



Universidade Federal do Pampa

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA

CAMPUS SÃO GABRIEL

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM CIÊNCIAS
BIOLÓGICAS**

DIONE LARISSA KERCHER

**IDENTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO DAS VARIANTES 1 E 2 DO GENE QUE
CODIFICA A FOSFATASE ALCALINA EM CÉLULAS TRONCO DERIVADAS DE
TECIDO ADIPOSEO INDUZIDAS COM DEXAMETASONA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

SÃO GABRIEL, RIO GRANDE DO SUL, BRASIL

2014

DIONE LARISSA KERCHER

**IDENTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO DAS VARIANTES 1 E 2 DO GENE QUE
CODIFICA A FOSFATASE ALCALINA EM CÉLULAS TRONCO DERIVADAS DE
TECIDO ADIPOSEO INDUZIDAS COM DEXAMETASONA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Andrés Delgado Cañedo

São Gabriel

2014

Ficha catalográfica elaborada automaticamente com os dados fornecidos
pelo(a) autor(a) através do Módulo de Biblioteca do
Sistema GURI (Gestão Unificada de Recursos Institucionais) .

K592i Kercher, Dione Larissa
Identificação da expressão das variantes 1 e 2 do gene que
codifica a fosfatase alcalina em células tronco derivadas de
tecido adiposo induzidas com dexametasona. / Dione Larissa
Kercher.
59 p.

Dissertação (Mestrado)-- Universidade Federal do Pampa,
MESTRADO EM CIENCIAS BIOLOGICAS, 2014.
"Orientação: Andrés Delgado Cañedo".

1. Genética. 2. Biologia Molecular. 3. Cultura Celular. I.
Título.

DIONE LARISSA KERCHER

**IDENTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO DAS VARIANTES 1 E 2 DO GENE QUE
CODIFICA A FOSFATASE ALCALINA EM CÉLULAS TRONCO DERIVADAS DE
TECIDO ADIPOSEO INDUZIDAS COM DEXAMETASONA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas.

Área de Concentração: Genética

Dissertação defendida e aprovada em 24 de Março de 2014.
Banca examinadora:

Prof. Dr. Andrés Delgado Cañedo
Orientador - UNIPAMPA

Prof^a. Dr^a. Melissa Camassola
Membro Titular - ULBRA

Prof. Dr. Juliano Tomazzoni Boldo
Membro Titular - UNIPAMPA

Prof^a. Dr^a. Thais Posser
Membro Titular - UNIPAMPA

Prof. Dr. Jeferson Franco
Suplente - UNIPAMPA

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, que sempre batalharam para que eu chegasse onde estou hoje, e ter conseguido tudo que já conquistei, pela confiança que eles têm em mim, pelo incentivo, o carinho, a amizade e pela paciência. Devo a eles a maravilhosa vida que tenho!

Ao meu orientador, o Prof. Dr. Andrés Delgado Cañedo, por TUDO! Sei que sempre poderei contar com ele.

Aos amigos e colegas de laboratório, Adriana Sassi, Adriano de Paula, Fabiano Torres, Mariana Sônego, Viviane Ulbrich, Rafael Matielo, Letiane da Ponte, Ana Paula Zemolin, que sempre deram aquela forcinha quando precisei.

Aos Amigos Douglas Santos, Ana Paula Ternes, Pabulo Rampelotto, Everton Cadaval, por todo apoio e ajuda na elaboração, execução e escrita desse trabalho.

Ao Leandro Santos e à Bruna Torres, meus amigos e colegas de casa, que me aturam todos os dias, me fazem rir, e que me dão força e coragem para seguir em frente.

À banca examinadora, por terem aceitado o convite.

Aqueles que por ventura não foram mencionados e tiveram alguma colaboração com este trabalho, sintam-se incluídos.

RESUMO

Células tronco são células indiferenciadas e multipotentes, capazes de se diferenciar nos mais diversos tipos celulares. São definidas por duas características principais, a autorrenovação e o potencial de diferenciação. Devido ao seu potencial de diferenciação, facilidade de isolamento e expansão em cultura, as células tronco mesenquimais (Mesenchymal Stem Cell – MSCs) são largamente utilizadas em testes para o tratamento de inúmeras doenças, como doenças cardíacas, mieloma e osteoartrite. O corticosteroide dexametasona é amplamente utilizado como indutor de diferenciação óssea em células tronco e está envolvido no aumento da atividade da enzima fosfatase alcalina (ALP). Há quatro genes que codificam a ALP: ALPL, ALPP, ALPPL2 e ALPI. A ALPL é um dos principais marcadores de diferenciação óssea promovida pelo tratamento com dexametasona, esse gene possui três diferentes variantes que são geradas por *splicing* alternativo. Porém, até hoje não se tem conhecimento de qual dessas variantes atua na deposição de matriz óssea. O objetivo do trabalho foi analisar, por PCR quantitativo (qPCR), a atividade das variantes de ALPL durante a diferenciação de MSCs tratadas com dexametasona. Os primers das três variantes do gene ALPL foram desenhados pelo nosso grupo de pesquisa. Para o experimento, aproximadamente 3×10^4 células por mL foram semeadas em placa de cultura. Para o tratamento utilizou-se dexametasona $10^{-7}M$, tendo como período de tratamento 0, 3 e 7 dias. Os resultados da qPCR mostraram que os primers desenhados possuem uma eficiência superior a 90% e $R^2 = 1$, sendo os primers da variante 2 mais eficiente que os primers da variante 1, e os primers de ambas as variantes mais eficientes que os primers de ALP atualmente utilizados. Os primers da ALPL/v3 não apresentaram amplificação. Nossa análise estatística indica que a diferença de expressão entre as células tratadas e os controles se mostrou relevante, apontando para um grande aumento de ALPL/v1 nas células tratadas. A expressão de ALPL/v2, apesar de significativa entre os controles e tratados, é baixa quando comparada à ALPL/v1. Os resultados obtidos neste trabalho indicam que a dexametasona, além de aumentar a atividade do promotor de ALPL, também dá preferência ao *splicing* alternativo que origina o mRNA da variante 1 do gene.

Palavras chave: diferenciação osteogênica, células tronco mesenquimais, dexametasona, fosfatase alcalina

ABSTRACT

Stem cells are undifferentiated and pluripotent cells that are able to differentiate into several cell types. Stem cells are distinguished from other cell types by two important characteristics: self-renewal and differentiation potential. Due to their differentiation potential and easiness for isolate and growth in vitro, mesenchymal stem cells (MSCs) are widely used in trials for the treatment of numerous diseases such as heart disease, myeloma and osteoarthritis. The corticosteroid dexamethasone is broadly used to induce bone differentiation in stem cells and is involved in the increased activity of alkaline phosphatase (ALPL). There are four genes coding ALP: ALPL, ALPP, ALPPL2 and ALPI. The ALPL is one of the main markers for bone differentiation stimulated by dexamethasone. This gene has three different variants which are generated by alternative splicing. However, to date it is not known which of these variants act in the bone matrix deposition. In this context, the aim of this work was to analyze the activity of ALPL variants during the differentiation of MSCs treated with dexamethasone. Primers for the three ALPL variants were designed by our group. For the experiment, approximately 3×10^4 cells per ml were seeded in culture plate. For treatment, we used 10^{-7} M dexamethasone for 0, 3 and 7 days. The qPCR results showed that the primers designed had an amplification efficiency higher than 90% and $R^2 = 1$; variant 2 (V2) primers was more efficient than the variant 1 (V1) primers and primers of both variants are more efficient than the currently used ALP primers. The primers of ALPL/v3 showed no amplification. Our statistical data showed that the differences in expression between treated and control cells were significant, indicating an expressive increase of ALPL/v1 in treated cells. The expression of ALPL/v2, although significant between controls and treated cells, was low when compared to ALPL/v1. The results of this study indicate that dexamethasone, besides increasing the activity of the ALPL promoter, gives preference to alternative splicing that originates the variant1 mRNA.

Keywords: osteogenic differentiation, Mesenchymal stem cell, dexamethasone, alkaline phosphatase

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Manuscrito:

Tabela 1. Oligonucleotide sequence, amplicon size and cycling conditions used in the RT-PCR and qPCR.	29
Figura 1. Real time qPCR analysis of ALP. ALPL/v1, ALPL/v2 expression in human AD-MSCs.	30

Dissertação:

Figura 1. Amplificação por PCR em gel de agarose 1,5%.	55
Figura 2. Curva de eficiência dos primers do gene ALP.	55
Figura 3. Curva de eficiência dos primers do gene ALP/v1.	56
Figura 4. Curva de eficiência dos primers do gene ALP/v2.	56
Figura 5. Curva de eficiência dos primers do gene Beta-actina.	57
Figura 6. Curva de eficiência dos primers do gene GAPDH.	57
Figura 7. Curvas de dissociação do gene ALPL/v2	58
Figura 8. Predição de peptídeo sinal nas três variantes do gene ALPL.	59

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
1.1. Caracterização	10
1.2. Obtenção e potencial de proliferação	12
1.3. Diferenciação	13
1.4. Potencial em terapias celulares	15
1.5. A Dexametasona na indução de diferenciação óssea	15
1.6. Função da Fosfatase Alcalina na diferenciação óssea	17
2. OBJETIVO GERAL	20
2.1. Objetivos específicos	20
3. MANUSCRITO	21
4. CONCLUSÕES.....	31
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	32
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA DISSERTAÇÃO	33
7. ANEXO 1	44
7.1. Metodologia detalhada.....	44
8. ANEXO 2	47
8.1. Resultados e Discussão não incluídos no artigo	47
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DO ANEXO 2	53

1. INTRODUÇÃO

1.1. Caracterização das células tronco mesenquimais

Células tronco são células indiferenciadas e pluripotentes capazes de se diferenciar nos mais variados tecidos do corpo. Elas podem ser definidas por duas propriedades peculiares: autorrenovação e potencial de diferenciação. A autorrenovação é a capacidade que estas células têm de proliferar, gerando células idênticas à original. Já o potencial de diferenciação é a capacidade que as células tronco têm de, quando em condições favoráveis, gerar células especializadas e de diferentes tecidos (revisado por Bydlowski et al., 2009; Solozobova et al., 2012 e Williams and Hare, 2011).

Células tronco mesenquimais (Mesenchymal Stem Cell – MSCs) são caracterizadas, em geral, pela sua capacidade de proliferar em cultura, sua morfologia, pela presença de um conjunto sugerido de marcadores de proteínas de superfície e a sua capacidade de diferenciação consistente *in vitro* em múltiplas linhagens de células, quando em condições controladas (Pittenger et al. 1999).

O conceito de células tronco mesenquimais é originário de trabalhos realizados pelo grupo de pesquisa de Alexander Friedenstein há cerca de quatro décadas atrás. Nesses trabalhos foi observado que, quando as células da medula óssea eram submetidas à aderência ao plástico, uma pequena população se desenvolvia em Unidades Formadoras de Colônia semelhantes a Fibroblastos (UFC-F) (Lazarotto-Silva, 2009; revisado por Bydlowski et al., 2009). Após a expansão *in vitro*, as culturas clonais providas dessas UFC-F puderam ser introduzidas em modelos experimentais onde a formação de osso, cartilagem e elementos estromais foi observada (Castro-Malaspina et al. 1980).

As MSCs são um tipo de célula tronco adulta, que apresentam grande plasticidade e podem ser facilmente obtidas e expandidas *in vitro* sem perder seu potencial de diferenciação (revisado por Punwar and Khan, 2011). As MSCs são encontradas na medula óssea, imersas no estroma, e são capazes de gerar ossos, tendões, cartilagem, tecidos adiposo e muscular, estroma medular e até mesmo células com características neurais (Kopen et al., 1999). As MSCs podem ser encontradas também nos tecidos mesenquimais presentes em todos os órgãos do corpo (da Silva Meirelles & Nardi 2003). Elas fornecem suporte estrutural, além de regular a passagem de células através dos tecidos e também são capazes de expressar os marcadores de indiferenciação OCT-4, NANOG e SSAE 3/4 (Kaveh et al., 2011).

As MSCs podem ser expandidas e induzidas *in vitro* a se diferenciarem, mas estão limitadas à diferenciação nos diferentes tipos celulares esqueléticos encontrados em várias fases do desenvolvimento, assim como em sítios anatômicos específicos. Esses tipos celulares podem ser osteoblastos, condrócitos, adipócitos, fibroblastos e células reticulares e, embora muitos trabalhos afirmem que as MSCs também podem dar origem a outros tipos celulares de origem mesodérmica como músculo esquelético, músculo liso, músculo cardíaco e células endoteliais, esta alegação ainda não está comprovada experimentalmente e, assim, o assunto permanece controverso (revisado por Bianco et al. 2008).

Atualmente existe um conjunto de critérios para que possamos definir as MSCs humanas. Esses critérios foram propostos pelo Comitê de Células Tronco Mesenquimais e Teciduais da Sociedade Internacional de Terapia Celular (SITC). Os critérios são: a) as MSCs necessitam ser aderentes ao substrato (plástico) quando em condições padrão de cultivo *in vitro*; b) as MSCs devem expressar as proteínas de superfície CD105, CD73 e CD90, e não expressar as proteínas CD45, CD34, CD14 ou CD11b, CD79 α ou CD19, e HLA-DR.; c) as MSCs precisam se diferenciar *in vitro* em osteoblastos, adipócitos e condrócitos (Dominici et al. 2006; revisado por Bydlowski et al., 2009).

Não há marcadores específicos para o reconhecimento das MSCs, mas existem anticorpos para vários antígenos de superfície que podem ser usados para este fim. Estudos realizados em culturas de MSCs não clonais apresentam um perfil de expressão característico de proteínas de superfície: CD34-, CD45-, CD14-, CD13+, CD29+, CD44+, CD49a+, CD63+, CD90+, CD105+, CD106+, CD146+, CD166+ (Deschaseaux & Charbord 2000, Filshie et al. 1998, Stewart et al. 2003, Vogel et al. 2003, Zannettino et al. 2003).

As MSCs humanas possuem morfologia semelhante a um fibroblasto e param de proliferar antes das 40 duplicações populacionais, momento no qual estas células se tornam maiores e mais achatadas, o que provavelmente pode ser associado ao fenômeno de senescência *in vitro* (Bruder et al. 1997). Um dos mecanismos que levam à senescência celular é o encurtamento dos telômeros sofrido durante o cultivo *in vitro*.

Diversos autores têm estudado o tamanho dos telômeros das MSCs, bem como o encurtamento sofrido durante o cultivo *in vitro*. Como esperado, os telômeros de MSCs derivadas de doadores jovens são maiores que os de doadores velhos. Esses mesmos estudos concordam que ocorre diminuição do tamanho dos telômeros a cada divisão celular, tanto em cultura quanto *in vivo*, em aproximadamente 1,5-2 kb. Quando os telômeros atingem o

tamanho limite de cerca de 10 kb, as células deixam de se dividir e assumem um fenótipo senescente. (Baxter et al. 2004; Mareschi et al. 2006).

Os telômeros são estruturas que cobrem as extremidades dos cromossomos impedindo que eles sejam reconhecidos como DNA quebrado precisando de reparos e vão se encurtando a cada ciclo de síntese de DNA, uma vez que não consegue replicar completamente as extremidades de moléculas lineares, sendo essas extremidades sintetizadas por uma enzima conhecida como telomerase (Wright and Shay, 2002).

A telomerase apresenta baixos níveis de atividade nas células tronco adultas, e o mesmo ocorre nas MSCs (revisado por Roobrouck et al. 2008). Mesmo sendo expressa em baixos níveis nas MSCs, e não tendo influência direta na replicação celular, a telomerase parece ser necessária para a diferenciação *in vitro* dessas células, uma vez que MSCs isoladas de camundongo *nocauteados* para a enzima telomerase não conseguem se diferenciar em adipócitos e condrócitos, mesmo em estágios iniciais (Liu et al. 2004).

1.2. Obtenção e potencial de proliferação das células tronco mesenquimais

As MSCs já puderam ser isoladas de diversas espécies, entre elas humanos (Pittenger et al. 1999), camundongos (da Silva Meirelles & Nardi 2003), ratos (Rui et al. 2010), cachorros (Seo et al. 2012), gatos (Martin et al. 2002), babuínos (Devine et al. 2003), entre outras. O estroma da medula óssea é a fonte mais comumente utilizada para o isolamento de MSCs (Conget & Minguell 1999).

As MSCs podem ser obtidas não só a partir da medula óssea, já foi demonstrado que elas podem ser encontradas na maioria dos órgãos, no sangue periférico de fetos jovens (Campagnoli et al. 2001), no endotélio e subendotélio da veia do cordão umbilical (Covas et al. 2003), no sangue do cordão umbilical (Revencu et al. 2013), na placenta (In't Anker et al. 2004) e no fluido amniótico do segundo trimestre de gestação (Tsai et al. 2004). As MSCs podem também ser isoladas de vários tecidos adultos, como por exemplo, tecido adiposo, muscular, epitelial (Zuk et al. 2001; Young et al. 2001).

MSCs obtidas de doadores mais velhos exibem uma redução do potencial de expansão, uma taxa de proliferação mais lenta desde as primeiras passagens, menor assiduidade na medula óssea, uma morfologia mais larga e achatada, e também alterações no seu potencial de diferenciação (Banfi et al. 2000; Stolzing et al. 2008; Zhou et al. 2008). Vários grupos têm estudado a capacidade de diferenciação osteogênica de MSCs originárias

de doadores jovens e velhos. A maior parte desses estudos relatam uma diminuição na produção de fosfatase alcalina conforme a idade dos doadores aumenta. Alguns destes estudos também demonstram uma perda do potencial condrogênico relacionada à idade dos doadores (revisado por Roobrouck et al. 2008).

Muitos trabalhos descrevem uma redução na geração de células UFC-F positivas para fosfatase alcalina, diretamente ligada ao aumento da idade do doador (D'Ippolito et al. 1999; Baxter et al. 2004; Zhou et al. 2008). Porém, Stenderup et al. (2003), não observaram diferença no potencial de diferenciação osteogênico e adipogênico *in vitro*, nem de diferenciação osteogênica *in vivo*, quando comparados doadores jovens e idosos. O grupo de Mendes e colaboradores mostrou que MSCs derivadas, tanto de doadores jovens como de idosos, foram capazes de formar osso *in vivo*, porém a formação de osso foi reduzida significativamente com o aumento da idade (Mendes et al. 2002).

O potencial de proliferação das MSCs se apresenta de forma bastante variável na literatura, devido às diferentes metodologias usadas no isolamento das culturas e às diferentes técnicas utilizadas para a determinação da sua capacidade de proliferação. A densidade inicial de células é também um fator crítico no potencial de expansão de uma cultura de MSCs. Diversos trabalhos demonstram que as culturas têm uma capacidade de expansão maior quando plaqueadas em baixa densidade, provavelmente porque em alta densidade o contato célula-célula ou fatores secretados no meio induzem taxas de crescimento mais baixas (Colter et al. 2000, 2001; Sekiya et al. 2002)

1.3. Diferenciação das células tronco mesenquimais

Muitos estudos têm observado o potencial de diferenciação *in vitro* das MSCs, onde as condições ideais de cultura, os estímulos apropriados e os métodos corretos para a identificação do fenótipo diferenciado vêm sendo determinados (Lazzarotto-Silva, 2009).

Já foi possível estabelecer, *in vitro*, a diferenciação das MSCs em células ósseas, células adiposas, em condrócitos e cardiomiócitos (Phinney et al. 1999; Johnstone et al. 1998; Glennon-Alty et al. 2013; Xu et al. 2004). A adipogênese pode ser induzida pelo tratamento com 1-metil-3-isobutilxantina, dexametasona (dexa) e indometacina. Essa diferenciação pode ser comprovada pelo acúmulo de vacúolos lipídicos no interior das células, pela expressão do receptor de proliferação PPAR γ 2, da lipoproteína lipase e da proteína de ligação do ácido graxo aP2. Para promover a condrogênese, as MSCs são induzidas por fatores de crescimento

da superfamília TGF (transforming growth factor), como TGF- β 1, TGF- β 3, e BMP-2 (bone morphogenetic protein)-2, BMP-6 e BMP-9. Comprova-se essa diferenciação pela presença de marcadores condrogênicos. Quando tratadas com dexametasona, β -glicerofosfato e ácido ascórbico, as MSCs isoladas formam nódulos celulares e aumentam, de 4 a 10 vezes, a expressão de fosfatase alcalina, gerando depósito de cálcio nas células (diferenciação osteogênica) (Pittenger et al. 1999; Shintani et al. 2013; Peran et al. 2013).

Devido ao grande potencial de diferenciação das MSCs, estas células são amplamente utilizadas em testes para o tratamento das mais variadas doenças. Há inúmeros trabalhos que mostram o uso de células tronco na recuperação do coração pós-infarto do miocárdio (Hoover-Plow and Gong, 2012; Hui-he et al., 2012) e também outras doenças cardíacas (Williams and Hare, 2011). Outros trabalhos mostram o uso de células tronco no auxílio do tratamento contra mieloma e incontinência urinária (Reece, 2011; Dissaranan et al., 2011). As células tronco também são usadas na tentativa de produzir tecido cartilaginoso, o qual é usado no reparo de danos a cartilagem e de doenças como osteoartrite generalizada (revisado por Gadjanski et al., 2012 e Punwar and Khan, 2011).

Durante a diferenciação osteogênica de MSCs, várias mudanças na expressão gênica ocorrem. As mais notáveis são o aumento na expressão da fosfatase alcalina, osteopontina, osteocalcina, colágeno tipo I e fator de ligação do núcleo α 1. O aumento de expressão destes genes em MSCs é um indicativo de diferenciação osteogênica. Quando as células osteoprogenitoras se submetem ao procedimento de formação de osso novo, a atividade de fosfatase alcalina é muito baixa, mas aumenta durante a diferenciação e maturação da matriz. Enquanto os osteoblastos estão se transformando em osteócitos, essa atividade estaria ausente. A atividade da fosfatase alcalina geralmente aparece antes da osteocalcina, o que implica que a fosfatase alcalina é um indicador precoce da linhagem dos osteoblastos, enquanto osteocalcina é encontrada em um fenótipo osteoblástico mais maduro (Groot et al., 1986; Vermeulen et al., 1989). A situação *in vitro* é semelhante à *in vivo*; quando a proliferação diminui, ocorre um aumento na expressão de fosfatase alcalina e a expressão de osteocalcina ocorre nas últimas fases da diferenciação osteogênica. Em geral, a atividade da fosfatase alcalina e da osteocalcina são usadas como marcadores para a identificação de osteoblastos (revisado por Kaveh et al., 2011 e Lian and Stein 1995).

1.4. Potencial em terapias celulares das células tronco mesenquimais

A facilidade de isolamento e expansão em cultura das MSCs, o fato de serem altamente multipotentes, suas propriedades imunomodulatórias e sua capacidade de se dirigir à sítios de inflamação quando injetadas por via intravenosa (Chapel et al. 2003; Ortiz et al. 2003), torna sua aplicação em terapias celulares e no tratamento de diversas doenças muito visada. Por exemplo, depois da injeção direta de MSCs em miocárdio infartado de suínos, se observou que as células inseridas no animal se diferenciaram em linhagens miogênicas, expressando proteínas musculares específicas, e sendo capazes de mitigar a disfunção cardíaca dos animais (Shake et al. 2002).

O fator básico na homeostase óssea é o balanço entre os osteoblastos (células produtoras de osso) e os osteoclastos (células que reabsorvem osso). As MSCs interferem diretamente na homeostase óssea, pela taxa de produção de osteoblastos e de fatores que afetam o balanço osteoblasto/osteócito (Lazzarotto-Silva, 2009). Nas doenças que causam lesão devido a trauma, doenças congênitas e degenerativas e também no câncer, a substituição óssea é um dos maiores desafios na pesquisa ortopédica e traumatológica (Niemeyer et al. 2006) e estas células poderiam ser usadas no tratamento.

O uso de modelos animais e humanos mostrou que a regeneração de deformidades ósseas teve maior sucesso quando os grupos receberam a matriz com MSCs, em relação aos grupos que receberam a matriz sem MSCs (Perka et al. 2000; Quarto et al. 2001). Como citados na revisão feita por Giordano et al. (2006), há vários ensaios clínicos sendo realizados na tentativa de encontrar um tratamento mais eficaz para diversas doenças como a osteogenesis Imperfecta, esclerose lateral amiotrófica, doenças hematológicas e cardiovasculares.

1.5. A Dexametasona na indução de diferenciação óssea

O primeiro trabalho com dexametasona no tratamento de células tronco para diferenciação celular *in vitro* foi realizado por Maniatopoulos et al. (1988). Neste trabalho os autores cultivaram as células tronco em meio com 10^{-8} M de dexametasona e obtiveram como resultado que esta substância foi o principal fator para a diferenciação das células tronco em tecido ósseo. A dexametasona é um corticosteroide sintético que atua no controle da velocidade de síntese de proteínas. Seu efeito principal é a alteração promovida na resposta

imunológica linfocitária, devido à ação anti-inflamatória e imunossupressora, podendo prevenir ou suprimir processos inflamatórios de várias naturezas (Hunter e Lobo, 2011; Hoch et al., 2012; revisado por Kaveh et al., 2011).

Embora a dexametasona não seja encontrada naturalmente no corpo, ela mimetiza as ações de vários glicocorticóides localizados naturalmente no organismo, tais como o cortisol, estradiol, testosterona, vitamina D3, tiroxina e ácido retinoico (revisado por Kaveh et al., 2011). A dexametasona oferece suporte à diferenciação osteogênica devido a sua ligação com algumas proteínas reguladoras específicas na célula e, em seguida, ativa a transcrição de genes específicos de osteoblastos. *In vitro*, o tratamento com dexametasona aumenta a atividade de fosfatase alcalina, que é necessária para a mineralização da matriz e transformação da morfologia das MSCs de fusiforme para cuboidais (Cheng et al., 1994; Peter et al., 1998; Park, 2014). Existem também evidências de que a dexametasona funciona em vários pontos no processo de diferenciação para estimular a maturação dos osteoblastos. Se a dexametasona é removida da cultura *in vitro*, uma grande quantidade de células podem regredir para uma condição mais indiferenciada ou se diferenciar, por exemplo, em tecido adipogênico. Portanto, é necessário que sempre haja dexametasona no meio de cultura para se conseguir a diferenciação das MSCs em osteoblastos (Porter et al., 2003). Contudo, a presença por um período muito prolongado de dexametasona no meio de diferenciação pode ter um efeito tóxico sobre os osteoblastos e provocar sua lise, assim sendo, os osteoblastos devem ser utilizados logo após estarem completamente diferenciados (revisado por Kaveh et al., 2011).

O trabalho realizado por Both et al. (2007), demonstrou que durante a expansão celular o uso de dexametasona no meio de crescimento é o método mais rápido e eficiente para se expandir MSCs. Demonstraram também que o uso de dexametasona na expansão celular não interfere no seu potencial osteogênico.

Hintze et al. (2012), demonstraram que nos revestimentos de superfície de matrizes extracelulares artificiais de colágeno contendo colágeno II e ácido hialurônico sulfatado a dexametasona estimulava a diferenciação osteogênica de MSCs, o que é demonstrado pelo aumento da atividade de ALP (fosfatase alcalina total), pelo depósito de cálcio e pela expressão dos marcadores osteogênicos. Para os pesquisadores, estes resultados indicam o potencial da dexametasona em aumentar a formação de ossos quando utilizados como revestimentos de implantes, em particular em pacientes com qualidade óssea comprometida, por exemplo, nos casos de diabetes ou osteoporose.

Os resultados apresentados no trabalho de Beloti e Rosa (2005), indicam que a exposição de cultura primária à dexametasona exerce um papel crucial no desenvolvimento inicial de osteoblastos, expresso por proliferação celular reduzida e um aumento da atividade de ALP e formação óssea. E indicam também que a ausência de dexametasona na cultura primária causou um atraso na diferenciação dos osteoblastos.

1.6. Função da Fosfatase Alcalina na diferenciação óssea

Um dos principais marcadores de diferenciação óssea pelo tratamento com dexametasona é o aumento na atividade das fosfatases alcalinas, as quais atuam removendo grupos fosfato de um grande número de moléculas diferentes, incluindo nucleotídeos, proteínas e alcaloides. No genoma humano existem quatro genes que codificam fosfatases alcalinas: a) fosfatase alcalina placentar (ALPP) – que é expressa principalmente na placenta, embora esteja estreitamente relacionada com a forma intestinal da enzima; b) fosfatase alcalina placentar like (ALPPL2) – é expressa nos testículos, timo e tumores de determinadas células germinativas e está intimamente relacionada às formas placentar e intestinal; c) fosfatase alcalina intestinal (ALPI) – este gene codifica uma enzima digestiva; d) fosfatase alcalina de osso/fígado/rim (ALPL) – a função proposta para o produto da expressão desse gene é a mineralização da matriz óssea (Peng et al., 2012; Singh et al., 2012; revisado por Golub and Boesze-Battaglia, 2007).

A ALPL apresenta três variantes distintas, geradas por *splicing* alternativo. A variante 1 de ALPL representa o transcrito mais longo e conseqüentemente codifica a mais longa das isoformas. A variante 2 desse gene não tem uma porção da região codificadora 5', e inicia a tradução a jusante do códon de iniciação, em comparação com a variante 1. A isoforma 2 codifica um transcrito mais curto do que uma isoforma 1. A variante 3 também não possui uma porção da região codificadora 5' e inicia a tradução em um códon de iniciação alternativo. Esta isoforma não possui um éxon na região 5' quando comparada a isoforma 1; o transcrito codificado pela 3 variante possui um N-terminal único e é mais curto do que o da isoforma 1 (dados depositados em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>).

Apesar da função proposta para a ALPL ser a mineralização da matriz óssea, o trabalho realizado por Waymire et al. (1995) mostra que ratos que não possuem uma forma funcional desta enzima apresentaram desenvolvimento normal do esqueleto; porém, posteriormente apresentaram problemas ósseos, paralisia e acabaram morrendo precocemente.

Maniatopoulos et al. (1988) também analisaram a atividade da fosfatase alcalina e encontraram um aumento dessa atividade em células diferenciadas em tecido ósseo. Boskey et al. (2008) utilizaram inibidores de fosfatase e avaliaram a deposição de matriz óssea nas células. Dos inibidores utilizados (apigenina, inibidor de CK2 II, ácido ocadaico, caliculina A, microcistina LR e Levamisole), a apigenina e o inibidor de CK2 II reduziram a taxa de deposição mineral, mas não bloquearam a mesma. O ácido ocadaico, caliculina A e microcistina LR inibiram acentuadamente a deposição mineral, já Levamisole não apresentou nenhum efeito na deposição mineral.

O trabalho realizado por D'Ippolito et al. (1999), mostrou que, em culturas primárias tratadas com dexametasona, mais de 90% das colônias eram positivas para ALP quando comparadas a um número menor que 50% na sua ausência. Visualmente, a atividade de ALP parecia ser consistentemente mais elevada em células cultivadas na presença de dexametasona. A ALP é um marcador osteogênico primário, onde sua expressão aumenta até aproximadamente o sétimo dia de cultura e após esse período os níveis de expressão da fosfatase começam a decair, momento no qual outros marcadores ósseos, como a osteocalcina, começam a se destacar (Park et al. 2009).

O alto nível de expressão de ALP no osso foi observado há mais de 80 anos atrás, e a primeira hipótese para explicar por que ALP é importante para a formação de tecido ósseo foi formulada; nessa hipótese, a ALP seria a responsável pelo aumento da concentração local de fosfato inorgânico, um conceito conhecido como a "hipótese de reforço". À medida que se obteve maior conhecimento sobre a biologia dos tecidos ósseos e metabolismo mineral, o papel da ALP como um marcador para a atividade osteogênica tornou-se mais consistente. Em contraste, o mecanismo detalhado de como funciona a ALP em tecidos ósseos é frequentemente considerada controversa. Assim, enquanto que a medição do aumento da expressão de ALP enzimaticamente, histoquimicamente ou ao nível do mRNA é tomado como uma indicação fiável de fenótipo osteoblástico, condrocítico ou odontoblástica, a função deste aumento na expressão de ALP é menos clara (Golub and Boesze-Battaglia, 2007).

A chave para a compreensão do papel da ALP na mineralização é fornecida por estudos da expressão de genes em diferentes fases durante a diferenciação osteoblástica e calcificação da placa de crescimento da cartilagem. Nos dois tecidos a ALP é expressa precocemente no desenvolvimento, e logo é observada na superfície da célula e em vesículas de matriz. Mais tarde no desenvolvimento, quando outros genes (como a osteocalcina) são regulados, a expressão ALP diminui. Portanto está claro que a ALP deve funcionar nas fases

iniciais do desenvolvimento (revisado por Golub and Boesze-Battaglia, 2007). As principais vias reguladoras que controlam a diferenciação dos osteoblastos, a expressão de ALP e a condrogênese são BMP, RUNX2 e o sistema osterix (Gaur et.al, 2005/2006).

A ALP é um dos primeiros genes funcionais expressos no processo de calcificação. Portanto, é provável que pelo menos um dos seus papéis no processo de mineralização ocorra numa etapa precoce. Uma pista para o papel da ALP na calcificação veio de estudos de pacientes com hipofosfatase, cuja doença resulta de mutações mis-senso do gene que codifica a ALP, levando a uma atividade de fosfatase ausente ou diminuída. No sangue e na urina, os níveis de fosfoetanolamina, piridoxal-5'-fosfato e pirofosfato inorgânico (PPi) são elevados nestes pacientes, mostrando que estes compostos são substratos para esta fosfatase (Whyte, 1994; revisado por Golub and Boesze-Battaglia, 2007).

O maior interesse de estudo está voltado ao inibidor da mineralização PPi, como o regulador chave de calcificação. É comentado, na revisão realizada por Terkeltaub (2001), que a geração de fosfato inorgânico (Pi) pela fosfatase alcalina osso/fígado/rim através da hidrólise de PPi, parece ser o mecanismo central através da qual ela exerce efeitos estimuladores, fisiologicamente essenciais na mineralização da matriz óssea (Johnson et al., 2000; revisado por Golub and Boesze-Battaglia, 2007).

A produção de matriz óssea depende da relação entre PPi e Pi, uma vez que o PPi inibe a formação de hidroxiapatita (Negri, 2011). A ALP tem como função promover a mineralização diminuindo os níveis de PPi e aumentando a concentração do promotor de mineralização (Pi) (Harmey et al., 2004).

No entanto, até hoje nenhum trabalho se aprofundou o suficiente no estudo das fosfatases alcalinas para saber qual ou quais dos quatro genes ou suas variantes é/são o/s responsável/eis pelo aumento dessa atividade. Apesar de existirem vários trabalhos usando a dexametasona como indutor de osteogênese, ainda não está clara a atuação da dexametasona neste processo. Nesta dissertação de mestrado nós avaliamos a expressão das variantes da fosfatase alcalina osso/fígado/rim durante a diferenciação em osso de células tronco mesenquimais tratadas com dexametasona.

2. OBJETIVO GERAL

Obter dados que colaborem no melhor entendimento dos efeitos da dexametasona na expressão dos genes da fosfatase alcalina durante a diferenciação osteogênica de células tronco mesenquimais.

2.1. Objetivos específicos

Identificar qual/quais gene/s que codificam as fosfatases alcalinas são expressos na diferenciação das células tronco mesenquimais tratadas com dexametasona;

Identificar, nos genes expressos, quais são as variantes que participam nesta expressão.

Identificar qual/quais variantes da ALPL possuem potencial para codificar a enzima extracelular durante a diferenciação de células tronco mesenquimais tratadas com dexametasona.

3. MANUSCRITO

Title: Discrimination among alkaline phosphatase variants by qPCR demonstrates expression of ALPL variant 1 and 2 during dexamethasone treatment of AD-MSCs

Abstract

Stem cells are undifferentiated and pluripotent cells able to differentiate in to several cellular types and they have two main characteristics: self-renewal and differentiation potential. Because its differentiation potential and to be relatively easy to obtain and to expand in vitro, mesenchymal stem cells are widely used in cell therapy. In osteogenic differentiation protocols dexamethasone is one of the most used drugs. Although the real mechanism to induce differentiation is not totally known, it is proposed that the main role could be the alkaline phosphatase gene (ALP) upregulation. There are four genes coding ALPs, also some ALP coding genes may suffer alternative splicing generating different variants. Between them, the main marker is the ALPL gene, which has six known variant. Some of these variants produce secreted ALPL and others produce intracellular ones; however, total ALPL is used indiscriminately as an osteogenic differentiation marker. In this work, we analyzed by RT-PCR all the known ALP genes, discriminating three ALPL variants during dexamethasone-induced MSC differentiation. Only the amplification of ALPL variant 1 and 2 was observed. Thus, these two variants were analyzed by qPCR in order to understand the expression dynamics. We observed variation between the samples and also a high increase of the variant-1 expression at the seventh day after dexamethasone exposure, while the variant-2 expression was not altered in the same mode. Moreover, we evaluated the two variant *in silico* demonstrating that only the protein coded by the variant-1 possess

signal peptide and, therefore, could be secreted. Therefore we propose the variant-1 analysis as the osteogenic differentiation marker.

Keywords: osteogenic differentiation, Mesenchymal stem cell, dexamethasone, alkaline phosphatase, adipose derived stem cell

Text

Stem cells are undifferentiated and pluripotent cells able to differentiate in to several cell types. They have two important characteristics: self-renewal and differentiation potential (Solozobova et al., 2012 e Williams and Hare, 2011).

Mesenchymal stem cells (MSCs) are adult stem cells characterized by the proliferation in culture medium, morphological shape, presence and absence of some plasma membrane markers cluster and their capacity of osteogenic, chondrogenic and adipogenic differentiation in vitro (Pittenger et al. 1999). They can be found in both bone marrow stroma and mesenchymal tissues (da Silva Meirelles & Nardi 2003).

MSCs were already differentiated into osteocyte, adipocyte, chondrocytes, cardiomyocytes and other cell types (Phinney et al. 1999; Johnstone et al. 1998; Glennon-Alty et al. 2013 Xu et al. 2004). For osteogenic differentiation, MSCs are treated with dexamethasone, β -glycerophosphate and ascorbic acid, forming cellular nodules with bone-matrix deposition. During this process several changes in gene expression occur. Among the most notable is the increase in the expression of alkaline phosphatase, osteocalcin and osteopontin (Pittenger et al. 1999).

Dexamethasone is a synthetic corticosteroid that acts controlling the protein synthesis rate. It is not found naturally in the body and mimics the actions of various glucocorticoids found naturally in the body. In osteogenic differentiation

dexamethasone increases the alkaline phosphatase (ALP) expression (Hoch et al. 2012) being the major osteogenic differentiation marker currently used. The human genome have four genes encoding ALPs proteins: alkaline phosphatase bone/liver/kidney (ALPL); intestinal alkaline phosphatase (ALPI), placental alkaline phosphatase (ALPP) and placental-like alkaline phosphatase (ALPPL2). Only ALPL is considered to function in mineralization of bone-matrix, and this gene has different variants generated by alternative splicing, producing both intracellular and extracellular phosphatases. During the ossification process, ALPL could be responsible for increasing the local inorganic phosphate (Pi) concentration through the inorganic pyrophosphate (PPi) hydrolysis. Pi and calcium (Ca^{2+}) form hydroxyapatite crystals form the bone tissue (Harmey et al., 2004).

ALP activity increase not only happens during osteogenic differentiation, but also during the adipogenic differentiation, being associated with the lipid accumulation. However, during the adipogenic differentiation the presence or absence of dexamethasone in the culture medium does not affect the activity of ALP that, in this case, is influenced by the presence of 3-isobutyl-1-methylxanthine (Ali et al., 2006).

Studies aiming osteogenic differentiation which analyze total ALP expression and/or activity, neglect the cellular ALP location and produce inconsistent data by the lack of methodological standardization. For example, some authors quantify the ALP activity in centrifuged cell lysate and do not observe any increase in the enzyme activity due to the treatment (Innes et al., 2013). Other study using sonicated cell lysate and show an increase on ALPL activity (Hoch et al., 2012). This difference in the outcome can be attributed to the fact that the extracellular ALP, involved in hydroxyapatite deposit, is associated with the plasma membrane and may precipitate along with it

during centrifugation. Taking these inconsistent data in account we may ask ourselves: “what must we think when some author cites an ALP activity increase?”

In order to collaborate with this response we have designed primers to analyze the expression of all the known human ALPs, including primers for the three ALPL variants, during the dexamethasone treatment of adipose-derived MSCs. We also used primers previously design to amplify two endogenous genes (beta-actin and GAPDH) and the three ALPL variant indiscriminately (total ALPL). The primer sequences, RT-PCR and qPCR cycles used in this study are summarized in Table 1.

MSCs at the 7th passage were cultured in DMEM medium supplemented with 10% Bovine Fetal Serum (FBS) and submitted to osteogenic differentiation with 10^{-7} M dexamethasone during 7 days. Control and treated cells total RNA was extracted in 0, 3 and 7 days with ReliaPrepTM RNA Tissue Kit (Promega) and cDNA were synthesized with M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen) following manufacturers recommendation.

RT-PCR of all the samples showed amplification product for the endogenous genes, ALPL/total, ALPL/v1 and ALPL/v2 as in treated cells as in control cells (data not shown), suggesting that neither MSC expresses the other ALP genes nor dexamethasone stimulates their expression.

Amplification products were purified from agarose gel, quantified and used to analyze the primer amplification efficiencies by qPCR using Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen). Amplification efficiency was 92.3% e $R^2=1$ for ALPL/v1 and 93% e $R^2=1$ for ALPL/v2. The detection limit was 4.412 molecules for ALPL/v1 and 668 molecules for ALPL/v2, respectively. However, although the high efficiency index, both of primer pairs presented primer dimer at low molecule

concentrations and it is recommended to use the “fourth step”, to discriminate amplification product from primer dimmer, because of the low abundance of ALPL variants in some control samples. We use the “fourth step” performing the fluorescence read step at 80°C. This extra step was not necessary for endogenous or APL/total primer pairs. It is important to take into account that these primers were designed based on a short region to discriminate one ALPL variant from another and if they are not good enough as expected, they are the better possible primer to analyze the ALPL variants.

Expression values were worked out in molecule number relative to 100,000.00 endogenous molecules (using as endogenous molecule the mean between the two endogenous genes evaluated), performing ANOVA test to evaluate the variation between the control samples and the general effect of the dexamethasone treatment. When statistical significance was detected ($p < 0,05$) the Student T-test was applied to determine which were the populations that differ among each other, using the same p value cutoff.

qPCR data presented in Figure 1 show a broad heterogeneity in the ALPL expression regarding the sample of the three patients analyzed. This behavior has already been related by Siddappa et al. (2007) justifying it from the fact that each patient has a unique metabolism which behaves differently when subjected to the same treatment. Patient 1 (P1) did not shown variation in the expression of any variants nor ALPL/total over the periods of treatment with dexamethasone, however, their expression were high since the starting point of the experiment. Patient 2 (P2) and patient 3 (P3) did not present high ALPL/total expression in Day 0 but they arise during the dexamethasone treatment from Day3 (P3) or Day7 (P2) ($p < 2,23E^{-6}$; $p < 2,09E^{-8}$, respectively). When the two variants were discriminated, it was possible to observe that

both ALPL/v1 and ALPL/v2 showed a great increase in the expression in comparison to the controls (P2 $p < 3,47E^{-10}$; P3 $p < 4,92E^{-10}$ and P2 $p < 1,03E^{-10}$ P3 $p < 9,14E^{-11}$, respectively), but ALPL/v1 contributed more than ALPL/v2 in the ALPL/total expression (approximately 4X). Therefore, it can be proposed that dexamethasone induce an upregulation in the ALPL expression and stimulates the alternative splicing which produces the variant-1.

Moreover, we submitted the protein sequences of the two ALPL variants to the PrediSi online tool (<http://www.predisi.de>) in order to analyze if some of the variant could be secreted. The output (data not shown) demonstrated that only the protein coded by the variant-1 possess signal peptide and, therefore, could be secreted to act extracellularly, collaborating in the hydroxyapatite-matrix deposition.

In conclusion, our results provide a functional primer system to evaluate specifically the ALPL extracellular (ALPL/v1) and intracellular (ALPL/v2) variants, suggesting that, in osteogenic differentiation, dexamethasone induces the ALPL expression and also stimulates the alternative splicing which produces the extracellular variant1. At the same time, this work collaborates with Brini's idea (Brini et al. 2013) which proposes the use of specific markers in early stage of differentiation in order to select those samples presenting the better characteristic, avoiding negative results and saving time and financial resources.

References

Ali, A. T.; Penny, C. B.; Paiker, J. E.; Psaras, G.; Ikram, F.; Crowther, N. J. (2006). The relationship between alkaline phosphatase activity and intracellular lipid

- accumulation in murine 3T3-L1 cells and human preadipocytes. *Analytical Biochemistry*, 354(2), 247–254. doi:10.1016/j.ab.2006.04.028
- Brini, A. & Niada, S. (2013). Chondrogenic potential of human mesenchymal stem cells and expression of Slug transcription factor. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. doi:10.1002/term1772
- Glennon-Alty, L.; Williams, R.; Dixon, S.; Murray, P. (2013). Induction of mesenchymal stem cell chondrogenesis by polyacrylate substrates. *Acta biomaterialia*, 9(4), 6041–6051. doi:10.1016/j.actbio.2012.12.007
- Hoch, A. I.; Binder, B. Y.; Genetos, D. C.; Leach, J. K. (2012). Differentiation-dependent secretion of proangiogenic factors by mesenchymal stem cells. *PLoS One*, 7(4), e35579. doi:10.1371/journal.pone.0035579
- Innes, J. F.; Gordon, C.; Vaughan-Thomas, A; Rhodes, N. P.; Clegg, P. D. (2013). Evaluation of cartilage, synovium and adipose tissue as cellular sources for osteochondral repair. *The Veterinary Journal* (London, England: 1997), 197(3), 619–624. doi.org/10.1016/j.tvjl.2013.05.044
- Johnstone, B.; Hering, T. M.; Caplan, A. I.; Goldberg, V. M.; Yoo, J. U. (1998). In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Experimental cell research*, 238(1), 265–272. doi:10.1006/excr.1997.3858
- Meirelles, L. D. S. & Nardi, N. B. (2003). Murine marrow-derived mesenchymal stem cell: isolation, in vitro expansion, and characterization. *British Journal of Haematology*, 123(4), 702–711
- Harmey, D.; Hesse, L.; Narisawa, S.; Johnson, K. A.; Terkeltaub, R.; Milla, L. (2004). Concerted Regulation of Inorganic Pyrophosphate and Osteopontin by Akp2, Enpp1, and Ank. *American Journal of Pathology*, Vol. 164(4), 1199–1209
- Phinney, D. G.; Kopen, G.; Righter, W.; Webster, S.; Tremain, N.; Prockop, D. J. (1999). Donor variation in the growth properties and osteogenic potential of human marrow stromal cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, 75(3), 424–436

- Pittenger, M. F. (1999). Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells. *Science*, 284(5411), 143–147. doi:10.1126/science.284.5411.143
- Siddappa, R. & Licht, R. (2007). Donor variation and loss of multipotency during in vitro expansion of human mesenchymal stem cells for bone tissue engineering. *Journal of Orthopaedic Research*, 1029–1041. doi:10.1002/jor.20402
- Solozobova, V.; Wyvekens, N. & Pruszek, J. (2012). Lessons from the embryonic neural stem cell niche for neural lineage differentiation of pluripotent stem cells. *Stem Cell Reviews*, 8(3), 813–829. doi:10.1007/s12015-012-9381-8
- Williams, A. R. & Hare, J. M. (2011). Mesenchymal stem cells: biology, pathophysiology, translational findings, and therapeutic implications for cardiac disease. *Circulation Research*, 109(8), 923–940. doi:10.1161/CIRCRESAHA.111.243147
- Xu, M.; Wani, M.; Dai, Y.-S.; Wang, J.; Yan, M., Ayub, A.; Ashraf, M. (2004). Differentiation of bone marrow stromal cells into the cardiac phenotype requires intercellular communication with myocytes. *Circulation*, 110(17), 2658–2665. doi:10.1161/01.CIR.0000145609.20435.36

Table 1. Name of the gene, sequence of the forward and reverse primers, size of amplified and cycles used for the RT-PCR and q-PCR.

Target gene (NCBI Ref. #)	Forward primer (5' – 3')	Reverse primer (5' – 3')	Tamanho do amplificado	RT-PCR Cycles	qPCR Cycles
ALP NM_000478.4	AGAACCCCAAAGGCTTCTTC	CTTGGCTTTTCCTTCATGGT	74 pb	-	55°C – 2min/ 95°C – 2 min/ 40X/ 95°C – 15seg/ 60°C – 30seg/ 80°C – 30 seg, com leitura/ 40X/ 95°C – 15seg/ 60°C – 1 min/ 95°C – 30seg/ 60°C – 15seg
ALPL/V1 NM_000478.4	TAAAGCAGGTCTTGGGGTGC	TGTGGAGACCCCATCCCAT	221 pb	93°C – 5min/ 40X/ 93°C – 30seg/ 60°C – 30seg/ 72°C – 30 seg/ 40X/ 72°C – 5 min	55°C – 2min/ 95°C – 2 min/ 40X/ 95°C – 15seg/ 63°C – 30seg/ 80°C – 30 seg, com leitura/ 40X/ 95°C – 15seg/ 63°C – 1 min/ 95°C – 30seg/ 63°C – 15seg
ALPL/V2 NM_001127501.2	GCGCAGAGAAAGAGAAAGACC	CACTGTGGAGACCCCATCC	146 pb	93°C – 5min/ 40X/ 93°C – 30seg/ 60°C – 30seg/ 72°C – 30 seg/ 40X/ 72°C – 5 min	55°C – 2min/ 95°C – 2 min/ 40X/ 95°C – 15seg/ 62°C – 30seg/ 80°C – 30 seg, com leitura/ 40X/ 95°C – 15seg/ 62°C – 1 min/ 95°C – 30seg/ 62°C – 15seg
ALPL/V3 NM_001177520.1	TGTTCTGGGAGATGACGTA	GTTCACTCTCGTGGTGGTCA	210 pb	93°C – 5min/ 40X/ 93°C – 30seg/ 60°C – 30seg/ 72°C – 30 seg/ 40X/ 72°C – 5 min	-
ALPP NM_001632.3	AGCCAGCTCATCTCCAACAT	TCCCACACATACCGGCAC	170 pb	93°C – 5min/ 40X/ 93°C – 30seg/ 61°C – 30seg/ 72°C – 30 seg/ 40X/ 72°C – 5 min	-
ALPPL2 NM_031313.2	AGCCAGCTCATCTCCAACAT	TCCCACACATACCGGCAC	170 pb	93°C – 5min/ 40X/ 93°C – 30seg/ 55°C – 30seg/ 72°C – 30 seg/ 40X/ 72°C – 5 min	-
ALPI NM_001631.3	AGCCAGCTCATCTCCAACAT	TCCCACACATACCGGCAC	170 pb	93°C – 5min/ 40X/ 93°C – 30seg/ 53°C – 30seg/ 72°C – 30 seg/ 40X/ 72°C – 5 min	-
GAPDH NM_001256799.2	ACCAGGTGGTCTCCTCTGACTTC	GTGGTCGTTGAGGGCAATG	83 pb	-	55°C – 2min/ 95°C – 2 min/ 40X/ 95°C – 15seg/ 60°C – 30seg/ 80°C – 30 seg, com leitura/ 40X/ 95°C – 15seg/ 60°C – 1 min/ 95°C – 30seg/ 60°C – 15seg
B-actin NM_001101.3	ATCATTGCTCCTCCTCAGCG	GCTGATCCACATCTGCTGG	90 pb	-	55°C – 2min/ 95°C – 2 min/ 40X/ 95°C – 15seg/ 60°C – 30seg/ 80°C – 30 seg, com leitura/ 40X/ 95°C – 15seg/ 60°C – 1 min/ 95°C – 30seg/ 60°C – 15seg

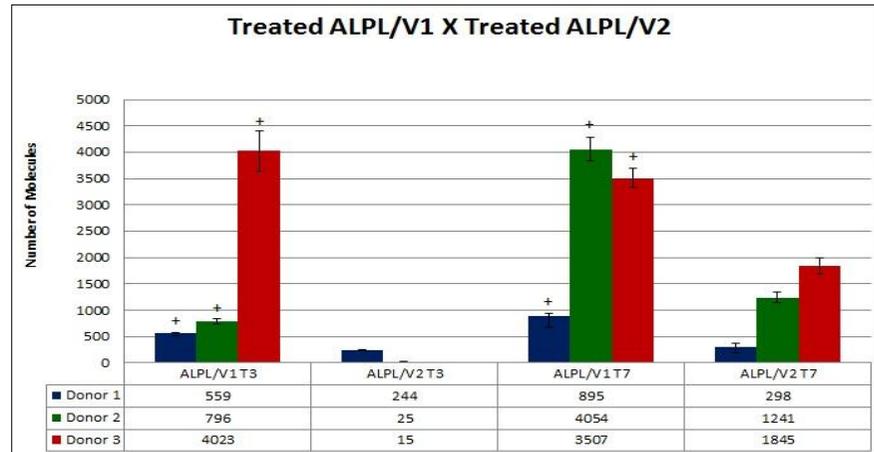
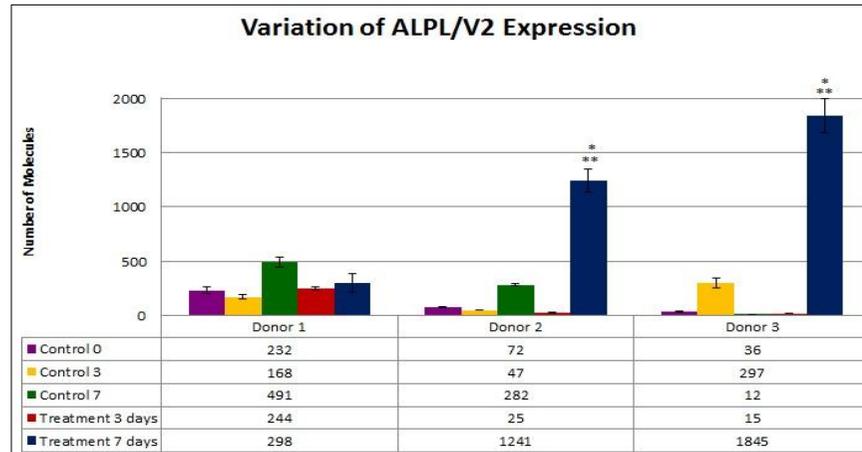
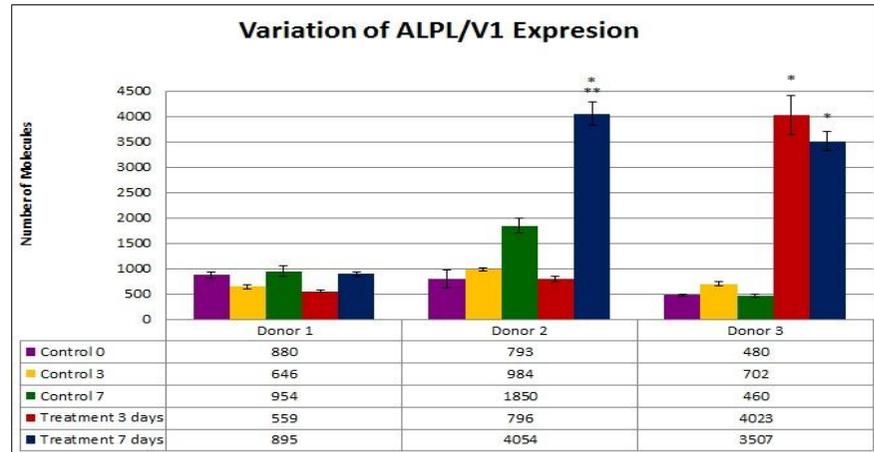
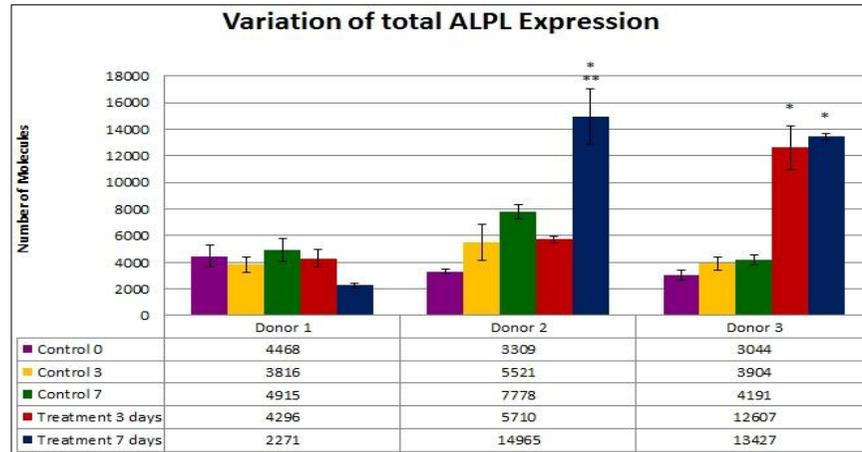


Figure 1: Real time qPCR analysis of ALP, ALPL/v1 and ALPL/v2 expression in human AD-MSCs treated with 10^{-7} M dexamethasone. Sample of treated cells or control cells were acquired at days 0, 3 and 7. Number of molecules are expressed normalized to 100,000 molecules of endogenous genes (mean between B-actin and GAPDH). (A) Total ALPL expression in three patients AD-MSCs samples; (B) ALPL/v1 expression in three patients AD-MSCs samples; (C) ALPL/v2 expression in three patients AD-MSCs samples; (D) ALPL/v1 x ALPL/v2 expression highlighting the difference between them.

*control vs treatment, $p < 0,05$.

** treatment for 3 days vs treatment for 7 days, $p < 0,05$.

+ ALPL/v1 vs ALPL/v2, $p < 0,05$.

4. CONCLUSÕES

Os resultados apresentados neste trabalho mostram que a dexametasona não só aumenta a atividade do promotor de ALPL, mas também dá preferência ao splicing alternativo que origina a variante 1, aumentando os níveis de mRNA da variante 2 em menor proporção. É visto também que as duas variantes do gene possuem uma expressão semelhante nas células não tratadas, porém quando tratadas com dexametasona a expressão da ALPL/v1 pode aumentar a partir do terceiro dia, enquanto que expressão de ALPL/v2 aumenta em menor proporção no sétimo dia.

Os primers desenhados pelo nosso grupo de pesquisa para o gene ALPL variantes 1 e 2 mostraram-se mais eficientes que os primers de ALP total atualmente utilizados por outros autores. Ressaltamos a necessidade de se utilizar primers mais específicos para verificar-se a expressão de ALPL, pois apenas uma de suas variantes é secretada, podendo produzir matriz óssea e os primers aqui desenhados satisfazem esta necessidade. Assim, propomos o uso da variante 1 da ALPL como marcador osteogênico.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nosso trabalho nos apresentou uma gama de situações adversas durante a técnica de qPCR, que tivemos que solucionar no decorrer dos experimentos. Porém, não obtivemos sucesso na resolução de todas essas questões, como, por exemplo, a formação de dímeros de primers quando há baixa abundância de transcrito nas amostras. Acreditando que este caso se repete em vários laboratórios ao redor do mundo e, por tal motivo, seguiremos o trabalho na busca de resolver todos os impasses enfrentados neste trabalho, tendo como perspectiva futura realizarmos experimentos que permitam a utilização confiável de dados com alto conteúdo de dímero de primers.

A nossa busca por respostas quanto à variante de ALPL que é responsável pela deposição de matriz óssea foi satisfatória, com a obtenção de resultados consistentes que sustentam nossa hipótese de que a ALPL/v1 seria a variante secretada, portanto atuante no depósito de matriz.

Como o manuscrito deste trabalho foi redigido na forma de *short communication*, muitos detalhes da metodologia e dos resultados e discussão não puderam ser utilizados devido aos limites de texto recomendados pela editora. Portanto, a metodologia detalhada e os resultados e discussão completos foram anexados a esse trabalho como Anexo 1 e Anexo 2, respectivamente.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA DISSERTAÇÃO

- Banfi, A.; Muraglia, A.; Dozin, B.; Mastrogiacomo, M.; Cancedda, R.; Quarto, R. (2000). Proliferation kinetics and differentiation potential of ex vivo expanded human bone marrow stromal cells: Implications for their use in cell therapy. *Experimental hematology*, 28(6), 707–715
- Baxter, M. A.; Wynn, R. F.; Jowitt, S. N.; Wraith, J. E.; & Fairbairn, L. J. (2004). Study of telomere length reveals rapid aging of human marrow stromal cell following in vitro expansion, *Stem Cells*, 22, 675–682
- Beloti, M. M. & Rosa, A. L. (2005). Osteoblast differentiation of human bone marrow cells under continuous and discontinuous treatment with dexamethasone. *Brazilian dental journal*, 16(2), 156–161
- Bianco, P.; Robey, P. & Simmons, P. (2008). Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts, and assays. *Cell stem cell*, 2(4), 313–319. doi:10.1016/j.stem.2008.03.002
- Boskey, A. L.; Doty, S. B.; Kudryashov, V.; Mayer-Kuckuk, P.; Roy, R. (2008). Modulation of Extracellular Matrix Protein Phosphorylation Alters Mineralization in Differentiating Chick Limb-bud Mesenchymal Cell Micromass Cultures. *Bone*, 42(6), 1061–1071
- Both, K. S.; Muijsenberg, A. J. C. van der; Blitterswijk, C. A. van; Boer, J.; Bruijn, J. D. (2007). A rapid and efficient method for expansion of human mesenchymal stem cells. *Tissue engineering*, 13(1), 3–9. doi:10.1089/ten.2005.0513
- Bruder, S. P.; Jaiswal, N. & Haynesworth, S. E. (1997). Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation. *Journal of cellular biochemistry*, 64(2), 278–294
- Bydlowski, S. P.; Debes, A. A.; Maselli, L. M. F.; Janz, F. L. (2009). Características biológicas das células-tronco mesenquimais. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, 31, 25–35. doi:10.1590/S1516-84842009005000038

- Campagnoli, C.; Roberts, I. A. G.; Kumar, S.; Bennett, P.; Bellantuono, I.; Fisk, N. M. (2001). Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. *Blood*, 98(8), 2396–2402. doi:10.1182/blood.V98.8.2396
- Castro-Malaspina, H.; Gay, R. E.; Resnick, G.; Kapoor, N.; Meyers, P.; Chiarieri, D.; Moore, M. A. (1980). Characterization of human bone marrow fibroblast colony-forming cells (CFU-F) and their progeny. *Blood*, 56(2), 289–301
- Chapel, A.; Bertho, J. M.; Bensidhoum, M.; Fouillard, L.; Young, R. G.; Frick, J.; Thierry, D. (2003). Mesenchymal stem cells home to injured tissues when co-infused with hematopoietic cells to treat a radiation-induced multi-organ failure syndrome. *The journal of gene medicine*, 5(12), 1028–1038. doi:10.1002/jgm.452
- Cheng, S.; Yang, J. & Rifas, L. (1994). Differentiation of human bone marrow osteogenic stromal cells in vitro: induction of the osteoblast phenotype by dexamethasone. *Endocrinology*, 134(1), 277–286
- Colter, D. C.; Class, R.; DiGirolamo, C. M.; Prockop, D. J. (2000). Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(7), 3213–3218. doi:10.1073/pnas.070034097
- Colter, D. C.; Sekiya, I.; Prockop, D. J. (2001). Identification of a subpopulation of rapidly self-renewing and multipotential adult stem cells in colonies of human marrow stromal cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(14), 7841–7845. doi:10.1073/pnas.141221698
- Conget, P. A. & Minguell, J. J. (1999). Phenotypical and Functional Properties of. *Journal of cellular physiology*, 73(January), 67–73
- Covas, D. T.; Siufi, J. L. C.; Silva, A R. L.; Orellana, M. D. (2003). Isolation and culture of umbilical vein mesenchymal stem cells. *Brazilian journal of medical and biological*, 36(9), 1179–1183
- Deschaseaux, F. & Charbord, P. (2000). Human marrow stromal precursors are alpha 1 integrin subunit-positive. *Journal of cellular physiology*, 184(3), 319–325. doi:10.1002/1097-4652

- Devine, S. M.; Cobbs, C.; Jennings, M.; Bartholomew, A.; Hoffman, R. (2003). Mesenchymal stem cells distribute to a wide range of tissues following systemic infusion into nonhuman primates. *Blood*, *101*(8), 2999–3001. doi:10.1182/blood-2002-06-1830
- Dissaranan, C.; Cruz, A. M.; Couri, B. M.; Goldman, H. B.; Damaser, M. S. (2012). Stem Cell Therapy for Incontinence: Where Are We Now? What is the Realistic Potential? *Curr Urol Rep. Author manuscript*. *12*(5), 336–344. doi:10.1007/s11934-011-0210-4
- Dominici, M.; Le Blanc, K.; Mueller, I.; Slaper-Cortenbach, I.; Marini, F.; Krause, D.; Horwitz, E. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, *8*(4), 315–317. doi:10.1080/14653240600855905
- D’Ippolito, G.; Schiller, P. C.; Ricordi, C.; Roos, B. A.; Howard, G. A. (1999). Age-related osteogenic potential of mesenchymal stromal stem cells from human vertebral bone marrow. *Journal of bone and mineral research*, *14*(7), 1115–1122. doi:10.1359/jbmr.1999.14.7.1115
- Filshie, R. J.; Zannettino, A. C.; Makrynikola, V.; Gronthos, S.; Henniker, A. J.; Bendall, L. J.; Bradstock, K. F. (1998). MUC18, a member of the immunoglobulin superfamily, is expressed on bone marrow fibroblasts and a subset of hematological malignancies. *Leukemia*, *12*(3), 414–421
- Gadjanski, I.; Spiller, K. & Vunjak-Novakovic, G. (2012). Time-dependent processes in stem cell-based tissue engineering of articular cartilage. *Stem Cell Reviews*, *8*(3), 863–881. doi:10.1007/s12015-011-9328-5.
- Gaur, T.; Lengner, C. J.; Hovhannisyan, H.; Bhat, R. A.; Bodine, P. V. N.; Komm, B. S.; Lian, J. B. (2005). Canonical WNT signaling promotes osteogenesis by directly stimulating Runx2 gene expression. *The Journal of biological chemistry*, *280*(39), 33132–33140. doi:10.1074/jbc.M500608200
- Gaur, T.; Rich, L.; Lengner, C. J.; Hussain, S.; Trevant, B.; Ayers, D.; Lian, J. B. (2006). Secreted Frizzled Related Protein 1 Regulates Wnt Signaling for BMP2 Induced Chondrocyte Differentiation, *Journal of Cellular Physiology*, *96*(October 2005), 87–96. doi:10.1002/jcp

- Giordano, A.; Galderisi, U. & Marino, I. R. (2006). From the Laboratory Bench to the Patient's Bedside: An Update on Clinical Trials With Mesenchymal Stem Cells, *Journal of Cellular Physiology*, (October), 27–35. doi:10.1002/JCP
- Glennon-Alty, L.; Williams, R.; Dixon, S.; Murray, P. (2013). Induction of mesenchymal stem cell chondrogenesis by polyacrylate substrates. *Acta biomaterialia*, 9(4), 6041–6051. doi:10.1016/j.actbio.2012.12.007
- Golub, E. E. & Boesze-Battaglia, K. (2007). The role of alkaline phosphatase in mineralization. *Orthopaedics*, 18:444–448
- Groot, C. G.; Danes, J. K.; Blok, J.; Hoogendijk, A.; Hauschka, P. V. (1986). Light and electron microscopic demonstration of osteocalcin antigenicity in embryonic and adult rat bone. *Bone*, 7(5), 379–385
- Harmey, D.; Hessele, L.; Narisawa, S.; Johnson, K. A.; Terkeltaub, R.; Millán, J. L. (2004). Concerted Regulation of Inorganic Pyrophosphate and Osteopontin by Akp2, Enpp1, and Ank. *American Journal of Pathology*, 164(4), 1199–1209
- Hintze, V.; Miron, A.; Möller, S.; Schnabelrauch, M.; Heinemann, S.; Worch, H.; Scharnweber, D. (2012). Artificial extracellular matrices of collagen and sulphated hyaluronan enhance the differentiation of human mesenchymal stem cells in the presence of dexamethasone. *Journal Of Tissue Engineering And Regenerative Medicine*. doi:10.1002/term
- Hoch, A. I.; Binder, B. Y.; Genetos, D. C.; Leach, J. K. (2012). Differentiation-dependent secretion of proangiogenic factors by mesenchymal stem cells. *PLoS One*, 7(4), e35579. doi:10.1371/journal.pone.0035579
- Hoover-Plow, J. & Gong, Y. (2012). Challenges for heart disease stem cell therapy. *Vascular health and risk management*, 8, 99–113. doi:10.2147/VHRM.S25665
- Hui-hi, L.; Yi-fei, L.; Zheng-qiang, S.; Yi, W. (2012). Preconditioning of stem cells for the treatment of myocardial, *Chinese Medical Journal*, 125(2), 378–384. doi:10.3760/cma.j.issn.0366-6999.2012.02.037

- Hunter, R. S. & Lobo, A. M. (2011). Dexamethasone intravitreal implant for the treatment of noninfectious uveitis. *Clinical ophthalmology (Auckland, N.Z.)*, 5, 1613–1621. doi:10.2147/OPHTH.S17419
- In't Anker P. S.; Scherjon, S. A; Kleijburg-van der Keur, C.; de Groot-Swings, G. M. J. S.; Claas, F. H. J.; Fibbe, W. E.; Kanhai, H. H. H. (2004). Isolation of mesenchymal stem cells of fetal or maternal origin from human placenta. *Stem cells* (Dayton, Ohio), 22(7), 1338–1345. doi:10.1634/stemcells.2004-0058
- Johnson, K. A.; Hessle, L.; Vaingankar, S.; Wennberg, C.; Mauro, S.; Narisawa, S.; Terkeltaub, R. (2000). Osteoblast tissue-nonspecific alkaline phosphatase antagonizes and regulates PC-1. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, 279(4), R1365–1377
- Johnstone, B.; Hering, T. M.; Caplan, A. I.; Goldberg, V. M.; Yoo, J. U. (1998). In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Experimental cell research*, 238(1), 265–272. doi:10.1006/excr.1997.3858
- Kaveh, K.; Ibrahim, R.; Bakar, Z. A.; Ibrahim, T. A. (2011). Mesenchymal stem cell, osteogenic lineage and bone tissue engineering: A review. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 10 (17):2317–2330
- Kopen, G. C.; Prockop, D. J. & Phinney, D. G. (1999). Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96, 10711–10716
- Lazzarotto-Silva, C. (2009). Estudos Moleculares de Células Tronco Mesenquimais Cultivadas In Vitro. *Instituto Nacional do Câncer (INCA)*
- Lian, J. B. & Stein, G. S. (1995). Development of the osteoblast phenotype: molecular mechanisms mediating osteoblast growth and differentiation. *The Iowa orthopaedic journal*, 15, 118–140
- Liu, L.; DiGirolamo, C. M.; Navarro, P. A. A. S., Blasco, M. A.; Keefe, D. L. (2004). Telomerase deficiency impairs differentiation of mesenchymal stem cells. *Experimental Cell Research*, 294(1), 1–8. doi:10.1016/j.yexcr.2003.10.031

- Maniopoulos, C.; Sodek, J.; Melcher, A. H. (1988). Bone formation in vitro by stromal cells obtained from bone marrow of young adult rats. *Cell and tissue research*, 254(2), 317–330
- Mareschi, K.; Ferrero, I.; Rustichelli, D.; Aschero, S.; Gammaitoni, L.; Aglietta, M.; Fagioli, F. (2006). Expansion of mesenchymal stem cells isolated from pediatric and adult donor bone marrow. *Journal of cellular biochemistry*, 97(4), 744–754. doi:10.1002/jcb.20681
- Martin, D. R.; Cox, N. R.; Hathcock, T. L.; Niemeyer, G. P.; Baker, H. J. (2002). Isolation and characterization of multipotential mesenchymal stem cells from feline bone marrow. *Experimental hematology*, 30(8), 879–886
- Meirelles, L. D. S. & Nardi, N. B. (2003). Murine marrow-derived mesenchymal stem cell: isolation, in vitro expansion, and characterization. *British Journal of Haematology*, 123(4), 702–711
- Mendes, S. C.; Tibbe, J. M.; Veenhof, M.; Bakker, K.; Both, S.; Platenburg, P. P.; Oner, F. C.; de Bruijn, J. D.; Van Blitterswijk, C. A. (2002). Bone Tissue-Engineered Implants Using Human Bone Marrow Stromal Cells: Effect of Culture Conditions and Donor Age. *Tissue Engineering*, 8(6), 911–920
- Negri, A. L. (2011). Regulation of Bone Mineralization by Inorganic Peptide Factors. *Rev Argent Endocrinol Metab*, (2), 48: x–x
- Niemeyer, P.; Krause, U.; Kasten, P.; Kreuz, P. C.; Henle, P.; Südkam, N. P.; Mehlhorn, A. (2006). Mesenchymal stem cell-based HLA-independent cell therapy for tissue engineering of bone and cartilage. *Current stem cell research & therapy*, 1(1), 21–27
- Ortiz, L. A.; Gambelli, F.; McBride, C.; Gaupp, D.; Baddoo, M.; Kaminski, N.; Phinney, D. G. (2003). Mesenchymal stem cell engraftment in lung is enhanced in response to bleomycin exposure and ameliorates its fibrotic effects. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(14), 8407–8411. doi:10.1073/pnas.1432929100
- Park, J.-B. (2014). Effects of the combination of dexamethasone and fibroblast growth factor-2 on differentiation of osteoprecursor cells. *Molecular Medicine Reports*, 659–662. doi: 10.3892/mmr.2013.1811

- Park, B.W.; Hah, Y. S.; Choi, M. J.; Ryu, Y. M.; Lee, S. G.; Kim, D. R.; Byun, J. H. (2009). In vitro osteogenic differentiation of cultured human dental papilla-derived cells. *Journal of oral and maxillofacial surgery*, 67(3), 507–514. doi:10.1016/j.joms.2008.08.037
- Peng, H.; Yin, Z.; Liu, H.; Chen, X.; Feng, B.; Yuan, H.; Su, B.; Ouyang, H.; Zhang, Y. (2012). Electrospun biomimetic scaffold of hydroxyapatite/chitosan supports enhanced osteogenic differentiation of mMSCs. *Nanotechnology*, 23(48), 485102. doi:10.1088/0957-4484/23/48/485102
- Peran, M.; Ruiz, S.; Kwiatkowski, W.; Marchal, J. A.; Yang, S.-L.; Aranega, A.; Choe, S.; Belmonte, I. J. C. (2013). Activin/BMP2 chimeric ligands direct adipose-derived stem cells to chondrogenic differentiation. *Stem Cell Research*, 10(3), 464–476. doi:10.1016/j.scr.2013.02.002
- Perka, C.; Schultz, O.; Spitzer, R. S.; Lindenhayn, K. (2000). The influence of transforming growth factor beta1 on mesenchymal cell repair of full-thickness cartilage defects. *Journal of Biomedical Materials Research*, 52(3), 543–552
- Peter, S. J.; Liang, C. R.; Kim, D. J.; Widmer, M. S.; Mikos, a G. (1998). Osteoblastic phenotype of rat marrow stromal cells cultured in the presence of dexamethasone, beta-glycerolphosphate, and L-ascorbic acid. *Journal of Cellular Biochemistry*, 71(1), 55–62
- Phinney, D. G.; Kopen, G.; Righter, W.; Webster, S.; Tremain, N.; Prockop, D. J. (1999). Donor variation in the growth properties and osteogenic potential of human marrow stromal cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, 75(3), 424–436
- Pittenger, M. F. (1999). Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells. *Science*, 284(5411), 143–147. doi:10.1126/science.284.5411.143
- Porter, R. M.; Huckle, W. R. & Goldstein, A. S. (2003). Effect of dexamethasone withdrawal on osteoblastic differentiation of bone marrow stromal cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, 90(1), 13–22. doi:10.1002/jcb.10592
- Punwar, S. & Khan, W. S. (2011). Mesenchymal stem cells and articular cartilage repair: clinical studies and future direction. *The Open Orthopaedics Journal*, 296–301. doi:10.2174/1874325001105010296

- Quarto, R.; Mastrogiacomo, M & Cancedda, R. (2001). Repair of Large Bone Defects with the Use of Autologous Bone Marrow Stromal Cells. *The New England Journal of Medicine*, 344(5), 381–387
- Reece, D. E. (2011). Posttransplantation maintenance therapy and optimal frontline therapy in myeloma. *Hematology*, 197–204. doi:10.1182/asheducation-2011.1.197
- Revenu, T.; Trifan, V.; Nacu, L.; Gutium, T.; Globa, L.; Motoc, A. G. M.; Nacu, V. (2013). Collection, isolation and characterization of the stem cells of umbilical cord blood. *Romanian Journal of Morphology and Embryology*, 54(2), 291–297
- Roobrouck, V. D.; Ulloa-Montoya, F. & Verfaillie, C. M. (2008). Self-renewal and differentiation capacity of young and aged stem cells. *Experimental Cell Research*, 314(9), 1937–1944. doi:10.1016/j.yexcr.2008.03.006
- Rui, Y. F.; Lui, P. P. Y.; Li, G.; Fu, S. C.; Lee, Y. W.; Chan, K. M. (2010). Isolation and Characterization of Multipotent. *Tissue Engineering*, 16(5)
- Sekiya, I.; Larson, B. L.; Smith, J. R.; Pochampally, R.; Cui, J.-G.; Prockop, D. J. (2002). Expansion of Human Adult Stem Cells from Bone Marrow Stroma: Conditions that Maximize the Yields of Early Progenitors and Evaluate Their Quality. *Stem Cells*, 20:530–541
- Seo, M.-S.; Park, S.-B. & Kang, K.-S. (2012). Isolation and characterization of canine Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells. *Cell Transplantation*, 21(7), 1493–1502. doi:10.3727/096368912X647207
- Shake, J. G.; Gruber, P. J.; Baumgartner, W. A.; Senechal, G.; Meyers, J.; Redmond, J. M.; Pittenger, M. F.; Martin, B. J. (2002). Mesenchymal stem cell implantation in a swine myocardial infarct model: engraftment and functional effects. *The Annals of Thoracic Surgery*, 73(6), 1919–1926
- Shintani, N.; Siebenrock, K. A. & Hunziker, E. B. (2013). TGF- β 1 enhances the BMP-2-induced chondrogenesis of bovine synovial explants and arrests downstream differentiation at an early stage of hypertrophy. *PloS One*, 8(1), e53086. doi:10.1371/journal.pone.0053086

- Singh, U.; Quintanilla, R. H.; Grecian, S.; Gee, K. R.; Rao, M. S.; Lakshmiathy, U. (2012). Novel live alkaline phosphatase substrate for identification of pluripotent stem cells. *Stem Cell Reviews*, 8(3), 1021–1029. doi:10.1007/s12015-012-9359-6
- Solozobova, V.; Wyvekens, N. & Pruszek, J. (2012). Lessons from the embryonic neural stem cell niche for neural lineage differentiation of pluripotent stem cells. *Stem Cell Reviews*, 8(3), 813–829. doi:10.1007/s12015-012-9381-8
- Stenderup, K.; Justesen, J.; Clausen, C.; Kassem, M. (2003). Aging is associated with decreased maximal life span and accelerated senescence of bone marrow stromal cells. *Bone*, 33(6), 919–926. doi:10.1016/j.bone.2003.07.005
- Stewart, K.; Monk, P.; Walsh, S.; Jefferiss, C. M.; Letchford, J.; Beresford, J. N. (2003). STRO-1, HOP-26 (CD63), CD49a and SB-10 (CD166) as markers of primitive human marrow stromal cells and their more differentiated progeny: a comparative investigation in vitro. *Cell and Tissue Research*, 313(3), 281–290. doi:10.1007/s00441-003-0762-9
- Stolzing, A.; Jones, E.; McGonagle, D.; Scutt, A. (2008). Age-related changes in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells: consequences for cell therapies. *Mechanisms of Ageing and Development*, 129(3), 163–173. doi:10.1016/j.mad.2007.12.002
- Terkeltaub, R. A. (2001). Inorganic pyrophosphate generation and disposition in pathophysiology. *Am J Physiol Cell Physiol*, 281: C1–C11
- Tsai, M.-S.; Lee, J.-L.; Chang, Y.-J.; Hwang, S.-M. (2004). Isolation of human multipotent mesenchymal stem cells from second-trimester amniotic fluid using a novel two-stage culture protocol. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 19(6), 1450–1456. doi:10.1093/humrep/deh279
- Vermeulen, A. H.; Vermeer, C. & Bosman, F. T. (1989). Histochemical detection of osteocalcin in normal and pathological human bone. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 37(10), 1503–1508. doi:10.1177/37.10.2789247
- Vogel, W.; Grünebach, F.; Messam, C. A.; Kanz, L.; Brugger, W.; Bühring, H. J. (2003). Heterogeneity among human bone marrow-derived mesenchymal stem cells and neural progenitor cells. *Hematopoietic Stem Cells*, 88(02), 126–133

- Waymire, K. G.; Mahuren, J. D.; Jaje, J. M.; Guilarte, T. R.; Coburn, S. P.; McGregor, G. R. (1995). Mice lacking tissue non-specific alkaline phosphatase die from seizures due to defective metabolism of vitamin B-6. *Nature Genetics*
- Whyte, M. P. (1994). Hypophosphatasia and the role of alkaline phosphatase in skeletal mineralization. *Endocrine Reviews*, 15(4), 439–461. doi:10.1210/edrv-15-4-439
- Williams, A. R. & Hare, J. M. (2011). Mesenchymal stem cells: biology, pathophysiology, translational findings, and therapeutic implications for cardiac disease. *Circulation Research*, 109(8), 923–940. doi:10.1161/CIRCRESAHA.111.243147
- Wright, W. E. & Shay, J. W. (2002). Historical claims and current interpretations of replicative aging. *Nature Biotechnology*, 20(7), 682–688. doi:10.1038/nbt0702-682
- Xu, M.; Wani, M.; Dai, Y.-S., Wang, J., Yan, M., Ayub, A., & Ashraf, M. (2004). Differentiation of bone marrow stromal cells into the cardiac phenotype requires intercellular communication with myocytes. *Circulation*, 110(17), 2658–2665. doi:10.1161/01.CIR.0000145609.20435.36
- Young, H. E.; Steele, T. A.; Bray, R. A.; Hudson, J.; Floyd, J. A.; Hawkins, K.; Thomas, K.; Austin, T.; Edwards, C.; Cuzzourt, J.; Duenzl, M.; Lucas, P. A.; Black, A. C. (2001). Human reserve pluripotent mesenchymal stem cells are present in the connective tissues of skeletal muscle and dermis derived from fetal, adult, and geriatric donors. *The Anatomical Record*, 264(1), 51–62
- Zannettino, A. C. W.; Harrison, K.; Joyner, C. J.; Triffitt, J. T.; Simmons, P. J. (2003). Molecular cloning of the cell surface antigen identified by the osteoprogenitor-specific monoclonal antibody, HOP-26. *Journal of cellular biochemistry*, 89(1), 56–66. doi:10.1002/jcb.10481
- Zhou, S.; Greenberger, J. S.; Epperly, M. W.; Goff, J. P.; Adler, C.; Leboff, M. S.; Glowacki, J. (2008). Age-related intrinsic changes in human bone-marrow-derived mesenchymal stem cells and their differentiation to osteoblasts. *Aging Cell*, 7(3), 335–343. doi:10.1111/j.1474-9726.2008.00377.x
- Zuk, P. A.; Zhu, M.; Mizuno, H.; Huang, J.; Futrell, J. W.; Katz, A. J.; Benhaim, P.; Lorenz, H. P.; Hedrick, M. H. (2001). Multilineage cells from human adipose tissue: implications

for cell-based therapies. *Tissue Engineering*, 7(2), 211–228.
doi:10.1089/107632701300062859

7. ANEXO 1

7.1. Metodologia detalhada

As células tronco mesenquimais (adipócito derivadas), dos pacientes usados neste trabalho foram fornecidas pelo Laboratório de Células Tronco e Engenharia de Tecidos (LACET) da Universidade Luterana do Brasil (ULBRA) localizada em Canoas - RS. Estas células foram cultivadas em garrafas de cultura, com meio de cultura completo, composto de DMEM, 10% de Soro Fetal Bovino e 1% de antibiótico (sulfato de gentamicina), mantidas em estufa de CO₂, em temperatura constante de 37°C e uma taxa de 5% de CO₂ e 95% de umidade. O repique foi realizado sempre que as células alcançavam mais de 80% de confluência.

O experimento foi realizado com células em passagem sete (P7), em placa de cultura, com aproximadamente 3×10^4 células por mL de meio. O tratamento com dexametasona foi realizado utilizando 1 µL de dexametasona 10^{-4} M por mL de meio, gerando uma concentração final de 10^{-7} M de dexametasona. O tratamento teve a duração de sete dias, sendo as extrações de RNA realizadas nos dias zero, três e sete, sendo assim plaqueados: a) um poço para o controle do dia zero (C0); b) um para o controle do dia três (C3); c) um para o tratado do dia três (T3); d) um para o controle do dia sete (C7); e) um para o tratado do dia sete (T7). O meio de cultura foi trocado a cada 3-4 dias, sendo novamente adicionada a dexametasona nos poços tratados. Todo o manejo das células foi feito dentro de uma capela de fluxo laminar previamente esterilizada com luz UV.

A extração de RNA total foi realizada com o Kit ReliaPrepTM RNA Tissue (Promega), o RNA foi quantificado no espectrofotômetro NanoVue (GE Healthcare Life Sciences). O cDNA foi sintetizado com o Kit M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen) usando o oligonucleotídeo T₂₀ (poli T) como primer na concentração recomendado pelo fabricante da enzima. Devido à grande quantidade de RNA extraído, todos os cDNAs do primeiro paciente, exceto do tratado do dia sete, foram diluídos numa proporção de 1:10 (5 µL de cDNA em 45 µL de água ultrapura). Já o tratado do dia sete foi diluído em uma proporção de 1:5 (5 µL de cDNA em 20 µL de água ultrapura), devido à menor quantidade de RNA extraído. Já o RNA extraído do segundo paciente foi de aproximadamente 1/3 a quantidade do primeiro, portanto, os cDNAs dos segundo paciente não tiveram necessidade de serem diluídos.

Os primers para as fosfatases alcalinas foram desenhados pelo nosso grupo de pesquisa através da ferramenta “Primer designing tool” do NCBI, (www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast). Os primers da ALPL/v1 amplificam um fragmento de 200 pares de bases (pb), tendo o primer direto a sequência 5'-TAAAGCAGGTCTTGGGGTGC-3' e o reverso 5'-TGTGGAGACACCCATCCCAT-3'; a ALPL/v2 amplifica um fragmento de 130 pb, sendo a sequência do primer direto 5'-GCGCAGAGAAAGAGAAAGACC-3' e do reverso 5'-CACTGTGGAGACACCCATCC-3' e a ALPL/v3 amplifica um fragmento de 210 pb, tendo como sequência do primer direto 5'-TGTTCTGGGAGATGACGTA-3' e do reverso 5'-GTTCACTCTCGTGGTGGTCA-3'. O primer ALPP amplifica um fragmento de aproximadamente 170 pb, tendo como sequência direta 5'-AGCCAGCTCATCTCCAACAT-3' e reversa 5'-TCCCACACATACCGGGCAC-3'. Os primers foram desenhados aceitando até um tamanho máximo de 250 pb, o tamanho mínimo do íntron foi usado dentro dos parâmetros dos íntrons alternativos de cada variante. Para outros parâmetros foram usados os valores padrões da ferramenta.

Também foram usados para testes os primer de fosfatase alcalina total (ALP), sendo a sequência direta 5'-AGAACCCCAAAGGCTTCTTC-3' e a sequência reversa 5'-CTTGCTTTTCCTTCATGGT-3'. Como genes endógenos foram usados os primers de β -actina com as sequência direta 5'-ATCATTGCTCCTCCTCAGCG-3' e a sequência reversa 5'-GCTGATCCACATCTGCTGG-3' e também os primers de GAPDH, o qual apresenta sequência direta 5'-ACCAGGTGGTCTCCTCTGACTTC-3' e reversa 5'-GTGGTCGTTGAGGGCAATG-3'.

Os cDNAs foram amplificados, primeiramente, por RT-PCR em termociclador Eppendorf modelo Mastercycler, utilizando os primers das variantes 1, 2 e 3 (V1; V2 e V3, respectivamente) do gene ALPL com temperatura de anelamento de 60°C (ciclo: 93°C – 5min/ 40X/ 93°C – 30seg/ 60°C – 30seg/ 72°C – 30 seg/ 40X/ 72°C – 5 min) e o primer ALPP, utilizando o mesmo ciclo do primer anterior, porém fazendo um gradiente de três temperaturas de anelamento, cada uma específica para um determinado gene (ALPI – 53°C; ALPPL2 – 55°C; ALPP – 61°C). Todas as reações realizadas foram de 25µL. O resultado foi observado em gel de agarose 1,5% corados com o corante GelRed no fotodocumentador L-PIX (Loccus Biotecnologia).

Posteriormente os cDNAs foram analisados por qPCR no equipamento Applied Biosystems® 7500 Real-Time PCR Systems (Applied Biosystem), utilizando o Kit Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG, para avaliar a expressão diferencial dos genes das

fosfatases alcalinas durante a diferenciação das células tronco tratadas e não tratadas com dexametasona. Para este teste foram utilizados apenas os primers das variantes 1 e 2 do gene ALPL, os primers de ALP total, e como controles endógenos os primers para β -actina e GAPDH. A quantidade relativa de RNA total adicionado a cada reação foi de aproximadamente 10ng. O programa usado para ciclagem foi o *three step with melting*, porém as temperaturas do ciclo variaram conforme os primers. Para os primers da ALPL/v1 foi usado o seguinte ciclo: 55°C – 2min/ 95°C – 2 min/ 40X/ 95°C – 15seg/ 63°C – 30seg/ 80°C – 30 seg, com leitura/ 40X/ 95°C – 15seg/ 63°C – 1 min/ 95°C – 30seg/ 63°C – 15seg; para o ALPL/v2: 55°C – 2min/ 95°C – 2 min/ 40X/ 95°C – 15seg/ 62°C – 30seg/ 80°C – 30 seg, com leitura/ 40X/ 95°C – 15seg/ 62°C – 1 min/ 95°C – 30seg/ 62°C – 15seg; e para os primers de ALP, β -actina e GAPDH: 55°C – 2min/ 95°C – 2 min/ 40X/ 95°C – 15seg/ 60°C – 30seg/ 80°C – 30 seg, com leitura/ 40X/ 95°C – 15seg/ 60°C – 1 min/ 95°C – 30seg/ 60°C – 15seg.

Triplicatas técnicas foram realizadas para cada primers em todas as amostras. Também foi feita uma curva de eficiência dos primers e para isso, uma das amostras que apresentou amplificação no PCR convencional, utilizando cada um dos primers, foi usada. O produto do PCR foi observado em gel de agarose 1,5%, corados com SYBRsafe (Invitrogen) e visualizados em transiluminador de luz azul (Invitrogen). A banda de DNA contida no gel foi recortada com bisturi e purificada com EZ-10 Spin Column DNA Gel Extraction Kit (Ludwig Biotec); o DNA purificado foi quantificado e diluído para 1ng/ μ L. A partir deste foi realizada uma curva de diluições nas proporções de 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000 e 1:100000. Com essas diluições foram realizadas as curvas de eficiência de cada um dos primers no equipamento Applied Biosystems® 7500 Real-Time PCR Systems (Applied Biosystem).

Para avaliar qual ou quais variantes da proteína ALPL tem potencial para serem secretadas, as sequência proteicas foram submetidas na ferramenta PrediSi (<http://www.predisi.de>) para predição da presença de peptídeos sinais.

Para realizar os cálculos estatísticos transformamos os valores de CT em número de moléculas, para isso foi utilizada a planilha de cálculo e fórmula disponibilizadas por Pfaffl (2001). Nas análises estatísticas, utilizamos os testes de ANOVA e Teste t no programa Excel 2007 (Microsoft). Consideramos haver diferença significativa entre as amostras quando $p < 0,05$.

8. ANEXO 2

8.1. Resultados e Discussão não incluídos no artigo

Estudos que visam a diferenciação osteogênica e analisam a expressão total de fosfatase alcalina (ALP) e/ou sua atividade, negligenciam a localização celular da ALP e assim podem produzir dados inconsistentes pela falta de padronização metodológica. Por exemplo, alguns autores quantificam a expressão de ALP em lizado celular centrifugado e não observam qualquer aumento da atividade enzimática em função do tratamento (Innes et al., 2013), outros estudos utilizam lizado de células com posterior sonicação e seus resultados mostram um aumento na atividade de ALP total (Hoch et al., 2012). Esta diferença de resultados pode ser atribuída ao fato de que a ALP extracelular, envolvida no depósito de hidroxiapatita durante a diferenciação osteogênica, está associada com a membrana plasmática e pode precipitar durante a centrifugação.

Por outro lado, o aumento da atividade de ALP, usado como marcador durante a diferenciação osteogênica, também acontece durante a diferenciação adipogênica, sendo associado ao acúmulo de lipídios. Como é sabido a dexametasona influencia no aumento da atividade de ALPL durante a diferenciação óssea; porém, a presença ou ausência da dexametasona não tem influência visível na expressão da ALP na diferenciação adipogênica de células 3T3-L1 ou culturas primárias de pré-adipócitos. Entretanto, neste modelo, a expressão diferencial é influenciada pela presença de 3-isobutil-1-metilxantina (Ali et al., 2006).

Levando em consideração estes dados conflitantes estamos em frente à necessidade de sermos mais específicos quanto ao tipo de fosfatase alcalina estudado, seja o gene estudado ou variante gênica estudada.

Atualmente é bem aceito na literatura que a dexametasona é usada na diferenciação das células tronco em tecido ósseo e, por tal motivo, trabalhamos sob o objetivo de verificar quais são os genes ou variantes gênicas estimuladas pelo tratamento de MSCs com dexametasona. O fato de termos utilizado apenas dexametasona como indutor justifica-se por ser o método mais simples que direciona as MSCs para a diferenciação óssea. Além disso, com a adição de outros suplementos, qualquer resultado que fosse obtido, nos impediria de inferir se teria sido em resposta à dexametasona ou aos outros suplementos. Há outros trabalhos como o de Akavia et al. (2005), Nédellec et al. (2002), que também utilizam apenas dexa no tratamento de células tronco e, embora a eficiência do protocolo não se compare com

aqueles que utilizam vitamina C e glicerofosfato como aditivos, é possível de se observar depósito de cálcio ao final do tratamento. Inclusive, o primeiro trabalho de diferenciação de MCSs em tecido ósseo foi feito usando dexametasona como indutor (Maniatopoulos et al., 1988)

Para definir o tipo de fosfatase alcalina envolvido durante a diferenciação osteogênica nós realizamos RT-PCR para as três variantes do gene ALPL e os outros três genes que codificam fosfatases alcalinas (ALPP, ALPI e ALPPL2) comprovando que: os primers do gene ALPL funcionam e se mostraram de qualidade, amplificam uma única banda e esta é do tamanho esperado, com baixa formação de dímeros quando observados em gel de agarose. Apenas as variantes 1 e 2 do gene ALPL apresentaram bandas usando 1 μ L de cDNA não diluído, equivalente a 10ng de RNA total (Figura 1). A Variante 3 apresentou bandas fracas e em apenas algumas amostras; em um teste qPCR, comprovou-se que estas bandas eram apenas dímeros (dados não mostrados). A RT-PCR para estudo dos outros genes codificantes de ALPs não apresentou produto de amplificação, isto pode ser explicado pelo fato de não haver expressão desse gene nas células, ou devido ao primer não estar funcionando; contudo esta última hipótese foi descartada a partir da amplificação de cDNA de placenta (dados não mostrados).

Para a avaliação da eficiência dos primers desenhados fez-se uma curva de eficiência para cada um deles. Como podemos ver nas Figuras 2 a 6, todos os primers apresentaram uma alta eficiência de amplificação e valor do coeficiente de correlação igual a 1, exceto o primer ALP total que apresentou valor de coeficiente de correlação igual a 0,997. Os genes endógenos β -actina e GAPDH apresentaram eficiência de 86,212% e 87,748%, respectivamente. O primer do gene ALP total apresentou eficiência de 86,927%. Os primers desenhados pelo nosso grupo de pesquisa apresentaram uma maior eficiência comparada aos genes endógenos e ao ALP. Os primer da isoforma 1 do gene ALPL apresentou uma eficiência de 92,282% e os primers da isoforma 2 do mesmo gene mostrou uma eficiência ainda maior, 93,015%. Este resultado mostra que, além dos primers desenhados serem específicos para cada variante, também são mais eficientes quando comparados ao primer ALP total, comumente usado como marcador de diferenciação óssea em MSCs humanas.

Pela curva de eficiência observa-se que a variante 2 do gene ALPL tem maior poder de detecção de moléculas quando comparada à variante 1 (ALPL/v1 > 4412 moléculas; ALPL/v2 > 668 moléculas), sendo assim, os primers da isoforma 2 podem ser considerados mais eficientes que os primers da isoforma 1 neste quesito. Entretanto, a baixa abundância da

variante 2 nas MSCs fez com que as curvas de dissociação desta variante apresente curvas correspondente a dímeros de primer em quase todas as diluições, podendo inferir que a quantidade do transcrito está próximo ou abaixo de 668 moléculas a cada 10ng de RNA total (Figura 7).

Os dímeros de primer formados quando o número de moléculas da variante ALPL/v2 encontram-se abaixo de aproximadamente 1000 moléculas a cada 10ng de RNA total possuem temperatura de dissociação (*melting*) próxima aos 80°C e, portanto, alta presença deste dímero pode interferir no resultado superestimando os valores. Na tentativa de otimizar a reação e eliminar os dímeros, foi realizada uma sequência de estudos, onde foram testados diferentes tempos de hibridização, diferentes temperaturas de hibridização e expansão e, também, o denominado “quarto passo”. Com estes testes conseguimos um ciclo que gera para ambas as variantes, uma eficiência acima de 90% e um $R^2 = 1$. Porém, mesmo assim, não foi possível eliminar toda a formação de dímeros de primer quando as quantidades de moléculas era muito baixa.

Devido a essa alta taxa de dímeros, os dados gerados com os primers ALPL/v2 não apresentam robustez suficiente nas amostras com baixa expressão para que se possa confiar totalmente nos resultados de número de moléculas e estes devem ser tomados como aproximados; a partir dos dados da curva de dissociação podemos inferir a amplificação desta variante devido à presença de produtos com temperatura de dissociação similar àquelas geradas pelo produto da amplificação. Contudo, estes valores aproximados não interferem no resultado final uma vez que durante o tratamento houve um aumento significativamente grande da expressão desta variante e estes valores foram obtidos com curva de dissociação considerada ótima.

O “quarto passo” acima citado, é um artifício onde se usa a leitura de fluorescência em uma temperatura acima da temperatura de dissociação dos dímeros e é um método trabalhado por vários autores com melhoras nos dados de qPCR (Audemard et al., 2004; Chatterjee et al., 2012; Crane, 2005).

Considerando a qualidade dos primers podemos dizer que quando o par de primer é adequado, não observa-se formação de dímeros e isto é possível quando a sequência para desenhar-se os primers é longa, mas em situações onde os primers são desenhados usando como base uma sequência restritiva como, por exemplo, para estudo de *splicing* alternativo, nem sempre as regiões a serem estudadas proporcionam a possibilidade de gerar bons primers. Portanto obtém-se o melhor primer dentro das possibilidades, e assim nem sempre os

primers apresentarão todas as qualidades desejadas. Por este motivo, há a necessidade de rever alternativas para análise por qPCR. Entre as alternativas para tornar o primer mais eficiente, foram feitas duas variações: a primeira foi realizar a leitura acima da temperatura de dissociação do dímero de primer (80°C). Como alternativa para avaliar a veracidade destes dados foi feita uma curva de concentração para detectar a quantidade de DNA molde necessária para se obter uma curva de dissociação sem dímero de primer. E também uma curva dentro da área de formação de dímero para identificar intervalos de concentrações a partir do surgimento dos dímeros nas leituras, observando padrões de curvas de dissociação conforme diminuía a quantidade de DNA molde abrindo uma perspectiva para realizar um estudo para determinação matemática de baixas concentrações de DNA molde quando da formação de dímeros de primer.

Contudo, neste caso, a primeira precaução a se levar em consideração é a possibilidade de se trabalhar com a maior quantidade possível de ácidos nucleicos, pois se a quantidade de RNA total adicionada à reação for maior e suficiente para a não formação de dímeros, é provável que não seja necessário o uso da leitura de fluorescência em 80°C. Chatterjee et al. (2012) realizou um trabalho onde testou sete quantidades iniciais diferentes de DNA em qPCR e observou que a eficiência de amplificação da amostra depende da quantidade inicial de amostra fornecida na reação, sendo que esta eficiência é diminuída com a diminuição da quantidade de amostra.

Quanto à dinâmica da expressão de ALPL durante o tratamento de AD-MSCs com dexametasona, a Figura 1 do artigo mostra a grande heterogeneidade da expressão dos genes nos três pacientes, onde os genes apresentaram um comportamento diferente em cada um dos pacientes. Essa diferença de expressão dos genes é justificada, pois cada paciente possui um metabolismo único que se comporta de maneira distinta quando submetidos ao mesmo tratamento. Essa ideia é suportada pelo trabalho realizado por Siddappa et al. (2007), que investigaram a variação a respostas dos genes de ALPL em relação ao tratamento com dexametasona em 19 doadores. Obtiveram como resultado que a indução de ALP variava de 1.3 a 3.8 vezes nos pacientes tratados em relação aos não tratados, indicando uma grande variação individual em resposta a um sinal osteogênico.

No nosso estudo o paciente 1 (P1) não apresentou variação na expressão, tanto de ALPL/v1 quanto de ALPL/v2. Entretanto, o mesmo apresentou uma expressão elevada de ALPL desde o início do tratamento. Os pacientes 2 (P2) e 3 (P3) não apresentaram alta expressão de nenhuma variante da ALPL no início do teste, mas a expressão da variante 1

aumentou com o passar dos dias nas células tratadas, já a expressão da variante 2 manteve um aumento menor quando comparada á variante 1.

Também foi observado, que as células em cultura apresentam um aumento intrínseco da expressão de ALPL ao longo dos dias. Portanto, se faz necessário que para cada amostra tratada haja também um controle, não se utilizando somente um controle para todos os tratados (dia 0). Mesmo que o paciente P1 não tenha apresentado variação na expressão entre tratados e controles, ele não apresentou problemas na diferenciação osteogênica quando induzida pelo método padrão com dexametasona, vitamina C e glicerofosfato (Msc. Bruno Paiva, comunicação pessoal). Essa diferenciação das células do P1 em tecido ósseo poderia ser explicada pelo nível de expressão da fosfatase alcalina que este paciente apresentava já desde o início do tratamento.

No paciente 3 (P3) é possível observar um aumento significativo na variante 1 a partir do terceiro dia enquanto que este comportamento não é observado nos outros pacientes. A variante 2, entretanto, apresenta o mesmo comportamento entre tratados e controles no dia 3. No sétimo dia de tratamento a V1 teve uma alta expressão nos Pacientes 2 e 3. A V2 teve um pequeno aumento, mas aproximadamente 4 vezes menor do que a variante 1. A expressão da ALPL nos controles varia entre pacientes, e varia nos diferentes dias quando comparada nos mesmos paciente. Apesar de essa variação ser mínima ela deve ser levada em consideração para podermos avaliar corretamente o efeito da dexametasona na expressão de ALPL (Figura 1 do artigo).

Na Figura 8 é mostrado o resultado da submissão das sequências das três variantes de ALPL à ferramenta PrediSi. Apenas a V1 de ALPL apresentou peptídeo sinal, esta sinalização permite que ela seja secretada para fora da célula. A ALPL secretada é responsável pela hidrólise de PPI, gerando com isso Pi (Terkeltaub, 2001). Esse fosfato inorgânico é enviado para dentro da vesícula de matriz através de um canal de Na/Pi, se liga com o Ca^{2+} gerando hidroxiapatita (Negri, 2011). As variantes 2 e 3 não apresentaram peptídeo sinal, portanto sua atividade deve ocorrer intracelularmente, mesmo assim elas poderiam influenciar na mineralização, transformando PPI em Pi e transportá-lo para fora da célula, mas esta ideia não tem muito suporte na literatura.

Os resultados deste estudo proporcionam um sistema de primers funcionais para avaliar especificamente as variantes extracelular (ALPL/v1) e intracelular (ALPL/v2) do gene ALPL, sugerindo que a diferenciação osteogênica promovida pela dexametasona não só induz a expressão de ALPL, mas também estimula o *splicing* alternativo que produz a V1

extracelular. Ao mesmo tempo, concordamos com Brini et al. (2013), que propôs o uso de marcadores específicos no estágio inicial de diferenciação, a fim de selecionar aquelas amostras que apresentam as melhores características, evitando assim, resultados negativos e com isso economizar tempo e recursos.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DO ANEXO 2

- Akavia, U. D.; Shur, I.; Rechavi, G.; Benayahu, D. (2006). Transcriptional profiling of mesenchymal stromal cells from young and old rats in response to Dexamethasone. *BMC Genomics*, 7, 95. doi:10.1186/1471-2164-7-95
- Ali, A. T.; Penny, C. B.; Paiker, J. E.; Psaras, G.; Ikram, F.; Crowther, N. J. (2006). The relationship between alkaline phosphatase activity and intracellular lipid accumulation in murine 3T3-L1 cells and human preadipocytes. *Analytical Biochemistry*, 354(2), 247–54. doi:10.1016/j.ab.2006.04.028
- Audemard, C.; Reece, K. S. & Burrenson, E. M. (2004). Real-Time PCR for Detection and Quantification of the Protistan Parasite *Perkinsus marinus* in Environmental Waters †. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(11), 6611–6618. doi:10.1128/AEM.70.11.6611
- Brini, A. T.; Niada, S.; Lambertini, E.; Torreggiani, E.; Arrigoni, E.; Lisignoli, G.; Piva, R. (2013). Chondrogenic potential of human mesenchymal stem cells and expression of Slug transcription factor. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. doi:10.1002/term
- Chatterjee, N.; Banerjee, T. & Datta, S. (2012). Accurate estimation of nucleic acids by amplification efficiency dependent PCR. *PloS one*, 7(8), e42063. doi:10.1371/journal.pone.0042063
- Crane, B. L. (2005). Real-time PCR measurement by fluorescence anisotropy. *Massachusetts Institute of Technology*.
- Hoch, A. I.; Binder, B. Y.; Genetos, D. C.; Leach, J. K. (2012). Differentiation-dependent secretion of proangiogenic factors by mesenchymal stem cells. *PloS One*, 7(4), e35579. doi:10.1371/journal.pone.0035579
- Innes, J. F.; Gordon, C.; Vaughan-Thomas, A.; Rhodes, N. P.; Clegg, P. D. (2013). Evaluation of cartilage, synovium and adipose tissue as cellular sources for osteochondral repair. *Veterinary journal*, 197(3), 619–624. doi:10.1016/j.tvjl.2013.05.044

- Maniopoulos, C.; Sodek, J. & Melcher, A. H. (1988). Bone formation in vitro by stromal cells obtained from bone marrow of young adult rats. *Cell and tissue research*, 254(2), 317–330
- Nédellec, P., Edling, Y., Perret, E., Fardeau, M., & Vicart, P. (2002). Glucocorticoid treatment induces expression of small heat shock proteins in human satellite cell populations: consequences for a desmin-related myopathy involving the R120G alpha B-crystallin mutation. *Neuromuscular Disorders : NMD*, 12(5), 457–465
- Negri, A. L. (2011). Regulation of Bone Mineralization by Inorganic Peptide Factors. *Rev Argent Endocrinol Metab*, (2), 48: x–x
- Siddappa, R. & Licht, R. (2007). Donor variation and loss of multipotency during in vitro expansion of human mesenchymal stem cells for bone tissue engineering. *Journal of Orthopaedic Research*, 1029–1041. doi:10.1002/jor.20402
- Terkeltaub, R. A. (2001). Inorganic pyrophosphate generation and disposition in pathophysiology. *Am J Physiol Cell Physiol*, 281: C1–C11

FIGURAS

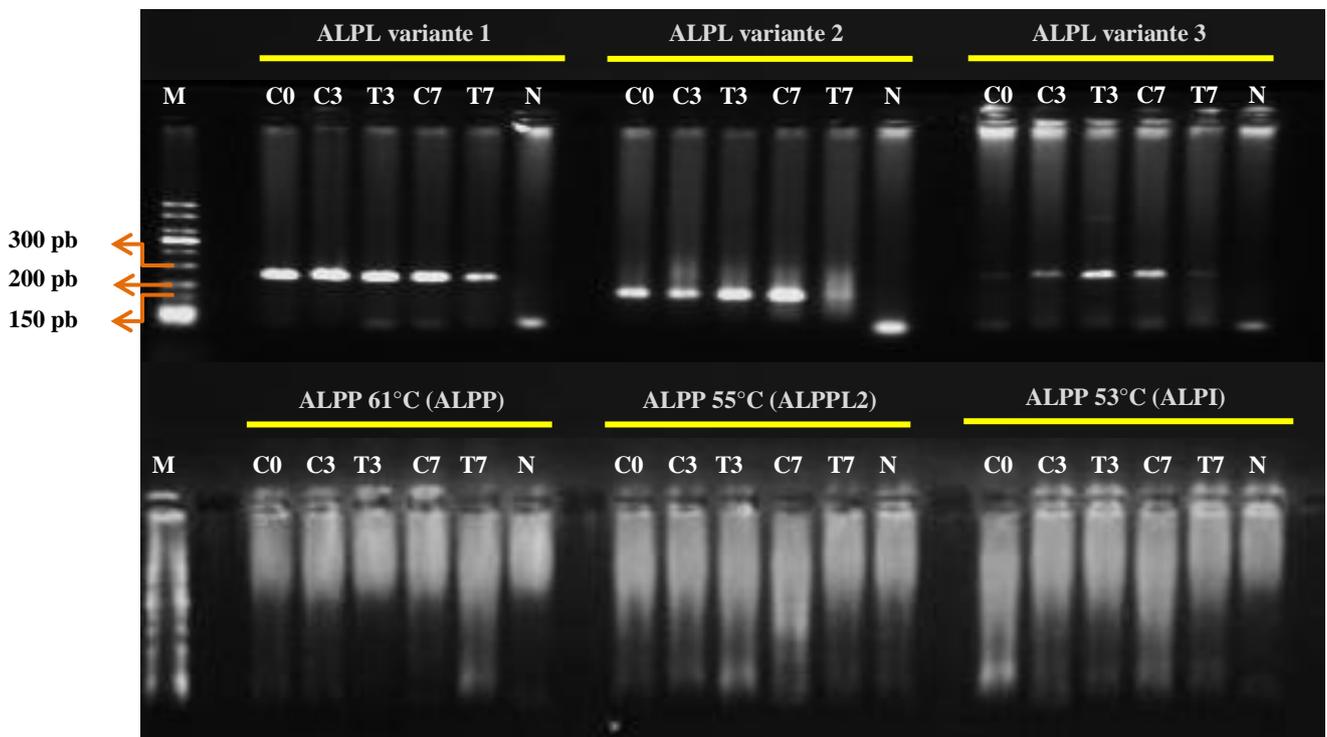


Figura 1. Amplificação por PCR em gel de agarose 1,5%. Abreviaturas: M – marcador de peso molecular; N – negativo; C0 – controle dia zero; C3 – controle dia três; T3 – tratado com dexta dia três; C7 – controle dia sete; T7 – tratado com dexta dia sete.

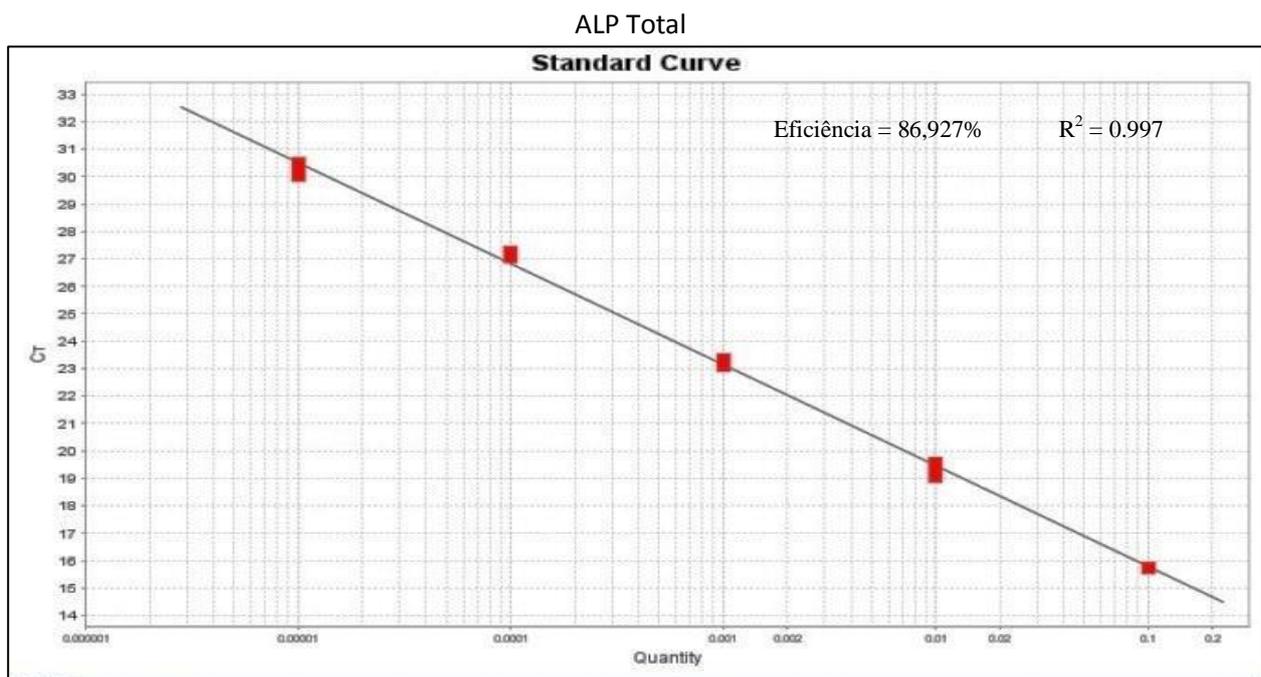


Figura 2. Curva de eficiência dos primers do gene ALP, realizada em triplicatas, com diluições que foram de 1:10 a 1:10⁻⁵.

ALPL/v1

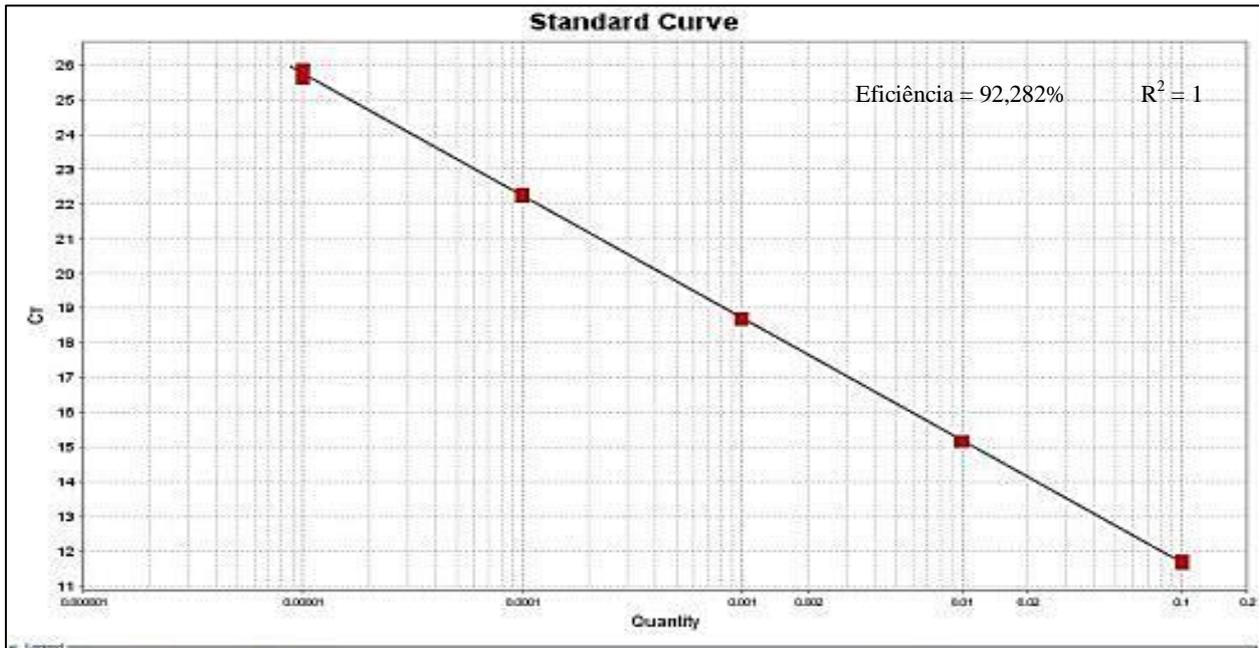


Figura 3. Curva de eficiência dos primers do gene ALPL/v1, realizada em triplicatas, com diluições que foram de 1:10 a

ALPL/v2

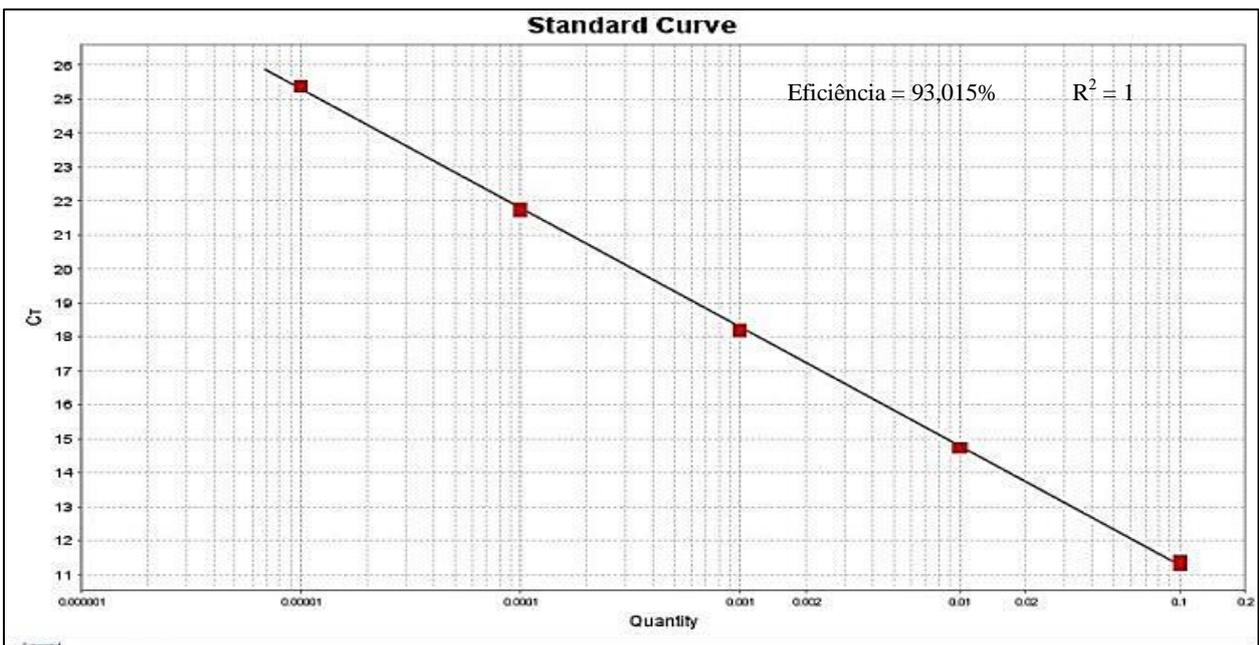


Figura 4. Curva de eficiência dos primers do gene ALPL/v2, realizada em triplicatas, com diluições que foram de 1:10 a 1:10⁸.

Beta - actina

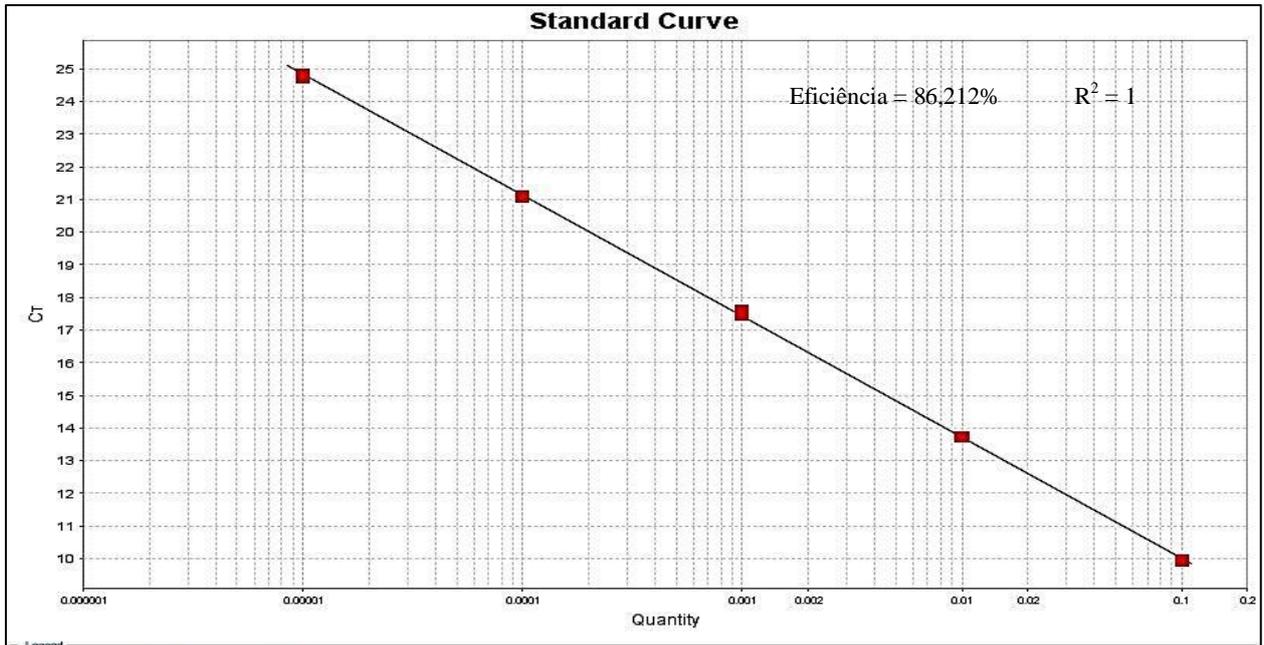


Figura 5. Curva de eficiência dos primers do gene Beta-actina, realizada em triplicatas, com diluições que foram de 1:10 a 1:10⁻⁵.

GAPDH

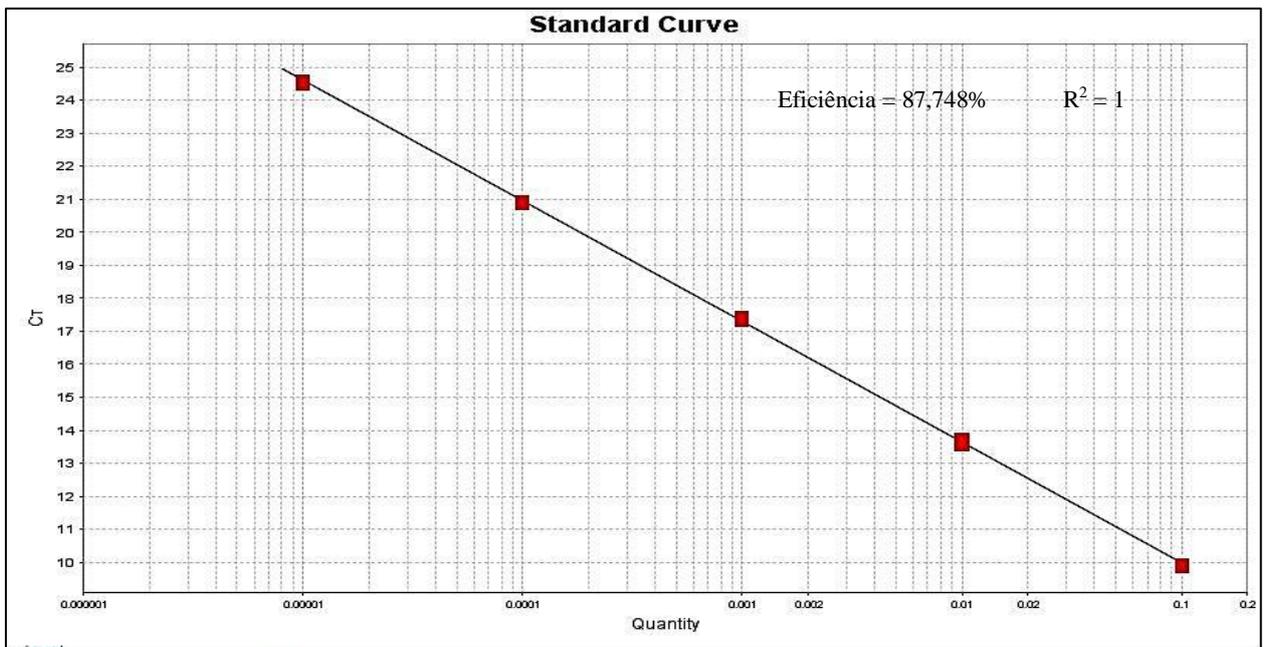


Figura 6. Curva de eficiência dos primers do gene GAPDH, realizada em triplicatas, com diluições que foram de 1:10 a 1:10⁻⁵.

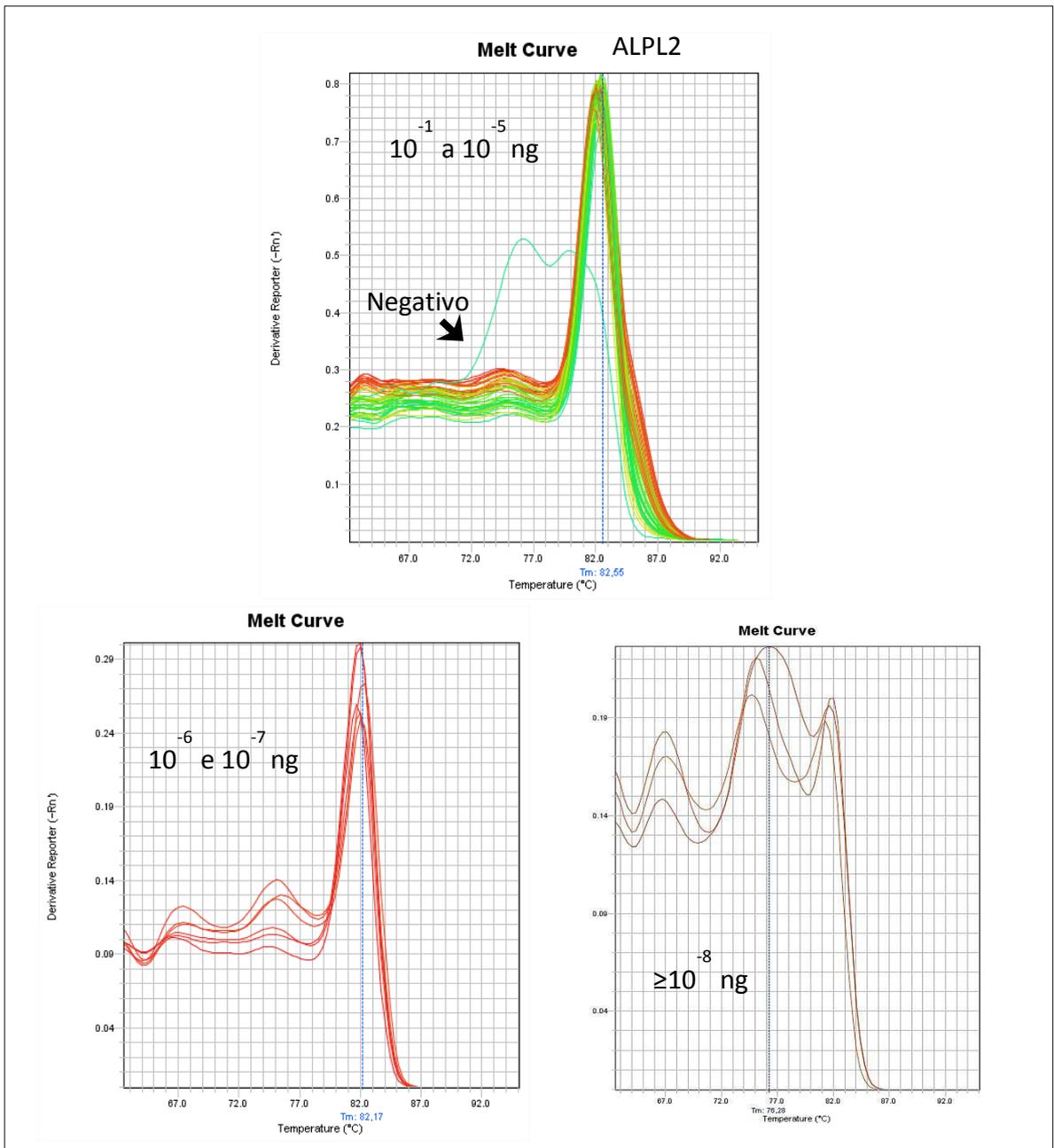


Figura 7. Curvas de dissociação da ALPL/v2 mostrando, desde a diluição de 10^{-1} até 10^{-8} , a presença e aumento da formação de dímeros quanto menor a concentração da amostra.

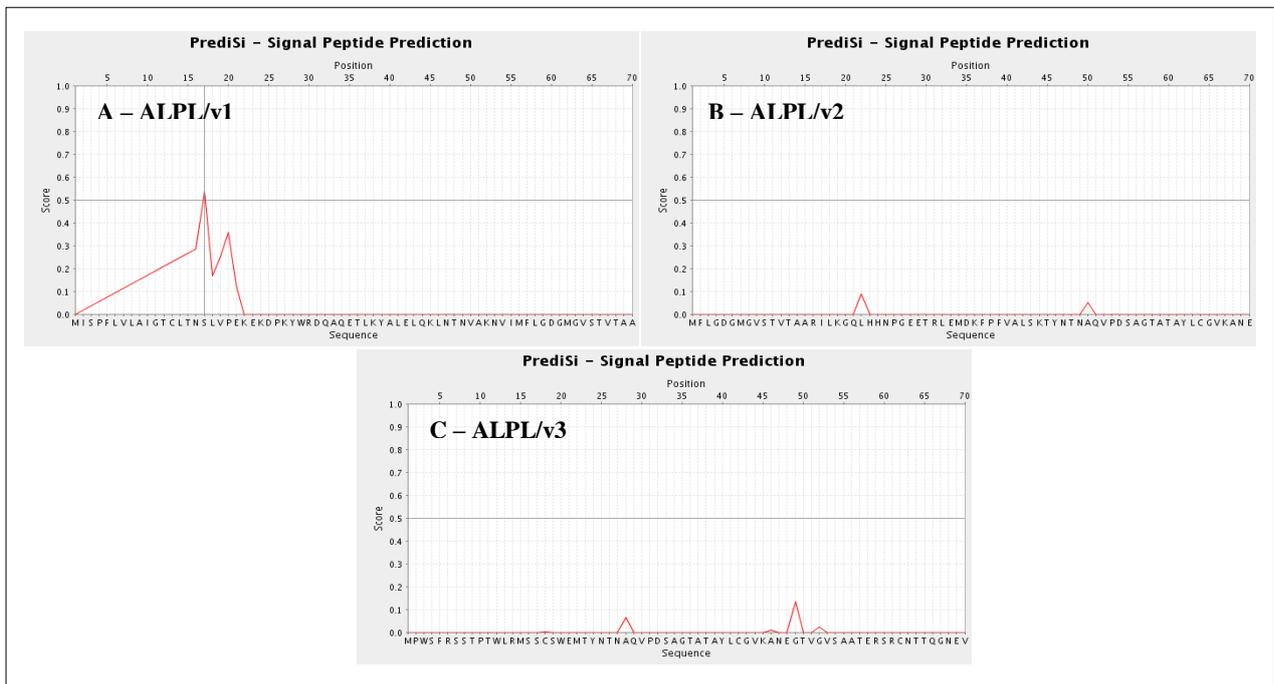


Figura 8. Predição de peptídeo sinal nas três variantes do gene ALPL. A – variante 1; B – variante 2; C – variante 3. Somente na variante 1 foi predita a presença de peptídeo sinal.