANA.....	72
4.6.1 Curva de morte celular.....	72
4.6.2 Anelamento dos oligonucleotídeos e inserção no plasmídeo.....	74
4.6.3 Transformação das bactérias competentes.....	74
5 DISCUSSÃO	77
5.1 INFLUÊNCIA DOS GENES <i>NEPH</i> NA DIFERENCIAÇÃO DAS CTMs DA PLACENTA HUMANA PARA O FENÓTIPO ADIPOGÊNICO.....	78
5.2 PADRONIZAÇÃO DA TRANSFEÇÃO DE CTMs DA PLACENTA HUMANA COM pCX-EGFP.....	82
5.3 SILENCIAMENTO GÊNICO: EXPERIMENTOS PRELIMINARES E PERSPECTIVAS.....	83
6 CONCLUSÕES	87
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	89
ANEXO A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)	101
ANEXO B – Protocolo de extração de plasmídeos <i>Quick Plasmid Miniprep Kit</i> (Invitrogen)	103
ANEXO C – Protocolo de extração de plasmídeos <i>Plasmid Miniprep System</i> (Promega)	105

ANEXO D – Protocolo de extração de plasmídeos <i>Plasmid Purification Midi Kit</i> (Qiagen)	107
--	-----

1 INTRODUÇÃO

1.1 CÉLULAS-TRONCO

Os estudos com células-tronco (CT) em humanos têm crescido rapidamente nos últimos anos, sendo que um dos primeiros trabalhos mostrando o potencial de CTs embrionárias humanas foi publicado há menos de 15 anos (THOMSON *et al.*, 1998). A pesquisa com CTs de embriões humanos sempre foi e ainda é cercada por problemas éticos, pois a obtenção destas células resulta na destruição do embrião que poderia vir a gerar uma vida, esse fato fez com que surgisse uma gama de estudos buscando outras fontes de CTs que não as embrionárias (JACKSON *et al.*, 1999; GALLI *et al.*, 2000; ROSSANT, 2001; KRAUSE *et al.*, 2001). Após a demonstração de que CTs adultas podiam dar origem a células de regiões diferentes às de sua origem, o conceito de que CTs adultas possuíam restrição de linhagens foi desafiado, sugerindo que as CTs adultas têm um maior potencial do que se pensava inicialmente (FERRARI *et al.*, 1998; RAFF, 2003; TRENTIN *et al.*, 2004; CALLONI *et al.*, 2009).

Para uma célula ser considerada CT, ela precisa apresentar algumas características como a capacidade de autorrenovação, ou seja, a habilidade de uma célula de passar por vários ciclos de divisão celular, sem alterar o seu estado indiferenciado, bem como a habilidade de se diferenciar em fenótipos celulares distintos, definida como multipotencialidade (MORRISON; KIMBLE, 2006). A capacidade de autorrenovação engloba divisões simétricas, na qual ambas as células filhas mantêm-se como CTs, fazendo assim a manutenção do *pool* de CTs; e divisões assimétricas, onde apenas uma das células filhas se mantém como CT enquanto a outra segue uma rota de diferenciação (Figura 1) (ULLOA-MONTOYA *et al.*, 2005).

As CTs são classificadas como totipotentes quando possuem habilidade de se diferenciar em todos os fenótipos celulares do corpo, bem como as células dos anexos embrionários. Estas células são encontradas nas fases embrionárias iniciais do zigoto até a mórula. Já as CTs pluripotentes tem a capacidade de se diferenciar em todas as células do corpo, no entanto, não originam as células dos anexos embrionários. Tais células estão presentes na massa celular interna do blastocisto (THOMSON *et al.*, 1998). Por fim, as CTs multipotentes são aquelas

que podem se diferenciar em apenas alguns fenótipos celulares e estão presentes em vários tecidos do organismo (JIANG *et al.*, 2002).

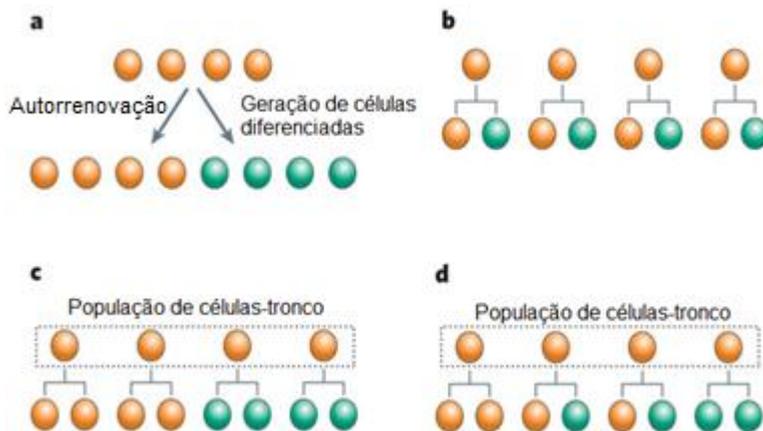


Figura 1. Processos de divisão de CTs. (a): as CTs (alaranjadas) realizam tanto a autorrenovação, ou seja, geram células que permanecem como CTs, como também geram células diferenciadas (verdes). (b): as CTs realizam divisões assimétricas, onde cada CT gera uma CT e uma célula diferenciada. (c): as CTs realizam divisões simétricas, onde cada CT pode se dividir simetricamente para gerar tanto duas CTs ou duas células diferenciadas. (d): ocorre a combinação das divisões simétricas e assimétricas das CTs. (adaptado de MORRISON; KIMBLE, 2006).

Quanto à origem, as CTs são classificadas em CTs embrionárias e CTs adultas ou somáticas. As CTs embrionárias são as células derivadas da massa celular interna do blastocisto. Em meio adequado, podem se proliferar indefinidamente, mantendo seu potencial de diferenciação em todos os tecidos do organismo em desenvolvimento (DOETSCHMAN *et al.*, 1985; PRINGLE *et al.*, 2011). As CTs embrionárias, em cultura, representam alternativa interessante no campo da medicina regenerativa, com aplicação potencial em inúmeras doenças. Possuem características bastante atrativas, quando comparadas às CTs adultas, pois podem crescer indefinidamente em cultura apropriada, além de gerar uma ampla série de tipos celulares e permitir manipulação genética mais fácil. Por outro lado, sua utilização apresenta dificuldades geradas pelos

questionamentos éticos de sua obtenção e seu potencial no desenvolvimento de tumores (WOBUS, 2005; EVANGELISTA *et al.*, 2008; PRINGLE *et al.*, 2011).

Em contraste, as CTs adultas ou somáticas podem ser encontradas em diferentes tecidos do feto e do adulto. Durante o desenvolvimento de um organismo multicelular ocorre uma série de eventos pré-programados pelo genoma. Estes eventos englobam a proliferação celular, o comprometimento com alguma linhagem celular, a expressão e inibição de genes relacionados com as linhagens celulares e a regulação da apoptose. Esta sequência de eventos resulta na formação das diferentes células, tecidos e órgãos que constituem o indivíduo. Apesar de a maioria das células seguir esta sequência durante o desenvolvimento, um pequeno número não o faz, tornando-se assim um reservatório de células indiferenciadas que permanecem no indivíduo adulto e que estão diretamente envolvidas na manutenção da integridade e no reparo dos órgãos e tecidos por toda a vida. Estas são as CTs adultas, que em cultura, podem proliferar apenas por um número limitado de passagens. Sua resposta a sinais de diferenciação diminui após cada passagem, e em geral, este potencial de diferenciação corresponde à população celular do tecido de sua origem (YOUNG; BLACK, 2004; MARCUS; WOODBURY, 2008).

Nos últimos anos houve um crescimento considerável no número de trabalhos abordando as CTs adultas. As CTs hematopoiéticas são o grupo de CTs adultas mais bem descrito, sendo já conhecida a hierarquia do sistema hematopoiético e os marcadores específicos dos progenitores e das células sanguíneas diferenciadas (SPANGRUDE *et al.*, 1988; ULLOA-MONTOYA *et al.*, 2005). Além disso, também são conhecidas as CTs epidérmicas (JONES; HARPER, 1995), as CTs neurais (GAGE *et al.*, 1995), as CTs mesenquimais (CAPLAN, 1991; PITTENGER *et al.*, 1999), entre outras.

1.1.1 Células-tronco Mesenquimais

Células não hematopoiéticas da medula óssea foram identificadas há mais de 40 anos e foram descritas como células clonogênicas, de morfologia fibroblástica, formando monocamada em cultura e capazes de se autorenovar. Estas foram definidas como unidades de colônias formadoras de fibroblastos (UCF-Fs), devido à capacidade de aderir ao

plástico de cultivo e formar colônias de células similares aos fibroblastos (FRIEDENSTEIN *et al.*, 1970). Em 1991, estas células foram denominadas células-tronco mesenquimais (CTMs) (CAPLAN, 1991).

As CTMs podem ser encontradas não somente na medula óssea, mas também em tecidos mesenquimais presentes em todos os órgãos do corpo. Estas células possuem capacidade de multiplicação e migração ao longo das camadas ectodérmicas e endodérmicas durante o desenvolvimento embrionário inicial. Essa característica migratória e a habilidade de reconhecimento do microambiente, que se mantêm presentes no adulto, são fundamentais para o reparo tecidual, envolvendo células mesenquimais da pele, ossos e músculos (CAPLAN, 1991; RASTEGAR *et al.*, 2010).

Os requerimentos mínimos para uma população de células ser classificada como CTM são: a aderência seletiva ao plástico; formação de UCF-Fs; a presença de expressão dos marcadores de superfície CD105, CD90 e CD73 e a ausência de expressão dos marcadores CD45, CD34 e CD14; e, por fim, o potencial de diferenciação das células para uma ou mais linhagens, sendo estas osteogênica, adipogênica, condrogênica e vascular/endotelial (PROCKOP, 1997; HORWITZ *et al.*, 2005; PAROLINI *et al.*, 2008).

Um grande problema na caracterização das CTMs é a ausência de marcadores definidos e definitivos para elas. Há uma ampla quantidade de marcadores descritos, porém, cada estudo utiliza grupos de marcadores diferentes, o que pode estar relacionado com as particularidades das condições das culturas de células que cada estudo possui, bem como com as diferentes regiões de onde as CTMs são obtidas (MAFI *et al.*, 2011).

A medula óssea ainda se mantém como a principal fonte de CTMs em humanos. No entanto, em adultos a quantidade de CTMs nesse tecido é muito baixa e a capacidade proliferativa, o potencial de expansão e a multipotencialidade dessas células decrescem com o aumento da idade do indivíduo (ZHANG *et al.*, 2004; FEHRER; LEPPERDINGER, 2005). Sendo assim, vários estudos vêm buscando isolar CTMs de diferentes tecidos. Dentre os tecidos dos quais as CTMs já foram efetivamente isoladas encontram-se o tecido muscular esquelético e a derme (YOUNG *et al.*, 2001), o tecido adiposo (ZUK *et al.*, 2001), a membrana sinovial (DE BARI *et al.*, 2001), o endotélio e

subendotélio da veia umbilical (COVAS, D T *et al.*, 2003) e da veia safena (COVAS *et al.*, 2005), os rins (ALMEIDA-PORADA *et al.*, 2002), o sangue do cordão umbilical e placentário (LEE *et al.*, 2004; LEE *et al.*, 2004), a medula óssea vertebral (AHRENS *et al.*, 2004), o ligamento periodontal (SEO *et al.*, 2004) e o sangue menstrual (ALLICKSON *et al.*, 2011). É importante ressaltar que estudos clínicos têm demonstrado que tecidos extraembrionários, como a placenta humana, além de desempenhar um papel fundamental no desenvolvimento fetal, também mantém um reservatório importante de CTMs (PAROLINI *et al.*, 2008).

1.2 PLACENTA HUMANA

Durante a gestação, os vertebrados vivíparos desenvolvem um sistema complexo de membranas nutricionais que envolvem o feto. No local de união das membranas fetais com a mucosa uterina é formada a placenta (LEISER; KAUFMANN, 1994).

A placenta é um órgão temporário que atua nas trocas fisiológicas entre a mãe e o feto, sendo assim, consiste de uma parte fetal, denominada córion, e uma parte materna, a decídua basal. Dessa maneira, a placenta é composta por células derivadas de dois indivíduos geneticamente distintos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

Em humanos, após a fertilização, o blastocisto se anexa ao endométrio e as células trofoblásticas que envolvem a massa celular interna iniciam a implantação. Enquanto as células trofoblásticas se diferenciam em células cada vez mais especializadas, que irão permitir a circulação de nutrientes entre a mãe e o feto, as células da massa celular interna darão origem ao feto. Durante o processo de implantação do blastocisto no endométrio, a massa celular interna dá origem a uma camada de células denominada hipoblasto. As células do hipoblasto, por sua vez, migram para as extremidades do blastocisto para dar origem a um tecido conjuntivo chamado de mesoderme extraembrionária, que irá circundar o saco vitelínico e a cavidade amniótica. O âmnio e o córion são originados da mesoderme extraembrionária, enquanto que o córion trofoblástico, como o próprio nome já diz, tem origem das células trofoblásticas (EVANGELISTA *et al.*, 2008). Ao final da quarta semana após a fertilização, a placenta já está completamente formada e

realizando as trocas fisiológicas entre a mãe e o feto (ILANCHERAN *et al.*, 2009).

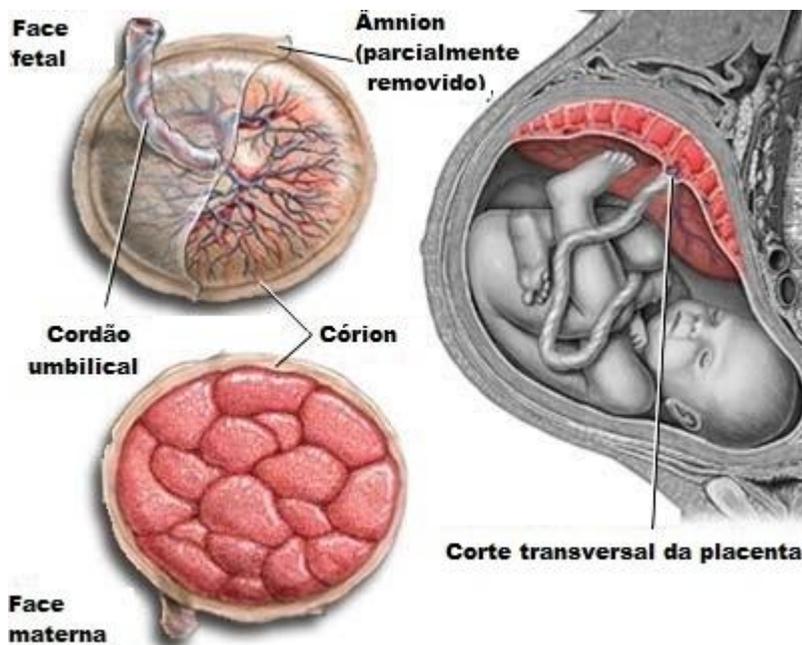


Figura 2. Anatomia da placenta humana. Representação da anatomia da placenta humana através de um corte transversal, além dos detalhes na face fetal e na face materna. A face fetal é composta pelo amnion recobrindo o cório (adaptado de A.D.A.M. Health Solution, 2012).

Após estar formada, a placenta possui uma forma discoide com o diâmetro de 15 a 20 cm e espessura de 2 a 3 cm. As membranas fetais da placenta são compostas pelo amnion e pelo cório (figura 2), que são as regiões as quais a maioria dos trabalhos utiliza como fonte de CTs (PAROLINI *et al.*, 2008; ILANCHERAN *et al.*, 2009).

1.2.1 Células-Tronco da placenta

Tecidos extraembrionários como fontes de CTMs apresentam várias vantagens sobre tecidos embrionários e outras fontes de CTMs adultas. Além de os tecidos extraembrionários serem rotineiramente descartados após o parto, fazendo com que não haja problemas de natureza ética na utilização desses tecidos, também são de fácil obtenção quando comparados com os métodos de obtenção de CTMs adultas da medula óssea (ZHANG *et al.*, 2004; EVANGELISTA *et al.*, 2008; MARCUS; WOODBURY, 2008; ILANCHERAN *et al.*, 2009). Já a utilização de CTs embrionárias, além de resultar na destruição do embrião, também apresenta um grande potencial de geração de teratomas após a implantação *in vivo* (YEN *et al.*, 2005; EVANGELISTA *et al.*, 2008). O volume significativo de tecido extraembrionário, em particular o da placenta, permite o isolamento de um grande número de CTMs em comparação com o número dessas mesmas células que pode ser obtido de outras fontes, como o cordão umbilical ou a medula óssea (MIAO *et al.*, 2006; MARCUS; WOODBURY, 2008; HUANG *et al.*, 2009).

Devido ao fato de a placenta ser gerada nos primeiros estágios do desenvolvimento embrionário, há grandes esperanças de que suas células mantenham a plasticidade das células embrionárias primárias das quais se originaram (EVANGELISTA *et al.*, 2008; PAROLINI *et al.*, 2008). Já foi demonstrado que células da placenta humana, em cultura, possuem a habilidade de se diferenciar em células de linhagem mesodermal como osteoblasto e adipócito, células de linhagem ectodermal com características neuronais (YEN *et al.*, 2005), bem como em células hepáticas de origem endodermal (CHIEN *et al.*, 2006).

Vários estudos descrevem a obtenção de CTs a partir de diferentes regiões da placenta. Essas células são caracterizadas e obtidas através de metodologias diversas. Dentre as populações de CTs já isoladas da placenta estão as CTMs, as CTs hematopoiéticas, bem como progenitores endodermais, células trofoblásticas coriônicas e CTs epiteliais amnióticas (ALVAREZ-SILVA *et al.*, 2003; PAROLINI *et al.*, 2008; CHEN *et al.*, 2009). Por ser uma importante fonte de CTs, a placenta tem sido bastante explorada por grupos de pesquisa que

investigam estas células (CHEN, LI *et al.*, 2009; ILANCHERAN *et al.*, 2009; SEMENOV *et al.*, 2009).

1.3 DIFERENCIAÇÃO DAS CÉLULAS-TRONCO

A diferenciação de uma CT é um processo dependente de diversos fatores, tais como microambiente, interações célula-célula, divisões assimétricas e regulação gênica (acetilação da cromatina, metilação de sequências gênicas e regulação pós-transcricional por microRNAs). No entanto, os mecanismos reguladores desses fatores ainda não foram completamente elucidados (WATT; HOGAN, 2000; RAFF, 2003; LEE *et al.*, 2011; BASSON, 2012).

Diversas proteínas participam de maneiras variadas no processo de diferenciação das CTs. Uma família de proteínas de membrana que atua em diversos mecanismos celulares, inclusive na diferenciação, é o da superfamília das imunoglobulinas (*immunoglobulin superfamily* - IgSF). Dentre o grupo de proteínas pertencente à IgSF, um que tem sido pouco estudado é o da família NEPH, também conhecidas como KIRREL (kin of IRRE like). A família NEPH é composta por 3 proteínas: NEPH1, NEPH2 e NEPH3, e atuam de forma crucial no funcionamento renal (TRYGGVASON, 1999; LIU *et al.*, 2003; SELLIN *et al.*, 2003). No entanto, sua participação no desenvolvimento de diversas estruturas como o sistema nervoso central e o sistema muscular, tem sido salientada em diferentes organismos nos últimos anos (NEUMANN-HAEFELIN *et al.*, 2010; ARIF *et al.*, 2011; KONG *et al.*, 2011).

1.4 PROTEÍNAS NEPH

1.4.1 Superfamília das imunoglobulinas

As proteínas NEPH, como descrito anteriormente, são integrantes da IgSF. As IgSF são uma classe de moléculas de reconhecimento célula-célula, que compartilham um variado número de domínios extracelulares tipo imunoglobulina como estrutura comum, e interagem com outras IgSF. Além das proteínas NEPH, fazem parte da IgSF as moléculas de adesão de células neurais, integrinas, receptores tirosina quinases, plexinas, neuroliginas e neurexinas, moléculas que possuem

papel comprovado no reconhecimento celular e morfogênese de tecidos. Tem sido demonstrado que estas proteínas estão envolvidas em vários mecanismos ontogênicos incluindo a formação de sinapses, orientações axonais e determinação do destino celular (MANESS; SCHACHNER, 2007; VÖLKER *et al.*, 2011).

1.4.2 Estrutura e função das proteínas NEPH nos rins

Todas as proteínas NEPH consistem de cinco domínios extracelulares do tipo imunoglobulina, um domínio transmembranar e uma cauda citoplasmática (SELLIN *et al.*, 2003). Em conjunto com a proteína NEPHRINA, também integrante da IgSF, as proteínas NEPH desempenham um papel fundamental no desenvolvimento e manutenção da barreira de filtração renal (DONOVIEL *et al.*, 2001; NEUMANN-HAEFELIN *et al.*, 2010).

NEPH1 interage com a NEPHRINA na fenda do diafragma glomerular, uma junção especial dos podócitos nos rins (LIU *et al.*, 2003). Os podócitos possuem um corpo celular de onde partem prolongamentos primários, que por sua vez se dividem formando os prolongamentos secundários, estes se enrolam e aderem esta célula aos capilares glomerulares. Os domínios extracelulares da NEPHRINA e de NEPH1 ligam-se uns aos outros de maneira heterofílica e homofílica, constituindo um complexo proteico localizado na fenda do diafragma e responsável pela barreira que impede a passagem de proteínas do sangue para a urina (GERKE *et al.*, 2005). A deleção de *Neph1* em camundongos acarreta doença glomerular severa e morte perinatal (DONOVIEL *et al.*, 2001).

Em contraste com NEPH1, o papel de NEPH2 e NEPH3 na biologia dos podócitos ainda não está claro. No entanto, fragmentos solúveis de NEPH2 foram encontrados na urina de indivíduos saudáveis. A fragmentação da proteína ocorre através da clivagem dos domínios extracelulares de NEPH2, que é realizada por metaloproteinases. Os autores sugerem que a atuação de NEPH2 nos glomérulos renais possa ocorrer por sinalizações à distância através desse mecanismo (GERKE, PETER *et al.*, 2005). Todas as proteínas NEPH, ou seja, NEPH1, NEPH2 e NEPH3, ligam-se à proteína da fenda do diafragma, a podocina, e têm sido apontadas como centrais nos mecanismos de sinalização da fenda do diafragma (SELLIN *et al.*, 2003).

1.4.3 Funções extrarrenais das Proteínas NEPH

Funções de NEPH adicionais às dos rins têm sido identificadas e intensivamente estudadas em organismos modelo, como *Drosophila melanogaster* e *Caenorhabditis elegans* (STRÜNKELNBERG *et al.*, 2001; DWORAK; SINK, 2002; CHEN *et al.*, 2009). Estudos iniciais em *D. melanogaster* demonstraram que IrreC/Rst, ortólogo de NEPH1, influencia a orientação do quiasma óptico. Estes estudos mostraram que interações homofílicas entre IrreC/Rst são necessárias para a projeção neuronal do lobo ocular, enquanto que a superexpressão ou deleção do gene *IrreC/Rst* geram erros na orientação axonal. Tal gene também está envolvido no desenvolvimento muscular da *D. melanogaster*. IrreC/Rst inicia a fusão dos mioblastos para formar as unidades musculares finais através de interações célula-célula (SCHNEIDER *et al.*, 1995; MENON *et al.*, 2005). Da mesma forma, através de interações célula-célula, SYG-1, ortólogo de NEPH1 em *C. elegans*, é responsável por determinar a formação sináptica específica do neurônio motor específico hermafrodita (HSN) neste verme (SHEN; BARGMANN, 2003).

Em camundongos e galinhas foram observadas variações na expressão dos genes *Neph* em diferentes tecidos ao longo do desenvolvimento. As variações da expressão deste gene foram observadas em tecidos como os arcos branquiais, somitos, coração, broto dos pulmões e crista ectodérmica apical, dando suporte ao conceito de que as proteínas *Neph* de vertebrados, similarmente às ortólogas de *D. melanogaster* e *C. elegans*, fornecem orientação para o reconhecimento celular e a morfogênese de tecidos de vários órgãos (VÖLKER *et al.*, 2011)

A expressão de *mKirre*, homólogo de *NEPH2* em camundongos, está envolvida no suporte de CT hematopoiéticas exercido pelas células estromais da medula óssea, através da clivagem por metaloproteinases de seu domínio extracelular que sinaliza para as CTs hematopoiéticas se manterem em seu estado indiferenciado (UENO *et al.*, 2003). Também em camundongos, foi demonstrado que *NEPH2* está envolvido na formação dos núcleos pontinos no sistema nervoso central controlando a migração tangencial intranuclear (NISHIDA *et al.*, 2011). Além disso, recentemente em nosso laboratório, foi demonstrada a expressão de *NEPH1* e *NEPH2* nas CTMs da placenta humana e um possível papel na

diferenciação dessas células para o fenótipo neuronal foi atribuído a estes genes (KOHLER, 2009).

Com base nas observações da atuação dos genes *NEPH* na morfogênese de diversas estruturas em diferentes espécies, há uma forte evidência de que esses genes possam estar envolvidos no processo de diferenciação das CTMs para outros fenótipos além do neuronal. A placenta é o modelo ideal para desenvolver tais estudos devido à facilidade de obtenção e isolamento de suas CTMs, além da capacidade de diferenciação dessas células e a já demonstrada expressão dos genes *NEPH1* e *NEPH2* no trabalho citado anteriormente.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar as diferenças de expressão de genes *NEPH* entre CTMs da placenta humana indiferenciadas e quando induzidas à diferenciação, bem como, avaliar sua possível influência no processo de diferenciação celular.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a expressão de genes *NEPH* em CTMs da placenta humana.
- Avaliar as diferenças na expressão de genes *NEPH* nas CTMs da placenta humana induzidas à diferenciação para o fenótipo adipogênico quando comparadas com células indiferenciadas.
- Padronizar a metodologia de transfecção de CTMs da placenta humana com plasmídeos, assim como padronizar a técnica de RNAi para posterior silenciamento dos genes *NEPH* nestas células.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 OBTENÇÃO E ISOLAMENTO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DE PLACENTA HUMANA

As placentas foram obtidas através de uma colaboração com o Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina (HU/UFSC). Pais de recém-nascidos saudáveis, com gestação a termo, parto natural e peso adequado fizeram a doação, mediante a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (Anexo A). O TCLE teve como objetivo esclarecer aos doadores a linha de pesquisa, a segurança e a seriedade com que esta foi realizada. Os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da UFSC, através de número de protocolo 311/08-CEPSH/PRPG.

Após a coleta da placenta, recipientes estéreis contendo salina tamponada por fosfato (PBS - NaCl, 113 mM; KCl, 2 mM; CaCl₂, 1 mM; NaHCO₃, 3,6 mM) foram utilizados para armazenar as placentas e transportá-las para o Laboratório de Células Tronco e Regeneração Tecidual (LACERT) da UFSC, onde as células foram cultivadas. Para a realização das culturas celulares utilizamos a porção do córion, região próxima ao cordão umbilical (figura 2). Após a fragmentação desta região, com auxílio de tesoura e pinça, foi feita a remoção do âmnio. Os fragmentos de córion da placenta foram dissociados mecanicamente com auxílio de tesoura e pinça e digeridos enzimaticamente com 200 µL da enzima dispase (BD) a 50 unidades/mL, por aproximadamente 8 minutos a 37°C, centrifugados por 5 minutos a 300 X g para remoção da enzima e submetidos à digestão com 1 mL da enzima colagenase I (Sigma) a 250 unidades/mL, por 1 hora a 37°C. O tecido dissociado foi filtrado com *Cell Strainer* 70 µm (BD) e incubado por 5 minutos a temperatura ambiente com IMDM (*Iscove's Modified Dulbecco's Medium*, Invitrogen) suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF) (Cultilab) e 0,5% de penicilina/estreptomicina (ambas Gibco) e, após esse período, centrifugado por 7 minutos a 300 X g. O *pellet* resultante foi ressuspenso em 5 mL de IMDM. Logo após, as células foram plaqueadas em garrafas de cultura de 25 cm² (Corning) e mantidas em estufa úmida a 37°C e 5% de CO₂. Cinco dias após o plaqueamento, o meio de cultura foi trocado e as células que não aderiram ao plástico foram descartadas (SONCINI *et al.*, 2007). As trocas do meio foram

realizadas periodicamente a cada quatro dias, sempre havendo remoção das células não aderentes, selecionando assim, as CTMs por sua adesão ao plástico (SONCINI, 2007). As células foram mantidas desta forma até atingirem confluência de 80% - 90% para então dar-se sequência à manutenção das culturas.

3.1.1 Cultura das células-tronco mesenquimais obtidas da placenta humana

Aproximadamente uma semana após as culturas de células atingirem a confluência de 80% a 90%, as células aderentes foram removidas usando solução de tripsina a 0,05% (Gibco) e ácido etilenodiamino tetra-acético a 0,1 M (EDTA, Invitrogen), e recuperadas em meio de cultura contendo 10% de SBF seguido de centrifugação (300 X g por 5 minutos). Logo após a centrifugação as células foram replaqueadas na concentração de 1×10^5 células/mL em meio IMDM suplementado com 10% de SBF e 0,5% de penicilina/estreptomicina. Esta cultura foi intitulada passagem 1. A cada tripsinização e replaqueamento foi contado uma passagem, sendo que os experimentos foram conduzidos com células com passagens de 5 a 8 para garantir a homogeneidade da cultura. Depois de atingirem passagens superiores a 5, as células foram submetidas a análises fenotípicas e ao processo de indução à diferenciação.

3.2 IMUNOFENOTIPAGEM DAS CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS

Para caracterização das CTMs foi utilizada a técnica de citometria de fluxo, que consiste na marcação das células através do reconhecimento de antígenos de superfície específicos da membrana celular. Para a detecção desses antígenos foram utilizados anticorpos monoclonais previamente conjugados com fluorocromo (tabela 1). Durante a realização desses experimentos foram realizados controles negativos utilizando isotipo FITC, PE e PerCP (BD).

Tabela 1: Marcadores utilizados para caracterização imunofenotípica das CTMs da placenta humana através de citometria de fluxo.

Marcador de superfície	Fluorocromo conjugado	Volume utilizado
CD73	PE	5 µL
CD90	FITC	1 µL
CD105	PerCP	5 µL
CD34	PE	5 µL
CD45	FITC	5 µL

Aliquotas de 100 µL de suspensão celular diluídas em PBS suplementado com 10% de SBF, contendo 10^5 células, foram colocadas em tubos de poliestireno 12 x 75 mm (Falcon) previamente identificados com os diferentes marcadores. Logo após, foram adicionados os anticorpos monoclonais marcados com fluorocromos (em quantidades de acordo com a tabela 1) e as amostras foram incubadas no escuro, à temperatura ambiente, por 1 hora. A seguir, após terem sido acrescentados 2 mL de PBS suplementado com 10% de SBF em cada tubo, as amostras foram centrifugadas a 300 X g por 5 minutos. Os sobrenadantes foram desprezados, novamente adicionado 2 mL de PBS suplementado com 10% de SBF em cada tubo e a centrifugação repetida. Cada *pellet* foi ressuspensionado em 200 µL de PBS suplementado com 10% de SBF e analisados no citômetro de fluxo Facs CantoII (BD). Os dados foram gerados pelo *software* Facs Diva 6.0 e analisados no *software* FlowJo. Foram utilizadas células mononucleares como controle positivo para os marcadores CD45 e CD34, uma vez que as CTMs são negativas para tais marcadores (DOMINICI *et al.*, 2006)

3.3 INDUÇÃO DA DIFERENCIAÇÃO ADIPOGÊNICA

Para indução da diferenciação para o fenótipo adipogênico utilizamos o protocolo previamente descrito por Pittenger (1999), que consistiu na utilização de 1×10^4 células/poço que foram cultivadas em placas de 24 poços (Corning) em meio de cultura IMDM suplementado com 10% de SBF e 0,5% de penicilina/estreptomicina. Após as culturas atingirem confluência de 80%, o meio foi substituído pelo meio indutor

para a diferenciação adipogênica composto por DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, Invitrogen) suplementado com 10% de SBF, 0,5% de penicilina/estreptomicina, dexametasona a 10^{-8} M (Sigma), indometacina a 100 μ M (Sigma), insulina a 4,3 mM (Sigma) e isobutilmetilxantina a 0,5 mM (IBMX, Sigma). As células foram mantidas em estufa úmida, a 37°C e 5% de CO₂. O tratamento foi aplicado por 20-21 dias com trocas de todo o meio a cada 4 dias. Para o grupo controle, as CTMs da placenta humana foram plaqueadas em condições idênticas e mantidas em meio IMDM suplementado com 10% de SBF e 0,5% de penicilina/estreptomicina.

Após o período do tratamento, parte das células foi fixada em paraformaldeído a 4% (Sigma) para posterior coloração. Outra parte teve seu RNA total extraído para posterior análise da expressão de genes pela reação da transcriptase reversa seguida pela reação em cadeia da polimerase (RT-PCR).

3.4 COLORAÇÃO DAS CÉLULAS DIFERENCIADAS

Para evidenciar os vacúolos de gordura e avaliar a diferenciação das células submetidas ao meio indutor de adipogênese, foi utilizado o corante Oil Red O (Sigma), onde, em uma solução de 6 mL de Oil Red a 0,5% de isopropanol (Sigma) foram adicionados 4 mL de água, fazendo uma solução com volume final de 10 mL. Destes 10 mL, 300 μ L foram adicionados por poço durante 5 minutos. Após a remoção do corante as células foram lavadas com PBS e então observadas em campo claro em microscópio invertido (Olympus IX71) e fotografadas em câmera (Olympus DP71).

3.5 REAÇÃO DA TRANSCRIPTASE REVERSA SEGUIDA PELA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (RT-PCR)

As culturas foram preparadas segundo os procedimentos descritos anteriormente e, após o tratamento de indução à diferenciação adipogênica, foi feita a extração do RNA total para ensaios de RT-PCR. O meio de cultura foi removido dos poços e o conteúdo celular total destas amostras foi extraído utilizando reagente Trizol (Invitrogen) 1 mL/10cm². O conteúdo celular total foi transferido para microtubos de 1,5 mL (Eppendorf), onde foram adicionados 200 μ L de clorofórmio

(Merck). Esta solução foi homogeneizada, incubada por 3 minutos em temperatura ambiente e submetida à centrifugação a 12.000 X g por 15 minutos a 4°C. Logo após, a fase aquosa incolor, contendo o RNA, foi transferida para um novo tubo de 1,5 mL, onde foram adicionados 500 µL de álcool isopropílico (Sigma). A solução foi mais uma vez incubada por 10 minutos em temperatura ambiente e centrifugada a 12.000 X g por 10 minutos a 4°C. Em seguida, o sobrenadante foi descartado, o *pellet* foi lavado com 1 mL de álcool etílico a 75% (Merck) e posteriormente centrifugado a 7.500 X g por 5 minutos a 4°C. Terminada a centrifugação, o sobrenadante foi removido e o *pellet* resultante correspondente ao RNA total foi ressuscitado em água Milli-Q (Millipore Corporation) livre de RNase e quantificado em espectrofotômetro nanovue (GE).

Para eliminar quaisquer resquícios de DNA genômico do RNA total, foi realizado o tratamento com o *kit RQ1 RNase-Free DNase* (Promega). Conforme as instruções do fabricante, foram utilizados 1 µg do RNA total extraído, 1 µL de tampão de reação, 1 unidade de DNase e água para completar o volume final de 10 µL. Os reagentes foram então incubados por 30 minutos a 37°C. Após este período foi adicionado 1 µL de *stop solution* e as amostras foram novamente incubadas por 10 minutos a 65°C para a inativação da DNase. Após este processo, deu-se sequência à síntese do DNA complementar (cDNA).

3.5.1 Síntese de cDNA

A partir de 1 µg do RNA total tratado com DNase, a fita de cDNA foi sintetizada através do *Kit* para transcrição reversa *ImProm-II™ Reverse Transcription System* (Promega). Conforme especificações do fabricante, primeiramente foi realizada uma reação com o RNA, 0,5 µL de oligo(dT) e água para completar um volume final de 5 µL. As amostras foram então incubadas por 5 minutos a 70°C. Esta primeira reação serve para que o os oligo(dT), que são utilizados como oligonucleotídeos iniciadores pela transcriptase reversa, reconheçam e se liguem nas caudas poli-A dos mRNAs. Em seguida, as amostras foram transferidas para o gelo e incubadas por 5 minutos. Logo após, foram preparadas as reações com 4 µL de tampão (*ImProm-II™ 5X Reaction Buffer*), 5 mM de MgCl₂, dNTP Mix a 0,5 mM de cada dNTP, 20 unidades da enzima inibidora de ribonuclease (Rnasin), 1 unidade da

enzima transcriptase e água para completar o volume de 15 µL. Os reagentes foram misturados com a primeira reação e incubados por 5 minutos a 25°C, 1 hora a 42°C e 15 minutos a 70°C. Todos os reagentes fazem parte do *kit* para transcrição reversa da Promega.

Foram utilizados 2 controles para cada amostra na reação de RT, onde 1 continha todos os reagentes, exceto o RNA, para verificar se havia alguma contaminação na reação; o outro controle continha todos os reagentes, exceto a transcriptase reversa, para verificar se havia contaminação por DNA genômico nas amostras. Após a síntese de cDNA, as amostras foram submetidas à PCR.

3.5.2 PCR

Na técnica de PCR para amplificação dos genes *NEPH* a partir do cDNA sintetizado, foram utilizados 0,4 µM de oligonucleotídeos iniciadores específicos (tabela 2), sendo um senso e outro anti-senso, 12,5 µl do reagente *GoTaq Master Mix* (Promega) e 1 µL de cDNA, em um volume final de 25 µL. As amostras foram desnaturadas inicialmente a 94°C por 4 minutos, em seguida, foram submetidas a 35 ciclos de 94°C por 45 segundos para dissociação, 56,3°C-60°C por 45 segundos dependendo do oligonucleotídeo iniciador (temperatura de anelamento, tabela 2), 72°C por 1 minuto para extensão, com uma extensão final a 72°C por 10 minutos. As reações foram realizadas no termociclador *Mastercycler gradient* (Eppendorf) e em triplicata para cada amostra. Nestes experimentos, a expressão do gene gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*GAPDH*) foi utilizada como controle positivo das reações. Em todos os experimentos foram utilizados controles negativos que consistiram em adicionar todos os reagentes, exceto o cDNA, para averiguar se havia alguma contaminação nas reações. Após a amplificação, os produtos foram analisados por eletroforese em gel de agarose.

Tabela 2: Sequência de oligonucleotídeos iniciadores utilizados para os experimentos de RT-PCR.

Gene	Sequência de oligonucleotídeos iniciadores	Temperatura de anelamento (°C)	Tamanho do fragmento amplificado
<i>NEPH1</i>	Senso: CTGCCACCATCATCTGGTTC	56,3	448 pb
	Anti-senso: GTGCTGACATTGGTGCTTCC		
<i>NEPH2</i>	Senso: CATCATCTCCAGCACCCAGA	56,6	400 pb
	Anti-senso: TGCCATAAGGACGAGGAAGG		
<i>GAPDH</i>	Senso: ATGAGGTCCACCACCTGTT	60	441 pb
	Anti-senso: ATCACTGCCACCCAGAAGAC		

3.5.3 PCR em tempo real

A técnica de PCR em tempo real teve como objetivo determinar a expressão relativa dos genes *NEPH1* e *NEPH2* nas células de placenta humana que foram induzidas à diferenciação em comparação com as células não diferenciadas, utilizando a expressão do gene *GAPDH* como controle endógeno e normalizador da quantificação. Para realização da técnica, foram utilizados o método *SYBR® Green* (Invitrogen), e oligonucleotídeos iniciadores específicos para cada reação (tabela 3). Antes da realização das análises comparativas de expressão, foram determinadas a temperatura de anelamento ideal dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados e a eficiência de amplificação. Para isso, foram testadas as temperaturas de anelamento de 56,5°C, 58,5°C e 60°C para os oligonucleotídeos iniciadores do *NEPH1*, 55,5°C, 56,8°C e 59°C para os oligonucleotídeos iniciadores do *NEPH2* e 53°C, 55°C e 57°C para os oligonucleotídeos iniciadores do *GAPDH*, onde a temperatura que apresentou menor “ciclo limiar” (*Threshold cycle - Ct*) e menor variação de Ct entre as replicatas foi considerada a ideal.

Para que os experimentos de PCR em tempo real sejam validados, há necessidade de que a eficiência de amplificação, tanto para

os genes alvo quanto para o controle endógeno, seja similar e próxima a 100%. Para determinar a eficiência de amplificação para os oligonucleotídeos iniciadores do *NEPH1* e do *NEPH2*, foram realizadas diluições seriadas das amostras de 100 ng, 50 ng, 25 ng, 12,5 ng e 6,25 ng, e, para o *GAPDH*, diluições de 10 ng, 2 ng, 0,4 ng, 0,08 ng e 0,016 ng, sendo que curvas de eficiência foram construídas em função dessas diluições do cDNA. A partir das curvas de eficiência também foi possível determinar os limites mínimos e máximos de Ct aceitáveis para cada oligonucleotídeo iniciador. Todos os experimentos foram conduzidos em replicata, utilizando cDNA de CTMs da placenta humana indiferenciadas e os dados foram gerados pelo *software Realplex* versão 2.2 (Eppendorf). Após determinada a temperatura de anelamento ideal e a eficiência de amplificação, demos sequência às análises por PCR em tempo real.

Tabela 3: Sequência de oligonucleotídeos iniciadores utilizados para os experimentos de RT-PCR em tempo real.

Gene	Sequência de oligonucleotídeos iniciadores	Temperatura de anelamento ideal (°C)	Tamanho do fragmento amplificado
<i>NEPH1</i>	Senso: GGGCCATCGTGCCTCGAATC	57	170 pb
	Anti-senso: CCAGGCCCATGCTATGCGGT		
<i>NEPH2</i>	Senso: AGGAGCAAGGTTCGGAAATGAAGTC	59	153 pb
	Anti-senso: GAGATTTCTCTGGGAACGGGCAACA		
<i>GAPDH</i>	Senso: GAAGGTGAAGGTCGGAGTC	60	226 pb
	Anti-senso: GAAGATGGTGATGGGATTTC		

Para os experimentos de PCR em tempo real foram utilizados 5 µL de *Platinum® Quantitative PCR SuperMix-UDG* (Invitrogen), oligonucleotídeos iniciadores específicos para cada reação (tabela 2) e água para completar um volume final de 10 µL. Para os experimentos com *NEPH1* foram utilizados 25 ng de cDNA e 0,5 µM de cada iniciador, já no caso do *GAPDH* foram utilizados 2 ng de cDNA e 0,3

μM de cada iniciador. As amostras foram desnaturadas inicialmente a 95°C por 4 minutos, em seguida, foram submetidas a 35 ciclos de 95°C por 30 segundos, $57\text{-}60^\circ\text{C}$ por 30 segundos dependendo do oligonucleotídeo iniciador (tabela 3), 72°C por 30 segundos. Ao fim de cada reação foi realizada a curva de dissociação (*melting curve*) na qual cada amostra foi mantida a 95°C por 15 segundos, e aquecida de 60°C a 95°C gradativamente por 20 minutos. Como controle negativo de reação foram utilizados todos os reagentes, exceto o cDNA. Não foram realizados experimentos de PCR em tempo real com o gene *NEPH2*, pois não foi possível determinar uma eficiência de amplificação adequada utilizando os oligonucleotídeos iniciadores disponíveis.

As análises por PCR em tempo real foram conduzidas em triplicata para cada amostra, utilizando o termociclador *Mastercycler ep Realplex* (Eppendorf). Os níveis de expressão foram quantificados comparativamente conforme a equação de Pfaffl (Equação 1), utilizando a expressão de *GAPDH* como normalizador da reação.

Equação 1: Equação de Pfaffl

$$\text{Taxa} = \frac{E_{\text{alvo}}^{\Delta\text{Ct alvo}(\text{controle} - \text{tratado})}}{E_{\text{referência}}^{\Delta\text{Ct referência}(\text{controle} - \text{tratado})}}$$

- E_{alvo} = eficiência de amplificação do gene alvo
- $\Delta\text{Ct alvo}$ = a diferença entre o Ct do gene alvo no grupo controle e no grupo tratado
- $E_{\text{referência}}$ = eficiência de amplificação do gene de referência
- $\Delta\text{Ct referência}$ = a diferença entre o Ct do gene de referência do grupo controle e no grupo tratado

3.5.4 Eletroforese em gel de agarose

Os produtos das reações de PCR foram corados com o reagente *Blue Green Load Dye I* (LGC) ($0,1 \mu\text{L}$ para $7 \mu\text{L}$ de reação) e separados por eletroforese em gel de agarose a 2% (Invitrogen), em cuba para eletroforese (Locus Biotecnologia) por 20 minutos, à uma corrente elétrica de 250 V, utilizando tampão Sódio-Ácido Bórico (SB) composto por hidróxido de sódio (NaOH - Sigma) a 10 mM e pH ajustado com ácido bórico (H_3BO_3 - Sigma) para 8,5; e *100 bp DNA Ladder* (Invitrogen) como marcador de peso molecular. Após a

eletroforese, os produtos amplificados foram visualizados sob a luz ultravioleta (UV) em transiluminador (*Benchtop UV Transilluminator - UVP*) e as imagens do gel foram capturadas através do sistema *Multidoc-It Digital Imaging System* (UVP).

Nas reações de PCR em tempo real que determinaram as eficiências de reação também foram realizadas análises dos produtos gerados por eletroforese. O objetivo destas análises foi confirmar o tamanho do produto amplificado e a inexistência de produtos inespecíficos. Os experimentos foram conduzidos como descrito acima, exceto pela adição de *Blue Orange Dye* (Promega) (1,1 μL para 7 μL de reação) para dar peso à amostra e permitir o rastreamento da migração durante a eletroforese.

3.6 TRANSFEÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DE PLACENTA HUMANA COM PLASMÍDEOS

A padronização da transfecção de CTMs de placenta humana com plasmídeos foi realizada com o objetivo de aplicar esta metodologia no silenciamento dos genes *NEPH* nas CTMs através da técnica de RNAi, fazendo uso de plasmídeos como vetores. Para tal padronização utilizamos o plasmídeo pCX-EGFP, que foi gentilmente doado pelo Dr. Masaru Okabe, Osaka University, Japão. Este plasmídeo confere às células a expressão da Proteína Verde Fluorescente (GFP), o que possibilita a observação das células transfectadas pela simples exposição da proteína à luz UV, sem necessidade de qualquer tratamento. Além disso, este plasmídeo também confere resistência à ampicilina, o que permite selecionar as bactérias transformadas no momento da amplificação do mesmo.

3.6.1 Amplificação do plasmídeo

A amplificação do plasmídeo pCX-EGFP foi realizada na linhagem de bactérias competentes JM-109 - *Escherichia coli* (Promega). Conforme as orientações do fabricante, foram colocadas 1-50 ng de plasmídeo GFP em 100 μL de bactérias competentes e, após 30 minutos de incubação no gelo, foi aplicado um choque térmico de exatamente 42°C durante 45 segundos para a incorporação dos plasmídeos nas bactérias. As bactérias foram então incubadas durante 2

minutos em gelo, após este período foram acrescentados 900 μL de meio Lysogeny Broth (LB) composto por Bact Triptona a 1% (BD), extrato de levedura a 0,5% (BD), NaCl 1% (BD) e pH ajustado para 7; e foram mantidas em estufa a 37°C sob agitação (225 RPM) durante 1 hora. Logo após, 100 μL das bactérias foram plaqueados em placas de cultura previamente preparadas com LB-Agar a 1,5% (BD) e antibiótico a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (ampicilina Invitrogen) e incubadas a 37°C *overnight*. O plasmídeo pCX-EGFP também possui um gene que confere resistência ao antibiótico ampicilina, permitindo o uso de tal antibiótico na seleção das bactérias que incorporarem e expressarem o plasmídeo. Como controles negativos do experimento, bactérias sem o plasmídeo foram colocadas em LB com antibiótico e incubadas em estufa a 37°C, *overnight*. Além disso, como controle das condições experimentais, também foram incubadas placas de Petri contendo LB e agar sem a adição de bactérias, visando comprovar a esterilidade das soluções.

No dia seguinte foi selecionada, com a utilização de uma ponteira, apenas uma colônia de bactérias e estas foram incubadas em 5 mL de meio LB líquido contendo ampicilina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), durante 12 horas, a 37°C sob agitação. Após este período as células foram submetidas à extração dos plasmídeos GFP.

As extrações dos plasmídeos GFP foram realizadas através dos kits *Quick Plasmid Miniprep Kit* (Invitrogen - ver anexo B), *Plasmid Miniprep System* (Promega - ver anexo C) e *Plasmid Purification Midi Kit* (Qiagen - ver anexo D), conforme as instruções de cada fabricante. As concentrações de plasmídeos extraídos foram determinadas por espectrofotometria em espectrofotômetro Nanovue (GE). O plasmídeo EGFP clonado foi diluído em tampão eluente TE (10 mM Tris-HCl, pH 8,0 e 0,1 mM EDTA) e armazenado em tubos a -20°C para posterior utilização.

Após a extração, 250 ng de plasmídeos foram separados para eletroferese, com intuito de avaliar o tamanho e a pureza do mesmo. Como o pCX-EGFP possui sítios de restrição (figura 3) e é necessário que este esteja em forma linear para a determinação do tamanho exato do mesmo, foram utilizadas 10 unidades da enzima de restrição HindIII (Invitrogen) em 250 ng de plasmídeos para a linearização. O reagente *Blue Green Load Dye I* (LGC) (0,1 μL para 7 μL de reação) foi utilizado para corar as amostras, além do reagente *Blue Orange Dye 1X* (Promega), que foi utilizado para rastrear a migração durante a

eletroforese. As amostras foram então separadas por eletroforese em gel de agarose a 0,7% (Invitrogen), em cuba para eletroforese (Locus Biotecnologia) por 2 horas, a uma corrente elétrica de 90 V, utilizando o tampão TAE (composto por 40 mM de Tris Base - Sigma, 20 mM de ácido acético glacial - Merck e 1 mM de ácido etilenodiamino tetraacético - EDTA - Sigma, com pH ajustado para 8,0) e 100 ng de DNA do padrão de peso molecular *1 Kb Plus DNA Ladder* (Invitrogen) como padrão de peso molecular. Após a eletroforese, os plasmídeos linearizados, foram visualizados sob a luz ultravioleta em transiluminador (*Benchtop UV Transilluminator* - UVP) e as imagens do gel foram capturadas através do sistema *Multidoc-It Digital Imaging System* (UVP). Após estes testes, as CTMs da placenta humana foram transfectadas com os plasmídeos.

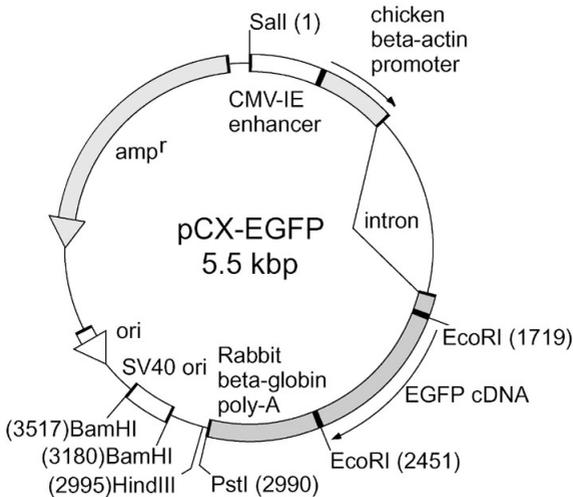


Figura 3. Mapa do plasmídeo pCX-EGFP. Esquema ilustrando o mapa do plasmídeo pCX-EGFP utilizado na padronização de transfecção das CTMs da placenta humana com plasmídeos.

Todas as manipulações de transformação das bactérias competentes foram realizadas no Laboratório de Imunologia Aplicada à Aquicultura (LIAA) do Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética da Universidade Federal de Santa Catarina, que possui os

equipamentos apropriados para a realização das técnicas propostas, além da autorização para manipulação de organismos geneticamente modificados.

3.6.2 Transfecção

As transfecções das CTMs de placenta humana com o plasmídeo pCX-EGFP foram realizadas através de dois métodos: o lipossomal, onde foram testados os reagentes *Lipofectamine*[™] 2000 (Invitrogen) e *HiPerFect Transfection Reagent* (Qiagen) e o método de eletroporação, onde foi utilizado o eletroporador *Neon*[®] *Transfection System* (Invitrogen). A eleição do melhor método foi determinada através da observação de maior taxa de células transfectadas, menor mortalidade celular e maior duração da expressão da proteína GFP.

3.6.2.1 Lipossomos

O primeiro método de transfecção utilizado foi via lipossomo através do reagente *Lipofectamine*[™] 2000 (Invitrogen). Conforme as instruções do fabricante, 1×10^4 células/poço foram cultivadas em placas de 24 poços (Corning) em meio de cultura IMDM suplementado com 10% de SBF e 0,5% de penicilina/estreptomicina. Após as culturas atingirem confluência de 80% o meio foi substituído por IMDM suplementado com 0,5% de penicilina/estreptomicina sem soro. Para cada poço foram utilizados 0,8 µg, 1,2 µg ou 1,6 µg de DNA (plasmídeo pCX-EGFP) e 2 µL, 4 µL ou 8 µL de lipofectamina, respectivamente (proporção de 1:2,5). O DNA e a lipofectamina foram diluídos separadamente em 50 µL de meio IMDM sem soro e incubados por 5 minutos em temperatura ambiente. Logo após, o DNA e a lipofectamina foram misturados (volume total de 100 µL) e incubados por 20 minutos em temperatura ambiente para a vesicularização dos plasmídeos nos lipossomos. Em seguida, cada poço contendo as CTMs recebeu os 100 µL da mistura DNA-lipofectamina, sendo incubadas em estufa úmida, a 37°C e 5% de CO₂. Quatro horas após a transfecção, o meio contendo lipofectamina foi removido e substituído por IMDM suplementado com 10% de SBF e 0,5% de penicilina/estreptomicina. As células foram observadas em microscópio epifluorescente invertido (Olympus IX71) para avaliação da eficiência da transfecção e fotografadas em câmera

(Olympus DP71). As observações foram realizadas diariamente até que a expressão de GFP não fosse mais detectada. Todos os experimentos foram realizados em triplicata e utilizando controles negativos que continham somente DNA (sem lipofectamina) ou somente lipofectamina (sem DNA).

Tabela 4: Esquema das diferentes condições testadas para transfectar as CTMs de placenta humana com o plasmídeo pCX-EGFP via HiPerFect. Os volumes são dados por poço de placa de 24 poços.

Condição	Quantidade de DNA	Volume de HiPerFect
1		1,5 µL
2	75 ng	3 µL
3		4,5 µL
4		1,5 µL
5	37,5 ng	3 µL
6		4,5 µL
7		1,5 µL
8	7,5 ng	3 µL
9		4,5 µL

O segundo método via lipossomo testado foi utilizando o reagente *HiPerFect Transfection Reagent* (Qiagen). Conforme as instruções do fabricante, no dia anterior à transfecção 5×10^4 células/poço foram cultivadas em placas de 24 poços (Corning) em 500 µL/poço de meio de cultura IMDM suplementado com 10% de SBF e 0,5% de penicilina/estreptomicina. Para cada poço foram utilizadas concentrações diferentes de DNA e de HiPerFect, que, em 9 condições, variaram entre 7,5 ng a 75 ng de DNA e 1,5 µL a 4,5 µL de HiPerFect (tabela 4). O DNA e o HiPerFect foram diluídos em 100 µL de meio IMDM sem soro e incubados por 10 minutos a temperatura ambiente para formação dos complexos de transfecção. Logo após, os 100 µL dos complexos foram adicionados aos poços contendo as CTMs e estas foram incubadas em estufa úmida, a 37°C e 5% de CO₂. As células foram observadas diariamente, para avaliação da transfecção, em microscópio epifluorescente invertido (Olympus IX71) e fotografadas em câmera (Olympus DP71). Todos os experimentos foram realizados

em triplicata e utilizando controles negativos que continham somente DNA (sem HiPerFect) ou somente HiPerFect (sem DNA).

3.6.2.2 Eletroporação

A eletroporação consiste na aplicação de pulsos elétricos que abrem poros na membrana celular, permitindo a entrada de ácidos nucleicos presentes no meio. O equipamento desenvolvido para emitir pulsos elétricos precisos nas células é chamado de eletroporador.

Neste trabalho realizamos a eletroporação visando transfecção de CTMs de placenta humana com o plasmídeo pCX-EGFP utilizando o eletroporador *Neon® Transfection System* (Invitrogen). Conforme as instruções do fabricante, CTMs em garrafas de cultura com confluência de 80% foram tripsinizadas, lavadas com PBS, ressuspendidas em tampão de ressuspensão (Invitrogen) e colocadas em um tubo de 1,5 mL. Em uma placa de 24 poços foram adicionados 500 µL/poço de meio IMDM suplementado com 10% de SBF e sem antibióticos e em seguida, a placa foi pré-incubada em estufa úmida, a 37°C e 5% de CO₂ enquanto os outros reagentes foram preparados. O DNA foi misturado com as células e o tampão de ressuspensão no tubo de 1,5 mL. Em seguida, 10 µL desta solução foram aspirados, submetidos ao pulso elétrico (tabela 5) e adicionados a 1 poço da placa de 24 poços pré-incubada (esses passos foram repetidos com os 24 poços da placa). Foram utilizadas 5x10⁴ células/poço e 1 µg de DNA/poço. Em seguida, as células foram incubadas em estufa úmida, a 37°C e 5% de CO₂ e foram observadas em microscópio epifluorescente invertido (Olympus IX71) para avaliação da eficiência da transfecção e fotografadas em câmera (Olympus DP71). As observações foram realizadas diariamente até que a expressão de GFP não fosse mais detectada.

Após o estabelecimento do melhor método de transfecção das CTMs da placenta humana com plasmídeos, deu-se sequência à padronização da técnica de RNA de interferência (RNAi), utilizando plasmídeos como via de entrega do material genético responsável pelo silenciamento gênico nas células.

Tabela 5: Esquema de pulsos testados na eletroporação para transfecção das CTMs de placenta humana com o plasmídeo pCX-EGFP.

Amostra	Poço	Voltagem do pulso	Largura do pulso (milissegundo - ms)	Número de pulsos
1	A1	Controle sem pulso		
2	A2	1.400	20	1
3	A3	1.500	20	1
4	A4	1.600	20	1
5	A5	1.700	20	1
6	A6	1.100	30	1
7	B1	1.200	30	1
8	B2	1.300	30	1
9	B3	1.400	30	1
10	B4	1.000	40	1
11	B5	1.100	40	1
12	B6	1.200	40	1
13	C1	1.100	20	2
14	C2	1.200	20	2
15	C3	1.300	20	2
16	C4	1.400	20	2
17	C5	850	30	2
18	C6	950	30	2
19	D1	1.050	30	2
20	D2	1.150	30	2
21	D3	1.300	10	3
22	D4	1.400	10	3
23	D5	1.500	10	3
24	D6	1.600	10	3

3.7 INTRODUÇÃO DA TÉCNICA DE RNAi EM CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DE PLACENTA HUMANA

A técnica de RNAi foi aplicada com o objetivo de silenciar o gene *NEPH1* nas CTMs da placenta humana através da transfecção destas células com plasmídeos contendo sequências de oligonucleotídeos de DNA que, uma vez dentro das células, transcrevem RNA dupla fita (dsRNA). O dsRNA transcrito corresponde a uma sequência do mRNA do gene *NEPH1*, isso faz com que os mecanismos de silenciamento da célula reconheçam esse mRNA e façam sua clivagem, impedindo assim a sua tradução em proteína NEPH1. Com o

silenciamento do gene *NEPH1* buscamos entender o papel desempenhado por este gene no processo de diferenciação das CTMs para o fenótipo adipogênico. Para tal, fizemos uso do *kit* para silenciamento *siSTRIKE™ U6 Hairpin Cloning Systems (Human)* (Promega). Este *kit* contém o plasmídeo *psiSTRIKE Puromycin Vector siSTRIKE™* (fornecido linearizado), no qual foram inseridos os oligonucleotídeos de silenciamento. Este plasmídeo, além de possuir um gene que confere resistência à ampicilina, permitindo a seleção de bactérias transformadas, também possui um gene que confere resistência à puromicina, que é um antibiótico letal para células eucarióticas, como as CTMs, possibilitando assim a seleção das células transfectadas. No entanto, para fazer uso de tal ferramenta de seleção, foi necessário realizar uma curva de diluição da puromicina.

3.7.1 Curva de diluição da puromicina

A curva de diluição da puromicina (Sigma) foi realizada através do tratamento das CTMs da placenta humana com diferentes concentrações deste antibiótico. As CTMs da placenta humana foram plaqueadas em placas de 24 poços (1×10^5 células/poço) em meio IMDM suplementado com 10% de SBF e 0,5% de penicilina/estreptomicina e cultivadas em estufa úmida a 37°C e 5% de CO₂. Após as culturas atingirem confluência de 80%, o meio foi substituído por 500 µL/poço de IMDM suplementado com 10% de SBF e 0,5% de penicilina/estreptomicina contendo as seguintes concentrações de puromicina: 1 µg/mL, 2 µg/mL, 4 µg/mL, 6 µg/mL, 8 µg/mL e 10 µg/mL. As células foram mantidas em estufa úmida a 37°C e 5% de CO₂ e a mortalidade celular foi verificada 48 horas após o início do tratamento em campo claro em microscópio invertido e fotografadas. Os experimentos foram realizados em triplicata e utilizando meio sem adição de puromicina como controle da reação. A menor concentração de puromicina utilizada capaz de matar todas as células do poço foi a de 6 µg/mL e foi, portanto, eleita para realizar a seleção das células transfectadas.

3.7.2 Construção e inserção dos oligonucleotídeos de silenciamento no plasmídeo *psiSTRIKE*

As seqüências dos oligonucleotídeos de silenciamento do gene *NEPH1* foram desenhadas através do programa *siRNA Target Designer* - Versão 1.6 (Promega), onde foram inseridas as seqüências dos cDNAs, ou seja, o DNA obtido a partir do mRNA do gene *NEPH1*. O programa gerou seqüências de oligonucleotídeos com extremidades compatíveis às do plasmídeo *psiSTRIKE* (figura 4). As seqüências de cDNAs foram obtidas do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). Foram adquiridas duas seqüências de oligonucleotídeos para o silenciamento do gene *NEPH1*, além de duas seqüências “embaralhadas” para serem utilizadas como controle negativo (Tabela 6).

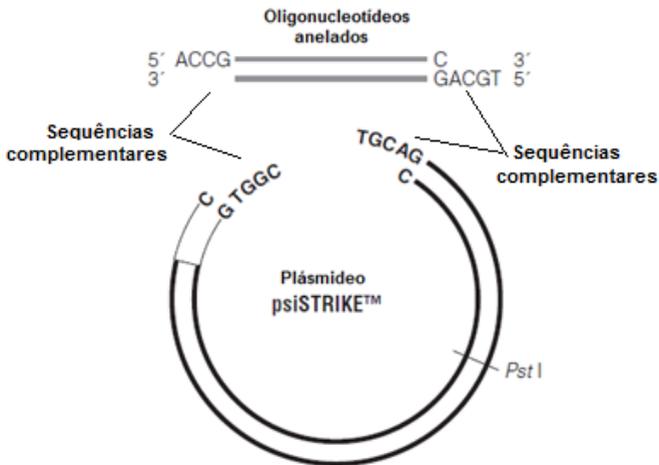


Figura 4. Seqüências complementares entre os oligonucleotídeos e o plasmídeo *psiSTRIKE*. Mapa do plasmídeo *psiSTRIKE* mostrando as seqüências complementares a serem pareadas com as dos oligonucleotídeos.

Tabela 6. Sequências de oligonucleotídeos desenhadas para o silenciamento do gene *NEPH1*.

Oligo	Sequência (5' – 3')
<i>Neph1</i> Sequência 1	Senso: TCTCGTGAGCCAAGTCTTATTATTCAAGAGATAATAA GCAGTTGGCTCACCT
	Anti-senso: CTGCAGGTGAGCCAAGTCTTATTATCTCTTGAATAAT AAGCAGTTGGCTCAC
<i>Neph1</i> Sequência 1 embaralhada	Senso: TCTCGCCGCTGCATTAGATAATTTTCAAGAGAAATTAT CTAATGCAGCGGCT
	Anti-senso: CTGCAGGCCGCTGCATTAGATAATTTCTCTTGAAAATT ATCTAATGCAGCGGC
<i>Neph1</i> Sequência 2	Senso: TCTCGTCGCTATGAGACAAATGTTTCAAGAGAACATTT GTCTCATAGCGACCT
	Anti-senso: CTGCAGGTCGCTATGAGACAAATGTTCTCTTGAAACAT TTGTCTCATAGCGAC
<i>Neph1</i> Sequência 2 Embaralhada	Senso: TCTCGTCGCTATGAGACAAATGTTTCAAGAGAACATTT GTCTCATAGCGACCT
	Anti-senso: CTGCAGGTCGCTATGAGACAAATGTTCTCTTGAAACAT TTGTCTCATAGCGAC

Primeiramente, cada senso dos oligonucleotídeos foi anelado com seu correspondente anti-senso. Para isso, foram utilizados 1 µg de oligonucleotídeo senso, 1 µg de oligonucleotídeo anti-senso e 46 µL de tampão de anelamento (Promega), totalizando um volume de 50 µL. Os reagentes foram então aquecidos a 90°C por 3 minutos e 37°C por 15 minutos. Após esse processo, os oligonucleotídeos anelados foram armazenados a -20°C para posterior utilização. A confirmação do anelamento se deu através de uma eletroforese em gel de agarose a 4% utilizando 0,05% de brometo de etídio como corante. Após a

eletroforese, os oligonucleotídeos anelados foram visualizados sob a luz ultravioleta em transiluminador e fotografados. Dada a confirmação do anelamento dos oligonucleotídeos, estes foram submetidos ao processo de inserção no plasmídeo *psiSTRIKE*.

Para a inserção dos oligonucleotídeos nos plasmídeos foi preparada uma solução com 5 μ L de tampão de inserção (Promega), 50 ng do plasmídeo linearizado, 4 ng de oligonucleotídeos anelados, 3 unidades de DNA ligase T4 (Promega) e água para completar o volume de 10 μ L. Os reagentes foram então incubados por 1 hora à temperatura ambiente. Após este processo, os plasmídeos foram armazenados a -20°C para posterior utilização.

3.7.3 Transformação de bactérias para amplificação do plasmídeo *psiSTRIKE*

As transformações das bactérias competentes *Escherichia coli* JM-109 com o plasmídeo *psiSTRIKE* foram realizadas conforme já descrito no item 3.6.1. A inserção dos plasmídeos pCX-EGFP foi utilizada como controle positivo dos experimentos.

3.8 TRATAMENTO ESTATÍSTICO

Todos os experimentos de diferenciação e avaliação da expressão de *NEPH1* foram realizados em triplicata e a ocorrência de diferenças significativas entre as médias de expressão entre os grupos estudados foram verificadas através do teste *t* de *Student*. Todas as análises foram feitas através de *software* estatístico *GraphPad Prism 4*®. Os resultados foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 CARACTERIZAÇÃO DAS CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DA PLACENTA HUMANA

CTMs de placentas de três doadores foram cultivadas de maneira independente conforme as metodologias descritas na seção material e métodos e, após 5 passagens, as células se apresentavam com a morfologia fibroblastóide, o que é característico destas células (TANIGUCHI *et al.*, 2011) (figura 5).

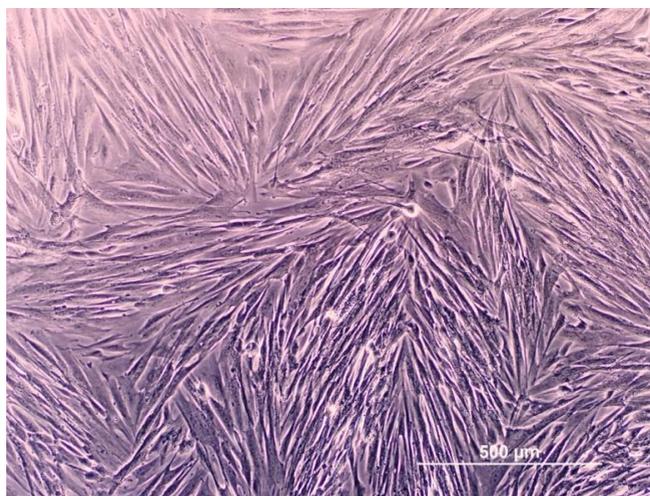


Figura 5. Morfologia das CTMs da placenta humana. Fotografia representativa de cultura de CTMs de placenta humana de passagem 6, observadas em microscópio de contraste de fase.

As CTMs da placenta humana também foram caracterizadas por imunofenotipagem através de citometria de fluxo, onde foram utilizados anticorpos para o reconhecimento dos antígenos da membrana celular CD105, CD90, CD73, CD45 e CD34. Conforme é demonstrado na figura 6, 85% das células foram positivas para o marcador CD105, 99,9% para CD90 e 97,9% para CD73, confirmando a origem mesenquimal. Já para CD45 e CD34, apenas 0,775% e 0,517%,

respectivamente, das CTMs apresentaram a expressão dos marcadores, possivelmente como um remanescente de células hematopoiéticas e/ou endoteliais ainda presentes no cultivo. Como controle do experimento, foram utilizadas células mononucleares positivas para os marcadores CD45 e CD34, o que permitiu validar a ausência da expressão de tais marcadores nas CTMs e descartar falhas na técnica ou mau funcionamento dos anticorpos.

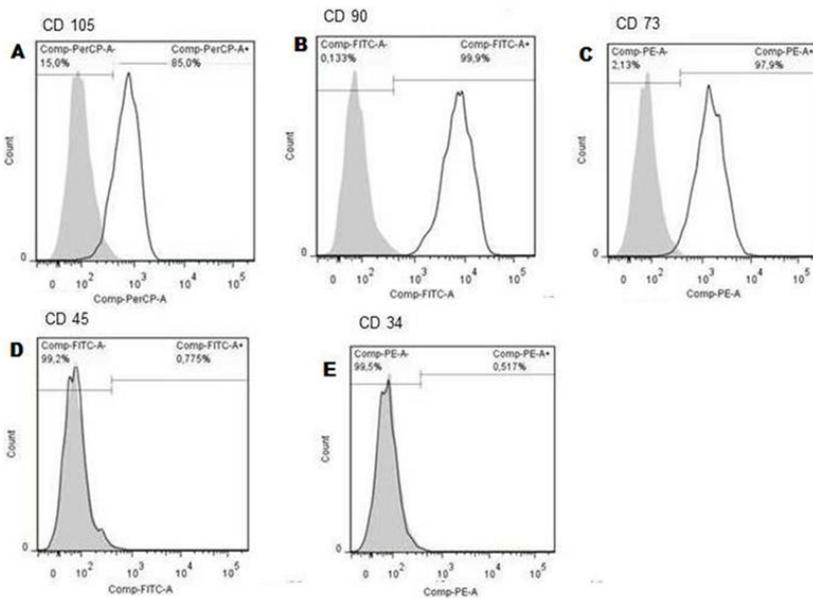


Figura 6. Imunofenotipagem de CTMs de placenta humana. Histogramas apresentando a porcentagem de células reativas com os anticorpos testados. Nas imagens A, B e C se observa a porcentagem de reatividade para os marcadores de superfície característicos de CTM CD105, CD90 e CD73, respectivamente. As imagens D e E mostram a porcentagem de reatividade para os marcadores de superfície hematopoiéticos e endoteliais CD45 e CD34, respectivamente.

4.2 INDUÇÃO DAS CTMs DA PLACENTA HUMANA A DIFERENCIAÇÃO ADIPOGÊNICA

As CTMs indiferenciadas da placenta humana de todos os doadores foram induzidas a diferenciação para adipócitos através do cultivo em meio específico. Como mostra a figura 7, esta diferenciação foi nitidamente evidenciada após 20-21 dias de cultivo, em todas as amostras submetidas ao tratamento e não foi constatada nos controles (figura 7 A). A diferenciação adipogênica nas CTMs da placenta humana foi confirmada pelo acúmulo de vesículas lipídicas intracelulares coradas com Oil Red O (figura 7 B). Após a constatação da diferenciação adipogênica, as células diferenciadas e as células controle foram submetidas à RT-PCR para análise de expressão dos genes *NEPH*.

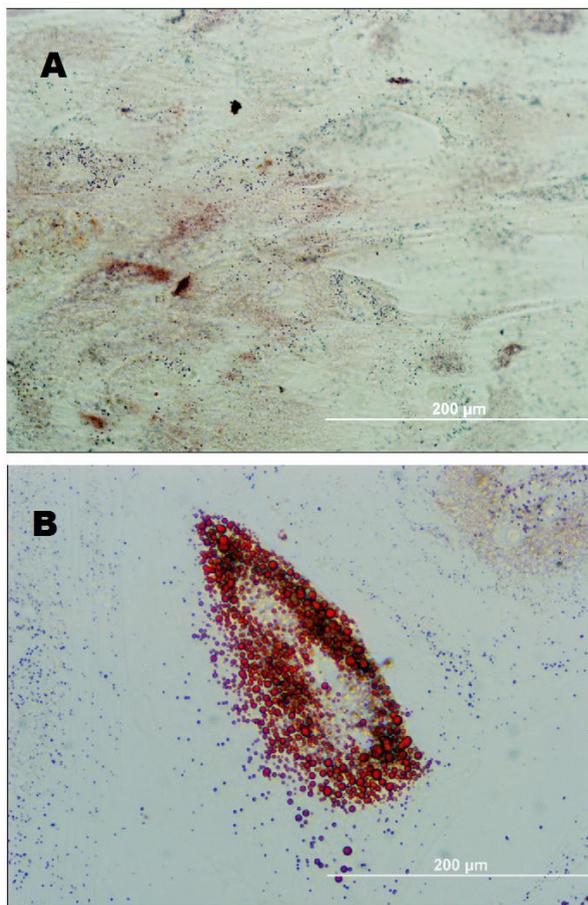


Figura 7. CTM de placenta humana induzida à adipogênese. Fotografia representativa de cultura de CTMs de placenta humana induzidas à diferenciação adipogênica e coradas com Oil Red O. (A): Células utilizadas como controle da diferenciação, onde não foi constatado o acúmulo de vesículas lipídicas no interior das células. (B): Células tratadas com meio indutor para adipogênese, evidenciando o acúmulo de vesículas lipídicas intracelulares coradas em vermelho. Os experimentos foram realizados em células de três pacientes diferentes e em triplicata.

4.3 RT-PCR

As análises de expressão dos genes *NEPH1* e *NEPH2* foram realizadas nas CTMs da placenta humana induzidas à diferenciação adipogênica e nas células utilizadas como controle da diferenciação. A figura 8 mostra que as amostras amplificaram um fragmento do tamanho esperado de 448 pb para *NEPH1*, 400 pb para *NEPH2* e 441 pb para o controle endógeno de *GAPDH*, tanto nas células induzidas à diferenciação adipogênica quanto nas células controle. Em um trabalho anterior de nosso laboratório já havia mostrado que as CTMs da placenta humana não apresentam a expressão do gene *NEPH3* e, por tal motivo, não foram realizados experimentos visando a detecção da expressão de tal gene (KOHLENER, 2009).



Figura 8. Expressão dos genes *NEPH1* e *NEPH2* em CTMs de placenta humana induzidas à diferenciação adipogênica. Fotografia de gel de agarose apresentando os produtos gerados por PCR, evidenciando as expressões dos genes *NEPH1* e *NEPH2* em CTMs da placenta humana induzidas à adipogênese (tratadas) e nas células controle. Os produtos gerados possuíam o tamanho esperado de 448 pb para *NEPH1*, 400 pb para *NEPH2* e 441 pb para *GAPDH*. Todos os experimentos foram realizados em culturas destas células em passagens maiores que 5, de 3 pacientes diferentes e em triplicata. PM = marcador de peso molecular de 100 pb.

4.4 PCR EM TEMPO REAL

Como descrito na introdução deste trabalho, inúmeras proteínas da família das IgSF, das quais as proteínas NEPH fazem parte, estão envolvidas em diversos processos celulares. Para averiguar se as proteínas NEPH poderiam estar envolvidas no processo de diferenciação das CTMs da placenta humana, foram realizados experimentos de PCR em tempo real. As análises realizadas através desta técnica tiveram

como objetivo comparar os níveis de expressão dos genes *NEPH* entre as células induzidas à diferenciação e as células controle.

Contudo, antes de realizar as análises foi preciso validar os experimentos, através da padronização dos oligonucleotídeos iniciadores quanto à temperatura de anelamento ideal e a eficiência da reação.

4.4.1 Temperatura de anelamento e eficiência de amplificação

Para determinar a temperatura de anelamento ideal para os oligonucleotídeos iniciadores de *NEPH1*, foram testadas as temperaturas de 56,5°C, 58,5°C e 60°C; para os oligonucleotídeos iniciadores do *NEPH2* foram testados 55,5°C, 56,8°C e 59°C e para os oligonucleotídeos iniciadores do *GAPDH* foram avaliadas as temperaturas de anelamento de 53°C, 55°C e 57°C. Conforme mostra a tabela 7, a temperatura de anelamento ideal, ou seja, aquela que apresentou reprodutibilidade das replicatas e menor Ct médio para os oligonucleotídeos iniciadores de *NEPH1* foi a de 60°C, já para os oligonucleotídeos iniciadores de *NEPH2* a temperatura ideal foi a de 59°C e para *GAPDH* foi a de 57°C. É possível notar que nas temperaturas não adequadas os Cts das replicatas variaram consideravelmente, ocorrendo até mesmo mais de 2 ciclos de diferença, como é o caso do *NEPH2* na temperatura de anelamento de 56,8°C, que obteve os Cts de 31,65 e 33,79. Tal problema não ocorreu nas temperaturas ideais. Em todas as condições a análise da curva de dissociação não revelou a presença de dímeros de oligonucleotídeos iniciadores nem de produtos inespecíficos. Após a determinação da temperatura de anelamento ideal para cada oligonucleotídeo iniciador, foi determinada a eficiência de amplificação de cada oligonucleotídeo iniciador.

Para a determinação da eficiência de amplificação, para cada par de oligonucleotídeos iniciadores foi construída uma curva de diluição de amostras. As concentrações de cDNA de 100 ng, 50 ng, 25 ng, 12,5 ng e 6,25 ng foram utilizadas para os oligonucleotídeos iniciadores de *NEPH1* e *NEPH2*, e as concentrações de 10 ng, 2 ng, 0,4 ng, 0,08 ng e 0,016 ng foram utilizadas para os oligonucleotídeos iniciadores do *GAPDH*. Os Cts alcançados em cada concentração utilizada para cada oligonucleotídeo iniciador encontram-se na tabela 8, onde é possível observar que, nos oligonucleotídeos iniciadores de *NEPH1* e *GAPDH*,

na medida em que a concentração do cDNA inicial diminui, maior é o número de ciclos necessários para se alcançar um nível crítico de Ct. Já no caso dos oligonucleotídeos iniciadores de *NEPH2*, algumas diluições contendo menos cDNA geraram um Ct menor do que diluições com mais cDNA, quando o esperado deveria ser o contrário. Além disso, nas concentrações mais baixas de cDNA os oligonucleotídeos iniciadores não foram capazes de amplificar produtos detectáveis.

Tabela 7: Cts observados nos experimentos de determinação da temperatura de anelamento ideal dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados para RT-PCR em tempo real. Todos os experimentos foram conduzidos em replicata.

<i>NEPH1</i>			<i>NEPH2</i>			<i>GAPDH</i>		
T° de anelamento	Ct	Ct médio	T° de anelamento	Ct	Ct médio	T° de anelamento	Ct	Ct médio
56,5°C	28,72 29,07	28,89	55,5°C	34,37 -	34,37	53°C	30,46 31,33	30,90
58,5°C	28,47 27,88	28,17	56,8°C	31,65 33,79	32,72	55°C	26,33 24,50	25,42
60°C	28,21 28,06	28,13	59°C	32,27 32,69	32,48	57°C	21,17 21,13	21,15

Tabela 8: Cts gerados nos experimentos de determinação da eficiência de amplificação dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados para RT-PCR em tempo real.

<i>NEPH1</i>			<i>NEPH2</i>			<i>GAPDH</i>		
Concentração de amostra	Ct	Ct médio	Concentração de amostra	Ct	Ct médio	Concentração de amostra	Ct	Ct médio
100 ng	26,08 24,17	25,13	100 ng	32,14 32,56	32,35	10 ng	19,45 19,49	19,47
50 ng	27,09 27,17	27,13	50 ng	33,36 31,54	32,45	2 ng	21,50 21,63	21,56
25 ng	27,71 28,22	27,96	25 ng	33,67 32,24	32,95	0,4 ng	23,72 23,92	23,82
12,5 ng	28,83 29,20	29,01	12,5 ng	32,94 -	-	0,08 ng	26,39 26,48	26,43
6,25 ng	30,7 29,82	30,26	6,25 ng	- -	-	0,016 ng	29,03 29,01	29,02

Conforme é mostrado na figura 9, para *NEPH1* a eficiência de amplificação foi de 96%, já para *GAPDH* a eficiência de amplificação foi de 97%. Essas eficiências foram consideradas adequadas para a utilização desses oligonucleotídeos iniciadores nas análises quantitativas, pois são similares e próximas de 100%.

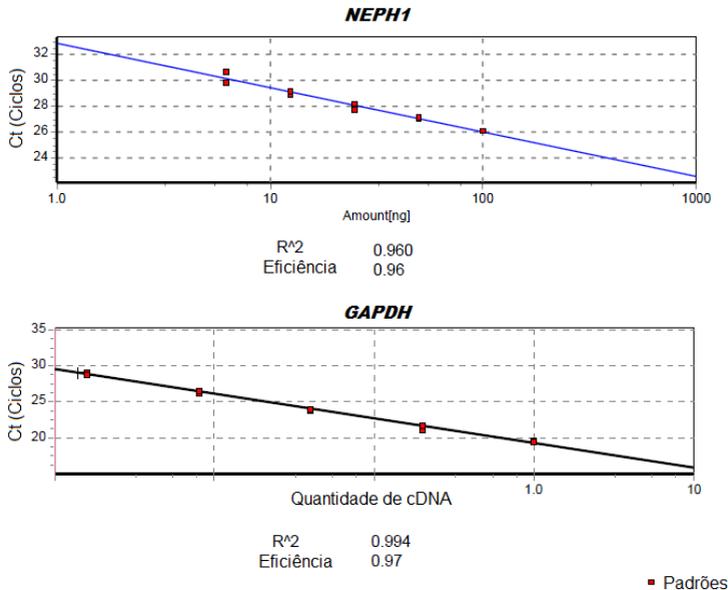


Figura 9. Eficiência de amplificação de PCR em tempo real. Curvas de diluição de cDNA para determinação de eficiência de amplificação dos oligonucleotídeos iniciadores de *NEPH1* e *GAPDH*. Os experimentos foram realizados em replicata e os dados foram gerados pelo *software Realplex* versão 2.2 (Eppendorf).

Não foi possível determinar a eficiência de amplificação dos oligonucleotídeos iniciadores do gene *NEPH2* (figura 10), pois as replicatas não foram reprodutíveis (tabela 8), o que pode indicar baixa expressão do gene nestas células. Esse fato impossibilitou a utilização desses oligonucleotídeos iniciadores para determinação da diferença de expressão do gene *NEPH2* entre as CTMs de placenta humana diferenciadas para o fenótipo adipogênico assim como as células indiferenciadas.

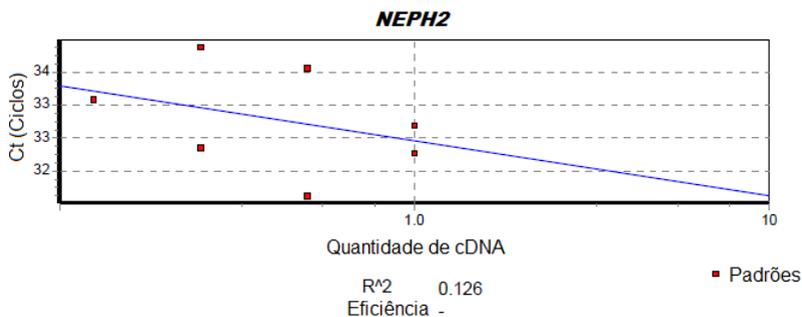


Figura 10. Eficiência de amplificação de PCR em tempo real para os oligonucleotídeos iniciadores de *NEPH2*. Curva de diluição de cDNA para determinação de eficiência de amplificação para os oligonucleotídeos iniciadores de *NEPH2*. As diluições das amostras não apresentaram replicatas reprodutíveis, fazendo com que não fosse possível determinar a eficiência de amplificação para estes oligonucleotídeos iniciadores.

A especificidade das reações de PCR em tempo real foi verificada através da curva de dissociação, onde foi possível observar um pico único, correspondente a um único fragmento (figura 11). Após a amplificação, as amostras também foram submetidas à eletroforese em gel de agarose a 2%. De acordo com os *inserts* na figura 11, pode-se observar a geração de um único produto e do tamanho esperado de 170 pb para *NEPH1* e de 226 pb para *GAPDH*. Com estes experimentos, foi possível afirmar que não houve amplificação de produtos inespecíficos, tampouco se formaram dímeros de oligonucleotídeos iniciadores.

As reações de PCR em tempo real para os oligonucleotídeos iniciadores de *NEPH1* e *GAPDH* possuíram temperatura de anelamento ideal e eficiência de reação adequada, além de especificidade dos produtos gerados, permitindo então que fosse realizada à análise das expressões destes genes nas CTMs da placenta humana.

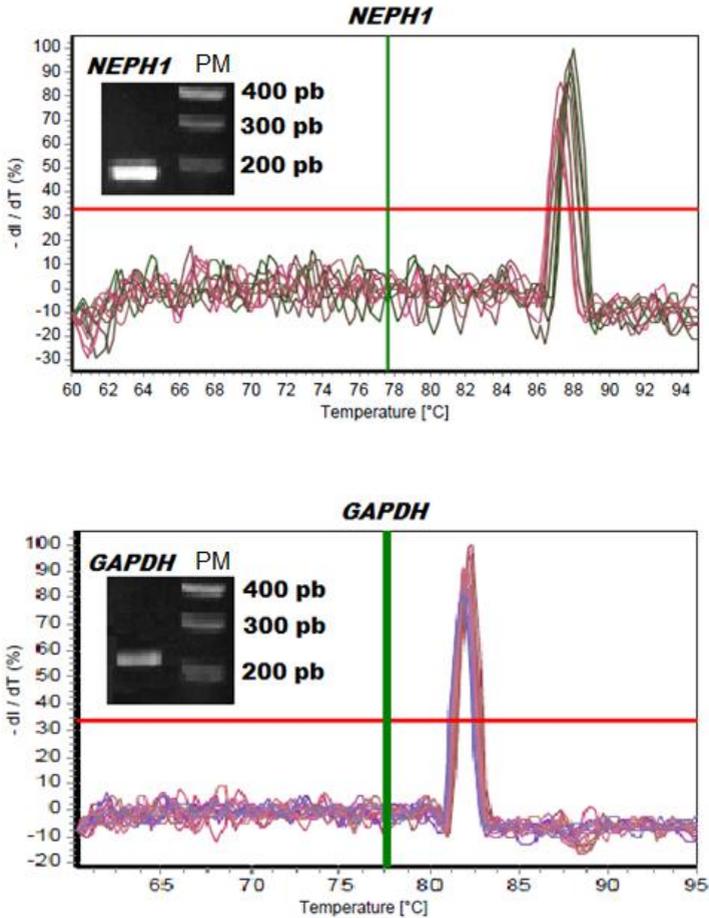


Figura 11. Curva de dissociação e eletroforese de *NEPH1* e *GAPDH*. Imagem representando as curvas de dissociação dos oligonucleotídeos iniciadores de *NEPH1* e *GAPDH* evidenciando uma única T_m para cada par de oligonucleotídeo iniciador. Nos *inserts*, fotografias de gel de agarose 2%, apresentando os produtos gerados por RT-PCR em tempo real com os tamanhos esperados de 170 pb para *NEPH1* e de 226 pb para *GAPDH*. Os experimentos foram realizados em replicata e os dados foram gerados pelo *software Realplex* versão 2.2 (Eppendorf). PM = marcador de peso molecular de 100 pb.

4.4.2 Análise da expressão de *NEPH1*

Após validar os experimentos de PCR em tempo real para os oligonucleotídeos iniciadores de *NEPH1* e *GAPDH*, foi avaliada a expressão relativa do gene *NEPH1* entre as CTMs da placenta humana indiferenciadas e induzidas à diferenciação. A expressão do gene *GAPDH* foi utilizada como normalizadora da quantificação. Conforme é mostrado na figura 12, houve um aumento estatisticamente significativo de 75% na expressão de *NEPH1* nas CTMs de placenta humana diferenciadas para adipócito em comparação com as células controle.

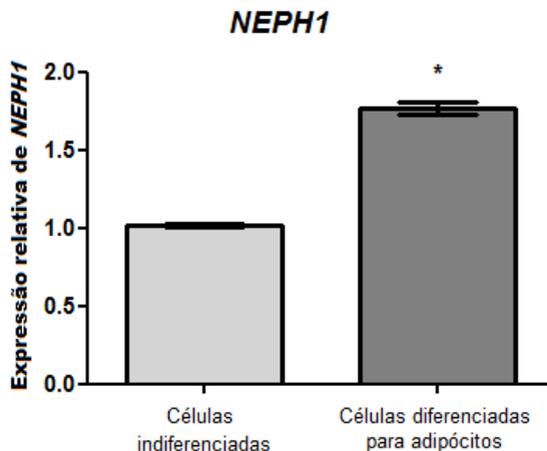


Figura 12. Avaliação da expressão de *NEPH1* em CTMs da placenta humana submetidas à diferenciação adipogênica. Imagem representativa dos níveis de expressão de *NEPH1* em CTMs de placenta humana diferenciadas para adipócito. O gráfico mostra que houve aumento na expressão de *NEPH1* quando as células foram submetidas à diferenciação adipogênica, em comparação com as células indiferenciadas. Resultados de três experimentos independentes realizados em triplicata. * $P < 0,05$ pelo teste *t* de *student*.

Portanto, com os resultados obtidos até o momento, há uma forte evidência de que o gene *NEPH1* possa exercer um papel na diferenciação de CTMs da placenta humana para o fenótipo adipogênico.

Com estes dados, passamos à padronização da transfecção das CTMs da placenta humana com plasmídeos para, posteriormente, aplicar esta técnica utilizando RNAi. Esperamos, através do silenciamento de *NEPH1*, entender o papel desempenhado por este gene no processo de diferenciação das CTMs da placenta humana.

4.5 TRANSFECCÃO DE CTMs DE PLACENTA HUMANA COM PLASMÍDEO

Durante o processo da padronização da transfecção de CTMs da placenta humana com plasmídeos, diversas técnicas foram testadas, tanto de extração dos plasmídeos como de transfecção das CTMs com os mesmos. As técnicas que apresentaram os melhores resultados foram escolhidas como padrão no LACERT da UFSC.

4.5.1 Obtenção dos plasmídeo

O plasmídeo pCX-EGFP foi amplificado em bactérias competentes *Escherichia coli* JM-109, conforme descrito na seção materiais e métodos, e estas foram submetidas às extrações do DNA plasmidial. As extrações do plasmídeo pCX-EGFP foram realizadas primeiramente com o *Quick Plasmid Miniprep Kit* (Invitrogen), onde foi observada uma quantidade de DNA extraído de 9,8 µg. Devido ao fato de as extrações do plasmídeo, utilizando este *kit*, terem apresentado uma quantidade total de DNA extraído insuficiente para os experimentos de transfecção, realizamos novas extrações do plasmídeo utilizando o *kit Plasmid Miniprep System* (Promega), quando foi observada uma quantidade de DNA extraído de 6,34 µg.

Sendo estas quantidades de DNA plasmidial insuficientes para nossos experimentos, as extrações do plasmídeo pCX-EGFP, após a sua amplificação nas bactérias *Escherichia coli* JM-109, foram ainda realizadas com o *Plasmid Purification Midi Kit* (Qiagen) e apresentaram uma quantidade de 1.785 µg de plasmídeo, um resultado muito superior às taxas alcançadas pelos mini *kits* testados anteriormente. Devido a tais resultados, as extrações de DNA plasmidial seguintes foram realizadas utilizando o *kit* da Qiagen.

Após a extração, o plasmídeo pCX-EGFP foi linearizado através da utilização da enzima de restrição HindIII e submetido à eletroforese

em gel de agarose a 0,7%. A análise da figura 13 mostra que o DNA extraído estava livre de contaminações, bem como, possuía o tamanho esperado de 5.5 kb. Após esta confirmação, o plasmídeo foi utilizado nos experimentos de transfecção das CTMs da placenta humana.

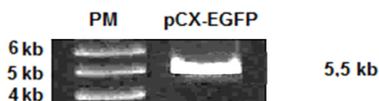


Figura 13. Eletroforese do plasmídeo pCX-EGFP. Fotografia representativa de gel de agarose 0,7% apresentando o plasmídeo pCX-EGFP linearizado. PM = marcador de peso molecular de 1 kb.

4.5.2 Transfecção

Para a realização da transfecção das CTMs de placenta humana com o plasmídeo pCX-EGFP foram testados 3 protocolos, estes foram realizados através de lipofectamina, de HiPerFect e de eletroporador. Os resultados obtidos foram analisados por simples observação das células transfectadas em microscópio sob a luz UV. Os critérios de avaliação pelos quais foi determinada a melhor técnica de transfecção foram: a eficiência da transfecção, ou seja, o número de células transfectadas em relação ao número de células totais submetidas à técnica; a menor taxa de mortalidade celular, avaliada através da observação de restos celulares no poço; e o maior período de dias pelos quais as células permaneceram expressando o plasmídeo.

As CTMs da placenta humana submetidas à transfecção com o plasmídeo pCX-EGFP, através da utilização do reagente HiPerFect, não apresentaram a expressão de GFP em nenhuma das nove condições testadas. Os experimentos foram realizados em células de dois pacientes diferentes e em triplicata. Estes resultados indicam que, dentro das nossas condições, esta técnica não é adequada para a transfecção de CTMs de placenta humana com plasmídeos (dados não mostrados).

Para a transfecção das CTMs da placenta humana com o plasmídeo pCX-EGFP através da utilização do reagente lipofectamina, foram testadas 3 condições: 0,8 µg, 1,2 µg ou 1,6 µg de DNA e 2 µL, 4 µL ou 8 µL de lipofectamina, respectivamente. A condição que apresentou os melhores resultados observados foi a em que utilizamos

0,8 μg de plasmídeo e 2 μL de lipofectamina. Conforme observado na figura 14, nesta condição, cerca de 10% das células expressaram a proteína GFP 24 horas após a transfecção. Além disso, poucos restos celulares foram observados no poço, indicando baixa taxa de mortalidade celular. Estas células deixaram de expressar o plasmídeo por volta de 6 dias após a transfecção.

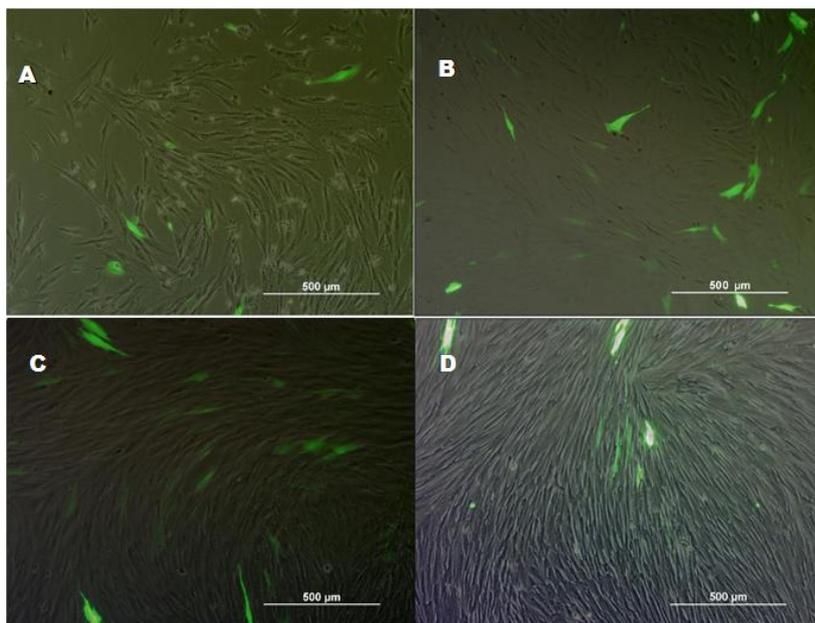


Figura 14. Transfecção das CTMs com o plasmídeo pCX-EGFP utilizando lipofectamina. Fotografias ilustrativas da transfecção de CTMs da placenta humana com o plasmídeo pCX-EGFP através de lipofectamina na condição com 0,8 μg de plasmídeo e 2 μL de lipofectamina. (A): células 24 horas após a transfecção. (B): células 2 dias após a transfecção. (C): células 4 dias após a transfecção. (D): células 5 dias após a transfecção. É possível observar uma taxa baixa de células expressando o plasmídeo, sendo que no 5º dia após a transfecção, menos de 2% das células ainda apresentavam fluorescência.

Para a transfecção das CTMs da placenta humana com o plasmídeo pCX-EGFP utilizando eletroporador, foram testadas condições diversas, que variaram de 1 a 3 pulsos, de 850 V a 1.700 V e

de largura de 10 ms a 40 ms. A figura 15 mostra a condição em que foi utilizado 1 pulso de 1.700 V e largura de pulso de 20 ms, que foi a que apresentou os melhores resultados obtidos utilizando eletroporação. Nesta condição, cerca de 40% das células apresentaram a expressão do plasmídeo 24 horas após a transfecção. Apesar de ter apresentado um pouco mais de restos celulares quando comparada com a lipofectamina (figura 14 A), ainda assim a taxa de mortalidade celular foi baixa. Além disso, as células mantiveram a expressão da proteína GFP por cerca de 9 dias após a transfecção.

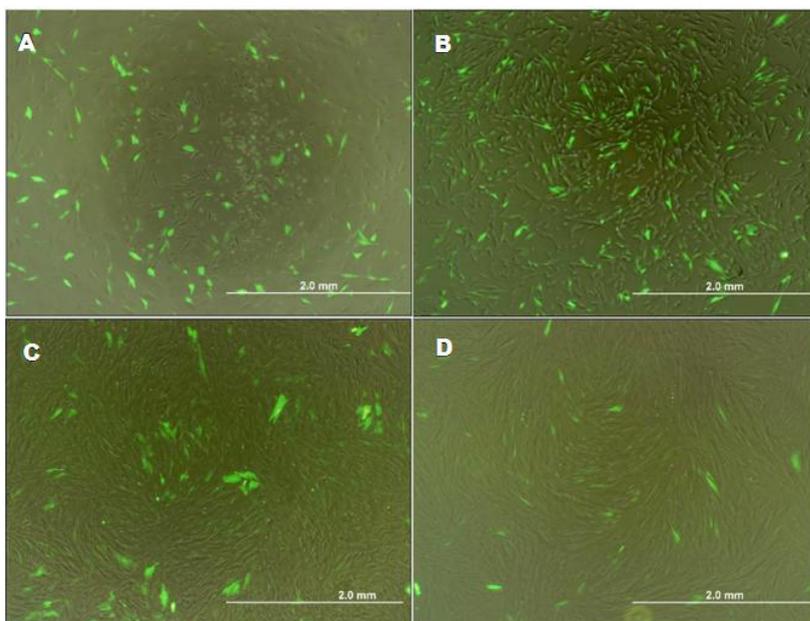


Figura 15. Transfecção das CTMs com plasmídeo pCX-EGFP utilizando eletroporação. Imagem representativa das CTMs da placenta humana transfectadas através de eletroporação com 1 pulso de 1.700V e largura de 20 ms. (A): células 1 dia após a transfecção. (B): 2 dias após a transfecção. (C): 6 dias após a transfecção. (D): 9 dias após a transfecção. Todos os experimentos foram realizados em replicata e utilizando o eletroporador *Neon® Transfection System* (Invitrogen).

Portanto, das técnicas de transfecção de CTMs da placenta humana com plasmídeos avaliadas, a que apresentou maior eficiência quanto ao número de células transfectadas, maior duração da expressão do plasmídeo e pouca morte celular foi a de eletroporação através do eletroporador *Neon® Transfection System* (Invitrogen). Esta técnica foi adotada como padrão para transfecção de CTMs da placenta humana com plasmídeos no LACERT da UFSC.

4.6 EXPERIMENTOS PRELIMINARES DE SILENCIAMENTO DO GENE *NEPH1* EM CTMs DA PLACENTA HUMANA

Após estar padronizada, a técnica de transfecção de CTMs de placenta humana com plasmídeos estava pronta para ser aplicada no silenciamento do gene *NEPH1* nas mesmas células. O primeiro passo para a realização da técnica de silenciamento foi estabelecer a quantidade mínima de puomicina necessária para matar as CTMs de placenta humana, já que o plasmídeo *psiSTRIKE*, a ser utilizado como vetor dos oligonucleotídeos de silenciamento, possui um gene que confere resistência a este antibiótico, o que permite selecionar as células que tenham sido efetivamente transfectadas.

4.6.1 Curva de morte celular

Conforme descrito na seção material e métodos, foram testadas as concentrações finais de puomicina de 1 µg/mL, 2 µg/mL, 4 µg/mL, 6 µg/mL, 8 µg/mL e 10 µg/mL, que foram diluídas em 500 µL de meio. O objetivo desse experimento foi estabelecer a quantidade mínima de puomicina necessária para matar todas as CTMs de placenta humana. Após 48 horas de tratamento, a mortalidade das células foi analisada através de simples observação em microscópio invertido. Conforme é mostrado na figura 16, a partir da concentração de 6 µg/mL praticamente todas as células no poço estavam mortas, sendo assim, esta concentração foi estabelecida como a ideal para a seleção das CTMs da placenta humana após a transfecção com o plasmídeo *psiSTRIKE*.

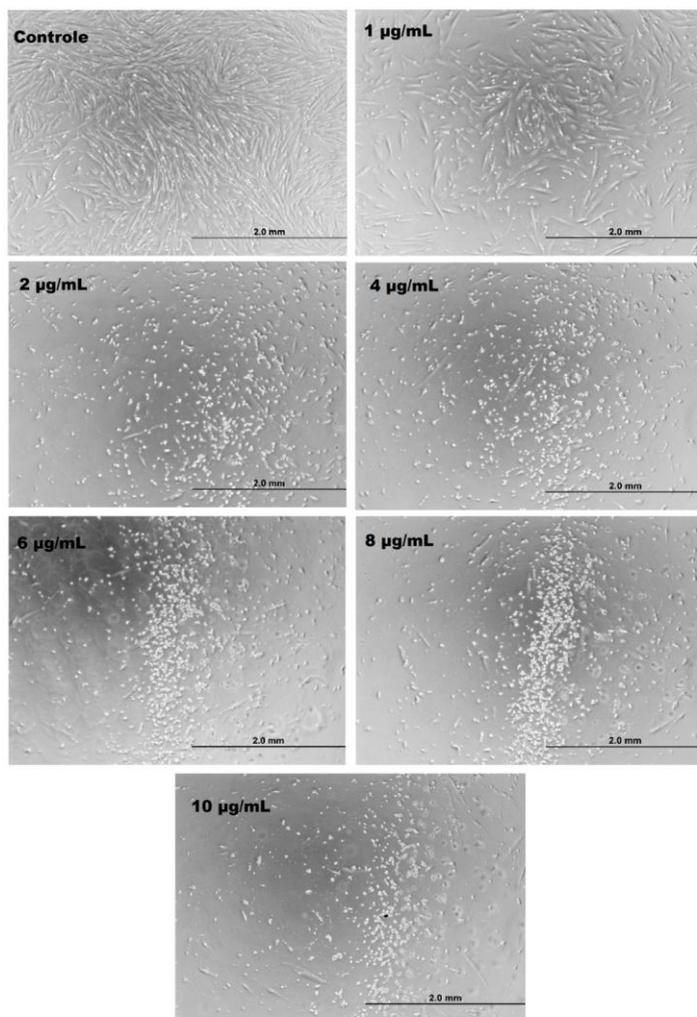


Figura 16. Curva de diluição da puromicina. Imagem representativa de CTMs da placenta humana tratadas com 1 µg/mL, 2 µg/mL, 4 µg/mL, 6 µg/mL, 8 µg/mL e 10 µg/mL de puromicina. Conforme se pode observar, as células tratadas com a concentração de 6 µg/mL do antibiótico apresentam extensa morte celular quando comparadas com as células tratadas com concentrações mais baixas e células controle, sem antibiótico.

4.6.2 Anelamento dos oligonucleotídeos e inserção no plasmídeo

Após a obtenção dos oligonucleotídeos para silenciamento do gene *NEPH1* em CTMs da placenta humana, estes foram anelados, conforme descrito na seção materiais e métodos, para então serem inseridos no plasmídeo. Para confirmar o anelamento dos oligonucleotídeos, estes foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 4% utilizando 0,05% de brometo de etídio como corante, pois o brometo se liga apenas a estruturas dupla fita, o que significa que se o anelamento não ocorrer, não há visualização. Conforme se pode observar na figura 17, o anelamento das sequências de oligonucleotídeos testadas foi realizado com sucesso e os mesmos demonstraram o tamanho esperado de 53 pb. Em seguida, os oligonucleotídeos anelados foram submetidos à inserção no plasmídeo *psiSTRIKE*, e estes foram submetidos a amplificação em bactérias competentes.

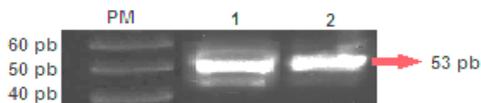


Figura 17. Eletroforese dos oligonucleotídeos de anelamento. Fotografia representativa de gel de agarose 4% apresentando os oligonucleotídeos anelados. O corante utilizado foi o brometo de etídio, que se liga somente a sequências de DNA fita dupla, confirmando assim, o anelamento dos oligonucleotídeos. Foram analisadas a sequência 1 (1) e a sequência 1 embaralhada (2). PM = marcador de peso molecular de 10 pb.

4.6.3 Transformação das bactérias competentes

Após os oligonucleotídeos terem sido anelados e submetidos à inserção no *psiSTRIKE*, as bactérias competentes *Scherichia coli* JM-109 foram submetidas a transformação com este plasmídeo, conforme descrito na seção de materiais e métodos. Observamos que não houve crescimento de bactérias submetidas à transformação com o plasmídeo *psiSTRIKE*, quando estas foram mantidas em meio LB contendo ampicilina. Como utilizamos o plasmídeo pCX-EGFP como controle positivo do experimento de transformação e as células transformadas

com este plasmídeo cresceram normalmente em meio LB com ampicilina, descartamos a possibilidade de erros na técnica.

Acreditamos que a inserção dos oligonucleotídeos de silenciamento no plasmídeo *psiSTRIKE* não tenha ocorrido e que o mesmo encontrava-se linearizado no momento da transformação. Este fato impossibilitou que os genes presentes no plasmídeo fossem transcritos.

Novos experimentos são necessários para avaliar o que realmente ocasionou o não crescimento das bactérias submetidas à transformação com o plasmídeo *psiSTRIKE*, assim como, é necessária a avaliação de outros métodos de silenciamento gênico para que o gene *NEPH1* possa ser silenciado nas CTMs da placenta humana e, desse modo, possamos buscar entender o papel deste gene na diferenciação das CTMs para o fenótipo adipogênico, bem como para outros fenótipos mesenquimais.

5 DISCUSSÃO

Nos últimos anos, as CTMs têm se tornado as células mais comumente utilizadas em pesquisas clínicas como engenharia de tecidos, reparação de traumas, oncoterapia, além de pesquisas básicas abordando CTs. No entanto, no humano adulto, a quantidade de CTMs existentes é muito baixa: estima-se que apenas cerca de 0,001% a 0,01% das células de um adulto sejam CTMs. Ainda, a capacidade de proliferação, o potencial de expansão e a multipotencialidade de CTMs de fontes adultas tendem a decair com o avanço da idade dos doadores (PITTENGER, 1999; FEHRER; LEPPERDINGER, 2005; HUANG *et al.*, 2009).

Por outro lado, os tecidos extra-embriônicos, como a placenta, têm sido apresentados como uma alternativa atrativa como fontes de CTMs. As CTMs da placenta humana apresentam a expressão de marcadores de superfície e o potencial de diferenciação similares às CTMs extraídas da medula óssea (HUANG *et al.*, 2009). Porém, o potencial de expansão das CTMs derivadas da placenta é consideravelmente maior do que as das CTMs da medula óssea (CHANG *et al.*, 2007). Devido à abundância do tecido placentário e as facilidades tanto na manipulação quanto na obtenção deste material, a quantidade relativa de CTs que podem ser isoladas da placenta é maior em comparação com fontes de CTMs de outros tecidos, como a medula óssea. Além disso, por se tratar de um material rotineiramente descartado, a placenta como fonte de CTs não gera problemas de natureza ética, como ocorre com as CTs embrionárias, quando a sua obtenção ocasiona a destruição do embrião (EVANGELISTA *et al.*, 2008; MARCUS; WOODBURY, 2008).

Conforme consenso presente na literatura, as CTMs da placenta humana são obtidas através da dissociação mecânica e enzimática deste tecido e, em seguida, selecionadas pela sua capacidade de aderência ao plástico (PAROLINI *et al.*, 2008; HUANG *et al.*, 2009). As CTMs não possuem um marcador específico, mas a expressão em conjunto de determinados marcadores de superfície, tais como CD105, CD90 e CD73, e a ausência de expressão dos marcadores hematopoiéticos e endoteliais CD45 e CD34 é definida como determinante para a caracterização de CTMs (EVANGELISTA *et al.*, 2008; MARCUS; WOODBURY, 2008; PAROLINI *et al.*, 2008).

Nossos resultados mostram que as CTs obtidas neste estudo apresentam aderência ao plástico e a expressão dos marcadores de superfície CD105, CD90 e CD73, assim como a ausência de expressão de CD45 e CD34, indicando que as células obtidas por nós possivelmente são CTMs.

Além disso, as CTMs são caracterizadas por apresentarem morfologia similar à de fibroblastos e o potencial para se diferenciar para uma ou mais linhagens, geralmente osteoblasto, adipócito ou condrócito (HORWITZ *et al.*, 2005; PAROLINI *et al.*, 2008). Vários estudos apontam uma maior variedade no potencial de diferenciação das CTMs, tendo sido já descrito que essas células possuem a capacidade de serem induzidas à diferenciação para células das três linhagens germinativas como o fenótipo neural, de linhagem ectodermal; o fenótipo endotelial, músculo esquelético e cardiomiócito, de linhagem mesodermal; e o fenótipo pancreático, de linhagem endodermal (MARCUS; WOODBURY, 2008; PAROLINI *et al.*, 2008). Neste trabalho, observamos que as células apresentaram a morfologia fibroblastóide esperada, além de terem apresentado capacidade de se diferenciar para o fenótipo adipogênico, quando mantidas em meio indutor para essa condição. Portanto, estas células preencheram os requisitos necessários para serem caracterizadas como CTMs da placenta humana.

5.1 INFLUÊNCIA DOS GENES *NEPH* NA DIFERENCIAÇÃO DAS CTMs DA PLACENTA HUMANA PARA O FENÓTIPO ADIPOGÊNICO

Um modelo teórico para a diferenciação das CTMs descreve que as células indiferenciadas passam por duas etapas durante o processo de aquisição do fenótipo específico: a divisão assimétrica de uma CTM dá origem a uma célula exatamente idêntica à célula mãe e a outra célula precursora. As células precursoras, tripotentes ou bipotentes, morfologicamente semelhantes às CTMs, porém com expressão gênica diferenciada, continuam a se multiplicar por divisões simétricas. Esta transição das CTMs para células precursoras constitui a primeira etapa do processo de diferenciação. A segunda etapa deste processo constitui na transição das células precursoras para progenitores comprometidos com alguma linhagem celular. Estes progenitores são unipotentes e

continuam a se dividir simetricamente, passando por vários estágios de maturação até a célula especializada, o que é caracterizado pelo fim da capacidade proliferativa e pela síntese de marcadores tissulares específicos, incluindo componentes da matriz extracelular (BAKSH *et al.*, 2004).

A diferenciação em adipócitos é iniciada por fatores agonistas que incluem a insulina, a IBMX, a indometacina e glicocorticóides como a dexametasona (OSYCZKA *et al.*, 2002). A diferenciação é verificada por diferenças na morfologia, bem como pela ativação transcricional de muitos genes como o da Lipoproteína Lipase (LPL) e o *peroxisome proliferator-activated receptor- γ -2* (PPAR γ 2). O PPAR γ 2 é um membro da superfamília de receptores de ligantes de fatores transcricionais ativados e é reconhecido como um receptor nuclear hormonal específico do adipócito. Este gene possui um papel chave na regulação do aumento das células gordurosas e a sua expressão é estimulada pela dexametasona (PITTENGER *et al.*, 1999). Com a indução à diferenciação adipogênica as células passam a acumular vacúolos ricos em lipídeos, que são detectáveis através da coloração com Oil Red O (TAGAMI *et al.*, 2003; CHEN *et al.*, 2009).

Nossos resultados mostram que após o tratamento das CTMs da placenta humana com meio indutor para adipogênese, tais células foram submetidas à coloração com Oil Red O que revelou o acúmulo de vesículas lipídicas no interior das células, confirmando assim a diferenciação das CTMs para o fenótipo adipogênico. O acúmulo de vesículas lipídicas não foi observado no interior das células utilizadas como controle do experimento de diferenciação, comprovando assim que o meio indutor foi capaz de induzir as CTMs da placenta humana ao fenótipo adipogênico.

Após a confirmação da diferenciação das CTMs da placenta humana para o fenótipo adipogênico, tais células foram submetidas à análise da expressão dos genes da família *NEPH*, que consiste de *NEPH1*, *NEPH2* e *NEPH3*. Como já citado, um trabalho anterior de nosso laboratório demonstrou que as CTMs da placenta humana não apresentam a expressão do gene *NEPH3* e, por tal motivo, não foram realizados experimentos visando a detecção da expressão de tal gene (KOHLENER, 2009). As análises foram realizadas através de RT-PCR e a expressão de *NEPH1* e *NEPH2* foi confirmada tanto nas células diferenciadas quanto nas células controle indiferenciadas. No entanto,

para detectar a variação na expressão desses genes durante a diferenciação adipogênica e apontar um papel das proteínas NEPH neste processo, foram realizadas análises de expressão relativa por RT-PCR em tempo real.

Durante a calibração dos oligonucleotídeos iniciadores a serem utilizados nas análises de PCR em tempo real, não foi possível construir uma curva de eficiência para os oligonucleotídeos iniciadores do gene *NEPH2*. Este fato pode ter ocorrido devido à baixa expressão do gene ou mau funcionamento dos oligonucleotídeos iniciadores. Estes oligonucleotídeos iniciadores foram desenhados para amplificar um produto do cDNA de *NEPH2* que, no DNA genômico, apresenta um íntron posicionado em seu interior. O posicionamento do íntron no interior do produto a ser amplificado permite a detecção de contaminações por DNA genômico nas análises de RT-PCR, uma vez que, se houver DNA genômico nas amostras o produto amplificado não apresentará o mesmo tamanho do cDNA amplificado. No entanto, este fato impede que as calibrações dos oligonucleotídeos iniciadores sejam feitas com DNA genômico, o que seria o mais indicado no caso de uma baixa expressão do gene de interesse. Devido à impossibilidade de determinar a eficiência de reação para os oligonucleotídeos iniciadores de *NEPH2*, não foi possível utilizar estes oligonucleotídeos iniciadores para a determinação da expressão relativa de *NEPH2* nas CTMs da placenta humana induzidas para a adipogênese. Desta maneira, somente a expressão relativa do gene *NEPH1* foi determinada em tais células, utilizando a expressão do gene *GAPDH* como normalizadora da quantificação. Os oligonucleotídeos iniciadores dos genes *NEPH1* e *GAPDH* apresentaram eficiências de reação similares e próximas de 100%.

Os resultados obtidos demonstram que o gene *NEPH1* é cerca de 1,7 vezes mais expresso nas CTMs da placenta humana induzidas à diferenciação adipogênica do que nas mesmas células indiferenciadas. Este resultado se demonstrou estatisticamente relevante através do teste *t* de Student ($P < 0,0001$).

O grupo de proteínas NEPH é conservado evolutivamente. Elas fazem parte das proteínas de adesão da superfamília das imunoglobulinas e regulam a morfogênese de diferentes tecidos. As proteínas NEPH possuem uma estrutura proteica comum, consistindo de domínios extracelulares tipo imunoglobulina, uma região

transmembranar e uma cauda carbóxi-terminal citoplasmática, necessária para a sinalização (TAMURA *et al.*, 2005; NEUMANN-HAEFELIN *et al.*, 2010). Os genes ortólogos de *NEPH* têm sido amplamente caracterizados em modelos invertebrados, atuando em diversos processos como desenvolvimento neural, formação de sinapses e fusão de mioblastos (RUIZ-GÓMEZ *et al.*, 2000; SHEN; BARGMANN, 2003). Em vertebrados, as proteínas *NEPH* foram primeiramente descritas na barreira de filtração glomerular dos rins e, recentemente, têm surgido várias evidências sugerindo uma função extra-renal para estas proteínas (HUBER, T.; BENZING, 2005; VÖLKER *et al.*, 2011).

A expressão de *Neph1* já foi descrita na placenta de camundongos, onde foi atribuída uma função a este gene na regulação da transferência de proteínas do feto para a mãe (BEALL *et al.*, 2005). Já *Neph2*, em camundongos, está presente nas células estromais da medula óssea e seu papel está na manutenção do estado indiferenciado das CTs hematopoiéticas, função que é desempenhada pelas células estromais (UENO *et al.*, 2003). Vários trabalhos descrevem a expressão das proteínas *NEPH* durante o desenvolvimento de vertebrados (GERKE *et al.*, 2006; SERIZAWA *et al.*, 2006; MORIKAWA, Y *et al.*, 2007; KOMORI, TADASUKE *et al.*, 2008; HÖRNBERG *et al.*, 2009), como no desenvolvimento de camundongos e aves, onde as proteínas *NEPH* desempenham um importante papel no reconhecimento celular, que pode levar à perfeita morfogênese de uma enorme variedade de órgãos e tecidos (VÖLKER *et al.*, 2011). Além disso, um trabalho recente de nosso grupo apontou *NEPH1* e *NEPH2* como possíveis agentes na diferenciação de CTMs da placenta humana para o fenótipo neuronal ou na manutenção destas células em um estado indiferenciado (KÖHLER, 2009).

Nossos resultados, com base na literatura, apontam que *NEPH1* pode estar envolvido na diferenciação das CTMs da placenta humana para o fenótipo adipogênico, possivelmente através de sua capacidade de realizar sinalizações celulares. Com o aumento da expressão deste gene ao longo do processo de diferenciação, novas interações célula-célula podem se formar e, com isso, podem estimular as células a iniciarem divisões assimétricas visando à especialização de função.

A manipulação da expressão desse gene através do silenciamento por RNAi, é uma alternativa interessante para avaliar o comportamento

das CTMs da placenta humana ao serem estimuladas a se diferenciar estando sem a expressão de *NEPH1*, possibilitando assim, a determinação da função deste gene durante este processo.

5.2 PADRONIZAÇÃO DA TRANSFEÇÃO DE CTMs DA PLACENTA HUMANA COM pCX-EGFP

Uma das mais eficientes maneiras de se marcar uma célula viva é utilizando um gene que expressa a proteína verde fluorescente GFP. Clonado da água-viva *Aequorea victoria*, o gene *GFP* expressa a proteína verde fluorescente que é única no que se diz respeito à emissão de luz sem necessitar de fatores ou substratos. A simples exposição da proteína à luz UV é suficiente para gerar a luminosidade verde, desse modo, o gene *GFP* pode ser introduzido em células, permitindo localizá-las ainda viáveis (SHIMADA *et al.*, 1999). Por tais motivos, para a padronização da transfeção de CTMs de placenta humana com plasmídeos foi utilizado o plasmídeo pCX-EGFP que confere às células a expressão da proteína GFP. A padronização de tal técnica se fez necessária, uma vez que o nosso grupo de pesquisa tem interesse em desenvolver técnicas de manipulação genética pós-transcricionais, como a de RNAi. Os métodos de transfeção testados foram através de lipossomos e eletroporação.

Lipossomos são vetores seguros para transfeção, pois são geralmente reconhecidos pelas células como moléculas que não representam riscos a elas. Os lipossomos são vesículas microscópicas que se formam espontaneamente quando lipídios, geralmente fosfolipídios, são colocados em meio aquoso. Estas vesículas são vendidas comercialmente e especialmente sintetizadas com carga positiva para capturar ácidos nucleicos, fundirem-se com a membrana celular e liberar o DNA ou RNA no interior da célula (SCHMIDT-WOLF; SCHMIDT-WOLF, 2003; MIYAZAKI *et al.*, 2006).

Por outro lado, a eletroporação é um método para introdução de material genético em células através da descarga de pulsos elétricos. Este método cria poros temporários na membrana da célula que permitem a entrada do DNA. A formação do poro é um evento muito rápido, ocorrendo dentro de 10 nano segundos e estima-se que cada poro possua cerca de 10 nm de diâmetro (CHANG; REESE, 1990; MIYAZAKI *et al.*, 2006).

Dos métodos testados, o que apresentou os melhores resultados para transfectar as CTMs da placenta humana com o plasmídeo pCX-EGFP foi eletroporação, utilizando o eletroporador *Neon® Transfection System* (Invitrogen). Esta técnica apresentou maior eficiência quanto a porcentagem de células transfectadas, apresentou maior duração da expressão do plasmídeo, cerca de nove dias, além de ter apresentado baixa mortalidade celular. Portanto, este método foi o escolhido para prosseguimento deste estudo.

5.3 SILENCIAMENTO GÊNICO: EXPERIMENTOS PRELIMINARES E PERSPECTIVAS

A descoberta do silenciamento gênico mediado por RNAs de dupla fita (dsRNA) rapidamente tornou este o método mais utilizado para o bloqueio da expressão de um gene de interesse. A introdução de um dsRNA longo na célula, ativa a endoribonuclease Dicer que o processa em um pequeno RNA de interferência (siRNA) de 21 nucleotídeos. Em seguida, os siRNAs se associam ao complexo indutor de silenciamento (RISC) e promovem a destruição do mRNA complementar a uma das fitas do siRNA. A técnica de RNAi baseia-se neste mecanismo, que é conservado evolutivamente (SIJEN *et al.*, 2001; LENZ, 2005).

Antes da descoberta do RNAi, para avaliar a função de um determinado gene era necessário identificar um organismo com alguma característica anormal, tanto física quanto comportamental, para então isolar os possíveis genes mutantes, sendo este método aplicável somente a organismos de rápida reprodução. Experimentos genéticos em mamíferos eram limitados a abordagens de genética reversa, que consiste no *knock out* de um gene específico para identificar a sua função. Porém, muitos destes experimentos são extremamente trabalhosos e caros. Por outro lado, com o RNAi é possível analisar vários genes num mesmo organismo, além de permitir a avaliação local e temporal da função de um determinado gene (ELBASHIR *et al.*, 2001; NOVINA; SHARP, 2004).

Com intuito de silenciar o gene *NEPH1* nas CTMs da placenta humana e identificar a possível função deste gene durante o processo de diferenciação destas células, foram realizados ensaios para a implantação da técnica de RNAi no LACERT da UFSC. No entanto,

não foi possível anelar os oligonucleotídeos de silenciamento de *NEPH1* com o plasmídeo *psiSTRIKE*, que serviria de vetor para a transfecção das CTMs. Este plasmídeo é vendido comercialmente em forma linear, possuindo extremidades com nucleotídeos característicos que permitem o anelamento com oligonucleotídeos desenhados especificamente para este vetor. Pelo fato de o plasmídeo pCX-EGFP ter sido utilizado como controle nos experimentos de transformação das bactérias competentes JM-109, as quais este plasmídeo foi capaz de transformar e o vetor *psiSTRIKE* não, descartamos a possibilidade de erros de protocolo. Ainda, através de eletroforese, utilizando brometo de etídio como corante, nos certificamos de que os oligonucleotídeos estavam anelados entre si (sequência senso e sequência anti-senso).

Não foi possível detectar qual a falha no protocolo que impossibilitou a inserção dos oligonucleotídeos de silenciamento no plasmídeo *psiSTRIKE*. Algumas hipóteses são a de degradação das extremidades deste plasmídeo devido à manipulação; a falta de especificidade entre as extremidades dos oligonucleotídeos e as extremidades do *psiSTRIKE*, ou ainda a degradação de algum dos reagentes utilizados para o anelamento dos oligonucleotídeos de silenciamento no *psiSTRIKE*. Por falta de tempo hábil, até a conclusão desse trabalho, não foi possível a realização de outros experimentos, tampouco a aquisição de novos reagentes.

Neste trabalho foi demonstrado que as CTMs da placenta humana possuem potencial de diferenciação e podem ser induzidas ao crescimento e diferenciação em linhagens celulares específicas quando em condições permissivas. As características das CTMs da placenta humana apontam um grande potencial dessas células para serem utilizadas em diversas aplicações terapêuticas promissoras, como a medicina regenerativa, onde poderiam atuar como ferramenta no tratamento de doenças degenerativas e de desordens relacionadas à idade (KASSEM *et al.*, 2004). As terapias promissoras utilizando CTMs apostam na capacidade dessas células de serem enxertadas e sobreviverem em tecidos-alvo distintos durante um longo período, onde podem proliferar rapidamente e dar origem a células capazes de substituir células doentes (BANFI *et al.*, 2000; MINGUELL; ERICES, 2006). No entanto, os mecanismos pelos quais as CTMs são direcionadas para uma determinada linhagem celular ainda não estão completamente esclarecidos, fazendo com que a utilização das CTMs

em aplicações clínicas e terapêuticas ainda permaneçam incertas (KASSEM *et al.*, 2004).

A aplicabilidade de CTs, particularmente de CTMs da placenta humana, na medicina regenerativa se mantém dependente da identificação de mecanismos e moléculas que controlam a diferenciação destas células para as linhagens celulares específicas e o estabelecimento destas células no tecido de interesse. Pelo fato do gene *NEPH1* ser uma molécula candidata a desempenhar um papel importante no processo de diferenciação das CTMs da placenta humana, é de extrema relevância a realização de maiores investigações a respeito da função de *NEPH1* no processo de diferenciação destas células para o fenótipo adipogênico, bem como para outros fenótipos.

6 CONCLUSÕES

- As CTMs da placenta humana utilizadas neste estudo expressaram os marcadores de superfície celular propostos para as CTMs em geral, bem como apresentaram morfologia fibroblastóide e potencialidade de diferenciação, caracterizando-as como verdadeiras CTMs.
- Os genes *NEPH1* e *NEPH2* são expressos tanto em CTMs da placenta humana diferenciadas para o fenótipo adipogênico quanto nas mesmas células indiferenciadas.
- As CTMs da placenta humana induzidas à diferenciação adipogênica apresentam maior expressão de *NEPH1* em comparação que as mesmas células indiferenciadas, indicando um possível papel de tal gene no processo de diferenciação destas células para o fenótipo adipogênico.
- Das técnicas de transfecção de CTMs da placenta humana com plasmídeos testadas, a eletroporação demonstrou ser a mais indicada para estas células.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAM HEALTH SOLUTION, 2012. Disponível em <www.adam.com>. Acesso em: 10 de maio de 2012.

AHRENS, N. *et al.* Mesenchymal Stem Cell Content of Human Vertebral Bone Marrow. **Transplantation**, v. 78, n. 6, p. 925-929, 2004.

ALLICKSON, J. G. *et al.* Recent Studies Assessing the Proliferative Capability of a Novel Adult Stem Cell Identified in Menstrual Blood. **Open Stem Cell J**, v. 3, p. 4-10, 2011.

ALMEIDA-PORADA, G. *et al.* Differentiative potential of human metanephric mesenchymal cells. **Experimental hematology**, v. 30, n. 12, p. 1454-6142, 2002.

ALVAREZ-SILVA, M. *et al.* Mouse placenta is a major hematopoietic organ. **Development**, v. 130, n. 22, p. 5437-5444, 2003.

ARIF, E. *et al.* Motor protein Myo1c is a podocyte protein that facilitates the transport of slit diaphragm protein Neph1 to the podocyte membrane. **Molecular and Cellular Biology**, v. 31, n. 10, p. 2134-2150, 2011.

BAKSH, D.; SONG, L.; TUAN, R. S. Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 8, n. 3, p. 301-316, 2004.

BANFI, A. *et al.* Proliferation kinetics and differentiation potential of ex vivo expanded human bone marrow stromal cells: Implications for their use in cell therapy. **Experimental Hematology**, v. 28, n. 6, p. 707-715, 2000.

BASSON, M. A. Signaling in Cell Differentiation and Morphogenesis. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, 2012.

BEALL, M. H. *et al.* Placental and fetal membrane Nephrin and Neph1 gene expression: response to inflammation. **Journal of the Society for Gynecologic Investigation**, v. 12, n. 5, p. 298-302, 2005.

CALLONI, G. W.; DOUARIN, N. M. LE; DUPIN, E. High frequency of cephalic neural crest cells shows coexistence of neurogenic, melanogenic, and osteogenic differentiation capacities. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 22, p. 8947-8952, 2009.

CAPLAN, A I. Mesenchymal stem cells. **Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society**, v. 9, n. 5, p. 641-650, 1991.

CHANG, C. M. *et al.* Placenta-derived multipotent stem cells induced to differentiate into insulin-positive cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 357, n. 2, p. 414-420, 2007.

CHANG, D. C.; REESE, T. S. Changes in membrane structure induced by electroporation as revealed by rapid-freezing electron microscopy. **Biophysical Journal**, v. 58, n. 1, p. 1-12, 1990.

CHEN, L.; HE, D. M.; ZHANG, Y. The differentiation of human placenta-derived mesenchymal stem cells into dopaminergic cells in vitro. **Cellular & molecular biology letters**, v. 14, n. 3, p. 528-536, 2009.

CHIEN, C. *et al.* In Vitro Differentiation of Human Placenta Derived Multipotent Cells into Hepatocyte Like Cells. **Cells**, v. 24, n. 7, p. 1759-1768, 2006.

COVAS, D. T. *et al.* Isolation and culture of umbilical vein mesenchymal stem cells. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 36, n. 9, p. 1179-1183, 2003.

COVAS, D. T. *et al.* Mesenchymal stem cells can be obtained from the human saphena vein. **Experimental Cell Research**, v. 309, n. 2, p. 340-344, 2005.

DE BARI, C. *et al.* Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. **Arthritis and Rheumatism**, v. 44, n. 8, p. 1928-1942, 2001.

DOETSCHMAN, T.; EISTETTER, H.; KATZ, M. The in vitro development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium. **Journal of Embryology and Experimental Morphology**, v. 87, p. 27-45, 1985.

DOMINICI, M.; BLANC, K. L.; MUELLER, I. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v. 8, n. 4, p. 315-317, 2006.

DONOVIEL, D. B.; FREED, D. D.; VOGEL, H. Proteinuria and perinatal lethality in mice lacking NEPH1, a novel protein with homology to NEPHRIN. **Molecular and Cellular Biology**, v. 21, n. 14, p. 4829-4836, 2001.

DWORAK, H.; SINK, H. Myoblast fusion in *Drosophila*. **BioEssays**, v. 24, n. 7, p. 591-601, 2002.

ELBASHIR, S. M. *et al.* Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. **Nature**, v. 411, n. 6836, p. 494-498, 2001.

EVANGELISTA, M.; SONCINI, MADDALENA; PAROLINI, O. Placenta-derived stem cells: new hope for cell therapy? **Cytotechnology**, v. 58, n. 1, p. 33-42, 2008.

FEHRER, C.; LEPPERDINGER, G. Mesenchymal stem cell aging. **Experimental gerontology**, v. 40, n. 12, p. 926-930, 2005.

FERRARI, G. *et al.* Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. **Science**, v. 279, n. 5356, p. 1528-1530, 1998.

FRIEDENSTEIN, A.; CHAILAKHJAN, R.; LALYKINA, K. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea pig bone marrow and spleen cells. **Cell Tissue Kinet**, v. 3, n. 4, p. 393-403, 1970.

GAGE, F. H.; RAY, J.; FISHER, L. J. Isolation, characterization, and use of stem cells from the CNS. **Annual review of neuroscience**, v. 18, n. 1, p. 159-192, 1995.

GALLI, R. *et al.* Skeletal myogenic potential of human and mouse neural stem cells. **Nature Neuroscience**, v. 3, n. 10, p. 986-991, 2000.

GERKE, P. *et al.* Neuronal expression and interaction with the synaptic protein CASK suggest a role for Neph1 and Neph2 in synaptogenesis. **Journal of Comparative Neurology**, v. 498, n. 4, p. 466-475, 2006.

GERKE, P. *et al.* NEPH2 is located at the glomerular slit diaphragm, interacts with nephrin and is cleaved from podocytes by metalloproteinases. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 16, n. 6, p. 1693-1702, 2005.

HORWITZ, E. *et al.* Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v. 7, n. 5, p. 393-395, 2005.

HUANG, Y. C. *et al.* Isolation of mesenchymal stem cells from human placental decidua basalis and resistance to hypoxia and serum deprivation. **Stem Cell Reviews**, v. 5, n. 3, p. 247-255, 2009.

HUBER, T.; BENZING, T. The slit diaphragm: a signaling platform to regulate podocyte function. **Current Opinion in Nephrology and Hypertension**, v. 14, n. 3, p. 211-216, 2005.

HÖRNBERG, M. *et al.* Retinoic acid selectively inhibits death of basal vomeronasal neurons during late stage of neural circuit formation.

Journal of Neurochemistry, v. 110, n. 4, p. 1263-1275, 2009.

ILANCHERAN, S.; MOODLEY, Y.; MANUELPIILLAI, U. Human fetal membranes: a source of stem cells for tissue regeneration and repair? **Placenta**, v. 30, n. 1, p. 2-10, 2009.

JACKSON, K. A.; MI, T.; GOODELL, M. A. Hematopoietic potential of stem cells isolated from murine skeletal muscle. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 25, p. 14482-14486, 1999.

JIANG, Y. *et al.* Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. **Nature**, v. 418, n. 6893, p. 41-49, 2002.

JONES, P.; HARPER, S. Stem cell patterning and fate in human epidermis. **Cell**, v. 80, n. 1, p. 83-93, 1995.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. Histologia básica. Décima edição, editora Guanabara Koogan, 2004.

KASSEM, M.; KRISTIANSEN, M.; ABDALLAH, B. M. Mesenchymal stem cells: cell biology and potential use in therapy. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 95, n. 5, p. 209-214, 2004.

KOHLER, M. C. **Análise da expressão de NEPH em células tronco mesenquimais diferenciadas para o fenótipo neuronal *in vitro*.**

Dissertação (Mestrado em Neurociências) - Curso de Pós Graduação em Neurociências da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009.

KOMORI, T. *et al.* Expression of kin of irregular chiasm-like 3/mKirre in proprioceptive neurons of the dorsal root ganglia and its interaction with nephrin in muscle spindles. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 511, n. 1, p. 92-108, 2008.

KONG, L. *et al.* Expression of the IgSF protein Kirre in the rat central nervous system. **Life Sciences**, v. 88, n. 13-14, p. 590-597, 2011.

KRAUSE, D. S. *et al.* Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. **Cell**, v. 105, n. 3, p. 369-377, 2001.

LEE, M. W. *et al.* Mesenchymal stem cells from cryopreserved human umbilical cord blood. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 320, n. 1, p. 273-278, 2004.

LEE, O. K. *et al.* Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. **Blood**, v. 103, n. 5, p. 1669-1675, 2004.

LEE, S. I. *et al.* MicroRNA-mediated posttranscriptional regulation is required for maintaining undifferentiated properties of blastoderm and primordial germ cells in chickens. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 26, p. 10426-10431, 2011.

LEISER, R.; KAUFMANN, P. Placental structure: in a comparative aspect. **Experimental and Clinical Endocrinology**, v. 102, n. 3, p. 122-134, 1994.

LENZ, G. The RNA interference revolution. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 38, n. 12, p. 1749-1757, 2005.

LIU, G.; KAW, B.; KURFIS, J. Neph1 and nephrin interaction in the slit diaphragm is an important determinant of glomerular permeability. **Journal of Clinical**, v. 112, n. 2, p. 209-221, 2003.

MAFI, P. *et al.* Adult mesenchymal stem cells and cell surface characterization-a systematic review of the literature. **The Open Orthopaedics**, v. 5, n. Suppl 2, p. 253-260, 2011.

MANESS, P. F.; SCHACHNER, M. Neural recognition molecules of the immunoglobulin superfamily: signaling transducers of axon guidance and neuronal migration. **Nature Neuroscience**, v. 10, n. 1, p. 19-26, 2007.

MARCUS, A. J.; WOODBURY, D. Fetal stem cells from extra-embryonic tissues: do not discard. **Journal of cellular and molecular medicine**, v. 12, n. 3, p. 730-742, 2008.

MENON, S.; OSMAN, Z.; CHENCHILL, K. A positive feedback loop between Dumbfounded and Rolling pebbles leads to myotube enlargement in *Drosophila*. **The Journal of Cell**, v. 169, n. 6, p. 909-920, 2005.

MIAO, Z. *et al.* Isolation of mesenchymal stem cells from human placenta: comparison with human bone marrow mesenchymal stem cells. **Cell biology international**, v. 30, n. 9, p. 681-687, 2006.

MINGUELL, J. J.; ERICES, A. Mesenchymal stem cells and the treatment of cardiac disease. **Experimental Biology and Medicine**, v. 231, n. 1, p. 39-49, 2006.

MIYAZAKI, M. *et al.* Gene transfer using nonviral delivery systems. **Peritoneal Dialysis**, v. 26, p. 633-640, 2006.

MORIKAWA, Y. *et al.* Expression of mKirre in the developing sensory pathways: its close apposition to nephrin-expressing cells. **Neuroscience**, v. 150, n. 4, p. 880-886, 2007.

MORRISON, S. J.; KIMBLE, J. Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer. **Nature**, v. 441, n. 7097, p. 1068-1074, 2006.

NEUMANN-HAEFELIN, E. *et al.* A model organism approach: defining the role of Neph proteins as regulators of neuron and kidney morphogenesis. **Human molecular genetics**, v. 19, n. 12, p. 2347-2359, 2010.

NISHIDA, K. *et al.* Role of Neph2 in pontine nuclei formation in the developing hindbrain. **Molecular and Cellular Neurosciences**, v. 46, n. 3, p. 662-670, 2011.

NOVINA, C. D.; SHARP, P. A. The RNAi revolution. **Nature**, v. 430, n. 6996, p. 161-164, 2004.

OSYCZKA, A. M. *et al.* Multilineage differentiation of adult human bone marrow progenitor cells transduced with human papilloma virus type 16 E6/E7 genes. **Calcified tissue international**, v. 71, n. 5, p. 447-458, 2002.

PAROLINI, O. *et al.* Concise review: isolation and characterization of cells from human term placenta: outcome of the first international Workshop on Placenta Derived Stem Cells. **Stem Cells**, v. 26, n. 2, p. 300-311, 2008.

PITTENGER, M. F. *et al.* Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells. **Science**, v. 284, n. 5411, p. 143-147, 1999.

PRINGLE, S. *et al.* Mesenchymal differentiation propensity of a human embryonic stem cell line. **Cell Proliferation**, v. 44, n. 2, p. 120-127, 2011.

PROCKOP, D. J. Marrow Stromal Cells as Stem Cells for Nonhematopoietic Tissues. **Science**, v. 276, n. 5309, p. 71-74, 1997.

RAFF, M. Adult stem cell plasticity: fact or artifact? **Annual review of cell and developmental biology**, v. 19, p. 1-22, jan 2003.

RASTEGAR, F. *et al.* Mesenchymal stem cells: Molecular characteristics and clinical applications. **World Journal of Stem Cells**, v. 2, n. 4, p. 67-80, 2010.

ROSSANT, J. Stem Cells from the Mammalian Blastocyst. **Stem Cells**, p. 477-482, 2001.

RUIZ-GÓMEZ, M. *et al.* Drosophila dumbfounded: a myoblast attractant essential for fusion. **Cell**, v. 102, n. 2, p. 189-198, 2000.

SCHMIDT-WOLF, G. D.; SCHMIDT-WOLF, I. G. . Non-viral and hybrid vectors in human gene therapy: an update. **Trends in Molecular Medicine**, v. 9, n. 2, p. 67-72, 2003.

SCHNEIDER, T. *et al.* Restricted expression of the irrc-rst protein is required for normal axonal projections of columnar visual neurons. **Neuron**, v. 15, n. 2, p. 259-271, 1995.

SELLIN, L. *et al.* NEPH1 defines a novel family of podocin interacting proteins. **The FASEB Journal**, v. 17, n. 1, p. 115-117, 2003.

SEMENOV, O. V. *et al.* Engineered polyelectrolyte multilayer substrates for adhesion, proliferation, and differentiation of human mesenchymal stem cells. **Tissue engineering. Part A**, v. 15, n. 10, p. 2977-2990, 2009.

SEO, B.M. *et al.* Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. **Lancet**, v. 364, n. 9429, p. 149-155, 2004.

SERIZAWA, S. *et al.* A neuronal identity code for the odorant receptor-specific and activity-dependent axon sorting. **Cell**, v. 127, n. 5, p. 1057-1069, 2006.

SHEN, K.; BARGMANN, C. I. The immunoglobulin superfamily protein SYG-1 determines the location of specific synapses in *C. elegans*. **Cell**, v. 112, n. 5, p. 619-630, 2003.

SHIMADA, H. *et al.* Comparison of ES cell fate in sandwiched aggregates and co-cultured aggregates during blastocyst formation by monitored GFP expression. **Molecular Reproduction and Development**, v. 52, n. 4, p. 376-382, 1999.

SIJEN, T. *et al.* On the role of RNA amplification in dsRNA-triggered gene silencing. **Cell**, v. 107, n. 4, p. 465-476, 2001.

SONCINI, M. *et al.* Isolation and characterization of mesenchymal cells from human fetal membranes. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, v. 1, n. 4, p. 296-305, 2007.

SPANGRUDE, G. J.; HEIMFELD, S.; WEISSMAN, I. L. Hematopoietic Stem. **Advancement of Science**, v. 241, n. 4861, p. 58-62, 1988.

STRÜNKELNBERG, M. *et al.* *rst* and its paralogue *kirre* act redundantly during embryonic muscle development in *Drosophila*. **Development**, v. 128, n. 21, p. 4229-4239, 2001.

TAGAMI, M. *et al.* Genetic and ultrastructural demonstration of strong reversibility in human mesenchymal stem cell. **Cell and tTissue Research**, v. 312, n. 1, p. 31-40, 2003.

TAMURA, S. *et al.* Expression of mKirre, a mammalian homolog of *Drosophila kirre*, in the developing and adult mouse brain. **Neuroscience**, v. 133, n. 3, p. 615-624, 2005.

TANIGUCHI, N. *et al.* Expression patterns and function of chromatin protein HMGB2 during Mesenchymal stem cell differentiation. **The Journal of biological chemistry**, v. 286, n. 48, p. 41489 -41498, 2011.

THOMSON, J.; ITSKOVITZ-ELDOR, J.; SHAPIRO, S. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. **science**, v. 282, n. 5391, p. 1145-1147, 1998.

TRENTIN, A. *et al.* Self-renewal capacity is a widespread property of various types of neural crest precursor cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 13, p. 4495-4500, 2004.

TRYGGVASON, K. Unraveling the mechanisms of glomerular ultrafiltration: nephrin, a key component of the slit diaphragm. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 10, n. 11, p. 2440-2445, 1999.

UENO, H. *et al.* A stromal cell-derived membrane protein that supports hematopoietic stem cells. **Nature Immunology**, v. 4, n. 5, p. 457-463, 2003.

ULLOA-MONTOYA, F.; VERFAILLIE, C. M.; HU, W.-S. Culture systems for pluripotent stem cells. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 100, n. 1, p. 12-27, 2005.

VÖLKER, L. A. *et al.* Comparative analysis of Neph gene expression in mouse and chicken development. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 137, n. 3, p. 355-366, 2011.

WATT, F.; HOGAN, B. Out of Eden: stem cells and their niches. **Science**, v. 287, n. 5457, p. 1427-1430, 2000.

WOBUS, A. Embryonic stem cells: prospects for developmental biology and cell therapy. **Physiological Reviews**, v. 85, n. 2, p. 635-678, 2005.

YEN, B. L. *et al.* Isolation of Multipotent Cells from Human Term Placenta. **Stem Cells**, n. 161, p. 3-9, 2005.

YOUNG, H. E.; BLACK, A. C. Adult stem cells. **The Anatomical Record**, v. 276, n. 1, p. 75-102, 2004.

YOUNG, H. E. *et al.* Human reserve pluripotent mesenchymal stem cells are present in the connective tissues of skeletal muscle and dermis derived from fetal, adult, and geriatric donors. **The Anatomical Record**, v. 264, n. 1, p. 51-62, 2001.

ZHANG, Y. *et al.* Comparison of mesenchymal stem cells from human placenta and bone marrow. **Chinese Medical Journal**, v. 117, n. 6, p. 882-887, 2004.

ZUK, P. A. *et al.* Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. **Tissue Engineering**, v. 7, n. 2, p. 211-228, 2001.

ANEXO A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA
CATARINA
LABORATÓRIO DE CÉLULAS TRONCO E
REGENERAÇÃO TECIDUAL, BEG-CCB, UFSC

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

TÍTULO DO PROJETO: Expansão *ex vivo* de células-tronco mesenquimais e hematopoiéticas de placenta/cordão umbilical para reconstituição terapêutica e reprogramação fenotípica.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL (ORIENTADOR): Prof. Márcio Alvarez da Silva

PESQUISADOR PRINCIPAL: Aloisio Luiz Benedetti, Maristela Martini, Diego Amarante da Silva, Diana Heck, Sarah Carneiro, Mariane Dahmer, Camila Etcheverria

Estamos desenvolvendo um Projeto de Pesquisa envolvendo a utilização de células-tronco hematopoiéticas (CTHs) e células-tronco mesenquimais (CTMs) obtidas do cordão umbilical/placenta. Estas células são importantes para transplantes e recuperação do sangue nos casos de leucemias e tumores malignos. Entretanto algumas dificuldades são observadas: 1)baixo número de doadores disponíveis; 2)a compatibilidade do doador com o receptor; 3)baixo número de CTHs no cordão umbilical. Neste projeto esperamos fazer um enriquecimento em CTHs para a sua utilização clínica. É possível se obter CTMs do cordão umbilical e da placenta. As CTMs podem formar tecidos como muscular, ósseo, sanguíneo e neural. Neste projeto estamos interessados em obter e amplificar *ex vivo* CTHs humanas de cordão umbilical/placenta de neonatos a termo, assim como obter, caracterizar e re-programar CTMs obtidas do mesmo tecido. Investigaremos também como CTMs obtidas de placenta/cordão umbilical podem melhorar a amplificação de CTHs *in vitro*. Esperamos que esta pesquisa traga benefícios, como o aumento no sucesso de procedimentos como transplante de medula óssea. A placenta/cordão umbilical obtida será processada no Laboratório, onde isolaremos as células e manteremos em cultura para testarmos qual a melhor metodologia de amplificação destas

células. Se você tiver alguma dúvida em relação ao estudo ou não quiser mais fazer parte do mesmo, pode entrar em contato pelo telefone: (48) 33316905, Laboratório de Células Tronco e Regeneração Tecidual (LACERT).

Se você estiver de acordo em participar desta pesquisa, posso garantir que o material celular obtido, será confidencial e somente será utilizado neste trabalho, podendo ser congelado para posterior procedimento.

Pesquisador
responsável: _____

Pesquisador principal: _____

Eu _____, fui esclarecido(a) sobre a Pesquisa “Expansão *ex vivo* de células tronco mesênquimais e hematopoiéticas de placenta/cordão umbilical para reconstituição terapêutica e reprogramação fenotípica” e concordo com a doação de parte e/ou totalidade da placenta e cordão umbilical e que meus dados sejam utilizados na realização da pesquisa.

Florianópolis, ____ de _____ de 20 ____.

Assinatura: _____ RG: _____

ANEXO B – Protocolo de extração de plasmídeos *Quick Plasmid Miniprep Kit* (Invitrogen)

As bactérias competentes JM-109 - *Escherichia coli* (PROMEGA) foram transformadas com o plasmídeo pCX-EGFP e amplificadas como descrito anteriormente. Em seguida, foram submetidas à extração do plasmídeo através do *kit Quick Plasmid Miniprep Kit* (Invitrogen). Conforme as instruções do fabricante, primeiramente foi realizada a lise das células, onde, 5 mL de bactérias foram centrifugadas durante 2 minutos a 10.000 X g. O *pellet* resultante foi ressuscitado em 250 µL de tampão de ressuspensão, que foram transferidos para um tubo de 1,5 mL. Foram então adicionados 250 µL do tampão de lise, em seguida a solução foi homogeneizada gentilmente por inversão do tubo e incubada por 5 minutos à temperatura ambiente. Logo após, foram adicionados 350 µL do tampão de precipitação à solução, que foi homogeneizada por inversão e submetida à centrifugação por 10 minutos a 12.000 X g. Em seguida foi realizado o processo de purificação.

Para realizar a purificação, após a centrifugação o sobrenadante foi transferido para uma coluna *spin*, que foi acoplada a um tubo de lavagem de 2 mL e submetidos a centrifugação por 1 minuto a 12.000 X g. O líquido que escoou para o tubo de lavagem foi descartado e a coluna *spin* foi novamente acoplada ao tubo. Foram então adicionados 700 µL do tampão de lavagem na coluna, que foi submetida novamente a centrifugação por 1 minuto a 12.000 X g. Mais uma vez o líquido que escoou para o tubo de lavagem foi descartado e o processo de centrifugação foi repetido para eliminar quaisquer resquícios do tampão de lavagem. Após esse processo, o tubo de lavagem foi descartado e foi realizada a eluição do DNA.

Para o procedimento de eluição, a coluna *spin* foi acoplada a um tubo de recuperação de 1,5 mL. Em seguida foram adicionados 75 µL de tampão TE no centro da coluna. A coluna foi incubada por 1 minuto à temperatura ambiente e centrifugada por 2 minutos a 12.000 X g. Após a centrifugação, a coluna foi descartada e o tubo de recuperação contendo o plasmídeo foi armazenado a -20°C para posterior utilização.

ANEXO C – Protocolo de extração de plasmídeos *Plasmid Miniprep System* (Promega)

As bactérias competentes JM-109 - *Escherichia coli* (PROMEGA) foram transformadas com o plasmídeo pCX-EGFP e amplificadas como descrito anteriormente. Em seguida, foram submetidas à extração do plasmídeo através do *kit* de extração *Plasmid Miniprep System* (Promega). Conforme as instruções do fabricante, 600 μL das bactérias crescidas em meio LB foram transferidas para um tubo de 1,5 mL. Foram então adicionados 100 μL do tampão de lise celular e a solução foi homogeneizada por inversão do tubo, tornando-se azul, indicando a completa lise das células. Logo após, foram adicionados 350 μL da solução de neutralização e os reagentes foram novamente homogeneizados por inversão do tubo, fazendo com que a solução se tornasse amarela, indicando a completa neutralização do processo de lise. O tubo foi centrifugado por 3 minutos a 12.000 X g e o sobrenadante foi transferido para uma coluna *PureYield*. A coluna foi então acoplada a um tubo coletor *PureYield* e levada a centrifugação por 15 segundos a 12.000 X g. Após a centrifugação, o líquido que escoou para o tubo coletor foi descartado, a coluna foi novamente acoplada ao tubo coletor e nela foram adicionados 200 μL da solução de lavagem e remoção de endotoxinas. Os reagentes foram centrifugados por 15 segundos a 12.000 X g e, após, foram adicionados 400 μL da solução de lavagem da coluna e repetida à centrifugação por 30 segundos a 12.000 X g. Em seguida, o tubo coletor foi descartado, a coluna foi acoplada a um tubo de 1,5 mL e foram adicionados 30 μL do tampão de eluição TE diretamente no centro da coluna. A coluna foi incubada por 1 minuto à temperatura ambiente e centrifugada por 15 segundos a 12.000 X g. Logo após, a coluna foi descartada e o tubo contendo o plasmídeo foi armazenado a -20°C para posterior utilização.

ANEXO D – Protocolo de extração de plasmídeos *Plasmid Purification Midi Kit* (Qiagen)

As bactérias competentes JM-109 - *Escherichia coli* (PROMEGA) foram transformadas com o plasmídeo pCX-EGFP e amplificadas como descrito anteriormente. Em seguida, foram submetidas à extração do plasmídeo através do *kit* de extração de plasmídeos *Plasmid Purification Midi Kit* (Qiagen). Conforme as instruções do fabricante, 50-100 mL das bactérias foram centrifugadas a 6.000 X g por 15 minutos a 4°C e o *pellet* resultante foi ressuspensionado em 4 mL do tampão P1. Foram então adicionados 4 mL do tampão P2 a esta solução que, após homogeneização, foi incubada por 5 minutos a temperatura ambiente, tornando-se azul, o que indicou a completa lise das células. Logo após, foram adicionados 4 mL do tampão P3, os reagentes foram misturados, fazendo com que a coloração azul desaparecesse e a solução tornou-se transparente, indicando que a lise foi neutralizada. Os reagentes foram então incubados por 5 minutos em gelo. Em seguida, a solução foi submetida à centrifugação a 20.000 X g por 30 minutos a 4°C. Após, o sobrenadante contendo o DNA foi removido e centrifugado novamente a 20.000 X g por 15 minutos a 4°C.

Enquanto as amostras eram centrifugadas, foi realizado o equilíbrio da coluna QIAGEN-tip para permitir que a mesma se esvazie apenas pela força da gravidade. Para isso, foi adicionado 1 mL do tampão QBT em uma coluna QIAGEN-tip previamente acoplada a um tubo de descarte de 50 mL. O fluxo iniciou automaticamente, pois a presença de detergente no tampão reduziu a tensão superficial.

Após a realização do equilíbrio e terminada a centrifugação das amostras, o sobrenadante com DNA foi adicionado à coluna e os reagentes escoaram através da força da gravidade. Após, a coluna foi lavada por duas vezes com 10 mL do tampão QC, que também escoou pela coluna através da força da gravidade. O tubo contendo os reagentes escoados foi descartado e foi realizada então a eluição dos plasmídeos em 5 mL de tampão QF. Em seguida foi realizada a precipitação dos plasmídeos através da adição de 3,5 mL de isopropanol ao DNA eluído e centrifugação a 15.000 X g por 30 minutos a 4°C. Após, o *pellet* resultante foi lavado com etanol a 70% e levado a centrifugação a 15.000 X g por 10 minutos. Por último, o *pellet* foi ressuspensionado em

150 μL de TE e os plasmídeos foram armazenados a -20°C para posterior utilização.