

ANDRESSA VAZ SCHITTINI

**CONSTRUÇÃO DE VETORES LENTIVIRAIS PORTANDO O GENE DA *GFP* SOB
O CONTROLE DE PROMOTORES CARDÍACOS PARA A TRANSDUÇÃO DE
CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS INDUZIDAS A DIFERENCIAR EM
CARDIOMIÓCITOS**

Monografia apresentada à disciplina
Parasitologia Geral como requisito parcial à
conclusão do Curso de Ciências Biológicas,
Setor de Ciências Biológicas, Universidade
Federal do Paraná.

Orientador Interno: Dr^a. Adriana Mercadante

Orientador externo: Dr. Alejandro Correa
Dominguez

Curitiba

2007

A minha família Xixo, Josélia e
André por todo amor, paciência
e carinho.

Agradecimentos

À Deus por sempre guiar e conduzir minha vida.

À minha família que amo muito e que sempre me apoiou nos momentos difíceis.

As amigas eternas Fernanda e Amanda.

Aos amigos da faculdade: Elaine, Augusto, Nicole, Rodrigo, Milenie, Nádia, Maiara, Thayna, Bianca, Manuela e Rafael.

Ao IBMP pela grande oportunidade de estágio.

Ao Doutor Alejandro Correa Dominguez, que sempre foi um orientador dedicado e atencioso.

A Fernanda Mansur por ter me ajudado desde a escolha do primeiro primer

A grande equipe de células tronco: Bruno, Patrícia, Alessandra, Joana e Crisciele.

SUMÁRIO

RESUMO	X
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	8
3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	8
4 MATERIAIS E MÉTODOS	9
4.1 Cultivo das CTMs isoladas de tecido adiposo e/ou medula óssea.....	9
4.2 Transdução das CTMs isoladas da medula óssea e/ou tecido adiposo humano com lentivírus portando o gene da <i>GFP</i>	9
4.3 Avaliação da sobrevivência.....	10
4.4 Seleção de genes que se expressam especificamente em cardiomiócitos e busca de seus promotores.....	11
4.5 Desenho de iniciadores para esses promotores.....	12
4.6 Amplificação da seqüência dos promotores e de colônia.....	13
4.7 Digestão e Ligação dos promotores em pGEM-T e à montante do gene da <i>GFP</i> no vetor pRLsin18ppt-pgk-gfp.....	13
4.8 Miniprep e midiprep.....	14
5 RESULTADOS e DISCUSSÃO	16
GLOSSÁRIO	25
REFERÊNCIAS	28

RESUMO

As células tronco mesenquimais (CTMs) são células adultas que possuem capacidade de auto-renovação, viabilidade a longo prazo e um potencial limitado para diferenciar em distintos tipos celulares. As CTMs não possuem restrições éticas, não são teratogênicas e vêm sendo muito estudadas para sua utilização na terapia celular. O transplante de células tronco mesenquimais derivadas da medula óssea adulta têm sido proposto, e está atualmente sendo testado, como estratégia para o reparo cardíaco após o dano do miocárdio. No entanto, é razoável pensar que a pré-diferenciação a um determinado tipo celular antes do transplante, por exemplo, cardiomiócitos, pode ser mais vantajosa na regeneração cardíaca que o transplante de células não comprometidas. As CTMs podem ser isoladas de diferentes fontes como a medula óssea e tecido adiposo, e diferentes métodos de indução mostram que elas são capazes de diferenciar em células semelhantes a cardiomiócitos *in vitro*. Uma das dificuldades encontradas em qualquer dos protocolos de diferenciação *in vitro* é a separação das populações celulares diferenciadas e não diferenciadas e o seguimento em cultura das células em diferenciação para estudos posteriores, moleculares ou celulares. Para contornar esse problema, vetores lentivirais podem ser usados para transferir genes repórteres nas CTMs. Os vetores lentivirais são derivados do HIV-1 e mostram uma alta eficiência na transferência de transgenes, os quais são integrados no genoma independentemente da capacidade proliferativa das células hospedeiras. Assim, com o intuito de quantificar e acompanhar a diferenciação das CTMs em cardiomiócitos, nesse trabalho foram utilizados vetores lentivirais de terceira geração para transduzir estas células com o gene repórter da proteína verde fluorescente podendo estar sob controle de genes expressos em músculo cardíaco.

Palavras-chave: Células tronco mesenquimais, cardiomiócitos, lentivírus

1. INTRODUÇÃO

As células tronco são células que possuem capacidade de auto-renovação, viabilidade a longo prazo e potencial de diferenciação para vários tipos celulares (ZUK *et al.*, 2002). Elas podem ser divididas em duas classes: embrionária e adulta.

As células tronco embrionárias (CTEs) são pluripotentes, derivadas de células totipotentes de blastocistos humanos e que foram isoladas pela primeira vez por Thomson *et al.* (THOMSON *et al.*, 1998). Elas possuem o potencial para gerar todos os tipos celulares das três linhagens germinativas: mesoderme, ectoderme e endoderme, tanto *in vivo* como *in vitro* (Figura 1) (KEHAT *et al.*, 2001).

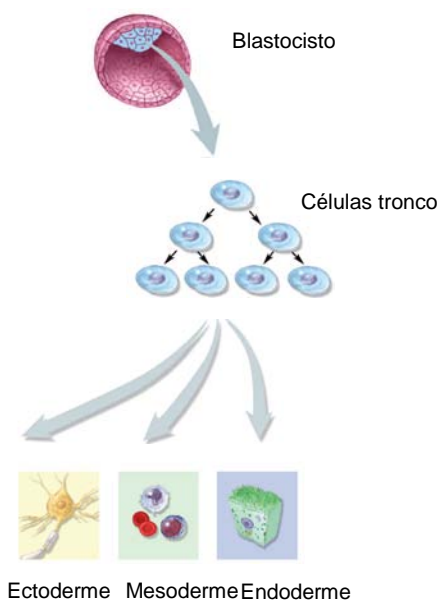


Figura 1: Diferenciação das células tronco embrionárias nos três folhetos germinativos. (Fonte: YU, J.; THOMSON, J. A. *Regenerative Medicine*, 2006 p. 2)

As CTE expressam fatores transcricionais tais, como, OCT3/4 e nanog e apresentam uma atividade aumentada da telomerase. Embora exista um grande interesse do uso das CTEs para produção de órgãos e tecidos, as limitações em seu uso se encontram nas restrições éticas e na geração de teratomas (WEI *et al.*, 2005).

As células tronco adultas são células multipotentes (DAMME *et al.*, 2006) que podem ser encontradas em vários tecidos como, por exemplo, medula óssea, corrente sanguínea, córnea e retina do olho, polpa do dente, fígado, pele, trato

gastrointestinal, pâncreas entre outros e apresentam uma diferenciação mais limitada quando comparadas com as CTEs (MONTROYA *et al.*, 2005). Diferentemente das células tronco embrionárias, o uso das CTMs não possuem restrições éticas, não são teratogênicas e permitem o transplante autólogo ou pouco imunogênico (TODA *et al.*, 2007).

Uma grande fonte de células tronco adultas é a medula óssea, local onde podem ser encontradas tanto células tronco hematopoéticas quanto células tronco mesenquimais. Mantendo as características de células tronco, as células tronco hematopoéticas possuem a capacidade de auto renovação e de diferenciação em todos os tipos de células sanguíneas, possibilitando a reposição de células do sistema hematopoético (VERFAILLIE *et al.*, 2002).

As células tronco mesenquimais (CTM) (MINGUELL *et al.*, 2001) podem ser isoladas não somente da medula óssea adulta mais também do sangue periférico e tecidos como, por exemplo o tecido adiposo (ZUK *et al.*, 2001), apresentando uma frequência muito baixa estimada em torno de 0,05% e de 0,5% da fração celular da medula óssea (STRAUER *et al.*, 2003) e no tecido adiposo, respectivamente (DE UGARTE *et al.*, 2003). As CTMs são células tronco adultas, caracterizadas pelo fato de permanecerem quiescentes, de forma que não se proliferam. Elas são importantes na manutenção da integridade dos tecidos e órgãos, pois são células indiferenciadas que estão num tecido diferenciado. Essas células podem produzir todos os tipos de células do tecido, sendo que essa especialização depende de qual tecido elas foram originadas, ou da plasticidade da célula (WAGERS *et al.*, 2002; VERFAILLIE *et al.*, 2002; MINGUEL *et al.*, 2001; RANGAPPA *et al.* 2003; RODRIGUEZ *et al.*, 2004, MONTROYA *et al.*, 2005; KULTERER *et al.*, 2007) incluindo células cardíacas (Figura 2) (TOMA *et al.*, 2002; MAKINO *et al.*, 1999).

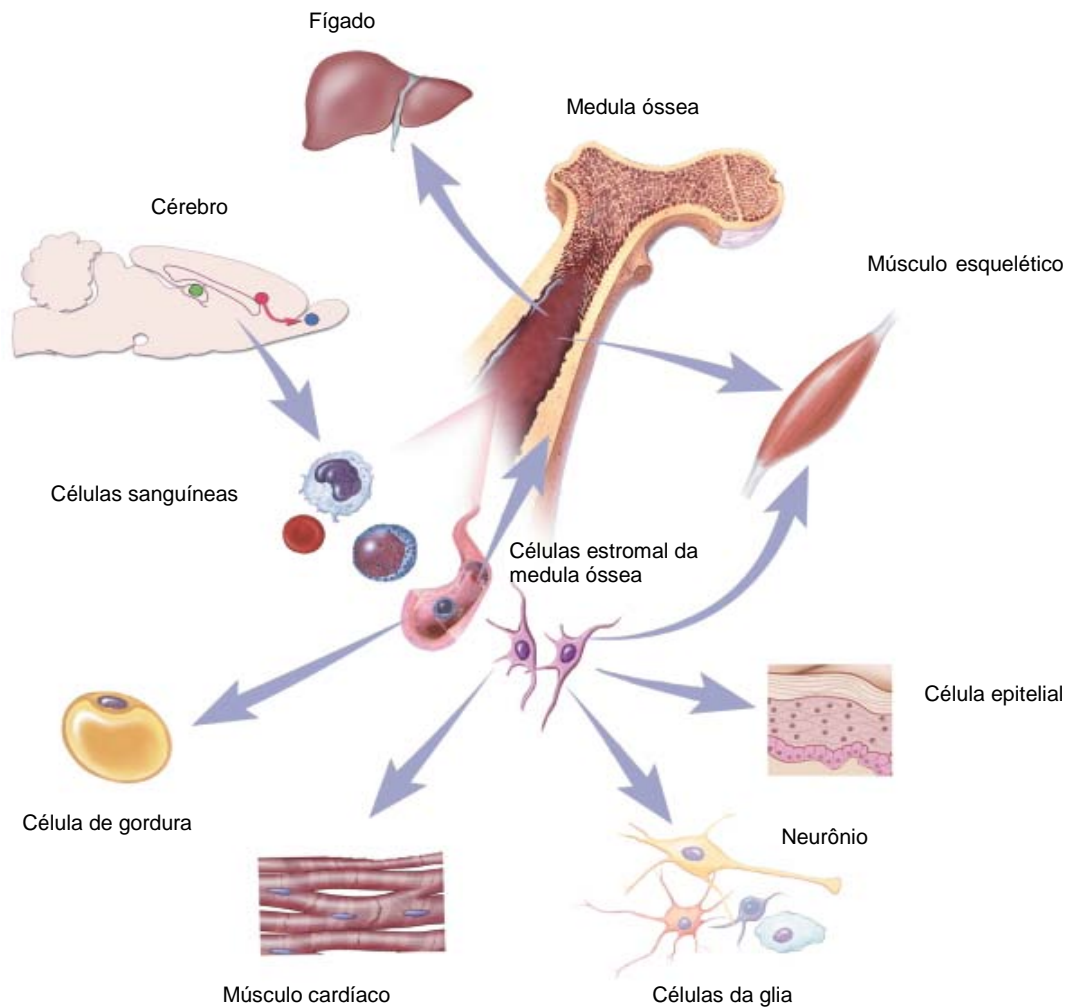


Figura 2: Plasticidade da célula (Fonte: Stem cells: Scientific Progress and Future Research Directions)

As CTMs têm como propriedade física a aderência ao substrato, morfologia alongada semelhante aos fibroblastos (KOTOBUKI *et al.*, 2004) e a capacidade de formar colônias quando em baixa densidade (COLTERER *et al.*, 2000). Quanto à característica fenotípica, as CTMs são destituídas de marcadores hematopoéticos e endoteliais como CD45 e Cd11b e moléculas de adesão como CD31 e CD18, mas geralmente expressam uma bateria de marcadores: CD44, CD49e, CD62, STRO-1, MHC-1, CD-117, CD-105, CD-90, CD-73 (KULTERER *et al.*, 2007). Para definir funcionalmente uma célula tronco mesenquimal esta deve ser capaz de se diferenciar *in vitro* em três linhagens: adipócitos (PITTINGER *et al.*, 1999), condrócitos (YOO *et al.*, 1998) e osteoblastos (JAISWAL *et al.*, 1997) (Figura 3).



Figura 3: Três linhagens diferenciadas *in vitro* (Fonte: adipócitos: www.conganat.org; condrócitos: virtual.ujaen.es; osteoblastos: www.zsalud.com – acesso: 27/11/07)

Atualmente, elas vêm sendo muito estudadas para sua utilização na terapia celular como, por exemplo, na cardiomioplastia (reparação de tecido cardíaco danificado) (FORBES *et al.*, 2002; TOMA *et al.*, 2002). O transplante de células tronco mesenquimais derivadas da medula óssea adulta tem sido proposto, e está atualmente sendo testado como estratégia para o reparo cardíaco após o dano do miocárdio, objetivando uma melhora na regeneração cardíaca (JAVAZON *et al.*, 2004; SMITS *et al.*, 2005; POH *et al.*, 2006).

Portanto, é razoável pensar que a pré-diferenciação *in vitro* das CTMs a um determinado tipo celular antes do transplante, principalmente a cardiomiócitos e células endoteliais, pode ser mais vantajosa na regeneração cardíaca que o transplante de células não comprometidas evitando, assim, tipos celulares indesejados (Figura 4) (TOMITA *et al.*, 1999; MAKINO *et al.*, 1999; MIN *et al.*, 2002; BITTIRA *et al.*, 2002; DAVANI *et al.*, 2003; PRÓSPER *et al.*, 2003; RAMAKRISHNAN *et al.*, 2003; SOUZA *et al.*, 2004; BROFMAN *et al.*, 2004; BEHFAR *et al.*, 2007).

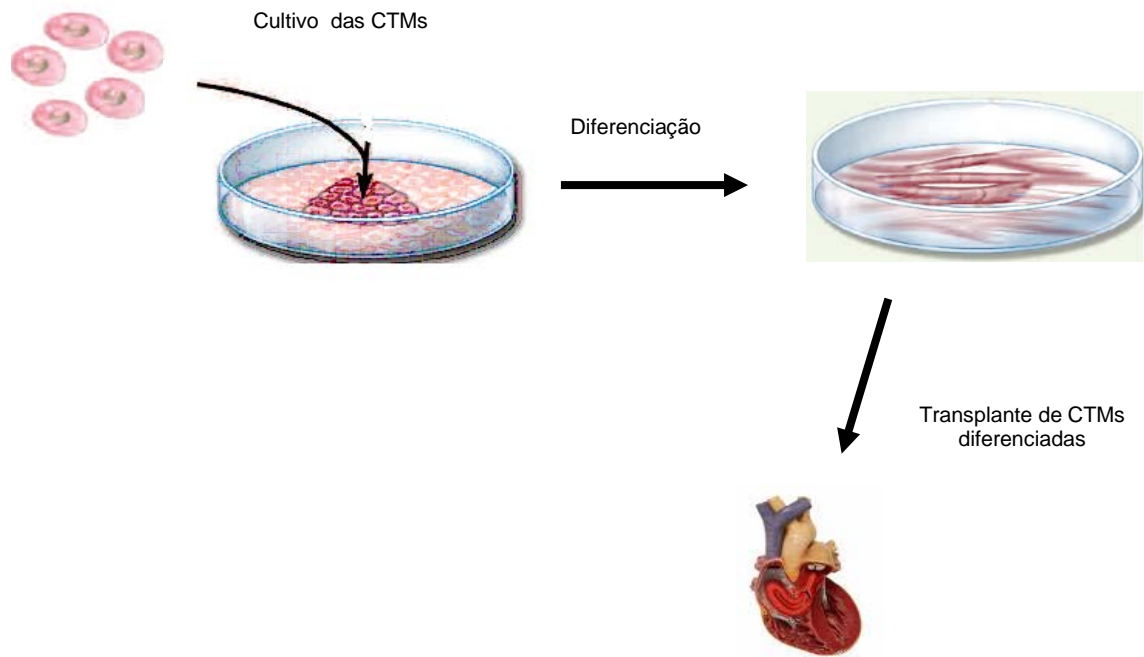


Figura 4: Pré-diferenciação das CTMs *in vitro* e transplante em tecido cardíaco.

De fato, estudos de pesquisa básica mostraram que tanto as CTMs como as células tronco embrionárias podem ser direcionadas a fenótipo cardíaco (SMITS *et al.*, 2005; KEATING *et al.*, 2006), mas os processos de diferenciação *in vitro* mostram uma eficiência baixa, menos que 3%, ou muitas vezes não são quantificados porque não é possível fazer um acompanhamento *in vitro* das células em diferenciação (FUKUHARA *et al.*, 2003; ZHANG *et al.*, 2005; KADIVAR *et al.*, 2006).

A diferenciação das células tronco em uma linhagem cardíaca pode ser alcançada através de várias técnicas que podem ser utilizadas em conjunto ou separadamente envolvendo múltiplas vias de sinalização (HENG *et al.*, 2004). Os processos que regulam a diferenciação são complexos e as interações entre os sinais são pouco conhecidas. Entretanto, o microambiente onde a célula está se desenvolvendo tem um papel crítico no seu comprometimento à diferenciação em determinada linhagem celular (RANGAPPA *et al.*, 2003). Várias estratégias podem ser utilizadas para orientar a diferenciação das células tronco *in vitro* como, entre outras, o desenvolvimento de meios de cultura quimicamente definidos (WONG *et al.*, 1993; GOLDSBOROUGH *et al.*, 1998; HENG *et al.*, 2004) e co-culturas, tanto diretas quanto indiretas, de células não diferenciadas com células diferenciadas

(TERADA *et al.*, 2002; YING *et al.*, 2002 ; HENG *et al.*, 2004). Além disso, alguns compostos químicos sintéticos também podem promover a diferenciação das células tronco mesenquimais em cardiomiócitos *in vitro*. Entre esses está a 5-azacitidina que é um morfógeno análogo da citosina capaz de alterar a expressão de certos genes que regulam a diferenciação (FUKUDA, 2000).

A diferenciação a cardiomiócitos é caracterizada pela maturação de estruturas miofibrilares, pela expressão de canais de sódio, potássio e cálcio para contração e excitação, pela formação das junções gap e pela saída do estado G0 do ciclo celular para a proliferação (WEI *et al.*, 2005). Durante a diferenciação, genes de expressão tipicamente cardíaco são ativados como, por exemplo, os fatores de transcrição GATA 4 e NKx 2.5 e proteínas estruturais de sarcômero como Troponina I, Troponina T cardíaca, Miosina de Cadeia Leve Atrial (MLCa) e Miosina de Cadeia Leve Ventricular (MLCv) (KEHAT *et al.*, 2001).

Entre as dificuldades encontradas em alguns dos protocolos de diferenciação *in vitro* estão a separação das populações celulares diferenciadas e não diferenciadas e o acompanhamento, em cultura, das células em diferenciação para estudos moleculares e/ou celulares posteriores. Essas dificuldades poderiam ser contornadas através da utilização do método de separação magnética (SIEGEL, 2002), do *sorting* por citometria de fluxo (HERZENBERG *et al.*, 2002) ou pela utilização de genes repórteres como a da proteína *green fluorescent protein* (GFP).

Trabalhos recentes demonstram o uso de vetores oncoretrovirais para transduzir genes em CTMs (ZHANG *et al.*, 2003; BONCI *et al.*, 2003), uma vez que esses vetores transferem genes eficientemente para a cromatina de células-alvo sem transferência de outros genes virais (NALDINI, 1998). No entanto, a limitação de seu uso é devido à baixa eficiência da transdução, à falta da expressão do transgene por longo tempo (ZHANG, 2005) e à dependência de divisões celulares para seu ciclo de vida (ZHANG, 2002).

Uma possível solução para esse problema é o uso de vetores lentivirais para transduzir o gene da proteína do *GFP* em CTMs. Os vetores lentivirais são um tipo de retrovírus derivados do HIV tipo 1 (NALDINI, 1998) e que podem infectar tanto células em divisão, quanto quiescentes (KAY, 2001; NALDINI, 1998; TRONO, 2000 VIGNA *et al.*, 2000; ZHANG *et al.*, 2002). Isso é possível devido a capacidade que o vetor lentiviral possui de atravessar o poro nuclear pela maquinaria de importação do

núcleo e, assim, de se integrar no genoma (KAY, 2001), podendo sustentar sua expressão por até mais de cinco meses (REISER *et al.*, 2005).

O genoma de lentivírus contém as regiões *gag*, *pol* e *env*, que codificam as proteínas de membrana da célula hospedeira, as enzimas associadas ao vírus e as glicoproteínas do envelope, respectivamente (VIGNA, 2000). Essas regiões codificadoras são flanqueadas pelas repetições longas terminais (LTRs: 5' e 3'LTR) e pelas seqüências cis-acting essenciais para a integração e transcrição (KAY, 2001). Além desses genes, os lentivírus possuem dois genes regulatórios *tat* e *rev*, requeridos para a replicação viral (KAY, 2001; NALDINI, 1998).

Os lentivírus podem ser gerados *in vitro* usando um múltiplo sistema atenuado de empacotamento, diminuindo o risco de mobilização do vetor e recombinação com o vírus tipo selvagem (KAY, 2001; NALDINI, 1998). Este é um procedimento que permite o trabalho com biossegurança, que é ativado pela transfecção de quatro plasmídeos: (1) *gag* e *pol*: codificam proteínas estruturais do vírus e a transcriptase reversa, respectivamente; (2) *rev*: um regulador pós-transcricional da expressão de *gag* e de *pol*, bem como das proteínas de exportação nuclear de RNA; (3) o cassette para a transferência do transgene (*GFP*) que está sob o controle do promotor de citomegalovírus (CMV) flanqueado pelas seqüências cis-acting que são requeridas para o encapsidamento, para a transcrição reversa e integração, incluindo o sinal (ψ^+) de empacotamento (ZUFFEREY, 1998; DAMME *et al.*, 2006) e (4) nesse plasmídeo o gene *env* é substituído por *vsv-g* (Vírus estomatitis vesicular) que aumenta a estabilidade do lentivírus e seu tropismo de infecção porque seu receptor é simultaneamente expresso em células de mamíferos (TRONO, 2000).

Esses vetores lentivirais possuem uma deleção na seqüência 3'LTR que, quando transduzidas em células alvos, resultam na inativação da transcrição da seqüência 5'LTR.

Para facilitar a entrada do lentivírus nas CTMs alguns trabalhos relatam o uso de polibrene o qual é um potencializador e que, segundo Jenses (2002), é capaz de aumentar a transdução viral em células da linhagem NIH-373.

Com o intuito de acompanhar a diferenciação de CTMs a cardiomiócitos *in vitro*, vetores lentivirais foram usados para transduzir estas células com o gene repórter da proteína verde fluorescente (GFP) sob o controle de promotores do citomegalovírus ou de genes expressos em músculo cardíaco.

2. OBJETIVO GERAL

Construção e transdução de vetores lentivirais que contém o gene da proteína do *GFP* sob o controle de promotores cardíacos para células tronco mesenquimais induzidas a se diferenciarem em cardiomiócitos

3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Cultivo das CTMs isoladas de tecido adiposo e de medula óssea
2. Transdução das CTMs isoladas da medula óssea e/ou do tecido adiposo humano com lentivírus que contém o gene da proteína do *GFP*
3. Avaliação da sobrevivência das CTM transduzidas
4. Seleção de genes que se expressam especificamente em cardiomiócitos e busca de seus promotores
5. Clonagem dos promotores (desenho dos primers, amplificação e purificação da seqüência dos promotores, digestão e ligação)
6. Produção das partículas virais contendo o plasmídeo com a GFP utilizando as células da linhagem 293FT

4. MATERIAIS E MÉTODOS:

4.1 Cultivo das CTMs isoladas de tecido adiposo e/ou medula óssea:

As células da medula óssea e do tecido adiposo foram coletadas na Pontifícia Universidade Católica do Paraná e Santa Casa de Misericórdia de Curitiba de pacientes submetidos a cirurgias cardíacas (revascularização do miocárdio). A coleta de células da medula óssea foi realizada através da punção da crista ilíaca posterior do doador, com o auxílio de seringas contendo solução anticoagulante e transferida para bolsa de transferência contendo meio 199. As células do tecido adiposo serão coletadas de doadores que foram submetidos a cirurgias de dermolipectomia no Instituto de Medicina e Cirurgia do Paraná.

As CTMs isoladas de tecido adiposo humano foram plaqueadas numa concentração de $1,25 \times 10^5$ células por poço com D-MEM-F12 suplementado com 15% de soro bovino fetal e 10x de antibiótico penicilina-estreptomicina. Já as CTMs isoladas de medula óssea foram plaqueadas numa concentração de $1,25 \times 10^5$ células por poço com IMDM suplementado com 15% de soro bovino fetal e 10x de antibiótico penicilina-estreptomicina. As placas foram incubadas numa estufa com 5% de tensão de CO₂ a 37°C com o meio de cultura sendo trocado uma vez por semana.

4.2 Transdução das CTMs isoladas da medula óssea e/ou tecido adiposo humano com lentivírus portando o gene da GFP:

As CTM foram transduzidas com o gene repórter GFP utilizando vetores lentivirais em uma MOI de 10. Para a produção das partículas virais transdutoras, culturas de células da linhagem 293FT (Invitrogen) foram estabelecidas em placas de 15 cm de diâmetro, utilizando 22 mL de meio "high-glucose D-MEM" em cada placa e mantidas na estufa a 37°C até alcançarem uma confluência de 40 – 60%. Para a transfecção, foram plaqueadas $8,5 \times 10^6$ células. A solução de transfecção contém: CaCl₂ (2,5 M), DNA a transfectar (concentração 0,5-3 mg/mL) e HBS 2X (pH 7,03). A partir da transfecção o meio foi retirado das placas no período de 24 e 48 horas, filtrado (filtro 0,22 µm) e ultracentrifugado a 19000x g por 2 horas. O *pellet* foi

ressuspendido em PBS. Para a titulação foram usadas as linhagens de células HeLa, sendo plaqueadas 5×10^4 células em cada poço, em duas placas de seis poços (uma controle e outra transduzida) (Figura 5), e mantidas com meio RPMI suplementado com 10% de soro bovino fetal. No dia da infecção, as células foram tripsinizadas e foi adicionado meio composto de 10 mL de RPMI (10% de soro bovino fetal), 80 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de polibrene e diferentes volumes do meio que continha os vetores lentivirais.

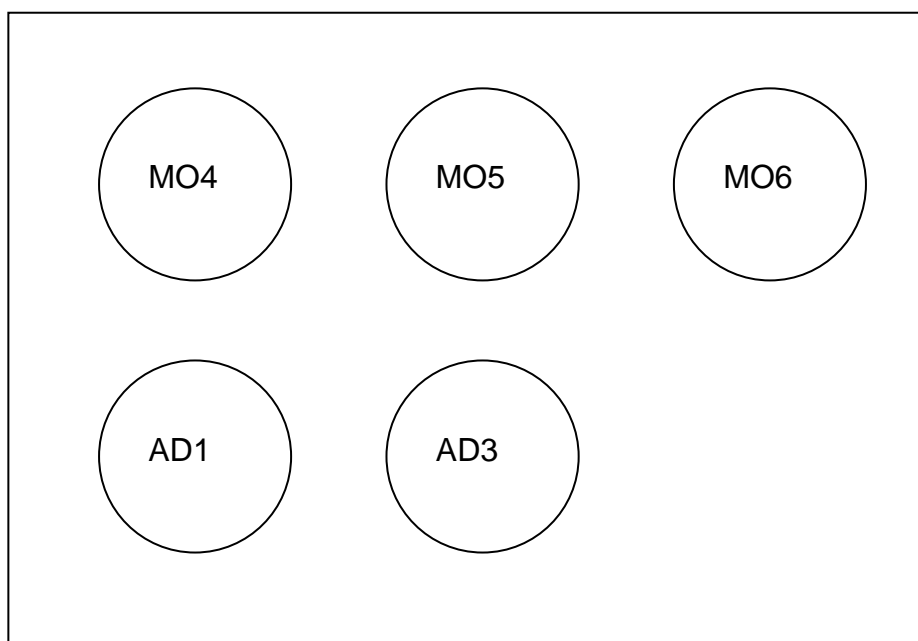


Figura 5: Maneira como as células foram plaqueadas nas placas de seis poços. MO4: medula óssea 4; MO5: medula óssea 5; MO6: medula óssea 6; AD1: adiposo 1 e AD3: adiposo 3.

4.3 Avaliação da sobrevida:

Para a contagem, as células foram tripsinizadas adicionando 1,5 mL de tripsina (0,05% p/v)-EDTA (0,02% p/v). Uma alíquota era retirada, corada com azul de tripan e contada em Câmara de Neubauer apenas nas áreas enumeradas (Figura 6).

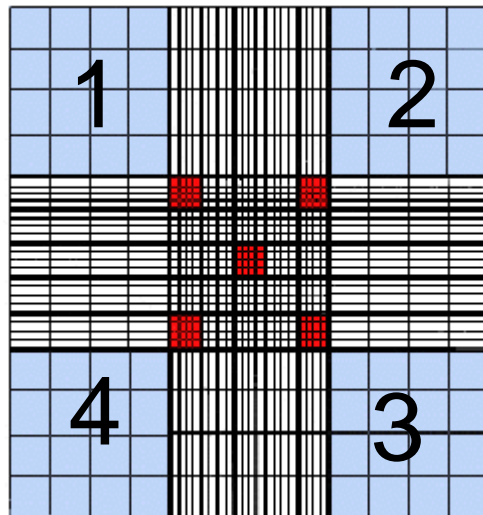


Figura 6: Câmara de Neubauer (fonte: http://www.ugr.es/~jhuertas/EvaluacionFisiologica/Recuento_rojos/Imagenes/grid.gif - acesso: 27/11/07)

A avaliação da sobrevida foi realizada da seguinte maneira:

	Área 1	Área 2	Área 3	Área 4
Σ Ct	Σ Ct A1	Σ Ct A2	Σ Ct A3	Σ Ct A4
Σ Cm	Σ Cm A1	Σ Cm A2	Σ Cm A3	Σ Cm A4

$$D = \frac{\Sigma CT - \Sigma CM}{4} = \frac{R}{4} = R \times 2 = R \times 10^4 = R \times 1,5ml$$

onde: D: divisão; Ct: células totais; Cm; células mortas; R: resultado; A1-4: áreas da câmara de Neubauer (Figura 6).

4.4 Seleção de genes que se expressam especificamente em cardiomiócitos e busca de seus promotores:

Com o auxílio do site NCBI (www.ncbi.nih.gov) foi realizada uma revisão bibliográfica para encontrar os genes expressos especificamente em cardiomiócitos, cujos promotores sejam bem caracterizados e que melhor se adequassem as condições do vetor pRRLsin18ppt-pgk-gfp.

4.5 Desenho de iniciadores para esses promotores:

Os iniciadores foram desenhados com o auxílio do programa Primer Select. As letras em negritos indicam os nucleotídeos adicionados para o reconhecimento das enzimas de restrição e os iniciadores foram os seguintes:

Troponina série 1: F= 5' TT**CTCGAG**TCCAAATTCCACTTCTGAGGC 3'
R= 5' TT**GGATCC**GAGATAAAGGGCGAGGACAC 3'

Troponina série 2: F= 5' TT**CTCGAG**TATTCCTAGAATTCTAGATTGTTC 3'
R= 5' TT**GGATCC**GCTTGAGACTCCCCGAG 3'

MLC-2v: F= 5' TT**CTCGAG**GACCCAGAGCACAGAGCATCG 3'
R= 5' TT**GGATCC**GAATTCAAGGAGCCTGCTGGC 3'

α -Actinina: F= 5' TT**CTCGAG**ACTCAGATGTGCTGCTG3'
R= 5' TT**GGATCC**GCCTTATTTGGCCCTTCG3'

4.6 Amplificação e purificação da seqüência dos promotores e da PCR de colônia:

O DNA foi extraído de células sanguíneas humanas usando o *kit*. "Blood e Cell culture DNA max kit" da Qiagen seguindo as recomendações do fabricante. O DNA foi concentrado em Microcon (Centrifuge Filter Devices – Amicon) seguindo recomendações do fabricante. O DNA foi fragmentado de três maneiras diferentes: mecanicamente utilizando, uma seringa com agulha tamanho 18, com movimentos contínuos do êmbolo por doze vezes, centrifugação de 3-5 minutos com pérolas de vidro e/ou sonificado com três séries de 10 segundos, numa potência de 20, pulso de 4 segundos (Ultrasonic Homogenizer 4710 series) e um intervalo de 1 minuto em cada série.

As condições de amplificação foram:

Troponina série 1: 35 ciclos: temperatura de anelamento: 52°C-40seg, temperatura de extensão: 72°C-1min, 72°C-1min e 30 seg; 45 ciclos: temperatura de anelamento: 60°C-40seg, temperatura de extensão: 72°C-1min e 30 seg

PCR de gradiente para Trop 1: 45°C - 55°C e 45°C – 65°C

Troponina série 2: 35 ciclos: temperatura de anelamento: 40°C-30seg, 55°C-30seg, temperatura de extensão: 72°C-30seg, 72°C-1min e 30seg

MLC-2v: 35 ciclos: temperatura de anelamento: 55°C-30seg, temperatura de extensão: 72°C-30seg

α -Actina: 35 ciclos: temperatura de anelamento: 40°C-30seg, 55°C-30seg temperatura de extensão: 72°C-30seg, 72°C-1min e 30seg

A PCR de colônia, foi realizada nas mesmas condições utilizadas para a amplificação do promotor da miosina.

A purificação dos promotores foi realizada utilizando o *kit* (High Pure PCR-product purification kit- Roche) e seguindo as recomendações do fabricante.

4.7 Digestão e ligação dos promotores em pGEM-T e montante do gene da GFP no vetor pRRLsin18ppt-pgk-gfp:

A digestão do plasmídeo e do inserto foram realizados com as enzimas XhoI e BamHI. As condições da digestão foram as seguintes:

Digestão do plasmídeo: 30 U/mL de BamHI; 30 U/mL de XhoI, 0,1 μ L de BSA (10 ml/ μ L), 1x buffer da BamHI, 5 μ g de plasmídeo. Volume final 30 μ L.

Digestão do inserto: 120 U/mL de BamHI, 120 U/mL de XhoI, 0,3 μ L de BSA (10 ml/ μ L), 1x buffer da BamHI, 0,285 μ g de inserto. Volume final 50 μ L. Foram realizados controles com cada enzima separada e com inserto.

A purificação da digestão foi realizada com o *kit*. (High Pure PCR-product purification kit- Roche) seguindo as recomendações do fabricante e sem *kit*.

O promotor da miosina foi clonado em dois plasmídeos: pGEM-T e pRRLsin18ppt-pgk-gfp. A clonagem em pGEM-T ("pGEM-T and pGEM-T easy Vector Systems"- Promega) foi realizado conforme as instruções do fabricante e incubadas no termoblock – Eppendorf – por 12 horas à 16°C. Para a ligação do promotor da miosina ao plasmídeo pRRLsin18ppt-pgk-gfp foram realizadas três diluições (1:1; 1:5; 1:10 sendo 1= $6,7 \times 10^9$) para um volume final de 20 μ L utilizando: 1x buffer de T₄ DNA ligase, 1 u de T₄ DNA ligase:

As amostras foram incubadas no termoblock – Eppendorf – à 16° por 12 horas. Em seguida o pGEM-T com o promotor da miosina foi transformado em células XL1-blue pela adição de 50 μ L de bactéria e 3 μ L de clone pGEM-T em tubos tipo Eppendorf. As bactérias e seus clones foram passados para uma cubeta de eletroporação e eletroporadas, utilizando o aparelho Gene Pulser, em uma

potência de 25 μ F, 200 Ω e 2,5 KV de 4- 5 milisegundos. Foram adicionados 300 μ L de meio SOC, agitando por uma hora. Depois foram centrifugadas à 8000 xg por 5 minutos, plaqueadas com LBamp IPTG-Xgal e incubadas por 12 horas à 37°C.

O plasmídeo pRRLsin18ppt-pgk-gfp com o promotor da miosina foi transformado em células Stbl-2 (Max Efficiency Stbl-2 competente cells) seguindo as indicações do fabricante. As células Stbl-2 que continham o plasmídeo lentiviral e o promotor da miosina foram selecionadas com o gene de resistência para ampicilina. Estas células então foram usadas para realização da placa mãe (Figura 7).

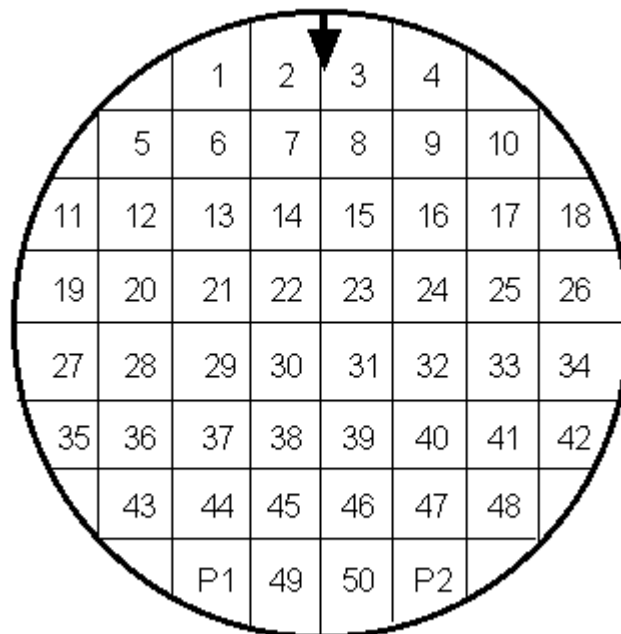


Figura 7: "Placa mãe" (Fonte: <http://www.fgsc.net/fgn48/Image9.gif> - acesso: 28/11/07)

4.8 Minipreparação e midipreparação:

Para a minipreparação foi realizado um cultivo de colônias em 3 mL de meio líquido LB e 300 mg/ μ L de ampicilina e ficaram 12 horas agitando à 37°C e 300 rpm. A minipreparação foi realizada usando *kit*: Quiaprep Spin Miniprep kit'- Qiagen de acordo com as indicações do fabricante. Para midipreparação, as bactérias foram cultivadas em meio contendo 3 mL de meio LB e 300 mg/ μ L de ampicilina e

permaneceram 8 horas agitando à 37°C e 300 rpm. Em seguida foi realizado um novo plaqueamento em meio com 50 mL de meio LB e 5000 mg/μL de ampicilina. Esse meio ficou 12 horas agitando à 37°C e 300rpm para a realização da midiprep com o *kit*: HiSpeed Plasmid Purification Handbook- Qiagen, seguindo as indicações do fabricante.

Digestão de minipreparação: 10 U/mL de BamHI, 10 U/mL de XhoI, 0,1 mg/mL de BSA, 1x buffer da BamHI, 11,5 μg DNA. Volume final 20 μL. Digestão de midipreparação: 10 U/mL de BamHI, 10 U/mL de XhoI, 0,1 mg/mL de BSA, 1x buffer da BamHI, 0,01 u de DNA.

A purificação foi realizada com o *kit*: High Pure PCR-product purification kit-Roche, seguindo as recomendações do fabricante e sem *kit*. Para a purificação sem o *kit* um *tip* de 1000 μL com filtro foi cortado na abertura menor e lavado duas vezes com água milique. Um fragmento do gel, contendo o plasmídeo digerido, foi colocado no *tip* de 1000 μL com filtro e centrifugado a 6000 rpm por 6 minutos. O DNA foi precipitado com 0,3M de acetato de sódio e 2,5 vezes o volume de etanol 100% por 12 horas a -20°C. Depois a amostra foi centrifugada a 12000 rpm por 20 minutos e em seguida lavada duas vezes com etanol 70% gelado, e centrifugada a 12000 rpm por 5 minutos. Em seguida o eppendorf foi deixado aberto para evaporar etanol e a amostra foi ressuspensa em água milique. Após a purificação, as amostras foram quantificadas no espectrofotômetro e concentradas utilizando microcon (Centrifuge Filter Devices – Amicon) seguindo as recomendações do fabricante.

Como não foi possível a clonagem dos promotores no plasmídeo pRRLsin18ppt-pgk-gfp, os materiais e métodos referentes aos números 6, dos objetivos específicos, não serão detalhados ou descritos.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO:

5.1. Transdução com vetores lentivirais portando o gene da *GFP* e sobrevivência da CTMs.

As CTMs isoladas de medula óssea e tecido adiposo, cultivadas em meio IMDM e D-MEM-F12 respectivamente, apresentavam morfologia semelhante a fibroblastos e aderência ao plástico (Figura 8), conforme descrito por Kotobuki (2004). Estas mesmas células podem diferenciar *in vitro* a osteoblastos, adipócitos e condrócitos, quando cultivadas com os meios apropriados (comunicação pessoal Carmem Rebellato).

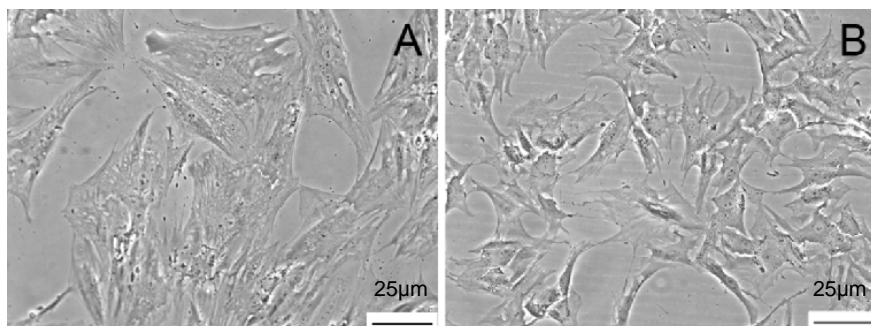


Figura 8: CTMs observadas por microscopia invertida. A: CTM isolada de Medula Óssea; B: CTM isolada de Tecido Adiposo.

Para avaliar a sobrevivência das CTMs depois de transduzidas com vetores lentivirais portando o gene da *GFP* sob o controle de promotor forte de CMV, ensaios de crescimento *in vitro* foram realizados. Assim, as CTMs que atingiram a confluência de 60-70% foram transduzidas numa MOI de 10 utilizando-se polibrene numa concentração de 80 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, conforme descritos em materiais e métodos (4.2).

Por seis semanas foi acompanhado o crescimento das CTMs transduzidas com lentivírus, através da contagem de sua sobrevivência ao longo das semanas (Figura 9 A-E).

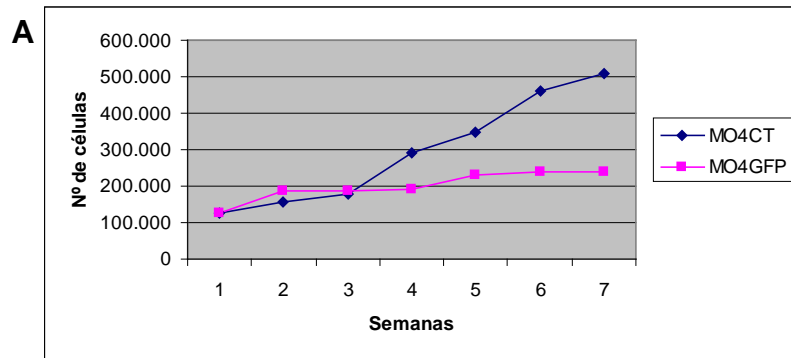


Gráfico A: Comparação da sobrevivência de CTMs isoladas de medula óssea não transduzidas (MO4CT) e transduzida com *GFP* (MO4GFP).

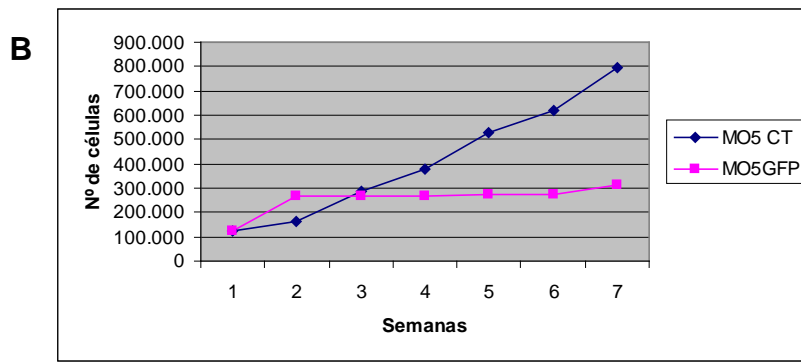


Gráfico B: Comparação da sobrevivência de CTMs isoladas de medula óssea não transduzidas (MO5CT) e transduzida com *GFP* (MO5GFP).

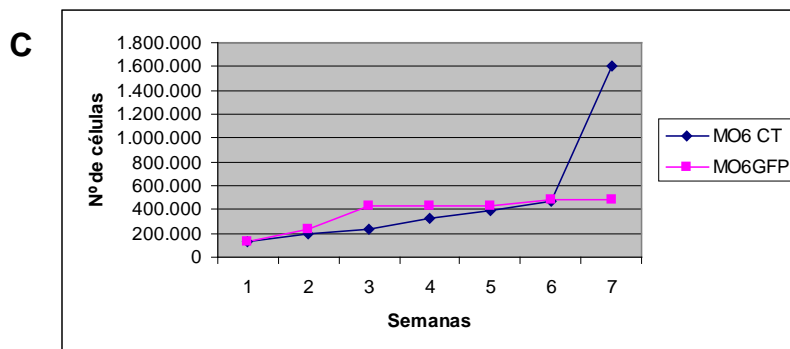


Gráfico C: Comparação da sobrevivência de CTMs isoladas de medula óssea não transduzidas (MO6CT) e transduzida com *GFP* (MO6GFP).

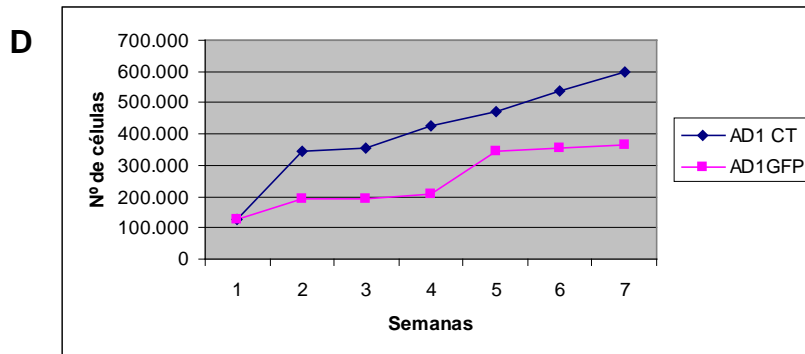


Gráfico D: Comparação da sobrevivência de CTMs isoladas de tecido adiposo não transduzidas (AD1CT) e transduzidas com *GFP* (AD1GFP).

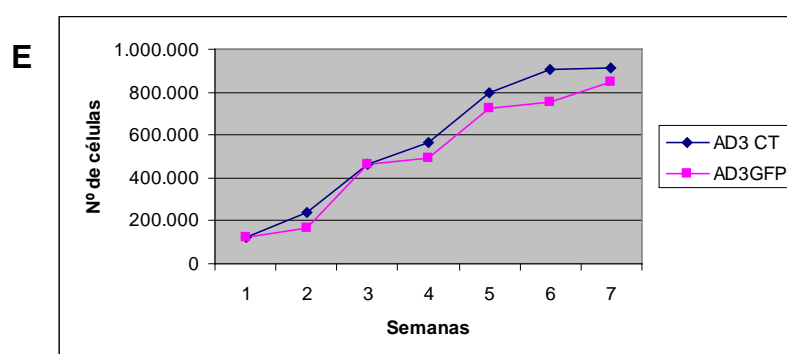


Gráfico E: Comparação da sobrevivência de CTMs isoladas de tecido adiposo não transduzidas (AD3CT) e transduzidas com *GFP* (AD3GFP).

Figura 9 A-E: Análise da sobrevivência das CTMs transduzidas com *GFP* durante seis semanas.

Foi possível observar que as CTMs transduzidas com o *GFP* apresentaram uma fase estacionária no crescimento quando comparadas com o controle (gráficos A-D). Com exceção das CTMs transduzidas de AD3 GFP (gráfico E), que mantiveram um crescimento normal até a 7ª semana, as demais CTMs transduzidas atingiram sua fase estacionária a partir da 3ª semana. A expressão de *GFP* se manteve durante pelo menos 50 dias. Esses resultados estão de acordo com as afirmações de Zhang (2002) de que os vetores lentivirais podem transduzir genes repórteres eficientemente em CTMs (ZHANG *et al.*, 2002), apresentando uma expressão que se mantém por longo tempo devido a presença do promotor forte interno de citomegalovírus (ZHANG *et al.*, 2004), tanto durante a expansão quanto durante a diferenciação (LEE, 2001).

Mesmo utilizando neste trabalho uma MOI relativamente baixa, os vetores lentivirais podem estar integrando no genoma das CTMs, silenciando genes

importantes como por exemplo genes de crescimento. Já Hanazono (1997) afirma que a proteína do *GFP* pode ser tóxica para as células, diminuindo seu crescimento ou a indução da diferenciação fenotípica, ou ainda sua maturação.

5.2 Construindo vetores lentivirais para a transdução do gene da *GFP* sob o controle de promotores cardíacos.

Foi realizada uma pesquisa pelas enzimas de restrição que tivessem sítio no vetor lentiviral, cortando exatamente nas seqüências 5'-3' do promotor do citomegalovírus (CMV). Com o mapa lentiviral em mãos, foi verificado que as enzimas BamHI e XhoI tinham sítio de restrição no vetor pRRLsin 18ppt-pgk-gfp, de forma que o cortasse apenas uma vez, gerando pontas coesivas.

A partir daí foi realizada uma pesquisa bibliográfica pela página eletrônica da NCBI e os promotores melhores caracterizados na literatura e que melhor se adequaram às condições do plasmídeo foram: cadeia leve da miosina (MLC-2v) (MOORE *et al.*, 2004) e troponina cardíaca (Trop I) (BHAVSAR, 1996) com tamanhos de 330pb e 1000pb respectivamente. Para esses promotores foram desenhados iniciadores, com o programa Primer Select, de forma que os mesmos não anelassem em locais inespecíficos (característica confirmada pelo programa Blast), não formassem dímeros nem grampos e que mantivessem uma temperatura entre 50°C-55°C. Para o reconhecimento das enzimas BamHI e XhoI, foram adicionados seis nucleotídeos à 5' nos iniciadores que vão adiante e a reverso.

Para verificar se o produto da PCR do promotor inteiro não seria inativado através da excisão pelas enzimas de restrição, foi utilizado o programa Map Draw o qual confirmou que os iniciadores não possuíam sítios para as enzimas de restrição em seu interior, com exceção daqueles nucleotídeos que foram adicionados em seus finais 5'.

A amplificação do promotor MLC-2v ocorreu utilizando-se o DNA quebrado por sonicação com 55°C de temperatura de anelamento por 30 segundos e 72°C de temperatura de extensão por 30 segundos. Para a amplificação do promotor da Troponina I foi utilizado o DNA quebrado com seringa, pérolas de vidro e sonicação e em todas as condições descritas em materiais e métodos. Apenas o promotor MLC-2v foi amplificado (Figura 11).

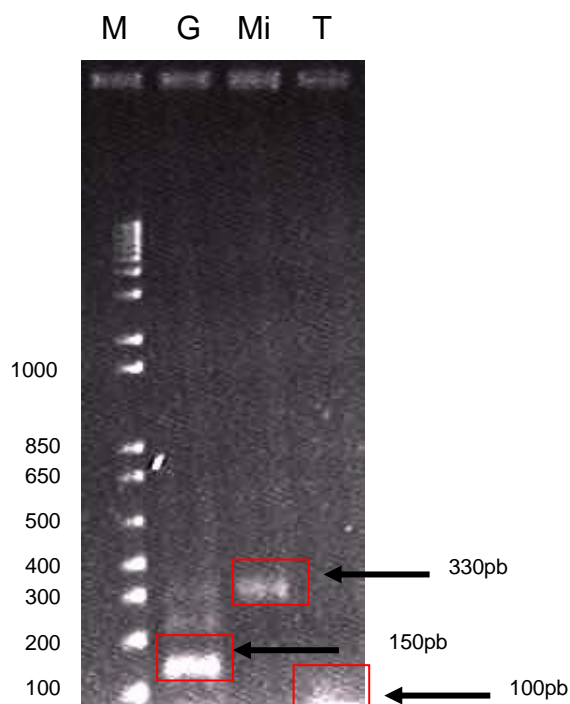


Fig 11: Eletroforese em gel de agarose 1% do produto da PCR de MLC-2v, Trop I e GAPDH. Abreviações: M: marcador 1Kb plus, Gap: GAPDH, Mi: MLC-2v; T: troponina I.

Como em todas as condições testadas o promotor da troponina I não foi amplificado, foi resolvido fazer um novo desenho de iniciadores para o promotor da troponina I, com um tamanho de 1108pb e a busca por outro promotor cardíaco na página eletrônica da NCBI. O novo promotor escolhido foi da α -Actinina (MINTY *et al.*, 1986) com um tamanho de 400pb. As condições para a escolha desses promotores foram as mesmas da MLC-2v e troponina I, o desenho desses novos iniciadores foi realizado com o programa Primer Select. Foram adicionados os nucleotídeos para o reconhecimento das mesmas enzimas e a verificação da não existência de sítios para as enzimas foi realizado pelo programa Map Draw.

Tanto para a amplificação do promotor da α -Actinina quanto para o promotor da troponina I, foi utilizado o DNA quebrado com pérolas de vidro e sonicado, nas condições descritas para cada uma em materiais e métodos. Como controle positivo o GAPDH foi utilizado em todas as PCRs, dado que suas características de amplificação já estão estabelecidas. Mais uma vez esses promotores não foram amplificados e, portanto, o trabalho prosseguiu apenas com o promotor da miosina (Figura 12).

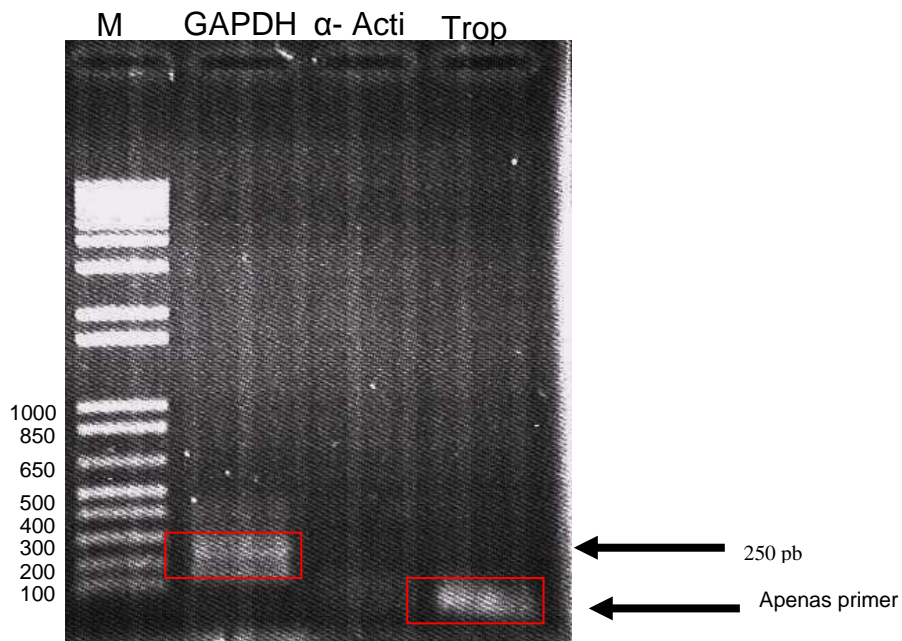


Figura 12: Eletroforese em gel de agarose 1% do produto da PCR de GAPDH, α -Actinina e trop I. Abreviações: M: marcador 1Kb plus; α -acti: α -actinina; trop: troponina I.

Logo após a amplificação, o promotor da miosina digerido, purificado e concentrado (experimentos descritos em materiais e métodos 4.5 e 4.6) foi clonado no plasmídeo pGEM-T. O pGEM-T é ideal para clonar produtos de PCR porque suas pontas coesivas são terminadas em timina, pareando com os produtos de PCR que terminam com a adenina adicionada pela Taq polimerase. Essa construção foi transformada em células XLI-blue (conforme descrito em materiais e métodos 4.6).

Das colônias positivas foi realizado uma placa mãe (conforme descrito em materiais e métodos 4.6) e uma PCR de colônia. As colônias selecionadas para a realização da midipreparação, foram aquelas em que as bandas estavam evidentes (Figura 13).

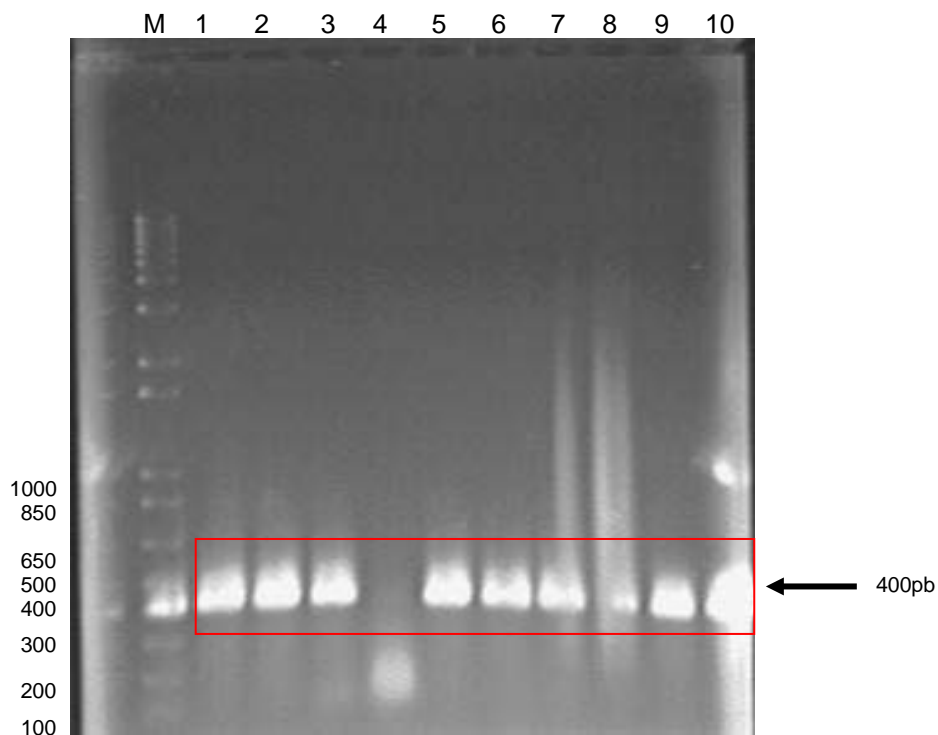


Figura 13: Eletroforese em gel de agarose 1% do produto da PCR das colônias de 1-10. Abreviações: M: marcador 1Kb plus.

O plasmídeo liberado pela midipreparação foi digerido, purificado e concentrado. O promotor da MLC-2v liberado do pGEM-T foi usado para clonagem no plasmídeo pRRLsin 18ppt-pgk-gfp.

Essa construção foi transformada em células Stbl-2 e das colônias positivas foi realizado a placa mãe. Na PCR de colônia não foram observadas bandas claras, mas sim um rastro. Pelo gel de agarose foram selecionadas algumas colônias que se achava corresponder ao tamanho do plasmídeo pRRLsin 18ppt-pgk-gfp ligado ao promotor da MLC-2v (dados não mostrados), e com estas foi realizado o minipreparação. O plasmídeo liberado da minipreparação foi digerido, purificado e concentrado e a digestão foi comprovada em gel de agarose (Figura 14). O inserto liberado não correspondeu ao tamanho exato do promotor de MLC-2v, portanto, a clonagem foi desconsiderada.

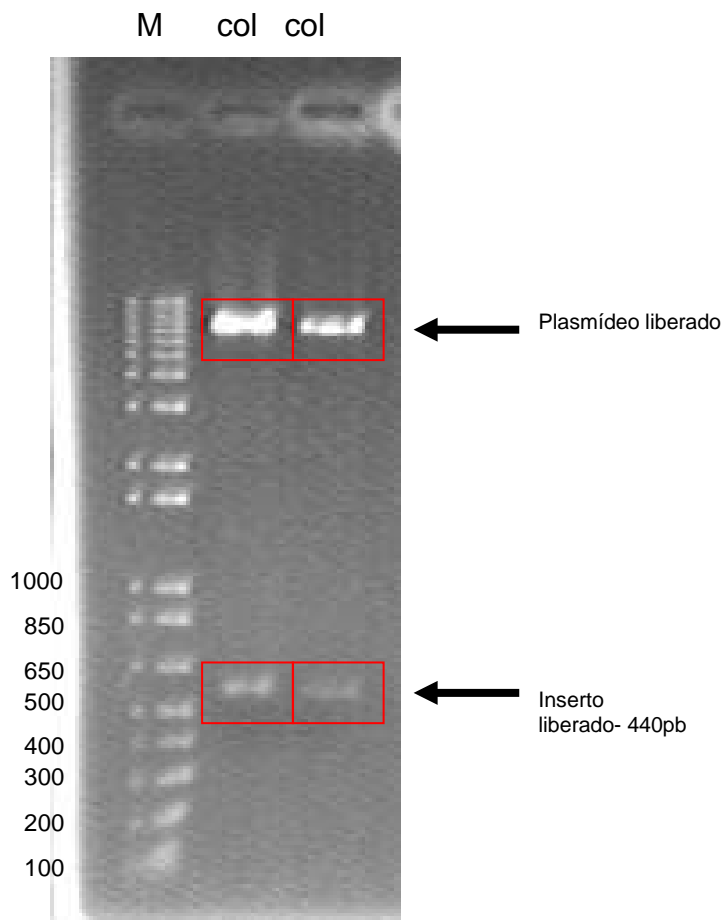


Figura 14: Eletroforese em gel de agarose da digestão do plasmídeo pRRLsin 18ppt-pgk-gfp. Abreviações: M:marcador; col: colônia

Vários fatores podem ter interferido na não obtenção de clones positivos, dentre estes está: a ligação não ocorreu, ou as Stbl-2 perderam sua estabilidade e competência ao terem sido guardadas em nitrogênio líquido e por mais de um ano, visto que as recomendações do fabricante não indicam o uso das mesmas com esses tratamentos (www.invitrogen.com).

Portanto para tentar confirmar se de fato são as células Stbl-2 ou se é a ligação que não está ocorrendo, foi realizada uma nova clonagem e desta vez usou-se o plasmídeo pUC 19 como controle positivo. Tanto a construção do plasmídeo pRRLsin 18ppt-pgk-gfp com o promotor da MLC-2v, quanto o pUC 19 foram transformantes em células Stbl-2 e não foram obtidas colônias resistentes à

ampicilina. Assim é plausível pensar que as células Stbl-2 de fato perderam sua eficiência (neste momento estamos encomendando um novo lote).

6. CONCLUSÕES:

Podemos concluir que o crescimento das CTMs diminuiu ao longo das semanas ou pela toxicidade do *GFP* ou pela inserção dos transgenes em genes importantes.

Como as tentativas de ligação do promotor da miosina ao plasmídeo pRRLsin 18ppt-pgk-gfp não foram possíveis, as perspectivas serão clonar promotores de genes cardíacos em outros vetores utilizando os sistemas duplo de ativação transcricional tet-on e TSTA.

GLOSSÁRIO

Teratomas: é um tumor de células germinativas derivadas de células pluripotentes e composta de diferentes tipos de tecidos de uma ou mais das três camadas celulares germinativas

(<http://www.maxillofacialcenter.com/BondBook/softtissue/teratoma.html>: acessado: 26/12/2007).

Morfógenos: uma molécula que pode induzir a obtenção de diferentes destinos celulares, de acordo com o nível de morfógeno ao qual a célula está exposta. (GRIFFITHS, AJF; MILLER, JH; SUZUKI, DT; LEWONTIN, RC; GELBART, WM. Introdução à Genética. 7 ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2002.).

MOI 10: multiplicidade de infecção, ou seja 1 CTM para cada 10 partículas virais.

5-azacitidina: é um químico análogo a citidina, um nucleosídeo presente no DNA e RNA. Na sua presença as células a incorporam ao DNA durante a replicação e ao RNA durante a transcrição, inibindo a metiltransferase que causa a demetilação nessas seqüências, impedindo, assim, a ligação de proteínas ao DNA e RNA (<http://en.wikipedia.org/wiki/5-azacytidine> acessado: 27/12/2007).

Azul de tripan: é um corante usado para analisar a viabilidade de células em cultura. Como as células são impermeáveis a este corante, apenas as células que estão morrendo apresentarão o corante em seu interior.

Gene repórter: Gene repórter: Um gene cuja expressão fenotípica é mais fácil de monitorar e que é usado para o estudo do promotor histoespecífico e das atividades do acentuador nos transgenes. (GRIFFITHS, AJF; MILLER, JH; SUZUKI, DT; LEWONTIN, RC; GELBART, WM. Introdução à Genética. 7 ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2002.).

Fator de transcrição: Uma proteína que se liga a um elemento cis-regulador (por exemplo, um acentuador) e assim, direta ou indiretamente, afeta o início de transcrição. (GRIFFITHS, AJF; MILLER, JH; SUZUKI, DT; LEWONTIN, RC; GELBART, WM. Introdução à Genética. 7 ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2002.).

Transfecção: Processo pelo qual o DNA exógeno na solução é introduzido em células cultivadas. (GRIFFITHS, AJF; MILLER, JH; SUZUKI, DT; LEWONTIN, RC;

GELBART, WM. Introdução à Genética. 7 ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2002.).

Transdução: Transferência da informação genética de uma célula para outra por meio de um vetor viral. (LENHINGER, AL. Lenhinger Princípios de Bioquímica. 4.ed. São Paulo: Sarvier, 2006.).

Transformação: Introdução de um DNA exógeno em uma célula, forçando a célula a adquirir um novo fenótipo. (LENHINGER, AL. Lenhinger Princípios de Bioquímica. 4.ed. São Paulo: Sarvier, 2006.).

REFERÊNCIAS

BEHFAR, A; TERZIC, A. **Optimizing adult mesenchymal stem cells for heart repair.** J Mol Cell Cardiol, 47:283-284. 2007.

BHAVSAR, PK; BRAND, NJ; YACOUB, MH; BARTON, PJR. **Isolation and characterization of the human cardiac tropoinin I gene (TNNI3).** Genomics 35: 11-23. 1996.

BITTIRA, B, KUANG, JQ; AL-KHALDI, A; SHUM-TIM, D; CHIU, RC. **In vitro preprogramming of marrow stromal cells for myocardial regeneration.** Ann Thorac Surg 74:1154-9; discussion 1159-60. 2002.

BONCI, D; CITTADINI, A; LATRONICO, MV; BORELLO, U; AYCOCK, JK; DRUSCO, A; INNOCENZI, A; LAVITRANO, M; MONTI, MG; ROSS, JJ; NALDINI, L; PESCHLE, C; COSSU, G; CONDORELLI, G. **“Advanced” generation lentiviruses as efficient vectors for cardiomyocyte gene transduction in vitro and in vivo.** Gene Ther, 10: 630-636. 2003.

BROFMAN, PR; CARVALHO, KA; GUARITA-SOUZA, LC; REBELATTO, C; HANSEN, P; SENEGAGLIA, AC; MYAGUE, N; FURUTA, M; FRANCISCO, JC; OLANDOSKI, M. **Transplante celular: análise funcional, imunocitoquímica e histopatológica em modelo experimental de miocardiopatia isquêmica utilizando diferentes células.** Rev Bras Cardiovasc 19: 261-266. 2004.

COLTERER, DC; CLASS, R; DOGIROLAMO, CM. **Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow.** Proc Natl Acad Sci, 97: 3213-3218. 2000

DAVANI, S; MARANDIN, A; MERSIN, N; ROYER, B; KANTELIP, B; HERVE, P; ETIEVENT, JP; KANTELIP, JP. **Mesenchymal progenitor cells differentiate into an endothelial phenotype, enhance vascular density, and improve heart function in a rat cellular cardiomyoplasty model.** Circulation 108 Suppl 1:II253-8. 2003.

DAMME, AV; THORREZ, L; MA, L; VANDENBURGH, H; EYCKMANS, J; DELL'ACCIO, F; DE BARI, C; LUYTEN, F; LILICRAP, D; COLLEN, D; VANDENDRIESSCHE, T; CHUAH, MKL. **Efficient Lentiviral Transduction and Improved Engraftment of Human Bone Marrow Mesenchymal Cells.** Stem Cells, 24: 896-907. 2006.

DE UGARTE, DA; MORIZONO, K; ELBARBARY, A; ALFONSO, Z; ZUK, PA; ZHU, M; DRAGOO, JL; ASHJIAN, P; THOMAS, B; BENHAIM, P; CHEN, I; FRASER, J; HEDRICK, MH. **Comparison of multi-lineage cells from human adipose tissue and bone marrow.** Cells Tissues Organs, 174: 101-109. 2003.

FORBES, SJ; VIG, P; POULSOM, R; WRIGTH, NA; ALISON, MR. **Adult stem cell plasticity: new pathways of tissue regeneration become visible.** Clin Sci, 103: 355-369. 2002.

FUKUDA, K. **Development of regenerative cardiomyocytes from mesenchymal stem cells for cardiovascular tissue engineering.** *Artif Organs*, 25:187-93. 2001.

FUKUHARA, S; TOMITA, S; YAMASHIRO, S; MORISAKI, T; YUTANI, C; KITAMURA, S; NAKATANI, T. **Direct cell-cell interaction of cardiomyocytes is key for bone marrow stromal cells to go into cardiac lineage in vitro.** *J Thorac Cardiovasc Surg*, 125: 1470-80. 2003.

GOLDSBOROUGH, MD; TILKINS, ML; PRICE, PJ; LOBO-ALFONSO, J; MORISON, JR; STEVENS, ME. **Serum-free culture of murine embryonic stem (ES) cells.** *Focus* 20: 8-12. 1998.

HANAZONO, Y., YU, J. M., DUNBAR, C. E., EMMONS, R. V. **Green fluorescent protein retroviral vectors: low titer and high recombination frequency suggest a selective disadvantage.** *Hum. Gene Ther*, 8: 1313-1319.

HENG, BC; CAO, T; HAIDER, HK; WANG, DZM; SIM, EKW; NG, SC. **An overview and Synopsis of techniques for directing stem cell differentiation in vitro.** *Cell Tissue Res*, 315: 291-303. 2004.

HERZENBERG, LA; PARKS, D; SAHAF, B; PEREZ, O; ROEDERER, M; HERZENBERG, LA. **The history and future of the fluorescence activated cell sorter and flow cytometry: a view from Stanford.** *Clin Chem*, 48: 1819-1827. 2002.

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

JAVAZON, EH; BEGGS, KJ; Flake, AW. **Mesenchymal stem cells: Paradoxes of passaging.** *Exp Hematol*, 32: 414-425. 2004.

KAY, MA; GLORIOSO, JC; NALDINI, L. **Viral vectors gene therapy: the art of turning infectious agents into vehicles of therapeutics.** *Nature Medicine*, 7: 33-40. 2001.

KADIVAR, M; KHATAMI, S; MORTAZAVI, Y; SHOKRGOZAR, MA; TAGLIKHANI, M; SOLEIMANI, M. **In vitro cardiomyogenic potential of human umbilical vein-derived mesenchymal stem cells.** *Biochemi Biophys Res Commun*, 340: 639-647. 2006.

KEATING, A. **Mesenchymal stromal cells.** *Current Opinion in Hematology*, 13: 419-425. 2006.

KEHAT, I; KENYAGIN-KARSENTI, D; SNIR, M; SEGEV, H; AMIT, M; GEPSTEIN, A; LIVNE, E; BINAH, O; ITSKOVITZ-ELDOR, J; GEPSTEIN, L. **Human embryonic stem cells can differentiate into myocytes with structural and functional properties of cardiomyocytes.** *Journal Clin Invest*, 108:407-414. 2001.

KOTOBUKI, N., M. HIROSE, Y. TAKAKURA, AND H. OHGUSHI. **Cultured**

autologous human cells for hard tissue regeneration: preparation and characterization of mesenchymal stem cells from bone marrow. *Artif Organs*, 28:33-9. 2004.

KULTERER, B; FRIEDL, G; JANDROSITZ, A; SANCHEZ-CABO, F; PROKESCH, A; PAAR, C; SCHEIDELER, M; WINDHAGER, R; PREISEGGER, K; TRAJANOSKI, Z. **Gene expression profiling of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow during expansion and osteoblast differentiation.** *Biomed Central*, 8: 70. 2007.

LEE, K; MAJUMDAR, MK; BUYANER, D; HENDRICKS, JK; PITTENGER, MF; MOSCA, JD. **Human Mesenchymal Stem Cells Maintain Transgene Expression during Expansion and Differentiation.** *Mol Ther*, 3: 857-866. 2001

MAKINO, S; FUKUDA, K; MIYOSHI, S; KONISHI, F; KODAMA, H; PAN, J; SANO, M; TAKAHASHI, T; HORI, S; ABE, H; HATA, J; UMEZAWA, A; OGAWA, S. **Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro.** *J Clin Invest*, 103:697-705. 1999.

MIN, JY; SULLIVAN, MF; YANG, Y; ZHANG, JP; CONVERSO, KL; MORGAN, JP; XIAO, YF. **Significant improvement of heart function by cotransplantation of human mesenchymal stem cells and fetal cardiomyocytes in postinfarcted pigs.** *Ann Thorac Surg*, 74:1568-75. 2002.

MINGUEL, JJ; ERICES, A; CONGET, P. **Mesenchymal Stem Cells.** *Expo Biol Med*, 226: 507-520. 2001.

MINTY, A; KEDES, L. **Upstream regions of the human cardiac actin gene that modulate its transcription in muscle cells: presence of an evolutionarily conserved repeated motif.** *Molecular and cellular biology*, 6: 2125-2136. 1986.

MOORE, JC; SPIJKER, R; MARTENS, AC; BOER, T; ROOK, MB; VAN DER HEYDEN, MAG; TERTOOLEN, LG; MUMMERY, CL. **A P19CI6 GFP reporter line to quantify cardiomyocyte differentiation of stem cells.** *Int. J. Dev. Biol*, 48: 47-55. 2004.

MONTOYA, FU; VERFAILLIE, CM; HU, WS. Culture Systems for pluripotent Stem Cells. **J Biosci Bioeng.** 100: 12-27. 2005.

NALDINI, L. **Lentiviruses as gene transfer agents for delivery to non-dividing cells.** *Curr Opin in Biotechnol*, 9: 457-463. 1998.

PITTENGER, MF; MACKAY, AM; BECK, SC; JAISWAL RK; DOUGLAS, R; MOSCA, JD; MOORMAN, MA; SIMONETTI, DW; CRAIG, S; MARSHAK, DR. **Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells.** *Science*, 284:143-7. 1999.

POH, KK; SPERRY, E; YOUNG, RG; FREYMAN, T; BARRINGHAUS, KG; THOMPSON, CA. **Repeated direct endomyocardial transplantation of allogenic mesenchymal stem cells: Safety of a high dose, "off-the-shelf", cellular**

cardiomyoplast strategy. Int J Cardiol, 117: 360-364. 2006.

PRÓSPER, F, P. A., MERINO J, RÁBAGO G, CHACHQUES JC, HERNÁNDEZ M, BARBA J, ALEGRIA E, GAVIRA JJ, PANIZO A, HERREROS J. **Adult Stem Cell for Myocardial Repair.** Basic Appl Myol 13:15-22. 2003.

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

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

REISER, J; ZHANG, XY; HEMENWAY, CS; MONDAL, D; PRADHAN, L; LA RUSSA, VF. **Potential of mesenchymal stem cells in gene therapy approaches for inherited and acquired diseases.** Expert Opin Biol Ther, 5: 1571-1584. 2005.

RODRIGUEZ, AM; ELABD, C; AMRI, AZ; AILHAUD, G; DANI, C. **The human adipose tissue is a source of multipotent stem cells.** Biochimie, 87: 125-8. 2005.

SIEGEL, DL. **Selecting antibodies to cell-surface antigens using magnetic sorting techniques.** Methods Mol Biol, 178:219-226, 2002.

SMITS, AM; VLIET, PV; HASSINK, RT; GOUMANS, M; DOEVENDANS, PA. **The role of stem cells in cardiac regeneration.** J. Cell. Mol. Med, 9: 25-36. 2005.

SOUZA, LC; CARVALHO, KA; REBELATTO, C; SENEGAGLIA, AC; FURUTA, M; MYAGUE, N; HANSEN, P; FRANCISCO, JC; BROFMAN, PR. **Combined transplantation of skeletal myoblasts and mesenchymal cells (cocultivation) in ventricular dysfunction after myocardial infarction.** Arquivos Brasileiros de Cardiologia, 83: 294-299. 2004.

STRAUER, BE; KORNOWSKI, R. **Stem cell therapy in perspective.** Circulation, 107:929-34. 2003.

TODA, A; OKABE, M; YOSHIDA, T; NIKAIDO, T. **The Potential of Amniotic Membrane/Amnion-Derived Cells for Regeneration of Various Tissues.** J. Pharmacol Sci, 930-0194. 2007

TERADA, N; HAMAZAKI, T; OKA, M.; HOKI, M; MASTALERZ, DM; NAKANO, Y; MEYER, EM; MOREL, L; PETERSEN, BE; SCOTT, EW. **Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion.** Nature, 416:542-5. 2002.

THOMSOM, JA; ITSKOVITZ-ELDOR, J; SHAPIRO, SS; WAKNITZ, MA; SWIERGIEL, JJ; MARSHALL, V.S; JONES, JM. **Embryonic stem cells lines derived from human blastocysts.** Science, 282: 1145-1147. 1998

TOMA, C; PITTENGER, KS; CAHILL, KS; BYRNE, BJ; KESSLER, PD. **Human**

mesenchymal stem cells differentiate of a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. Circulation, 105: 93-98, 2002.

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

TRONO, D. **Lentiviral vectores: turning a deadly foe into a therapeutic agent.** Gene Ther, 7:20-23. 2000.

VERFAILLIE, C. M. **Adult stem cells: assessing the case for pluripotency.** Trends Cell Biol 12:502-8. 2002.

VIGNA, E; NALDINI, L. **Lentiviral vectores: excellent tools for experimental gene transfer and promising candidates for gene therapy.** J Gene Med, 2:308-316. 2000.

WAGERS, AJ; CHRISENSEN, JL; WEISSMAN, IL. **Cell fate determination from stem cells.** Gene Ther, 9: 606-612. 2002.

WANG, JS; SHUM-TIM, D; GALIPEAU, J; CHEDRAWY, E; ELIOPOULOS, N; CHIU, RC. **Marrow stromal cells for cellular cardiomyoplasty: feasibility and potential clinical advantages.** J Thorac Cardiovasc Surg, 120:999-1005. 2002.

WEI, H; JUHASZ, O; LI, J; TARASOVA, YS; BOHELER, KR. **Embryonic stem cells and cardiomyocyte differentiation: phenotypic and molecular analyses.** J. Cell. Mol. Med, 9: 804-817. 2005.

WONG, M; TUAN, RS. **Nuserum, a syntetic serum replacement, supports chondrogenesis of embryonic chick limb bud mesenchymal cells in micromass culture.** In Vitro Cell Dev Biol Anim, 29A: 917-922. 1993.

YING, QL; NICHOLS, J; EVANS, EP; SMITH, AG. **Changing potency by spontaneous fusion.** Nature, 416:545-548, 2002.

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

ZUFFEREY, R; DULL, T; MANDEL, RJ; BUKOVSKY, A; QUIROZ, D; NALDINI, L; TRONO, D. **Self-Inactivating lentivirus vector for safe and efficient *in vivo* gene delivery.** Journal of virology, 72: 9873-9880. 1998.

ZHANG, XY; LA RUSSA, VF; BAO, L; KOLLS, J; SCHWARZENBERGER, P; REISER, J. **Lentiviral Vectores for Subtained Transgene Expression in Human Bone Marrow-Derived Stromal Cells.** Molecular Therapy, 5:555-565. 2002.

ZHANG, XY; LA RUSSA, VF; REISER, J. **Transduction of Bone Marrow-Derived Mesenchymal stem Cells by Using Lentivirus Vectors Pseudotyped with Modified RD114 Envelope Glycoproteins.** J Virol, 78: 1219-1229. 2003.

ZHANG, FB; LI, L; FANG, B; ZHU, DL; YANG, HT; GAO, PJ. **Passage-restricted differentiation potential of mesenchymal stem cells into cardiomyocyte-like cells.** Biochem Biophys Res Commun, 336: 784-792. 2005.

ZUK, PA; ZHU, M; MIZUNO, H; HUANG, JI; FUTRELL, WJ; KATZ, AJ; BENHAIM, P; LORENZ, HP; HEDRICK, MH. **Multineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies.** Tissue Eng, 7: 211-226. 2001.

ZUK, PA; ZHU, M; ASHJIAN, P; DE UGARTE, DA; HUANG, JI; MIZUNO, H; ALFONSO, ZC; FRASER, JK; BENHAIM, P; HEDRICK, MH. **Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells.** Mol Biol Cell, 13: 4279-4295. 2002.