

RELATÓRIO FINAL DE ATIVIDADES

Padronização da Técnica de PCR em tempo-real na Avaliação da Pluripotência de Células-tronco Mesenquimais Caninas

THAILA ISABEL WODEWOTZKY

Orientação: João Pessoa Araújo Júnior

Co-orientação: Fernanda Cruz Landim e Alvarenga

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Departamento de Microbiologia/Imunologia do Instituto de Biociências da UNESP - Campus de Botucatu, SP, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE

Wodewotzky, Thaila Isabel.

Padronização da técnica de PCR em tempo-real na avaliação da pluripotência de células-tronco mesenquimais caninas / Thaila Isabel Wodewotzky. – Botucatu, 2010

Trabalho de conclusão (bacharelado – Ciências biológicas) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu, 2010

Orientador: João Pessoa Araújo

Co-orientador: Fernanda Cruz Landim e Alvarenga

Assunto CAPES: 20000006

1. Reação em cadeia de polimerase. 2. Expressão gênica. 3. Medula óssea.

Palavras-chave: Células-tronco mesenquimais; Expressão gênica; Medula óssea; Oc14; PCR em tempo-real.

SUMÁRIO:

1. RESUMO.....	3
2. INTRODUÇÃO.....	4
3. OBJETIVOS.....	7
4. DETALHAMENTO DO PROJETO.....	7
4.1. METODOLOGIA.....	7
4.1.1. COLETA DAS CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DA MEDULA ÓSSEA.....	7
4.1.2. ISOLAMENTO E CULTIVO <i>IN VITRO</i> DAS CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS.....	9
4.1.3. MARCAÇÃO POR IMUNOFLOURESCÊNCIA	10
4.1.4. DILUIÇÃO DOS PRIMERS E A TEMPERATURA DE ANELAMENTO (T_A).....	11
4.1.5. EXTRAÇÃO DO RNA TOTAL DAS CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS.....	13
4.1.6. QUANTIFICAÇÃO DO RNA.....	13
4.1.7. TRATAMENTO COM DNASE.....	14
4.1.8. AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA NO TRATAMENTO COM DNASE.....	15
4.1.9. TRANSCRIÇÃO REVERSA – RT-PCR.....	15
4.1.10. AMPLIFICAÇÃO DO CDNA EM GEL DE AGAROSE	16
4.1.11. PADRONIZAÇÃO DA AMPLIFICAÇÃO DO CDNA EM PCR EM TEMPO-REAL (qPCR).....	16
4.1.12. OBTENÇÃO DA CURVA PADRÃO	17
4.2. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	18
4.2.1. MARCAÇÃO POR IMUNOFLOURESCÊNCIA.....	18
4.2.2. ANÁLISE DA INTEGRIDADE DO RNA.....	19
4.2.3. INTEGRIDADE DAS AMOSTRAS DE CDNA.....	19
4.2.4. CURVA PADRÃO.....	20
5. CONCLUSÕES.....	23
6. REFERÊNCIA.....	24
7. ANEXOS.....	27
8. ARTIGO CIENTÍFICO.....	29

1. RESUMO

Este relatório final tem como objetivo apresentar as atividades desenvolvidas no período de janeiro/2009 a março/2010, pela aluna Thaila Isabel Wodewotzky, relativas ao projeto de conclusão de curso intitulado “**Padronização da Técnica de PCR em tempo-real na Avaliação da Pluripotência de Células-tronco Mesenquimais Caninas**”, para fins de obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas. O referido projeto objetiva avaliar a quantificação e relevância dos níveis de expressão gênica do fator de transcrição Oct4 em CTM’s, por meio da padronização da técnica de PCR em tempo-real. Para tanto, o RNA total das CTM’s obtidas, isoladas e cultivadas a partir da medula óssea de cães foi extraído a partir da medula óssea de cães a fim de avaliar a quantificação e relevância dos níveis de expressão gênica do Oct4 por meio da utilização da técnica de PCR em tempo-real com transcrição reversa (RT-qPCR). O RNA total foi extraído e submetido à reação de transcriptase reversa, para a obtenção do cDNA. Posteriormente esse cDNA foi utilizado na padronização da técnica de qPCR utilizando primers desenhados a partir de sequências obtidas no genbank. . Como normalizador utilizou-se o RNA codificante de GAPDH. Verificou-se desempenho satisfatório dos *primers* para Oct4 na avaliação de CTM’s de cães. Também o RNAm do GAPDH foi adequado como normalizador. Dessa forma, esse sistema pode ser utilizado na realização de testes quantitativos utilizando amostras de células-tronco embrionárias caninas.

Palavras-chave: células-tronco mesenquimais, medula óssea, Oct4, PCR em tempo-real, expressão gênica.

2. INTRODUÇÃO

As células-tronco mesenquimais (CTM's) são de especial interesse para a área da terapia celular por apresentarem uma maneira relativamente simples de serem coletadas e isoladas quando comparadas às demais - a partir da aspiração da medula óssea - e pela facilidade de cultivo e alto potencial de expansão *in vitro*. A medula óssea é um dos tecidos orgânicos mais ricos em células mesenquimais indiferenciadas, mas também já foram encontradas em menor quantidade e isoladas de outros órgãos e tecidos, tais como sangue periférico, sangue de cordão umbilical e placentário, tecido muscular e esquelético, derme e tecido adiposo (Prata, 2006).

Além disso, possuem a plasticidade de células multipotentes, com a capacidade de se diferenciarem em tecido ósseo, cartilaginoso, adiposo, (Orlic et al., 2001; Fathke et al., 2004). Experimentos mostram também que essas células-tronco circulantes têm o potencial de diferenciação em hepatócitos maduros, células epiteliais da pele e do trato intestinal e pode melhorar a função do coração após um infarto do miocárdio. (Satoh et al., 2004; Korbling et al., 2002; Mangi et al., 2003).

As células pluripotentes apresentam algumas características que indicam tratar-se de uma célula indiferenciada como: a atividade de fosfatase alcalina, presença do fator de transcrição Oct4, alta atividade da telomerase e uma variedade de marcadores celulares reconhecidos por anticorpos monoclonais nos antígenos estágio-específicos embrionários, no entanto esses marcadores não são específicos (Donovam et al.2001). Apesar da importância de muitos desses fatores ainda não ser muito compreendida a importância da expressão do fator e transcrição Oct4 é comprovada (Donovam et al.2001).

O fator de transcrição Oct4 (Octamer-binding transcription factor) é considerado um dos principais reguladores da manutenção da pluripotência de células-tronco embrionárias (CTE's), ou seja, da capacidade de diferenciação e auto-renovação, podendo se multiplicar infinitamente sem que ocorra a diferenciação. No entanto, uma vez que ocorra a baixa expressão do Oct4 nas células, estas perdem sua pluripotência e começam a se diferenciar.

O Oct4 é pertencente à família POU (**P**ituitária – **O**ctamer – **U**nc-86) são definidos como uma família de fatores de transcrição que se ligam a domínios específicos (domínio POU) da molécula de DNA. Inicialmente identificados em mamíferos (Herr et al, 1988) e posteriormente em diversos vertebrados e invertebrados, demonstrando desempenhar funções variadas, dentre elas um importante papel no desenvolvimento do organismo (Verrijzer, 1993; Ryan, 1997; Latchman, 1999). Foi mostrado, em diversas pesquisas, que a expressão relevante do

Oct4 só ocorre em células embrionárias pluripotentes por natureza (Hayes et al, 2008; Rodda et al, 2005; Zhang et al, 2010), podendo ativar ou reprimir sítios de transcrição gênica (Shoeler, 1991) regulando a transcrição de vários genes devido sua interação com outros dois fatores de transcrição gênica, o E1A like activity (Shoeler, 1991), e a proteína Sox2 HMG-box (Yuan et al, 1996). No entanto, várias publicações recentes demonstram ter expressão do Oct4 em células somáticas humanas, progenitoras, tumorais e células-tronco adultas, como as CTM's (Jiang et al, 2002; Mueller et al, 2009).

Os mecanismos exatos que regulam os níveis de Oct4 nas CTE's ainda não estão totalmente determinados, mas parece estarem envolvidos com a regulação direta de outros genes de função essencial da indiferenciação, como Sox2 e Nanog. A baixa regulação do Oct4 leva a uma perda de manutenção da pluripotência celular das CTE's, assim como ocorre nas células diferenciadas. No entanto, a super expressão de Oct4 também induz diferenciação em células CTE's (Niwa, 2000). Isto sugere que os níveis adequados de Oct4 devem ser mantidos para a manutenção da pluripotência (Kashyap et al, 2009).

De acordo com as informações citadas acima, é possível avaliar a quantificação e relevância dos níveis de expressão gênica do Oct4 nas CTM's, por meio da utilização da técnica de RT-PCR em tempo real (RT-qPCR).

A reação em cadeia da polimerase, mais conhecida como PCR (Polymerase Chain Reaction, termo em inglês) foi inventada por Kary Mullis em 1983 e consiste em uma técnica que possibilita a reprodução de milhares de cópias de um determinado fragmento de DNA. Por meio dessa técnica, uma sequência particular de interesse pode ser amplificada (replicada), tornando-se predominante na amostra de DNA (Triunfol, 2003), e assim a sequência amplificada pode ser utilizada para diversos fins como diagnóstico de doenças, quantificação da expressão gênica e na medicina forense.

O processo de PCR utiliza múltiplos ciclos de desnaturação, anelamento dos *primers* e alongamento da sequência por ação da enzima polimerase (Life Technology, ca. 2000). Esses *primers* são pequenos fragmentos de DNA complementares a cada uma das extremidades da sequência de interesse. A Figura 1 mostra uma representação da técnica de PCR.

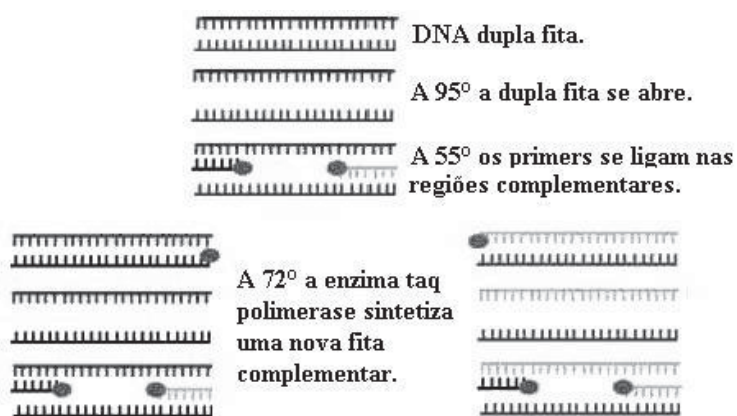


Figura 1 – Reação em cadeia da polimerase – PCR.

Fonte: Triunfol (2003)

Disponível online em: <http://www.odnavaiaescola.com>

PCR em tempo-real, que é uma técnica descrita como quantitativa porque consegue realizar a avaliação do número de moléculas produzidas a cada ciclo, por meio da emissão de fluorescência. Em comparação a técnica convencional, o qPCR em tempo real possui características vantajosas como maior rapidez, especificidade, sensibilidade e ainda realizar a quantificação do produto amplificado. Quando a amostra a ser analisada é uma molécula de RNA é necessário realizar inicialmente a transcrição reversa para converter esse RNA em DNA complementar ou cDNA para posterior amplificação por qPCR. Dessa forma denominamos essa reação de RT-qPCR.

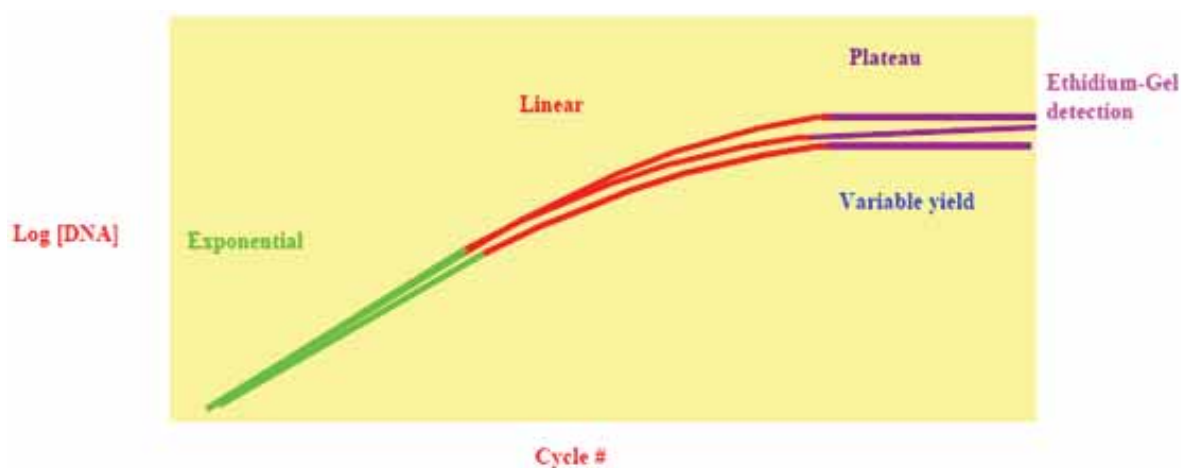


Figura 2 - **Exponencial:** Dobro do produto é acumulado em cada ciclo (eficiência da reação ~ 100%). Reação específica e precisa.

Linear: Alta variabilidade (consumo dos componentes da reação).

Platô: Detecção por gel para os métodos tradicionais. Produtos não são mais produzidos e começam ser degradados.

Disponível on-line em:

http://www.ibb.unesp.br/extensao/acidos_nucleicos/material_didatico/5_PCR_e_m_Tempo_Real.pdf

A curva de amplificação segue um padrão de aumento do produto gerado obedecendo três fases: exponencial, linear e platô (Figura 2). À medida que os ciclos da reação de PCR vão se sucedendo, ocorre o aumento do número de fluoróforos livres e conseqüentemente a fluorescência gerada. Quando a fluorescência emitida pelo fluoróforo atinge determinado limiar significativamente acima da fluorescência basal da reação e localizado na fase exponencial da mesma (Duarte, 2006). O ciclo em que o limiar é atingido é denominado C_T (Threshold Cycle – nº de ciclos) e é inversamente proporcional à concentração de produto gerado da reação.

De modo a garantir que as técnicas de RT-qPCR alcancem elevados níveis de sensibilidade e especificidade, é necessário a padronização protocolo com a finalidade de evitar problemas de execução tais como: aparecimento de produtos inespecíficos, baixa eficiência na amplificação, contaminações e impurezas das amostras (Roche Applied Science, 2006; Applied Biosystems, 2007).

As principais condições que influenciam o desempenho de uma reação de PCR são o desenho e concentração dos primers, as concentrações dos diferentes reagentes, em especial o tampão, desoxinucleotídeos e cloreto de magnésio, o número de ciclos, as temperaturas de desnaturação e anelamento e a adição de co-solventes (Hehegariu et al, 1997; Roche Applied Science, 2006; Applied Biosystems, 2007).

Assim, o presente estudo teve como objetivo padronizar reação de RT-qPCR para uso na quantificação da expressão gênica de Oct4 das CTM's obtidas, isoladas e cultivadas a partir da medula óssea de cães domésticos (*Canis familiaris*).

3. OBJETIVOS

O objetivo geral deste experimento é avaliar a quantificação e relevância dos níveis de expressão gênica do Oct4 por meio da utilização da técnica de PCR em tempo-real. Para tanto, temos como objetivos específicos:

- A) Padronização da técnica de PCR em tempo-real (qPCR) para os genes específicos;
- B) Obtenção da curva de referência para quantificação da expressão do Oct4 em células-tronco mesenquimais caninas.

4. DETALHAMENTO DO PROJETO

4.1. METODOLOGIA

4.1.1. COLETA DAS CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DA MEDULA ÓSSEA

Para a coleta das CTM's destinadas ao cultivo sobre a membrana de colágeno, foram utilizados 4 cães adultos, saudáveis, provenientes de proprietários para transferência CTM's, desenvolvida pelo Laboratório de Reprodução Avançada e Terapia Celular (LANÇA) em conjunto com o Hospital Veterinário (HV) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Unesp de Botucatu (FMVZ), em tratamentos de casos como fratura com não união óssea, ulcerações de pele e queimaduras, lesões medulares e de nervo e lesões articulares. Ainda foram submetidos à punção medular 2 cães destinados a cirurgia de ovário-salpingo-histerectomia (OSH) eletiva e sob a autorização e assinatura de um termo de consentimento e livre esclarecimento preenchido pelo proprietário (anexo 1).

Os animais foram preparados para a punção da medula óssea a partir da região da articulação escápulo-umeral. Para isso, inicialmente os animais foram tranquilizados com acepromazina na dose de 0,05 mg/kg pela via intramuscular. Decorridos 15 minutos, os animais foram posicionados em decúbito lateral direito e introduzida, na veia cefálica esquerda, solução fisiológica de cloreto de sódio 0,9%, na dose de 20 mL/kg/hora. Em seguida, a anestesia geral foi induzida com propofol, na dose de 6-8 mg/kg pela via intravenosa. Para a manutenção anestésica utilizou-se o mesmo agente. Após tricotomia e anti-sepsia do local, uma agulha de biópsia de medula óssea foi introduzida no tubérculo maior do úmero até atingir o canal medular. À agulha, acoplou-se uma seringa descartável de 20 mL contendo cerca de 1 mL de heparina sódica (Bergamo, 600478) 5000 UI/mL, na qual, por meio de gradiente de pressão negativo, foram coletados uma média de 5 mL de sangue da medula óssea.

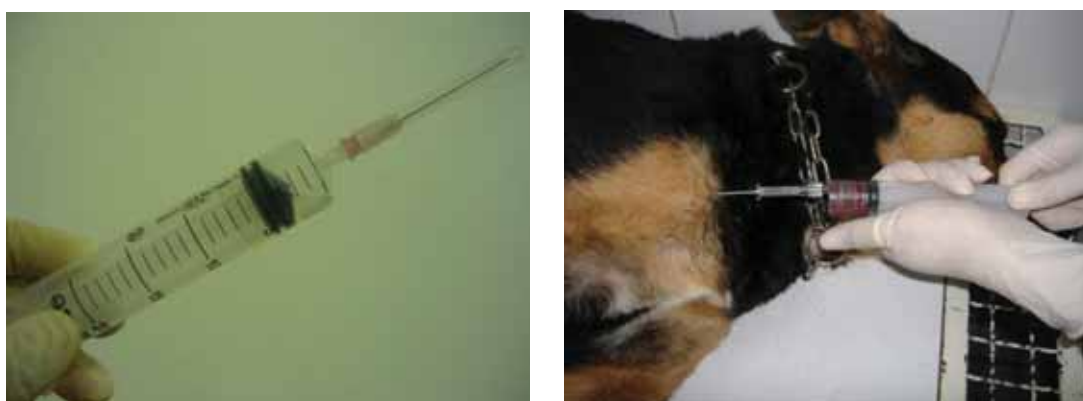


Figura 3 – **A** - representação da seringa com cerca de 1 mL de anti-coagulante (heparina). **B** – punção da medula óssea de cão a partir da porção superior do úmero.

4.1.2. ISOLAMENTO E CULTIVO *IN VITRO* DAS CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS

Após a coleta da medula óssea, o sangue foi centrifugado a 1500 rpm por 10 minutos para retirada do soro e gordura. O material obtido foi ressuspenso na proporção 1:1 em meio DMEM alta glicose com L-glutamina (Gibco, 1995-065) sem soro fetal bovino (SFB). Dessa solução, fora transferido um volume de 4 mL para um outro tubo de 15 mL (TPP, 000292) previamente preparado, contendo 4 mL de Ficoll-Paque (densidade 1.077 g.mL^{-1} - Amersham Biosciences) (diluição Ficoll:meio de cultura 1:1), e então centrifugado a 1500 rpm durante 40 minutos à temperatura ambiente. Houve a formação do anel células na interface Ficoll-células. Coletado o anel de células mononucleares, o material foi ressuspendido em meio DMEM alta glicose com L-glutamina (Gibco, 11995-065) sem soro e centrifugado novamente a 1.500 rpm durante 10 minutos. Este passo foi repetido duas vezes para retirada total do produto Ficoll-Paque (tóxico às células). Posteriormente a lavagem, o pellet foi ressuspenso em 1 mL de DMEM alta glicose com L-glutamina (Gibco, 11995-065) com a adição de 20% de soro fetal bovino inativado em carvão ativado (Gibco, 12657-029).

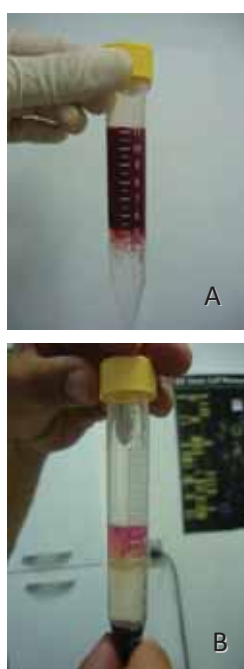


Figura 4 - **A** – sangue medular submetido a divisão em duas fases por densidade molecular. Acima, sangue, abaixo, ficoll. **B** – Material após a centrifugação por densidade. Em vermelho, o anel de células mononucleares.

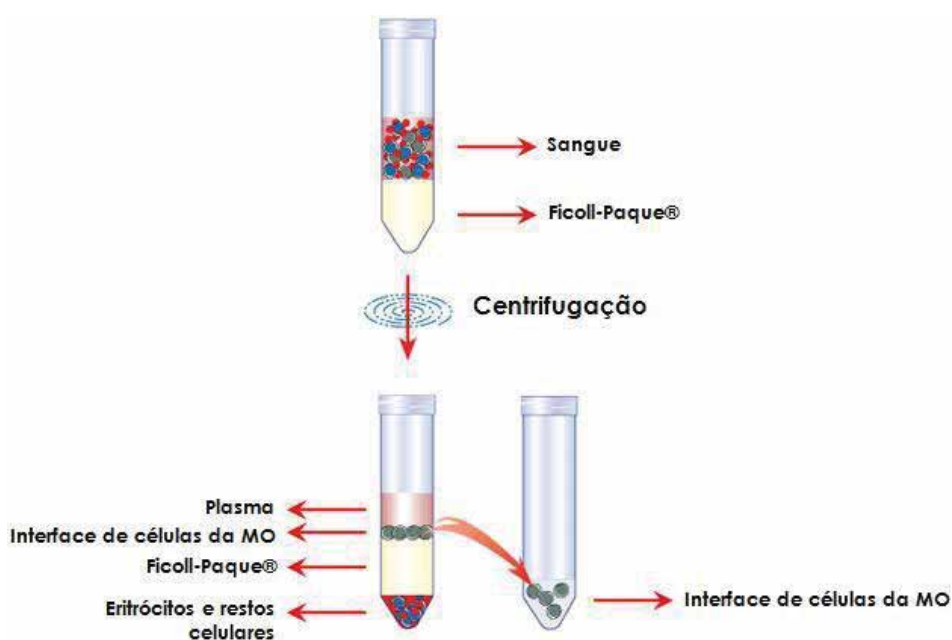


Figura 5 - Processo de separação da porção mononuclear da Medula Óssea Modificada de: http://www.stemcell.com/product_catalog/rosettesep.asp

As células foram plaqueadas em garrafas de 25 cm² (Sarstedt, 83.1810.300), com 5 mL de meio DMEM alta glicose com L-glutamina (Gibco, 11995-065), 20% SFB (Gibco, 12657-029), 100 UI.mL⁻¹ Penicilina / 100 µg.mL⁻¹ Estreptomicina (Sigma, P3539) e 3,0 µg.mL⁻¹ Anfotericina B (Sigma, A9528), durante um período de 14 dias, tempo necessário para que o cultivo atinja 80% de subconfluência. O meio de cultura foi trocado a cada 2 a 3 dias, dependendo da necessidade do cultivo.

Uma vez atingidos 80% de subconfluência em cultivo (Figura 6), as células foram submetidas a passagens em subcultivos. Para este experimento, foram utilizadas amostras em cultivo primário e secundário, de acordo com a disponibilidade do laboratório de cultivo celular.



Figura 6 – Cultivo de células-tronco mesenquimais caninas.

OBS: Todo o procedimento de isolamento e manuseio das células foi realizado dentro da capela de fluxo laminar horizontal devidamente esterilizado e os meios de cultura, filtrados em filtro estéril de 33 mm de diâmetro e membrana com poros de 0,22 µm (TPP, 000854) para evitar a passagem de contaminantes para as culturas.

4.1.3. MARCAÇÃO POR IMUNOFLORESCÊNCIA

As CTM's obtidas e isoladas a partir da medula óssea de cães, em cultivo primário, foram marcadas com anticorpo primário Oct4 (Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA) em uma concentração de 1:100 de solução de PBS, deixando agir durante 1h em temperatura ambiente. Em seguida, as amostras foram lavadas 2x com solução de PBS e adicionadas ao anticorpo secundário fluorescente Alexa Fluor 555 em uma proporção de 1:500, deixados durante 30 min em local privado de luminosidade. A leitura foi realizada em microscopia de fluorescência (filtro azul, excitação: 450 a 490 nm em aumento de 100X).

Toda a parte de isolamento, cultivo e marcação por fluorescência das CTM's, foram realizados no Laboratório de Reprodução Avançada e Terapia Celular (LANÇA) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da UNESP/Botucatu,SP.

4.1.4. DILUIÇÃO DOS PRIMERS E A TEMPERATURA DE ANELAMENTO (T_a)

A quantidade de iniciadores para uma reação deve ser calibrada, normalmente variando de 1 a 20 picomoles de cada iniciador para reações com volumes finais entre 10-50 μ L.

Normalmente as empresas que sintetizam este *primers* fornecem informações sobre o produto, sendo assim, basta diluir o material na concentração desejada, no entanto, sempre mantendo uma solução estoque mais concentrada.

O material vem normalmente liofilizado e foi ressuscitado em solução tampão TE, utilizando a fórmula de concentração e volume a seguir:

$$V_i \times C_i = V_f \times C_f$$

Onde,

V_i = volume desejado da solução inicial (μ L)

C_i = concentração da solução inicial (pMoles/ μ L)

V_f = volume desejado da solução final (μ L)

C_f = concentração desejada da solução final (pMoles/ μ L)

O procedimento de diluição dos *primers* foi realizado para os quatro *primers* utilizados no experimento, GAPDH (sense e anti-sense) e Oct4 (sense e anti-sense) (IDT – Integrated DNA Technologies).

GAPDH_canino_F:

- Informações do fabricante: 28,6 nMoles – 28.600 pMoles
- Solução estoque: 100 pMoles. μ L⁻¹
- Solução de uso: 10 pMoles. μ L⁻¹

Solução estoque:

$$V_i \times C_i = V_f \times C_f$$

$$V_i \times 100 \text{pMoles}.\mu\text{L}^{-1} = 1\mu\text{L} \times 28.600 \text{pMoles}^{-1}$$

$$V_i = 286\mu\text{L de TE}$$

GAPDH_canino_R:

- Informações do fabricante: 32,6 nMoles – 32.600 pMoles
- Solução estoque: 100 pMoles. μL^{-1}
- Solução de uso: 10 pMoles. μL^{-1}

Solução estoque:

$$V_i \times C_i = V_f \times C_f$$

$$V_i \times 100 \text{pMoles} \cdot \mu\text{L}^{-1} = 1 \mu\text{L} \times 32.600 \text{pMoles}^{-1}$$

$$V_i = 326 \mu\text{L de TE}$$

Oct4_canino_F:

- Informações do fabricante: 30,5 nMoles – 30.500 pMoles
- Solução estoque: 100 pMoles. μL^{-1}
- Solução de uso: 10 pMoles. μL^{-1}

Solução estoque:

$$V_i \times C_i = V_f \times C_f$$

$$V_i \times 100 \text{pMoles} \cdot \mu\text{L}^{-1} = 1 \mu\text{L} \times 30.500 \text{pMoles}^{-1}$$

$$V_i = 305 \mu\text{L de TE}$$

Oct4_canino_R:

- Informações do fabricante: 31,2 nMoles – 31.200 pMoles
- Solução estoque: 100 pMoles. μL^{-1}
- Solução de uso: 10 pMoles. μL^{-1}

Solução estoque:

$$V_i \times C_i = V_f \times C_f$$

$$V_i \times 100 \text{pMoles} \cdot \mu\text{L}^{-1} = 1 \mu\text{L} \times 31.200 \text{pMoles}^{-1}$$

$$V_i = 312 \mu\text{L de TE}$$

A partir da solução estoque, podemos obter a solução de uso em concentração de 10 pMoles. μL^{-1} . Estes cálculos são válidos para todos os quatro primers, já que as soluções estoque finais possuem a mesma concentração (100 pMoles. μL^{-1}).

Solução de uso:

$$V_i \times 100 \text{ pMoles} \cdot \mu\text{L}^{-1} = 50 \mu\text{L} \times 10 \text{ pMoles}^{-1}$$

$$V_i = 5 \mu\text{L da solução estoque}$$

Para obter o volume final da solução de uso em 50 μL , foi adicionado 45 μL de água Mili-Q.

Os *primers* diluídos foram mantidos em temperatura média de -20°C .

A temperatura de anelamento dos *primers* utilizados foi determinada a partir da ferramenta *NCBI BLAST* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>), sendo determinada por meio das informações oferecidas pelo fabricante.

4.1.5. EXTRAÇÃO DO RNA TOTAL DAS CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS

Para a extração do RNA total as CTM's foram contadas com o auxílio do hemocitômetro e separadas a uma concentração de 8×10^5 cél. mL^{-1} . O RNA foi extraído usando o kit Cytoplasmic and Nuclear RNA Purification Kit (Norgen, 21000) de acordo com as especificações do fabricante e dissolvido em 50 μL . Após a extração, os RNAs foram armazenados em caixas devidamente especificadas a uma temperatura de -80°C até posterior utilização. Foi um total de 13 amostras extraídas de acordo com o banco de dados mostrado na tabela no anexo.

4.1.6. QUANTIFICAÇÃO DO RNA

A concentração do RNA obtido foi determinada por meio da análise da densidade óptica das amostras em espectrofotômetro - NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop, Wilmington), nos comprimentos de onda de 260 nm e 280 nm. O grau de pureza das amostras é dado pela relação A_{260}/A_{280} , considerando o RNA puro, ou seja, livre de contaminantes, quando compreendida entre $1.8 \leq \text{razão} \leq 2.2$.

A quantificação das amostras de RNA deve ser realizada por espectrofotômetro, sendo a concentração calculada em $\mu\text{g}/\text{mL}$ através da fórmula:

$$(A_{260 \text{ nm}} - A_{320 \text{ nm}}) \times 40 \times \text{fator de diluição} = [\text{RNA}] \text{ em } \mu\text{g}/\text{ml}$$

ou

$$[\text{RNA}] = \frac{A_{260} \times Fc \times Fd}{1000}$$

Onde $A_{260\text{nm}}$ é valor de leitura da amostra a 260 nm; **Fc** corresponde ao fator de conversão, no qual a A_{260} máxima é 1 e corresponde a $40 \mu\text{g mL}^{-1}$ de RNA; **Fd** corresponde ao fator de diluição da amostra de leitura; o resultado da multiplicação é dividido por mil para obtermos a concentração em $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. A qualidade do RNA é analisada com base na relação da absorbância $A_{260\text{nm}}$ $A_{280\text{nm}}$ e da leitura a $A_{320\text{nm}}$, assim como na visualização do RNA após eletroforese em gel de agarose.

4.1.7. TRATAMENTO COM DNASE

Para garantir a pureza das amostras, o total de RNA quantificado foi primeiramente tratado com DNase livre de RNase (*DNase-Out*, Invitrogen, 18047019), afim de eliminar possíveis resíduos de DNA da amostra.

O mix dos componentes utilizados segue as proporções descritas na Tabela 1.

Tabela 1 – Quantidade de componentes necessários para purificação das amostras com DNase.

Componente	Quantidade
RNA (amostra)	1 – 8 μL
Tampão	1 μL
*DNase	1 U/ μg de RNA
**Stop DNase	1 μL /U de DNase

*quando $[\text{RNA}] > 1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$, adicionar 1U DNase

** adicionado posteriormente

Uma vez preparada a mistura dos reagentes, as amostras foram incubadas em termociclador a 37°C durante um período de 30 min, para garantir a funcionalidade da enzima degradante de DNA. Passado este período, foi adicionado à solução o stopDNase, afim de inibir a atividade da enzima, e então, deixados por 10 min à 65°C .

Após esse passo, as amostras devem ser armazenadas a -80°C para evitar a degradação do RNA de interesse.

Devido a erros de manipulação, em boa parte das amostras tratadas, a reação não foi parada (pela adição da solução stopDNase), resultando na degradação do RNA obtido e consequentemente, a perda das amostras. Sendo assim, das 13 amostras coletadas, sobraram apenas três para a realização do experimento.

4.1.8. AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DO TRATAMENTO COM DNASE

Amostras de RNA foram submetidas ao PCR convencional utilizando os componentes nas proporções estipuladas na Tabela 2. O mix mencionado na tabela 2, PCR SuperMix (Invitrogen, 10572-014) contém a enzima *Taq*DNA polimerase, tampão de reação, $MgCl_2$ e as dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP). As quantidades foram proporcionalmente adaptadas para o número de reações realizadas, adicionando um excesso de 10% para eliminar os erros de pipetagem. Após a mistura dos reagentes, as amostras foram colocadas em um termociclador para a amplificação do cDNA. A PCR convencional ocorreu durante 35 ciclos, compreendendo 6 min à 94°C para desnaturação das fitas do cDNA, seguidos por 1 min à 58°C para anelamento dos primers e mais 8 min em 72°C na fase de extensão. O produto da amplificação dos cDNAs foi conferida pela corrida em gel de agarose (1,5%) não denaturante, corado com SYBR® Safe DNA gel stain (Invitrogen, S33111) para posterior visualização das bandas. Após a solidificação do gel, cerca de 8µL do produto foi adicionado em cada poço formado. O tratamento foi considerado eficiente onde não foi observado bandas do gene de interesse.

4.1.9. TRANSCRIÇÃO REVERSA – RT-PCR

Já com o RNA livre de contaminantes, as amostras foram submetidas à reação de transcrição reversa, para a conversão em amostras de DNA complementares (cDNA), ao qual são estruturas mais estáveis e de difícil degradação quando comparadas às fitas de RNA. O cDNA das amostras foram sintetizados pelo kit ImProm-II™ Reverse Transcription System (Promega, A3800) em duas fases. Na primeira fase da reação, para cada amostra, foi utilizado 1µg de RNA total e 1µL Random primer (RP) e incubou-se por 5 min a 70°C. Em seguida, na segunda fase da reação, os tubos foram reservados em gelo para adição do *mix* contendo 4µL de 5x Buffer, 0,5µL de 20 mM dNTP *mix* (Promega, Madison, WI), 1µL de RNase out, 1,2µL de 25mM $MgCl_2$, 0,5µL de enzima RT (Promega, Madison, WI), 7,8 µL de H₂O Milli-Q autoclavada e incubadas por 60 minutos a 42°C e 10 minutos a 94°C. Ao final deste passo teremos a primeira fita de cDNA de todos os mRNAs presentes na amostra de RNA total.

A integridade do produto da RT (cDNAs) foi conferida por realização de PCR para o cDNA do RNAm codificante da proteína GAPDH (*glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*), seguida de corrida em gel de agarose (1,5%) não denaturante, corado com SYBR® Safe DNA gel stain (Invitrogen, S33111).

O cDNA foi armazenado a -20°C até o momento de sua amplificação em tempo-real.

4.1.10. AMPLIFICAÇÃO DO cDNA EM GEL DE AGAROSE

Esta etapa é necessária para avaliar a integridade do cDNA obtido. Para tanto, o cDNA das amostras foram amplificados em PCR convencional utilizando os componentes nas proporções estipuladas na Tabela 2. O mix mencionado na tabela 2, PCR SuperMix (Invitrogen, 10572-014) contém a enzima *Taq*DNA polimerase, tampão de reação, $MgCl_2$ e as dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP). As quantidades foram proporcionalmente adaptadas para o número de reações realizadas, adicionando um excesso de 10% para eliminar os erros de pipetagem.

Tabela 2 – Quantidade de componentes necessários para a amplificação das amostras.

Componente	Quantidade
RNA (amostra)	5 μ L
Mix	12,5 μ L
H ₂ O	5,5 μ L
Primer sense	1 μ L
Primer anti-sense	1 μ L

Após a mistura dos reagentes, as amostras foram colocadas em um termociclador para a amplificação do cDNA. A PCR convencional ocorreu durante 35 ciclos, compreendendo 6 min à 94°C para desnaturação das fitas do cDNA, seguidos por 1 min à 58°C para anelamento dos primers e mais 8 min em 72°C na fase de extensão.

O produto da amplificação dos cDNAs foi conferida pela corrida em gel de agarose (1,5%) não denaturante, corado com SYBR® Safe DNA gel stain (Ivitrogen, S33111) para posterior visualização das bandas. Após a solidificação do gel, cerca de 8 μ L do produto fora adicionado em cada poço formado, juntamente com o marcador de peso molecular de 100 pb (Norgen, 11400). O suporte com o gel foi transferido para a cuba de eletroforese de forma a ficar submerso em tampão TAE 1x. A corrida foi feita na velocidade de 80 watts durante 20 a 30 min. Este teste foi feito apenas para GAPDH, sendo este o controle interno deste estudo.

4.1.11. PADRONIZAÇÃO DA AMPLIFICAÇÃO DO cDNA EM PCR EM TEMPO-REAL (qPCR)

Os oligonucleotídeos, que foram utilizados como *primers*, para as reações de polimerase em cadeia, estão descritos na Tabela 3. O GAPDH foi utilizado como controle interno (Gauthier et al., 1992). O Oct4 foi construído com o auxílio do banco de dados NCBI

Nucleotide Search utilizando-se o software Primer Express 2.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA).

Para a amplificação, cerca de 100 ng/ μ L do cDNA obtido foi adicionado a reação contendo 10 μ L do Maxima™ SYBR Green qPCR Master Mix (2x) (Fermentas, K0251), 0,4 μ M de cada *primer* (sense e anti-sense) em solução com volume final de 40 μ L, divididos em dois tubos (duplicata). Na Tabela 4 estão descritas as condições da qPCR para cada um dos genes analisados.

Tabela 3: Seqüência de nucleotídeos dos *primers* utilizados expressão gênica por PCR quantitativo em tempo-real.

Gene	Seqüência (5' - 3')	Tamanho do produto
GAPDH	S: GCCCTCAATGACCACTTT	101pb
	Anti-S: TCCTTGGAGGCCATGTAGAC	
Oct4	S: TTCTCAGGGGCACCACTATC	87pb
	Anti-S: GAGCGTAGTGAAGTGAGGGC	

Tabela 4: Condições das etapas e processamento das reações de PCR para os genes analisados

Gene	Pré-incubação	Desnaturação	Anelamento	Elongamento	Nº de ciclos
GAPDH	95°C/10 min	95°C/15 seg	60°C/1 min	95°C/15 seg	35
Oct4	95°C/10 min	95°C/15 seg	60°C/1 min	95°C/15 seg	35

4.1.12. OBTENÇÃO DA CURVA PADRÃO

A quantificação da qPCR é feita com base em uma curva padrão externa que consiste em alíquotas de concentrações conhecidas do alvo molecular objeto do estudo. A amplificação e detecção da curva padrão são realizadas paralelamente a amplificação das amostras que se quer quantificar.

A curva de padronização foi feita seguindo as especificações contidas na Tabela 5, utilizando o GAPDH como referência da expressão.

Tabela 5: Curva de diluição para cada amostra

[] Relativa de cDNA (ng)	GAPDH	Oct4
100	Puro	Puro
50	1:2	1:2
25	1:4	1:4
12,5	1:8	1:8
0	c-	c-

*Reações feitas em duplicata

Toda a parte experimental em Biologia Molecular feita neste estudo, foi realizada no Laboratório de Diagnóstico Molecular do Departamento de Microbiologia/Imunologia da UNESP/Botucatu,SP.

4.2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.2.1. MARCAÇÃO POR IMUNOFLOURESCÊNCIA

A partir da análise por imunofluorescência foi possível demonstrar a expressão da proteína Oct4 nas CTM's caninas (Figura 7). A marcação positiva do Oct4 indica o caráter indiferenciado das células, mantendo assim, seu potencial de diferenciação. A expressão desta proteína também foi confirmada em células-tronco mesenquimais amnióticas humanas (Prusa et al, 2003).

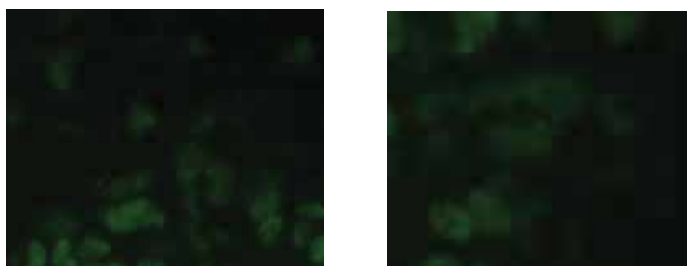


Figura 7 – CTM's caninas em cultivo primário marcadas com anticorpos fluorescentes.

4.2.2. ANÁLISE DA INTEGRIDADE DO RNA

A análise da integridade do RNA foi realizada pela amplificação e corrida em gel de agarose por eletroforese com as 13 amostras coletadas, porém, apenas nas três primeiras foi possível a visualização de bandas (Figura 8). Note, na Figura 8, a formação de uma banda arrastada da amostra quatro em diante, levando a concluir que o fato de não interromper a reação da DNase provocou a degradação do RNA extraído. Este teste foi feito apenas para GAPDH, sendo este o controle interno deste estudo.



Figura 8 – Teste de integridade do RNA das amostras pela expressão do GAPDH (101 pb) em gel de agarose. MM - Marcador molecular (100 pb – Norgen, 11400).

4.2.3. INTEGRIDADE DAS AMOSTRAS DE cDNA

A integridade do produto da RT (cDNAs) foi conferida por realização de gel de agarose (1,5%) não denaturante, corado com SYBR® Safe DNA gel stain (Ivitrogen, S33111), como mostra a Figura 9. Este teste foi feito apenas para GAPDH, sendo este o controle interno deste estudo.

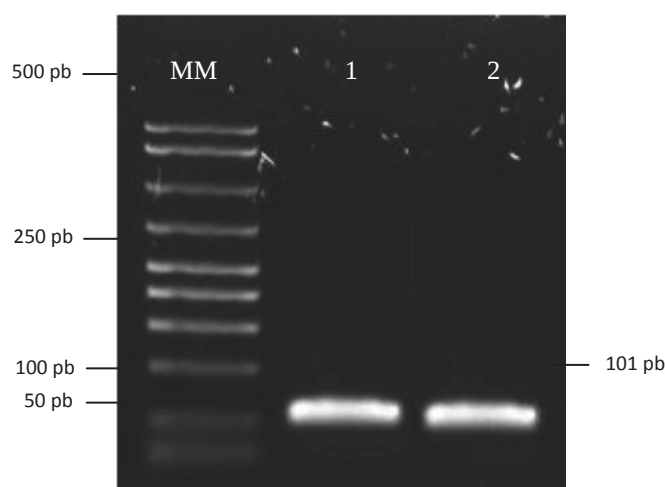


Figura 9 – Teste de integridade do cDNA das amostras pela expressão do GAPDH (101 pb) em gel de agarose. MM - Marcador molecular (50 pb – Norgen, 13525), 1 – amostra do cultivo primário das CTM's. 2 – amostra do cultivo em 1ª passagem das CTM's.

4.2.4. CURVA PADRÃO

Foram realizadas ao todo seis corridas para avaliação da curva padrão, utilizando quatro diluições em cada curva, num total de 14 reações, incluindo o controle negativo. Seguindo esse padrão de diluição foi possível observar que os C_T (Threshold Cycle – nº de ciclos) de cada uma das concentrações, representadas em duplicatas, geraram uma reprodutibilidade e uma especificidade do teste pela não detecção de sinal nos controles negativos adicionados em cada corrida, nos quais não havia moléculas alvo (tabela 4).

Na tabela 6, estão representados os C_T das reações em duplicatas, a média entre ambas e a concentração de produto gerado em cada reação de qPCR, de acordo com as diluições realizadas. Note que os valores dos C_T são inversamente proporcionais ao aumento do número de cópias geradas. O ponto C_T indica o momento a partir do qual a reação é otimizada (fase exponencial) e o produto da amplificação pode ser então estimado, ou seja, quanto maior a concentração de produto formado, mais rápido será detectada a fluorescência.

Tabela 6: Valores dos C_T nas diferentes reações e concentrações de amostras.

	[] Relativa de cDNA (ng)	C_T			DP %*
		Curva 1	Curva 2	Média	
GAPDH	100	26,1136	26,7134	26,4135	0,424123
Oct4	100	25,2776	25,8414	25,5595	0,398667
GAPDH	50	27,7616	27,5891	27,67535	0,121976
Oct4	50	27,2638	27,0494	27,1566	0,151604
GAPDH	25	29,1623	28,8231	28,9927	0,239851
Oct4	25	28,7879	28,8231	28,8055	0,02489
GAPDH	12,5	30,0630	29,8867	29,9749	0,124663
Oct4	12,5	29,4755	30,1443	29,8099	0,472913

(*) DP = desvio padrão (%).

As curvas padrões foram feitas a partir da interpolação dos C_T obtidos de cada reação (Eixo y) e os respectivos logaritmos da concentração relativa de cDNA presente nas amostras (Eixo x). A curva é então representada por uma regressão linear de equação $y = ax+b$.

As retas de regressão linear traçadas sobre os pontos de coleta de fluorescência na fase logarítmica demonstram coeficiente de correlação de 0.9962 e 0.9893 para GAPDH e Oct4, respectivamente. As diluições foram analisadas em duplicata e as médias dos C_T consideradas no cálculo da validação.

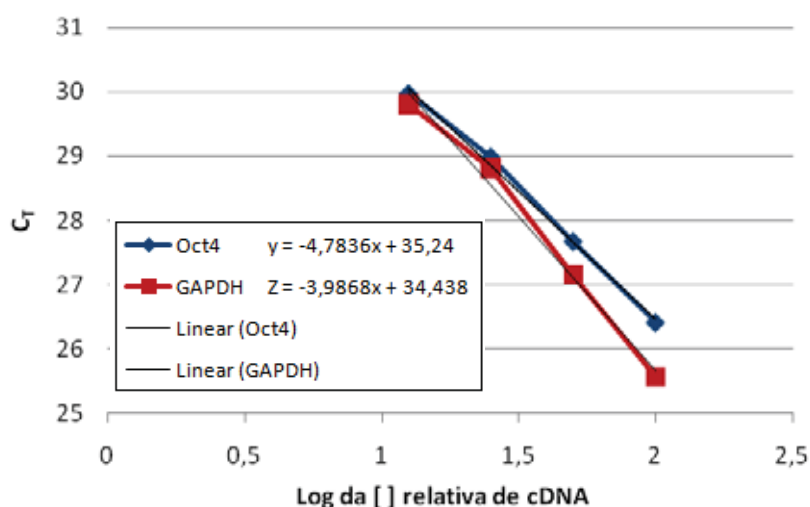


Gráfico 1 – Curva padrão externa de GAPDH usada como referência e a curva do fator de transcrição Oct4 usada como padrão na quantificação da expressão

A partir da obtenção da curva padrão podemos calcular eficiência da reação de PCR em tempo-real, determinada da seguinte maneira:

$$E = 10^{[-1/slope]}$$

Onde:

E = eficiência da reação

Slope = inclinação da reta (a)

Aplicando a fórmula a cima temos $E = 1,7816$ para o controle (GAPDH) e $E = 1,6183$ para o gene de amostragem (Oct4).

Por meio da reprodutividade linear da amplificação obtida pelas curvas padrões das reações de qPCR, é possível analisar e quantificar a presença significativa da expressão de Oct4

em CTM's provenientes da medula óssea de cães partindo dos cálculos preconizados por Pfaffl (2001):

$$\text{Quantificação Relativa} = \frac{E(\text{alvo})^{\Delta CT(\text{alvo})}}{E(\text{ref})^{\Delta CT(\text{ref})}}$$

Onde:

E – eficiência da reação

$\Delta C_T = C_T(\text{calibrador}) - C_T(\text{amostra})$

Alvo – Oct4

Referência – GAPDH

A quantificação relativa da expressão do GAPDH e Oct4, representados no gráfico 2, foi estimada a partir do aumento da amplificação progressiva a cada ciclo, considerando a amostra mais concentrada do gene controle, GAPDH, como 100%. Em porcentagem, a expressão de Oct4 se mostrou maior que o controle externo em todas as reações.

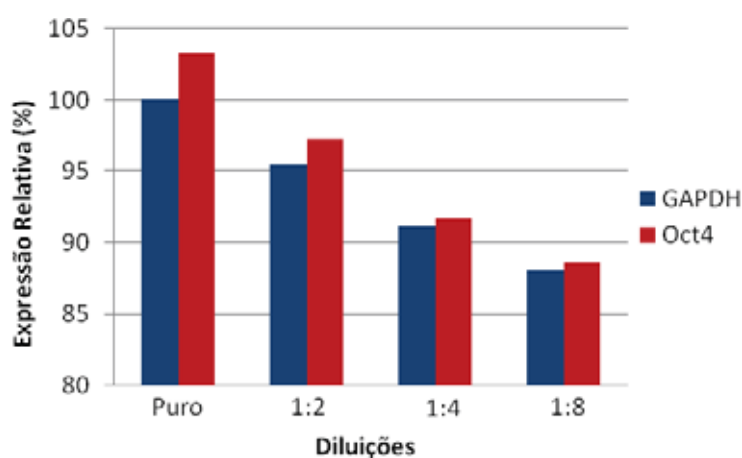


Gráfico 2 – Quantificação relativa da expressão dos gene GAPDH e Oct4 nas diferentes concentrações de amostras. O 100% foi representado pela referência GAPDH em sua mais elevada concentração amostral.

Em termos comparativos, é possível notar que os C_T obtidos no presente estudo são compatíveis com os demais encontrados em artigos da literatura referentes às células mesenquimais do cordão umbilical (Soo Seo et al, 2009) ou células embrionárias caninas (Hayes et al, 2008).

5. CONCLUSÕES

Com este experimento inicial, podemos concluir que a utilização dos *primers* para *Otc4* são satisfatórios para posteriores testes de quantificação da expressão gênica em CTM's. Assumindo a importância da expressão relevante deste gene, como um fator de transcrição responsável pela manutenção da pluripotência celular, é possível avaliar indiretamente o grau de indeferenciação das CTM's estudadas.

Para a obtenção de uma melhor relação entre os níveis de expressão do Oct4, é necessária a realização de testes quantitativos utilizando amostras de células-tronco embrionárias caninas.

6. REFERÊNCIAS

- APPLIED BIOSYSTEMS. Guide for Relative Standard Curve and Comparative C_T Experiments. *Disponível online:* <http://appliedbiosystems.gene-quantification.info>, 2007.
- * CARVALHO, R.F. Quantificação Absoluta e Relativa. *disponível online:* http://www.ibb.unesp.br/extensao/acidos_nucleicos/material_didatico/7_quantificacao_absoluta_e_relativa.pdf.
- * DONOVAN, P.J., GEARHART, J. The end of the beginning for pluripotent stem cells. **Nature**, v. 414, p. 92-97, 2001.
- * DUARTE, C.A.B. Detecção e quantificação do vírus da hepatite c através de RT-PCR em tempo-real. **Dissertação de mestrado**, Curitiba, 2006.
- * FATHKE, C., WILSON, L., HUTTER, J., KAPOOR, V., SMITH, A., HOCKING, A., ISIK, F. Contribution of Bone Marrow-Derived Cells to Skin: Collagen Deposition and Wound Repair. **Stem Cells**, v.22, n.5, p.812-822, 2004.
- * GAUTHIER J.M., THERIAULT R., THERIAULT G., GELIMAN Y., SIMONEAU J.A. Electrical stimulation induced changes in skeletal muscle enzymes of men and women. **Med Sci Sports Exerc.**; v. 24(11): p.1252-6, 1992.
- * HAYES, B., et al, Derivation, Characterization, and In Vitro Differentiation of Canine Embryonic Stem Cells. **Stem Cells**, v. 26, p. 465-473, 2008.
- * HENEGARIU, O.; HEEREMA, N.A.; DLOUHY G.H.; VANCE, G.; VOGT, P.H. Multiplex PCR: critical parameters and step-by-step protocol. **Biotechniques**. v. 23, p. 504-511, 1997.
- * HERR, W, et al. The POU domain, a large conserved region in the mammalian pit-1 Oct-1 Oct-2 and *Caenorhabditis elegans* Unc-86 gene products. **Genes Dev** 2, 1513-1516, 1988
- * JIANG, Y. et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. **Nature**, v. 418, 2002.
- * KASHYAP, V.; REZENDE, N.C.; SCOTLAND, K.B.; SHAFFER, S.M.; PERSSON, J.L.; GUDAS, L.J.; MONGAN, N.P. Regulation of Stem Cell Pluripotency and Differentiation Involves a Mutual Regulatory Circuit of the Nanog, OCT4, and SOX2 Pluripotency Transcription Factors With Polycomb Repressive Complexes and Stem Cell microRNAs **Stem Cells and Development**, v. 18, nº 7, 2009.
- * KORBLING, M., et al. Hepatocytes and Epithelial Cells of Donor Origin in Recipients of Peripheral-Blood Stem Cells. **N. Engl. J. Med.** v.346, p.738-746, 2002.

- * LATCHMAN, D.S. POU Family transcription factors in the nervous system. **J Cell Physiol** 179, 126-133, 1999.
- * LIFE TECHNOLOGY. **PCR/RT-PCR Applications Guide**. Induslab. (S.l.:s.n.), p.29, 2000.
- * MANGI, A.A. NOISEUX, N., KONG, D., HE, H., REZVANI, M., INGWALL, J.S., DZAU, V.J. Mesenchymal Stem Cells Modified with akt Prevent Remodeling and Restore Performance of Infarcted Hearts. **Nature Med**, v.9, p.1195-1201, 2003.
- * MUELLER, T.; LUETZKENDORF, J.; NERGER, K.; SCHMOLL, H.J.; MUELLER, L. P. ANALYSIS of OCT4 expression in an extended panel of human tumor cell lines from multiple entities and in human mesenchymal stem cells. **Cell. Mol. Life Sci.** v. 66 p. 495-503, 2009.
- * NIWA H, J MIYAZAKI AND AG SMITH. Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. **Nat Genet**, v. 24, p. 372–376, 2000.
- * ORLIC, D., KAJSTURA, J., CHIMENTI, S., et al. Bone Marrow Cells Regenerate Infarcted Myocardium. **Nature**, v.410, p.701–705, 2001.
- * PFAFFL, M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Res.** vol 29, 2001.
- * PRATA, K. L. Efeito da quimioterapia em altas doses sobre as células-tronco mesenquimais humanas. **Dissertação (Mestrado)** – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, SP, 2006.
- * PRUSA, A. R.; MARTON, E.; ROSNER, M.; BERNASCHEK, G.; HENGSTSCHLÄGER, M. Oct-4-expressing cells in human amniotic fluid: a new source for stem cell research? **Human Reproduction**, v.18 [7], p. 1489-1493, 2003.
- * ROCHE APPLIED SCIENCE. PCR Applications Manual, 3rd edition. Disponível online: <https://www.roche-applied-science.com/publications>, 2006.
- * RODDA, D. J., CHEW, J.L., LIM, L.H, LOH, Y.H., WANG, B., NG, H.H., ROBSON, P. Transcriptional Regulation Of Nanog By Oct4 And Sox2, **The Journal Of Biological Chemistry**, v. 280, nº 26, p. 24731–24737, 2005.
- * RYAN, A.K., ROSENFELD, M.G. POU domain family values - flexibility, partnerships and developmental codes. **Genes and Development** 11, 1207-1225, 1997.
- * SATOH, H., KISHI, K., TANAKA, T., KUBOTA, Y., NAKAJIMA, T., AKASAKA, Y., ISHII, T. Transplanted Mesenchymal Stem Cells are Effective for Skin Regeneration in Acute Cutaneous Wounds. **Cell Transplantation**, v.13, n.4, p.405-412, 2004.

- * SCHÖLER H.R., CIESIOLKA T., GRUSS P. A nexus between Oct-4 and E1A: implications for gene regulation in embryonic stem cells. **Cell**, v. 66, p. 291-304, 1991.
- * SOO SEO, M. et al. Isolation and characterization of canine umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells. **Journal of Veterinary Science**, v.10, nº 3, p. 181-187, 2009.
- * TRIUNFOL, Márcia L. **O DNA vai à escola.** Disponível em: <http://www.odnavaiaescola.com/>
- * VERRIJZER, C.P., VAN der VLIET P.C. POU domain transcription factors. **Biochimica et Biophysica Acta** 1173, 1-21, 1993.
- * VIERIRA, D. Técnicas de PCR: Aplicações e Padronização de Reações. 2002. Disponível on-line: <http://www.etall.hpg.ig.com.br>
- * YUAN, F., ET AL. Time-dependent vascular regression and permeability changes in established human tumor xenografts induced by an anti-vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor antibody. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 93, p.14765-14770, 1996.
- * ZHANG, W., WANG, X., XIAO, Z., LIU, W., CHEN, B., DAI, J. Mapping of the minimal internal ribosome entry site element in the human embryonic stem cell gene OCT4B mRNA. **Biochem Biophys Res Commun.** Mar 16, 2010.

7. ANEXOS

Tabela de amostras do RNA extraído a partir de CTM's caninas.

Nº da amostra	Natureza	Data de extração	Espécie	Nome	RG	Descrição	Nº de células (x10 ⁵)	Quantidade de RNA (ng/µL)
1	RNA	07/04/09	Canina	Rania	-	2ª passagem	8	180
2	RNA	14/05/09	Canina	Guíta	107.384	Cultivo primário	8	107,7
3	RNA	28/05/09	Canina	Flecha	153.461	1ª passagem	8	66,6
4	RNA	09/06/09	Canina	Faísca	153.462	Cultivo primário	8	31,3
5	RNA	09/06/09	Canina	Capitú	152.925	Cultivo primário	8	145,4
6	RNA	16/06/09	Canina	Faísca	153.462	1ª passagem	8	33,2
7	RNA	16/06/09	Canina	Flecha	153.461	2ª passagem	8	29,8
8	RNA	16/06/09	Canina	Flecha	153.461	3ª passagem	8	30,9
9	RNA	26/06/09	Canina	Capitú	152.925	1ª passagem	8	52,0
10	RNA	26/06/09	Canina	Faísca	153.462	2ª passagem	8	22,7
11	RNA	02/07/09	Canina	Faísca	153.462	2ª passagem	8	58,9
12	RNA	08/07/09	Canina	Faísca	153.462	3ª passagem	8	97,9
13	RNA	05/08/09	Canina	Lara	-	3ª passagem	8	128,0

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Declaro para os devidos fins que estou ciente e autorizo a realização do procedimento **"Colheita de Medula Óssea"**, referente ao Projeto de Pesquisa intitulado **Cultivo *in vitro* de Células Tronco Mesenquimais obtidas da Medula Óssea de Cães adultos**, de responsabilidade da **Prof. Fernanda da Cruz Landim e Alvarenga**.

Nome do animal: _____

Nome do Responsável: _____

RG: _____ Data: ____ / ____ / 200__

Assinatura: _____