



Universidade Federal do Rio Grande do Sul



Centro de Biotecnologia do Estado do Rio Grande do Sul

Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

**ANÁLISE MOLECULAR E CITOQUÍMICA DE GENES E PROTEÍNAS
RELACIONADOS A OSTEODIFERENCIAÇÃO EM CÉLULAS TRONCO
DERIVADAS DO TECIDO ADIPOSO.**

Aline Fraga Zandonai

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da UFRGS como parte dos requisitos para a Obtenção do Grau de Mestre em Biologia Molecular e Celular.

Orientador: Prof. Dr. João Antonio Pêgas Henriques

Porto Alegre (RS)

2008

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biologia Celular e Doenças Respiratórias e no Centro de Terapia Celular – Hospital São Lucas - PUCRS . O projeto foi subsidiado pelo Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela Fundação de Coordenação e Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e pelo Laboratório de Genotoxicidade – Instituto Royal (GENOTOX Centro de Biotecnologia / UFRGS).

Dedicatória

Ao meu esposo pela força e pela compreensão nos momentos que me fiz ausente me dedicando a elaboração deste trabalho.

A minha mãe, Eneida (*in memoriam*).

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. João Antonio Pegas Henriques pela orientação, compreensão, paciência e apoio durante a elaboração deste trabalho.

A Dra. Denise Cantarelli Machado, pela co-orientação e por disponibilizar o Laboratório de Biologia Celular e Doenças Respiratórias e o Centro de Terapia Celular. Pela compreensão e sugestões.

Ao Dr. Diego Bonatto, pela co-orientação; pelo apoio; competência, todas as sugestões e discussões durante todo o desenvolvimento deste trabalho.

A Ana Paula e Mariana Lemos por toda a atenção e auxílio em todos os momentos. Por compartilhar o desenvolvimento do projeto do início ao fim. Ao Jhony (João Álvaro), por estar sempre interessado no acompanhamento do trabalho. Muito Obrigada!

Aos demais colegas de laboratório por suas colaborações. Em especial, ao Christian Viezer, Paula Musnich e Jeremiah Lubianca.

A Cassiana Viau e ao Thiago, da patologia do HSL pela ajuda na realização do trabalho.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação pelos ensinamentos.

Aos professores membros da minha comissão de acompanhamento, Dra. Jenifer Saffi e Dr. Luiz Augusto Basso.

Aos funcionários da Secretária de Pós-Graduação do PPGBCM, em especial a Silvinha.

Ao CNPq por disponibilizar os recursos para este trabalho, e a CAPES pela bolsa de estudos.

Aos médicos Milton Paulo e Pedro Martins incluindo suas equipes por suas contribuições.

Aos pacientes do estudo por suas doações, sem esse ato não seria possível a realização deste estudo.

A toda minha família, em especial, à minha avó Lorena, ao meu pai e minha tia Elevi, pelo carinho e compreensão durante todo o mestrado. O apoio familiar é essencial nestes momentos, sem isso não seria possível.

As minhas grandes amigas Ana Kristina, Priscila, Themis e Karine pelo apoio pessoal. Tina, muito obrigada pela amizade e apoio.

A Lunara Martins e Luisa por todo o auxílio e incentivo.

Ao meu esposo, Cláudio Júnior, pela compreensão da minha ausência, por suportar a longa distância durante a elaboração deste trabalho, por todo apoio, por estar ao meu lado... por tudo! Obrigada pelo nosso amor. Te amo!

Obrigada.

SUMÁRIO

ABREVIATURAS.....	viii
RESUMO.....	x
ABSTRACT.....	xi
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 As células-tronco.....	2
1.2 A célula- tronco mesenquimal.....	4
1.3 As células- tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo (ADSCs).....	7
1.3.1 Capacidade de diferenciação das ADSCs	9
1.4 Diferenciação em tecido ósseo	10
1.5 Proteínas Morfogenéticas Ósseas – <i>bone morphogenetic proteins</i> (BMPs)	13
1.6 Marcadores da Osteogênese.....	15
1.7 Células-tronco e mecanismos de reparação.....	17
1.8 A proteína MCM2 (<i>minichromosome maintenance 2</i>)	18
2 OBJETIVOS	20
2.1 Objetivo geral.....	21
2.2 Objetivos específicos.....	21

3	CAPÍTULO 1 - Artigo: Molecular and cytochemistry analyses of genes and proteins related to osteodifferentiation in human adipose-derived stem cells.	22
4	DISCUSSÃO	49
5	CONCLUSÕES	56
6	PERSPECTIVAS	58
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60
	ANEXO 1 - Artigo publicado na revista Differentiation	69

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ALP	Fosfatase alcalina
B2M	Beta-2 microglobulina
OC	Osteocalcina
BMP	Proteína morfogenética óssea
BMP-4	Proteína morfogenética óssea-4
cDNA	Ácido desoxirribonucléico complementar
CO ₂	Dióxido de carbono
°C	Graus centígrados
OM	Meio contendo dexametasona/ácido ascórbico/glicerolfosfato
D-MEM	Meio de Eagle Modificado por Dulbecco
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DNase	Deoxirribonuclease
dNTPS	Desoxirribonucleotídeos trifosfatados
DPBS	Dulbecco's Phosphate-Buffered Salines
dT	Dideoxitimidina
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EtBr	Brometo de Etídio
FBS	Soro fetal bovino
g	Força gravitacional
H ₂ O	Água
kDa	Quilo-dalton (unidade de massa atômica)
M	Molar

MgCl ₂	Cloreto de magnésio
MCM	Minichromosome maintenance complex
MCM2	Minichromosome maintenance 2
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MQ	MilliQ
mRNA	Ácido ribonucléico mensageiro
OP	Osteopontina
p/v	peso/volume
PBS	Salina tamponada com fosfato
qRT-PCR	Transcrição reversa seguida de PCR em tempo real
RNA	Ácido ribonucléico
RNase	Ribonuclease
TGF- β	Fator de crescimento e transformação- β
U	Unidade
v/v	volume/volume
μ L	Microlitro
μ M	Micromolar
%	Por cento
s	Segundos
hADSCs	Human adipose-derived stem cells

RESUMO

A descoberta das células tronco adultas tornou possível a sua aplicação clínica em protocolos de medicina regenerativa e de engenharia de tecidos para a reparação de órgãos danificados ou pouco funcionais. Neste sentido, são conhecidas muitas fontes diferentes de células tronco adultas, entre elas o tecido epitelial, o tecido muscular e a medula óssea. Recentemente, o tecido adiposo adulto foi reconhecido como uma fonte alternativa, acessível e rica em células tronco mesenquimais (MSCs), também denominadas de células tronco derivadas do tecido adiposo (hADSCs). As hADSCs são as células tronco adultas que apresentam a maior plasticidade, e são facilmente isoladas pela característica de aderência a substratos plásticos. Sob condições específicas de cultivo, as hADSCs podem diferenciar-se em células precursoras osteoblásticas. Dentre as proteínas necessárias para a diferenciação das hADSCs, o papel do complexo *minichromosome maintenance* (MCM) não é muito bem conhecido. A proteína MCM2 é parte do complexo MCM, fazendo parte do complexo pré-replicativo (pre-RC). Em células proliferativas, o gene MCM2 apresenta alta expressão, sendo que o seu produto gênico está relacionado com os mecanismos de reparação de DNA. Sendo assim, analisamos as mudanças na expressão do gene MCM2 durante a osteodiferenciação das hADSCs em diferentes meios de cultura, contendo BMP-4 ou OM. Os genes relacionados com a osteodiferenciação, como osteocalcina (OC), osteopontina (OP) e fosfatase alcalina (ALP) foram analisados por RT-PCR, por PCR em tempo real e citoquímica. Os dados obtidos pelas

técnicas citoquímicas e de biologia molecular indicaram uma diminuição da expressão do gene MCM2 durante a osteodiferenciação, que pode estar relacionada com danos ao DNA ou senescência nas hADSCs.

Palavras chaves: células tronco derivadas do tecido adiposo (hADSCs), complexo MCM2-7, diferenciação osteogênica.

ABSTRACT

The discovery of adult stem cells is a promise field in regenerative medicine and tissue engineering. There are many sources of adult stem cells among which of whom are the skin, muscle and bone marrow. Currently, the adipose tissue has been an alternative source of mesenchymal stem cells (MSCs), termed human adipose-derived stem cells (hADSCs). The MSCs are the most plastic adult stem cells known until now and are easily isolated by adherence in plastic substrates. Under specific conditions of culture hADSCs can be differentiated in osteoblast cell precursors. Among proteins needed for hADSCs differentiation, the roles of minichromosome maintenance (MCM) complex remains poorly understood. The protein complex MCM2-7 is part of DNA pre-replicative complex (pre-RC), being abundant in proliferating cells and involved in DNA repair mechanisms. In this sense, the Mcm2 is essential for the activity of the MCM complex. Thus, we analysed MCM2 gene expression changes during osteoinduction by culturing hADSCs in different media containing BMP-4 or in osteogenic medium. Genes related to osteodifferentiation, like osteocalcin (OC), osteopontin (OP) and alkaline phosphatase (ALP) were analysed by molecular and cytochemistry approaches during osteodifferentiation. Interestingly, we observed a decrease in the MCM2 gene level osteoinduction of hADSCs in osteogenic medium, which could be related to an increase in genome damage and senescence in hADSCs.

KEYWORDS: adipose-derived stem cells (hADSCs), complex MCM2-7, osteogenic differentiation.

Introdução

1 INTRODUÇÃO

1.1 As células-tronco

As células-tronco diferem das outras células somáticas por apresentarem: (i) a característica de auto renovação, mantendo-se como uma população de células indiferenciadas, (ii) a capacidade de gerar outra população tronco e (iii) a capacidade de se diferenciarem em diversos tipos celulares. Quanto a capacidade de diferenciação das células-tronco esta é conhecida tanto *in vivo*, para a manutenção dos tecidos adultos e renovação celular, como *in vitro* onde, sob determinadas condições de cultivo contendo fatores e proteínas específicas, estas podem gerar populações de células diferenciadas de distintas origens embrionárias (ODORICO, 2001; ZAGO, 2006).

Existem basicamente dois tipos de células-tronco: as células-tronco embrionárias e as células-tronco adultas ou somáticas. As células-tronco embrionárias são conhecidas como pluripotentes por terem a capacidade de gerar todos os diferentes tipos celulares. Elas podem ser removidas da massa celular interna do embrião, no 4° ou 5° dia após a fecundação, no período em que é denominado de blastocisto. Estas células retiradas da massa celular interna podem ser cultivadas, tornando-se uma linhagem de célula-tronco embrionária. Também são conhecidos outros tipos de células pluripotentes, como as células germinais embrionárias, encontradas em uma fase mais avançada do desenvolvimento fetal (5° a 10° semana), e as células obtidas por transferência de núcleo somático em adultos (ZAGO, 2006). Essas células têm a capacidade de

gerar os tecidos derivados dos três folhetos embrionários e, quando cultivadas em condições apropriadas, essas dão origem a células que se proliferam e se renovam indefinidamente (ODORICO *et al.*, 2001).

As células-tronco adultas ou somáticas (encontradas em tecidos adultos) são multipotentes, pois geram tipos celulares de uma ou mais linhagens mas não possuem a capacidade de constituir o organismo como um todo. A capacidade de gerar tanto *in vivo* como *in vitro* diversos tipos celulares, bem como os mecanismos envolvidos que modulam a diferenciação em um tipo celular específico, ainda são muito discutidos. O grau de “plasticidade” e a capacidade de gerar outro tipo de tecido permanecem alvos de muitas discussões e pesquisas (VESCOVI, 2002; KOLF *et al.*, 2007).

São muitas as fontes de células-tronco adultas. A fonte mais conhecida que já vem sendo utilizada em transplantes há algum tempo é a medula óssea. Nela são encontradas as células-tronco hematopoiéticas reconhecidas por apresentarem o marcador de superfície ou (CD- *cluster of differentiation*) CD34⁺ e CD201 e outros marcadores como FGFR (*fibroblast growth factor receptor*). Estas são definidas pelo potencial para reconstituir todas as células da linhagem hematopoiética e sustentar a produção destas células por toda a vida do indivíduo transplantado. As células-tronco hematopoiéticas também são encontradas no sangue de cordão umbilical, na placenta e no sangue periférico. O isolamento dessas células é realizado pela coleta do material obtido da crista ilíaca de um doador, seguido de centrifugação deste material em gradiente de hipaque para obtenção de uma camada de células mononucleares onde se encontram as

células hematopoéticas e posterior cultivo destas células para transplante (WOGNUM *et al.*, 2003).

Verfaillie e seu grupo (REYES *et al.*, 2001; JIANG *et al.*, 2002) isolaram uma população de células mononucleares da medula óssea que, após realizado um transplante ou por meio de cultivo *in vitro*, apresentaram a capacidade de se diferenciarem em tecidos mesodérmicos e também em endotélio e em endoderma. Esta população de células isoladas denominada MAPC (*multipotent adult progenitor cell*), foi encontrada utilizando a técnica de exclusão de células CD45⁺ e glicoforina A⁺ e cultivadas em fatores de crescimento e soro fetal bovino (REYES *et al.*, 2001; JIANG *et al.*, 2002).

Outros tipos de células-tronco são conhecidos, como as células-tronco neuronais (ENCINAS, 2008); epiteliais (LIANG, 2002) do músculo esquelético, também conhecidas como células satélites (PÉAULT, 2007), do cordão umbilical (KOGLER *et al.*, 2004; BIEBACK *et al.*, 2004) do líquido amniótico (DE COPPI *et al.*, 2007) e de diversos outros tecidos.

1.2 A célula- tronco mesenquimal

Além das células tronco encontradas em quase todos os tipos de tecidos, ainda existe um tipo de célula tronco multipotente encontrada em diversos tecidos chamada de célula tronco mesenquimal (MSC - *mesenchymal stem cell*). O papel biológico destas células não está completamente esclarecido, mas acredita-se estar envolvido com uma reserva celular para manutenção e reparo dos tecidos. Pittenger *et al.* (1999) demonstraram primeiramente que MSCs derivadas da

medula óssea têm o potencial para diferenciar-se em linhagens adipogênica, condrogênica e osteogênica utilizando gradiente de densidade em hipaque para isolar as células, semearam em placas de cultura e removeram as células não aderentes. Na diferenciação condrogênica, após 10 dias, as culturas apresentaram uma matriz extracelular rica em proteoglicanas e colágeno tipo II (típico de cartilagem articular). Quando as células foram induzidas com dexametasona, β -glicerolfosfato, ácido ascórbico e soro fetal bovino 10% (meio osteogênico), as MSCs formaram agregados ou nódulos e verificou-se um aumento na expressão de fosfatase alcalina, característico de células osteoblásticas (PITTENGER *et al.*, 1999). De origem mesodérmica, as MSCs contribuem para a regeneração de diversos tecidos mesenquimais como osso, cartilagem, músculo, tendão e tecido adiposo. As MSCs, primeiramente caracterizadas na medula óssea foram também isoladas de tecidos de origem mesodérmica como tecido adiposo, muscular, ósseo e tendões. Além disso, as MSCs também foram encontradas em tecidos como músculo, osso tabecular, sangue de cordão umbilical, pericitos, membrana sinovial, fígado fetal, pulmões, polpa dentária e acredita-se estar presente em todos, ou quase todos, os tecidos adultos (PITTENGER *et al.*, 1999; KRAUSE, 2002; BIEBACK *et al.*, 2004). Recentemente, Meirelles *et al.* demonstraram que colônias plástico-aderentes semelhantes as MSCs foram isoladas do cérebro, baço, fígado, rim, pulmão, medula óssea, músculo, timo e pâncreas de camundongos. Todas estas colônias apresentaram morfologia e imunofenótipo semelhantes após muitas passagens (da SILVA MEIRELLES *et al.*, 2006). Estes estudos podem indicar a presença de um microambiente comum de MSCs.

Devido à ampla distribuição anatômica das MSCs, existem evidências que indicam a possibilidade destas células apresentarem origem relacionada a pericitos. Os pericitos, ou células perivasculares, são células que revestem os capilares e estão presentes na parede vascular, arteríolas e na camada externa das veias e artérias. Elas têm origem mesenquimatosa e possuem núcleo alongado e prolongamentos citoplasmáticos que envolvem parcialmente a parede dos vasos (da SILVA MEIRELLES *et al*, 2008) .

As MSCs apresentam a característica de aderência à superfície plástica ou matriz extracelular e, por esta razão, são facilmente isoladas dos tecidos onde se encontram. Em cultura, as MSCs apresentam morfologia fibroblastóide (semelhante a fibroblastos), possuindo prolongamentos citoplasmáticos (MEIRELLES & NARDI, 2003). As culturas de MSCs são também caracterizadas por vários anticorpos e são definidas como CD45⁻ CD34⁻ CD105⁺ CD73⁺ CD117⁺. Outros marcadores também são utilizados para MSCs como: Thy-1 (CD90), CD144, CD166, CD115, Cd29, Sca-1, Stro-1, (CHEN *et al.*, 2008). Além desses marcadores, outros são expressos como CD106, CD117, CD9, CD10, CD13, CD29, CD44, CD49e, CD146 (STREM, 2005) (Tabela 1). Segundo Kolf *et al.* (2007) há um consenso que as MSCs não expressam CD11b, glicoforina-A, e CD45. Entretanto, há uma divergência em relação aos marcadores. Por exemplo, WAGNER *et al.*(2005) isolaram uma população com os marcadores negativos para CD10 e CD117. Contudo, as MSCs não possuem um único marcador que possa ser utilizado para seu isolamento e purificação, fazendo com que o seu conceito seja funcional.

A influência do “nicho” parece ser outro fator importante quando se trata de células tronco e sua diferenciação. O conceito de nicho refere-se a microambientes anatômicos e especializados que regulam sua auto-renovação, manutenção e reparo tecidual. O seu potencial de diferenciação está relacionado com o ambiente local, com os fatores que ali existem e de acordo com os dos sinais que recebem (SCADDEN, 2006).

As MSCs também apresentam efeitos imunomodulatórios, como a inibição da proliferação e a ativação de linfócitos T (WAN, 2008), a indução de células T regulatórias, interferência na maturação e na função de células dendríticas e a alteração no padrão de liberação de citocinas, assim como na diminuição do fator de necrose tumoral (TNF- α); no interferon γ (IFN- γ) e na interleucina 12 (IL-12) e aumento da produção de citocinas anti-inflamatórias como IL-10 (NAUTA & FIBBE, 2007). Além desses efeitos, a MSC representa um tipo celular vantajoso para transplantes alogênicos, pois existem evidências de que estas células apresentam um baixo nível de expressão de MHC I (*major histocompatibility complex I*) e ausência de MHC II (*major histocompatibility complex II*), reduzindo, assim, os riscos de rejeição e complicações pós-transplante (UCCELLI *et al.*, 2006).

1.3 As células- tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo (ADSCs)

Recentemente, o tecido adiposo adulto foi reconhecido como fonte alternativa, acessível e rica em MSCs. Assim como a medula óssea, tem origem no mesoderma embrionário e contém um estroma que é facilmente isolado

contendo uma população heterogênea de células estromais, sendo assim uma fonte abundante de MSCs. A frequência de células-tronco no tecido adiposo é de aproximadamente 2×10^8 células para cada 100 mL de tecido lipoaspirado e a média de ADSCs existente são de 2% das células nucleadas. (AUST *et al.*, 2004; STREM *et al.*, 2005; FRASER *et al.*, 2006). As ADSCs apresentam fenótipo similar ao das MSCs originadas da medula óssea (Tabela 1), sendo que o CD105 (endoglina), CD117 (c-kit) e CD166 são marcadores utilizados para identificar potencial de diferenciação (STREM *et al.*, 2005).

Marcador de superfície	Padrão de expressão	
	ADSCs	MSCs
CD9	+	+
CD10	+	+
CD29	+	+
CD31	--	--
CD34	--	--
CD44	+	+
CD45	--	--
CD49d	+	--
CD49c	+	+
CD54	+	+
CD55	+	+
CD59	+	+
CD90	+	+
CD105	+	+
CD106	--	+
CD117	+	+
CD146	+	+
CD166	+	+
STRO-1	+	+

Tabela 1. Os marcadores de superfície das ADSCs são similares aos das MSCs da medula-óssea. (Adaptado de STREM *et al.*, 2005),

1.3.1 Capacidade de diferenciação das ADSCs

A diferenciação das células-tronco é determinada por uma cascata de eventos que é dependente do tempo e do estado de compactação da cromatina no núcleo. Os nucleossomos restringem o acesso da maquinaria de transcrição a regiões regulatórias específicas do DNA. Apenas alguns genes estão disponíveis para serem expressos, enquanto a maioria permanece reprimida, por meio da interação de muitos elementos regulatórios que servem como fatores de transcrição ou co-ativadores. Estes sinais afetam a expressão gênica por intermédio de complexos multiprotéicos que também regulam a remodelagem da cromatina. As modificações pós-traducionais constituem processos que afetam a estabilidade e a estrutura de proteínas, sendo importantes mecanismos envolvidos durante a diferenciação das células-tronco (SHUR *et al.*, 2007).

Os estudos têm apresentado evidências da capacidade de diferenciação das células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo (ADSCs) (Figura 2). A maior parte apresenta a diferenciação destas células em linhagens celulares de tecido adiposo, de tecido ósseo e cartilaginoso (STREM *et al.*, 2005). Sob condições específicas de cultivo, as ADSCs murinas e humanas foram induzidas à neurogênese e apresentaram fenótipo de diferenciação neuronal, indicando que o tecido adiposo representa uma fonte alternativa de células com capacidade de diferenciação para a sua utilização no tratamento de doenças de ordem neurológicas (SAFFORD *et al.*, 2002). Woodbury *et al.* (2000) utilizando um meio pré-indutor, contendo 20% de SFB e 1 mM de β -mercaptoetanol e meio indutor neuronal contendo (2%) dimetilsulfóxido (DMSO) e 200 μ M de hidroxianisola

butilada (*butylated hydroxyanisole* ou BHA) em culturas de células derivadas da medula óssea, verificaram que 80% de células expressam marcadores neuronais tais como: NSE, NeuN, neurofilamento-M e tau. As ADSCs induzidas com insulina, indometacina e BHA mostraram um aumento na expressão de NSE, vimentina, trk-A and NeuN (ASHJIAN *et al.*, 2003) (Apêndice 1). Em adição, Dicker *et al.* (2005) comprovaram que as ADSCs podem se diferenciar em adipócitos funcionais e possuem fenótipo similar aos das células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea.

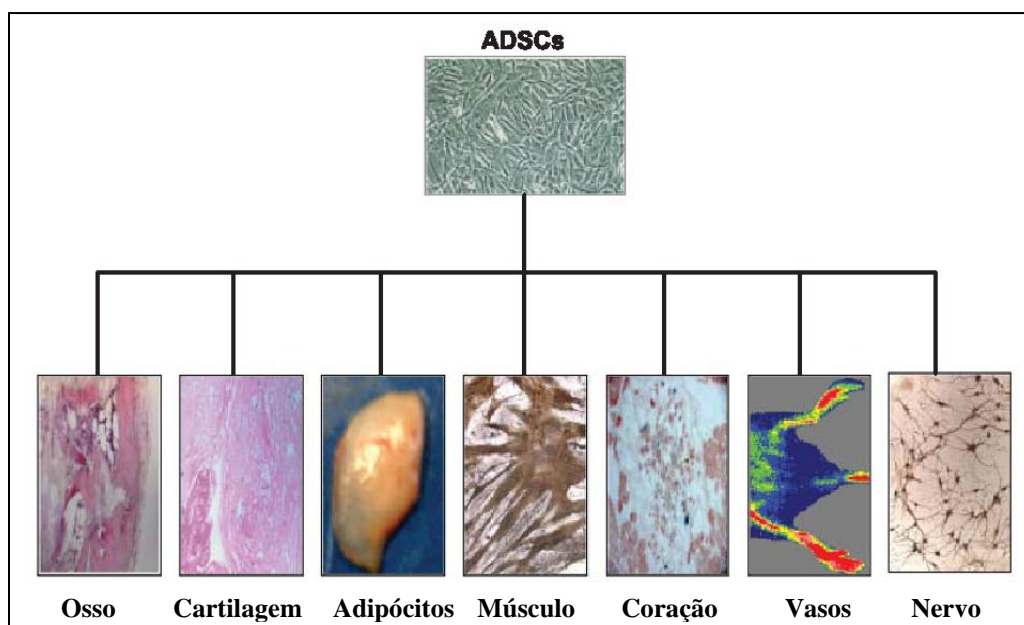


Figura 1. As ADSCs são multipotentes, apresentando a capacidade de diferenciação para tecidos de linhagens mesodérmica e não-mesodérmica. (Adaptada de STREM *et al.*, 2005).

1.4 Diferenciação em tecido ósseo

Durante a vida, o esqueleto é sujeito a constante remodelação para manter suas propriedades inalteradas. O processo de renovação do esqueleto,

como a remodelação e a cicatrização, é dependente da habilidade de promover a diferenciação de células precursoras (células mesenquimais) em osteoblastos funcionais (MURAGLIA *et al.*, 2000).

O tecido ósseo é um tipo de tecido conjuntivo rígido e inflexível onde a matriz extracelular foi impregnada com sais de cálcio e fosfato em um processo chamado de mineralização (KIERSZENBAUM, 2004). A matriz óssea consiste de componentes orgânicos (35%) e inorgânicos (65%). A matriz orgânica contém fibras colágenas do tipo I (90%), proteoglicanos e proteínas não colagenosas. Dentre as proteínas não colagenosas estão a osteocalcina, osteopontina e osteonectina. Estas proteínas são sintetizadas pelos osteoblastos e possuem função relacionada a mineralização óssea. A síntese da osteocalcina e da osteopontina em células precursoras aumenta após a estimulação com 1α , 25-dihidroxicolecalciferol, um metabólito da vitamina D. O componente inorgânico do tecido ósseo é representado por depósitos de fosfato de cálcio com características cristalinas da hidroxiapatita. Os cristais estão distribuídos ao longo do comprimento das fibras colágenas através de um processo associativo com a participação de proteínas não colagenosas (KIERSZENBAUM, 2004).

Os osteoblastos são as células precursoras dos osteócitos, o componente celular mais abundante no tecido ósseo. O caminho da diferenciação osteoblástica é modulado por: (i) interações entre células progenitoras (osteoprogenitoras), (ii) interações com as células vizinhas, (iii) interações com a matriz envolvida e (iv) uma ampla extensão de fatores solúveis, incluindo o de crescimento e transformação- β (TGF- β), o fator de crescimento semelhante à insulina I (IGF-I), o semelhante à insulina II (IGF-II), várias interleucinas, ácido

retinóico, glucocorticóides, estrógeno, hormônios da paratireóide, vitamina D e tiroxina. Vários membros da família das BMPs também são altamente efetivos nessa diferenciação (MUSCHLER & MIDURA, 2002).

Os osteoblastos estão envolvidos na mineralização da matriz óssea, eles sintetizam a parte orgânica da matriz (colágeno tipo I, proteoglicanas e glicoproteínas) e são capazes de concentrar fosfato de cálcio (FRANZ-ODENDAAL *et al.*, 2006).

Na fase final da formação óssea, os osteoblastos podem apresentar destinos diferentes: eles podem ser aprisionados pela matriz recém sintetizada, tornando-se um osteócito, sofrer apoptose ou ficar em um estado inativo. Quanto à morfologia, eles possuem prolongamentos citoplasmáticos que se prendem aos dos osteoblastos vizinhos (FRANZ-ODENDAAL *et al.*, 2006).

Na medicina ortopédica existem diversos exemplos de como as células-tronco mesenquimais podem ser utilizadas para a regeneração de ossos e cartilagens. Estes exemplos incluem a regeneração da coluna vertebral (MUSCHLER *et al.*, 2003), a reparação de ossos (QUARTO *et al.*, 2001) e defeitos cranianos (KREBSBACH *et al.*, 1998), assim como a reparação de defeitos em cartilagens (PONTICIELLO *et al.*, 2000; SOLCHAGA *et al.*, 2002) e tendões (YOUNG *et al.*, 1998). Neste caso, o processo de osteoindução (processo que sustenta a mitogênese de células progenitoras) é influenciado por vários fatores e consiste na indução de células-tronco indiferenciadas a formarem células osteoprogenitoras (EINHOM, 1995).

Os estudos biomecânicos realizados em células troncos mesenquimais derivadas de medula óssea caracterizaram processos biofísicos e bioquímicos

responsáveis pela diferenciação osteoblástica (TITUSHKIN *et al.*, 2006). Conforme estudos com microscopia confocal, não foram encontradas diferenças na estrutura de microtúbulos entre células indiferenciadas e osteoblastos, porém, ocorreram modificações na organização dos feixes de actina. As células tronco mesenquimais apresentaram feixes mais espessos estendendo-se pelo citoplasma e os osteoblastos feixes mais finos e condensados. A presença destes feixes mais espessos permanece após 10 dias de osteodiferenciação onde, aparentemente, as células já estão comprometidas osteogenicamente, mas não completamente diferenciadas (TITUSHKIN *et al.*, 2007).

1.5 Proteínas Morfogenéticas Ósseas – *bone morphogenetic proteins* (BMPs)

As proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs – *bone morphogenetic proteins*) são fatores de crescimento com papel específico na proliferação, na diferenciação de células mesenquimais (CHENG *et al.*, 2003, OTTO & RAO, 2004;) e são importantes durante o desenvolvimento embrionário. São membros da superfamília de polipeptídeos TGF- β e possuem uma região carboxi-terminal, contendo repetições de cisteínas (CELESTE, 1990). Já foram identificados mais de 15 tipos de BMPs e somente a BMP-1 não integra a superfamília de genes TGF- β (SOLHEIM *et al.*, 1998).

As BMPs desempenham um importante papel na fisiologia óssea e estão envolvidas em muitos processos ósseos como a formação óssea, indução,

crescimento, regeneração e cicatrização. As BMPs-2,-4,-6 exercem alto potencial osteoindutivo, influenciando a odontogênese, regeneração e cicatrização óssea (ZHOU *et al.*,1993). A partir da análise da expressão dos genes das BMPs no esqueleto humano evidenciou uma maior expressão de BMP-4 em osso tabecular, na epífise dos ossos longos e mandíbula, e a expressão dessa proteína foi maior do que a BMP-2 em todas as amostras (KOCHANOWSKA *et al.* ,2007). A BMP-2B, também chamada de BMP-4, tem a capacidade de induzir a formação óssea *in vivo*, estimular a proliferação e a atividade da fosfatase alcalina, além de sintetizar colágeno tipo I em células semelhantes a osteoblastos. A BMP-2 e a BMP-4 são altamente similares estruturalmente, apresentando 92% de homologia na seqüência de aminoácidos (ZHOU *et al.*,1993; ten DIJKE *et al.*, 1994).

A diferenciação osteoblástica e a formação óssea são reguladas por muitos fatores locais. Dentre eles, as BMPs são potentes fatores envolvidos neste processo (YAMAGUCHI *et al.*, 2000).

Dentre inúmeras BMPs já descritas, a BMP-4 está envolvida nos estágios iniciais da osteogênese (CHENG *et al.*, 2003). Suzawa *et al.* (2007) demonstraram que a matriz extracelular associada a BMPs é essencial para a diferenciação de células osteoblásticas murinas *in vitro*. Verificaram também que células MC3T3-E1 (células da calvária de feto de camundongos) acumularam BMPs na matriz extracelular rica em colágeno e esta associação estimulou a diferenciação de células mesenquimais. Os clones de células cultivadas com matriz extracelular e BMPs expressando receptor dominante negativo para BMP-2 e BMP-4 falharam em expressar fenótipos osteoblásticos e apresentaram baixa atividade da fosfatase alcalina (ALP), demonstrando assim que os sinais gerados pelos

receptores mais os ligantes BMP2-/4 são essenciais para a diferenciação destas células (SUZAWA *et al.*, 2007).

O uso da BMP-4 como agente indutor segue também uma linha de investigação no nosso grupo de pesquisa com culturas, *in vitro*, de células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea, realizados por LORO (2002), SILVA JUNIOR (2002), SILVA (2004) e PARIS (2004).

1.6 Marcadores da Osteogênese

Assim que os pré-osteoblastos são formados, eles alinham-se em áreas de reabsorção prévias ou rearranjam-se em um padrão que facilite a mineralização. Uma vez posicionados eles podem se dividir, secretar colágeno do tipo I e osteonectina e sintetizar fosfatase alcalina, PTH1R (receptor hormônio paratireóide) e α e β integrinas. A fosfatase alcalina é uma proteína de membrana ligada a GPI que gera Pi para o transporte interno, este forma um complexo com íons de Ca^{+2} para formar cristais de fosfato de cálcio na forma de hidroxiapatita (BRANDAO-BURCH *et al.*, 2005).

Após a síntese de Pi extracelular e colágeno, os pré-osteoblastos transformam-se em osteoblastos. Estas células são caracterizadas pela expressão de colágeno tipo I, BSP-1 (*bone sialoprotein -1*), osteopontina, fosfatase alcalina, PTH1R e osteocalcina. A BSP-1 é uma glicoproteína sulfatada que demonstra uma grande afinidade por hidroxiapatita e representa 10% de proteínas não colágenas no tecido ósseo. A osteocalcina (*bone Gla protein-BGLAP*), também conhecida como ácido gama carboxi-glutâmico, é uma proteína

de ligação com cálcio dependente de vitamina K. Quimicamente, apresenta peso molecular de 6 kDa e 49 aminoácidos. Ela tem em sua conformação três ácidos gama carboxi (GLA) nas posições 17, 21 e 24 que são conhecidos como mediadores fortes da ligação com hidroxiapatita, fosfato de cálcio. Essa proteína é produzida exclusivamente pelos osteoblastos durante o processo de síntese da matriz óssea, representando 20% das proteínas de matriz não colagenosa (PRICE *et al.*, 1976).

A osteopontina (SPP1) é uma glicoproteína fosforilada e esta envolvida na regulação da mineralização da matriz óssea. O nível de expressão do receptor desta proteína aumenta em resposta a vitamina D e níveis elevados de fosfato. É sugerido que sítios da osteopontina interagem com a osteocalcina, e esta, por fim, expõem domínios da osteopontina que suportam a nucleação e crescimento da hidroxiapatita (GERICKE *et al.*, 2005).

Beck e colaboradores sugerem que a expressão da osteopontina é regulada fortemente em resposta aos níveis elevados de fosfato extracelular e vários outros fatores, não apenas o ácido ascórbico, estimulam a expressão dos transcritos para a osteopontina, como por exemplo, o TGF- β , ácido retinóico, endotelinas, BMPs e vitamina D (BECK *et al.*, 2000).

Osteocalcina e osteopontina são conhecidos marcadores para a diferenciação em osteoblastos e na literatura encontram-se diversos estudos que utilizam estes marcadores, entre outros, para confirmar a osteogênese (ZUK *et al.*, 2002; ZHOU *et al.*, 2006).

1.7 Células-tronco e mecanismos de reparação.

Apesar da crescente aplicabilidade das células-tronco adultas na medicina regenerativa, ainda existem muitas questões em relação ao tempo de vida das células-tronco mesenquimais e por quanto tempo estas mantêm sua funcionalidade e sua estabilidade genética. Nos tecidos adultos, as células somáticas mantêm um balanço entre proliferação e apoptose. As células-tronco têm um papel fundamental na manutenção e reparo tecidual. Sua longevidade é dependente de um controle da expressão gênica, proliferação, ciclo celular e sinais de diferenciação. Em contrapartida, as anormalidades genéticas associadas com a idade, sugerem que a falta de reparação do DNA pode contribuir para o processo de envelhecimento (PARK & GERSON, 2005).

A reparação do DNA mantém a estabilidade genética e a falta deste mecanismo resulta na instabilidade genética e pode levar a um declínio da função celular. As células-tronco adultas são extremamente importantes na manutenção dos tecidos ao longo da vida. Sendo assim, devem ter o tempo de vida semelhante ao do organismo em que residem (VAN ZANT & LIANG, 2003). Elas regeneram e renovam os tecidos em resposta à danos e substituem as células diferenciadas que já exerceram sua função. Devido ao longo tempo de exposição à agentes causadores de danos ao DNA, as células-tronco necessitam de um mecanismo de reparação apurado, para assegurar a fidelidade à progênie (KENYON & GERSON, 2007).

1.8 A proteína MCM2 (*minichromosome maintenance 2*).

O complexo MCM é formado por seis proteínas relacionadas (MCM 2-7) que possuem um papel essencial na divisão celular de organismos eucarióticos. Juntamente com o complexo de reconhecimento de origem de replicação e proteínas CDC6, os seis membros da família MCM são necessários para o início da replicação de DNA e prevenção de ciclos adicionais de síntese do material genético durante a fase S. Este grupo de proteínas faz parte do complexo pré-replicativo, na origem de replicação e permite a “licença” para a utilização desta origem, possibilitando que a célula entre na fase S subsequente e estando também envolvido em mecanismos de reparação por recombinação homóloga (RITZI & KNIPPERS, 2000; BAILIS & FORSBURG, 2004).

As proteínas MCMs são marcadores biológicos de displasia e malignidade, onde a sua expressão em tecidos normais é restrita a compartimentos proliferativos (FREEMAN *et al.*, 1999). A proteína MCM2 também tem demonstrado ser um marcador de células proliferativas. Em megacariócitos, a expressão de MCM2 é maior do que a expressão do marcador proliferativo Ki-67 (LAMPERT *et al.*, 2005). Em câncer renal, a MCM2 tem utilidade clínica como marcador prognóstico (RODINS *et al.*, 2002). Um estudo realizado para verificar a expressão de MCM2 em câncer coloretal encontrou correlação entre esta expressão e a presença de metástases em linfonodos (GUZIŃSKA-USTYMOWICZ *et al.*, 2008).

As MCMs também são consideradas fortes candidatas para regulação do ciclo celular pelo mecanismo de “checkpoints”; estes utilizam vias de sinalização

para regular a replicação do DNA e manter a estabilidade genética. A MCM-2 também é fosforilada pela ATR (*Ataxia telangiectasia and Rad3 related*- sensor que detecta danos ao DNA), em resposta a múltiplas formas de danos no DNA e paradas na forquilha de replicação (CORTEZ *et al.*, 2004).

Objetivos

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a capacidade de diferenciação das células tronco mesenquimais humanas derivadas do tecido adiposo, utilizando hBMP-4 e meio osteogênico, contendo dexametasona, ácido ascórbico e β -glicerolfosfato como osteoindutor.

2.2 Objetivos específicos

- Padronização da extração e de cultura “in vitro” das células mesenquimais humanas derivadas do tecido adiposo.
- Imunofenotipagem dos marcadores CD34/117 e CD45/105 por citometria de fluxo da população de células extraídas do tecido adiposo.
- Verificar a capacidade de diferenciação em tecido ósseo das ADSCs, pela técnica de RT-PCR e real time RT-PCR , empregando os marcadores da linhagem osteogênica, osteopontina e osteocalcina.
- Verificar a capacidade de diferenciação pelas colorações com alizarina, von Kossa e fosfatase alcalina.

Capítulo 1

Molecular and cytochemistry analyses of genes and proteins related to osteodifferentiation in human adipose-derived stem cells.

(Em preparação)

Molecular and cytochemistry analyses of genes and proteins related to osteodifferentiation in human adipose-derived stem cells

Aline F. Zandonai^{1,2}, Mariana A. Lemos², Ana Paula F. Lambert^{1,2}, João Á. S. Silva², Christian Viezzer², Cassiana Viau¹, Diego Bonatto³, Denise Cantarelli Machado², João Antonio Pêgas Henriques^{1,*}

¹Laboratório de Radiobiologia Molecular-Centro de Biotecnologia do Estado do Rio Grande do Sul, Universidade Federal do Rio Grande do Sul-UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil.

²Laboratório de Biologia Celular e Doenças Respiratórias - Instituto de Pesquisas Biomédicas, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul- IPB - PUCRS - Porto Alegre, RS, Brazil.

³Laboratório de Genética Toxicológica - Instituto de Biotecnologia - Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade de Caxias do Sul-UCS, Caxias do Sul, RS, Brazil.

Short title: Osteodifferentiation in adipose-derived stem cells.

***Address to which correspondence should be sent:**

Dr. João Antonio Pêgas Henriques

Departamento de Biofísica/Centro de Biotecnologia, UFRGS.

Av. Bento Gonçalves 9500, Porto Alegre, RS, Brazil, 91507-970.

Telephone: 55-51-3308-7602; Fax: 55-51-3308-6084.

E-mail: pegas@cbiot.ufrgs.br

ABSTRACT

The discovery of adult stem cells is a promise field in regenerative medicine and tissue engineering. There are many sources of adult stem cells among which of whom are the skin, muscle and bone marrow. Currently, the adipose tissue has been an alternative source of mesenchymal stem cells (MSCs), termed human adipose-derived stem cells (hADSCs). The hADSCs are the most plastic adult stem cells known until now and are easily isolated by adherence in plastic substrates. Under specific conditions of culture hADSCs can be differentiated into osteoblast cell precursors. Among proteins needed for hADSCs differentiation, the role of minichromosome maintenance (MCM) complex remains poorly understood. The protein complex MCM2-7 is part of DNA pre-replicative complex (pre-RC), being abundant in proliferating cells and involved in DNA repair mechanisms. In this sense, the Mcm2 is essential for the activity of the MCM complex. Thus, we analysed MCM2 gene expression changes during osteoinduction by culturing hADSCs in different media containing BMP-4 or in osteogenic medium. Genes related to osteoinduction, like osteocalcin (OC), osteopontin (OP) and alkaline phosphatase (ALP) were analysed by molecular and cytochemistry approaches during osteodifferentiation. Interestingly, we observed a decrease in the MCM2 gene level osteoinduction of hADSCs in osteogenic medium, which could be related to an increase in genome damage and senescence in hADSCs.

KEYWORDS: adipose-derived stem cells (hADSCs), complex MCM2-7, osteogenic differentiation.

1 INTRODUCTION

Stem cells present self-renewal capacity, long-term viability, and multilineage potential population. Adult mesenchymal stem cells (MSCs) have been proposed as an alternative source for embryonic stem cells, showing many advantages when compared with the latter group of stem cells.

MSCs express a large number of adhesion molecules, extracellular matrix proteins, cytokines and growth factor receptors, associated with their function and cell interactions (De Ugarte *et al.*, 2003; Zuk *et al.*, 2002). The challenges presented by the use of MSCs in tissue regeneration and healing require the exploration of new cell sources for successful clinical applications for tissue engineering (Hong *et al.*, 2007). Originally identified as a source of osteoprogenitor cells, the MSCs from bone marrow stroma (BMSCs) can differentiate into adipocytes, chondrocytes, osteoblasts, and myoblasts *in vitro* (Pittenger *et al.*, 1999; Jorgensen *et al.*, 2004). On the other hand, recent studies suggest that human adipose tissue contains MSCs similar to BMSCs. Adipose tissue, similarly to bone marrow, is derived from embryonic mesenchyma and contains a stroma from which the human adipose-derived stem cells (hADSCs) are easily isolated (Zuk *et al.*, 2001). In addition, hADSCs can be obtained with relatively lower donor morbidity, and are easy to expand in large quantities *in vitro* when compared with hBMSCs (Zuk *et al.*, 2002). Because of their abundance and accessibility, hADSCs might be a novel and promising source for bone repair and regeneration by cell therapy (Quarto *et al.*, 2001).

The ability of hADSCs to give rise to osteoblasts has been investigated by several groups. It has been reported that hADSCs are capable to differentiate into osteoblasts *in vitro*, and under osteogenic conditions can express genes and proteins associated with

osteogenic phenotype, including osteocalcin, osteopontin, alkaline phosphatase and bone related genes, e.g, bone morphogenetic proteins (BMPs) (Mizuno *et al.*, 2003; Zuk *et al.*, 2002; Im *et al.*, 2005). BMPs are members of the TGF- β superfamily and multiple BMPs have been described (Celeste *et al.*, 1990; Solheim *et al.*, 1998). BMPs are known for their role in embryonic development and differentiation. In this sense, cells of the osteoblastic lineage express BMP-2, -4, and -6, mediate the effects of glucocorticoids on osteoblastic cell differentiation (Gazzerro *et al.*, 1998; Ghosh-Choudhury *et al.*, 1994). These findings suggested a role for BMPs as local regulators of osteoblastic differentiation and function. In addition, several BMPs are potent inducers of osteogenesis in both mouse and rat BMSCs (Rickard *et al.*, 1994; Balk *et al.*, 1997). On other hand, osteogenic activation *in vitro* requires the presence of β -glycerol-phosphate, ascorbic acid-2-phosphate, dexamethasone and fetal bovine serum (Zhou *et al.*, 2006). When hADSCs are cultured in monolayers and in the presence of these supplements, the cells acquire an osteoblastic morphology with upregulation of alkaline phosphatase (ALP) activity and deposition of a calcium-rich mineralized extracellular matrix (Frank *et al.*, 2002).

The minichromosome maintenance (MCM) proteins are a conserved set of six related proteins that are essential for replication initiation and elongation in eukaryotic cells (Labib *et al.*, 2000; Bailis and Forsburg, 2004). A subcomplex of three human MCM proteins, MCM4, -6, and -7, has limited DNA helicase activity *in vitro* (Ishimi, 1997; You *et al.*, 2002), and an archaeal protein related to the MCM2-7 family also functions as a DNA helicase (Chong *et al.*, 2000), suggesting that MCM proteins may be required for strand unwinding during the initiation step of chromosome replication. The protein MCM2 is a specific marker of cell proliferation abundant in proliferating cells (Rodins *et al.*, 2002; Lampert *et al.*, 2005).

To confirm whether hADSCs cells represent a stem cell population and may differentiate in osteogenic lineage, we conducted a molecular and histological characterization of the osteogenesis markers like osteocalcin (OC), osteopontin (OP) and ALP in hADSCs cultured in the presence of BMP-4 and osteogenic medium (OM). In addition, we analysed the expression of MCM-2 protein during differentiation process.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 Techniques for hADSCs isolation and culture.

Human adipose tissue was obtained with informed consent from five healthy patients who performed liposuction surgery for esthetic reasons in the Hospital São Lucas of PUCRS (Porto Alegre, RS – Brazil) as approved by the Ethics Committee of this University. No diabetes, hepatitis, metabolic diseases or other systemic complications were reported by these donors.

Isolation and culturing of hADSCs was performed as described by Zuk *et al.*, (2001). Briefly, the liposuction tissue was digested with 0.015% type I collagenase and the stromal cell pellet was obtained by centrifugation. The stromal cells were collected again by centrifugation, then filtered through a 100 µm nylon mesh to remove cellular debris, and resuspended and plated in control medium (containing DMEM, 10% FBS, 1% streptomycin-penicillin and 0.1% gentamycin) in tissue culture flasks. The initial plating density was approximately 3.5×10^3 cells/cm². The primary cells were incubated overnight at 37° C in a humidified atmosphere containing 95% air and 5% CO₂. Following the initial incubation, the flasks were washed extensively with phosphate-buffered saline (PBS) to remove residual nonadherent red blood cells.

The stromal cells were then cultured for 7 to 10 days until they reached confluence. The cells were then harvested by digestion with 0.5 mmol/L EDTA/0.05% trypsin, centrifuged at 1500 rpm for 5 minutes, resuspended in DMEM supplemented with 10% FBS, 1% streptomycin-penicillin and 0.1% gentamycin, and plated at a density of approximately 1×10^4 cells/cm². The culture media was changed every 3 days. Cells were cultured to confluence before a second harvesting and replated as described above. Subculture of the cells was performed up to passage 2 and cells were used immediately for assays.

2.2 Flow cytometry analysis

Cells were detached with Trypsin/EDTA and counted with trypan blue in a hemocytometer. About 2×10^5 cells were divided into aliquots of 100 μ l. The cells were incubated on ice for 30 min, resuspended in 1 mL of phosphate-buffered saline (PBS) and pelleted by centrifugation for 5 min at 1500 rpm. Then, the cells were stained with fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated mouse anti-human CD34, CD45, and R-phycoerythrin (PE)-conjugated CD105, CD117 (FK Biotecnologia) in a concentration of 2 μ g/mL at 4° C for 30 min. As negative controls, the cells were also stained with FITC- or PE-labeled mouse anti-human IgG. The cells were pelleted, washed with 3 ml PBS, and fixed with 1% paraformaldehyde in PBS. After fixation, fluorescence-activated cell sorting (FACS) analysis was performed on a FACS Callibur cytometry (Becton Dickinson) using cell quest software.

2.3 Osteogenic induction

After primary culture in the control medium (DMEM, 10% FBS, 1% Streptomycin-Penicillin, 0.1% Gentamycin) and expansion for two or three passages, the cells were trypsinized and replated onto petry tissue culture plates at a density of 10^6 cells. Cells were incubated and then placed in osteogenic media containing BMP-4 (control media plus 40 ng/mL of BMP-4) or osteogenic media (OM; control media plus 10 mM β -glycerophosphate, 50 μ g/mL ascorbate-2-phosphate, 0.1 μ M dexamethasone). BMP-4 was added in the first and third day of induction. The OM was changed every 3 days. Expression of osteoblast-associated genes such as osteocalcin (OC), osteopontin (OP) and alkaline phosphatase (ALP) were performed by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (qRT-PCR) as described below.

2.4 RNA isolation and Quantitative RT-PCR analysis (qRT-PCR)

Non-induced and induced culture layers on 7, 14, and 21 days after osteogenic induction were rinsed with cold PBS and total RNA was isolated using TRIZOL (Invitrogen) according to the manufacturer's instruction. The concentration and integrity of RNA were estimated spectrophotometrically. Before reverse transcription (RT), RNA samples were digested with DNase I (Invitrogen) to remove contaminating genomic DNA. DNase I was dissolved in 10 \times reaction buffer and 1 U/ μ L of DNase I was added per 1 μ g of RNA and incubated for 30 min at 37 $^{\circ}$ C. DNase I activity was stopped after addition of 1 μ L of 25 mM EDTA and incubated at 65 $^{\circ}$ C for 10 min. Reverse transcription was performed by adding 2 μ g total RNA using M-MLV (PROMEGA, Madison, USA) in a reaction mixture containing 10 pmol/ μ L oligo(dT). qRT-PCR was performed using an ABI

Prism 7500 Sequence Detection System (SDS) (Applied Biosystems). The primers used in this investigation were purchased from Superarray (USA). Amplification was carried out with 20 ng of cDNA in 96-well plates using SYBR green master mix (Applied Biosystems) in 25 μ L. PCR condition were: 1 min at 94°C, followed by 40 cycles at 94°C for 30 s, 60°C for 30 s, 72°C for 30 s, and 60°C for 35 s. A final stage of 15 s at 95°C, 1 min at 60°C, and 15 s at 95°C was applied to determine dissociation curves of the amplified products. The results were analyzed using sequence detection system (SDS) software (Applied Biosystems). Generation of double-stranded DNA (dsDNA) was measured in real time by the increase in fluorescence caused by the spontaneous binding of SYBR green. For each measurement, a threshold cycle value (Ct) was determined. The mRNA level relative to that of β 2-microglobulin (B2M) was analyzed using the comparative critical threshold ($\Delta\Delta$ Ct) method. The relative expression was calculated using the $2^{-\Delta\Delta$ Ct} method as previously described (Livak and Schmittgen, 2001). For statistical analysis were used ANOVA TEST and one way analysis of variance followed by Benferroni's multiple comparison test.

2.5 Semi-quantitative RT-PCR

For RT-PCR analysis of mRNA expression, total RNA (in 20 μ L reaction volume) was reverse-transcribed using reverse transcriptase (enzyme Superscript II, Invitrogen) and Oligo-dT₁₈ (Invitrogen) primers in a standard reaction. The resultant cDNA (1 μ L) was then used as template for PCR amplification (in 25 μ L reaction volume) of β -actin, OP, OC and ALP. PCR were performed at 94°C for 5 min, 35 cycles at 94°C for 30 s, 55°C for 45 s, 72°C for 60 s, and 72°C for 10 min.

2.6 Cytochemistry and staining procedures

To visualize calcium mineralization, cells were first fixed in a 3.7% formaldehyde solution, rinsed with distilled water, and stained with Alizarin Red S for 20 min at room temperature followed by differential interference contrast analysis. For von Kossa staining, the cells were incubated in OM for 3 weeks and fixed with 4% paraformaldehyde for 60 min at room temperature. The cells were rinsed with distilled water and then overlaid with a 1% (wt/vol) silver nitrate solution in the absence of light for 30 min. The cells were washed several times with distilled water and developed under UV light for 60 min. Finally; the excess of silver nitrate was removed with 2% sodium thiosulfate. For ALP stain, the cultures were treated at 21 day time points. Cells in 6-well plates (in triplicates) were first incubated 1-2 h with 500 μ L of 0.2M borate buffer, naphthyl phosphate, Fast Blue RR, and magnesium sulphate. After the incubation the wells were washed with distilled water for 10 min. Finally, formaldehyde was added. Each well was carefully aspirated off with a micropipetter, and each culture received 1 mL of prepared working solution. The plates were protected from direct light at least for 2 hours. After this period, stain solution was discarded, wells were washed, and cultures were evaluated microscopically.

3 RESULTS

Paciente	n° céls.	CD34	CD117	CD34/117	CD45	CD105	CD45/105
I	$1,2 \cdot 10^7$	0,09	1,15	6,91	1,48	1,96	3,03
II	$1,4 \cdot 10^7$	1,48	0,68	3,47	1,79	2,17	6,27
III	$1,0 \cdot 10^7$	0,01	0,96	4,60	0,16	1,54	2,11
IV	$1,0 \cdot 10^7$	0,63	0,33	5,27	0,24	0,57	4,50
V	$1,0 \cdot 10^7$	1,88	0,80	2,50	0,34	4,20	5,23

Table 1. Flow cytometry analysis

In cultures induced with BMP-4 we observed that osteocalcin (OC) was expressed in the early stages of osteoblastic differentiation, and was present since the seventh day after BMP-4 induction only by cells obtained from patient 1; however ALP was not expressed in these cells. In cell culture of patient 2, OC was expressed in induced and non induced cells at twenty-first days. Cells from patient 3 when not induced by BMP-4 showed expression of OC, OP and ALP by the fourteenth day after induction (Table 2). Quantitative real-time PCR did not detect a significant increase in OC levels after 2 or 3 week of induction and no morphological changes were observed (data not shown).

		DONOR I			DONOR II			DONOR III		
	DIAS	ALP	OC	OP	ALP	OC	OP	ALP	OC	OP
INDUCED CELLS	7 ⁰	-	+	-	-	-	-	-	-	+
	14 ⁰	-	+	+	+	-	+	+	+	-
	21 ⁰	-	-	+	-	+	+	-	-	+
NON-INDUCED CELLS	7 ⁰	-			-	-	-	-		
	14 ⁰	-	-	+	+	-	+	+	+	+
	21 ⁰	+			-	+	-	-		

Table 2. RT-PCR of osteogenesis-related genes.

Induced cells: with BMP-4, non-induced cells: without BMP-4 ALP: alkaline phosphatase; OC: osteocalcin; OP: osteopontin; (+): positive; (-): negative.

3.1 Cytochemistry and staining procedures with OM

To confirm osteogenic differentiation with OM, the extracellular matrix (ECM) was assessed in hADSCs cells using the von Kossa stain. After 2 weeks of culture with

OM, mineralization was barely detectable in hADSCs. After 3 weeks, mineralizing nodules were detectable in differentiated hADSCs. In cells cultured in the control medium no mineralizing nodules were detectable (Figure 1).

At the end of the first week, although the changes in cell shape became evident with differentiated hADSCs, extracellular matrix was not mineralized for all differentiated and control hADSC culture samples. No alizarin red (AR) staining was observed at this time in either experimental or control cultures. AR staining was positive at the third week of differentiated hADSCs in cultures containing OM, but not in control cells (Figure 2).

hADSCs cells cultured in OM formed an extensive network of dense, multilayered nodules that stained positively for ALP. The cells was stained positively for ALP activity after 21 days of culture in OM. The non-induced cells showed low expression of ALP (Figure 3).

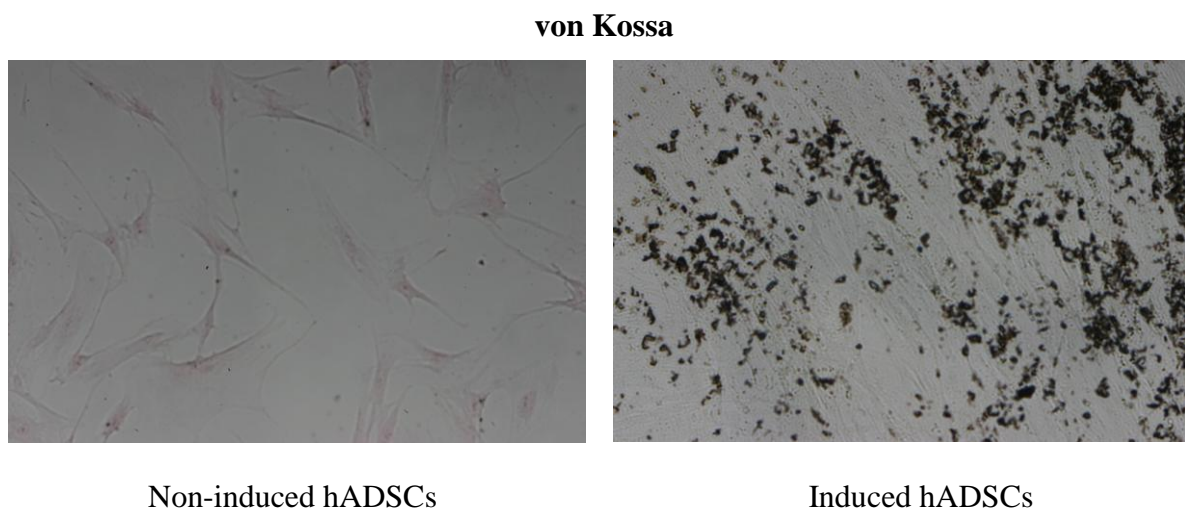


Figure 1 - von Kossa staining for induced human adipose tissue-derived stem cells (hADSCs). Right panel: Secretion of a extracellular matrix was observed as black nodules: hADSCs induced by OM for 21 days; the presence of a extracellular matrix (black regions) was examined at 3 weeks (von Kossa). Left panel: Undifferentiated (non induced) hADSCs cells maintained in control medium were examined for matrix calcification as a negative control (20x).

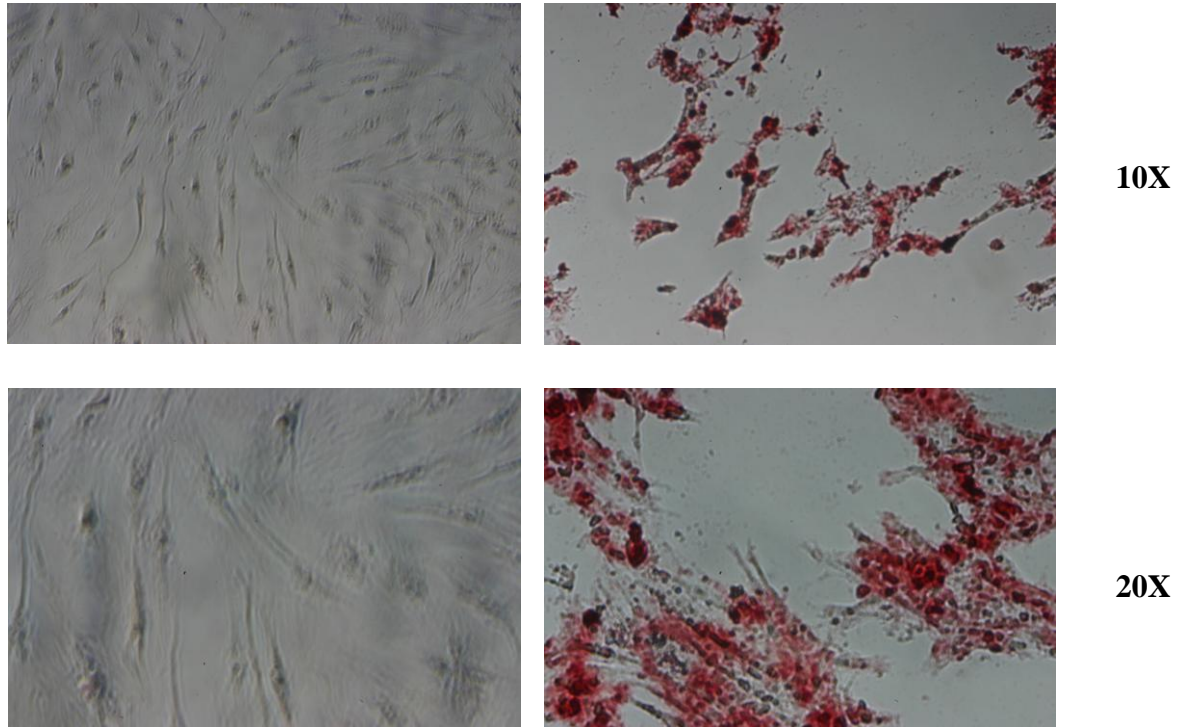


Figure 2 - Alizarin red staining for induced human adipose tissue-derived stromal cells (hADSCs) confirmed osteogenesis with red nodules, which indicates the presence of calcified extracellular matrix (ECM). The cells stained positively for AR after 21 days of culture in osteogenic media. Left panel: non- induced hADSCs; right panel: induced cells.

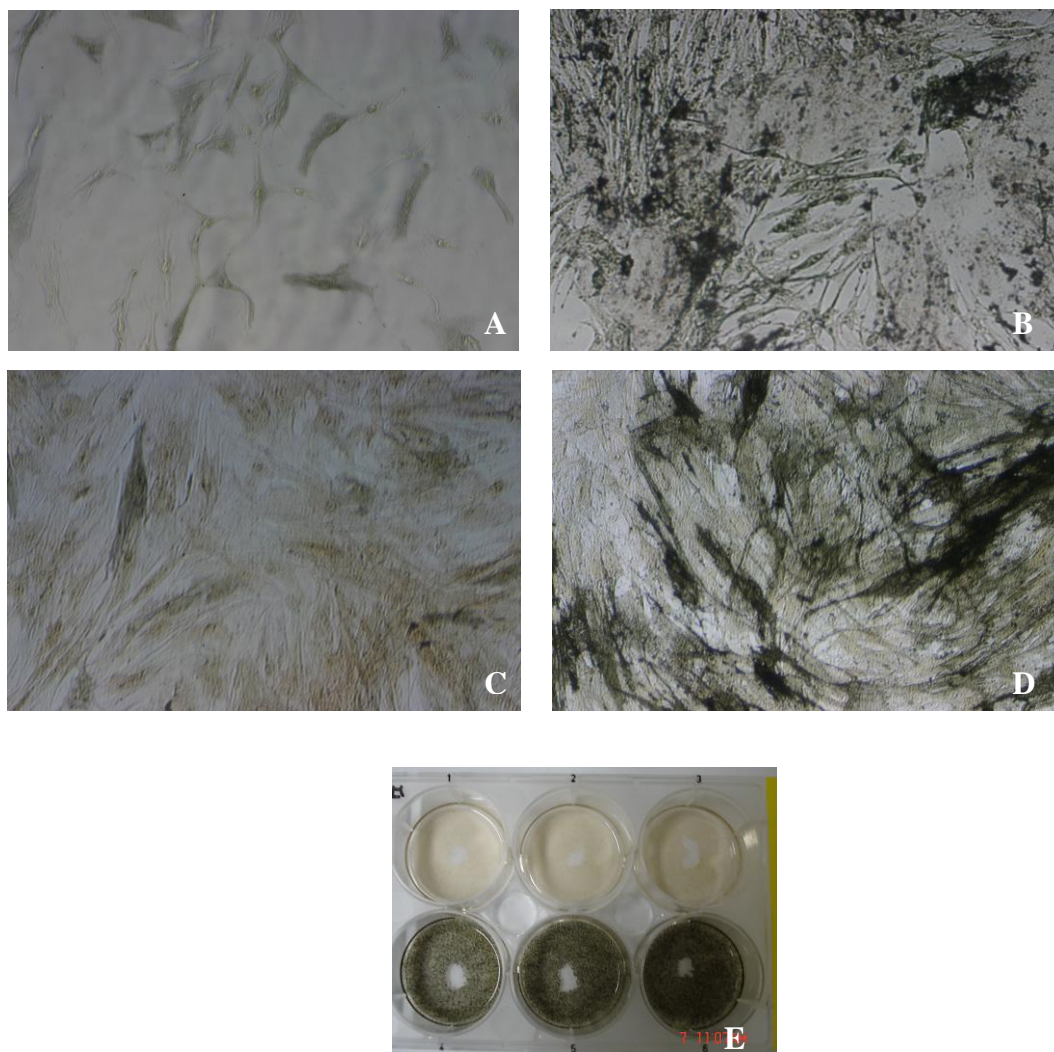


Figure 3 – Alkaline phosphatase (ALP) staining for non induced and induced human adipose tissue-derived stem cells (hADSCs). Osteogenesis was confirmed with ALP staining. The cells stained positively for ALP activity after 21 days of culture in osteogenic medium (OM). (A and C) hADSCs non-induced. (B and D) hADSCs induced. (E) Macroscopic appearance of ALP staining. Left panel: non- induced hADSCs; right panel: induced cells.

3.2 Osteogenic induction with OM

The osteodifferentiation from OM cultures were verified using qRT-PCR and histological analyses. Representative genes involved into bone development/differentiation (OC and OP) and MCM complex (MCM2) were selected from our analysis. We evaluated mRNA gene expression between undifferentiated/differentiated cells in comparison with a

housekeeping gene (B2M). As shown in **Figure 4 and 5**, an increase (3-fold) in the OP gene level was found in response to incubation of hADSCs in OM (**Figure 5**). The OC expression had a major relative expression on 7 day of induction with decrease of expression on 14 and 21 pos-induction days in patient IV (**Figure 4A**). In patient V there was decreasing in osteocalcin expression on seven day and increasing on 14 e 21 days (**Figure 4B**).

When the protein Mcm2 was analyzed in order to check induction of cellular differentiation, we observed a increase at 7 days pos-induction compared to the non-induced cells and a decrease in days 14 and 21 pos-induction (with $p < 0.01$ on 21 day; **Figure 6**).

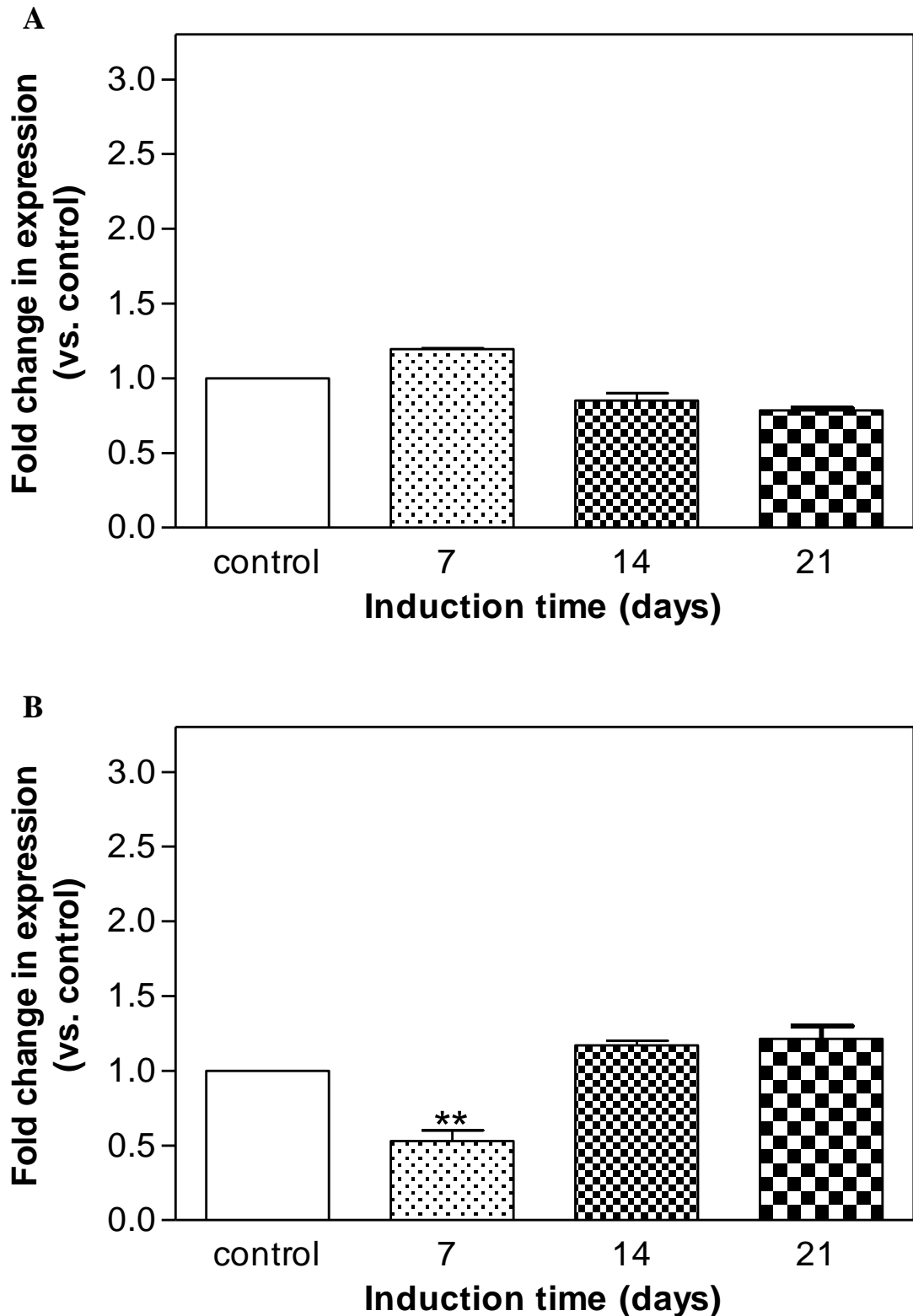


Figure 4 - Expression of osteocalcin gene was quantified by qRT-PCR in hADSCs induced in control medium and OM for up to 3 weeks in patient IV (A) and patient V (B). Gene expression levels were normalized with respect to endogenous B2M and expressed relative to non-induced control levels (** $p < 0.01$).

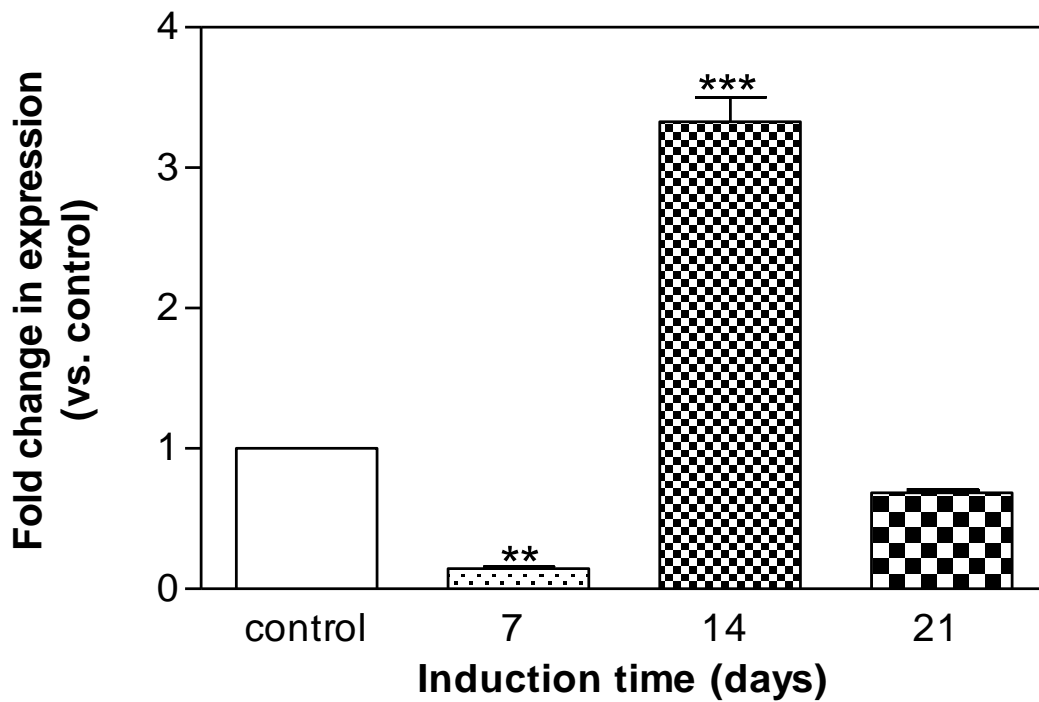


Figure 5 - Expression of the osteopontin gene was quantified by qRT-PCR hADSCs induced in control medium and osteogenic medium (OM) for up to 3 week in the patient IV. Gene expression levels were normalized with respect to endogenous B2M and expressed relative to non-induced control levels.

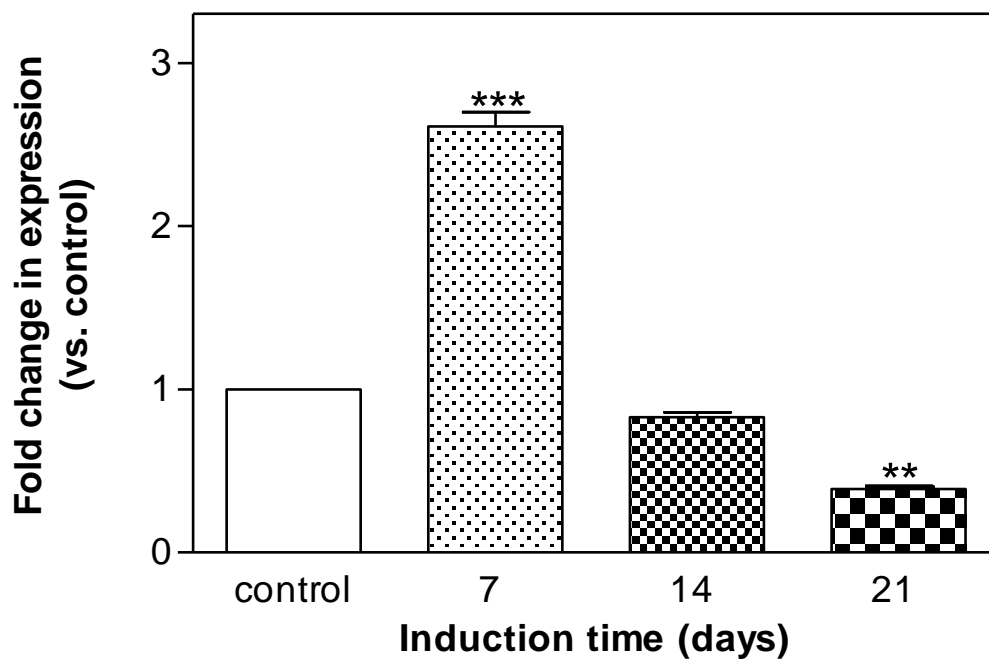


Figure 6 - Expression of the MCM2 gene was quantified by qRT-PCR hADSCs induced in control medium and osteogenic medium (OM) for up to 3 week in the patient IV. Gene expression levels were normalized with respect to endogenous B2M and expressed relative to non-induced control levels. (** p< 0, 01; ***p<0,001).

4 DISCUSSION

Mesenchymal stem cells (MSCs) have been described as multipotent cells that can replicate as undifferentiated cells and also have the ability to differentiate into cells of mesenchymal lineage like bone, cartilage, fat and muscle (Pittenger *et al.*, 1999; BIEBACK *et al.*, 2004). This differentiation is directly related to intrinsic and extrinsic signals according to the "niche" in which they are, and it will define the cellular phenotype (Caplan, 1991; Pittenger *et al.*, 1999).

The undifferentiated mesenchymal cells have the ability to promote tissue renewal, as well as for the replacement of osteoblasts in bone renewal and fractures healing after trauma or disease. Therefore, the possibility of manipulation and new bone tissue formation is only achievable due to the presence of stem cells that are stored and dispersed in various tissues (such as skeletal, muscle, and subcutaneous fat). Because of some stimulus, these stem cells begin to differentiate in a particular cell line, even in adults with different ages (Turgerman *et al.*, 2001).

The morphological appearance of adult stem cells, after culture, was similar to that with growth in broth suspension ("rounded", spherical morphology). However, after the second day, these cultures began to present cells growing attached. This adhesion property is characteristic of the mesenchymal cells lineage, unlike the hematopoietic lineage cell population which characteristically grow in suspension cultures (Aubin, 1999; Petite *et al.*, 2000).

The lack of universal standards and common criteria for the MSCS isolation has hampered the studies on the use of these cells. In this sense, there was not a consensus regarding the molecular markers that should be used in order to control cell preparation and quality. The International Society for Cellular Therapy (Wolfgang and Ho, 2007) proposed that the mesenchymal stem cell should express CD105, CD73 and CD90, and should not contain hematopoietic markers such as CD45, CD34, CD14 or CD11b (Strem *et al.*, 2005; Dominici *et al.*, 2006; Wolfgang and Ho, 2007).

The results obtained in this study about the markers expressed on the surface of hADSCs are in agreement with the markers defined before for MSCs, where it was observed frequent CD105 expression, indicating the presence of MSCs, (Zuk *et al.*, 2001; Dominici *et al.*, 2006; de Girolamo *et al.*, 2007).

Bone tissue growth and maintenance is a complex process, influenced by systemic hormones and growth factors. The bone tissue contains a great variety of growth factors, including bone morphogenetic proteins (BMPs). These proteins are produced by osteoblast that, through a cascade of events, leads to proliferation of undifferentiated mesenchymal stem cells until bone formation (Zhou *et al.*, 1993; Chen *et al.*, 1997; Solheim, 1998).

The BMP-4 protein is able to induce primitive cells to form *in vitro* and *in vivo* bone by acting primarily in the early stages of osteogenic differentiation (LI G, 1998). Therefore, the genes involved in bone development/differentiation were verified by osteocalcin, a specific marker for osteogenesis.

The alkaline phosphatase activity in osteoblastic cell line is increased during pre-osteoblast differentiation into osteoblast nearly final stages of proliferation and during the extracellular matrix deposition and maturation (Davies, 1999; Beck *et al.*, 2000). For this reason, the expression of this protein is frequently used as osteoblast marker (Davies,

1999). The osteopontin is expressed in cells from various tissues including bone, dentin, hypertrophic cartilage, kidney, brain, vascular and other tissues. In bone, osteopontin is produced by osteoblastic cells in several stages and it has been suggested that its expression occurs in two peaks (Sodek, 2000). Therefore, this protein in stem cells from bone marrow is detectable at the early stages of differentiation during cell precursors proliferation such as pre-osteoblasts and in high levels in osteoblasts (Aubin, 1998).

The ALP, osteopontin and osteocalcin mRNA expression of adipose stem cell cultures induced or with BMP-4 was evaluated using the RT-PCR technique. In this study, we found alkaline phosphatase, osteocalcin and osteopontin expression in non-induced controls, in the cultures derived from all patients treated with BMP-4. In adipose tissue cells cultures from patient I, the expression occurred in the 14th and 21st day; in adipose tissue cells cultures from patient II, the osteopontin expression occurred in the 14th day and the osteocalcin expression occurred in the 21st day. In cell cultures from patient III, the ALP and osteocalcin expression occurred in the 14th. The ALP and osteopontin expression in non-induced controls can be justified by the fact that the osteopontin is a protein found in extracellular matrix of other tissues such as muscles, tumors and body fluids (Sodek *et al.*, 2000; Gericke *et al.*, 2005) and alkaline phosphatase has a high regulation in osteogenic tissues; alkaline phosphatase's expression has also been observed in other types of cells and tissues such as cartilage, kidney and liver (Mota *et al.*, 2008). In a study previously conducted by our group, the osteopontin was present in culture since the first days, although these cells have been derived from bone marrow, regardless of the presence or not of BMP-4 (Loro, 2002).

In contrast to the OC expression, our results are different from those from Zuk (2002) when compared to BMSCs controls, observed the OC expression was limited to

osteogenic induction, as no basal expression was seen in hADSCs cells maintained in non-inductive control medium, whereas low basal OC expression was detected in non-induced MSCs. For instance, in stem cell cultures from bone marrow, the osteocalcin is the last one to be expressed in mature osteoblasts and also undetectable in pre-osteoblasts but abundantly expressed in mature osteoblasts (Aubin, 1998; Beck *et al.*, 2000).

The OM culture is currently considered by many authors as the most efficient osteoinductive (Zuk *et al.*, 2001; Zuk *et al.*, 2002; Mizuno *et al.*, 2003, Im *et al.*, 2005; Hong *et al.*, 2007; Aksu *et al.*, 2008). Thus, the cell differentiation process is controlled by a cascade of molecular events involved in genetic programming and gene regulation through the action of a variety of hormones, cytokines and growth factors (Ducy and Karsenty, 1998). Glucocorticoids influence the osteogenic lineage cells proliferation and differentiation leading to change in the levels of growth factors and hormones that interfere in signaling pathways (Cooper, 1999). The ascorbic acid is necessary for the collagen matrix synthesis and its deposit (Xiao *et al.*, 1997; Davies, 1999). The β -glycerolphosphate promotes *in vitro* mineralization by metabolic activity modulation mechanism of bone cells and serves as a local source of ions and inorganic phosphates (Chung *et al.*, 1998).

The osteocalcin and osteopontin protein expression was detected by the real time PCR technique in patient IV and V adipose tissue cells cultivated in OM medium. However, the osteocalcin presence in culture on the seventh day was not expected at least in bone marrow cells cultures. This fact has also been observed by other authors that did not obtain consensus about the precise time interval in which this protein is expressed in cells cultures from adipose tissue (Beck *et al.*, 2000; Zuk *et al.*, 2002; Zhou *et al.*, 2006). On the other hand the osteopontin expression was detected in high levels in the 14th day

after the induction in disagreement with literature, in which the same condition of induction and the same cell type is mentioned (Zuk *et al.*, 2002).

The differentiation of the patient IV and V adipose tissue osteogenic cells was confirmed in OM cultures by positive marking for alkaline phosphatase, von Kossa cytochemistry and alizarin red technique. These three confirmation cytochemistry methods are widely cited in literature as requirements for certification of the complete osteogenesis, because they are used to confirm alkaline phosphatase presence as well as calcium deposition in the extracellular matrix (Aksu *et al.*, 2008; Zuk *et al.*, 2001; Mizuno *et al.*, 2003, Im *et al.*, 2005; Hong *et al.*, 2007; Egusa *et al.*, 2007). This later marking is only seen in mature osteoblasts that secrete collagen type I, rich in calcium extracellular matrix which becomes calcified during the later stages of differentiation (Scott, 1980).

The MCM2 protein has been described a marker for proliferating cells (Freeman, 1999; Lampert *et al.*, 2005) and are involved in DNA repair mechanisms, like homologous recombination (Wang *et al.*, 2004). In our results, a decrease in the MCM2 gene expression during the osteo-differentiation of hADSCs was observed. These results may be related to cellular aging or still even with the cellular differentiation; therefore, when the cell is differentiated, it loses its proliferation capacity (Freeman, 1999). However, recent studies have shown that reduced MCM2 expression results in severe stem/progenitor cell deficiency and cancer (Pruitt *et al.* 2007).

5 ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by research grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and CAPES.

6 REFERENCES

- Aksu A E, Rubin P, Dudas J R, Marra K G. (2008). Role of gender and anatomical region on induction of osteogenic differentiation of human adipose-derived stem cells. *Ann Plast Surg.* 60[3]: 306-322.
- Aubin J E. (1998). Advances in the osteoblast lineage. *Biochem Cell Biol.* 76[6]: 899-910.
- Aubin J E. (1999). Osteoprogenitor cell frequency in rat bone marrow stromal populations: role for heterotypic cell-cell interactions in osteoblast differentiation. *J Cell Biochem.* 72[3]: 396-410.
- Bailis JM and Forsburg SL. (2004). MCM proteins: DNA damage, mutagenesis and repair. *Current Opinion in Genetics & Development.* 14: 17-21.
- Balk MI, Bray J, Day C, Epperly M, Greenberger J, Evans Ch, Niyibizi C (1997). Effect of rhBMP-2 on the osteogenic potential of bone marrow stromal cells from an osteogenesis imperfecta mouse (oim). *Bone.* 21: 7–15.
- Beck GR Jr, Zerler B, Moran E. (2000). Phosphate is a specific signal for induction of osteopontin gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97[15]: 8352-8357.
- Bieback K, Kern S, Kluter H and Eichler H. (2004). Critical parameters for the isolation of mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Stem Cells.* 22: 625-634.
- Caplan AI (1991). Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res.* 9[5]: 641-650.
- Celeste A J, Iannazzi J A, Taylor R C, Hewich R M, Rosen V, Wang E A *et al.*(1990). Identification of transforming growth factor beta family members present in bone-inductive protein purified from bovine bone. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 87[24]: 9843-9847.

- Chen D, Harris M A, Rossini G, Dunstan C R, Dallas S L, Feng J Q et al. (1997). Bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) enhances BMP-3, BMP-4, and bone cell differentiation marker gene expression during the induction of mineralized bone matrix formation in cultures of fetal rat calvarial osteoblasts. *Calcif Tissue Int.* 60[3]: 283-290.
- Chong JP, Hayashi MK, Simon MN, Xu RM, Stillman B (2000). A double-hexamer archeal minichromosome maintenance protein is an ATP-dependent DNA helicase. *Proc Natl Acad Sci U S A. Proc Natl Acad Sci USA.* 97(4): 1530-1535.
- Chung C H, Golub E E, Forbes E, Tokuoka T, Shapiro I M. (1998). Mechanism of action of beta-glycerophosphate on bone cell mineralization. *Calcif Tissue Int.* 51[4]: 305-311.
- Cooper M S, Hewison M, Stewart P M. (1999). Glucocorticoid activity, inactivity and the osteoblast. *J Endocrinol.* 163[2]: 159-164.
- Davies JE. (1999) *Bone Engineering*. Toronto.
- De Girolamo L, Sartori MF, Albisetti W, Brini AT (2007). Osteogenic differentiation of human adipose-derived stem cells: comparison of two different inductive media. *J Tissue Eng Regen Med.* 1[2]: 154-157.
- De Ugarte DA, Alfonso Z, Zuk PA, Elbarbary A et al. (2003). Differential expression of stem cell mobilization-associated molecules on multi-lineage cells from adipose tissue and bone marrow. *Immunol Lett.* 89(2-3): 267-70.
- Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D et al. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 8[6]: 315-317.
- Ducy P, Karsenty G. (1998). Genetic control of cell differentiation in the skeleton. *Curr Opin Cell Biol.* 10[5]: 614-619.
- Egusa H, Lida K, Kobayashi T, Lin T Y, Zhu M, Zuk P A et al. (2007). Downregulation of extracellular matrix-related gene clusters during osteogenic differentiation of human bone marrow- and adipose tissue-derived stromal cells. *Tissue Eng.* 13[10]: 2589-2600.
- Frank O, Heim M, Jakob M, Barbero A et al. (2002). Real-time quantitative RT-PCR analysis of human bone marrow stromal cells during osteogenic differentiation *in vitro*. *J Cell Biochem.* 85(4): 737-746.
- Freeman A, Morris LS, Mills AD, Stoeber K, Laskey RA, Williams GH. and Coleman N. (1999). Minichromosome maintenance proteins as biological markers of dysplasia and malignancy. *Clin Cancer Res.* 5: 2121-2132.
- Gazzerro E, Gangij V And Canalis E (1998). Bone morphogenetic proteins induce the expression of Noggin, which limits their activity in cultured rat osteoblasts. 102(12): 2106-2114.

- Gericke A, Qin C, Spevak L, Fujimoto Y, Butler W T, Sorensen E S *et al.* (2005). Importance of phosphorylation for osteopontin regulation of biomineralization. *Calcif Tissue Int.* 77[1]: 45-54.
- Ghosh-Choudhury N, Harris MA, Feng JG, Mundy GR and Harris SE (1994). Expression of the BMP 2 gene during bone cell differentiation. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* 4: 345-355.
- Halvorsen YC, Franklin D, Bond AL, Hitt DC, Auchter C, Boskey AL, *et al.* (2001). Extracellular Matrix Mineralization and Osteoblast Gene Expression by Human Adipose Tissue-Derived Stromal Cells. *Tissue Engineering.* 7(6): 729-741.
- Hong L, Colpan A, Peptan IA, Daw J, George A And Evans CA (2007). 17- β Estradiol enhances osteogenic and adipogenic differentiation of human adipose-derived stromal cells. *Tissue Engineering.* 3(6): 1197-1203.
- Im G I, Shin YW, Lee KB (2005). Do adipose tissue-derived mesenchymal stem cells have the same osteogenic and chondrogenic potential as bone marrow-derived cells? *Osteoarthritis Cartilage.* 13[10]: 845-853.
- Ishikawa H, Kitoh H, Sugiura F, Ishiguro N (2007). The effect of recombinant human bone morphogenetic protein-2 on the osteogenic potential of rat mesenchymal stem cells after several passages. *Acta Orthopaedica.* 78(2): 285 - 292.
- Ishimi Y (1997). A DNA helicase activity is associated with an MCM4, -6, and -7 protein complex. *J Biol Chem.* 272(39): 24508-24513.
- Jorgensen N.R, Henrikse Z, Sorensen O and Civitelli R. (2004). Dexamethasone, BMP-2, and 1,25-dihydroxyvitamin D enhance a more differentiated osteoblast phenotype: validation of an in vitro model for human bone marrow-derived primary osteoblasts. *Steroids.* 69: 219-226.
- Lampert I.A., Horncastle D., Dilworth S., Roberts I. *et al.* (2005). The expression of minichromosome maintenance protein-2 in normal and abnormal megakaryocytes and comparison with the proliferative marker Ki-67. *British Journal of Haematology.* 131: 490-494.
- Li G, Berven S, Simpson H and Triffitt JT (1998). Expression of BMP-4 mRNA during distraction osteogenesis in rabbits. *Acta Orthop Scand.* 69(4): 420-425.
- Livak KJ, Schmittgen TD. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods.* 25[4]: 402-408.
- Loro R. (2002). Estudo *in vitro* da osteoindução de células da medula óssea humana. Master's thesis, Pontificia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- Mizuno H and Hyakusoku H (2003). Mesengenic potential and future clinical perspective of human processed lipoaspirate cells. *J Nippon Med Sch.* 70[4]: 300-306.

- Mota A, Silva P, Neves D, Lemos C, Calhau C, Torres D, Martel F, Fraga H, Ribeiro L *et al.* (2008). Characterization of rat heart alkaline phosphatase isoenzymes and modulation of activity. *Braz J Med Biol Res.* 41(7): 600-609.
- Petite H, Viateau V, Bensaid W, Meunier A, de Pollak C, Bourguignon M *et al.* (2000). Tissue-engineered bone regeneration. *Nat Biotechnol.* 18[9]: 959-963.
- Pfaffl MW (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29(9): 2002-2007.
- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S and Marshak DR (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science.* 284: 143–147.
- Pruitt SC, Bailey KJ and Freeland A. (2007). Reduced MCM2 expression results in severe stem/progenitor cell deficiency and cancer. *Stem Cells.* 25(12): 3121-32.
- Quarto R, Mastrogiacomo M, Cancedda R, Kutepov SM, Mukhachev V, Lavroukov A, Kon E And Marcacci M (2001). Repair of large bone defects with the use of autologous bone marrow stromal cells. *N Engl J Med.* 344: 385-386.
- Rickard DJ, Sullivan TA, Shenker BI, Leboy PS, Kazhdan I (1994). Induction of rapid osteoblasts differentiation in rat bone marrow stromal cell cultures by dexamethasone and BMP-2. *Dev Biol.* 161: 218–28.
- Rodins K, Cheale M, Coleman N and Fox BS (2002). Minichromosome maintenance protein 2 expression in normal kidney and renal cell carcinomas: relationship to tumor dormancy and potential clinical utility. *Clin Cancer Res.* 8(4): 1075-81.
- Scott D M, Kent G N, Cohn D V. (1980). Collagen synthesis in cultured osteoblast-like cells. *Arch Biochem Biophys.* 201[2]: 384-391.
- Sodek J, Ganss B, Mckee MD (2000). Osteopontin. *Crit Rev Oral Biol Med.* 11(3): 279-303.
- Solheim E. (1998). Growth factors in bone. *Int Orthop.* 22[6]: 410-416.
- Strem B, Hicok KC, Zhu M, Wulur I *et al.* (2005). Multipotential differentiation of adipose tissue-derived stem cells. *Keio J Med.* 3: 132-14.
- Turgerman G, Pittman DD, Müller R, Kurkalli BG, Zhou S, Pelled A, (2001) *et al.* Engineered human mesenchymal stem cells: a novel platform for skeletal cell mediated gene therapy. *J Gene Med.* 3[3]: 240-251.
- Wan M and Cao X (2005). BMP signalling in skeletal development. *Biochem Biophys Res Commun.* 328(3): 651-657.
- Wang X, Ira G, Tercero JA, Holmes AM, Diffley JF and Haber JE (2004). Role of DNA replication proteins in double-strand break-induced recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* 24(16): 6891-9.

- Wolfgang W and Ho AD (2007). Mesenchymal stem cell preparations--comparing apples and oranges. *Stem Cell Rev.* 3[4]: 239-248.
- Xiao G, Cui Y, Ducy P, Karsenty G, Franceschi R T. (1997). Ascorbic acid-dependent activation of the osteocalcin promoter in MC3T3-E1 preosteoblasts: requirement for collagen matrix synthesis and the presence of an intact OSE2 sequence. *Mol Endocrinol.* 11[8]: 1103-1113.
- You Z, Ishimi Y, Masai H, Hanaoka F (2002). Roles of Mcm7 and Mcm4 subunits in the DNA helicase activity of the mouse Mcm4/6/7 complex. *J Biol Chem.* 277(45): 42471-9.
- Zhou Y, Liu Y, Tan J (2006). Is 1, 25-dihydroxyvitamin D3 an ideal substitute for dexamethasone for inducing osteogenic differentiation of human adipose tissue-derived stromal cells *in vitro*? *Chin Med J (Engl).* 119[15]: 1278-1286.
- Zuk P A, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell J W, Katz A J *et al.* (2001). Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng.* 7[2]: 211-228.
- Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H *et al.* (2002). Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell.* 13: 4279-4295.

Discussão

4 DISCUSSÃO

As células-tronco mesenquimais (MSCs) têm sido descritas como células multipotentes que se replicam e que mantem em um estado indiferenciado. As MSCs possuem também a capacidade de se diferenciar em células de linhagem mesenquimal como, por exemplo, tecido ósseo, cartilaginoso, adiposo e muscular (Pittenger *et al.*, 1999; BIEBACK *et al.*, 2004). Essa diferenciação está relacionada com o nicho em que elas se encontram e os fatores intrínsecos e extrínsecos ali existentes que irão definir o fenótipo celular (Caplan, 1991; Pittenger *et al.*, 1999).

As células- tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo (ADSCs) são uma abundante fonte de MSCs e representam um novo conceito para a terapia clínica. Estas células apresentam a característica de aderência à superfície plástica ou matriz extracelular e, por esta razão, são facilmente isoladas (Zuk *et al.*, 2001, 2002).

As células-tronco mesenquimais indiferenciadas têm a habilidade de promover a renovação tecidual, bem como a reposição de osteoblastos na regeneração óssea e em fraturas após trauma ou doenças associadas ao tecido ósseo. Contudo, a possibilidade de manipulação e a formação de tecido ósseo só são possíveis quando as células-tronco estão disponíveis e dispersas em vários tecidos (como esqueleto, músculo e tecido adiposo subcutâneo). Em função de alguns estímulos, estas células indiferenciadas iniciam a diferenciação em uma linhagem celular, repetindo o mesmo desenvolvimento osteogênico ocorrido

durante o desenvolvimento embrionário, até mesmo em adultos de diferentes idades (Turgerman *et al.*, 2001).

A manutenção e a formação do tecido ósseo são mantidas por um complexo processo, influenciado por hormônios sistêmicos e fatores de crescimento. O tecido ósseo contém uma grande variedade de fatores de crescimento, incluindo as proteínas morfogenéticas ósseas – *bone morphogenetic proteins* (BMPs). Estas proteínas são produzidas pelos osteoblastos que, por meio de uma cascata de eventos, induzem as células mesenquimais indiferenciadas à formação do tecido ósseo (Zhou *et al.*, 1993; Chen *et al.*, 1997; Solheim, 1998).

Neste trabalho foi induzida a diferenciação óssea de ADSCs utilizando-se BMP-4 e meio de diferenciação osteogênica (OM) como agentes indutores e testada por meio da caracterização molecular e histológica de marcadores osteogênicos.

A morfologia das células-tronco mesenquimais logo após colocadas em cultura foi similar a de células que crescem em suspensão, apresentando uma morfologia esférica. Entretanto, após o segundo ou terceiro dia de cultura, estas começam a apresentar morfologia fibroblastóide e aderência à superfície plástica. Esta adesão é característica da linhagem mesenquimal, e difere das células da linhagem hematopoiética que têm crescimento em suspensão (Aubin, 1999; Petite *et al.*, 2000).

Devido a diferentes resultados encontrados em relação aos marcadores de superfície e isolamento das MSCs foi necessário um consenso para a identificação e caracterização destas células, visando um maior controle da

qualidade das preparações celulares. Em agosto de 2006, a Sociedade Internacional de Terapia Celular propôs que as MSCs devem expressar CD105, CD73 e CD90, e não devem conter marcadores da linhagem hematopoiética como CD45, CD34, CD14 ou CD11b (Strem *et al.*, 2005; Dominici *et al.*, 2006; Wolfgang & Ho, 2007).

Os resultados obtidos neste estudo, com relação aos marcadores de superfície das ADSCs, estão de acordo com esta premissa e com outros estudos descritos na literatura. Foi observada com maior frequência a expressão de CD105, indicando a presença de células mesenquimais precursoras que desempenham um importante papel na osteogênese (Zuk *et al.*, 2001; Dominici *et al.*, 2006; de Girolamo *et al.*, 2007).

A proteína BMP-4 induz células primitivas a formar osso tanto *in vitro* como *in vivo*, atuando primariamente nos estágios iniciais da diferenciação osteogênica (LI G, 1998). Para verificar a diferenciação, os genes envolvidos na detecção foram utilizados em conjunto com um marcador específico da osteogênese, a osteocalcina (OC).

Também foi verificado que a atividade da fosfatase alcalina (ALP) na linhagem osteoblástica esta aumentada durante a diferenciação na fase pré-osteoblástica, próximo ao estágio de proliferação final durante a deposição da matriz extracelular e maturação (Davies, 1999; Beck *et al.*, 2000). Por esta razão, a expressão desta proteína é freqüentemente utilizada como um marcador osteoblástico (Davies, 1999). A osteopontina é expressa em células de vários tecidos incluindo osso, dentina, cartilagem hipertrófica, rim, cérebro, tecido vascular e outros. Nos ossos, a osteopontina é produzida pelos osteoblastos em

vários estágios e, é sugerido na literatura que a sua expressão ocorre em dois picos (Sodek, 2000). Contudo, em células-tronco da medula óssea esta proteína é detectável nos estágios iniciais da diferenciação, durante a proliferação de células precursoras como pré-osteoblastos e em altos níveis em osteoblastos (Aubin, 1998).

Para verificar a expressão de mRNA da ALP, da osteopontina e da osteocalcina nas culturas de hADSCs induzidas com BMP-4 foi utilizada a técnica de RT-PCR. Neste estudo, foi observada a expressão de ALP, osteocalcina e osteopontina nos controles não induzidos e nas culturas derivadas de todos os pacientes tratados com BMP-4. Nas culturas de células do paciente I, a expressão ocorreu no 14^o e 21^o dia; nas culturas do paciente II, a expressão da osteopontina ocorreu no 14^o dia e a expressão da osteocalcina ocorreu no 21^o. Nas culturas derivadas do paciente III, esta expressão ocorreu no 14^o dia. A expressão da fosfatase alcalina e da osteopontina nas células não induzidas pode ser justificada pelo fato de que a osteopontina é uma proteína encontrada na matriz extracelular de outros tecidos, como músculos, alguns tumores e fluídos corporais (SODEK *et al.*, 2000; GERICKE *et al.*, 2005), onde a fosfatase alcalina tem sido observada em outros tipos de células e tecidos como cartilagem, hepatócitos e células renais (MOTA *et al.*, 2008). Em um outro estudo realizado pelo nosso grupo de pesquisa, a osteopontina estava presente nos primeiros dias de cultura. Entretanto, estas células eram derivadas da medula óssea (Loro, 2002).

Em relação à expressão da osteocalcina, nossos resultados diferem de ZUK *et al.* (2002). Quando compararam com as culturas de BMSCs controles, não foi encontrada expressão basal nas ADSCs mantidas em meio não indutor.

Contudo, a expressão da osteocalcina foi verificada em baixos níveis nas culturas de MSCs derivadas da medula óssea. Têm sido mostrado que, em culturas de BMSC, a osteocalcina é a última a ser expressa nos osteoblastos maduros e é indetectável em pré-osteoblastos (Aubin, 1998; Beck *et al.*, 2000).

O meio indutor OM, contendo β -glicerolfosfato, ácido ascórbico e dexametasona, é considerado por muitos autores como o meio osteo-indutivo mais eficiente (ZUK *et al.*, 2001; ZUK *et al.*, 2002; MIZUNO *et al.*, 2003, IM *et al.*, 2005; HONG *et al.*, 2007; AKSU *et al.*, 2008). Desta forma, o processo de diferenciação celular é controlado por uma cascata de eventos moleculares envolvidos na regulação gênica, por meio da ação de vários hormônios, citocinas e fatores de crescimento (DUCY and KARSENTY, 1998). A influência dos glicocorticóides na proliferação e diferenciação de células osteogênicas causa alteração na concentração de fatores de crescimentos e hormônios interferindo em suas vias de sinalização (COOPER, 1999). O ácido ascórbico é necessário para a síntese da matriz colágena e do seu depósito (XIAO *et al.*, 1997; DAVIES, 1999). O β -glicerolfosfato promove a mineralização *in vitro* pelo mecanismo de modulação da atividade metabólica de células ósseas e serve como uma fonte local de íons e fosfatos inorgânicos (CHUNG *et al.*, 1998).

A expressão da osteocalcina e da osteopontina nas culturas de pacientes induzidas com OM foi detectada pela técnica de PCR em tempo real. No entanto, a presença de osteocalcina no 7º dia de indução não era esperada. Este fato é observado na literatura, não havendo um consenso sobre o período preciso em que a osteocalcina é expressa em culturas de ADSCs (BECK *et al.*, 2000; ZUK *et*

al., 2002; ZHOU *et al.*, 2006). Por outro lado, a expressão de osteopontina foi detectada em altos níveis no 14º dia pós-indução.

A diferenciação das células dos pacientes IV e V para tecido ósseo foram confirmados em culturas em meio OM pela marcação positiva para fosfatase alcalina, von Kossa e alizarina vermelha. Estas três alternativas de confirmação citoquímica são amplamente empregadas na literatura como requisitos para certificação da osteogênese completa, pois confirmam a presença de fosfatase alcalina e a deposição de cálcio na matriz extracelular (Aksu *et al.*, 2008; Zuk *et al.*, 2001; Mizuno *et al.*, 2003, Im *et al.*, 2005; Hong *et al.*, 2007; Egusa *et al.*, 2007). Essa última marcação só é observada em osteoblastos maduros que secretam colágeno tipo I, rico em matriz extracelular de cálcio, a qual se torna calcificada durante os estágios mais tardios de diferenciação (Scott, 1980).

A proteína MCM2 tem sido descrita como um marcador de células proliferativas, sendo expressa em células progenitoras e uma variedade de tecidos (Freeman, 1999; Lampert *et al.*, 2005) e esta envolvida em mecanismos de reparação de DNA, como recombinação homóloga (Wang *et al.*, 2004). Em nossos resultados, foi observada uma diminuição da expressão do gene MCM2, durante a osteo-diferenciação das hADSCs. Estes resultados podem estar relacionados com envelhecimento celular, ou ainda com a diferenciação celular, visto que quando as células se diferenciam, perdem a capacidade de proliferar (Freeman, 1999). Em adição, Pruitt *et al.* (2007) mostraram que expressão reduzida de MCM2 em camundongos *knockout* resulta em deficiência nas células-tronco e câncer.

Conclusões

5 CONCLUSÕES

O estudo *in vitro* da diferenciação de células-tronco adultas derivadas de tecido adiposo (hADSCs) cultivadas em meio osteogênico mostrou que:

- a)** As células aderem e proliferam em cultura;
- b)** As células sofrem osteoindução quando cultivadas na presença de meio contendo BMP-4 ou OM;
- c)** As células expressam proteínas marcadoras da linhagem osteogênica como a fosfatase alcalina, osteocalcina e osteopontina;
- d)** As células apresentam deposição de matriz mineralizada pelo menos quando cultivadas em meio OM.
- e)** Foi observada uma diminuição da expressão do gene MCM2, durante a diferenciação das hADSCs.

Perspectivas

6 PERSPECTIVAS

Baseado nos resultados obtidos em relação à cultura de hADSCs e expressão de proteínas relacionadas à osteogênese, planeja-se para o seguimento deste trabalho:

a) A utilização de amostras de pacientes do gênero masculino, visto que, este trabalho foi desenvolvido apenas com pacientes do gênero feminino, e já existem trabalhos que descrevem a influência de hormônios estrógenos na diferenciação para tecido ósseo (Aksu *et al.*, 2008);

b) Análise da expressão de outros genes relacionados à reparação de DNA e ciclo celular durante a osteogênese e neurogênese.

Referências bibliográficas

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKSU, A. E.; RUBIN, P.; DUDAS, J. R. & MARRA, K. G. Role of gender and anatomical region on induction of osteogenic differentiation of human adipose-derived stem cells. *Ann Plast Surg*, 60(3): 306-322, 2008.
- ASHJIAN, P.H.; ELBARBARY, A.S.; EDMONDS, B.; DEUGARTE, D.; ZHU, M.; ZUK, P.A.; LORENZ, H.P.; BENHAIM, P. & HEDRICK, M.H. *In vitro* differentiation of human processed lipoaspirate cells into early neural progenitors. *Plast Reconstr Surg*, 111: 1922-1931, 2003.
- AUBIN, J. E. Advances in the osteoblast lineage. *Biochem Cell Biol*, 76(6): 899-910, 1998.
- AUBIN, J.E. Osteoprogenitor cell frequency in rat bone marrow stromal populations: role for heterotypic cell-cell interactions in osteoblast differentiation. *J Cell Biochem*, 72(3): 396-410, 1999.
- AUST, L.; DEVLIN, B.; FOSTER, S.J.; HALVORSEN, Y.D.; HICOK, K.; DU, L.T.; SEN, A.; WILLINGMYRE, G.D. & GIMBLE, J.M. Yield of human adiposederivedadult stem cells from liposuction aspirates. *Cytotherapy*, 6: 7-14, 2004.
- BAILIS, J. M. & FORSBURG, S. L. MCM proteins: DNA damage, mutagenesis and repair. *Current Opinion in Genetics & Development*, 14:17-21, 2004.
- BECK, G. R.; ZERLER, B. & MORAN, E. Phosphate is a specific signal for induction of osteopontin gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(15): 8352-8357, 2000.
- BIEBACK, K.; KERN, S.; KLUTER, H. & EICHLER, H. Critical parameters for the isolation of mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Stem Cells*, 22: 625-634, 2004.
- BRANDAO-BURCH, A.; UTTING, J.C.; ORRISS, I.R. & ARNETT, T.R. Acidosis inhibits bone formation by osteoblasts in vitro by preventing mineralization. *Calcif Tissue Int*, 77(3): 167-74, 2005.
- CAI, J., WEISS, M. L. & RAO, M. S. In search of "stemness". *Experimental Hematology*, 32: 585-598, 2004.
- CAPLAN, A.I. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res*. 9(5): 641-650, 1991.
- CELESTE, A.J.; IANNAZZI J.A.; TAYLOR, R.C.; HEWICK R.M.; ROSEN, V.; WANG, E.A. & WOZNEY, J.M. Identification of transforming growth factor β family members present in bone-inductive protein purified from bovine bone. *Proc Natl Acad Sci*, 87: 9843-9847, 1990.

- CHEN, D.; HARRIS, M. A.; ROSSINI, G.; DUNSTAN, C. R.; DALLAS, S. L.; FENG, J. Q. *et al.* Bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) enhances BMP-3, BMP-4, and bone cell differentiation marker gene expression during the induction of mineralized bone matrix formation in cultures of fetal rat calvarial osteoblasts. *Calcif Tissue Int*, 60(3): 283-290, 1997.
- CHEN, Y.; SHAO, J. Z.; XIANG, L. X.; DONG, X. J. & ZHANG, G. R. Mesenchymal stem cells: a promising candidate in regenerative medicine. *Int J Biochem Cell Biol*, 40(5): 815-820, 2008.
- CHENG, H.; JIANG, W.; PHILLIPS, F. M.; HAYDON, R. C.; PENG, Y.; ZHOU, L. *et al.* Osteogenic activity of the fourteen types of human bone morphogenetic proteins (BMPs). *J Bone Joint Surg Am*, 85(8): 1544-1552, 2003.
- CHUNG, C. H.; GOLUB, E. E.; FORBES, E.; TOKUOKA, T. & SHAPIRO, I. M. Mechanism of action of beta-glycerophosphate on bone cell mineralization. *Calcif Tissue Int*, 51(4): 305-311, 1998.
- COOPER, M. S.; HEWISON, M. & STEWART, P. M. Glucocorticoid activity, inactivity and the osteoblast. *J Endocrinol*, 163(2): 159-164, 1999.
- da SILVA MEIRELLES, L.; CHAGASTELLES, P.C. & NARDI, N. B. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J Cell Sci*, 119: 2204–2213, 2006.
- da SILVA MEIRELLES, L.; CAPLAN, A.I. & NARDI, N.B. In Search of the in vivo Identity of Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells*, 26(9): 2287-99, 2008.
- DAVIES, J. E. *Bone Engineering*. Toronto, 1999.
- DE COPPI, P.; BARTSCH, G.; SIDDIQUI, M.M.; XU, T.; SANTOS, C.C.; PERIN, L.; MOSTOSLAVSKY G.; SERRE A.C.; SNYDER E.Y.; YOO J.J.; FURTH M.E.; SOKER S. & ATALA A. Isolation of amniotic stem cell lines with potential for therapy. *Nat Biotechnol*, 25(1): 100-106, 2007.
- DICKER, A.; LE BLANC, K.; ASTROM, G.; HARMELEN, V. *et al.* Functional studies of mesenchymal stem cells derived from adult human adipose tissue. *Exp Cell Res*, 308: 283-290, 2005.
- DOMINICI, M.; LE BLANC, K.; MUELLER, I.; SLAPER-CORTENBACH, I.; MARINI, F.; KRAUSE, D. *et al.* Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8(6): 315-317, 2006.
- DUCY, P. & KARSENTY, G. Genetic control of cell differentiation in the skeleton. *Curr Opin Cell Biol*, 10(5): 614-619, 1998.
- EGUSA, H.; LIDA, K.; KOBAYASHI, T.; LIN, T. Y.; ZHU, M.; ZUK, P. A. *et al.* Downregulation of extracellular matrix-related gene clusters during osteogenic

- differentiation of human bone marrow- and adipose tissue-derived stromal cells. *Tissue Eng*, 13(10): 2589-2600, 2007.
- EINHOM, T. A. Enhancement of fracture-healing. *J Bone Joint Surg Am*, 77(6): 940-956, 1995.
- ENCINAS, J. M. & ENIKOLOPOV, G. Identifying and quantitating neural stem and progenitor cells in the adult brain. *Methods Cell Biol*, 85:243-72, 2008.
- FRANZ-ODENDAAL, T. A.; HALL, B. K. & WITTEN, P. E. Buried alive: how osteoblasts become osteocytes. *Dev Dyn*, 235(1): 176-190, 2006.
- FRASER J.K.; WULUR, I.; ALFONSO, Z. & HEDRICK. Fat tissue: an underappreciated source of stem cells for biotechnology. *Trends Biotechnol*, 24(4): 150-154, 2006.
- FREEMAN, A.; MORRIS, L. S.; MILLS, A. D.; STOEBER, K.; LASKEY, R. A.; WILLIAMS, G. H. & COLEMAN, N. Minichromosome maintenance proteins as biological markers of dysplasia and malignancy. *Clin Cancer Res*, 5: 2121-2132, 1999.
- GERICKE, A.; QIN, C.; SPEVAK, L.; FUJIMOTO, Y.; BUTLER, W. T.; SORENSEN, E. S. *et al.* Importance of phosphorylation for osteopontin regulation of biomineralization. *Calcif Tissue Int*, 77(1): 45-54, 2005.
- GIROLAMO, L.; SARTORI, M. F.; ALBISETTI, W. & BRINI, A. T. Osteogenic differentiation of human adipose-derived stem cells: comparison of two different inductive media. *J Tissue Eng Regen Med*, 1(2): 154-157, 2007.
- GUZIŃSKA-USTYMOWICZ, K.; STEPIEŃ, E. & KEMONA, A. MCM-2, Ki-67 and PCNA protein expressions in pT3G2 colorectal cancer indicated lymph node involvement. *Anticancer Res*, 28 (1B): 451-7, 2008.
- HONG, L.; COLPAN, A.; PEPTAN, I.A.; DAW, J.; GEORGE, A. & EVANS, C.A. 17- β Estradiol enhances osteogenic and adipogenic differentiation of human adipose-derived stromal cells. *Tissue Eng*, 13(6): 1197-1203, 2007.
- IM, G. I.; SHIN, Y.W. & LEE, K.B. Do adipose tissue-derived mesenchymal stem cells have the same osteogenic and chondrogenic potential as bone marrow-derived cells? *Osteoarthritis Cartilage*, 13(10): 845-853, 2005.
- JIANG, Y.; JAHAGIRDAR, B.; REINHARDT R.; SCHWARTZ R., KEENE, C.; ORTIZ-GONZALES, X.R. & VERFAILIE, C.M. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*, 418: 41-49, 2002.
- JORGENSEN, N. R.; HENRIKSEN, Z.; SORENSEN, O. & CIVITELLI, R. Dexamethasone, BMP-2, and 1,25-dihydroxyvitamin D enhance a more differentiated osteoblast phenotype: validation of an in vitro model for human bone marrow-derived primary osteoblasts. *Steroids*, 69: 219-226, 2004.

- KENYION, J. & GERSON, S.L. The role of DNA damage repair in aging of adult stem cells. *Nucleic Acids Research*, 35(22): 7557-7565, 2007.
- KIERSZEMBAUM A L. Histologia e Biologia Celular: Uma introdução à patologia. Rio de Janeiro. *Elsevier*, 2004.
- KOCHANOWSKA, I.; CHABEREK, S.; WOJTOWICZ, A., *et al.* Expression of genes for bone morphogenetic proteins BMP-2, BMP-4 and BMP-6 in various parts of the human skeleton. *Musculoskeletal Disorders*, 8: 128-136, 2007.
- KOGLER, G.; SENSKEN, S.; AIREY, J.A.; TRAPP, T. *et al.* A new human somatic stem cell from placental cord blood with intrinsic pluripotent differentiation potential. *J Exp Med*, 200: 123-35, 2004.
- KOLF, M.C.; CHO, E. & TUAN, R. Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation. *Arthritis Research & Therapy*, 9: 204-214, 2007.
- KRAUSE, D. S. Plasticity of marrow-derived stem cells. *Gene Ther*, 9(11): 754-758, 2002.
- LAMPERT, I. A.; HORNCastle, D.; DILWORTH, S.; ROBERTS, I. *et al.* The expression of minichromosome maintenance protein-2 in normal and abnormal megakaryocytes and comparison with the proliferative marker Ki-67. *British Journal of Haematology*, 131: 490-494, 2005.
- LI, G.; BERVEN, S.; SIMPSON, H. & TRIFFITT, J.T. Expression of BMP-4 mRNA during distraction osteogenesis in rabbits. *Acta Orthop Scand*, 69(4): 420-425, 1998.
- LIANG, L. & BICKENBACH, J. R. Somatic epidermal stem cells can produce multiple cell lineages during development. *Stem Cells*, 20(1): 21-31, 2002.
- LORO, R. C. D. Estudo *in vitro* da osteoindução de células da medula óssea humana. Dissertação de mestrado, Faculdade de Odontologia, PUCRS, Porto Alegre, RS, Brasil, 2002.
- MIZUNO, H. & HYAKUSOKU, H. Mesengenic potential and future clinical perspective of human processed lipoaspirate cells. *J Nippon Med Sch*, 70(4): 300-306, 2003.
- MOTA, A.; SILVA, P.; NEVES, D.; LEMOS, C.; CALHAU, C.; TORRES, D.; MARTEL, F.; FRAGA, H.; RIBEIRO, L. *et al.* Characterization of rat heart alkaline phosphatase isoenzymes and modulation of activity. *Braz J Med Biol Res*, 41(7): 600-609, 2008.
- MURAGLIA, A., CANCEDDA, R. & QUARTO, R. Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate *in vitro* according to a hierarchical model. *Journal of Cell Science*, 113(7): 1161-1166, 2000.

- MUSCHLER, G. F.; NITTO, H.; MATSUKURA, Y.; BOEHM, C.; VALDEVIT, A.; KAMBIC, H. *et al.* Spine fusion using cell matrix composites enriched in bone marrow-derived cells. *Clin Orthop Relat Res*, (407): 102-118, 2003.
- MUSCHLER, G.F. & MIDURA, R.J. Connective tissue progenitors: practical concepts for clinical applications. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 395: 66-80, 2002.
- NAUTA, A. J. & FIBBE, W. E. Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. *Blood*, 110: 3499-3506, 2007.
- ODORICO, J. S.; KAUFMAN, D.S. & THOMSON, J. A. Multilineage differentiation from human embryonic stem cell lines. *Stem Cells*, 19: 193-204, 2001.
- OTTO, W. R. & RAO, J. Tomorrow's skeleton staff: mesenchymal stem cells and the repair of bone and cartilage. *Cell Prolif*, 37(1): 97-110, 2004.
- PARIS, M. A. Avaliação da proliferação e diferenciação de células da medula óssea humana cultivada sobre discos de hidroxiapatita e titânio. Dissertação de mestrado, PUCRS, Porto Alegre, RS, Brasil, 2004.
- PARK, Y. & GERSON, S. L. DNA repair defects in stem cell function and aging. *Annual Review of Medicine*, 56: 495-508, 2005.
- PÉAULT, B.; RUDNICK, M.; TORRENTE, Y. *et al.* Stem and progenitor cells in skeletal muscle development, maintenance, and therapy. *Mol Ther*, 15(5): 867-77, 2007.
- PETITE, H.; VIATEAU, V.; BENSALD, W.; MEUNIER, A.; DE POLLAK, C.; BOURGUIGNON, M. *et al.* Tissue-engineered bone regeneration. *Nat Biotechnol*, 18(9): 959-963, 2000.
- PONTICIELLO, M. S.; SCHINAGL, R. M.; KADIYALA, S. & BARRY, F. P. Gelatin-based resorbable sponge as a carrier matrix for human mesenchymal stem cells in cartilage regeneration therapy. *J Biomed Mater Res*, 52(2): 246-255, 2000.
- PRICE, P. A.; OTSUKA, A. A.; POSER, J. W.; KRISTAPONIS, J. & RAMAN, N. Characterization of a gamma-carboxyglutamic acid-containing protein from bone. *Proc Natl Acad Sci USA*, 73(5): 1447-1451, 1976.
- QUARTO, R.; MASTROGIACOMO, M.; CANCEDDA, R.; KUTEPOV, S. M., MUKHACHEV, V.; LAVROUKOV, A., KON, E. & MARCACCI, M. Repair of large bone defects with the use of autologous bone marrow stromal cells. *The New England Journal of Medicine*, 344: 385-386, 2001.

- REYES, M.; LUND, T.; LENVIK, T. & VERFAILLIE, C.M. Purification and *ex vivo* expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells. *Blood*, 98: 2615-25, 2001.
- RITZI, M. & KNIPPERS, R. Initiation of genome replication: assembly and disassembly of replication-competent chromatin. *Gene*, 245: 13–20, 2000.
- RODINS, K.; CHEALE, M.; COLEMAN, N. & FOX, S. B. Minichromosome maintenance protein 2 expression in normal kidney and renal cell carcinomas: relationship to tumor dormancy and potential clinical utility. *Clin Cancer Res*, 8: 1075-1081, 2002.
- SAFFORD, K.M. & RICE, H.E. Stem cell therapy for neurologic disorders: therapeutic potential of adipose-derived stem cells. *Current Drug Targets*, 6: 57-62, 2005.
- SCADDEN, D. T. The stem-cell niche as an entity of action. *Nature*, 441: 1075-1079, 2006.
- SCOTT, D. M.; KENT, G. N.; COHN, D.V. Collagen synthesis in cultured osteoblast-like cells. *Arch Biochem Biophys*, 201(2): 384-391, 1980.
- SHUR, I.; SOLOMON, R. & BENAYAHU, D. Dynamic interactions of chromatin-related mesenchymal modulator, a chromodomain helicase-DNA-binding protein, with promoters in osteoprogenitors. *Stem Cells*, 24: 1288-1293, 2006.
- SILVA, JR. A. Análise *in vitro* da proliferação e diferenciação de células da medula óssea humana cultivadas sobre discos de titânio e submetidas à irradiação com laser não-cirúrgico. Dissertação de mestrado, Faculdade de Odontologia, PUCRS, Porto Alegre, RS, Brasil, 2003.
- SILVA, T. Efeito da rugosidade de superfícies de discos de titânio sobre proliferação e diferenciação de células de medula óssea humanas. Dissertação de mestrado, PUCRS, Porto Alegre, RS, Brasil, 2004.
- SODEK, J.; GANSS, B. & MCKEE, M. D. Osteopontin. *Crit Rev Oral Biol Med*, 11(3): 279-303, 2000.
- SOLCHAGA, L. A.; GAO, J.; DENNIS, J. E.; AWADALLAH, A.; LUNDBERG, M.; CAPLAN, A. I. *et al.* Treatment of osteochondral defects with autologous bone marrow in a hyaluronan-based delivery vehicle. *Tissue Eng*, 8(2): 333-347, 2002.
- SOLHEIM, E. Growth factors in bone. *International Orthopaedics*, 22(6): 410-416, 1998.
- STREM, B.M. Multipotential differentiation of adipose tissue-derived stem cells. *Keio J Med*, 54(3): 132-142, 2005.

- SUZAWA, M.; TAKEUCHI, Y.; FUKUMOTO, S. *et al.* Extracellular matrix-associated bone morphogenetic proteins are essential for differentiation of murine osteoblastic cells *in vitro*. *Endocrinology*, 140: 2125-2133, 1999.
- ten DIJKE, P.; YAMASHITA, H.; SAMPATH, T. K.; REDDI, A. H.; ESTEVEZ, M.; RIDDLE, D. L. *et al.* Identification of type I receptors for osteogenic protein-1 and bone morphogenetic protein-4. *J Biol Chem*, 269(25): 16985-16988, 1994.
- TITUSHKIN, I. & CHO, M. Modulation of cellular mechanisms during osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Biophysical Journal*, 93(10): 3693–3702, 2007.
- TITUSHKIN, I. & CHO, M. Distinct membrane mechanical properties of human mesenchymal stem cells determined using laser optical tweezers. *Biophys J*, 90: 2582–2591, 2006.
- TURGERMAN, G.; PITTMAN, D. D.; MÜLER, R.; KURKALLI, B.G.; ZHOU, S.; PELLED, A. *et al.* Engineered human mesenchymal stem cells: a novel platform for skeletal cell mediated gene therapy. *J Gene Med*, 3(3): 240-251, 2001.
- UCCELLI, A.; MORETTA, L. & PISTOIA, V. Immunoregulatory function of mesenchymal stem cells. *Eur J Immunol*, 36(10): 2566-73, 2006.
- VAN ZANT, G. & LIANG Y. The role of stem cells in aging. *Exp Hematol*, 31(8): 659-672, 2003.
- VESCOVI, A.; GRITTI, A.; COSSU, G. & GALLI, R. Neural stem cells: plasticity and their transdifferentiation potential. *Cells Tissues Organs*, 171(1): 64-76, 2002.
- WAGNER, W.; WEIN, F.; SECKINGER, A.; FRANKHAUSER, M. & HO, A., D. Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood. *Experimental Hematology*, 33: 1402-1416, 2005.
- WANG, X.; IRA, G.; TERCERO, J.A.; HOLMES, A.M.; DIFFLEY, J.F. & HABER, J.E. Role of DNA replication proteins in double-strand break-induced recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, 24(16): 6891-9, 2004.
- WOGNUM, A.W.; EAVES, A.C. & THOMAS, T.E. Identification and isolation of hematopoietic stem cells. *Archives of Medical Research*, 34: 461-475, 2003.
- WOLFGANG, W. & HO, A. D. Mesenchymal stem cell preparations: comparing apples and oranges. *Stem Cell Rev*, 3(4): 239-248, 2007.

- WOODBURY, D., REYNOLDS, K. & BLACK, I.B. Adult bone marrow stromal stem cells express germline, ectodermal, endodermal, and mesodermal genes prior to neurogenesis. *J Neurosci Res*, 69: 908-917, 2002.
- XIAO, G.; CUI, Y.; DUCY, P.; KARSENTY, G. & FRANCESCHI, R. T. Ascorbic acid-dependent activation of the osteocalcin promoter in MC3T3-E1 preosteoblasts: requirement for collagen matrix synthesis and the presence of an intact OSE2 sequence. *Mol Endocrinol*, 11(8): 1103-1113, 1997.
- YAMAGUCHI, A.; KOMORI, T. & SUDA, T. Regulation of osteoblast differentiation mediated by bone morphogenetic proteins, hedgehogs, and cbfa1. *Endocrine Reviews*, 21(4): 393-411, 2000.
- YOUNG, R. G.; BUTLER, D. L.; WEBER, W.; CAPLAN, A. I.; GORDON, S. L. & FINK, D. J. Use of mesenchymal stem cells in a collagen matrix for Achilles tendon repair. *J Orthop Res*, 16(4): 406-413, 1998.
- ZAGO, M.A. Células-tronco, a nova fronteira da medicina. 1a ed. Atheneu. São Paulo, 2006.
- ZHOU, H.; HAMMONDS, R. G.; FINDLAY, D. M.; MARTIN, T. J. & NG, K. W. Differential effects of transforming growth factor-beta 1 and bone morphogenetic protein 4 on gene expression and differentiated function of preosteoblasts. *J Cell Physiol*, 155(1): 112-119, 1993.
- ZHOU, Y.; LIU, Y. & TAN, J. Is 1, 25-dihydroxyvitamin D3 an ideal substitute for dexamethasone for inducing osteogenic differentiation of human adipose tissue-derived stromal cells *in vitro*? *Chin Med J (Engl)*, 119(15): 1278-1286, 2006.
- ZUK, P.A.; ZHU, M.I.N.; ASHJIAN, P.; DE URGARTE, D.A.; HUANG, J. I.; MIZUNO, H. *et al.* Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell*, 13(12): 4279-4295, 2002.
- ZUK, P. A.; ZHU, M.; MIZUNO, H.; HUANG, J.; FUTRELL, J. W.; KATZ, A. J. *et al.* Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng*, 7(2): 211-228, 2001.

Anexo 1

Artigo publicado na *Differentiation*.