

Expressão do gene da Stanniocalcina-1 durante a diferenciação de células tronco adiposo derivadas humanas em osteoblastos

Lucas Kich Grun¹, Silvia Resende Terra¹, Vanessa Schein¹, Letícia Pettenuzzo¹, Bárbara Paranhos Coelho¹, Daniel Maragno Trindade²

Orientadora: Prof^a Fátima Theresinha Costa Rodrigues Guma¹

1- Departamento de Bioquímica, ICBS, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil

2- Laboratório Nacional de Biociências (LNBio), Campinas, SP

pro.pesq
Pró-Reitoria de Pesquisa - UFRGS

Introdução

As células tronco adiposo derivadas humanas têm potencial de diferenciação em diversas linhagens celulares como adipócitos, osteoblastos, miócitos, condrócitos, e até mesmo neurônios – caracterizando sua multipotencialidade [1].

A stanniocalcina-1 (STC1) é uma proteína hormonal de 56kDa, que desempenha um importante papel na regulação do cálcio e do fosfato. Estudos em mamíferos demonstram o alto grau de conservação do gene e a expressão da proteína em tecidos como rim, ovário, testículo, cérebro, osso e tireóide, sugerindo que esta proteína tenha ação pleiotrópica [2]. Suas funções são exercidas por mecanismos de ação autócrina, parácrina, intrácrina e/ou endócrina, e reguladas por fatores como HIF1, VEGF e vitamina D3 [3]. Postula-se que a STC1 possa ter um importante papel no desenvolvimento dos ossos, visto que foi verificada abundante expressão em condrócitos e osteoblastos [3]. Os mecanismos moleculares envolvidos na diferenciação de células tronco adiposo derivadas humanas (hADSC's) poderão contribuir para o desenvolvimento de ferramentas terapêuticas e ampliar a utilização destas células na regeneração tecidual óssea. O objetivo deste trabalho foi avaliar a expressão do mRNA da *stc1* e de um putativo transcrito alternativo para este gene.

Materiais e métodos

Cultura de células: O tecido adiposo humano foi obtido de lipoaspirado – seguindo as normas institucionais da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre. O lipoaspirado foi lavado com PBS e tratado com 0,075% de collagenase tipo I por 30 minutos a 37°C. A collagenase foi inativada com igual volume de DMEM (10% SFB). A amostra foi centrifugada por 10 minutos a 2000rpm. A fração estromal foi ressuspendida em DMEM (10% SFB), transferida para garrafas de 75cm² e mantida em cultura. As células entre a 3^a e a 8^a passagem foram mantidas indiferenciadas (IND) ou foram induzidas à diferenciação osteogênica com 50µM de ácido ascórbico, 0,01M de β-glicerofosfato e 0,1µM de dexametasona (7 e 14 dias) [1].

Extração de RNA total e Síntese de cDNA: O RNA total foi extraído das hADSC indiferenciadas e diferenciadas para osteoblasto por 7 e 14 dias com o kit RNAqueos (Invitrogen, USA) de acordo com as instruções do fabricante. O cDNA foi sintetizado com o kit Super Script III Reverse Transcriptase (Invitrogen, USA) utilizando-se 0,5 µg de RNA total tratado com DNase-I. Os primers da STC1-001 e STC1-002 foram desenhados com base nas diferenças entre as sequências nucleicas de cada transcrito, sendo cada par de primer específico para um dos transcritos. O gene constitutivo utilizado foi o Tata Box Binding Protein (TBP).

PCR: As reações de *sq*-PCR foram realizadas em termociclador (Veriti, Applied-Biosystems, USA) utilizando-se para a reação o kit Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen, USA) segundo instruções do fabricante e nas condições adequadas para cada par de primers. As reações de *q*-PCR foram executadas em triplicata para cada amostra utilizando termociclador (Step One Plus, Applied-Biosystems, USA) e o kit Power SYBR Green PCR (Applied-Biosystems, USA). As reações foram feitas em 25 µl contendo o cDNA e 100 pmol de cada primer específico (*forward* e *reverse*) seguindo instruções do fabricante e nas condições adequadas para cada par de primers. A quantificação foi realizada através do método do $\Delta\Delta CT$ [4] e o gene normalizador utilizado foi o HsTBP. Amostras de hADSC's de três pacientes foram utilizadas para a quantificação da expressão do mRNA.

Clonagem e Sequenciamento do Transcrito Alternativo da STC1 (STC-002): Após a reação de *sq*-PCR com os primers específicos para amplificação do transcrito alternativo, este foi purificado do gel de agarose, clonado no vector pGEM-T-Easy e sequenciado para confirmação da identidade do transcrito STC1-002.

Referências bibliográficas

- 1-Zuk et al. Molecular biology of the cell, v.13p. 4279–4295, 2002
- 2-Wagner et al. v.63,p. 481-491, 1986.
- 3-Yoshiko, y., j. E. Aubin, and n. Maeda, v.50: 483–492,2002.
- 4-Livak KJ, Schmittgen TD, Methods, v. 25(4):p.402-408,2001.

Resultados

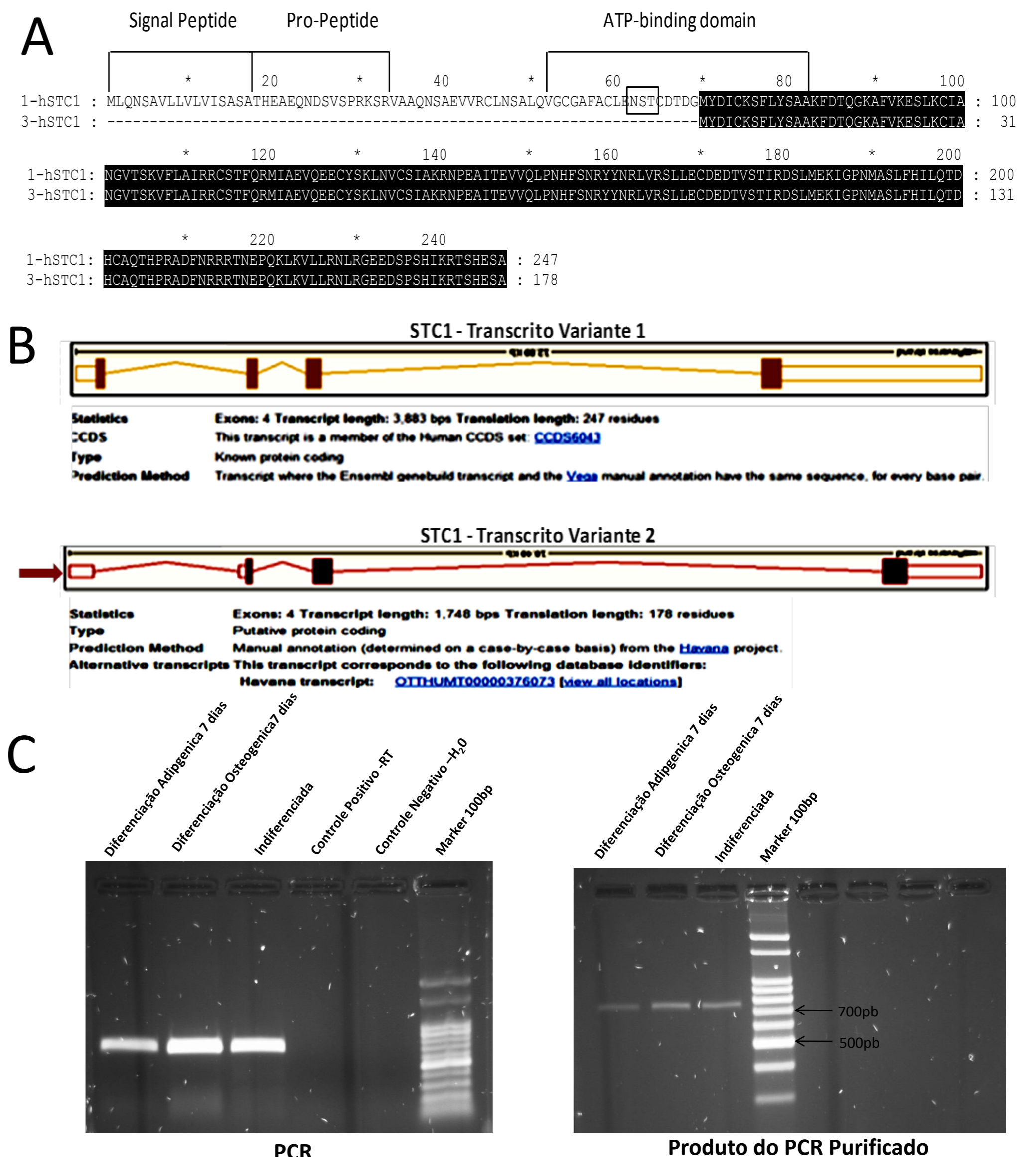


Figura 1: Caracterização da Sequência Protéica de dois Transcritos da STC1 e Expressão do Transcrito Alternativo da STC1 (STC-002) em hADSC's: A) Alinhamento das sequência protéica da STC1 identificadas na Plataforma de Genomas Ensembl.org (método Clustal W). **B)** Caracterização da Estrutura Gênica dos transcritos STC1-001 e STC1-002. **C)** Expressão do mRNA de STC1-002 em hADSC's indiferenciadas e diferenciadas em adipócitos e osteoblastos por sete dias.

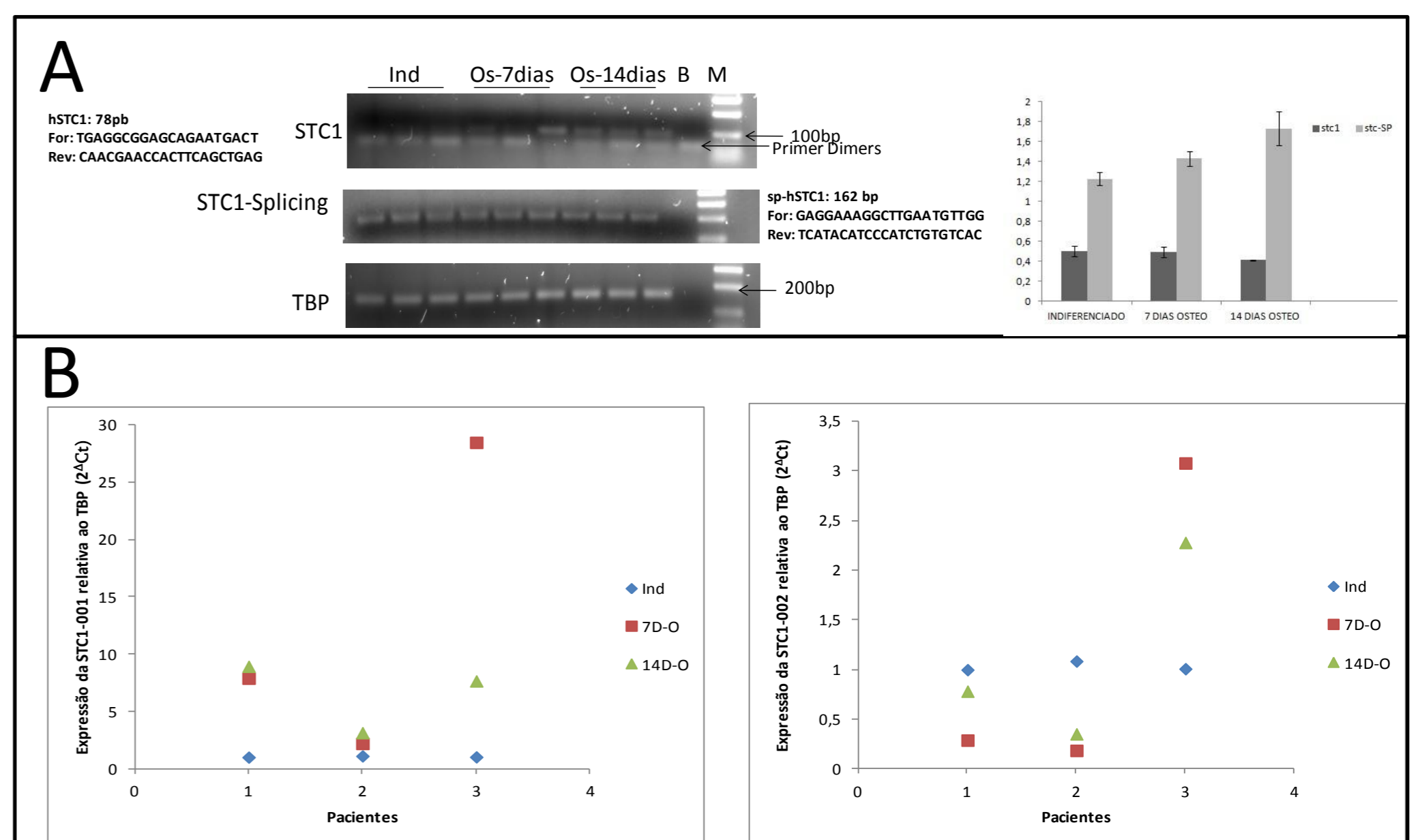


Figura 2: Expressão do mRNA por *sq*-PCR (A) e *q*-PCR (B) das 2 isoformas do gene STC1 em hADSC's diferenciadas em Osteoblastos.

Conclusões

A clonagem e sequenciamento confirmou a identidade do transcrito alternativo (STC-002) como é mostrado na figura 1. Este transcrito não apresenta a sequência do peptídeo sinal e a sequência do pró-peptídeo, sugerindo que este transcrito seja retido dentro da célula e não secretado, como usualmente ocorre com o transcrito principal da STC1 (STC-001).

Os testes preliminares da expressão do mRNA dos dois transcritos da STC1 foi feito por *sq*-PCR, contudo os pares de primers utilizados para o transcrito STC1-001 formaram dímeros como mostrado na figura 2-A, o que impossibilitou a utilização deste primers nas reações de *q*-PCR. Novos pares de primers foram desenhados e utilizados para a quantificação em tempo real. Os resultados demonstraram que hADSC's expressam as isoformas do gene STC1 de maneira diferencial, sendo a isoforma STC1-001 a mais abundante.