

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE QUÍMICA**

**Programa de Pós-Graduação  
em Ciências Biológicas (Bioquímica)**

**Análise dos genes diferencialmente expressos durante a  
osteodiferenciação induzida por proteínas  
morfogenéticas de osso (BMP2 e BMP7) em células C2C12  
e super-expressão de rhBMP2 e rhBMP7 em células de  
mamíferos**

**Juan Carlos Bustos Valenzuela**

**Orientadora: Profa. Dra. Mari Cleide Sogayar**

Tese de Doutorado apresentada ao  
Departamento de Bioquímica da  
Universidade de São Paulo

Data de depósito na SPG: 03/03/2008  
(três de março de dois mil e oito)

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

*JUAN CARLOS BUSTOS VALENZUELA*

**Análise dos genes diferencialmente expressos durante a osteodiferenciação induzida por proteínas morfogenéticas de osso (BMP2 e BMP7) em células C2C12 e super-expressão de rhBMP2 e rhBMP7 em células de mamíferos**

Tese apresentada ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Doutor em Ciências (Bioquímica)

Orientador(a): Prof.(a). Dr.(a). Mari Cleide Sogayar

São Paulo

2008

Juan Carlos Bustos Valenzuela

**Análise dos genes diferencialmente expressos durante a osteodiferenciação induzida por proteínas morfogenéticas de osso (BMP2 e BMP7) em células C2C12 e super-expressão de rhBMP2 e rhBMP7 em células de mamíferos**

Tese apresentada ao Instituto de Química da  
Universidade de São Paulo para obtenção do  
Título de Doutor em Ciências Biológicas  
(Bioquímica)

Aprovado em: \_\_\_\_\_

**Banca Examinadora**

**Prof. Dr.** \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

*Dedico esta tesis a mis padres Ubaldo y Nery, y a toda mi familia que a pesar de la distancia, me hicieron sentir su incondicional apoyo, en todo momento.*

*A mi querida Sofia por mudar mi humor con una simple sonrisa.....*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradezco a Dios por darme los mejores padres que pude haber deseado. Gracias a su ejemplo de vida y los valores que me han entregado he podido tener los fundamentos necesarios para poder desarrollarme de mejor manera. Agradezco también a mis hermanos Roxana, Abraham y Viviana por su preocupación, ayuda y por hacerme sentir como “el regalón”. Gracias a mis sobrinos Sebastián, Javiera, Nicolás, Benjamín, Cristóbal y Martín porque a pesar de su niñez, siempre han estado preocupados con la suerte de su tío, y el por cariño permanentemente de cada uno de ellos. Gracias también a Yanet por el constante apoyo y cariño.

À Profa. Mari Cleide Sogayar, por ter me dado à oportunidade de trabalhar no seu laboratório e por ter ajudado tanto na minha tese de doutorado como na minha tese de graduação, marcando e influenciando por sempre minha formação científica. E por ter ajudado a salvar meu dedo! ¡Muchas gracias por todo!

À Dra. Anna Carla Goldberg pela ajuda no início do doutorado tanto nos aspectos formais como sua boa disposição que sempre mostrou.

À Prof. José Mauro Granjeiro pela colaboração, boas idéias, preocupação e bom humor.

Às pessoas que sem querer vou esquecer de agradecer, mas que de alguma forma colaboraram comigo.

À Zizi de Mendonça, Ana Carolina Valle Campos e Gisella Grazioli, pela “super” ajuda experimental e o bom humor, sem vocês teria sido impossível.

À Fernando Lojudice por sempre me oferecer células para diferenciar.

À Theri pela ajuda nos microarrays, e sua boa disposição em diversas situações.

À Patrícia Barros, Débora, Ricardo, Guilherme, Sandra, Luana, Rafael, Alessandro e Dona Helena sem os quais o trabalho seria ainda mais difícil.

À André Fujita pela ajuda com os dados de microarrays, mas principalmente pelo papo furado na salinha everyday.

À Antero, Isnar, Leticia, Newton, Marina, Rita, Miguel, Luciana Gomes, Sheila, Wagner, Chris, Mario, Fernanda Ortis, Fernanda Festa, Leonardo Rodriguez, Ana Cláudia Carrera.

À Marcos Demasi por sua excelente disposição, ajuda e pelas conversas científicas e claro, não científicas.

À Ricardo Correa pelo vetor de expressão, suas idéias e preocupação.

A Isis Mariana Pasian minha primeira e última aluninha de iniciação por toda a ajuda com as BMPs.

Ao CNPq através da concessão de bolsas e auxílios.

Ao Instituto de Química e em especial aos funcionários da Secretária de Pós-graduação.

Ao Sr. Josué de Oliveira Cruz, Dona Doratilde Aparecida Ferreira Cruz e família pela permanente ajuda, apoio e carinho.

Agradezco a Luciana por haber estado conmigo en las buenas y en las malas, por haber tenido fé cuando otros hubiesen desistido, por tu constante ayuda, apoyo y por quererme tal como soy. Te daré gracias infinitamente por traer a Sofia, y agradezco cada día la excelente madre que eres. Para mi sería fácil continuar con las palabras, pero para lo que vendrá, hablando por mi, prefiero *Res non verba*. ¡Espero podamos lograr eso!

A mi princesa Sofia

Puede ser que algún día, logres entender lo que quise decir en este momento, aunque puedo imaginar que dentro de tu inocencia eres consciente de lo importante que fuiste, eres y serás para mí. Gracias a Dios por enviarte a este mundo para ayudarme a levantarme cuando muchas veces me parecía imposible. Gracias por recordarme día a día la mejor época de nuestras vidas, que refleja una parte del ciclo incesante de nuestra existencia.

Llegaste como si nada  
queriendo alcanzar al sol  
aquella tibia mañana  
pronto en mis brazos estabas  
reuniendo mundos diferentes  
era para sentirse extraño  
algo nuevo se alojaba en  
las calles de mi mente  
esas caritas, esas voces  
esas miradas inocentes  
me seguías por todos lados  
como atravesando continentes  
ya distantes  
sentía tus manitos suaves  
deslizándose omnipresentes  
sentía tus pensamientos llamándome  
adelantando mi llegada  
para que fuéramos a soñar  
entre estrellas gemelas e infinitas  
y luego continuar con  
nuestra apacible guerra  
balanceando nuestras energías  
invadiendo mundos inalcanzables  
volando sobre luces invisibles  
recorriendo océanos de cristal  
moviendo montañas con los dedos  
aliados del tiempo y del espacio  
rompiendo diamantes con la mirada  
ocultándonos tras sombras ficticias  
sentados en nubes coloridas, riendo eternamente.

## **Apoio Financeiro**

**CNPq** – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e tecnológico

**FAPESP** – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

**FINEP** – Financiadora de Estudos e Projetos

**PRP – USP** – Pró-Reitoria de Pesquisa da USP

## Índice

<b>RESUMO</b> .....	<b>i</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>ii</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	<b>iii</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
1.1. <i>Tecido ósseo e o equilíbrio entre formação e reabsorção óssea.</i> .....	1
1.1.1. <i>Formação óssea.</i> .....	2
1.1.2. <i>Reabsorção e reparo ósseo.</i> .....	6
1.2. <i>Fatores de crescimento relacionados à formação e reparo ósseo.</i> .....	8
1.2.1. <i>“Bone Morphogenetic Proteins”, BMPs.</i> .....	10
1.2.1.1. <i>Características principais</i> .....	10
1.2.1.2. <i>Regulação do sinal de BMPs.</i> .....	14
1.2.1.3. <i>Indução da formação óssea.</i> .....	15
1.2.1.4. <i>Obtenção, produção e utilização de BMPs em reparo ósseo.</i> .....	16
1.2.1.5. <i>Utilização de rhBMP2 e rhBMP7 comerciais em reparo ósseo.</i> .....	17
1.2.1.6. <i>Resumo das aplicações clínicas de rhBMP2 e rhBMP7.</i> .....	18
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>21</b>
2.1. <i>Objetivos gerais:</i> .....	21
2.2. <i>Objetivos específicos:</i> .....	21
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>22</b>
3.1. <i>Plasmídeos.</i> .....	22
3.2. <i>Soluções para cultura de bactérias.</i> .....	22
3.3. <i>Cultura de bactérias.</i> .....	22
3.4. <i>Preparação de estoques glicerinados.</i> .....	22
3.5. <i>Linhagens celulares.</i> .....	23
3.6. <i>Soluções e meios de cultura para células de mamíferos.</i> .....	23
3.7. <i>Soluções.</i> .....	23
3.8. <i>Ensaio de osteodiferenciação induzida por rhBMP2 e rhBMP7 utilizando células de cordão umbilical humano.</i> .....	24
3.9. <i>Coloração de Von Kossa.</i> .....	24
3.10. <i>Ensaio de osteodiferenciação induzida por rhBMP2, e rhBMP7 comerciais em células C2C12.</i> .....	25
3.11. <i>Ensaio de atividade de fosfatase alcalina de células C2C12 tratadas com rhBMP2 e rhBMP7 comerciais.</i> .....	25
3.12. <i>Coleta dos RNAs totais das células C2C12 tratadas com rhBMP2 e hBMP7 comerciais.</i> .....	26
3.13. <i>Preparação do cRNA para hibridização com os bioarranjos de DNA (Codelink).</i> .....	26
3.14. <i>Hibridização dos cRNAs aos bioarranjos de DNA.</i> .....	27
3.15. <i>Análise dos resultados da hibridização dos bioarranjos de DNA.</i> .....	28
3.16. <i>Confirmação dos transcritos selecionados por PCR quantitativo (qPCR).</i> .....	29
3.17. <i>Síntese de cDNA.</i> .....	29
3.18. <i>Determinação da concentração final de “primers”.</i> .....	30
3.19. <i>Determinação da eficiência dos “primers”.</i> .....	33
3.20. <i>Confirmação da expressão diferencial através de qPCR.</i> .....	33
3.21. <i>Digestão, desfosforilação e purificação do vetor pENTR2B.</i> .....	35
3.22. <i>Amplificação do cDNA correspondente à hBMP2 e hBMP7.</i> .....	35
3.23. <i>Amplificação do cDNA de hBMP2 e hBMP7 por PCR.</i> .....	36
3.24. <i>Purificação e fosforilação dos cDNAs de hBMP2 e hBMP7.</i> .....	36
3.25. <i>Ligação do vetor pENTR2B com os cDNAs correspondentes à hBMP2 e hBMP7.</i> .....	37
3.26. <i>Eletroporação de E. coli DH10B.</i> .....	37
3.27. <i>Identificação de clones bacterianos positivos para hBMP2 e hBMP7 através de PCR.</i> .....	37

3.28.	Digestão e purificação do vetor pCMV-IRES-EGFP. ....	38
3.29.	Amplificação, digestão e purificação dos cDNAs de hBMP2 e hBMP7. ....	38
3.30.	Ligação do vetor pCMV-IRES-EGFP com os cDNAs correspondentes à hBMP2 e hBMP7. ....	39
3.31.	Eletroporação de <i>E. coli</i> XLB1. ....	40
3.32.	Identificação dos clones positivos através de PCR. ....	40
3.33.	Transfecção transitória e estável de células 293T com pCMV-hBMP2- IRES-EGFP e pCMV-hBMP7-IRES-EGFP. ....	41
3.34.	Análise da expressão de hBMP2 e hBMP7 na transfecção transitória de células 293T com pCMV-IRES-EGFP, pCMV-IRES-EGFP-hBMP2 e pCMV-IRES-EGFP-hBMP7 e dos clones estáveis de células 293TpCMV-IRES-EGFP e 293TpCMV-hBMP7-IRES-EGFP. ....	42
3.35.	Purificação de rhBMP7 do meio de cultura do clone estável de células 293TpCMV-hBMP7-IRES-EGFP N <sup>o</sup> 12 através de cromatografia iônica. ....	43
3.36.	Análise funcional do meio de cultura condicionado por células 293T expressando rhBMP7 utilizando-se as células C2C12. ....	44
3.37.	Osteodiferenciação <i>in vivo</i> utilizando-se o meio de cultura condicionado pelas células 293TpCMV-hBMP7-IRES-EGFP N <sup>o</sup> 12. ....	45
3.37.1.	Infusão das amostras. ....	45
3.37.2.	Recuperação das amostras. ....	46
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS. ....</b>	<b>47</b>
4.1.	Padronização de um modelo de diferenciação osteoblástica. ....	47
4.1.1	Efeito de rhBMP2 e rhBMP7 comerciais na diferenciação de células mesenquimais de cordão umbilical humano. ....	47
4.1.1.1	Morfologia celular. ....	47
4.1.1.2	Coloração específica de von Kossa. ....	50
4.1.2	Efeito de rhBMP2 e rhBMP7 comerciais na diferenciação osteoblástica de células C2C12. ....	52
4.1.2.1	Morfologia celular. ....	52
4.1.2.2	Ensaio de atividade de fosfatase alcalina de células C2C12 utilizando rhBMP2 e rhBMP7 comerciais. ....	54
4.2	Análise dos genes diferencialmente expressos através de microarranjos de DNA (Codelink), durante a osteodiferenciação das células C2C12, induzida por rhBMP2 e rhBMP7. ....	56
4.3	Confirmação da expressão diferencial dos genes regulados por rhBMP2 e rhBMP7 através de qPCR. ....	60
4.3.1	Determinação da concentração ideal e da eficiência dos “primers”. ....	60
4.3.2	Validação da expressão diferencial entre culturas de células C2C12 tratadas e não tratadas com rhBMP2 e rhBMP7. ....	63
4.3.2.1	Análise da expressão de MyoD. ....	78
4.4	Clonagem de hBMP2 e hBMP7. ....	80
4.4.1	Amplificação de hBMP2 e hBMP7 para clonagem no vetor pENTR2B. ....	80
4.4.2	Clonagem de hBMP2 e hBMP7 no vetor pENTR2B. ....	82
4.4.3	Subclonagem de rhBMP2 e rhBMP7. ....	83
4.4.3.1	Amplificação de hBMP2 e hBMP7 para subclonagem no vetor pCMV-IRES-EGFP. ....	83
4.4.3.2	Identificação dos clones positivos pCMV-hBMP2-IRES-EGFP e pCMV-hBMP7-IRES-EGFP através de PCR e seqüenciamento de DNA. ....	84
4.5	Análise da expressão de rhBMP2 e rhBMP7 na transfecção transitória de células HEK293T com pCMV-IRES-EGFP, pCMV-IRES-EGFP-hBMP2 e pCMV-hBMP7-IRES-EGFP. ....	87
4.6	Transfecção estável de células 293T com pCMV-IRES-EGFP, pCMV-hBMP2-IRES-EGFP e pCMV-hBMP7-IRES-EGFP. ....	89
4.7	Análise da expressão ao nível de proteína dos clones estáveis pCMV- hBMP7-IRES-EGFP. ....	91

4.8	Purificação de rhBMP7 do meio de cultura do clone estável de células 293TpCMV-hBMP7-IRES-EGFP N <sup>o</sup> 12.....	92
4.9	Osteodiferenciação “in vitro” e “in vivo” utilizando o meio de cultura das células 293TpCMV-hBMP7-IRES-EGFP N <sup>o</sup> 12.....	94
4.9.1	Osteodiferenciação “in vitro”.....	94
4.9.1.1	Análise da expressão de Osx por qPCR.....	94
4.9.1.2	Mudanças morfológicas das células C2C12.....	95
4.9.1.3	Coloração com Vermelho de Alizarina.....	97
4.9.1.4	Ensaio de atividade de fosfatase alcalina das células C2C12.....	98
4.9.2	Osteodiferenciação “in vivo”.....	100
<b>5.</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>103</b>
5.1	C2C12 como modelo de diferenciação osteoblástica.....	103
5.2	Análise dos genes diferencialmente expressos durante a osteodiferenciação de células C2C12 induzida por rhBMP2 e rhBMP7.....	104
5.3	Genes confirmados por qPCR e sua relação com osteodiferenciação e formação óssea.....	106
5.3.1	Fatores de transcrição e proteínas relacionadas.....	107
5.3.2	Proteínas envolvidas em vias de sinalização celular.....	114
5.3.3	Proteínas associadas à matriz extracelular.....	117
5.3.4	Outras proteínas.....	120
5.3.5	Integração das possíveis funções dos genes validados por qPCR.....	121
5.4	Clonagem e superexpressão de rhBMP2 e rhBMP7.....	124
5.4.1	Superexpressão e caracterização de rhBMP7 em células HEK 293T.....	125
5.4.2	Funcionalidade de rhBMP7 superexpressa em células 293TpCMV- hBMP7-IRES-EGFP N <sup>o</sup> 12.....	126
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>129</b>
<b>7.</b>	<b>PERSPECTIVAS.....</b>	<b>131</b>
<b>8.</b>	<b>REFERENCIAS.....</b>	<b>134</b>

## Índice de tabelas

<b>Tabela 1. Origem e principais funções de fatores de crescimento relacionados ao reparo e formação óssea.....</b>	<b>9</b>
<b>Tabela 2. Características comerciais de rhBMP2 e rhBMP7 utilizadas terapeuticamente em humanos.....</b>	<b>18</b>
<b>Tabela 3. Publicações relacionadas a aplicações clínicas de BMPs em humanos. Ensaio clínico (CT), ensaio clínico aleatório (RCT) e meta-análises (MA), extraída de (Granjeiro, Oliveira et al., 2005).....</b>	<b>19</b>
<b>Tabela 4. Sequência dos oligonucleotídeos utilizados para quantificação da expressão gênica através de ensaios de PCR quantitativo (qPCR). .....</b>	<b>31</b>
<b>Tabela 5. Prováveis genes diferencialmente expressos durante a osteodiferenciação das células C2C12 induzida por rhBMP2 e rhBMP7.....</b>	<b>59</b>
<b>Tabela 6. Tabela de concentração final e eficiência dos “primers” utilizados nas reações de qPCR para o estudo de expressão diferencial dos transcritos selecionados através dos microarranjos de DNA. ....</b>	<b>62</b>
<b>Tabela 7. Resumo dos resultados da análise de expressão através de qPCR de diversos genes durante a osteodiferenciação das células C2C12 induzida por rhBMP2 e rhBMP7. S=Sim, N=Não, I=Induzido, R=Reprimido e S/V=Sem Variação.....</b>	<b>79</b>

## Índice de figuras

<b>Figura 1. Ossificação intramembranosa.</b> .....	<b>4</b>
<b>Figura 2. Ossificação endocondral.</b> .....	<b>6</b>
<b>Figura 3. Proteínas da superfamília TGF <math>\beta</math></b> .....	<b>11</b>
<b>Figura 4. Sinalização intracelular induzida por BMPs.</b> .....	<b>14</b>
<b>Figura 5. Diferenciação celular utilizando rhBMP2 e rhBMP7.</b> .....	<b>49</b>
<b>Figura 6. Coloração de von Kossa nas células tratadas com rhBMP2 e rhBMP7.</b> .....	<b>51</b>
<b>Figura 7. Osteodiferenciação de células C2C12 induzida por rhBMP2 e rhBMP7.</b> .....	<b>53</b>
<b>Figura 8. Atividade de Fosfatase Alcalina das células C2C12 tratadas com 200ng/ml de rhBMP2 e rhBMP7.</b> .....	<b>55</b>
<b>Figura 9. Genes induzidos e reprimidos por rhBMP2 e rhBMP7 durante a diferenciação osteoblástica das células C2C12.</b> .....	<b>57</b>
<b>Figura 10. Tela de Saída de Fátigo.</b> .....	<b>58</b>
<b>Figura 11. Gráficos das eficiências dos “primers” mGAPDH, mHPRT e mHMBS.</b> .....	<b>61</b>
<b>Figura 12. qPCR dos genes candidatos: Runx2, Id1, Id2, Id3, Dlx1, Dlx2, Dlx5, Fkhr1, Osx, Hoxc8, Glis1, Glis3, Zfp82, Usf2 e Nab1 induzidos por rhBMP2 e rhBMP7 durante a osteodiferenciação das células C2C12.</b> .....	<b>69</b>
<b>Figura 13. qPCR dos genes candidatos: Lrp6, Ryk, Dvl1, Ecsit e PKC<math>\delta</math> induzidos por rhBMP2 e rhBMP7 durante a osteodiferenciação das células C2C12.</b> .....	<b>72</b>
<b>Figura 14. qPCR dos genes candidatos: Spp1, Ltbp2, Grn, Postn, Plod1, BMP1, Htra1 e IGFBP-r10 induzidos por rhBMP2 e rhBMP7 durante a osteodiferenciação das células C2C12.</b> .....	<b>75</b>
<b>Figura 15. qPCR dos genes candidatos: Cfdp1, AK012215.1 e AW488953.1 induzidos por rhBMP2 e rhBMP7 durante a osteodiferenciação das células C2C12.</b> .....	<b>77</b>
<b>Figura 16. Análise da expressão do gene MyoD durante a osteodiferenciação das células C2C12 induzida por rhBMP2 e rhBM7.</b> .....	<b>78</b>
<b>Figura 17. Reação de PCR para amplificar hBMP2 e hBMP7.</b> .....	<b>81</b>
<b>Figura 18. Reação de PCR para amplificar hBMP2 e hBMP7 a partir de cDNA de útero e próstata respectivamente.</b> .....	<b>81</b>
<b>Figura 19. Reação de PCR nos plasmídeos isolados das colônias positivas para a ligação pENTR2B-hBMP2.</b> .....	<b>82</b>
<b>Figura 20. Amplificação dos cDNAs correspondentes à hBMP2 e hBMP7 e digestão do vetor pCMV-IRES-EGFP.</b> .....	<b>84</b>
<b>Figura 21. Identificação de clones pCMV-hBMP2-IRES-EGFP através de PCR.</b> .....	<b>86</b>
<b>Figura 22. Identificação de clones pCMV-hBMP7-IRES-EGFP através de PCR.</b> .....	<b>86</b>
<b>Figura 23. Análise da expressão de rhBMP7 nas células 293T transfectadas transitoriamente com pCMV-IRES-EGFP e pCMV-hBMP7-IRES-EGFP</b> .....	<b>88</b>
<b>Figura 24. Clones estáveis de células 293T co-transfectadas com pCMV-IRES-EGFP + pTK-Hyg, pCMV-hBMP2-IRES-EGFP + pTK-Hyg, e pCMV-hBMP7-IRES-EGFP + pTK-Hyg</b> .....	<b>90</b>
<b>Figura 25. Expressão de rhBMP7 presente no meio de cultura nos clones de células 293TpCMV-hBMP7-IRES-EGFP.</b> .....	<b>91</b>
<b>Figura 26. Purificação de rhBMP7 do meio de cultura do clone estável de células 293TpCMV-hBMP7-IRES-EGFP N<sup>o</sup>12.</b> .....	<b>93</b>
<b>Figura 27. Análise da expressão do gene Osx produto do tratamento das células C2C12 com o meio condicionado (MC) das células 293TpCMV-hBMP7-IRES-EGFP N<sup>o</sup>12.</b> .....	<b>95</b>
<b>Figura 28. Análise funcional do meio condicionado das células 293TpCMV-hBMP7-IRES-EGFP N<sup>o</sup>12 utilizando o modelo de diferenciação osteoblástica de células C2C12.</b> .....	<b>96</b>

<b>Figura 29. Ensaio de Coloração Vermelho de Alizarina durante a diferenciação osteoblástica de células C2C12 com o meio condicionado de 293TpCMV-hBMP7-IRES-EGFP N°12.....</b>	<b>97</b>
<b>Figura 30. Atividade de Fosfatase Alcalina das células C2C12 tratadas com o meio condicionado das células 293TpCMV-hBMP7-IRES-EGFP N°12 .....</b>	<b>99</b>
<b>Figura 31. Osteodiferenciação “in vivo” utilizando o meio condicionado das células 293TpCMV-hBMP7-IRES-EGFP N°12. ....</b>	<b>102</b>
<b>Figura 32. Genes envolvidos em diferenciação osteoblástica. ....</b>	<b>123</b>

Bustos-Valenzuela JC. **Análise dos genes diferencialmente expressos durante a osteodiferenciação induzida por proteínas morfogenéticas de osso (BMP2 e BMP7) em células C2C12 e super-expressão de rhBMP2 e rhBMP7 em células de mamíferos.** 2008. 150p. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica). Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

## RESUMO

As BMPs (*Bone Morphogenetic Proteins*) são membros da superfamília de proteínas TGF- $\beta$  (*Transforming Growth Factor  $\beta$* ), regulam o crescimento e diferenciação de vários tipos celulares em diversos tecidos, e algumas delas desempenham um papel crítico na diferenciação de células de origem mesenquimal em osteoblastos. Particularmente, rhBMP2 e rhBMP7, promovem osteoindução tanto "*in vitro*" como "*in vivo*", sendo, ambas as proteínas utilizadas terapeuticamente em Ortopedia/Odontologia para reparo ósseo.

A expressão diferencial de genes durante a osteodiferenciação de células C2C12 induzida por rhBMP2 e rhBMP7, foi analisada através de microarranjos de DNA, selecionando 31 genes, dos quais 24 foram validados por qPCR, 13 dos quais são relacionados à transcrição, quatro associados a algumas vias de sinalização celular e sete associados à matriz extracelular. Análise funcional destes genes permitirá conhecer, com maiores detalhes, os eventos moleculares que ocorrem durante a diferenciação osteoblástica de células C2C12 induzida por rhBMPs.

Em paralelo, foi perseguida a super-expressão de rhBMP2 e rhBMP7 em células HEK293T, demonstrando-se a atividade de rhBMP7, induzindo osteodiferenciação "*in vitro*" e formação de osso "*in vivo*", demonstrando a viabilidade do objetivo de se produzir estas proteínas para futura aplicação como biofármacos no Brasil.

Palavras-chave: diferenciação celular, osteoblastos, BMPs, diferenciação osteoblástica, reparo ósseo, expressão de proteínas recombinantes.

Bustos-Valenzuela JC. **Analysis of differentially expressed genes during osteodifferentiation induced by bone morphogenetic proteins (BMP2 e BMP7) of C2C12 cells and overexpression of rhBMP2 and rhBMP7 in mammalian cells.** 2008. 150p. Thesis (Ph.D.) - Post-Graduate Program in Biological Sciences (Biochemistry). Institute of Chemistry, University of Sao Paulo, Sao Paulo

## **ABSTRACT**

The BMPs (Bone Morphogenetic Proteins) are members of the TGF- $\beta$  (Transforming Growth Factor  $\beta$ ) superfamily of proteins, regulate growth and differentiation of various cell types in various tissues, and some play a critical role in differentiation of mesenchymal cells into osteoblasts. Particularly, rhBMP2 and rhBMP7, promote osteoinduction "*in vitro*" and "*in vivo*" and both proteins are used therapeutically in Orthopedics and Dentistry.

The differential expression of genes during osteodifferentiation induced by rhBMP2 and rhBMP7 in C2C12 cells was analyzed through DNA microarrays, allowing the selection of 31 genes, of which 24 were validated by qPCR, 13 of which are related to transcription, four associated with cell signaling pathways and seven are associated with the extracellular matrix. Subsequent functional analysis of these genes should reveal more details on the molecular events which take place during C2C12 cells osteoblastic differentiation induced by rhBMPs

In paralel, rhBMPs 2 and 7 were overexpressed in HEK293T cells and BMP7 activity to induce osteodifferentiation "*in vitro*" and bone formation "*in vivo*" was demonstrated, reinforcing the viability of our objective to produce these proteins for future application as biopharmaceuticals in Brazil.

Key words: cellular differentiation, osteoblasts, BMPs, osteoblast differentiation, bone repair, recombinant protein expression.

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

$\mu\text{g}$	microgramas
$\mu\text{L}$	microlitro
$\mu\text{M}$	micromolar
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius
Abs	Absorbância
ATCC	American Type Culture Collection
BMP	Proteína Morfogenética de Osso
cDNAs	DNA complementar
Ct	número de ciclos da PCR que uma amostra atinge um valor de corte arbitrário nos ensaios de qPCR.
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	dimetilsulfóxido
DNA	Acido desoxirribonucléico
dNTP	Desoxinucleotídeo
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
EGF	Epithelial Growth Factor (Fator de Crescimento Epitelial)
ESTs	Expressed Sequence Tags
g	grama
GAPDH	Gliceraldeído 3 fosfato desidrogenase
h	horas
HKGs	Housekeeping genes
HMBS	Hydroxymethylbilane Synthetase
HPRT	hypoxantina fosforibosil transferase
Kpb	Kilo pares de bases
kDa	Kilodaltons
L	litro
M	molar
mg	miligrama
min	minutos
mL	mililitros
mM	milimolar

mmol	milimol
mRNA	RNA mensageiro
nm	nanometro
nmol	nanomol
O/N	“Overnight”
ORF	Caixa de leitura aberta
pb	pares de bases
PBSA	Phosphate Buffered Saline – sem cálcio ou magnésio
PCR	Reação da polimerização em cadeia
PEG	polietilenoglicol
pmol	picomol
pNF	paranitrofenol
qPCR	PCR quantitativo
rhBMP2	Proteína Morfogenética de Osso humana recombinante 2
rhBMP7	Proteína Morfogenética de Osso humana recombinante 7
RNA	Ácido Ribonucleico
Rnase	Ribonuclease
rpm	revoluções por minuto
RT-PCR	Transcrição reversa seguida de PCR
SDS	Sódio Dodecil Sulfato
seg	segundos
SFB	Soro fetal bovino
SVR	Support Vector Regression
TAE	Tris-Acetate-EDTA
Tm	Temperatura de “melting”
U	Unidades
V	Volt

## 1. INTRODUÇÃO.

### **1.1. Tecido ósseo e o equilíbrio entre formação e reabsorção óssea.**

Os ossos são os principais componentes do sistema de sustentação dos vertebrados. Eles constituem estruturas protetoras (crânio e caixa torácica); garantem maior rendimento do trabalho muscular, formando eficientes sistemas de alavancas nas articulações; armazenam substâncias gordurosas no tecido adiposo da medula amarela; executam a hemocitopoiese, na medula vermelha, e, ainda, atuam como depósito de cálcio, fosfato e outros íons. O osso apresenta vários tipos de tecidos: fibroso, reticular, cartilaginoso, adiposo, sangue e também fibras nervosas, além do tecido ósseo que é o predominante. O osso é, conseqüentemente, um órgão e não deve ser confundido com o tecido ósseo.

O tecido ósseo é um tecido conjuntivo especializado, o mais rígido do corpo, constituído de uma matriz orgânica colagênica (colágeno tipo I), contendo proteoglicanas de baixo peso molecular e proteínas não colagênicas, que correspondem a 25% de seu peso; uma parte mineral (hidroxiapatita) correspondente a 65% e água (10%) (Junqueira e Carneiro, 1999; Vaes, Dechering *et al.*, 2005).

As células especializadas constituintes do tecido ósseo são:

- Osteócitos que estão localizados em cavidades ou lacunas dentro da matriz óssea. Destas lacunas formam-se canalículos que se dirigem para outras lacunas, tornando possível, assim, a difusão de nutrientes graças à comunicação entre os osteócitos. Estas células têm um papel fundamental na manutenção da integridade da matriz óssea.
- Osteoblastos, que são células que sintetizam a parte orgânica (colágeno tipo I, proteoglicanas e glicoproteínas) da matéria óssea.

São capazes de concentrar fosfato de cálcio, participando da mineralização da matriz.

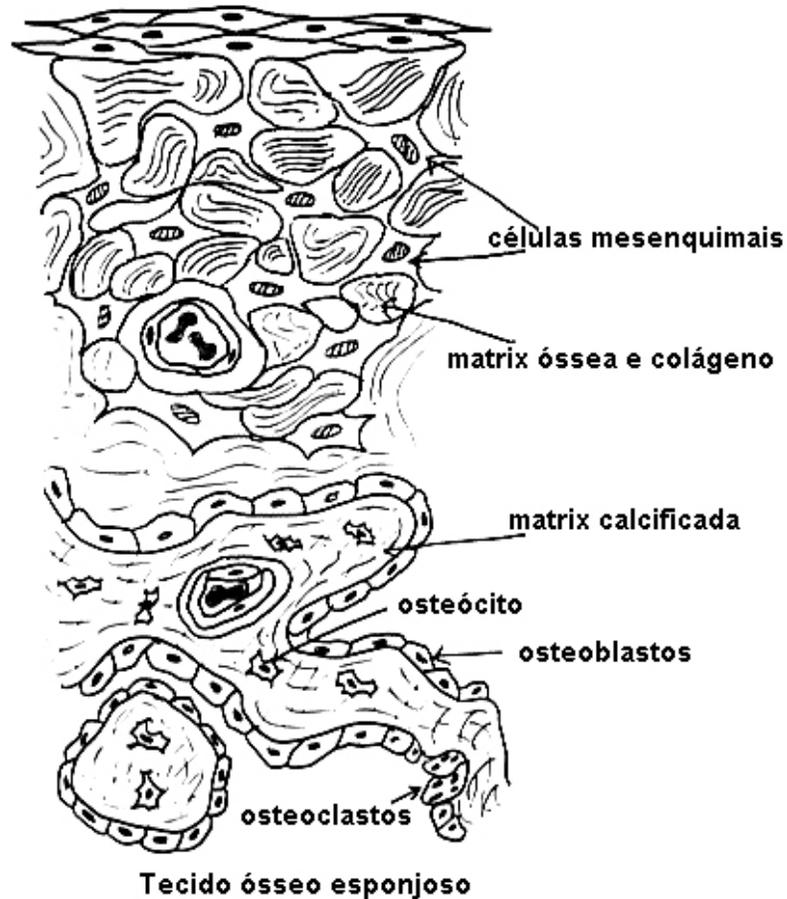
- Osteoclastos que participam dos processos de reabsorção e remodelamento do tecido ósseo. Na forma ativa, são células gigantes e multinucleadas, extensamente ramificadas, derivadas da fusão de monócitos que atravessam os capilares sanguíneos.

### **1.1.1. Formação óssea.**

A formação do tecido ósseo humano tem início durante o desenvolvimento embrionário, mas o crescimento e o desenvolvimento ósseo seguem até a idade adulta. Durante a embriogênese, o tecido ósseo é formado através de dois processos, que envolvem a transformação de um tecido mesenquimal, previamente formado, em tecido ósseo. A diferenciação direta de células mesenquimais em osteoblastos é chamada ossificação intramembranosa, originando os ossos achatados do corpo, como, por exemplo, os ossos do crânio (Opperman, 2000). A outra forma é a ossificação endocondral ou intracartilaginosa, que ocorre por substituição de um molde cartilaginoso por osso, originando a maioria dos ossos do corpo, como, por exemplo, o fêmur, úmero, tibia (Ornitz e Marie, 2002).

Durante a ossificação intramembranosa (Figura 1) células mesenquimais da crista neural proliferam e condensam-se em nódulos compactos, e algumas delas se desenvolvem em capilares, enquanto outras se transformam em osteoblastos. Estes últimos, secretam uma matriz composta de proteoglicanas e colágeno, a qual se calcifica pela ligação de sais de cálcio. Na maioria dos casos, os osteoblastos são separados da região de calcificação por uma camada de matriz óssea que eles secretam, e quando um deles fica preso nesta camada calcificada, é chamado de osteócito. Com o avanço da calcificação, espículas ósseas irradiam-se para fora da

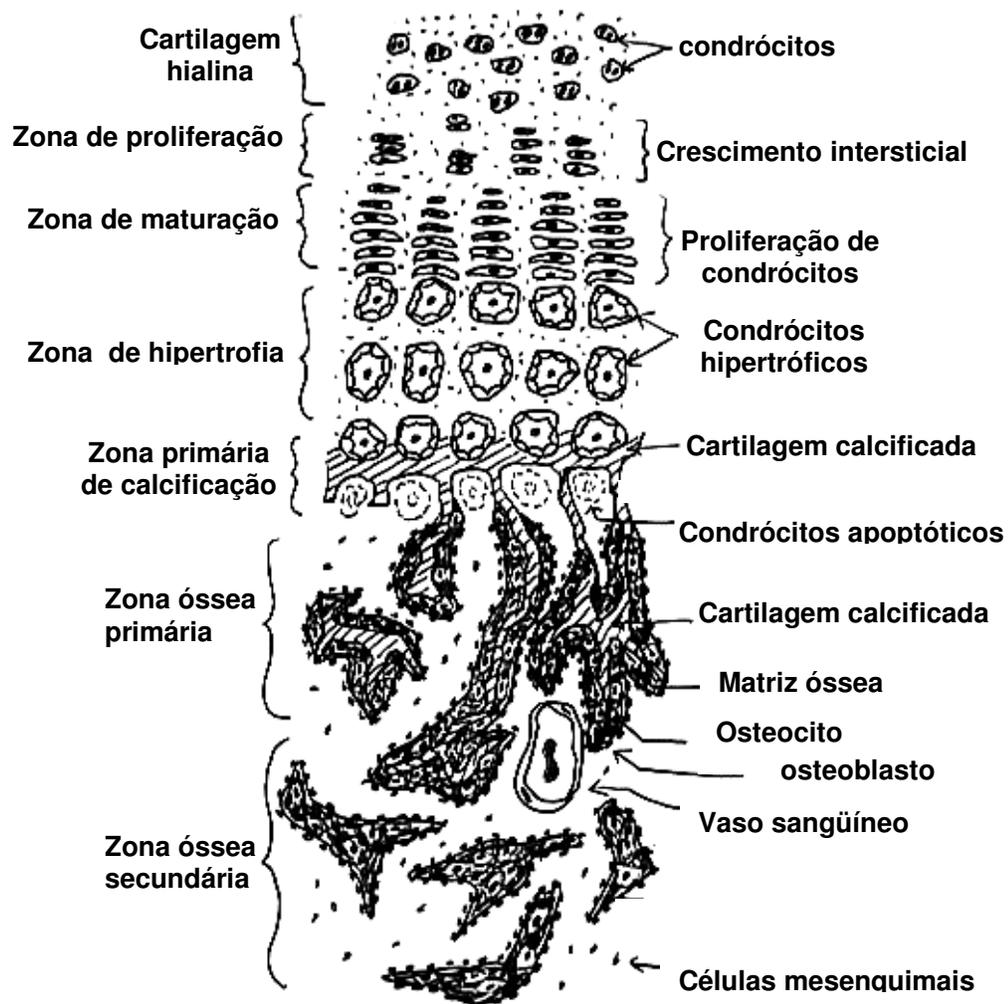
região inicial da ossificação. A zona de espículas calcificadas é rodeada por uma camada densa de células mesenquimais, que formam a membrana que envolve o osso, o periósteo. As células da superfície interna deste também se tornam osteoblastos, depositando matriz osteóide paralelamente às espículas existentes, resultando, assim, na formação de diversas camadas de osso. As proteínas morfogenéticas ósseas (“Bone Morphogenetic Proteins”, BMPs) e o fator de transcrição Runx2 participam neste tipo de ossificação. Particularmente, BMP2, BMP4 e BMP7 induzem, diretamente, a diferenciação osteoblástica de células mesenquimais. Tem sido demonstrado que estas proteínas ativam a expressão de Runx2, e que seu mRNA se encontra nas condensações de células mesenquimais, as quais formam osso (Ducy, Zhang *et al.*, 1997).



**Figura 1. Ossificação intramembranosa.**  
[www.udel.edu/biology/Wags/histopage/illuspage/icb/icb.htm](http://www.udel.edu/biology/Wags/histopage/illuspage/icb/icb.htm)

A ossificação endocondral (Figura 2) envolve a formação de cartilagem a partir de agregados de células mesenquimais e sua posterior substituição por osso. Este tipo de ossificação é dividido em cinco etapas. Primeiro as células mesenquimais diferenciam em condrócitos, liberando fatores parácrinos que induzem a expressão dos fatores de transcrição Pax1 e Scleraxis por parte das células mesenquimais (Cserjesi, Brown *et al.*, 1995; Sosic, Brand-Saberi *et al.*, 1997). Durante a segunda etapa, as células se condensam em nódulos, detectando-se a expressão do gene Sox9 nas condensações cartilaginosas. Na terceira etapa, os condrócitos proliferam aceleradamente, formando um modelo para o osso, e

durante sua divisão, secretam matriz celular de cartilagem. Na quarta etapa, estes condrócitos param de proliferar, aumentando seu volume celular e tornando-se condrócitos hipertróficos. Estas células alteram a composição da matriz que secretam, permitindo sua mineralização. Na última etapa, a cartilagem é invadida por vasos sangüíneos, ocorrendo a apoptose dos condrócitos hipertróficos (Rajpurohit, Mansfield *et al.*, 1999). Nos ossos longos, este tipo de ossificação começa no centro do osso e se espalha para as extremidades. As áreas cartilaginosas nas extremidades destes ossos são denominadas de placas de crescimento episeárias, as quais contêm três regiões: uma com condrócitos em proliferação, outra com condrócitos maduros e outra com condrócitos hipertróficos (Chen, Johnson *et al.*, 1995).



**Figura 2. Ossificação endocondral.**

[www.udel.edu/biology/Wags/histopage/illuspage/icb/icb.htm](http://www.udel.edu/biology/Wags/histopage/illuspage/icb/icb.htm)

### **1.1.2. Reabsorção e reparo ósseo.**

O tecido ósseo é um sistema dinâmico, portanto, mesmo no indivíduo adulto, já completamente formado, este tecido encontra-se metabolicamente ativo e a manutenção da matriz é, na realidade, o resultado de um balanço entre as atividades de síntese e de reabsorção óssea, as quais refletem, respectivamente, as atividades antagonistas de osteoblastos e osteoclastos (Hadjidakis e Androulakis, 2006). Este processo é determinado pela carga genética individual, sendo dependente de regulação endócrina, bioquímica e ambiental. A remodelação óssea

ocorre em quatro etapas distintas, ocorrendo, em primeiro lugar, a ativação dos pré-osteoclastos, que se diferenciam em osteoclastos maduros (etapa de ativação) e secretam prótons, acidificando a lacuna de reabsorção, o que causa a desmineralização do osso e expõe a matriz orgânica à ação de metaloproteinases (MMPs). Quando a cavidade atinge certa profundidade, a reabsorção cessa (inversão) e os pré-osteoblastos são recrutados para a cavidade óssea recém produzida. Sob a influência de hormônios e fatores de crescimento, estes pré-osteoblastos se diferenciam em osteoblastos, e preenchem a cavidade com novo osso. Portanto, o osso é continuamente destruído e reformado a fim de manter constante o volume ósseo e a homeostase de cálcio nos vertebrados (Teitelbaum, 2000). Apesar de ter uma grande capacidade regenerativa, em algumas situações, a resposta do organismo é insuficiente para o reparo completo de uma lesão, como em casos de lesões extensas, infecções (originadas de procedimentos incorretos, cistos ou doença periodontal), tumores e defeitos congênitos. Devido a esses fatores, inúmeros trabalhos têm procurado alternativas para auxiliar e/ou estimular a regeneração óssea, desenvolvendo, assim, diversos materiais osteosubstitutos e técnicas alternativas de tratamento (Rose e Oreffo, 2002; Gamradt e Lieberman, 2004).

O campo da Engenharia de Tecidos surgiu como consequência da combinação dos princípios de Engenharia, Química e Ciências Biológicas para o desenvolvimento de substitutos naturais que permitissem restaurar, manter ou melhorar a função dos tecidos (Nerem, 1992; Langer e Vacanti, 1993). As estratégias da Engenharia de Tecidos envolvem o uso de células isoladas para substituir funções específicas, substâncias que induzem a proliferação de células e tecidos (fatores de crescimento), ambas combinadas a matrizes, que atuam como

suportes (carreadores) para células ou proteínas. Muitos trabalhos têm sido publicados descrevendo o potencial da Engenharia de Tecidos aplicados ao reparo ósseo. Para que ocorra tal reparação, é fundamental a utilização de um arcabouço osteocondutor, para adesão e funcionamento das células osteoprogenitoras, bem como o uso de fatores de crescimento osteoindutores (Rose e Oreffo, 2002). Os fatores osteoindutores são caracterizados por sua habilidade em promover a formação óssea. A maioria destes fatores são citocinas, as quais são proteínas extracelulares ou peptídeos responsáveis pela sinalização celular.

### ***1.2. Fatores de crescimento relacionados à formação e reparo ósseo.***

Os fatores de crescimento com potenciais aplicações clínicas para serem utilizados em formação e reparo ósseo, e outros tecidos conectivos, podem ser agrupados quanto a suas atividades biológicas, incluindo as proteínas da superfamília “transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ )”, os fatores de crescimento semelhantes à insulina (“insulin-like growth factors”, IGFs), fator de crescimento derivado de plaquetas (“platelet-derived growth factor”, PDGF), fatores de crescimento fibroblásticos (“fibroblast growth factors”, FGFs) e o fator de crescimento epidermal (“epidermal growth factor”, EGF) (Long, 2001; Lieberman, Daluiski et al., 2002). A origem e as principais funções destas proteínas estão detalhadas na Tabela 1.

**Tabela 1. Origem e principais funções de fatores de crescimento relacionados ao reparo e formação óssea.**

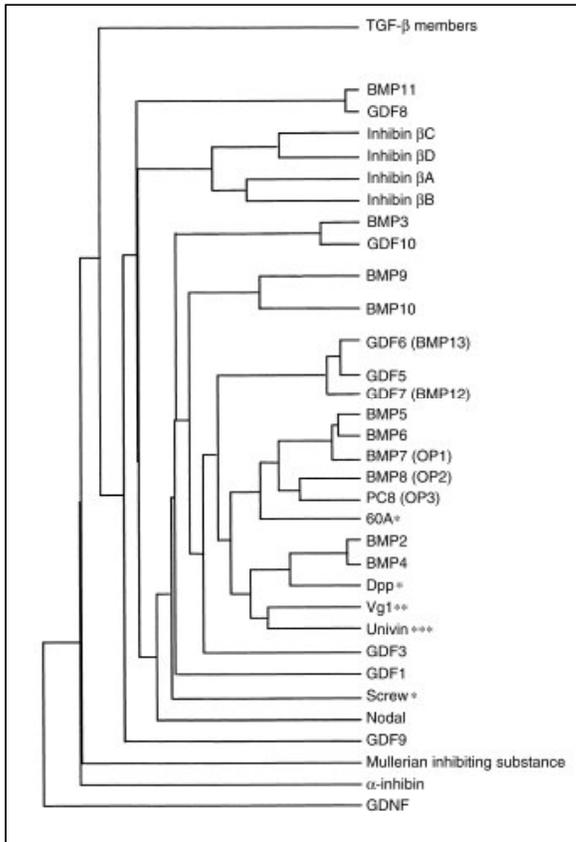
<b>Fator</b>	<b>Origem</b>	<b>Função principal</b>
TGF $\beta$	Matriz extracelular de cartilagem e osso; plaquetas.	Inicia diferenciação de células mesenquimais pluripotenciais. Produz proliferação de condro e osteoblastos; regula síntese de colágeno e proteoglicanas.
BMPs	Matriz extracelular de osso; osteoblastos; osteoprogenitores.	Inicia formação óssea pela diferenciação de células mesenquimais pluripotenciais em condro e osteoblastos; inicia diferenciação de osteoprogenitores em osteoblastos; influencia diversos aspectos durante “patterning” no esqueleto e desenvolvimento.
IGFs	Condrócitos, osteoblastos, matriz extracelular óssea.	Induzem proliferação e diferenciação de osteoprogenitores.
PDGF	Plaquetas, células endoteliais, monócitos.	Estimula a proliferação de osteoblastos e condrócitos; atua como mitógeno em osteoblastos e células mesenquimais; é um fator quimiotático para macrófagos.
FGFs	Osteoblastos, condrócitos, macrófagos, células mesenquimais.	Estimulam crescimento de osteoblastos, condrócitos e células mesenquimais; estimulam diferenciação de células pluripotentes; participam em angiogenese.
EGF	Células epiteliais e fibroblastos.	Induz o desenvolvimento de células endoteliais; estimula angiogenese.

O conhecimento do papel destes fatores de crescimento no desenvolvimento do esqueleto e de outros tecidos e órgãos abre caminho para utilizar estas proteínas no tratamento de diversas doenças que estejam relacionados ao reparo de tecidos, fraturas, entre outros. Por exemplo, no reparo ósseo em fraturas, tem sido proposto que este processo reflete o fenômeno de ossificação endocondral que acontece durante a embriogênese, sendo isto confirmado por diversas evidências, que dirigem esforços para o estudo e utilização destas proteínas no reparo ósseo (Linkhart, Mohan *et al.*, 1996; Le, Miclau *et al.*, 2001). Das proteínas mencionadas na Tabela 1, particularmente as BMPs, têm, atualmente, um importante potencial biotecnológico e terapêutico, relacionado principalmente, ao reparo ósseo e dental. As principais características destas proteínas são detalhadas a seguir.

## **1.2.1. “Bone Morphogenetic Proteins”, BMPs.**

### **1.2.1.1. Características principais.**

As BMPs (Figura 3), membros da superfamília de proteínas TGF- $\beta$  (“Transforming Growth Factor  $\beta$ ”), são muito conservadas, e desempenham um papel crítico na diferenciação de células de origem mesenquimal em osteoblastos, regulando o crescimento e a diferenciação de uma variedade de tipos celulares em diversos tecidos (Cook e Rueger, 1996; Sakou, 1998; Wozney, 1998). As BMPs 2 a 15 pertencem à superfamília TGF $\beta$ , com a exceção de BMP1 (Ducy e Karsenty, 2000), sendo algumas delas osteoindutoras. Dentro da superfamília, as BMPs podem ser subdivididas em subgrupos de acordo com a identidade entre suas seqüências. Assim, por exemplo, a BMP2 e a BMP4 compartilham um 80% de homologia entre si, enquanto que BMP5, BMP6 e BMP7 cerca de 78% (Rengachary, 2002; Walker e Wright, 2002).



**Figura 3. Proteínas da superfamília TGFβ, (Ducy e Karsenty, 2000).**  
 \**Drosophila*, \*\**Xenopus* e \*\*\* ouriço do mar.

**Figura 3. Proteínas da superfamília TGF β**

O foco da maioria dos estudos clínicos feitos com estas BMPs relaciona-se com sua habilidade em induzir a condro-osteogênese “*in vivo*” (Helm, Alden *et al.*, 2000), tendo relação direta com o histórico destas proteínas, que começou em 1889, quando foi demonstrado que ossos descalcificados podiam induzir reparo ósseo, e na década de 1930, foi reconhecido o fenômeno ao se injetar extrato alcoólico de osso cru em tecido muscular, obtendo-se formação óssea de novo (Rengachary, 2002). Quase 30 anos depois, a denominação BMP foi proposta por Urist (Urist, 1965) que demonstrou que extratos de ossos desmineralizados podiam induzir formação de osso “de novo” em sítios ectópicos, quando implantados em ratos (Urist, Iwata *et al.*, 1973; Urist, Mikulski *et al.*, 1979). Este mesmo grupo isolou destes extratos uma glicoproteína de baixo peso molecular, que era capaz de induzir a formação óssea. A clonagem dos primeiros genes que codificam BMPs se deu no fim da década de 80 (Wozney, Rosen *et al.*, 1988; Celeste, Iannazzi *et al.*, 1990) e, até o momento, 15 membros dessa família foram descritos. O estudo das diferentes BMPs tornou evidente que seu padrão de expressão, bem como sua função biológica, não estão restritos ao desenvolvimento do esqueleto. Outras funções foram identificadas como: proliferação e diferenciação celular, apoptose, morfogênese, “patterning” de vários órgãos, incluindo o esqueleto e a organogênese (Graff, 1997; Ebendal, Bengtsson *et al.*, 1998; Wozney, 1998).

As BMPs são sintetizadas como moléculas precursoras que variam entre 400 e 500 aminoácidos, sendo, posteriormente, clivadas proteoliticamente, por uma convertase semelhante à subtilisina (“subtilisin-like convertase”, SCPs), na seqüência consenso Arg-X-X-Arg, produzindo a proteína madura. Posteriormente, é formado um dímero composto por duas moléculas unidas por uma ponte dissulfeto intermolecular, o qual é secretado como uma proteína que varia entre 100-140

aminoácidos (dependendo da BMP), ainda que existam algumas evidências que sugerem que a proteína precursora pode ser secretada antes de ser clivada (Gregory, Ono *et al.*, 2005). As seqüências aminoacídicas variam, mas sete cisteínas estão conservadas em cada subtipo de BMP. Após a secreção, as BMPs dimerizadas através de uma simples ponte dissulfeto, que pode ser formada pela homodimerização ou heterodimerização dos monômeros, interagem com receptores serina/treonina quinase específicos; tipo I e II (Rengachary, 2002; Granjeiro, Oliveira *et al.*, 2005). A cascata de sinalização (Figura 4) começa quando a BMP se une ao receptor Tipo II, que é uma quinase constitutivamente ativa capaz de fosforilar o receptor do Tipo I, o qual, por sua vez, catalisa a fosforilação do resíduo de serina, localizado na extremidade carboxila das proteínas da família SMAD. A proteína SMAD fosforilada associa-se à co-SMAD, transloca-se ao núcleo, onde, associada a fatores de transcrição, como por exemplo Runx2, ativa os diversos genes alvos (Yamaguchi, Komori *et al.*, 2000; Walker e Wright, 2002).

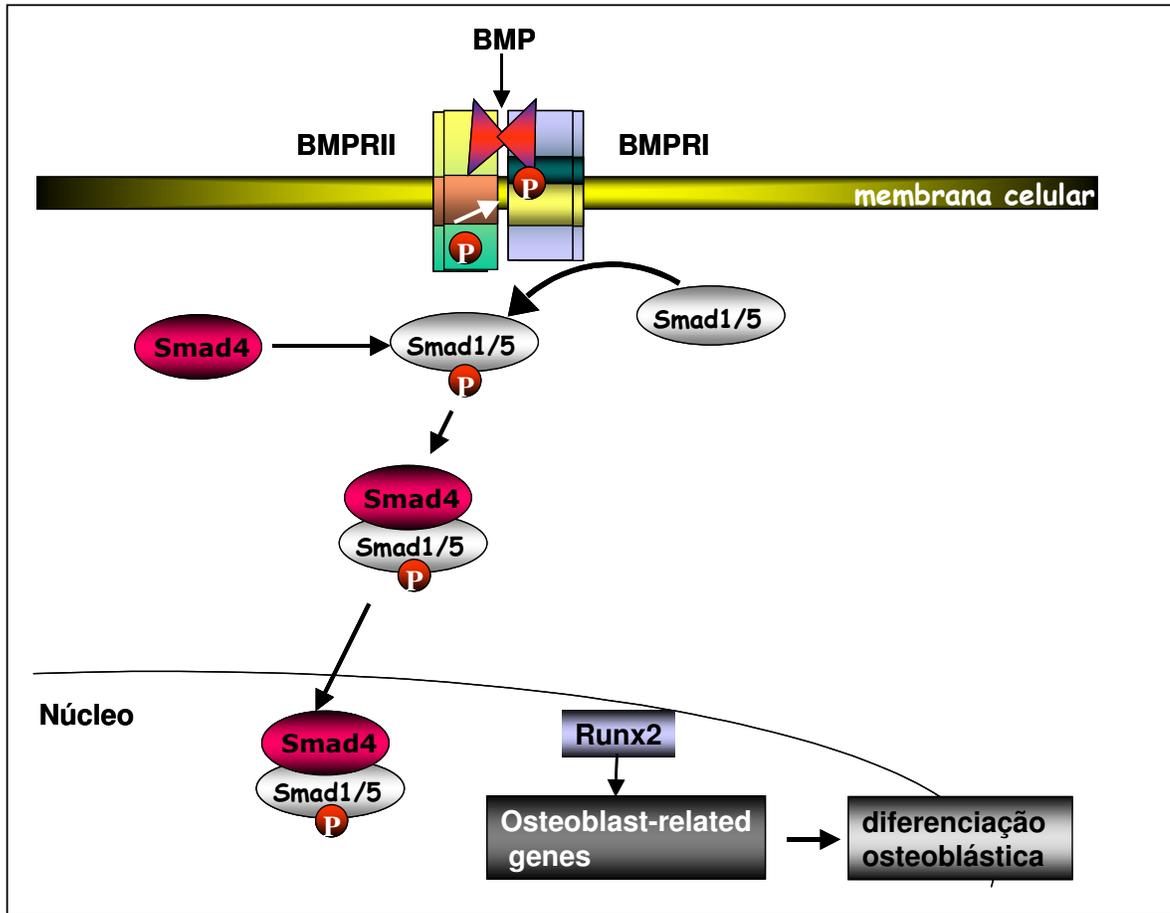


Figura 4. Sinalização intracelular induzida por BMPs

#### 1.2.1.2. Regulação do sinal de BMPs.

A modulação dos distintos tipos de sinais entre células é chave durante o desenvolvimento. Por isto, o sinal gerado por BMPs é regulado, intracelularmente, e extracelularmente. No citoplasma, SMADS inibitórias e Smurfs atuam modulando negativamente o sinal (Von Bubnoff e Cho, 2001). Extracelularmente, existem moléculas antagonistas que modulam a concentração de BMPs biologicamente ativas, inibindo as interações com seus receptores (Barth, Kishimoto *et al.*, 1999; Liem, Jessell *et al.*, 2000; Hama e Weinstein, 2001). Um aumento do número destes antagonistas tem sido identificados em vertebrados e invertebrados. Em vertebrados, a lista de antagonistas de BMPs contem sete

proteínas que incluem; “noggin”, “chordin”, “chordin-like”, “follistatin”, “FSRP”, “DAN/Cerberus” e “sclerostin”. Em vertebrados e invertebrados, outros fatores como metaloproteinases secretadas, incluindo *Drosophila* Tolloid (Tld), *Xenopus* Xolloid (Xol), e BMP1 humana, através de suas atividades proteásicas, modulam positivamente o sinal gerado por BMPs/Dpp-screw (Dpp ortólogo de BMP2/4, screw ortólogo de BMP5-8, e sog ortólogo de chordin em *Drosophila*), antagonizando a atividade de chordin/sog, (Yanagita, 2005). Um outro fator extracelular, chamado tsg (“twisted gastrulation”), conservado entre vertebrados e invertebrados, modifica as interações entre chordin/sog e BMP/dpp-screw, formando-se, assim, um complexo ternário que aumenta a inibição da atividade de BMP/dpp-screw (Oelgeschlager, Larrain *et al.*, 2000; Ross, Shimmi *et al.*, 2001; Scott, Blitz *et al.*, 2001).

#### **1.2.1.3. Indução da formação óssea.**

Os estudos feitos com BMPs para promover a indução de osso “*in vivo*” demonstraram que as BMPs-2, -4, -5, -6 -7 e -9 humanas recombinantes têm o potencial de iniciar a cascata de osteoindução. BMP2 induz formação de osso ectópico e de cartilagem quando implantada em tecido muscular “*in vivo*” (Reddi, 1994; Hogan, 1996) e estimula a diferenciação de células mesenquimais a osteoblastos “*in vitro*” (Nishimura, Kato *et al.*, 1998). BMP7 também é implicada na formação do tecido ósseo, tendo sido demonstrado que camundongos “knockout” para esta proteína, apresentam diversas anomalias esqueléticas (Helm, Alden *et al.*, 2000). Ambas BMPs são extensamente usadas em ensaios de diferenciação a osteoblastos “*in vitro*”. Entretanto, apesar de alguns estudos de diferenciação osteoblástica induzida por BMPs, utilizando diversos modelos celulares, mostrarem algumas evidências de genes regulados por estas proteínas (Locklin, Riggs *et al.*, 2001; Vaes, Dechering *et al.*, 2002; Balint, Lapointe *et al.*, 2003; Gu, Zhang *et al.*,

2004; Vaes, Dechering *et al.*, 2005), o mecanismo molecular responsável pelos efeitos das BMPs na diferenciação destas células a osso ou cartilagem, não está totalmente elucidado, sendo necessário aprofundar este tipo de análise para compreender com maiores detalhes este processo celular.

#### **1.2.1.4. Obtenção, produção e utilização de BMPs em reparo ósseo.**

As BMPs podem atuar em doses baixas nos tecidos, da ordem de nanogramas ou microgramas. No entanto, para se isolar alguns microgramas de BMPs, são necessários kilogramas de matriz óssea desmineralizada. A purificação das BMPs é feita por diversas metodologias, mas o rendimento é baixo, e o isolamento de uma BMP em particular, resulta num rendimento ainda mais baixo (Gao, Lindholm *et al.*, 1996). As pequenas quantidades de BMPs obtidas que resultam deste tipo de purificação, obrigam a busca de outra estratégia que permita obter maiores quantidades de proteínas. Esta estratégia é a clonagem e expressão dos respectivos cDNAs que codificam estas proteínas. Assim, atualmente, todos estes cDNAs, têm sido clonados tanto para análises funcionais como para a produção de rhBMPs, para serem utilizadas terapêuticamente. Embora uma simples rhBMP seja capaz de induzir formação óssea ectópica (Wang, Rosen *et al.*, 1988), é interessante notar que a quantidade de rhBMP necessária para induzir osso "*in vivo*", é 10 vezes maior, quando comparada à BMP altamente purificada, extraída de bovinos. Bessho e colaboradores, demonstraram esta diferença no efeito entre a BMP purificada humana derivada da matriz óssea e a BMP humana recombinante (Bessho, Kusumoto *et al.*, 1999). Este fato sugere que a ação da BMP nativa resulta da combinação da atividade de diferentes BMPs ou representa efeitos sinérgicos entre elas (Tuominen, Jamsa *et al.*, 2001). Apesar disto, devido ao baixo rendimento

obtido em purificações a partir de osso, como já foi mencionado, a produção de rhBMPs parece ser, por enquanto a melhor alternativa.

#### **1.2.1.5. Utilização de rhBMP2 e rhBMP7 comerciais em reparo ósseo.**

Foi demonstrado que rhBMP7 estimula a síntese de colágeno e diferenciação de osteoblastos. Estudos utilizando modelos animais, mostram que esta proteína tem a capacidade de induzir ossificação endocondral em falhas osteoperiostais segmentais (Sampath, Rashka et al., 1993). Em outubro de 2001, o FDA (“Food and Drug Administration”, [www.fda.gov](http://www.fda.gov)), aprovou o uso, em humanos, de rhBMP7 (rhOP-1), no tratamento de fusão espinhal, ortopedia e odontologia (OP-1 Implant, Stryker Biotech, Hopkinton, MA, <http://www.op1.com>). O implante rhOP-1 é incorporado a um carregador composto de colágeno, o qual é seguro e efetivo para liberar esta proteína no osso, permitindo o reparo de lesões (<http://www.stryker.com/en-us/products/Orthobiologicals/Osteoinductive/OP-1/OP-1Putty/index.htm>).

Em janeiro de 2002, a FDA aprovou o uso de rhBMP2 ligada a uma esponja de colágeno absorvente (“Absorbable Collagen Sponge”, ACS) num aparelho de metal, para sua aplicação em humanos, no tratamento de fusão espinhal lombar (InFUSE™ Bone Graft + LT-CAGE™ Lumbar Tapered Fusion Device, Medtronic Sofamor Danek, Warsaw, IN). Posteriormente, em novembro do mesmo ano, a FDA recomendou a aprovação do uso de rhBMP2 no carregador ACS (rhBMP2/ACS), com o nome InductOSTM (Wyeth Pharmaceuticals, [www.wyeth.com](http://www.wyeth.com)). A aprovação final da FDA está pendente.

Algumas características comerciais destas proteínas (rhBMP2 e rhBMP7) são resumidas na Tabela 2.

**Tabela 2. Características comerciais de rhBMP2 e rhBMP7 utilizadas terapeuticamente em humanos.**

<b>Proteína</b>	<b>Efeito potencial Indicações aprovadas pela FDA</b>	<b>Forma disponível</b>	<b>Nome Comercial</b>	<b>Custo/unidade</b>
rhBMP2 (diboterminalfa)	Osteoindução para o tratamento da não união óssea de fraturas	Proteína recombinante humana em colágeno (carregador)	InductOS™ (Wyeth Pharmaceuticals)	Não disponível
rhBMP2	Osteoindução para o aumento da fusão espinhal lumbar	4.2mg rhBMP2 em matriz de colágeno	InFUSE™ Bone Graft/LT-CAGE™ (Medtronic Sofamor Danek)	Enxerto/ACS \$3.500 "Fusion cage" \$3.530
rhBMP7 (rh-OP1)	Indução de osteogênese em não uniões de ossos longos	2.5mg rhOP1/1g colágeno I bovino	OP-1 Implant™ (Stryker Biotech)	\$5.200

**1.2.1.6. Resumo das aplicações clínicas de rhBMP2 e rhBMP7.**

A Tabela 3 resume as publicações em Pubmed relacionadas a ensaios clínicos (CT), ensaios clínicos aleatórios (RCT) e meta-análises (MA), enfatizando as aplicações clínicas de rhBMP2 e rhBMP7 (rhOP-1) em humanos.

**Tabela 3. Publicações relacionadas a aplicações clínicas de BMPs em humanos. Ensaio clínico (CT), ensaio clínico aleatório (RCT) e meta-análises (MA), extraída de (Granjeiro, Oliveira et al., 2005).**

Type	Author	Objective	Sample size	Recommend BMP use?
RCT	Haid Jr. et al. (35)	rhBMP-2 on anterior lumbar interbody fusion	67	Yes
CT	Kuklo et al. (36)	BMP on transforaminal lumbar interbody fusion	22	Yes
CT	Lanman and Hopkins (37)	rhBMP-2 on transforaminal lumbar interbody fusion	43	Yes
CT	Mummaneni et al. (38)	BMP on transforaminal lumbar interbody fusion	40	Yes
RCT	Baskin et al. (39)	rhBMP-2 for the treatment of human cervical disc disease	33	Yes
RCT	Burkus et al. (40)	rhBMP-2 on anterior lumbar interbody fusion	42	Yes
RCT	Jung et al. (41)	rhBMP-2 on lateral ridge augmentation	11	Yes
MA	Giannobile and Somerman (42)	Growth and amelogenin-like factors in periodontal wound healing A systematic review	511	Partially
MA	Burkus et al. (43)	Is INFUSE bone graft superior to autograft bone? An integrated analysis of clinical trials using the LT-CAGE lumbar tapered fusion device	679	Yes
RCT, MC	Boden et al. (44)	rhBMP-2 on lumbar arthrodesis	25	Yes
RCT, MC	Burkus et al. (45)	BMP (INFUSE bone graft) on lumbar interbody fusion	46	Yes
RCT, MC	Groeneveld and Burger (46)	rhBMP-2 on open tibial fracture	450	Yes
MA	Salata et al. (47)	Recent outcomes and perspectives of the application of bone morphogenetic proteins in implant dentistry		Insufficient data
RCT, MC	Friedlaender et al. (48)	OP-1 (BMP-7) in the treatment of tibial nonunion	122	Yes
CT	Cochran et al. (49)	(rhBMP-2) loaded in an absorbable collagen sponge for alveolar ridge augmentation	12	Yes
CT, MC	Schedel et al. (50)	rhBMP-2 to treat avascular necrosis of the femoral head	6	Yes
CT	van den Bergh et al. (51)	OP-1 in sinus floor elevation	6	Partially
RCT	Geesink et al. (52)	OP-1 in tibial osteotomy	24	Yes
CT	Boyne et al. (53)	rhBMP-2/absorbable collagen sponge for maxillary sinus floor augmentation	12	Yes
CT, MC	Howell et al. (54)	rhBMP-2/absorbable collagen sponge device for local alveolar ridge preservation or augmentation	12	Yes

Da Tabela 3, é possível concluir que, na maioria dos casos, as duas proteínas recombinantes rhBMP2 e rhBMP7, mostram efetividade em diversas anomalias e defeitos associados, principalmente, com Ortopedia e Odontologia.

Devido à transcendência desta família de proteínas na diferenciação de osteoblastos, é necessário um maior conhecimento das bases celulares e moleculares das vias ativadas pelas BMPs, durante o transcurso deste processo. Por outro lado, a viabilização da produção comercial destas proteínas, representa um grande desafio que permitiria, no futuro, a utilização de rhBMP2 e rhBMP7 em reparo de tecidos, fundamentalmente em Odontologia e Ortopedia.

Neste estudo se detalha, por um lado, a análise da expressão diferencial durante a diferenciação osteoblástica de células C2C12 induzidas a diferenciar por tratamento com rhBMP2 e rhBMP7 comerciais, através de microarranjos de DNA e

qPCR, para assim, identificar os genes que participam deste processo e associá-los com antecedentes presentes na literatura que permitam compreender, com maiores detalhes, os mecanismos moleculares durante a osteodiferenciação induzida por estas proteínas. Outro enfoque foi o isolamento e a clonagem dos cDNAs correspondentes à hBMP2 e hBMP7, a super-expressão de rhBMP2 e rhBMP7 em células de mamíferos, e a capacidade osteindutiva destas proteínas, que representam os primeiros passos de muitos, com o objetivo de comercializar estas proteínas para seu futuro uso terapêutico no Brasil.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. *Objetivos gerais:*

- a) Identificação dos genes diferencialmente expressos durante a osteodiferenciação das células C2C12 tratadas com rhBMP2 e rhBMP7 comerciais.
- b) Super-expressão e produção de rhBMP2 e rhBMP7 em diversos sistemas de expressão heteróloga.

### 2.2. *Objetivos específicos:*

- a) Identificar, através de microarranjos de DNA (Codewalk), os genes diferencialmente expressos durante a osteodiferenciação de células C2C12 tratadas com rhBMP2 e rhBMP7 comerciais.
- b) Confirmar, por qPCR, os resultados obtidos após análise dos microarranjos, utilizando-se RNA extraído de células tratadas com rhBMP2 e rhBMP7 comerciais.
- c) Clonar os cDNAs codificantes correspondentes à hBMP2 e hBMP7.
- d) Subclonar os cDNAs de hBMP2 e hBMP7 em diversos vetores de expressão heteróloga.
- e) Super-expressar rhBMP2 e rhBMP7 em células de mamíferos (HEK 293T e CHO DG44).
- f) Analisar a super-expressão de rhBMP2 e rhBMP7 através de “Western blot”.
- g) Realizar a análise funcional “*in vitro*” e “*in vivo*” de rhBMP7 presente no meio de cultura de células HEK293T estavelmente transfectadas com o vetor de expressão pCMV-hBMP7-IRES-EGFP.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS.**

#### ***3.1. Plasmídeos.***

**pENTR2B:** vetor de clonagem comercial (Invitrogen)

**pTK-Hyg:** vetor que contém o gene que confere resistência a higromicina, utilizado em co-transfecções em células de mamíferos (Clontech).

**pCMV-IRES-EGFP:** vetor de expressão lentiviral para células de mamíferos, modificado a partir do vetor pCMV cedido pelo Dr. Ricardo Correa.

#### ***3.2. Soluções para cultura de bactérias.***

Meio líquido de cultura SOC: 2% triptona, 0,5% extrato de levedura, 10mM NaCl, 2,5mM KCl, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 20mM MgSO<sub>4</sub>, 20mM glicose.

Meio LB (Luria-Bertani): Triptona 10 g/L; extrato de levedura 5 g/L; NaCl 10 g/L (pH 7,5).

LB-ágar: meio LB com 1,5 g/L de ágar (Difco, Merck, Gibco-BRL)

#### ***3.3. Cultura de bactérias.***

Bactérias (DH10B ou XLB1) foram crescidas em meio LB (líquido) ou meio LB-ágar (sólido) contendo 100µg/mL de ampicilina ou 50µg/mL de kanamicina à 37°C. No caso do crescimento em meio líquido, utilizou-se um agitador orbital e, para o crescimento em meio sólido, uma estufa.

#### ***3.4. Preparação de estoques glicerinados.***

Três mL de uma suspensão de bactérias foram crescidas durante a noite em meio líquido e sedimentadas por centrifugação a 20.000g. O “pellet” foi ressuspenso em

500µL de meio LB e foram adicionados 500µL de glicerol estéril. Os estoques glicerinados foram armazenados à -70 °C.

### ***3.5. Linhagens celulares.***

**HEK293T:** linhagem humana do epitélio renal transformada com o antígeno LT do vírus SV40.

**C2C12:** Número ATCC CRL-1772™, linhagem de camundongo que se diferencia em célula muscular. O tratamento com rhBMP2 ou rhBMP7 inibe esta diferenciação, induzindo diferenciação osteoblástica.

### ***3.6. Soluções e meios de cultura para células de mamíferos.***

Meios de cultura: DMEM (“Dulbecco’s Modified Eagle Medium”,

α-MEM (Invitrogen)

Soro fetal bovino HyClone

Solução salina: PBSA (“Phosphate Buffered Saline” – sem cálcio ou magnésio), solução salina tamponada pH 7,2, composta por 140mM NaCl, 2,7mM KCl, 8mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> e 1,5mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.

Tripsina: solução 0,1% de tripsina (Gibco) em PBSA contendo 1mM EDTA.

### ***3.7. Soluções.***

Todas as soluções utilizadas foram feitas a partir de reagentes de grau de pureza para análise, segundo formulações descritas em manuais de laboratório (Sambrook, Fritsch et al., 1989; Ausubel, Brent et al., 1999).

### ***3.8. Ensaio de osteodiferenciação induzida por rhBMP2 e rhBMP7 utilizando células de cordão umbilical humano.***

Células mesenquimais de cordão umbilical humano, preparadas pelo doutorando Fernando Lojudice, do nosso laboratório, foram semeadas numa densidade de 20.000 céls/cm<sup>2</sup>, em meio  $\alpha$ -MEM 10% SFB. No dia seguinte, as culturas foram lavadas com PBSA e, em seguida, foi adicionado meio de cultura contendo (ou não), 300ng/ml de rhBMP2 (R&D Systems) ou 300ng/ml rhBMP7 (R&D Systems). O meio foi trocado a cada 3-4 dias, quando as culturas foram examinadas e documentadas sob microscopia de fase.

### ***3.9. Coloração de Von Kossa.***

As culturas, não tratadas ou tratadas com as rhBMPs do item 3.8, foram analisadas através da coloração de von Kossa, que permite identificar matriz extracelular mineralizada. No dia 11, após o início do tratamento, as células foram lavadas com PBSA e fixadas (90% etanol, 10% formol) durante 10min. Em seguida, foram lavadas por 10min com PBSA e, então, foi adicionada uma solução 5% de nitrato de prata, deixando-se sob luz UV durante 30min. Posteriormente, foi adicionada uma solução 5% de hipossulfito de sódio, incubando-se por 3min. Após este período, foi adicionada uma solução 10% de safranina, deixando-se por 10min. Após lavar as culturas com PBSA, estas foram examinadas e documentadas sob microscopia de fase.

**3.10. Ensaio de osteodiferenciação induzida por rhBMP2, e rhBMP7 comerciais em células C2C12.**

Células C2C12 foram semeadas numa densidade de 20.000 céls/cm<sup>2</sup>, em placas de 12 poços em meio D-MEM, 10% soro fetal bovino (Hyclone), e incubadas a 37°C, 2% CO<sub>2</sub>. No dia seguinte, as culturas foram lavadas com PBSA e, em seguida, foi adicionado meio de cultura 5% soro contendo (ou não), 200ng/ml de rhBMP2 (R&D Systems) ou 200ng/ml de rhBMP7 (R&D Systems). As células foram mantidas em cultura durante 14 dias, sendo o meio (contendo ou não rhBMPs) trocado cada 3 ou 4 dias.

**3.11. Ensaio de atividade de fosfatase alcalina de células C2C12 tratadas com rhBMP2 e rhBMP7 comerciais.**

Células C2C12 foram semeadas e tratadas da mesma forma que se indica acima, com a diferença que foram tratadas durante 17 dias com rhBMPs. O meio de cultura contendo ou não as proteínas, foi trocado a cada 3 ou 4 dias. Nos dias 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 14, 17 do tratamento, as células foram coletadas e lisadas no tampão de lise (0,5M Tris pH 9,0, 0,9%NaCl e 1% Triton X-100) sendo cada amostra centrifugada a 12.000g durante 15min. Posteriormente, 10µl de cada lisado celular foram misturados com 80µl de uma solução contendo 25mM glicina pH 9,4, 2mM MgCl<sub>2</sub> e 1mM p-nitrofenilfosfato e a reação foi incubada durante 30min a 37°C. Em seguida, foram adicionados 10µl de 0,5M NaOH e realizou-se a leitura da absorbância a 405nm. Paralelamente, foi quantificada a proteína total pelo método de Bradford (1976), o qual se inicia pela adição de 1-2µl de lisado a uma mistura de 0,2mL do Reagente de Bradford com 0,8mL de água Milli-Q. Como padrão, utilizou-se albumina de soro bovino (BSA), sendo efetuadas

as respectivas leituras da absorbância a 595nm. A atividade enzimática foi expressada como nmol pNF/min/mg proteína.

### **3.12. Coleta dos RNAs totais das células C2C12 tratadas com rhBMP2 e hBMP7 comerciais.**

Células C2C12 (pré-mioblasto de camundongo, ATCC CRL-1772), foram semeadas numa densidade de 20.000 céls/cm<sup>2</sup>, em placas P60 em meio D-MEM, 10% soro fetal bovino (Hyclone), e incubadas a 37°C, 2% CO<sub>2</sub>. No dia seguinte, as culturas foram lavadas com PBSA e, em seguida, foi adicionado meio de cultura 5% soro contendo (ou não), 200ng/ml de rhBMP2 ou 200ng/ml de rhBMP7. As células foram coletadas após; 0, 4, 8, 12 e 24h para extração do RNA total com o kit RNAeasy (Qiagen). A concentração de RNA foi determinada pela absorbância das preparações a 260nm, utilizando-se como valor padrão 1Abs260 nm= 40µg/mL de RNA. Todas as medidas de absorbância realizadas nesta Tese foram feitas em espectrofotômetro de nanovolume (Nanodrop). O grau de pureza da preparação foi estimado pela relação Abs260nm/Abs280nm, considerando-se, como pureza satisfatória, uma relação próxima de 2,0

### **3.13. Preparação do cRNA para hibridização com os bioarranjos de DNA (Codelink).**

A preparação de cada cRNA foi feita conforme descrito no manual, Amersham Codelink<sup>TM</sup> iExpress Assay Reagent Kit. Brevemente, as amostras contendo 1,5µg de cada RNA correspondente ao tempo 12h de tratamento com cada rhBMP, foram misturadas com 7,5µl de mRNAs bacterianos (10pg/µl), 1µl do “primer” oligo dT, num volume final de 12µl. Cada reação foi incubada à 70°C

durante 10min e mantida em gelo por 3min. Posteriormente, foram adicionados, a cada tubo, 2µl de 10X FSB (First Strand Buffer), 4µl 5mM dNTPs, 1µl inibidor de RNase e 1µl ArrayScript num volume final de 20µl. Cada reação foi incubada à 42°C durante 2h. Após este período, cada tubo foi colocado em gelo e foi adicionado a cada um deles; 63µl água Milli-Q, 10µl 10X SFB (Second Strand Buffer), 4µl 5mM dNTPs, 2µl DNA polimerase e 1µl RNaseH. Em seguida, as reações foram incubadas à 16°C durante 2h. Após a síntese da segunda fita de cDNA, procedeu-se a purificação de cada cDNA como é descrito no manual citado. A 20µl de cada amostra de cDNA purificada foi adicionado: 12µl de Biotina-NTP “mix”, 4µl 10X T7 Tampão reação e 4µl 10X “Enzyme Mix”. Cada reação foi incubada à 37°C durante 14h. Após a síntese de cRNA biotilado, cada um deles foi purificado de acordo o manual citado, e alíquotas de 10µg foram armazenadas à -80°C para sua posterior hibridização nos bioarranjos de DNA (Codelink Mouse Whole Genome).

#### **3.14. Hibridização dos cRNAs aos bioarranjos de DNA.**

10µg de cada cRNA biotilado foram misturadas com 5µl de tampão de fragmentação num volume final de 25µl. Cada tubo foi incubado à 94°C durante 20min e, em seguida, mantido em gelo durante 5min. Posteriormente, 25µl de cada reação foram transferidos para outro tubo contendo 78µl de tampão de hibridização A, 130µl de tampão de hibridização B, 27µl de água Milli-Q. Cada tubo foi agitado e a reação foi incubada à 90°C por 5min. Em seguida, cada tubo foi colocado em gelo e cada amostra foi aplicada no seu respectivo bioarranjo de DNA. As etapas posteriores de hibridização, lavagem e análise das lâminas foram feitas conforme

detalhado no manual Codelink Gene Expression System: Single-Assay Biarray Hybridization and Detection.

### **3.15. Análise dos resultados da hibridização dos bioarranjos de DNA.**

Para a análise das intensidades obtidas nos bioarranjos de aproximadamente 36.000 seqüências gênicas de cada amostra, os dados foram normalizados utilizando-se o método SVR (Support Vector Regression), (Fujita, Sato *et al.*, 2006; Fujita, Sato, Garay-Malpartida *et al.*, 2007), implementado no “GEDi toolbox” (Fujita, Sato, Ferreira *et al.*, 2007). Maiores informações sobre este método de normalização de dados se encontram na página (<http://mariwork.iq.usp.br/gedi/>). Brevemente, SVR é uma regressão não-paramétrica como Loess, no entanto, tem uma maior precisão que o método de Loess, portanto, é uma ferramenta mais útil para identificar genes diferencialmente expressos. A identificação de possíveis genes com expressão diferencial foi obtida selecionando-se os genes com a razão rhBMP(2 ou 7)/controle maior que 2,5. Considerando-se que não se dispõem de uma quantidade suficiente de bioarranjos para fazer estatística com os dados obtidos, pode ser utilizada esta metodologia que compara a razão entre o tratamento/controle das intensidades previamente normalizadas (Pugazhendhi, Sadler *et al.*, 2007). Os genes induzidos e reprimidos pelo tratamento das células C2C12 com rhBMP2 e rhBMP7 foram classificados de acordo com suas funções através do programa FatiGO (<http://fatigo.bioinfo.cipf.es/>).

### **3.16. Confirmação dos transcritos selecionados por PCR quantitativo (qPCR).**

A confirmação da expressão diferencial das seqüências selecionadas através da análise dos dados dos bioarranjos, foi realizada por PCR quantitativo (qPCR). Foram desenhados “primers” das seqüências em questão com o programa Primer Express versão 2.0 (Applied Biosystems), utilizando-se os seguintes parâmetros: amplificação de um fragmento de aproximadamente 150 pb, conteúdo de GC entre 30 e 80%, que não apresentasse a formação de estruturas secundárias, temperatura de anelamento entre 58 e 60°C (de acordo com o algoritmo “nearest neighbor” (Breslauer, Frank *et al.*, 1986). Além disso, para evitar uma eventual co-amplificação de DNA genômico que pudesse estar contaminando a amostra, sempre que possível, os pares de “primers” foram desenhados em diferentes exons dos transcritos.

### **3.17. Síntese de cDNA.**

Os cDNAs das linhagens (ou tecidos) a serem testados foram sintetizados por transcrição reversa como descrito: 1µg do RNA total de interesse foi submetido a tratamento prévio com 2µL de DNase I (1U/µL Fermentas) no tampão adequado, incubando-se por 20min à 37°C. Para a inativação da enzima, a amostra foi incubada a 75°C por 10min. Posteriormente, cada amostra foi incubada com 0,5µg de pd(T)<sub>12,18</sub> 5'-PO<sub>4</sub> Na + Salt (Amersham-Bioscience), 1µg de random “primer” (hexameros, Invitrogen), 1mM de uma mistura contendo os nucleotídeos trifosfato de adenosina, guanosina, timidina e citosina à 75°C por 5min e colocados imediatamente em gelo. Adicionou-se o tampão de síntese da primeira fita (“First Strand Buffer” 5X – 250mM Tris-HCl pH 8,3, 375mM KCl e 15mM MgCl<sub>2</sub>; Invitrogen)

a uma concentração final de 1X, 10mM de DTT, 20U de RNaseOUT (Invitrogen) e 200U da enzima SuperScript III. Incubou-se à 25°C por 10min e em seguida à 50°C por 2h. Após este período, a enzima foi inativada à 70°C por 15min. Foi adicionado, então, 5U da enzima RNaseH e o cDNA foi incubado à 37°C por 30min com uma posterior inativação da enzima à 75°C por 10min. As amostras de cDNA, em um volume final de 20µL, foram diluídas (3 vezes) em água Milli-Q, e esta solução foi usada como estoque para os ensaios.

### **3.18. Determinação da concentração final de “primers”.**

As seqüências dos “primers” utilizados no qPCR são mostradas na tabela 4. As reações contendo “primers” variando entre uma concentração final máxima de 800nM e mínima de 100nM, foram realizadas utilizando-se, como molde, uma mistura de cDNAs. Com este ensaio, pode-se determinar a concentração ótima de “primers” que foi caracterizada como, a menor concentração onde o Ct e o perfil da curva de amplificação não apresentasse grandes variações em relação às maiores concentrações com uma menor formação de dímeros de “primers” (quando estes estavam presentes).

**Tabela 4. Seqüência dos oligonucleotídeos utilizados para quantificação da expressão gênica através de ensaios de PCR quantitativo (qPCR).**

As seqüências estão representadas na direção 5' → 3'. Os oligonucleotídeos foram desenhados em exons diferentes do transcrito a fim de evitar co-amplificação a partir de DNA genômico contaminante. Os amplicons gerados apresentam um tamanho médio de 150pb. F: Forward, R: Reverse.

Gene	Seqüências
mG3PDH	F: GATGCCCCCATGTTTGTGAT R: GGTCATGAGCCCTTCCACAAT
mHMBS	F: GCGGAAGAAAACGGCTCAA R: TCCCGTGGTGGACATAGCA
mHPRT	F: GTCCCAGCGTCGTGATTAGC R: TCATGACATCTCGAGCAAGTCTTT
Dlx1	F: GTCTGTGCGCCGAAGTCAA R: GCCCGGAAGAAGACCATTC
Dlx2	F: CAGCGGCCTCAACAATGTCT R: ATTCGGATTTCAAGGCTCAAGGT
Dlx5	F: GCCTCTCTAGGACTGACGCAA R: TGGTGACTGTGGCGAGTTACA
Id1	F: GATGGACTCCAGCCCTTCAG R: TGGAGAGGGTGAGGCTCTGT
Id2	F: GGTGGACGACCCGATGAGT R: GCGATCTGCAGGTCCAAGAT
Id3	F: GAAATCCTGCAGCGTGTGCATAG R: AAAGCTCCTCTTGTCTTGGAGAT
Runx2	F: ACCGAGACCAACCGAGTCAT R: CTCGGATCCCAAAGAAGCTT
Fkhr1	F: CCTTTGCCCCAGATGCCTAT R: GGGATCAACCGGTGACATAATG
Hoxa4	F: GGTGGTGTACCCCTGGATGA R: CGGGTCAGGTAGCGGTTAAA
Osx	F: TCCCCTTGTCGTCATGGTTAC R: TTGAATTTGATCCAGAGAAAGC
Plod1	F: AAACGTGCCCACTATCGACAT R: CGGACGACGAAGGCTAGATC
Spp1	F: TTATTGGTGACTTGGTGGTGATCT R: GAGGAGGCAATGCCAAACAG
Zfp82	F: GGATAAATCGCTGTTGCCTGTT R: GATGCCACAGCACACATGTG

Gene	Seqüências
BMP1	F: CCATGTCTCTATTGTACGCGAGAA R: AAGATGCCCCCTGGAGAATGTG
Cfdp1	F: AAGAAGGGTACATTGAGCGGAAA R: AGGAGCTCACATTGTCAATAGGATT
Dvl1	F: AAGAGTGACATGAGTGCCATTGTC R: GAAGCCCTCCACGTGTGTGTA
Ecsit	F: AAGCTGTGGTTCACCCGATTC R: GGGCAAAGACATCTGGTAGACAGT
Grn	F: CAATGCCCAATGCCATCTG R: ACTTCACCTCCTTCACTGGGTATC
Hoxc8	F: ATGCCCAGCATACACTCTCTTGT R: ATAAATACCAGAGAAGCACCGTGAA
Htra1	F: AGCTGAGACCTGGAGAATTTGTAGTT R: TAGCGTCTGTCTGAATGTAGTCCAT
Lrp6	F: ACCAAGGTCCAGGCTCGAA R: GCATCTTGTGCTACCATCTCCTTT
Nab1	F: TGGGTCAGGGCAAGTCAGA R: CTTGCTGCTTTTCTTTGGA
Postn	F: TTAGCATCTTCCTCAGCCTCCTT R: GAGCATTTTTATCCCAATCAGAA
Pkcδ	F: GTGGTGTGATTGACGATGATGTAG R: ACCCCATTGAGAACTCCAT
Ryk	F: CAGGTTCCAAAACCCTAACAGAA R: CCCTTAGGTAGACCAACCTGTGT
Usf2	F: GAACCAGAACTCCTCGAGATGAG R: CTTTACTTGCTCCTGTCTTGCTGTT
Barx1	F: CCGAAATTGCGAGGACTGA R: CCTTCCTTGTCTGGCCCTTAA
IGFBP-r10	F: GCTGCAATCACGGAGTTTGTGTT R: GTCTTCTCCGGGCTTTCTACAC
Ltp2	F: AGGAGCCAAGAGTTAAAGAAATCTAAAA R: TTTCCCATAGGATAGATGTGCCTAA
Glis1	F: AGAAGCCCAACAAGTGCATGTT R: GGTCGCTGGAGTTGCTGAAG
Glis3	F: TGCACCTCTTCCATCTTCTCATT R: TTCCCGTTCTTGTGCATATTCAT
AK012215.1	F: ACACACGACTGCCATAAAAC R: TCTTCAAATCTGTCAATATA
AW488953.1	F: CCACTTCATCTGTCCATCTC R: CTACATGAATATAGCCCTGGA
MyoD	F: AAGTTGCAGACGCATCCAT R: AGCGTCAGGAACCTCACAGA

### **3.19. Determinação da eficiência dos “primers”.**

Reações de amplificação, contendo “primers” numa concentração ótima, foram realizadas utilizando-se como molde uma mistura de cDNAs e diluídas em série. A análise de regressão linear dos valores de Cts em função do logaritmo da respectiva diluição forneceu o coeficiente angular da reta (a, em  $y=ax+b$ ), que foi utilizado para cálculo da eficiência de amplificação do produto pelos “primers”, na seguinte fórmula (Rasmussen, 2001).

$$Ef = 10^{-1/\text{coeficiente angular}}$$

$$Ef (\%) = (Ef - 1) \times 100$$

### **3.20. Confirmação da expressão diferencial através de qPCR.**

As PCRs foram realizadas com 3 $\mu$ l dos cDNAs de interesse em triplicatas ou duplicatas em diluição de 1:30, adicionando-se 3 $\mu$ l da concentração indicada do “primer” específico para cada transcrito de interesse (determinada previamente) e 6 $\mu$ l de Syber®Green Dye (Applied Biosystems). As reações foram montadas em placas de 96 poços e colocadas no Termociclador “7300 Real Time PCR System” (Applied Biosystems) com o seguinte programa: 50°C por 2min (etapa da ativação da enzima Uracil N-Glicosidade, AmpEraser), 95°C por 10min (ativação da Taq DNA polimerase, Taq Gold), 40 ciclos de 95°C por 15seg (desnaturação) e 60°C por 1min (anelamento e extensão). Cada reação de PCR foi repetida no mínimo 3 vezes. A detecção do produto de PCR em tempo real e a coleta dos dados foram realizadas pelo programa “7300 System SDS Software” (Applied Biosystems).

De posse dos Cts de cada amostra, inicialmente, foi calculada a média dos Cts das réplicas, considerando-se um desvio padrão máximo de 0,5 entre as médias obtidas. Dado que a expressão do transcrito é analisada em relação a uma amostra que é tomada como referência (células C2C12 sem tratamento), calculou-se, então, a diferença entre a média dos Cts da amostra referência e a média dos Cts das amostras estudadas (células C2C12 tratadas com 200ng/ml de rhBMP2 ou 200ng/ml de rhBMP7) nos diferentes períodos de tempo de tratamento (0, 4, 8, 12, 24h). Essa diferença foi definida como  $\Delta C_p$ . O cálculo do  $\Delta C_p$  foi realizado para os dados do transcrito alvo e para os dados de genes de expressão constitutiva. A fórmula final (Pfaffl, 2001) para o cálculo da diferença de expressão dos transcritos entre as amostras analisadas, que considera que não há um ganho de duas vezes do produto amplificado a cada ciclo, dado que a eficiência de amplificação dos “primers” utilizados não é de 100%, é dada por:

$$ratio = \frac{E_{\text{gene alvo}}^{\Delta C_{p \text{ gene alvo}}}}{E_{\text{controle endógeno}}^{\Delta C_{p \text{ controle endógeno}}}}$$

Para a normalização, foram utilizados como controles três genes murinos (HKGs) GAPDH, HPRT e HMBS, calculando-se um fator de normalização utilizando-se o programa GeNorm (Vandesompele, De Preter *et al.*, 2002), que, numa primeira etapa, calcula a estabilidade de cada gene controle do conjunto de dados fornecidos dando um valor (M) para cada gene. Dependendo do valor de estabilidade, pode-se retirar o gene controle menos estável e trabalhar com até dois genes. Depois de escolhidos os genes mais estáveis, o programa calcula a média geométrica dos controles para cada cDNA testado. Utilizando-se o programa Graphpad Prism 4,

calculou-se, através de “Two-Way ANOVA” (teste de Bonferroni), a significância estatística das diferenças observadas entre o controle e os tratamentos nos diferentes períodos de tempo.

### **3.21. Digestão, desfosforilação e purificação do vetor pENTR2B.**

1µg do vetor pENTR2B do Sistema Gateway (Invitrogen), foi digerido com 10U da enzima EcoRV (Fermentas), à 37°C O/N e à 65°C por 15min. Em seguida, o produto de digestão foi incubado numa mistura de reação de 50µl contendo 10mM Tris-HCl pH 7,5; 10mM MgCl<sub>2</sub>; 1U de fosfatase alcalina (CIAP), durante 30min a 37°C. Após a digestão, o DNA plasmídeo foi submetido à uma eletroforese em gel de agarose 1%, e a banda correspondente ao vetor linearizado foi purificada com o Kit comercial “GFX PCR cDNA and Gel Band Purification Kit” (Amersham Pharmacia Biotech).

### **3.22. Amplificação do cDNA correspondente à hBMP2 e hBMP7.**

Para tentar amplificar ambas BMPs humanas, foram utilizados cDNAs previamente sintetizados em nosso laboratório, durante o projeto Transcript Finishing Initiative (TFI), provenientes de linhagens celulares correspondentes aos seguintes tecidos: bexiga (SCABER), melanoma (SK-mel 25), Linfócitos B (IM9), útero (HeLa), testículo (Hs 1.Tes), cabeça-pescoço (FADU), mama (ZR 75.1), próstata (DU145), osteosarcoma (Sãos 2), osteoblastos (hFob), cólon (SW480), xeroderma pigmentosum, pulmão (NCI-H1155), placenta (Hs 732.PL), hepatócito (Hep G2), glioblastoma (linhagens A172 e T98G).

### **3.23. Amplificação do cDNA de hBMP2 e hBMP7 por PCR.**

A reação de PCR para a amplificação de hBMP2 foi feita numa mistura de reação num volume total de 20µl usando-se 0.25µM de cada um dos "primers": BMP2F (5'-GTCTCCTAAAGGGCCACCAT-3') e BMP2R (5'-TGCTGTACTAGCGACACCCA-3'), e 1U de Taq Hi-Fi DNA polimerase (Invitrogen). As amostras foram tratadas à 94°C por 3min e submetidas a 30 ciclos de 30seg à 94°C, 30seg à 58°C e 1min à 72°C, com uma etapa de extensão posterior à 72°C por 10min. A reação de PCR para a amplificação de hBMP7 foi feita numa mistura de reação num volume total de 20µl utilizando-se 0.25µM de cada um dos "primers": JCF7(5'-GCGATGCACGTGCGCTCACTG-3') e BMP7R (5'-ACTTGGCCCCAAAGGGTCTGAA-3'), e 1U de Taq Hi-Fi DNA polimerase. As amostras foram tratadas à 94°C por 3min e submetidas a 30 ciclos de 94°C por 30seg, 64°C por 30seg e 72°C por 1min. Posteriormente, uma etapa de 10min à 72°C. Para cada caso, 8µl de cada tubo foram aplicados a um gel de agarose 1% contendo brometo de etídeo, para a separação por eletroforese.

### **3.24. Purificação e fosforilação dos cDNAs de hBMP2 e hBMP7.**

Uma vez amplificados, os fragmentos de DNA correspondentes à hBMP2 e hBMP7 foram submetidos à uma eletroforese em gel de agarose 1% e purificados com o Kit comercial "GFX PCR cDNA and Gel Band Purification Kit". Os fragmentos foram fosforilados numa mistura de reação, em volume total de 60µl, contendo 50mM Tris-HCl pH 7.6, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 5mM DTT, 0,1mM espermidina e 0,11mM EDTA.; 1mM ATP; 1mM dNTPs; 1U T4PNK, 1U fragmento Klenow. A reação foi incubada durante 30min à 37°C e, em seguida, à 65°C por 15min para a

inativação das enzimas. Posteriormente, ambos fragmentos foram novamente purificados através do Kit comercial “GFX PCR cDNA and Gel Band Purification Kit”.

### **3.25. Ligação do vetor pENTR2B com os cDNAs correspondentes à hBMP2 e hBMP7.**

Para a reação de ligação foram utilizadas 100ng do vetor pENTR2B digerido e desfosforilado e 1µg dos fragmentos correspondentes aos cDNAs de hBMP2 e hBMP7 fosforilados e purificados, numa mistura de reação de volume total 25µl contendo 5U de T4 DNA ligase (Fermentas). As amostras foram incubadas O/N à 25°C, e posteriormente, à 65°C durante 15min. Como controles, foram tratados o vetor sozinho sem fragmentos e vetor sozinho sem ligase.

### **3.26. Eletroporação de *E. coli* DH10B.**

Após o término da reação de ligação da seção 3.25, 2µl de cada amostra foram misturadas com 50µl de bactérias eletrocompetentes e eletroporadas numa cubeta a 2.800V. Para cada amostra, foi adicionado 1mL de meio líquido de cultura SOC e estas foram incubadas durante 1h à 37°C sob agitação constante. Posteriormente, 100µl de cada amostra foram semeados em placa LB Agar contendo 50µg/ml de kanamicina.

### **3.27. Identificação de clones bacterianos positivos para hBMP2 e hBMP7 através de PCR.**

As colônias resistentes à kanamicina, obtidas a partir da ligação entre pENTR2B e hBMP2 e hBMP7, foram caracterizadas através de uma reação de PCR com o objetivo de identificar os clones positivos que levam os genes de interesse. A

reação de PCR para as colônias pENTR2B + hBMP2, foi feita num volume total de 10µl utilizando-se 0.25µM de cada um dos "primers": BMP2F e ATTB2 (5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT-3'), que hibridiza com a seqüência do vetor, e 1U de Taq DNA polimerase (Biolabs). As amostras foram tratadas à 94°C por 5min e submetidas a 30 ciclos de 94°C por 30seg, 57°C por 30seg e 72°C por 1min. Posteriormente, uma etapa de 10min à 72°C. Para as colônias pENTR2B + hBMP7, a reação de PCR foi feita da mesma forma, com a diferença que foi utilizado o "primer" JCF7 ao invés de BMP2F na mistura da reação. Uma vez identificados os clones positivos em ambos casos, estes foram crescidos para isolar seu DNA plasmídeo e confirmar a presença destes genes no vetor pENTR2B. A reação de PCR foi feita nas mesmas condições em cada caso, com a diferença que foram utilizados 10ng/µl de cada DNA plasmídeo isolado na reação.

### **3.28. Digestão e purificação do vetor pCMV-IRES-EGFP.**

1µg do vetor pCMV-IRES-EGFP, foi digerido com 10U da enzima XbaI (Fermentas), à 37°C por 2h e à 65°C durante 15min. Posteriormente, foi digerida também com 10U da enzima BamHI (Fermentas), à 37°C por 2h e à 65°C durante 15min. Após a segunda digestão, a amostra foi submetida à uma eletroforese em gel de agarose 1%, e a banda correspondente ao vetor linearizado foi purificada com o Kit comercial "GFX PCR cDNA and Gel Band Purification Kit"

### **3.29. Amplificação, digestão e purificação dos cDNAs de hBMP2 e hBMP7.**

A reação de PCR para a amplificação de hBMP2 foi feita numa mistura de reação, no volume total de 20µl, utilizando-se os "primers", 2Xba (5'-

TTAAATCTAGAGCCACCATGGTGGCCGGG-3') e 2Bam (5'-TTTAAAGGATCCTGTACTAGCGACACCCA-3'), na concentração de 0,25µM cada um, 1U da DNA Taq Hi-Fi polimerase (Invitrogen) e o vetor pENTR2B-hBMP2 como "template". As amostras foram tratadas à 94°C por 3min e submetidas a 3 ciclos de 30 segundos à 94°C, 30 segundos à 50°C e 1min à 72°C e 30 ciclos de 30 segundos à 94°C, 30 segundos à 63°C e 1,5 min à 72°C, com uma etapa posterior de extensão de 72°C por 10min. A reação de PCR para a amplificação de hBMP7 foi feita numa mistura de reação no volume total de 20µl, usando-se os "primers", 7Xba (5'-TTTTTCTAGAGCCACCATGCACGTGCGCTC-3') e 7Bam (5'-TTTTTTGGATCCGAGCTAGTGGCAGC-3'), na concentração de 0,25µM cada um, 1U de DNA Taq Hi-Fi polimerase (Invitrogen) e o vetor pENTR2B-hBMP7 como "template". Estas amostras foram submetidas aos mesmos ciclos descritos para amplificar hBMP2. Uma vez amplificados, os fragmentos de hBMP2 e hBMP7 foram digeridos com 20U de XbaI e 20U de BamHI respectivamente, e, posteriormente, foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% e purificados com o Kit comercial "GFX PCR cDNA and Gel Band Purification Kit".

### **3.30. Ligação do vetor pCMV-IRES-EGFP com os cDNAs correspondentes à hBMP2 e hBMP7.**

Para a reação de ligação, foram usados 50ng do vetor pCMV-IRES-EGFP digerido e purificado e 50ng dos fragmentos de DNA correspondentes à hBMP2 e hBMP7 purificados, numa mistura de reação com volume total de 20µl, contendo 5U de T4 DNA ligase (Fermentas). As amostras foram incubadas O/N à 16°C e posteriormente à 65°C durante 15min. Como controle, tratou-se o vetor sozinho, sem fragmentos, e vetor sozinho, sem ligase.

### **3.31. Eletroporação de *E. coli* XLB1.**

Após o término da reação de ligação do item 3.30, 2µl de cada amostra foram misturados com 50µl de bactérias eletrocompetentes e submetidas à eletroporação numa cubeta à 2.400V. Para cada amostra, foi adicionado 1 mL de meio de cultura SOC e as bactérias foram incubadas durante 1h à 37°C sob agitação constante. Posteriormente, 100µl de cada amostra foram plaqueados em placa LB ágar contendo 100µg/ml de ampicilina.

### **3.32. Identificação dos clones positivos através de PCR.**

As colônias bacterianas resistentes à ampicilina, obtidas da ligação entre pCMV-IRES-EGFP, hBMP2 e hBMP7, foram caracterizadas através de uma reação de PCR, com o objetivo de identificar os clones positivos carregando os genes de interesse. A reação de PCR para as colônias pCMV-IRES-EGFP + hBMP2 foi feita num volume total de 10µl, usando os “primers”: 21470R (5'-CCACCACGAATCCATGGTTG-3') que hibridiza internamente com a seqüência de hBMP2 e pLPCXF (5'-AGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGATC-3'), que anela com parte da seqüência do promotor do vetor, na concentração de 0,25µM cada um, e 1U de Taq DNA polimerase (Fermentas). As amostras foram tratadas à 94°C por 5min e submetidas a 30 ciclos de 94°C por 30seg, 54°C por 30seg e 72°C por 30seg. Posteriormente, uma etapa de 10min à 72°C. Para as colônias pCMV-IRES-EGFP + hBMP7, a reação de PCR foi feita da mesma forma, com a diferença que foi utilizado o “primer” 7680R (5'-GTCGAAGCGTTCCCGGATG-3') que hibridiza internamente com a seqüência de hBMP7 na mistura da reação ao invés de 21470R. Uma vez identificados os clones positivos, em ambos casos, estes foram crescidos para isolar seu DNA plasmideal e confirmar a presença destes genes no vetor

pCMV-IRES-EGFP. A reação de PCR foi feita nas mesmas condições em cada caso, com a diferença que na reação foram utilizados 10ng/μl de cada DNA plasmídeo isolado. Finalmente, o DNA plasmídeo das colônias positivas foi seqüenciado para confirmar as respectivas seqüências.

**3.33. Transfecção transitória e estável de células HEK293T com pCMV-hBMP2-IRES-EGFP e pCMV-hBMP7-IRES-EGFP.**

6μg de pCMV-IRES-EGFP (vetor vazio), pCMV-hBMP2-IRES-EGFP e pCMV-hBMP7-IRES-EGFP foram co-transfetadas, em cada caso, com 0,3μg do vetor pTK-Hyg, através do método de lipofecção, utilizando-se Lipofectamina 2000 (Invitrogen), em células HEK293T, cultivadas em placas P60. Depois de 48h, as células foram tripzinizadas e subdivididas (1:5, 1:10, 1:20 e 1:40) em placas P60 contendo meio DMEM 10% soro, 300μg/ml de Higromicina (Invitrogen). O meio foi trocado a cada 3-4 dias até a aparição de clones celulares resistentes aos antibióticos. Estes clones foram isolados, utilizando-se um anel de aço inoxidável, que foi colocado em volta de cada um deles, e adicionando-se tripsina dentro do anel para remover as células, as quais foram semeadas em placas de 24 poços contendo o meio seletivo. A transfecção transitória foi feita da mesma forma, com a diferença que não foi usado o vetor pTK-Hyg e, além disso, tanto o meio como as células foram coletados 48h depois para análise da expressão das rhBMPs.

**3.34. Análise da expressão de hBMP2 e hBMP7 na transfecção transitória de células HEK293T com pCMV-IRES-EGFP, pCMV-IRES-EGFP-hBMP2 e pCMV-IRES-EGFP-hBMP7 e dos clones estáveis de células 293TpCMV-IRES-EGFP e 293TpCMV-hBMP7-IRES-EGFP.**

100µg de proteína total tanto de lisado como de meio condicionado coletado após 48h da transfecção, foram aplicados num gel de poliacrilamida 12% (SDS-PAGE 12%). Após a eletroforese, o gel foi colocado em tampão de transferência (20% metanol, 39mM glicina, 48mM Tris-HCl pH 8,3) e as proteínas foram transferidas do gel para membrana de PVDF por eletroforese (400mA, 1h), em cuba semi-seca (Amersham Pharmacia). Os sítios inespecíficos da membrana de PVDF foram bloqueados com 5% leite-TBST (150mM NaCl, 50mM Tris-HCl pH 7,5) por 1h à temperatura ambiente, sob agitação. A membrana foi, então, lavada com TBST (3X 5min, temperatura ambiente, sob agitação) e incubada com os anticorpos monoclonais anti-BMP-2 (1:650) e anti-BMP-7 (1:2500) (R&D Systems) por 1h à temperatura ambiente, sob agitação. Novamente, a membrana foi lavada (3X 10min com TBST, sob agitação) e, então, incubada com o anticorpo secundário correspondente (anti-IgG mouse, Vector), conjugado com peroxidase, diluído 1:5.000 em TBST (1h, temperatura ambiente, sob agitação). Após três lavagens com TBST (10min cada, sob agitação), a membrana foi revelada com sistema quimioluminescente (SuperSignal West Pico Trial Kit, Pierce). Um filme de raio-X (Kodak) foi exposto à membrana até a obtenção do sinal adequado.

Este ensaio foi feito de igual forma, mas apenas com o meio condicionado dos clones 293TpCMV-IRES-EGFP, 293TpCMV-hBMP2-IRES-EGFP e 293TpCMV-hBMP7-IRES-EGFP.

**3.35. Purificação de rhBMP7 do meio de cultura do clone estável de células 293TpCMV-hBMP7-IRES-EGFP N°12 através de cromatografia iônica.**

As células 293TpCMV-hBMP7-IRES-EGFP N°12 foram semeadas em placas P100 e mantidas em D-MEM 10% SFB à 37°C, 2,0% CO<sub>2</sub>. Entre 80-100% de confluência, o meio de cultura foi trocado por o mesmo meio mas sem soro. Cada 24h durante 4-5 dias o meio de cultura foi coletado, filtrado com filtro de 0.45µm e armazenado à -80°C. Utilizando Centricon 10kDa (Millipore), 80ml de meio coletado foi concentrado a 500µl, sendo este diluído em 2 volumes (2V) da solução I (9M Uréia, 20mM Hepes pH 7,0). Em seguida, esta amostra foi aplicada na coluna de troca iônica Hi-Trap SP (GE Healthcare) previamente equilibrada com a solução II (6M Uréia, 50mM NaCl, 20mM Hepes pH 7,0). Posteriormente, a coluna foi lavada com 5V da solução II e, em seguida, foi feita a eluição em gradiente utilizando-se 5V da solução III (6M Uréia, 100mM NaCl, 20mM Hepes pH 7,0) e 5V da solução IV (6M Uréia, 300mM NaCl, 20mM Hepes pH 7,0). Uma parte de cada fração coletada, foi misturada com tampão de amostra sem agente redutor e aplicada a um gel de poliacrilamida 10% que, após eletroforese, foi corado com prata utilizando-se o “Kit ProteoSilver™ Silver Staining” (Sigma). Posteriormente, as frações que continham rhBMP7 foram concentradas, misturadas com tampão de amostra com ou sem agente redutor, e aplicadas a dois géis 12% poliacrilamida, sendo um para ser corado novamente com prata e, o outro, para ser utilizado num ensaio de “Western blot” utilizando-se o anticorpo anti-BMP7.

**3.36. Análise funcional do meio de cultura condicionado por células HEK293T expressando rhBMP7 utilizando-se as células C2C12.**

As linhagens celulares 293TpCMV-IRES-EGFP (vetor vazio) e 293TpCMV-hBMP7-IRES-EGFP N°12, foram semeadas em placas P100 na presença de meio D-MEM 10% Soro Fetal Bovino (SFB, Invitrogen), e incubadas à 37°C, 2% CO<sub>2</sub>. Na confluência de 80%, as culturas foram lavadas com PBSA (137mM NaCl, 2,7mM KCl, 8mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> e 1,4mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) e o meio foi trocado por DMEM sem soro. 24h depois o meio foi trocado por DMEM sem soro e as células foram mantidas em cultura por mais 24h, quando o meio foi novamente coletado. O meio condicionado proveniente de cada linhagem foi misturado com um volume de D-MEM 10% SFB (Hyclone) e aplicado a culturas de células C2C12 confluentes, previamente semeadas em placas de 6 ou 12 poços. Estas culturas foram mantidas à 37°C, 2% CO<sub>2</sub> até a visualização de diferenças morfológicas que evidenciam processos de diferenciação, resultante do tratamento com o meio condicionado de 293TpCMV-IRES-EGFP e 293TpCMV-hBMP7-IRES-EGFP N°12. Além das diferenças morfológicas captadas por microscopia, foi realizado o ensaio de coloração com Vermelho de Alizarina. Após 14 dias de tratamento, as culturas foram lavadas 2X com PBSA e fixadas com etanol 70% frio e deixadas em temperatura ambiente por 1h. Em seguida, as células foram lavadas com água Milli-Q durante 5-10min adicionando-se então a solução de Vermelho de Alizarina 1% pH 4,2 (Sigma) mantendo-se à temperatura ambiente durante 30min. Posteriormente, esta solução foi removida e as células foram lavadas com água Milli-Q, para serem analisadas e fotografadas sob microscopia óptica.

**3.37. Osteodiferenciação *in vivo* utilizando-se o meio de cultura condicionado pelas células 293TpCMV-hBMP7-IRES-EGFP N°12.**

**3.37.1. Infusão das amostras.**

Para o experimento "*in vivo*" (ensaio pré-clínico) das preparações de rhBMP7, foram escolhidos camundongos Balb/c nudes, machos, imunodeficientes, de quatro semanas de idade, com massa corporal entre 20 e 25g. Os procedimentos foram realizados de acordo com as normas do COBEA ([www.cobea.org.br](http://www.cobea.org.br)). A anti-sepsia da região cervical posterior dos animais foi feita com Clorexidina aquosa a 0,2%. A pré-anestesia foi intra-muscular utilizando-se 10µl de 50mg/ml Xilazina, seguido de anestesia intra-peritoneal com 10µl/g da mistura de 40mg/ml Ketamina/4mg/ml Xilazina. Posteriormente, realizou-se uma incisão de 5,0 mm na região dorsal do animal. Utilizando-se a técnica de divulsão com pinça, a pele foi separada do tecido celular subcutâneo em área com aproximadamente 40mm de diâmetro com formação de uma "bolsa" subcutânea virtual onde foi implantado o material a ser testado. À direita da linha média dorsal implantou-se o material (Hidroxiapatita/Colágeno) que contem 0,1; 0,5 e 1mg de proteína total presente no meio de cultura das células 293TpCMV-IRES-EGFP e à esquerda o mesmo material com 0,1; 0,5 e 1mg de proteína total presente no meio de cultura das células 293TpCMV-rhBMP7-IRES-EGFP N°12. Num primeiro experimento, 5 animais foram implantados unicamente com o material, outros 5 animais com o material contendo 0.1mg, 5 animais com 0.5mg e 1 animal com 1mg de proteína total. Posteriormente, em outro experimento, 5 animais foram implantados com o material contendo 0.1mg, 5 animais com 0,5mg e 3 animais com 1mg de proteína total. Após revisão da hemostasia local, realizou-se sutura dos bordos cirúrgicos com fio inabsorvível

monofilamentar de nylon 6-0. A analgesia pós-operatória foi realizada com injeção intramuscular de 0,5µl de 1mg/ml Meloxicam– Movatec® na coxa direita. Ao final do ato cirúrgico, os animais foram acondicionados em gaiolas colocadas sobre uma cama térmica até que houvesse um nível adequado de recuperação anestésica, e os animais estivessem acordados.

### **3.37.2.      *Recuperação das amostras.***

A recuperação das amostras foi realizada por procedimento padrão, sob anestesia em dose letal de 20µl/g da mistura de 40mg/ml Ketamina/4mg/ml Xilazina e anti-sepsia com Clorexidina aquosa a 0,2%, executando-se incisão no mesmo local onde foi feito o implante, e dissecação cortante das áreas de implante.

Os materiais recuperados foram separados por indivíduo e por posição de implante, colocados sobre fragmento de papel filtro devidamente identificado e encaminhados para análise histológica, imersos em 5ml de solução tamponada de paraformaldeído 4% previamente filtrado com filtro 0,22µm.

## **4. RESULTADOS.**

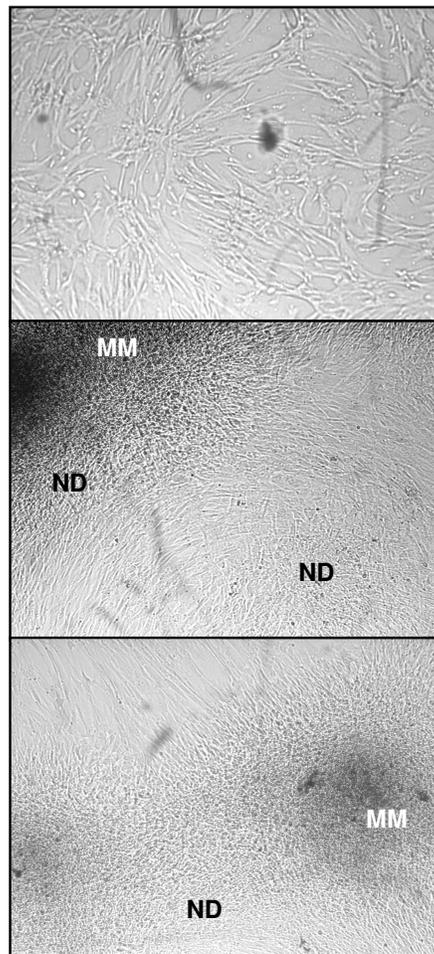
### ***4.1. Padronização de um modelo de diferenciação osteoblástica***

#### ***4.1.1 Efeito de rhBMP2 e rhBMP7 comerciais na diferenciação de células mesenquimais de cordão umbilical humano.***

##### ***4.1.1.1 Morfologia celular***

Com o objetivo de verificar se rhBMP2 e rhBMP7 eram capazes de induzir osteodiferenciação em células humanas, culturas primárias de células extraídas de cordão umbilical humano foram tratadas com ambas proteínas, conforme descrito em Materiais e Métodos. O cordão umbilical é uma das fontes de células tronco mesenquimais, as quais dão origem a vários tipos celulares como adipócitos, condroblastos, osteoblastos entre outros. Para este ensaio, utilizou-se células mesenquimais incubadas somente com o meio de cultura (controle negativo) e células que foram tratadas com rhBMP2 ou rhBMP7. Nos primeiros dias, não se registrou uma diferença marcante na morfologia das células, mas, a partir do dia 4, as células que foram tratadas começaram a adotar um ordenamento/agrupamento diferente, aparecendo regiões de matriz extracelular bem mais densa que o controle. Como pode ser visto na Figura 5, correspondente ao dia 5 pós-tratamento, nas culturas tratadas com BMPs existem regiões de condensação celular, e de matriz extracelular bem mais escuras, o que não foi observado nas culturas controle. No caso das células tratadas com rhBMP2 (Figura 5B), é possível notar a presença de duas zonas de condensação celular, os denominados nódulos de diferenciação (ND), separados por uma região de células que ainda não estão diferenciando. Observa-se, também, uma zona bastante escura que corresponderia à matriz extracelular mineralizada (MM). Com o tratamento com rhBMP7, ocorre algo muito similar, com a diferença que os 2 nódulos de diferenciação observados estão muito

próximos e estão começando a fundir-se. Como é possível notar, estes nódulos apresentam, regiões escuras correspondentes à matriz extracelular em mineralização (Figura 5C). Portanto, fica claro que o tratamento com as duas BMPs, tem um efeito sobre estas culturas, quando comparadas com o controle. Caso as regiões mais escuras realmente corresponderem à matriz mineralizada, seria uma evidência clara da ação destas proteínas sobre as células mesenquimais de cordão umbilical induzindo diferenciação celular, já que este tipo de matriz constitui-se num fenótipo característico de osteoblastos. Portanto, é muito provável que se esteja na presença de diferenciação osteoblástica, mas, logicamente, isto deve ser provado através de ensaios de coloração específica para matriz mineralizada, como, por exemplo, a coloração de von Kossa que se detalha a seguir.



**A** Controle (sem BMPs)

**B** 300ng/ml rhBMP2

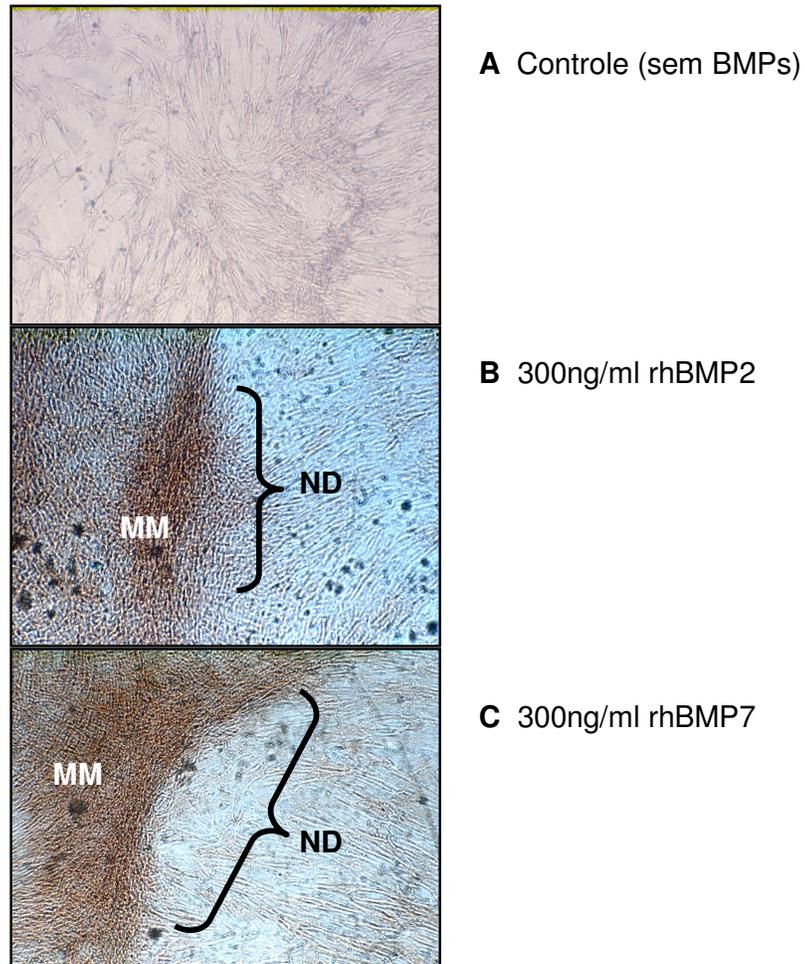
**C** 300ng/ml rhBMP7

**Figura 5. Diferenciação de células mesenquimais de cordão umbilical humano após o tratamento com rhBMP2 e rhBMP7 por 5 dias.**

Conforme descrito em Materiais e Métodos. **A:** células não-tratadas (controle), **B:** células tratadas com 300ng/ml de rhBMP2 e **C:** células tratadas com 300ng/ml de rhBMP7. Nas células tratadas é possível observar regiões de condensação celular ou nódulos de diferenciação (ND), e zonas escuras que correspondem à matriz extracelular mineralizada (MM).

#### **4.1.1.2 Coloração específica de von Kossa.**

As culturas de cordão umbilical humano, tratadas com rhBMP2 e rhBMP7, foram fixadas e coradas conforme descrito em Materiais e Métodos. A coloração de von Kossa identifica, especificamente, matriz extracelular mineralizada, que corresponde à matriz produzida por células osteoblásticas. Como pode ser visto, na Figura 6, que corresponde ao dia 11 pós-tratamento, as amostras tratadas com BMPs apresentam regiões de células mais agrupadas e ordenadas, além de regiões de matriz extracelular bem mais escuras quando comparadas às culturas controle (Figura 6A). Nas culturas tratadas com rhBMP2 (Figura 6B), é possível notar a presença de um nódulo de diferenciação (ND) no qual a matriz extracelular é corada em vermelho, demonstrando assim, sua mineralização. Nas células tratadas com rhBMP7 (Figura 6C), ocorre algo muito similar, observando-se, também, a presença de um nódulo de diferenciação, onde a coloração vermelha novamente demonstra a mineralização da matriz extracelular. Portanto, pode-se afirmar que as células mesenquimais provenientes do cordão umbilical, tratadas com rhBMP2 e rhBMP7, apresentam um grau de diferenciação, sendo muito provável, que esta seja do tipo osteoblástica, devido à detecção de matriz extracelular mineralizada, que é um fenótipo característico de osteoblastos. Infelizmente, não foi possível reproduzir este resultado com este tipo de cultura primária humana e com outras fontes de células mesenquimais. Por esta razão, para poder identificar os genes diferencialmente expressos durante a osteodiferenciação induzida por rhBMP2 e rhBMP7, foi escolhido outro modelo celular, as células murinas C2C12, as quais, em resposta ao tratamento com rhBMPs, se diferenciam em osteoblastos (Katagiri, Yamaguchi *et al.*, 1994)

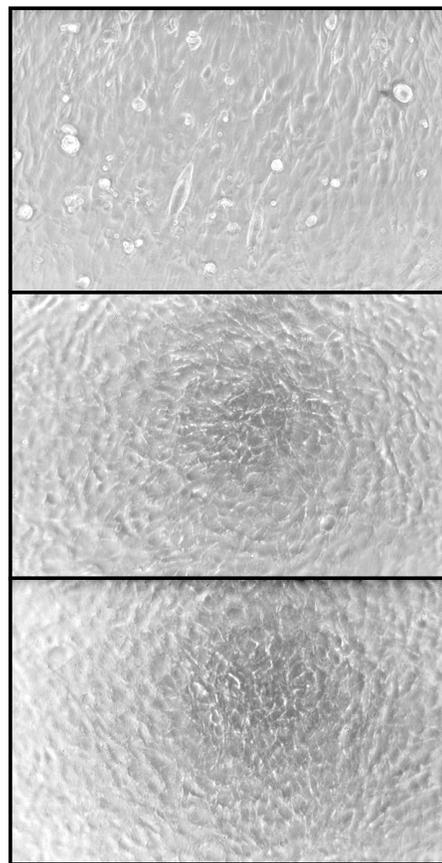


**Figura 6. Diferenciação osteogênica de células de cordão umbilical humano induzida por rhBMP2 e rhBMP7, demonstrada através de coloração de von Kossa, conforme descrito em Materiais e Métodos. A:** células não-tratadas (controle), **B:** células tratadas com 300ng/ml de rhBMP2 e **C:** células tratadas com 300ng/ml de rhBMP7. As fotos correspondem ao dia 11 do tratamento, com aumento de 40X. Nas células tratadas é possível observar regiões de condensação de células, os nódulos de diferenciação (ND), os quais contêm matriz extracelular mineralizada (MM), com a cor vermelha característica.

#### **4.1.2 Efeito de rhBMP2 e rhBMP7 comerciais na diferenciação osteoblástica de células C2C12.**

##### **4.1.2.1 Morfologia celular.**

A linhagem C2C12 é um excelente modelo de estudo de diferenciação osteoblástica. Estas células, que têm origem mesenquimal, são pré-mioblastos que ainda têm uma potencialidade limitada de diferenciação. Quando são cultivadas em meio de cultura com soro estas células se diferenciam em células musculares, mas, quando são mantidas em cultura na presença de rhBMP2 ou rhBMP7, são capazes de se diferenciar em osteoblastos (Katagiri, Yamaguchi *et al.*, 1994; Gu, Zhang *et al.*, 2004). Devido a isto, foram escolhidas como um modelo válido de estudo, tanto para a análise dos genes diferencialmente expressos através de microarranjos de DNA, como para analisar a funcionalidade das células transfectadas estavelmente e que expressam rhBMP2 ou rhBMP7. Antes de fazer o experimento para coletar os RNAs para fazer os microarranjos de DNA, as células C2C12 foram tratadas com as duas BMPs recombinantes comerciais com o objetivo de testar o modelo, observando-se as diferenças morfológicas durante o tratamento. A Figura 7 mostra os diferentes fenótipos das células após 4 dias de tratamento, sendo possível observar a aparição de células musculares no controle negativo (veículo apenas) enquanto as células tratadas com rhBMP2 ou rhBMP7 comerciais apresentam uma maior concentração celular, onde as células adotam uma forma poligonal, característica morfológica de osteoblastos.



**A. Controle**

**B. 200ng/ml rhBMP2**

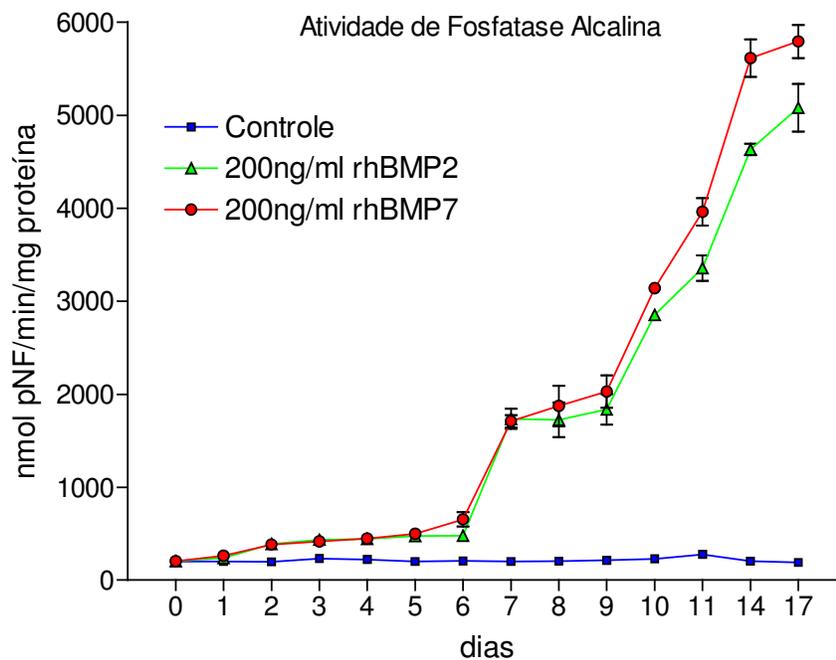
**C. 200ng/ml rhBMP7**

**Células C2C12 d4**

**Figura 7. Osteodiferenciação de células C2C12 induzida por rhBMP2 e rhBMP7.** O ensaio de diferenciação foi feito conforme detalhado em Materiais e Métodos. **A:** controle negativo, de culturas tratadas apenas com o veículo. **B:** culturas tratadas com 200ng/ml de rhBMP2; **C:** culturas tratadas com 200ng/ml de rhBMP7. Culturas tratadas por 4 dias e morfologia analisada através de microscopia de fase.

#### **4.1.2.2 Ensaio de atividade de fosfatase alcalina de células C2C12 utilizando rhBMP2 e rhBMP7 comerciais.**

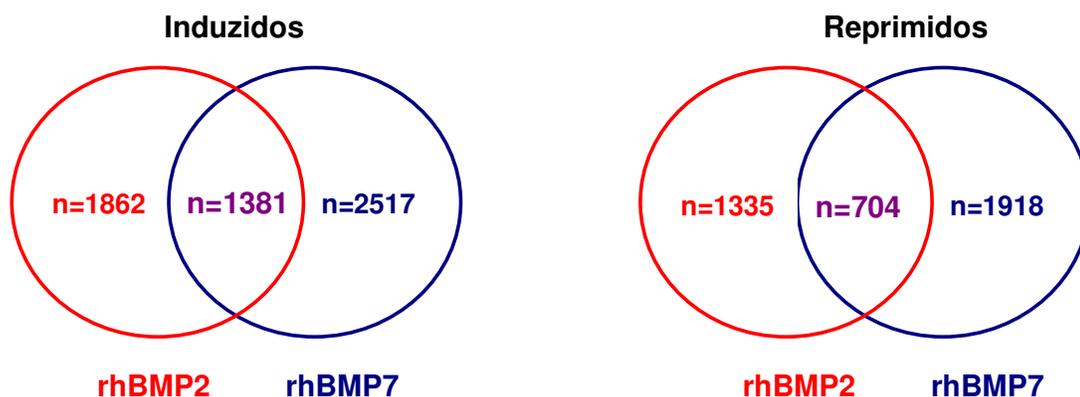
Uma característica que permite identificar se as células estão se diferenciando em osteoblastos é a atividade enzimática da fosfatase alcalina. Esta atividade está aumentada durante a osteodiferenciação e em osteoblastos já diferenciados, em comparação a células mesenquimais ou a outros tipos de células não-osteoblásticas diferenciadas (Cheng, Jiang *et al.*, 2003). A Figura 8 mostra o resultado da atividade de fosfatase alcalina em função do tempo das células C2C12 tratadas com rhBMP2 e rhBMP7 comerciais. Resulta evidente o incremento da atividade enzimática a partir do dia 2 de tratamento, aumentando consideravelmente nos dias 7, 10 e 14, chegando, no dia 17, a um valor muito parecido àquele registrado no dia 14. O resultado de atividade enzimática mostra, claramente, um perfil característico de osteoblastos, o qual, juntamente com as mudanças morfológicas das células C2C12 tratadas já mostradas acima, permitem afirmar que as células respondem às duas proteínas, validando este modelo celular de osteodiferenciação. Assim, estes dados permitiram planejar, com maior segurança o experimento que visa identificar os genes diferencialmente expressos durante o tratamento das células C2C12 com ambas rhBMPs.



**Figura 8. Cinética de indução da atividade de Fosfatase Alcalina em células C2C12 tratadas com 200ng/ml de rhBMP2 e rhBMP7.** O ensaio foi feito conforme descrito em Materiais e Métodos. Atividade da enzima (nmol pNF/min/mg proteína) avaliada durante a osteodiferenciação das células C2C12 induzida por rhBMP2 e rhBMP7 comerciais. Este resultado é representativo de 3 experimentos diferentes.

#### **4.2 Análise dos genes diferencialmente expressos através de microarranjos de DNA (Codelink), durante a osteodiferenciação das células C2C12, induzida por rhBMP2 e rhBMP7.**

As amostras de RNA total utilizadas para fazer os experimentos de microarranjos de DNA foram isoladas 12h após o tratamento com rhBMPs. Entretanto, foram coletadas amostras de RNA total também nos tempos 0, 4, 8 e 24h após o tratamento, com o objetivo de analisar, através de “Real Time PCR”, a variação da expressão dos genes diferencialmente expressos na diferenciação, durante um período maior de tempo. Os bioarranjos de DNA (Codelink) utilizados correspondem ao genoma completo de camundongo (~36.000 genes), portanto os resultados são bastante abrangentes e o interesse foi centrado, especificamente, nos genes relacionados com osteodiferenciação. Como pode ser observado na Figura 9, a análise dos dados resultou na obtenção de 1.862 e 2.517 genes induzidos, e 1.335 e 1.918 genes reprimidos, após o tratamento das células C2C12 com rhBMP2 e rhBMP7, respectivamente, considerando-se um “cut-off” de 2,5 vezes. Os genes induzidos e reprimidos pelo tratamento com cada rhBMP foram interceptados, resultando em 1.318 genes induzidos e 704 genes reprimidos por rhBMP2 e rhBMP7.



**Figura 9. Genes induzidos e reprimidos por rhBMP2 e rhBMP7 durante a diferenciação osteoblástica das células C2C12.** Os genes apresentando uma expressão diferencial > 2,5 vezes nos microarranjos de DNA foram selecionados. A figura mostra a intersecção dos genes induzidos e reprimidos tanto por rhBMP2 como por rhBMP7.

Os prováveis genes diferencialmente expressos, em comum, por rhBMP2 e rhBMP7 foram classificados de acordo com sua função, predita pelo programa FatiGO Data Mining (<http://fatiGO.bioinf.cnio.es>), que classifica os genes de acordo com os critérios do “Gene Ontology (GO)”, ou seja, componente celular, processo biológico e função molecular. Uma parte da tela de saída do FatiGO é mostrada na Figura 10.



**Figura 10. Tela de Saída de FatiGO.** Algumas das classificações fornecidas pelo programa FatiGO, com as barras de percentagens em vermelho correspondendo aos genes induzidos em comum por rhBMP2 e rhBMP7 e as barras em verde sendo os genes reprimidos em comum por ambas rhBMPs.

A partir da classificação de FatiGO, foram selecionados 33 genes induzidos por rhBMP2 e rhBMP7 relacionados, principalmente, a algumas vias de transdução de sinais, desenvolvimento, diferenciação celular, osteodiferenciação, e formação/remodelação óssea. Estes genes são mostrados na Tabela 5, que detalha o resultado da razão das intensidades normalizadas, obtidas em cada microarranjo e para cada gene. As razões correspondem às intensidades das amostras tratadas (200ng/ml de rhBMP2 ou rhBMP7) divididas pelas intensidades das amostras não-tratadas com rhBMPs, após 12h de tratamento. Apesar de não apresentar expressão diferencial no microarranjo, o gene MyoD é mostrado na Tabela 5. A razão para sua inclusão será discutida posteriormente.

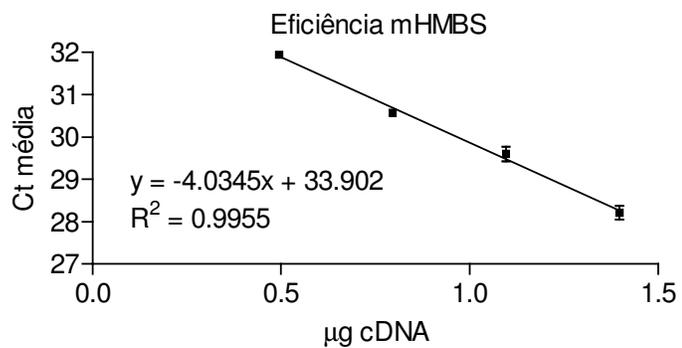
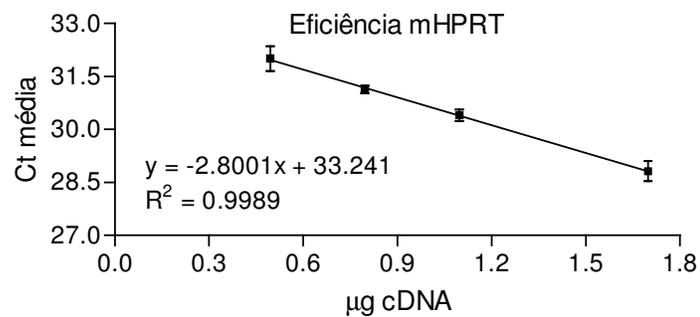
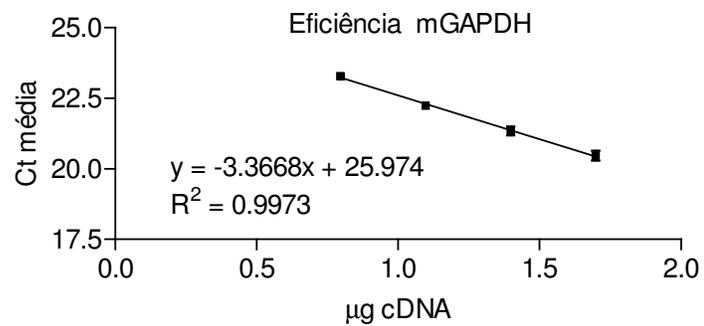
**Tabela 5. Prováveis genes diferencialmente expressos durante a osteodiferenciação das células C2C12 induzida por rhBMP2 e rhBMP7.**

Número Acesso	Descrição	Razão Intensidade Normalizada	
		rhBMP2/C	rhBMP7/C
NM_010053.1	distal-less homeobox 1 (Dlx1)	6,462	8,015
NM_010054.1	distal-less homeobox 2 (Dlx2)	3,236	5,594
NM_010056.2	distal-less homeobox 5 (Dlx5)	4,168	4,450
NM_010495.1	inhibitor of DNA binding 1 (Id1)	20,365	31,646
NM_010496.2	inhibitor of DNA binding 1 (Id2)	5,766	88,316
NM_008321.1	inhibitor of DNA binding 1 (Id3)	3,591	3,989
NM_009820.1	runt related transcription factor 2 (Runx2)	2,939	3,165
NM_130458.1	Osterix transcription factor (Osx)	3,728	5,482
NM_008265.2	homeo box A4 (Hoxa4)	4,766	4,049
NM_010466.1	homeo box C8 (Hoxc8)	2,515	4,191
NM_147221.1	GLIS family zinc finger 1 (Glis1)	176,83	131,282
NM_175459.3	GLIS family zinc finger 3 (Glis3)	35,467	33,331
NM_007526.1	BarH-like homeobox 1 (Barx1)	6,871	7,271
NM_011680.1	upstream transcription factor 2 (Usf2)	4,005	6,609
AF114258.1	forkhead protein FKHR1 (Fkhr1) mRNA	3,219	67,178
NM_177889.2	zinc finger protein 82 (Zfp82)	30,931	57,826
NM_011801.1	craniofacial development protein 1 (Cfdp1)	4,302	46,293
NM_010091.3	Dvl1	4,295	160,170
NM_011103.1	protein kinase C, delta (Prkc $\delta$ )	2,530	11,197
NM_012029.1	signaling intermediate in Toll pathway-evolutionarily conserved (Sitpec)	2,944	12,836
NM_008175.2	granulin (Grn)	3,055	8,980
NM_013649.2	receptor-like tyrosine kinase (Ryk)	4,083	13,548
NM_008514.1	low density lipoprotein receptor-related protein 6 (Lrp6)	2,689	6,526
NM_013589.1	latent transforming growth factor beta binding protein 2 (Ltbp2)	5,342	17,629
NM_178929.2	Kazal-type serine protease inhibitor domain 1 (IGFBP-r10)	3,278	7,094
NM_015784.1	periostin, osteoblast specific factor (Postn)	2,506	14,270
NM_008667.2	Ngfi-A binding protein 1 (Nab1)	3,541	12,381
NM_019564.1	protease, serine, 11 (Igf binding) (Prss11)	2,521	3,905
NM_009755.2	bone morphogenetic protein 1 (Bmp1)	4,083	55,404
NM_009263.1	secreted phosphoprotein 1 (Spp1)	3,137	61,283
NM_011122.1	procollagen-lysine, 2-oxoglutarate 5-dioxygenase 1 (Plod1)	37,891	45,897
AK012215.1	11 days embryo whole body cDNA, RIKEN clone:2700007P21 product:hypothetical protein, full insert sequence	13.,840	7,852
AW488953.1	UI-M-BH3-ash-e-04-0-UIs1 NIH_BMAP_M_S4 cDNA clone UI-M-BH3-ash-e-04-0-UI 3'. hypothetical protein LOC216971	5,184	5,961
NM_010783.1	MyoD family inhibitor (Mdfi)	0.998	0.979

### **4.3 Confirmação da expressão diferencial dos genes regulados por rhBMP2 e rhBMP7 através de qPCR.**

#### **4.3.1 Determinação da concentração ideal e da eficiência dos “primers”.**

Conforme descrito em Materiais e Métodos, a concentração ideal para cada par de “primer” específico foi determinada, assim como também o cálculo da eficiência dos mesmos. A Figura 11 mostra os gráficos (Ct vs  $\mu\text{g}$  cDNA) que permitem o cálculo da eficiência dos “primers” mGAPDH, mHPRT e mHMBS e a Tabela 6 mostra as eficiências calculadas através deste tipo de gráfico para todos os “primers” utilizados no qPCR. No caso dos genes Hoxa4 e Barx1, não foi possível obter as respectivas eficiências, mesmo utilizando diversos pares de “primers” para tal propósito.



**Figura 11** Gráficos de eficiência dos “primers” mGAPDH, mHPRT e mHMBS. São mostradas as linhas de tendência linear com suas respectivas equações e valores de  $R^2$ .

**Tabela 6. Tabela de concentração final e eficiência dos “primers” utilizados nas reações de qPCR para o estudo de expressão diferencial dos transcritos selecionados através dos microarranjos de DNA.**

Primers	Concentração nM	Coefficiente angular	Eficiência (%)
mHPRT	200	-2,80	128
mHMBS	600	-4.035	77
mGAPDH	200	-3,36	98
Dlx1	400	-3,04	113
Dlx2	400	-2,81	127
Dlx5	200	-3,76	84
Id1	200	-3,94	79
Id2	200	-3,53	92
Id3	200	-3,60	90
Runx2	400	-3,26	102
Fkhr1	400	-3,89	81
Hoxa4	nd	nd	Nd
Osterix	200	-4,30	71
Plod1	200	-3,85	82
Spp1	400	-4,20	73
Zfp82	400	-3,04	113
BMP1	200	-4,06	76
Cfdp1	400	-3,99	78
Dvl1	200	-4,11	75
Grn	400	-4,20	73
Hoxc8	400	-3,76	84
Htra1	200	-4,03	77
Lrp6	200	-3,81	82
Nab1F	400	-3,83	82
Postn	400	-2,89	121
Pkc $\delta$	200	-4,06	76
Ryk	200	-3,56	91
Usf2	200	-4,20	73
Barx1	nd	nd	nd
IGFBP-r10	200	-3,37	98
Ltpb2	400	-3,43	96
Glis1	200	-2,83	125
Glis3	200	-4,16	74
Ecsit	400	-3,83	82
AK012215.1	200	-3,82	82
AW488953.1	200	-3,55	91
MyoD	200	-3,77	84

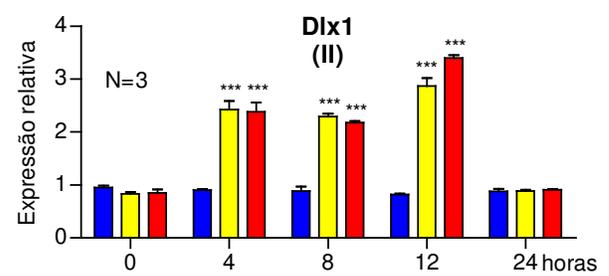
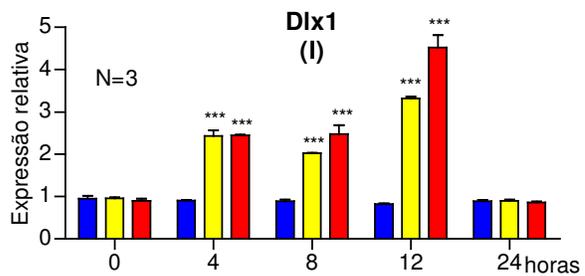
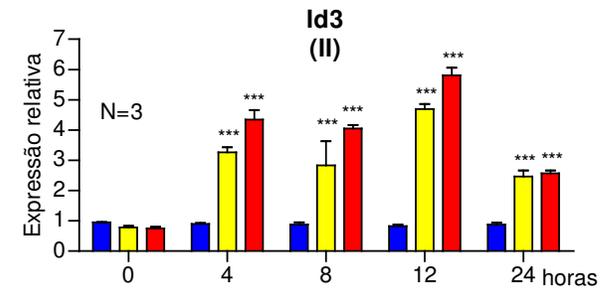
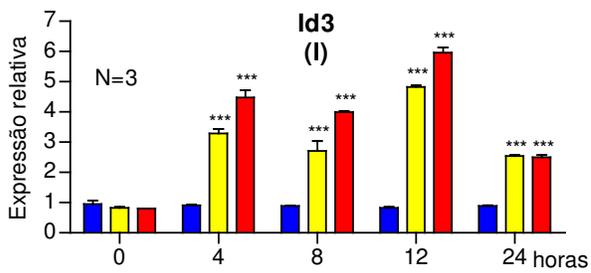
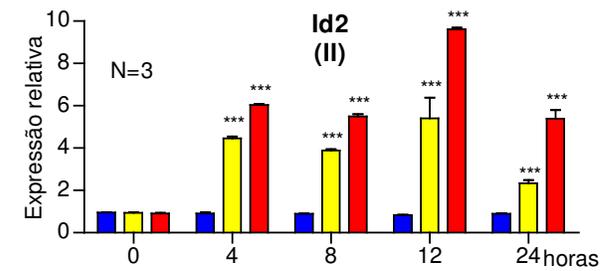
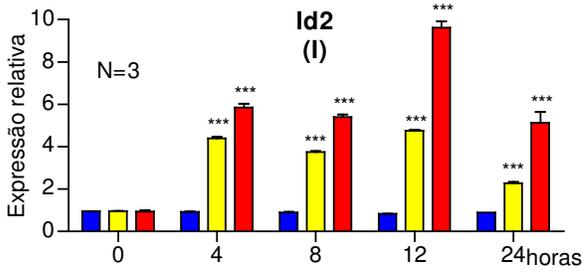
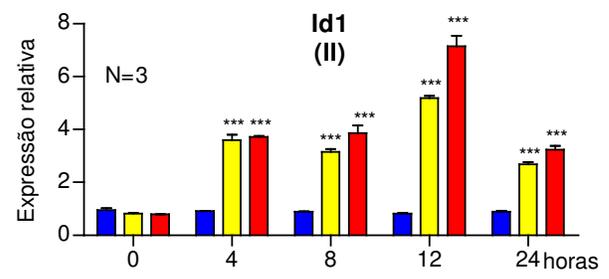
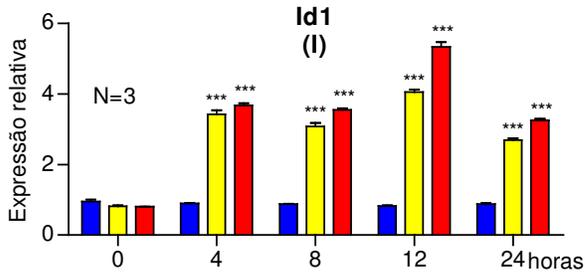
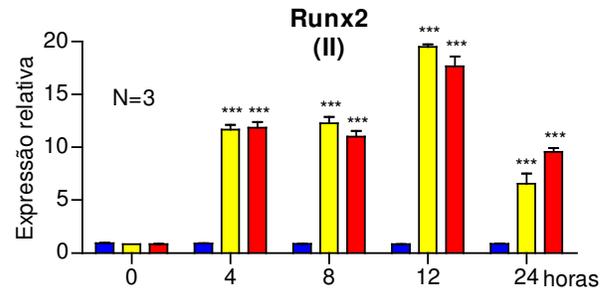
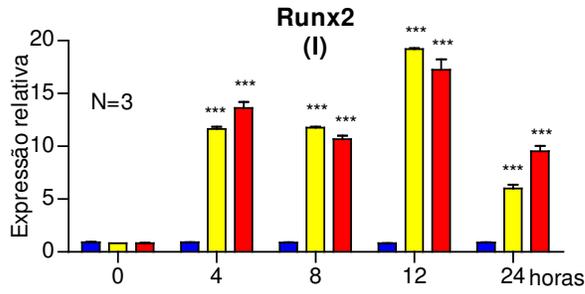
#### **4.3.2 Validação da expressão diferencial entre culturas de células C2C12 tratadas e não tratadas com rhBMP2 e rhBMP7.**

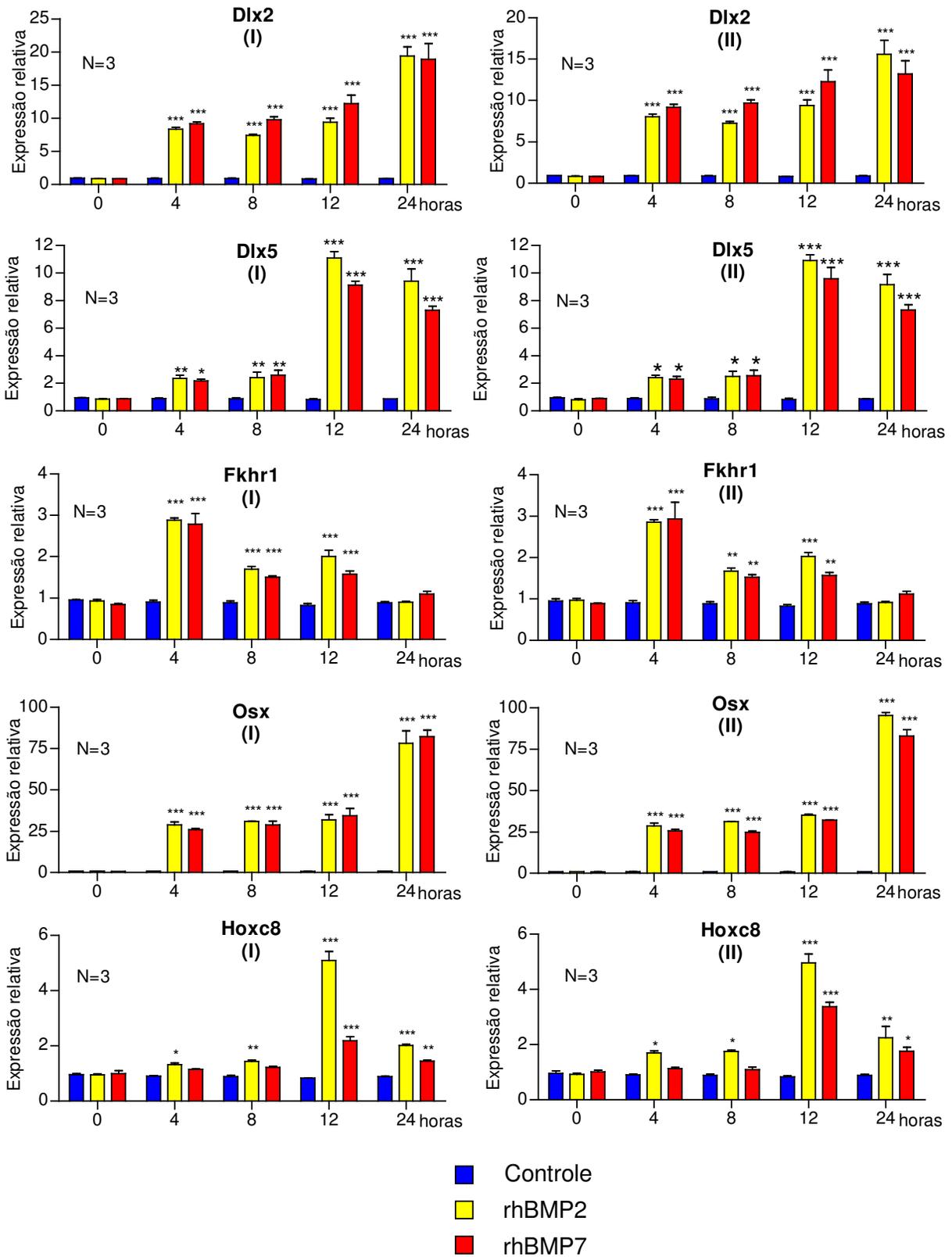
Os resultados dos ensaios de qPCR representam os valores médios obtidos das duplicatas. É importante assinalar que (I) corresponde aos cDNAs coletados nos diversos períodos de tempo do tratamento do primeiro experimento e (II) corresponde aos cDNAs coletados num segundo experimento, ou seja à duplicata biológica. Os valores estão representados na forma de expressão gênica relativa, calculada conforme descrito em Materiais e Métodos, sendo que a amostra tomada como referência corresponde às células C2C12 não-tratadas nos tempos 0, 4, 8, 12 e 24h. Os dados de qPCR foram normalizados através do algoritmo denominado geNorm, derivado do trabalho de Vandesompele J, et al (2002). Para as análises realizadas, utilizaram-se três genes controles: mGAPDH, mHPRT, e mHMBS, que foram ensaiados nas mesmas amostras de cDNAs nas quais se mediram a expressão dos transcritos de interesse. Para cada amostra, foi obtido um fator, o qual foi utilizado para a normalização dos dados.

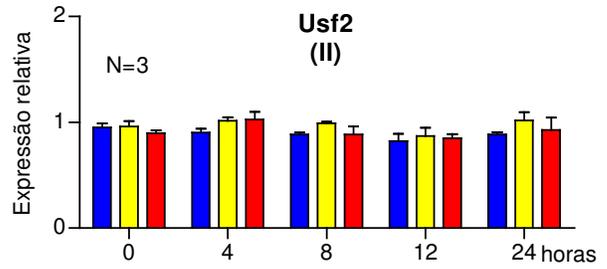
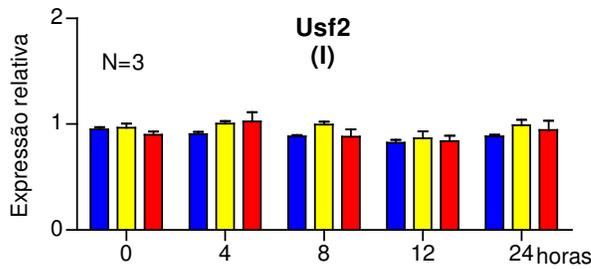
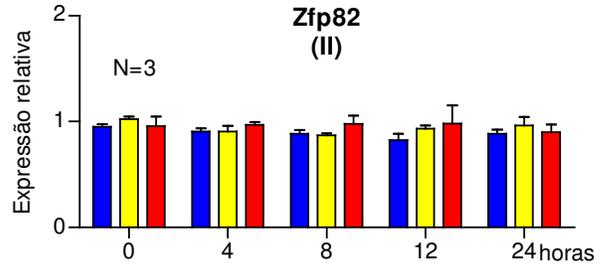
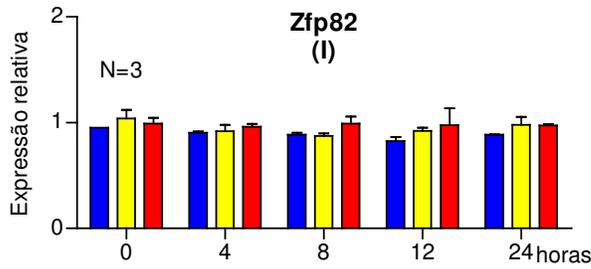
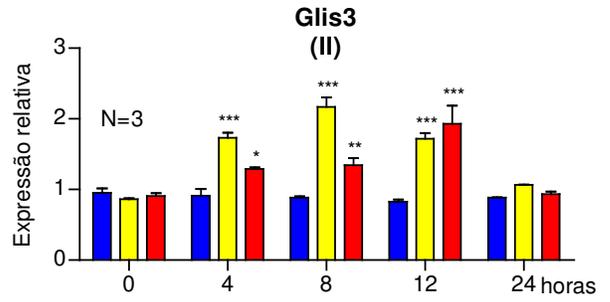
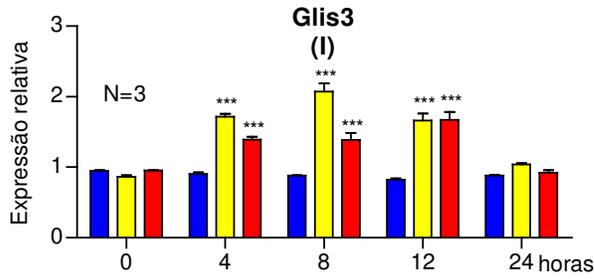
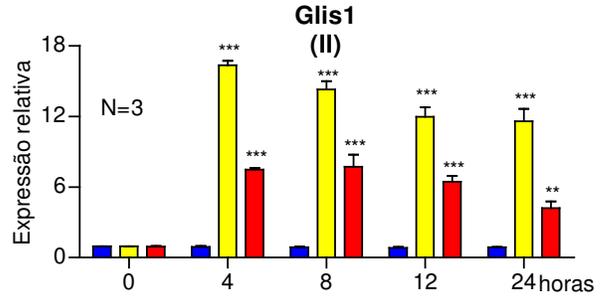
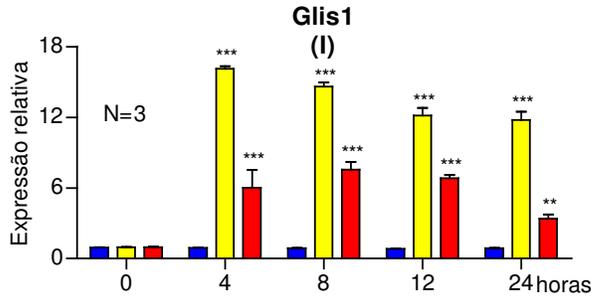
A Figura 12 mostra os gráficos de expressão relativa dos genes Runx2, Dlx1, Dlx2, Dlx5, Id1, Id2, Id3, Fkhr1, Osx, Zfp82, Hoxc8, Usf2, Glis1, Glis3 e Nab1 (15 no total), que participam da regulação transcricional de diversos genes envolvidos em processos celulares já conhecidos e outros ainda não caracterizados. Id1, Id2, Id3 e Nab1 correspondem às proteínas que se ligam a fatores de transcrição, modificando, com isso, a capacidade de união destes ao DNA, afetando, assim, a expressão de um ou mais genes. O resto dos genes presentes na figura correspondem a fatores de transcrição. O primeiro gene da figura é Runx2. É possível notar que este gene é induzido em níveis muito similares por rhBMP2 e rhBMP7. Após 4h de tratamento, este gene já apresenta indução, e o maior nível de expressão aparece 12h após

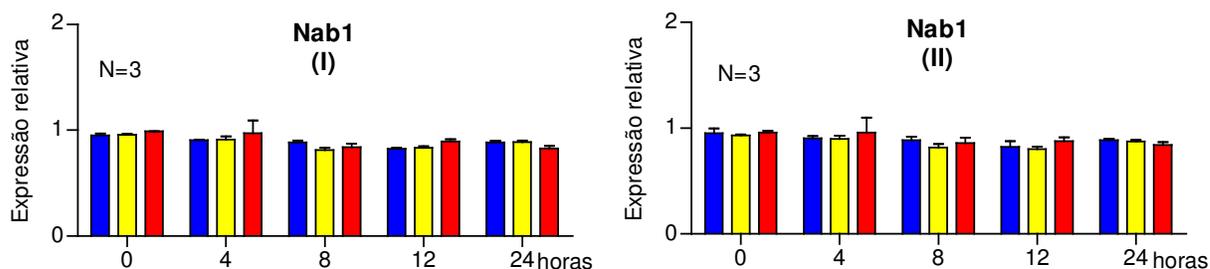
tratamento, decaindo até 24h, mas ainda sendo significativamente maior do que o controle neste ponto. Este mesmo perfil de expressão pode ser observado para os genes *Id1*, *Id2* e *Id3*, com a diferença que, no caso de *Id2*, o tratamento com *rhBMP7* indica um maior nível de expressão do que com *rhBMP2* nos tempos 4, 8, 12 e 24h, e no caso de *Id1* e *Id3* existe uma diferença de indução também nestes períodos de tempo, mas é menor do que aquela obtida para *Id2*. Os genes *Dlx1* e *Dlx2* são induzidos às 4h após o tratamento com ambas *rhBMPs*. *Dlx1* alcança sua expressão máxima 12h depois do início do tratamento, caindo ao valor basal às 24h, a diferença de *Dlx2*, que neste período, alcança seu maior valor de expressão. *Dlx5* é induzido por ambas *rhBMP2* de maneira muito similar, havendo um leve incremento entre 4-8h para aumentar 5 a 6 vezes após 12 e 24h. O gene *Fkhr1* é induzido pelo tratamento com as duas *rhBMPs*, apresentando seu máximo nível de expressão após 4h, o qual vai diminuindo até chegar bem próximo ao basal às 24h. No caso do gene *Osx*, o qual aparece como o gene mais induzido tanto por *rhBMP2* como *rhBMP7*, quanto ao nível de expressão relativa, sua expressão começa a aumentar 4h depois do tratamento e vai incrementando progressivamente até chegar ao máximo após 24h. É notório que os níveis de expressão alcançados pelo tratamento com ambas proteínas é muito similar no caso deste gene. O gene *Hoxc8* tem um leve aumento de expressão após 4h e 8h, chegando ao máximo às 12h e caindo às 24h após tratamento com *rhBMP2*. À diferença do tratamento com *rhBMP2*, *rhBMP7* gerou um aumento da expressão unicamente as 12 e 24h. Outra diferença foi que o tratamento com *rhBMP2* levou a uma expressão maior que o tratamento com *rhBMP7* no período de tempo correspondente às 12h. *Glis1* é induzido pelo tratamento com ambas proteínas a partir de 4h e sua expressão se mantém constante até 12h, diminuindo às 24h, mas, neste caso, claramente existe

um maior aumento na expressão do transcrito nas células tratadas com rhBMP2 do que naquelas tratadas com rhBMP7. Uma situação semelhante ocorre com o perfil de expressão de Glis3, que é um gene da mesma família que Glis1. Ele é induzido a partir das 4h depois do tratamento, e se mantém constante até 12h para logo diminuir sua expressão às 24h, mas à diferença de Glis1, o nível de expressão alcançado é muito similar nas células tratadas com rhBMP2 e rhBMP7. Por último, pode-se observar, claramente, que os genes Zfp82, Nab1 e Usf2, selecionados do microarranjo como possíveis genes diferencialmente expressos no período de tempo de 12h, não apresentam mudanças em seus níveis de expressão, em comparação àqueles registrados nas células não tratadas (controle), sendo estes muito próximos entre si, portanto, são descartados como diferencialmente expressos após o tratamento com rhBMP2 ou rhBMP7.



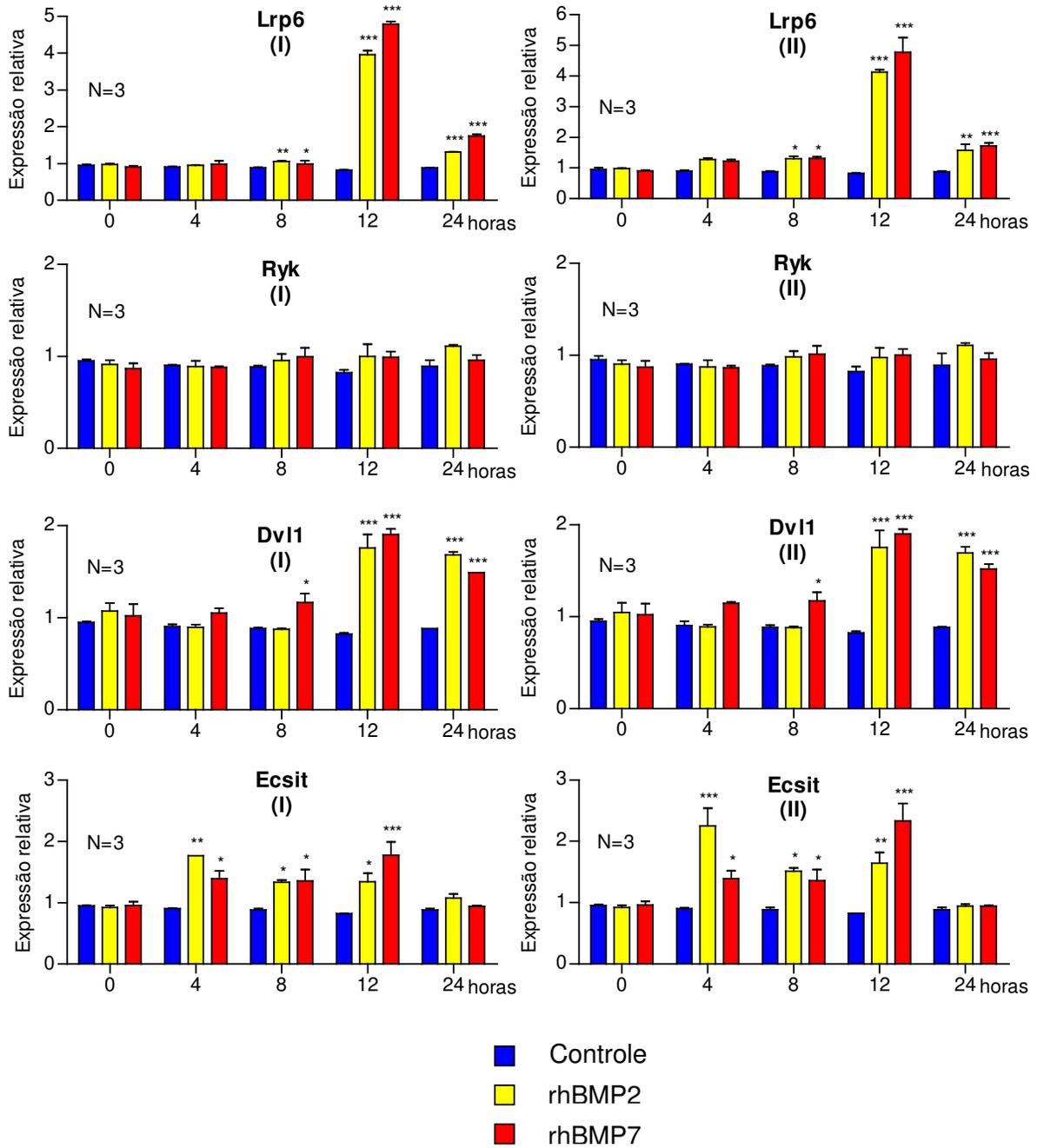


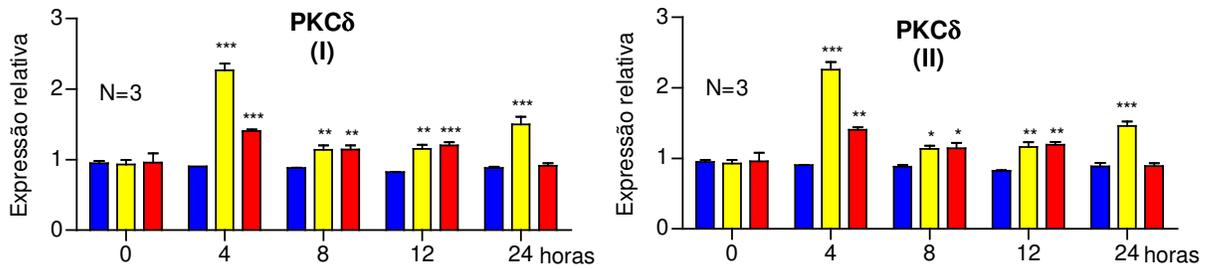




**Figura 12. Expressão, medida por qPCR, dos genes candidatos: Runx2, Id1, Id2, Id3, Dlx1, Dlx2, Dlx5, Fhkr1, Osx, Hoxc8, Glis1, Glis3, Zfp82, Usf2 e Nab1 induzidos por rhBMP2 e rhBMP7 durante a osteodiferenciação das células C2C12. (I)** representa os cDNAs obtidos após 0, 4, 8, 12 e 24h do tratamento no experimento número 1 e **(II)** cDNAs utilizados como duplicata biológica, correspondentes ao experimento número 2. Foram realizados 3 experimentos em duplicata para cada amostra, e os resultados foram normalizados pelo programa Genorm. Os asteriscos referem-se à significância estatística (“Two-Way” ANOVA, teste Bonferroni) entre o controle e o as células C2C12 tratadas com 200ng/ml de rhBMP2 ou rhBMP7 (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ). ■ Controle, ■ rhBMP2 e ■ rhBMP7.

A análise da expressão gênica, através de qPCR, de um segundo grupo de genes selecionados a partir dos dados obtidos dos microarranjos de DNA, é mostrada na Figura 13. Estes genes são Lrp6, Ryk, Dvl1, Ecsit e PKC $\delta$ , que estão relacionados, principalmente, às vias de sinalização celular que serão discutidas posteriormente. Todos estes genes, exceto de Ryk apresentam expressão diferencial em algum período de tempo como consequência do tratamento com rhBMPs. Como é possível notar na Figura 13, para o gene Lrp6, existe um leve aumento na expressão após 4h e 8h de tratamento com as duas rhBMPs, chegando ao máximo de expressão às 12h e posteriormente diminuindo até às 24h. Em relação a Dvl1, o tratamento com rhBMP7 causou um leve aumento na expressão já em 8h de tratamento enquanto que rhBMP2 não gerou este tipo de resposta. É possível notar que coincidentemente existe um máximo de expressão em 12h nas culturas tratadas com ambas proteínas recombinantes, que diminui levemente às 24h. A expressão do gene Ecsit aumenta após 4h de incubação das células com rhBMP2 e rhBMP7. Esta expressão descende levemente em 8h para logo aumentar no tempo de 12h, caindo, posteriormente, a níveis basais de expressão às 24h. No caso de PKC $\delta$ , onde os níveis de expressão não foram muito altos, o tratamento com rhBMP2 causou uma expressão maior já às 4h de tratamento em comparação a rhBMP7. No entanto, nos períodos de tempo de 8 e 12h, os níveis obtidos com ambos tratamentos foram muito similares. No último ponto, que corresponde às 24h, existe, ainda, uma expressão maior nas células tratadas com rhBMP2, em comparação ao controle e às células tratadas com rhBMP7, mas é evidente que a expressão deste gene devido à ação de rhBMP2 claramente vai diminuindo.

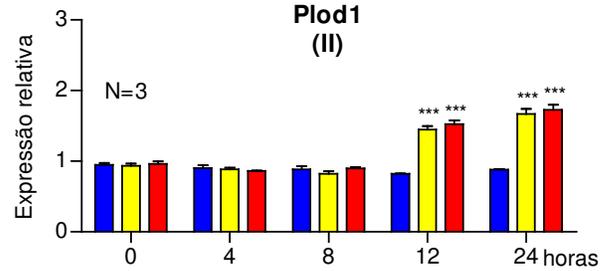
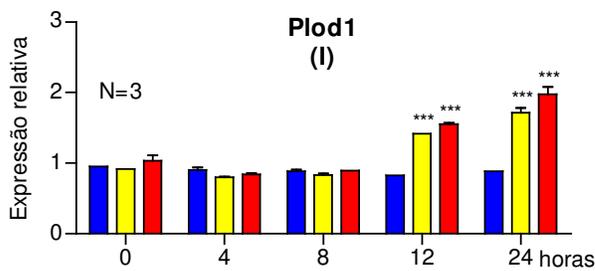
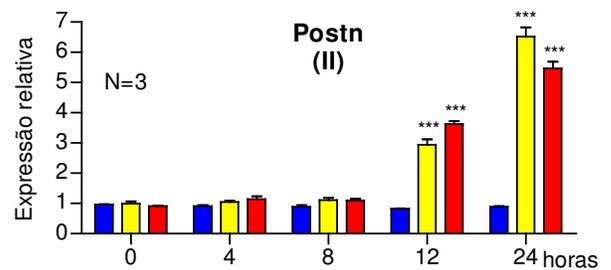
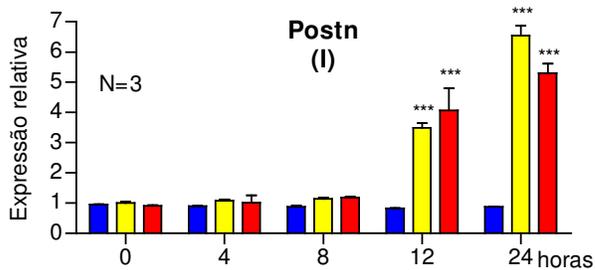
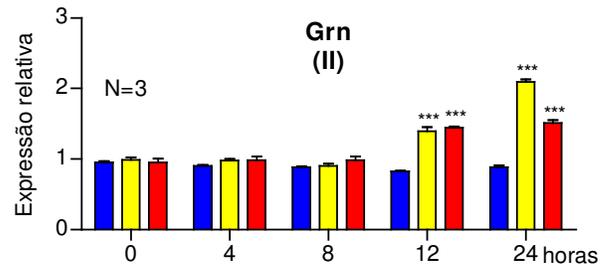
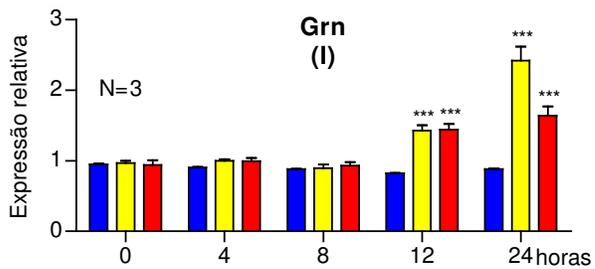
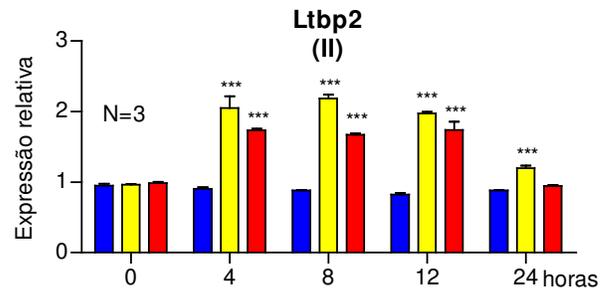
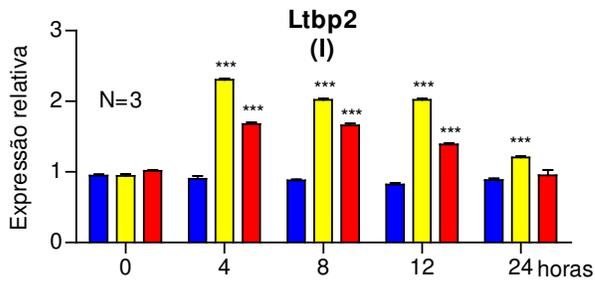
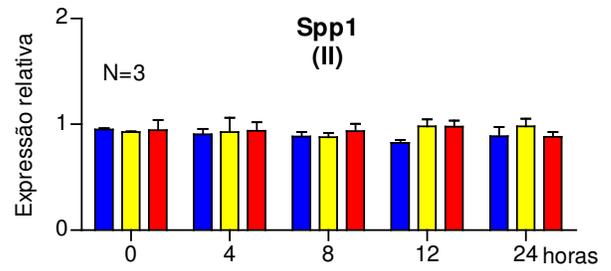
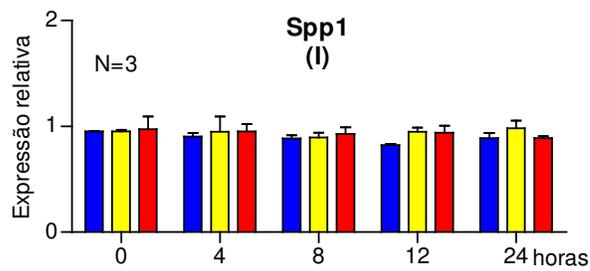




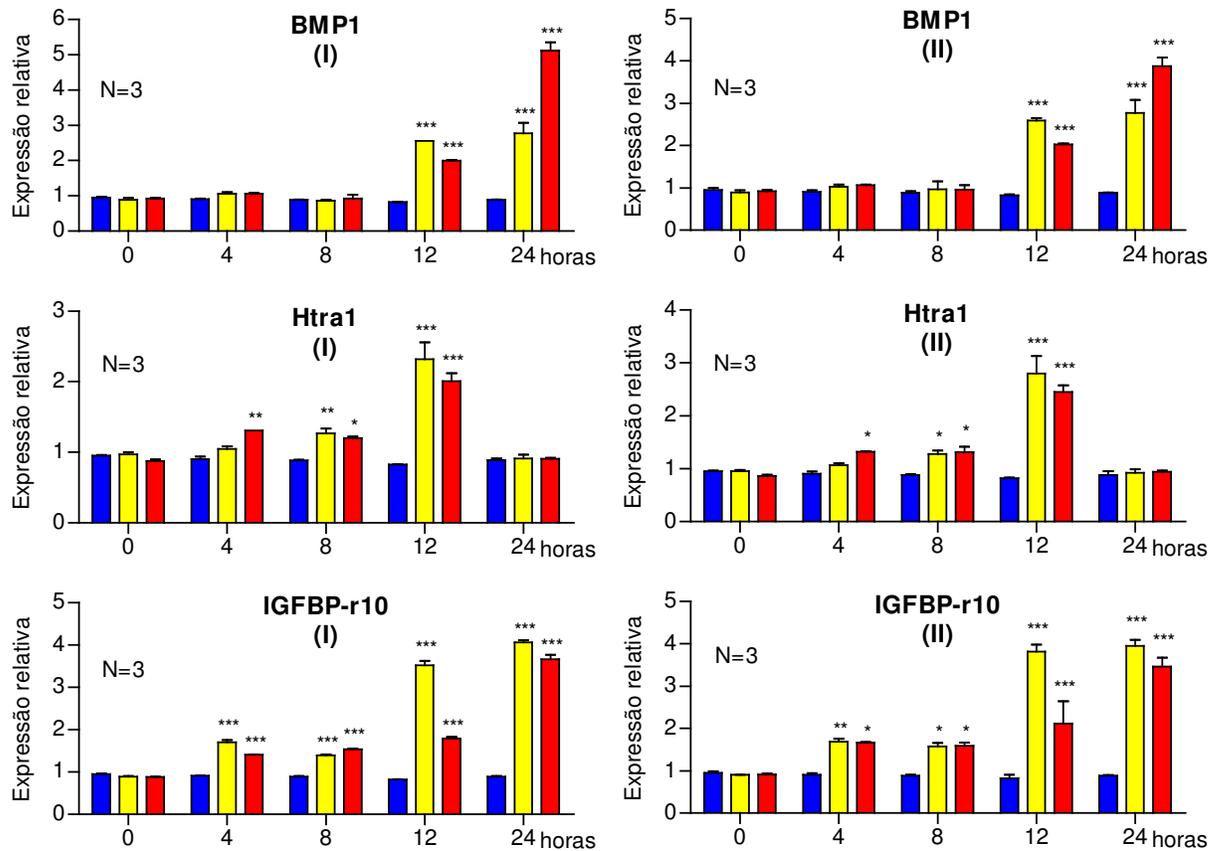
**Figura 13. Expressão, medida através de qPCR, dos genes candidatos: Lrp6, Ryk, Dvl1, Ecsit e PKCδ induzidos por rhBMP2 e rhBMP7 durante a osteodiferenciação das células C2C12. (I)** cDNAs obtidos após 0, 4, 8, 12 e 24h do tratamento no experimento número 1 e **(II)** cDNAs utilizados como duplicata biológica, correspondentes ao experimento 2. Foram realizados 3 experimentos em duplicata para cada amostra, e os resultados foram normalizados pelo programa Genorm. Os asteriscos referem-se à significância estatística (“Two-Way” ANOVA, teste Bonferroni) entre o controle e o as células C2C12 tratadas com 200ng/ml de rhBMP2 ou rhBMP7 (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ). ■ Controle, ■ rhBMP2 e ■ rhBMP7.

Outro grupo de genes selecionados a partir dos microarranjos de DNA para serem analisados através de qPCR é mostrado na Figura 14. Alguns destes genes correspondem a proteínas e enzimas, algumas das quais são secretadas pelas células, apresentando diferentes funções. Os genes que aparecem nesta figura são: Spp1, Ltp2, Grn, Postn, Plod1, BMP1, Htra1 e IGFBP-r10. Todos estes, exceto Spp1 foram, confirmados como sendo diferencialmente expressos após o tratamento com rhBMP2 e rhBMP7. Como se observa na Figura 14, a expressão de Ltp2 aumenta com o tratamento com as duas proteínas recombinantes após 4h de tratamento, mantendo uma expressão constante até 12h e diminuindo após 24h. Como pode ser visto, existe uma expressão levemente maior quando as células foram tratadas com rhBMP2 do que naquelas tratadas com rhBMP7. Um perfil de expressão muito similar em relação ao tempo de tratamento ocorre com Grn, Postn, Plod1 e BMP1, ainda que os valores de expressão relativa de cada um destes genes não sejam os mesmos. Coincidentemente, o aumento na expressão dos quatro genes ocorre após 12h de tratamento com rhBMP2 e rhBMP7 e continua aumentando ainda mais durante todo o tempo de análise que foi de 24h. No que se

diz respeito a Htra1, sua expressão, resultante do tratamento com as duas rhBMPs, começa a aumentar paulatinamente às 4h, mantendo-se em 8h, sendo que, às 12h chega ao seu valor máximo e, posteriormente, cai a níveis basais às 24h. O último gene deste grupo é IGFBP-r10. Como é observado na Figura 14, após 4h de tratamento com rhBMPs é produzido um aumento na expressão que se mantém constante em 8h. No tempo de 12h existe um incremento na expressão de IGFBP-r10, o qual é maior nas células tratadas com rhBMP2 do que com rhBMP7. Em 24h, o nível de expressão induzido por rhBMP2 é muito similar àquele obtido em 12h, ou seja, permanece praticamente o mesmo, com a diferença de que a expressão induzida por rhBMP7, em 24h é aproximadamente duas vezes maior do que no tempo de 12h.

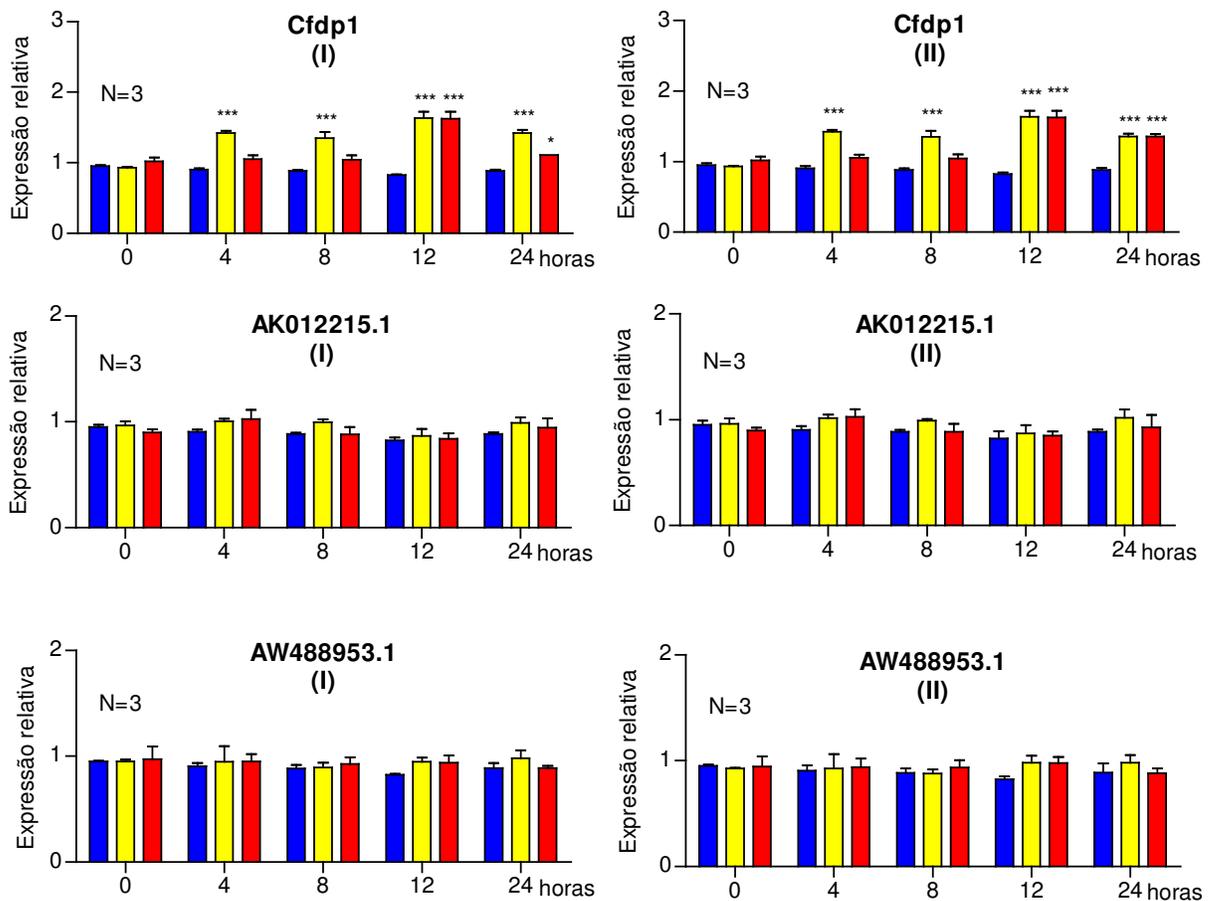


■ Controle  
■ rhBMP2  
■ rhBMP7



**Figura 14. Expressão, medida através de qPCR, dos genes candidatos: Spp1, Ltbp2, Grn, Postn, Plod1, BMP1, Htra1 e IGFBP-r10 induzidos por rhBMP2 e rhBMP7 durante a osteodiferenciação das células C2C12. (I) cDNAs obtidos após 0, 4, 8, 12 e 24h do tratamento no experimento número 1 e (II) os cDNAs utilizados como duplicata biológica, correspondentes ao experimento 2. Foram realizados 3 experimentos em duplicata para cada amostra, e os resultados foram normalizados pelo programa Genorm. Os asteriscos referem-se à significância estatística (“Two-Way” ANOVA, teste Bonferroni) entre o controle e o as células C2C12 tratadas com 200ng/ml de rhBMP2 ou rhBMP7 (\*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001). ■ Controle, ■ rhBMP2 e ■ rhBMP7.**

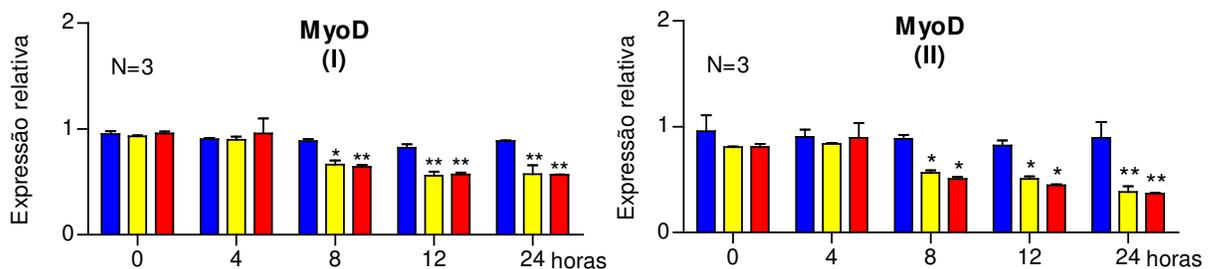
Na figura 15 são mostrados os resultados de qPCR do gene *Cfdp1* e de duas seqüências selecionadas dos microarranjos de DNA como sendo possivelmente expressas de forma diferencial durante a osteodiferenciação de células C2C12 induzida por rhBMP2 e rhBMP7. *Cfdp1* é induzido por rhBMP2 às 4h, mantendo sua expressão constante até 8h, para aumentar levemente às 12h e diminuir novamente às 24h a níveis similares àqueles detectados em 4h ou 8h. Por outro lado, a expressão deste mesmo gene aumenta significativamente somente em 12h de tratamento com rhBMP7 e diminui em 24h a um nível ainda superior em relação ao controle. Interessantemente, as seqüências AK012215.1 e AW488953.1 codificariam proteínas hipotéticas de função desconhecida, no entanto, analisando a figura fica evidente que ambas não são diferencialmente expressas durante a osteodiferenciação, pois os níveis de expressão são praticamente iguais àqueles obtidos a partir do controle.



**Figura 15. Expressão, medida através de qPCR, dos genes candidatos: Cfdp1, AK012215.1 e AW488953.1 induzidos por rhBMP2 e rhBMP7 durante a osteodiferenciação das células C2C12. (I) representa os cDNAs dos tempos 0, 4, 8, 12 e 24h do tratamento que correspondem ao experimento número 1 e (II) os cDNAs utilizados como duplicata biológica, correspondentes ao experimento 2. Foram realizados 3 experimentos em duplicata para cada amostra, e os resultados foram normalizados pelo programa Genorm. Os asteriscos referem-se à significância estatística (“Two-Way” ANOVA, teste Bonferroni) entre o controle e o as células C2C12 tratadas com 200ng/ml de rhBMP2 ou rhBMP7 (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ). ■ Controle, ■ rhBMP2 e ■ rhBMP7.**

#### 4.3.2.1 Análise da expressão de MyoD.

Como já foi mencionado, quando são tratadas com rhBMPs, as células C2C12 se diferenciam em osteoblastos, e quando não são tratadas com estas proteínas, se diferenciam em mioblastos. Um gene muito importante que participa na diferenciação mioblástica é o gene MyoD. Com o objetivo de analisar a expressão deste gene durante a osteodiferenciação de células C2C12 devido ao tratamento com rhBMP2 e rhBMP7, foi realizado um ensaio de qPCR para este gene com os cDNAs obtidos após diferentes períodos de tempo do tratamento. Como é possível observar na Figura 16, a expressão deste gene diminui a partir das 8h após o tratamento e continua diminuindo até 24h. Este resultado demonstra que a diferenciação muscular das células C2C12 é inibida pelo tratamento de rhBMP2 e rhBMP7, favorecendo, assim, a osteodiferenciação destas células.



**Figura 16. Análise da expressão do gene MyoD durante a osteodiferenciação das células C2C12 induzida por rhBMP2 e rhBMP7.** (I) representa os cDNAs dos tempos 0, 4, 8, 12 e 24h do tratamento que correspondem ao experimento número 1 e (II) os cDNAs utilizados como duplicata biológica, correspondentes ao experimento 2. Foram realizados 3 experimentos em duplicata para cada amostra, e os resultados foram normalizados pelo programa Genorm. Os asteriscos referem-se à significância estatística (“Two-Way” ANOVA, teste Bonferroni) entre o controle e o as células C2C12 tratadas com 200ng/ml de rhBMP2 ou rhBMP7 (\*p<0,05; \*\*p<0,01). ■ Controle, ■ rhBMP2 e ■ rhBMP7.

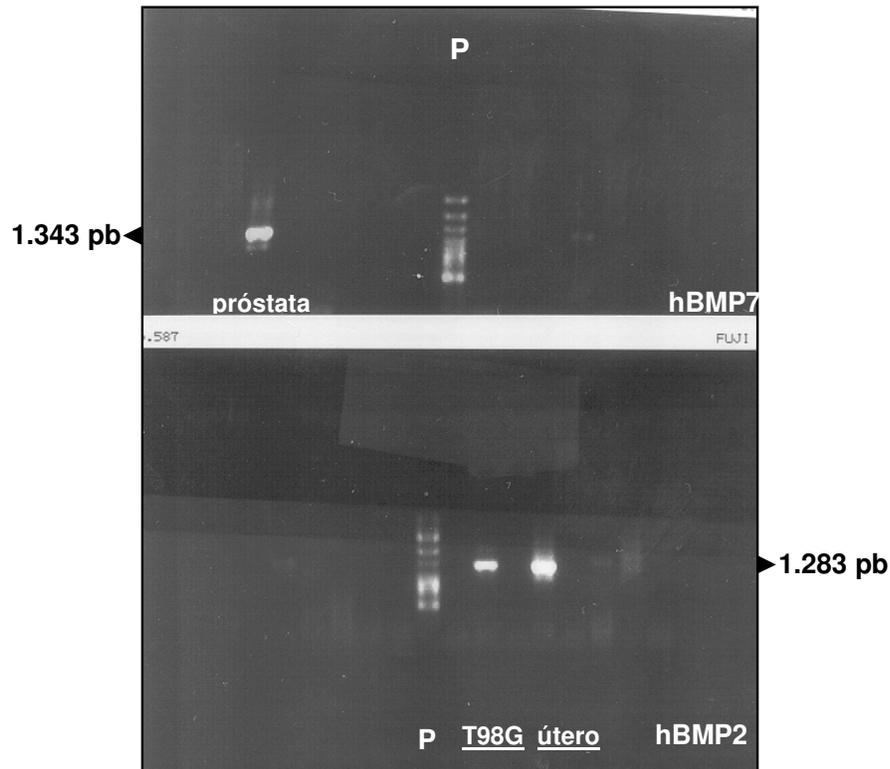
**Tabela 7. Resumo dos resultados da análise de expressão através de qPCR de diversos genes durante a osteodiferenciação das células C2C12 induzida por rhBMP2 e rhBMP7. S=Sim, N=Não, I=Induzido, R=Reprimido e S/V=Sem Variação.**

Gene	Diferencialmente Expresso	Induzido ou Reprimido
Dlx1	S	I
Dlx2	S	I
Dlx5	S	I
Id1	S	I
Id2	S	I
Id3	S	I
Runx2	S	I
Fkhr1	S	I
Osterix	S	I
Plod1	S	I
Spp1	N	S/V
Zfp82	N	S/v
BMP1	S	I
Cfdp1	S	I
Dvl1	S	I
Grn	S	I
Hoxc8	S	I
Htra1	S	I
Lrp6	S	I
Nab1F	N	S/V
Postn	S	I
Pkcδ	S	I
Ryk	N	S/V
Usf2	N	S/V
IGFBP-r10	S	I
Ltpb2	S	I
Glis1	S	I
Glis3	S	I
Ecsit	S	I
AK012215.1	N	S/V
AW488953.1	N	S/V
MyoD	S	R

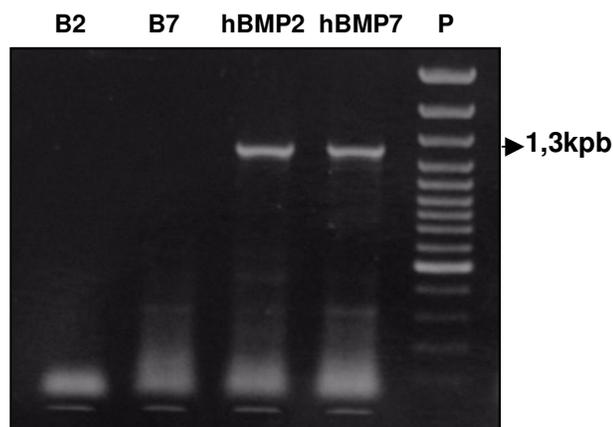
#### **4.4 Clonagem de hBMP2 e hBMP7.**

##### **4.4.1 Amplificação de hBMP2 e hBMP7 para clonagem no vetor pENTR2B.**

Com o objetivo de se obter a seqüência codificante para hBMP2 e hBMP7, foram feitas reações de PCR utilizando diversos cDNAs humanos, utilizando os “primers” BMP2F e BMP2R para hBMP2 e para hBMP7 os “primers” JCF7 e BMP7R. Com esta estratégia, como pode ser observado na Figura 17, foi obtida a amplificação específica para hBMP2 gerando a banda esperada de 1.283 pb, a partir de cDNA de útero (linhagem HeLa) e de glioblastoma (linhagem T98G) e para hBMP7 obteve-se a banda esperada de 1.343 pb, a partir de cDNA de próstata (linhagem DU145). Na Figura 18, se mostram os cDNAs amplificados que foram purificados e fosforilados para serem clonados no vetor pENTR2B. Para hBMP2, foi utilizado o cDNA de útero para esta amplificação, pois a amplificação foi mais forte com este tecido, conforme pode ser visto na Figura 17.



**Figura 17. Reação de PCR para amplificar hBMP2 e hBMP7 a partir dos cDNAs obtidos de:** linfócitos B, útero, pulmão, cólon, pescoço, osteosarcoma, melanoma, bexiga, próstata, Xeroderma pigmentosum, T98G (glioblastoma), A172 (glioblastoma), osteoblastos (hFOB), mama. A parte inferior corresponde à reação de PCR para amplificação de hBMP2 e a superior para hBMP7. Os cDNAs onde foi possível a amplificação destas hBMPs estão assinalados e sublinhados. **P:** Marcador de peso molecular de DNA.

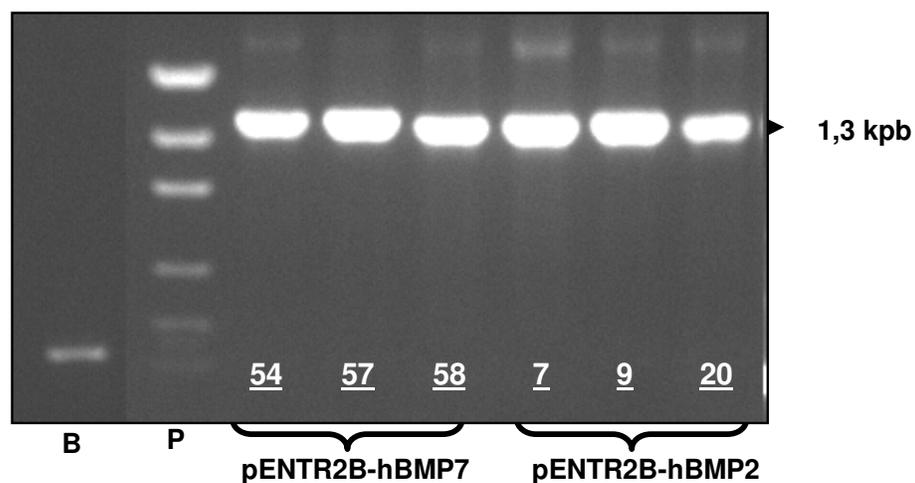


**Figura 18. Reação de PCR para amplificar hBMP2 e hBMP7 a partir de cDNA de útero e próstata respectivamente. B2 e B7:** controle negativo da reação. **P:** Marcador de peso molecular de DNA.

#### 4.4.2 Clonagem de hBMP2 e hBMP7 no vetor pENTR2B.

Os cDNAs ligados ao vetor pENTR2B foram inseridos em bactérias *E. coli* DH10B . As colônias obtidas foram analisadas por PCR de colônia.

A reação de PCR foi feita com os “primers” Attb1 e Attb2, conforme descrito em Materiais e Métodos. Foram obtidas 3 colônias positivas para cada caso, que apresentaram a amplificação esperada. Na Figura 19, observam-se as bandas de 1.310pb e 1.370pb, que correspondem à hBMP2 e hBMP7 respectivamente, o que demonstra, claramente, que ambos cDNAs foram clonados satisfatoriamente no vetor de clonagem pENTR2B. Posteriormente, estes plasmídeos foram seqüenciados confirmando a identidade de ambos cDNAs.



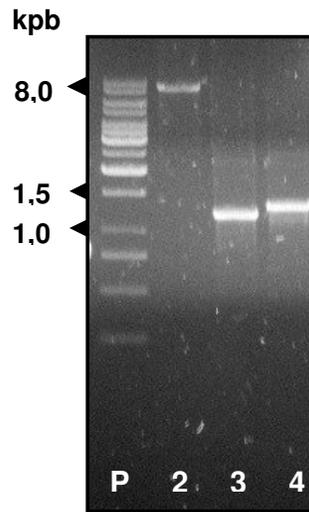
**Figura 19. Reação de PCR dos plasmídeos isolados a partir das colônias positivas para a ligação pENTR2B-hBMP2 (colônias 7, 9 e 20) e para a ligação pENTR2B-hBMP7 (colônias 54, 57 e 58). A reação foi feita conforme descrito em Materiais e Métodos. B: controle negativo da reação, P: Marcador de peso molecular de DNA.**

#### **4.4.3 Subclonagem de *rhBMP2* e *rhBMP7*.**

##### **4.4.3.1 Amplificação de *hBMP2* e *hBMP7* para subclonagem no vetor *pCMV-IRES-EGFP*.**

O vetor pENTR2B é simplesmente um vetor de clonagem, não permitindo a expressão de ambas *hBMPs*. Portanto, foi feita uma nova amplificação dos cDNAs correspondentes à *hBMP2* e *hBMP7*, para que estas duas seqüências fossem subclonadas no vetor de expressão pCMV-IRES-EGFP. Uma característica deste plasmídeo é que contém a seqüência IRES-EGFP situada após o gene clonado (neste caso *hBMP2* ou *hBMP7*), o que permite a expressão do gene de interesse e também de EGFP.

Para amplificar o cDNA de *hBMP2*, previamente clonado no vetor pENTR2B, utilizou-se o par de “primers” 2Xba e 2Bam, onde cada um apresenta o sítio de reconhecimento para a enzima de restrição XbaI e BamHI nas suas extremidades, respectivamente, para, logo após a amplificação, este ser digerido para sua subclonagem no vetor pCMV-IRES-EGFP, o qual havia sido digerido com as mesmas enzimas. Para amplificar a seqüência codificante de *hBMP7*, também clonada no vetor pENTR2B, utilizou-se o mesmo princípio de subclonagem, com exceção que foram usados os “primers” 7Xba e 7Bam. Como se pode observar na Figura 20, os produtos de amplificação obtidos para *hBMP2* e *hBMP7*, apresentaram os tamanhos esperados de 1.213pb e 1.318pb, respectivamente. Na segunda canaleta da mesma figura, pode-se observar uma banda de 8,0 kpb, que corresponde ao vetor pCMV-IRES-EGFP digerido com XbaI e BamHI.

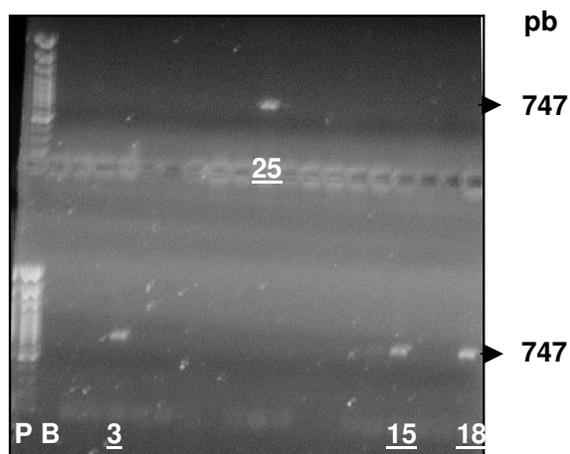


**Figura 20. Amplificação dos cDNAs correspondentes à hBMP2 e hBMP7 e digestão do vetor pCMV-IRES-EGFP.** As reações de PCR e de digestão com enzimas de restrição foram feitas conforme descrito em Materiais e Métodos. **P** padrão de peso molecular de DNA. **2:** vetor pCMV-IRES-EGFP digerido com XbaI/BamHI, de 8.0kpb. **3:** produto de amplificação para hBMP2, de 1.213 pb. **4:** produto de amplificação para hBMP7, de 1.318 pb.

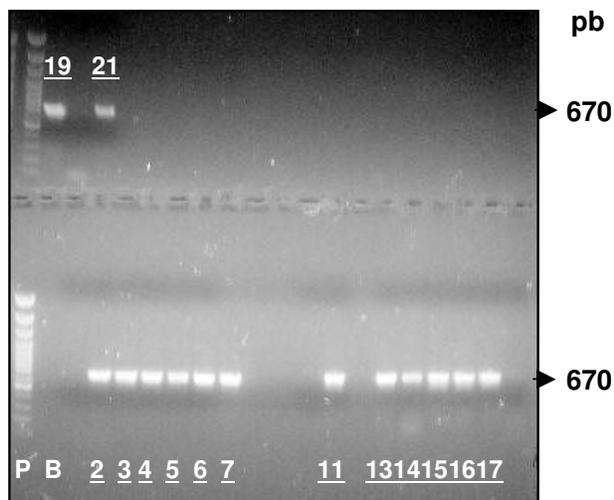
#### **4.4.3.2 Identificação dos clones positivos pCMV-hBMP2-IRES-EGFP e pCMV-hBMP7-IRES-EGFP através de PCR e seqüenciamento de DNA.**

Uma vez amplificados os fragmentos correspondentes aos cDNAs de hBMP2 e hBMP7, os mesmos foram ligados ao vetor pCMV-IRES-EGFP, e a reação de ligação foi utilizada para transformar bactérias *E. coli* XLB1 por eletroporação. As colônias positivas foram identificadas através de PCR, conforme descrito em Materiais e Métodos. As possíveis colônias pCMV-hBMP2-IRES-EGFP, obtidas da reação de ligação foram identificadas com os “primers” 21470R e pLPCXF, obtendo-se 4 colônias com o produto de amplificação esperado de 747pb, como pode ser observado na Figura 21. Nas colônias pCMV-hBMP7-IRES-EGFP, utilizou-se os “primers” 7680R e pLPCXF, obtendo-se 14 colônias positivas, cujo produto de amplificação foi de 670pb (Figura 22). Posteriormente, as colônias

bacterianas que apresentaram uma intensidade maior na amplificação, foram crescidas para purificar seu DNA plasmideal, e a reação de PCR foi novamente feita nestes plasmídeos para comprovar a identidade de cada colônia. Estes plasmídeos foram seqüenciados, demonstrando a identidade correta de cada cDNA. Posteriormente, foi purificado DNA plasmideal em escala média, para realizar transfecções estáveis em células HEK293T, visando à produção da respectiva proteína recombinante.



**Figura 21. Identificação de clones pCMV-hBMP2-IRES-EGFP através de PCR.** A reação de PCR foi feita conforme descrito em Materiais e Métodos. O produto de amplificação esperado é de 747pb. **P:** Padrão de peso molecular de DNA, **B:** controle negativo do PCR (sem “template”), **3, 15, 18 e 25** : clones pCMV-hBMP2-IRES-EGFP.



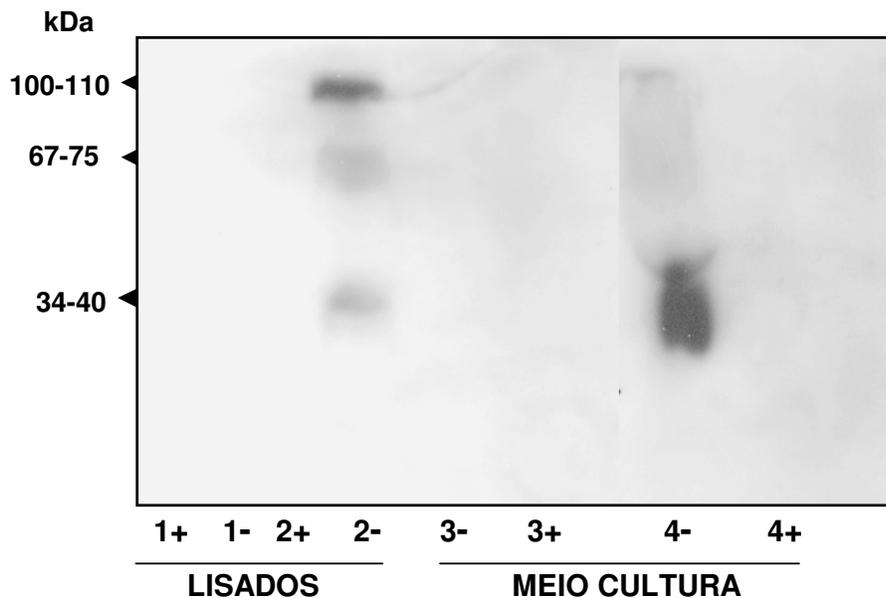
**Figura 22. Identificação de clones pCMV-hBMP7-IRES-EGFP através de PCR.** A reação de PCR foi feita conforme descrito em Materiais e Métodos. O produto de amplificação esperado é de 670pb. **P:** Padrão de peso molecular de DNA, **B** Controle negativo PCR. Colônias **2 3 4 5 6 7 11 13 15 16 17 19 21**: possíveis clones bacterianos recombinantes pCMV-hBMP7-IRES-EGFP.

#### **4.5 Análise da expressão de rhBMP2 e rhBMP7 na transfecção transitória de células HEK293T com pCMV-IRES-EGFP, pCMV-IRES-EGFP-hBMP2 e pCMV-hBMP7-IRES-EGFP.**

Após 48h da transfecção, tanto as células como também o meio de cultura foram coletados, como se descreve em Materiais e Métodos. A análise de expressão foi feita utilizando-se “Western Blot” dos lisados celulares e de proteína precipitada do meio de cultura, de cada condição. Foram aplicadas 100µg de proteína total em cada caso no gel de poliacrilamida. No caso da análise da expressão de rhBMP2, não foi possível detectar sinal da proteína, até o momento. Não está clara a razão deste resultado pois o cDNA foi sequenciado confirmando sua identidade e, por outro lado, o anticorpo funciona satisfatoriamente.

Como pode ser visto na Figura 23, nas células transfectadas com pCMV-hBMP7-IRES-EGFP, foi possível detectar a expressão da proteína tanto no lisado celular, com 3 bandas de aproximadamente 100, 67 e 34kDa, como no meio de cultura, onde só foi detectada a banda de 34kDa. A presença destas bandas não foi registrada no controle negativo (pCMV-IRES-EGFP), indicando a especificidade da expressão de rhBMP7. A banda de aproximadamente 100-110kDa corresponde à molécula precursora de rhBMP7 dimerizada (duas moléculas de ao redor de 50-55kDa ligadas por uma ponte dissulfeto intermolecular), enquanto que a banda de 67-75kDa representa um estado intermediário no processamento (uma banda de 50-55kDa ligada através da mesma ponte com uma molécula de aproximadamente 17-20kDa já clivada) e, por último, a banda de aproximadamente 34-40kDa (duas moléculas de aproximadamente 17-20kDa ligadas pela ponte dissulfeto), que é a molécula final do processamento, a qual é secretada pela célula e tem atividade biológica. Uma observação importante é que a banda correspondente à proteína

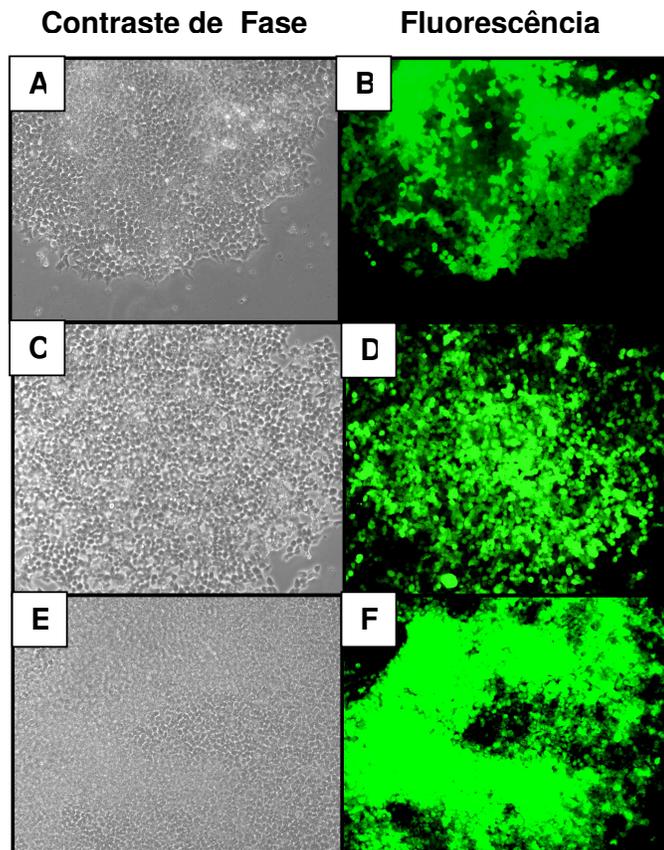
secretada para o meio de cultura apresenta uma intensidade maior do sinal, quando comparada com a intensidade da banda correspondente ao lisado celular, o que implica que a proteína funcional está sendo secretada eficientemente pelas células, concentrando-se principalmente fora destas. É importante assinalar que o anticorpo utilizado reconhece, especificamente, a região da proteína que contém a ponte dissulfeto, que forma o homodímero em cada caso (~ 110, 67 e 34kDa), sendo que o sinal é perdido quando as amostras de proteínas aplicadas ao gel contêm um agente redutor como  $\beta$ -mercaptoetanol.



**Figura 23. Análise da expressão de rhBMP7 nas células HEK293T transfectadas transitoriamente com pCMV-IRES-EGFP e pCMV-hBMP7-IRES-EGFP.** O “Western blot” foi feito conforme detalhado em Materiais e Métodos. **1 e 2:** lisados das células transfectadas com pCMV-IRES-EGFP e pCMV-hBMP7-IRES-EGFP, respectivamente. **3 e 4:** proteínas precipitadas do meio de cultura das células transfectadas com pCMV-IRES-EGFP e pCMV-hBMP7-IRES-EGFP, respectivamente. - amostra sem  $\beta$ -mercaptoetanol e + amostra com  $\beta$ -mercaptoetanol.

#### **4.6 Transfecção estável de células HEK293T com pCMV-IRES-EGFP, pCMV-hBMP2- IRES-EFGP e pCMV-hBMP7-IRES-EFGP.**

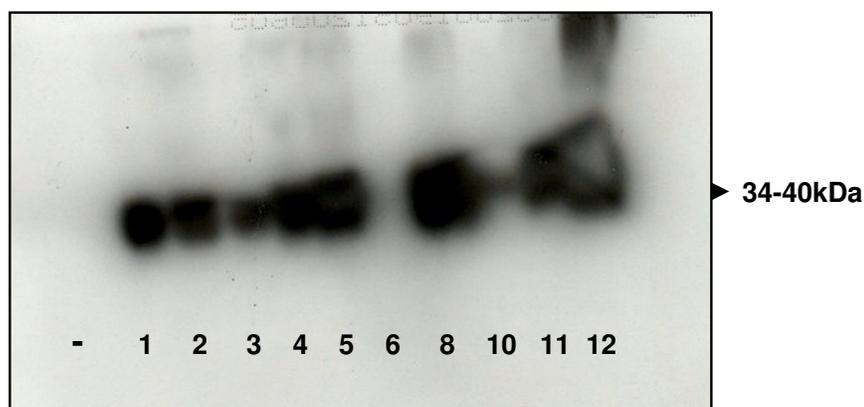
Em Materiais e Métodos, foi mencionado que as células HEK293T foram co-transfectadas estavelmente com pCMV-hIRES-EFGP + pTK-Hyg, pCMV-hBMP2-IRES-EFGP + pTK-Hyg, e pCMV-hBMP7-IRES-EFGP + pTK-Hyg. O vetor pTK-Hyg é utilizado para gerar células resistentes ao antibiótico higromicina, uma vez que este vetor contém um gene de resistência, que codifica uma enzima que modifica este antibiótico, eliminando seu efeito na célula. Este vetor foi introduzido nas células HEK293T numa proporção de 1:20 em relação ao vetor contendo o gene de interesse (0,3µg:6µg) em cada caso. Assim, com a pressão seletiva, através da presença de higromicina no meio de cultura, os clones celulares resistentes a este antibiótico deveriam expressar o gene de interesse, neste caso rhBMP2 e rhBMP7. Na Figura 24, mostram-se um dos diversos clones estáveis isolados para cada caso (pCMV-hIRES-EFGP + pTK-Hyg, pCMV-hBMP2-IRES-EFGP + pTK-Hyg e pCMV-hBMP7-IRES-EFGP + pTK-Hyg). Além destes clones serem resistentes a higromicina, como pode ser visto na figura, eles são capazes de expressar a proteína EGFP, a qual é detectada através de microscopia de fluorescência, o que, possivelmente, também implicaria a expressão das rhBMPs nestas células, pois a orientação do mRNA que será traduzido, é hBMP2 ou hBMP7-IRES-EGFP. No caso dos clones pCMV- hBMP7-IRES-EFGP + pTK-Hyg, existe uma maior probabilidade de expressão, devido ao fato que o resultado do “Western blot” da transfecção transitória de células HEK293T com pCMV-hBMP7-IRES-EFGP demonstrou a presença de rhBMP7 no lisado celular assim como no meio de cultura das células (Figura 23).



**Figura 24. Clones estáveis de células HEK293T co-transfectadas com pCMV-IRES-EGFP + pTK-Hyg, pCMV-hBMP2-IRES-EGFP + pTK-Hyg, e pCMV-hBMP7-IRES-EGFP + pTK-Hyg.** A seleção de células HEK293T resistentes à higromicina é detalhada em Materiais e Métodos. O mesmo campo foi visualizado através de microscopia de fase e fluorescência, correspondendo a um de diversos clones celulares obtidos em cada caso. **A e B:** clone de células HEK293T transfectadas com pCMV-IRES-EGFP + pTK-Hyg. **C e D:** clone de células HEK293T transfectadas com pCMV-hBMP2-IRES-EGFP + pTK-Hyg. **E e F:** clone estável de células HEK293T transfectadas com pCMV-hBMP7-IRES-EGFP + pTK-Hyg. Aumento 40X.

#### **4.7 Análise da expressão ao nível de proteína dos clones estáveis pCMV-hBMP7-IRES-EGFP.**

A expressão de rhBMP7 dos clones gerados a partir da transfecção estável de células HEK293T foi analisada através de “Western blot” conforme descrito em Materiais e Métodos. Para esta análise, utilizaram-se amostras correspondentes às proteínas presentes no meio de cultura, ou seja proteínas secretadas pelas células. Na Figura 25, é possível apreciar que dos 10 clones celulares analisados, 9 apresentam a banda de aproximadamente 34-40kDa que corresponde a rhBMP7, onde aparentemente os clones 1, 4, 5, 8 e 12 exibem uma maior expressão.

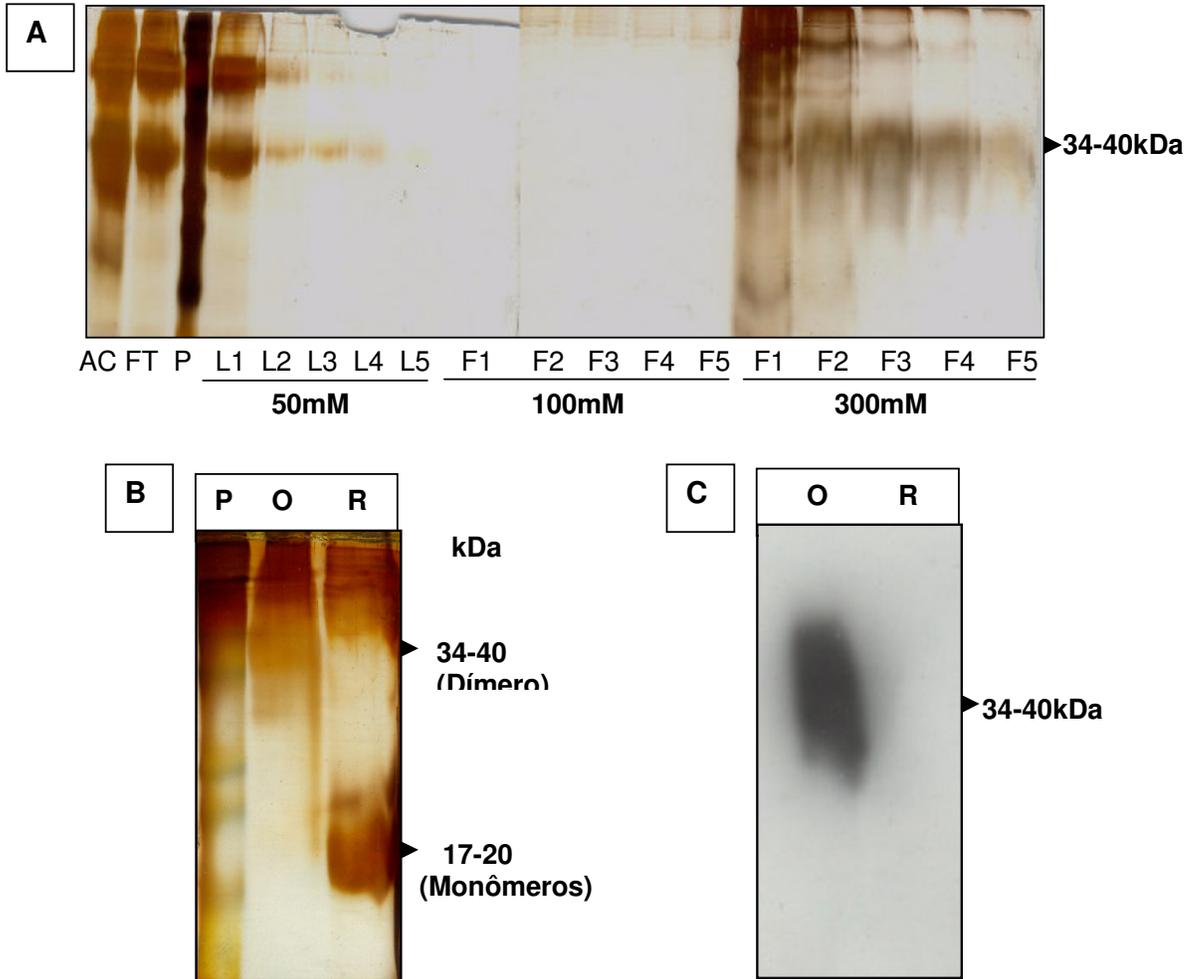


**Figura 25. Expressão de rhBMP7 presente no meio de cultura dos clones de células 293TpCMV-hBMP7-IRES-EGFP.** O “Western blot” foi feito conforme detalhado em Materiais e Métodos. – corresponde ao controle negativo, ou seja, um clone 293TpCMV-IRES-EGFP (vetor vazio) e 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 11, 12 correspondem aos clones estáveis de células pCMV-hBMP7-IRES-EGFP.

#### **4.8 Purificação de rhBMP7 do meio de cultura do clone estável de células 293TpCMV-hBMP7-IRES-EGFP N°12.**

Com o objetivo de se ter maior segurança em relação à expressão de rhBMP7 em células HEK293T, foi realizada uma purificação do meio condicionado destas células, utilizando uma coluna de troca iônica, conforme descrito em Materiais e Métodos. Foi utilizado o clone número 12, pois se observa uma maior expressão de rhBMP7 neste clone através de ensaios de “Western blot”. A Figura 26A corresponde a um gel de poliacrilamida 12% corado com prata mostrando as diferentes frações obtidas como produto da purificação. Observa-se que a banda de aproximadamente 34-40kDa começa a aparecer claramente no gel a partir da fração 2 (F2) até a fração 5 (F5) quando o tampão utilizado contém 300mM NaCl. Posteriormente, estas frações F2 a F5 foram misturadas e concentradas para serem analisadas novamente através de SDS PAGE 12%. A idéia para este novo gel foi a de aplicar nele uma parte da amostra com tampão de amostra sem  $\beta$ -mercaptoetanol (oxidada) e outra parte com tampão contendo esta substância (reduzida). Na Figura 26B, é possível observar que quando a amostra está oxidada (O) existe uma banda de tamanho entre 34-40kDa que corresponde a rhBMP7 dimerizada, lembrando que a dimerização é devida a uma ponte dissulfeto intermolecular. Esta banda desaparece completamente quando a amostra está reduzida, pois a ponte é quebrada pelo tratamento com um agente redutor e desta forma aparece outra banda de 17-20kDa que corresponde aos monômeros de rhBMP7. Por último a Figura 26C, mostra o “Western blot” realizado em paralelo ao gel mostrado em B. O sinal positivo aparece unicamente quando a amostra está oxidada (dímeros) e não quando está reduzida (monômeros), uma vez que o anticorpo reconhece somente a proteína rhBMP7 dimerizada. Estes ensaios

permitem ter certeza que a proteína expressa pelo clone de células 293TpCMV-hBMP7-IRES-EGFP N°12 é rhBMP7.



**Figura 26. Purificação de rhBMP7 do meio de cultura do clone transfectante estável 293TpCMV-hBMP7-IRES-EGFP N°12.** A purificação de rhBMP7 foi feita conforme detalhado em Materiais e Métodos. **A)** gel de poliacrilamida 12% corado com prata, contendo as diferentes frações obtidas após a purificação. **AC:** Amostra antes de passar pela coluna, **FT:** Amostra que passou pela coluna, **P:** Padrão de peso molecular, **L1-L5:** frações que correspondem às lavagens da coluna com tampão contendo 50mM NaCl, **F1-F5:** frações que correspondem às eluições com tampão contendo 100 e 300mM respectivamente. **B)** Gel de poliacrilamida 12% corado com prata onde foram aplicadas as frações eluídas com o tampão que contém 300mM NaCl. **O:** amostra oxidada que não contém  $\beta$ -mercaptoetanol no tampão de amostra e **R:** amostra reduzida que contém  $\beta$ -mercaptoetanol. **C)** “Western blot” do gel mostrado em **B).**

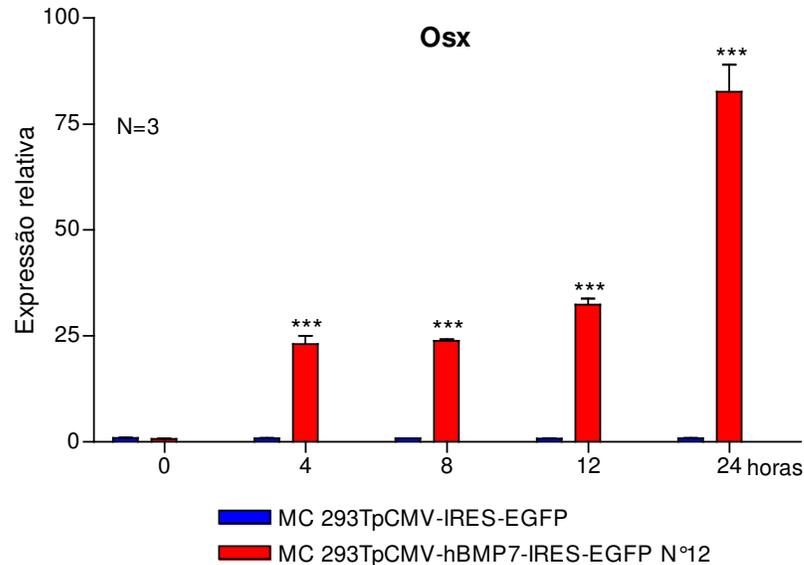
#### **4.9 Osteodiferenciação “in vitro” e “in vivo” utilizando o meio de cultura das células 293TpCMV-hBMP7-IRES-EGFP N°12.**

##### **4.9.1 Osteodiferenciação “in vitro”.**

###### **4.9.1.1 Análise da expressão de *Osx* por qPCR.**

Conforme mostrado anteriormente, foi possível gerar vários clones estáveis após a transfecção de células HEK293T com o vetor pCMV-hBMP7-IRES-EGFP, com a capacidade de expressar rhBMP7. Além disso, utilizando um dos clones, a proteína presente no meio de cultura deste, foi purificada através de cromatografia de troca iônica e identificada como sendo rhBMP7. No entanto, detectar a proteína através destas técnicas não significa que esta possua atividade biológica. Para garantir que a rhBMP7 produzida tem funcionalidade, os meios condicionados (MCs) dos clones 293TpCMV-hBMP7-IRES-EGFP N°12 e 293TpCMV-IRES-EGFP (vetor vazio) foram coletados para serem utilizados no ensaio de osteodiferenciação de células C2C12, conforme descrito em Materiais e Métodos. Um primeiro ensaio funcional destes MCs, foi a análise da expressão diferencial utilizando qPCR. Para isto, foi escolhido o gene *Osx*, que mostrou a maior expressão relativa nos ensaios de qPCR das células C2C12 tratadas com rhBMP2 e rhBMP7 comerciais. Como pode ser observado na Figura 27, existe um aumento na expressão de *Osx* nas células tratadas com o MC das células 293TpCMV-hBMP7-IRES-EGFP N°12 em comparação ao tratamento com o MC das células 293TpCMV-IRES-EGFP. Comparando as Figuras 12 e 27, é evidente que o perfil de expressão do gene *Osx* nas células C2C12, induzido por rhBMP7 presente no meio de cultura das células HEK293T, é muito similar ao obtido quando utilizou-se a proteína comercial, indicando que a rhBMP7 produzida em nosso laboratório apresenta a

mesma capacidade de induzir a expressão de *Osx* em células C2C12, da mesma forma que rhBMP2 e rhBMP7 comerciais.

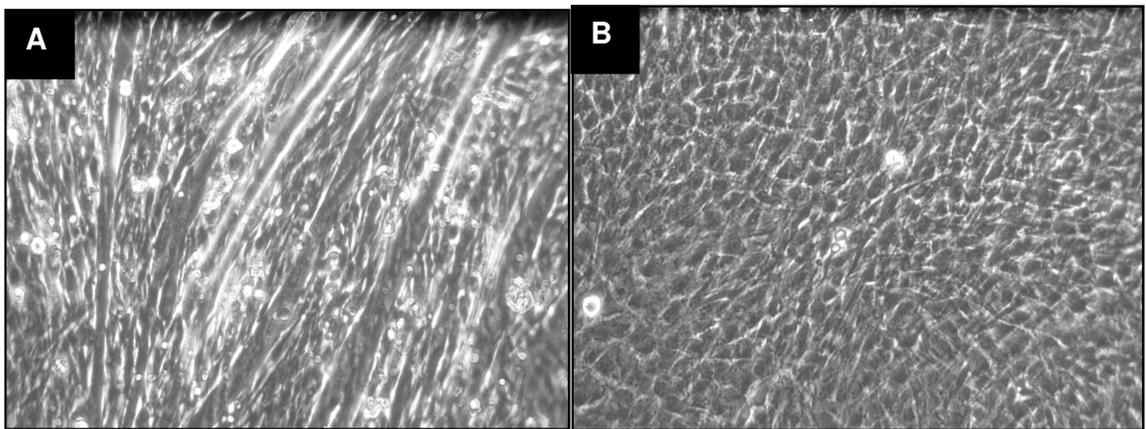


**Figura 27. Análise da expressão do gene *Osx* após tratamento das células C2C12 com o meio condicionado (MC) das células 293TpCMV-hBMP7-IRES-EGFP N°12.** Análise realizada através de qPCR utilizando os cDNAs correspondentes aos períodos de tempo 0, 4, 8, 12 e 24h após tratamento. Foram realizados 3 experimentos em duplicata para cada amostra, e os resultados foram normalizados pelo programa Genorm. Os asteriscos referem-se à significância estatística (“Two-Way” ANOVA, teste Bonferroni) entre o controle e o as células C2C12 tratadas com MC das células 293TpCMV-hBMP7-IRES-EGFP N°12 (\*\*\*) $p < 0,001$ ).

#### **4.9.1.2 Mudanças morfológicas das células C2C12.**

Seguindo com os ensaios que permitem assegurar que a rhBMP7 produzida pelas células 293TpCMV-hBMP7-IRES-EGFP N°12 possui as mesmas propriedades que a proteína comercial, foi realizado um ensaio que permite visualizar as diferenças morfológicas durante a osteodiferenciação, após o tratamento de células C2C12 com o MC de 293TpCMV-hBMP7-IRES-EGFP N°12. O experimento é detalhado em Materiais e Métodos. Como pode ser observado na Figura 28, após 8 dias de tratamento, as células C2C12 tratadas com MC das células 293TpCMV-IRES-EGFP (controle negativo) diferenciaram em mioblastos,

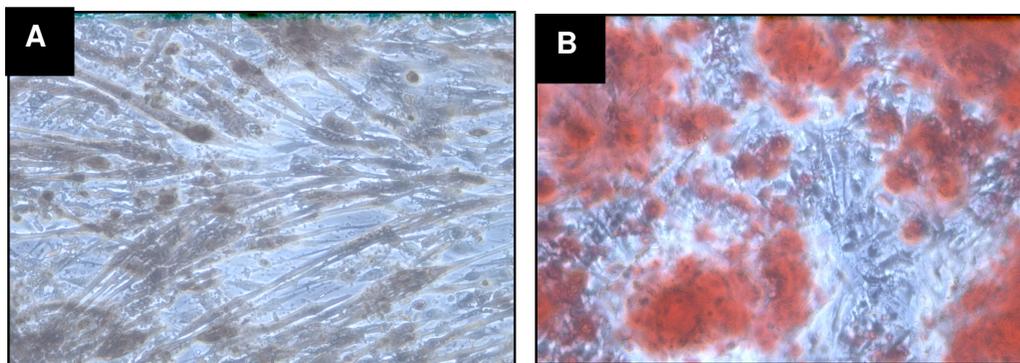
sendo evidente a presença de miotubos que são característicos deste tipo de célula. A mesma figura mostra que quando as células C2C12 foram tratadas com MC das células 293TpCMV-hBMP7-IRES-EGFP N°12, o tratamento foi capaz de inibir sua diferenciação para célula muscular, e induzir uma morfologia muito similar a osteoblasto. Este ensaio demonstra que a proteína rhBMP7 secretada pelo clone 293TpCMV-hBMP7-IRES-EGFP N°12, tem a capacidade de induzir diferenciação osteoblástica *“in vitro”*. Embora a Figura 28 mostre resultados do 8º dia do tratamento, estas diferenças morfológicas foram notadas a partir do 4º dia do tratamento.



**Figura 28. Análise funcional do meio condicionado (MC) das células 293TpCMV-hBMP7-IRES-EGFP N°12 utilizando o modelo de diferenciação osteoblástica de células C2C12.** O ensaio é detalhado em Materiais e Métodos. A figura mostra as culturas visualizadas através de microscopia óptica no 8º dia do tratamento. **A:** culturas tratadas com MC controle (de células 293TpCMV-IRES-EGFP) e **B** culturas tratadas com o MC das células que expressam rhBMP7 (293T pCMV-hBMP7-IRES-EGFP N°12). O experimento é representativo de 3 experimentos independentes.

#### 4.9.1.3 *Coloração com Vermelho de Alizarina.*

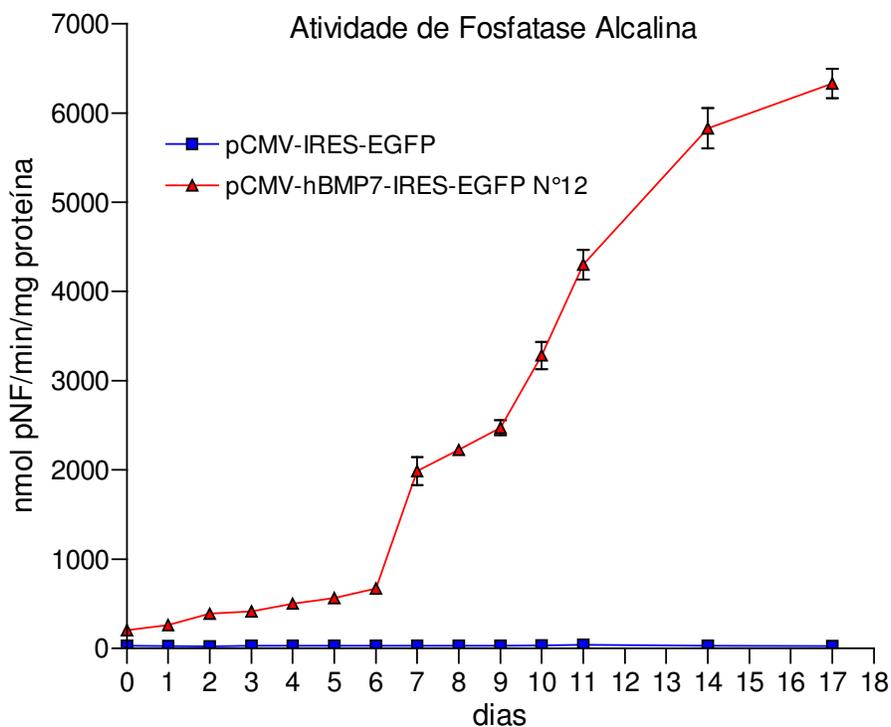
O ensaio mostrado acima é uma boa evidência morfológica da osteodiferenciação induzida por rhBMP7 produzida pelas células 293TpCMV-hBMP7-IRES-EGFP N°12. No entanto, um ensaio que permite assegurar a propriedade osteoindutora desta proteína é a coloração com Vermelho de Alizarina, um corante que se liga, especificamente, a  $Ca^{2+}$  presente em matrizes extracelulares secretadas por osteoblastos. As células C2C12 foram tratadas com os MCs das células 293TpCMV-IRES-EGFP e 293TpCMV-hBMP7-IRES-EGFP N°12 da mesma forma que na seção anterior. Após 14 dias de tratamento, como pode ser visto na Figura 29, o corante está ligado, especificamente, nas células C2C12 tratadas com MC das células 293TpCMV-hBMP7-IRES-EGFP N°12 e não nas células C2C12 tratadas com MC do controle. Portanto, este ensaio ratifica a capacidade de rhBMP7 presente no MC do clone 293TpCMV-hBMP7-IRES-EGFP N°12 de induzir osteodiferenciação nas células C2C12.



**Figura 29. Ensaio de Coloração com Vermelho de Alizarina durante a diferenciação osteoblástica de células C2C12 induzida com o meio condicionado (MC) de 293TpCMV-hBMP7-IRES-EGFP N°12 .** O ensaio é detalhado em Materiais e Métodos. A figura mostra as culturas visualizadas através de microscopia óptica no 14º dia do tratamento. **A:** culturas tratadas com meio condicionado do controle negativo (MC de 293TpCMV-IRES-EGFP); **B:** culturas tratadas com MC das células que expressam rhBMP7 (293TpCMV-hBMP7-IRES-EGFP N°12). O experimento é representativo de 3 experimentos independentes.

#### **4.9.1.4 Ensaio de atividade de fosfatase alcalina das células C2C12.**

Este ensaio foi feito da mesma maneira citada na secção 4.1.2.2, com a diferença que, neste caso, as células foram incubadas com o MC de 293TpCMV-IRES-EGFP e 293TpCMV-hBMP7-IRES-EGFP N°12 ao invés de rhBMPs comerciais. Como mostra a Figura 30, a atividade da enzima começa a aumentar significativamente após 2 dias e vai aumentando progressivamente até 17 dias, indicando a osteodiferenciação produzida por rhBMP7 presente no MC do clone 293TpCMV-hBMP7-IRES-EGFP N°12. Note-se que o gráfico obtido é muito semelhante àquele mostrado na Figura 8, na qual foram utilizadas rhBMP2 e rhBMP7 comerciais para o ensaio de atividade. Através deste tipo de ensaio, utilizando concentrações conhecidas de rhBMP7 comercial, foi possível estimar a concentração de rhBMP7 produzida por 293TpCMV-hBMP7-IRES-EGFP N°12 que é de aproximadamente, 234ng/ml  $\pm$  25,6.



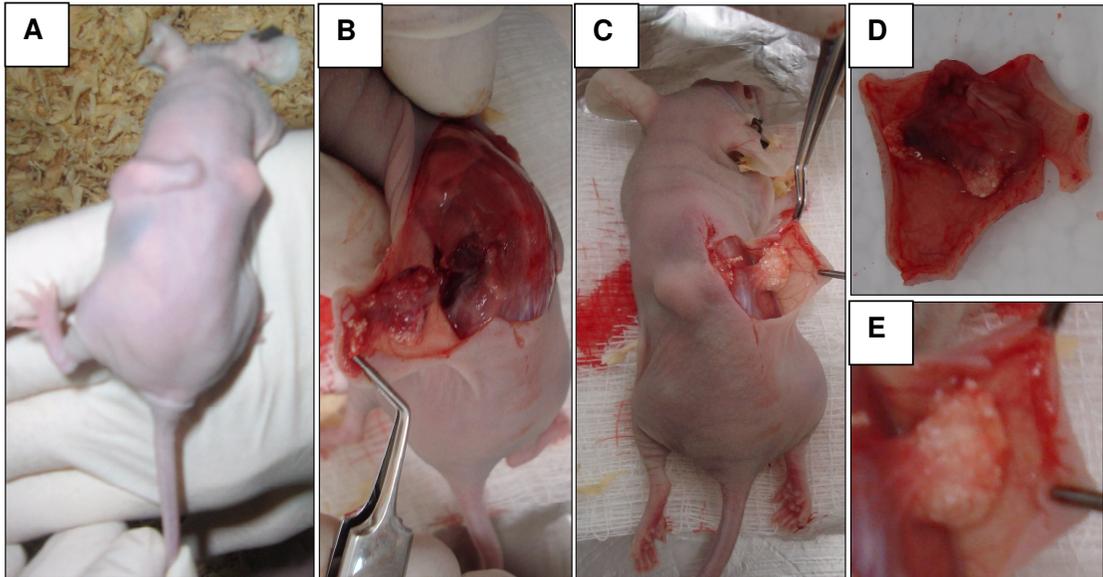
**Figura 30. Atividade de Fosfatase Alcalina das células C2C12 tratadas com o meio condicionado (MC) das células 293TpCMV-hBMP7-IRES-EGFP N°12.** O ensaio foi feito conforme descrito em Materiais e Métodos. O gráfico mostra a atividade da enzima (nmol pNF/min/mg proteína) durante a osteodiferenciação das células C2C12 induzida por rhBMP7 presente no MC das células pCMV-hBMP7-IRES-EGFP N°12. Este resultado é representativo de 3 experimentos diferentes.

#### **4.9.2 Osteodiferenciação “*in vivo*”.**

Os resultados mostrados acima demonstraram a capacidade do MC das células que expressam rhBMP7 de induzir diferenciação osteoblástica das células C2C12. Estes resultados representam uma análise “*in vitro*”, portanto, foi desenhado um experimento, descrito em Materiais e Métodos, com o propósito de se investigar se rhBMP7 presente no meio de cultura das células 293TpCMV-hBMP7-IRES-EGFP N°12 poderia induzir osteodiferenciação com a formação óssea “*in vivo*”. A Figura 31 mostra os resultados de um camundongo, de um total de quatro, que recebeu implantes contendo 1mg de proteína total presente tanto no MC das células 293TpCMV-IRES-EGFP (controle) como das células 293TpCMV-hBMP7-IRES-EGFP N°12, após 3 semanas de tratamento. Na parte A, que mostra o animal antes de ser sacrificado, pode-se observar, no lado esquerdo, que contém o implante com as proteínas presentes no MC das células expressando rhBMP7, uma grande massa de tecido, em comparação ao lado direito que contém apenas o implante com as proteínas presentes no MC das células que não expressam rhBMP7. A parte B da Figura 31, mostra o lado esquerdo do animal aberto após o sacrifício, onde é possível apreciar a formação de um tecido compacto e irrigado formado ao redor do implante. É importante assinalar, que neste tecido, foi possível constatar que sua aparência e dureza são muito similares àquelas encontradas no tecido ósseo. Em contraste, no lado direito do animal, representado na parte C da figura, é possível verificar que não ocorreu formação de qualquer tipo de tecido no implante, observando-se apenas o implante da mesma forma como quando foi colocado no camundongo.

Finalmente, as partes D e E da Figura 31, correspondem aos implantes retirados do camundongo que contém proteínas com rhBMP7 e não contém

rhBMP7, respectivamente. Novamente, observam-se as diferenças, sendo que em D, se observa uma massa vascularizada de tipo óssea, enquanto que em E, se observa unicamente o implante sem nenhum tipo de massa ou tecido. Estes resultados mostram que rhBMP7 presente no MC das células 293TpCMV-hBMP7-IRES-EGFP N°12 é capaz de induzir formação ectópica de osso.



**Figura 31. Osteodiferenciação “in vivo” utilizando o meio condicionado (MC) das células 293TpCMV-hBMP7-IRES-EGFP N°12.** Implantes contendo 1mg de proteína total presente no MC das células 293TpCMV-IRES-EGFP e 293TpCMV-hBMP7-IRES-EGFP N°12 foram introduzidos no subcutâneo de camundongos *nude* BALB/c, conforme detalhado em Materiais e Métodos. **A:** animal antes de ser sacrificado, **B:** animal após sacrifício, mostrando o implante colocado no lado esquerdo mais 1mg de proteína total do meio das células 293TpCMV-hBMP7-IRES-EGFP N°12; **C:** animal após sacrifício, com implante colocado no lado direito mais 1mg de proteína total do MC das células 293TpCMV-IRES-EGFP, **D e E:** implantes retirados do lado esquerdo e direito respectivamente. A figura mostra um animal de um total de quatro, que apresentaram características muito similares.

## 5. DISCUSSÃO.

### 5.1 C2C12 como modelo de diferenciação osteoblástica.

Em Resultados, mostrou-se que quando células de cordão umbilical humano (cultura primária) são tratadas com rhBMP2 ou rhBMP7, elas se diferenciaram em células com características morfológicas muito similares com as presentes em osteoblastos diferenciados (Figuras 5 e 6). Este resultado demonstrou que, provavelmente, existem células mesenquimais nestas culturas que são alvos de rhBMPs, pois, é conhecido que osteoblastos têm origem mesenquimal (Huang, Yang *et al.*, 2007). Isto gerou, nesse momento, um grande interesse em analisar as mudanças ao nível transcricional durante a osteodiferenciação induzida por rhBMPs nestas células, por tratar-se de um modelo de osteodiferenciação humano. Infelizmente, não foi possível reproduzir estes resultados, mesmo utilizando-se diversas fontes de células mesenquimais humanas como: células de gordura, de medula, e as já comentadas células de cordão umbilical. As causas da falta de reprodutibilidade deste experimento com células humanas não são muito claras, mas poderiam dever-se a mudanças durante a cultura das células, com uma diminuição das células mesenquimais, ou à alguma alteração na expressão dos receptores que se ligam às BMPs ou a algum tipo de inibição desta ligação.

Devido a este inconveniente e com o objetivo de estabelecer um modelo válido de estudo que permitisse identificar os genes expressos durante a diferenciação osteoblástica induzida por rhBMP2 e rhBMP7, foi adotada a linhagem murina C2C12. Estas células se diferenciam rapidamente em mioblastos, formando miotubos e produzindo proteínas que se encontram no músculo. O tratamento destas células com BMP2 ou BMP7 inibe sua diferenciação em células musculares, favorecendo a osteodiferenciação, que se manifesta com aumento da atividade de

fosfatase alcalina e produção de osteocalcina, características próprias de osteoblastos, enquanto que o nível de MyoD e myogenin, importantes na diferenciação muscular, diminui bastante (Katagiri, Yamaguchi *et al.*, 1994).

Células C2C12 foram tratadas com rhBMP2 e rhBMP7 comerciais para confirmar experimentalmente que são capazes de se diferenciar em osteoblastos após o tratamento com rhBMPs. Nossos dados (Figura 16), revelaram que a expressão de MyoD, foi reprimida durante o tratamento, como previamente descrito, confirmando-se, assim, que BMPs regulam negativamente a transcrição deste fator de transcrição miogênico.

Paralelamente, as diferenças morfológicas, observadas na Figura 7, após 4 dias de tratamento e o resultado do ensaio de atividade da fosfatase alcalina (Figura 8), confirmaram que o modelo C2C12 é válido para ser utilizado na busca dos genes diferencialmente expressos devido ao tratamento destas células com rhBMP2 e rhBMP7.

## **5.2 Análise dos genes diferencialmente expressos durante a osteodiferenciação de células C2C12 induzida por rhBMP2 e rhBMP7.**

Os resultados obtidos dos microarranjos de DNA representam somente um período de tempo de tratamento, que corresponde às 12h. A escolha deste período se deve ao fato que, entre 8 e 16h de tratamento, utilizando-se a linhagem C2C12, se encontrariam, majoritariamente os genes que comprometeriam estas células a se diferenciarem em osteoblastos (Balint, Lapointe *et al.*, 2003). Um ponto que deve ser comentado é que a análise através de microarranjos de DNA representa somente um experimento, que foi o primeiro a ser realizado. Este experimento passou adequadamente pelos standards de qualidade do fabricante. Inicialmente, a idéia era

a de realizar uma duplicata para identificar os genes diferencialmente expressos através de microarranjos. Uma segunda hibridização foi feita com o mesmo protocolo que a primeira, mas, infelizmente algum problema ocorreu durante o experimento, gerando resultados não confiáveis. O principal inconveniente foi que os microarranjos têm “spots” que não contêm amostra, não devendo, portanto, apresentar qualquer tipo de sinal. No entanto, estes “spots” apresentaram fortes sinais no segundo experimento. Portanto, este “background” não permite confiar nos resultados obtidos. Além disso, não foi possível normalizar os dados e, logicamente, foi impossível uní-los com os resultados do primeiro experimento. Desta forma, as análises posteriores dos resultados representam os dados obtidos da primeira hibridização.

Como foi mostrado em Resultados, os genes candidatos são aqueles que foram ativados e reprimidos tanto pelo tratamento das células C2C12 com rhBMP2 como com rhBMP7. O valor de corte foi 2,5 vezes mais ou menos expressos. Este valor foi escolhido devido ao fato que um gene importantíssimo em osteodiferenciação, o gene Runx2 (Hassan, Tare *et al.*, 2006) apresentou um “fold change” de 2,939 e 3,165 após o tratamento das células C2C12 com rhBMP2 e rhBMP7, respectivamente. Desta forma, foi possível filtrar os dados levando em conta uma expressão próxima a Runx2 (Tabela 5). O interesse principal foi selecionar os genes ativados que se relacionassem, principalmente, com desenvolvimento, regulação da transcrição, diferenciação osteoblástica, formação/remodelação óssea e transdução de sinais que possam ser importantes em osteodiferenciação. Evidentemente, tanto rhBMP2 como rhBMP7, ativaram muitos genes além dos envolvidos em osteogênese, devido ao fato destas proteínas serem muito importantes na formação de diversos tecidos. No caso de rhBMP7, por exemplo, foi possível verificar, no

resultado do microarranjo de DNA, a expressão aumentada de muitos genes importantes no desenvolvimento de olho e rim. Isto reafirma o fato desta proteína participar na formação destes órgãos (Patel e Dressler, 2005). Ainda que existam resultados muito interessantes fora do contexto da formação óssea, o interesse deste estudo, como já comentado, é a identificação dos genes que participam em processos celulares relacionados à osteogênese.

Continuando, assim, com a análise, os genes selecionados a partir dos microarranjos foram classificados de acordo com sua função: 17 genes envolvidos em transcrição, 6 que participam em vias de sinalização, 8 genes que representam proteínas secretadas com diversas funções e duas seqüências que codificariam proteínas hipotéticas de função desconhecida. A expressão diferencial destes possíveis candidatos, foi analisada através de qPCR, que será discutido a seguir.

### ***5.3 Genes confirmados por qPCR e sua relação com osteodiferenciação e formação óssea.***

Após a seleção dos genes candidatos regulados pelo tratamento das células C2C12 com rhBMPs, estes foram submetidos à confirmação utilizando qPCR. Neste sentido, é importante assinalar que esta análise foi realizada em períodos de tempo de tratamento adicionais (0, 4, 8 e 24h pós-tratamento) além do período de tempo estudado no microarranjo de DNA (12h pós-tratamento). Além disso, como foi mencionado anteriormente, os RNAs dos distintos períodos de tempo utilizados neste estudo representam um primeiro experimento (I), onde os resultados dos microarranjos foram válidos, e uma replicata biológica (II), na qual os resultados obtidos na segunda hibridização não puderam ser levados em conta, devido à(s) falha(s) experimental(s), já comentadas. Mesmo assim, estes RNAs foram utilizados

para sintetizar os respectivos cDNAs (II) e, assim, analisar a expressão dos genes selecionados através de outra técnica, como o qPCR, comparando os resultados com aqueles obtidos a partir da análise com os cDNAs (I) que representam o primeiro experimento, e, assim, confirmar os genes diferencialmente expressos nas células C2C12 devido ao tratamento com rhBMP2 e rhBMP7 comerciais. A importância dos genes confirmados através de qPCR é discutida a seguir, sendo que compreendem quatro categorias: transcrição, sinalização celular, proteínas associadas à matriz extracelular e outras proteínas.

### ***5.3.1 Fatores de transcrição e proteínas relacionadas.***

Como é conhecido, a maioria dos diversos processos que acontecem nas células, está relacionada com a regulação transcricional dos genes que são importantes em tais processos e, obviamente a diferenciação osteoblástica não escapa a isto. Esta diferenciação é consequência de um sinal gerado após a interação entre BMP e seu receptor, ativando e reprimindo uma série de genes, entre os quais se contam fatores de transcrição e proteínas que se ligam a estes modificando positiva ou negativamente sua função. Os dados obtidos da análise dos microarranjos evidenciou 17 genes que participam na regulação da transcrição e que podem estar envolvidos em osteoindução. Em dois deles (Hoxa4 e Barx1), a expressão diferencial não foi confirmada pois não foi possível a sua amplificação, mesmo tentando vários pares de “primers”. Como se observa na Figura 12, a expressão de 15 deles foi analisada, sendo 12 deles confirmados por qPCR.

O primeiro gene confirmado foi Runx2, com sua expressão sendo induzida já às 4h de tratamento por ambas rhBMPs. Este é um fator de transcrição de grande importância em condrogênese e osteogênese, que se expressa durante o

desenvolvimento do esqueleto (Hassan, Tare *et al.*, 2006). Além de ser induzido por BMPs, sua expressão pode ser regulada por TGF $\beta$ 1 e FGF2, fatores que também participam de formação óssea (Ryoo, Lee *et al.*, 2006). Este fator de transcrição é essencial para a diferenciação de células mesenquimais em osteoblastos. Sua importância na formação de osso é evidente devido ao fato que camundongos “knockout” Runx2<sup>-/-</sup> carecem de osteoblastos funcionais e de osso mineralizado (Gu, Zhang *et al.*, 2004). Além disso, mutações neste gene resultam em displasia cleidocraniana, que se caracteriza por uma alteração do desenvolvimento ósseo (Mundlos, Otto *et al.*, 1997). Runx2 pode induzir diretamente a expressão de genes relacionados com osteoblastos como: osteocalcina, colágeno tipo I e osteopontina, ligando-se em seus respectivos promotores (Yamaguchi, Komori *et al.*, 2000). BMP2 e Runx2 atuam sinergisticamente estimulando osteodiferenciação “*in vitro*” e “*in vivo*” (Yang, Wei *et al.*, 2003) e a fosforilação de Runx2 pela via MAPK ativada por FGF2, parece ser importante na indução da expressão de osteocalcina (Xiao, Jiang *et al.*, 2002). Levando em conta estes antecedentes, é evidente a importância deste gene na diferenciação osteoblástica e conseqüente formação óssea, e o fato de ser diferencialmente expresso nas células C2C12 tratadas com rhBMP2 e rhBMP7 (Figura 12), permite ter uma maior confiança em relação aos outros genes selecionados neste estudo.

Os genes Id1, Id2 e Id3, que codificam proteínas chamadas ID (“inhibitor of DNA binding”), como pode ser visto na Figura 12, foram induzidos pelo tratamento das células C2C12 com as duas proteínas recombinantes. As proteínas ID são um grupo distinto da família “basic helix-loop-helix” (bHLH), carecendo da região básica importante na ligação ao DNA e na ativação transcricional, mas sendo capazes de se ligar aos fatores de transcrição que contêm domínios bHLH (Locklin, Riggs *et al.*,

2001). Estes genes foram identificados em mioblastos, onde inibem a ligação de fatores de transcrição miogênicos como MyoD, por exemplo, aos elementos específicos reconhecidos pela região básica destes, particularmente à seqüência CANNTG (Peng, Kang *et al.*, 2004). Estas proteínas são alvos da família das BMPs em especial de BMP2 (Hollnagel, Oehlmann *et al.*, 1999; Lopez-Rovira, Chalaux *et al.*, 2002). Estes dados, juntamente com os resultados obtidos neste estudo utilizando-se a linhagem C2C12 tratada com rhBMP2 e rhBMP7, permitem sugerir que estas proteínas são importantes na inibição da diferenciação muscular, favorecendo, assim, a diferenciação osteoblástica. Concordando com os resultados aqui expostos, em relação à expressão dos genes ID, utilizando-se o mesmo modelo C2C12 assim como células humanas imortalizadas de medula, foi mostrado que estes genes foram induzidos pelo tratamento destas células com rhBMP2 (Locklin, Riggs *et al.*, 2001; Balint, Lapointe *et al.*, 2003). Por último, Peng *et al.*, utilizando células C2C12 e células tronco mesenquimais C3H10T1/2, sugerem um modelo no qual as proteínas ID aumentariam sua expressão após o estímulo por BMPs, promovendo a proliferação de osteoprogenitores e, simultaneamente, poderiam inibir a diferenciação destes. Após um período de tempo do estímulo com BMPs, o nível das proteínas ID voltaria ao nível basal, permitindo continuar com a diferenciação terminal para osteoblastos.

Um grupo de três genes, Dlx1, Dlx2 e Dlx5 que pertencem à família de genes “homeobox”, que são homólogos ao gene “distal-less” (Dll) de *Drosophila* (Kraus e Lufkin, 2006), foi induzido por rhBMP2 e rhBMP7. Esta família de genes controla a expressão de diversos genes associados no desenvolvimento, tanto de invertebrados como de vertebrados. Em mamíferos, eles são expressos no sistema nervoso, derivados da cresta neural e arcos branquiais. Participam no

desenvolvimento do cérebro, estruturas craniofaciais, e no esqueleto axial e apendicular (Kraus e Lufkin, 2006). Portanto, devido a estas características, os fatores de transcrição Dlx1, Dlx2 e Dlx5 podem ser muito importantes em osteodiferenciação. Particularmente no caso de Dlx5, existem evidências que indicam que ele é um alvo direto de BMPs. Durante a osteodiferenciação de células C2C12, foi demonstrado que Dlx5 regula a expressão de Runx2 em células tratadas com rhBMP2 e não em células tratadas com TGF- $\beta$ 1 (Lee, Kim *et al.*, 2003). Isto, em conjunto com a capacidade de BMP2 de induzir a expressão de genes marcadores de diferenciação osteoblástica como ALP (fosfatase alcalina) e Osx (discutido posteriormente) em células murinas “knockout” Runx2<sup>-/-</sup>, sugerem uma via alternativa, na qual Dlx5 modula a expressão de Runx2 e Osx e, assim, BMP2 poderia induzir a expressão de ALP. Além disso, Dlx5, mas não Runx2 é indispensável para que Osx seja expresso em células tratadas com BMP2 (Ryoo, Lee *et al.*, 2006). Portanto, Dlx5 regula a expressão de Runx2 e Osx independentemente. Estes dados são consistentes com o perfil de expressão obtido neste estudo com o gene Dlx5, sendo provável que Dlx1 e Dlx2 também participem, de alguma forma, neste ou em outro mecanismo similar. Evidentemente, novos estudos poderiam decifrar o papel destes genes em osteodiferenciação.

Osx, um fator de transcrição que contém um domínio de ligação ao DNA do tipo dedo de zinco, foi o gene com maior indução de expressão relativa após o tratamento das células C2C12 com rhBMP2 e rhBMP7. Identificado por Nakashima *et al.*, é expresso em todos os ossos, e camundongos “knockout” Osx<sup>-/-</sup> carecem de osso mineralizado (Nakashima, Zhou *et al.*, 2002). Tem sido sugerido que Osx atua na diferenciação terminal de osteoblastos, na distinção das vias osteogênica e condrogênica, enquanto que Runx2 atua antes, no compromisso de células

mesenquimais a osteoblastos ou condrócitos (Lee, Kwon *et al.*, 2003). Transcricionalmente, *Osx* regula a expressão de genes importantes em osso como: “bone sialoprotein” (BSP), osteocalcina, osteonectina e osteopontina (Celil, Hollinger *et al.*, 2005). Como mencionado no parágrafo anterior, *Dlx5* modula a expressão de *Osx*. Interessantemente, confirmando os dados da literatura, ao analisar o perfil de expressão destes genes e *Dlx2*, é possível notar que o transcrito *Osx* aumenta bastante entre 12-24h, o que pode estar relacionado ao incremento da expressão de *Dlx2* e *Dlx5* no mesmo período do tempo, revelando que, apesar de *Osx* precisar primeiro de *Dlx5*, posteriormente, eles poderiam funcionar de maneira paralela na finalização da diferenciação osteoblástica.

O fator de transcrição (“forkhead transcription factor”), *Fkhr1*, também foi confirmado como sendo diferencialmente expresso através de qPCR. *Fkhr1* ou *FoxO1a* é capaz de estimular a atividade promotora do gene ALP, assim como sua atividade enzimática. Esta proteína e a família de fatores à qual pertence, participam na regulação de processos tais como: ciclo celular, apoptose, metabolismo de glicose, embriogênese e diferenciação celular (Bois e Grosveld, 2003). Um aumento na expressão de *Fkhr1* e na atividade de ALP, foram registrados após 6 dias de tratamento com BMP2 utilizando células humanas de medula, hMSC, (Osyczka, Diefenderfer *et al.*, 2004). Estes dados indicam que *Fkhr1* participa na transcrição de ALP, o que traz, como consequência, um incremento na atividade da enzima. O perfil de expressão deste gene no nosso estudo mostra que sua expressão diminui a níveis basais 24h após tratamento, enquanto que a atividade de ALP começa a aumentar progressivamente após 48h de tratamento (Figura 8). Existem algumas explicações para isto: 1) a expressão de ALP é ativada por outros fatores de transcrição como *Runx2* e *Dlx5*; 2) ainda que o nível do transcrito de *Fkhr1* diminua,

não significa que ocorra o mesmo com a proteína, 3) o transcrito de Fkhr1 poderia aumentar novamente após 24h. Seja uma, ou todas estas explicações possíveis, os resultados obtidos neste estudo, para este gene, ainda que se situe em outro intervalo de tempo e, utilizando outro modelo celular comparado ao já citado acima (hMSC), indicam que Fkhr1 participa em diferenciação osteoblástica.

Hoxc8 pertence à família conservada de genes “Hox”, expressos em membros, tubo neural, cartilagem e osso (Yueh, Gardner *et al.*, 1998). Camundongos “knockout” Hoxc8<sup>-/-</sup> apresentam anormalidades em costelas, vértebra lombar e tecidos nervosos (Le Mouellic, Lallemand *et al.*, 1992; Tiret, Le Mouellic *et al.*, 1998). Hoxc8 se liga nos respectivos promotores de Osteopontina (Spp1) e Osteoprotegerina (OPG) funcionando como um repressor transcricional destes. A interação com SMAD1 ativada por BMP2, permite a expressão tanto de Spp1 como de OPG (Yang, Ji *et al.*, 2000; Wan, Shi *et al.*, 2001). Os resultados do qPCR indicam que este gene é induzido por rhBMP2 entre 4-24h, e por rhBMP7 entre 12-24h. Considerando que a função de Hoxc8 seria a de manter as células num estado indiferenciado, favorecendo sua proliferação, os resultados obtidos nesta tese, não estariam de acordo com isto. Uma possível hipótese para explicar este fato que, poderia ser semelhante com o metabolismo ósseo “*in vivo*”, seria que inicialmente Hoxc8 aumentaria para compensar o incremento de SMAD1 ativada por BMPs, controlando, assim, a expressão de Spp1 e OPG. Cabe assinalar que Spp1 foi selecionado a partir da análise dos microarranjos de DNA (Tabela 5), mas sua expressão foi constante durante o tratamento das células (Figura 14). Por último, é necessário mencionar que OPG participa ativamente da inibição da osteoclastogênese (Simonet, Lacey *et al.*, 1997), portanto, isto poderia reforçar a

idéia de que Hoxc8 poderia ser regulado, de alguma forma, por BMPs, em alguma etapa da diferenciação osteoblástica ou posteriormente.

Como foi mostrado, os genes Glis1 e Glis3 (“Gli similar”) relacionados à subfamília Gli, que são fatores de transcrição do tipo “Krüppel-like zinc finger proteins” (Nakanishi, Kim *et al.*, 2006), são induzidos por rhBMP2 e rhBMP7. Ambas proteínas contém 5 motivos do tipo dedo de zinco que mostram grande homologia de seqüência com as proteínas Gli, mas fora destes domínios existe pouca homologia entre as proteínas Glis e Gli. Glis1 e Glis3, por análise das suas seqüências, contém domínios de ativação e repressão, sugerindo que elas regulam positiva e negativamente a transcrição de seus genes-alvos. Existem evidências que sugerem que Glis3 participa em diferentes etapas de organogênese (Kim, Nakanishi *et al.*, 2003), enquanto que a expressão de Glis1 foi detectada durante embriogênese em regiões craniofaciais, arcos branquiais, somitos e rim (Nakanishi, Kim *et al.*, 2006). No caso de Glis3, recentemente foi demonstrado que atua sinergisticamente com BMP2 e Shh na diferenciação osteoblástica de células mesenquimais C3H10T1/2, induzindo a expressão de FGF18 (Beak, Kang *et al.*, 2007), indicando que este fator pode ser importante durante osteodiferenciação. Em relação a Glis1, sua expressão obtida neste estudo, incrementou devido ao tratamento com rhBMPs entre 4-24h, (Figura 12), obtendo-se um aumento maior do transcrito nas células tratadas com rhBMP2. Não existe, atualmente, nenhuma evidência na literatura que possa relacionar Glis1 com osteodiferenciação induzida por BMPs, mas sua possível função poderia ser similar a Glis3 devido à alta homologia entre estes genes. Sem dúvida, pelo pouco conhecimento do potencial papel em osteogênese destes fatores de transcrição, seria muito interessante, futuramente, analisar a sua importância neste processo.

### **5.3.2 Proteínas envolvidas em vias de sinalização celular.**

A via de sinalização ativada por BMPs é a que envolve as proteínas SMAD (Miyazono, 1999). Interessantemente, nossa análise dos microarranjos gerou um número de 5 genes candidatos, dos quais 4 foram validados como diferencialmente expressos por qPCR, os quais participam em diferentes vias de sinalização celular tais como: Wnt (canônica e Wnt/Ca<sup>2+</sup>), PKC e Toll/IL-1, as quais possivelmente poderiam interagir entre si, modulando a diferenciação osteoblástica. O fato do resto dos componentes destas vias não terem sido detectados nos microarranjos de DNA (2,5 vezes mais ou menos expressos), não implica que eles não tenham sua expressão aumentada. Como vimos anteriormente, genes selecionados dos microarranjos, como Zfp82, Usf2 e Nab1, como sendo possíveis candidatos a genes diferencialmente expressos, não foram confirmados por qPCR. O contrario também ocorre, ou seja, genes não detectados nos microarranjos, que são regulados por rhBMPs, e confirmados através de qPCR, ou seja, a ocorrência de falsos positivos e falsos negativos.

Na Figura 13 se mostra que o perfil de expressão dos genes Lrp6 (“low-density lipoprotein receptor-related protein 6”) e Dvl1 (“Dishevelled 1”) após o tratamento com rhBMP2 e rhBMP7, é similar. Estes genes formam parte da via de sinalização Wnt canônica (Zhong, Gersch *et al.*, 2006), existindo evidências que mostram sua relação com osteogênese (Day, Guo *et al.*, 2005; Glass, Bialek *et al.*, 2005). O sinal começa quando moléculas Wnts secretadas se ligam nos receptores GPCRs da família “frizzled” e aos co-receptores acoplados Lrp5/Lrp6, o que resulta na estabilização de  $\beta$ -catenina e sua subsequente translocação ao núcleo, onde, junto com os fatores de transcrição Tcf ou Lef, modulam a expressão de diversos genes (Rawadi, Vayssiere *et al.*, 2003). Camundongos “knockout” Lrp6<sup>-/-</sup> apresentam um

volume reduzido de osso trabecular vertebral (TBV, “vertebral trabecular bone”), demonstrando-se, assim, a importância desta proteína na formação óssea (Bodine e Komm, 2006). Além disso, tem sido demonstrado que este co-receptor participa em somito e osteogênese (Kokubu, Heinzmann *et al.*, 2004). Em relação a Dvl1, sua função é prevenir a degradação de  $\beta$ -catenina, inibindo sua fosforilação por parte de GSK3 $\beta$  (Wharton, 2003). Alguns dados sugerem que Dvl1, além de outros componentes do sinal Wnt, estão ativados durante a regeneração óssea, e particularmente as isoformas de Dvl (1, 2 e 3) seriam importantes na proliferação e diferenciação de condrócitos (Zhong, Gersch *et al.*, 2006). O aumento na expressão de Lrp6 e Dvl1, obtido neste estudo, poderia implicar que as células tratadas com rhBMPs, iniciam ou aumentam a expressão destes genes relacionados à via Wnt para, assim, intensificar o efeito osteodiferenciador dado inicialmente por ambas BMPs. Com relação a isto, existe um trabalho, utilizando células C2C12 e C3H10T1/2, que mostra uma sinergia entre  $\beta$ -catenina e BMP2 em promover osteodiferenciação (Mbalaviele, Sheikh *et al.*, 2005). Por outro lado, é possível que  $\beta$ -catenina, junto com TCF1, possam aumentar a expressão de Runx2 (Gaur, Lengner *et al.*, 2005).

Um incremento na expressão, do gene Ecsit ou Sitpec, nas células C2C12, foi registrado entre 4-12h. Este gene participa na via Toll, desempenhando-se como uma proteína adaptadora entre o complexo IRAK1/TRAF6 e a proteína MEKK1, a qual continua o sinal, fosforilando tanto a proteína JNK p38 como o complexo IKK, finalizando com a expressão de genes envolvidos em processos inflamatórios. Este gene participa na via BMP/SMAD interagindo com Smad1 e Smad4, ativando a expressão de Tlx2 e de outros genes (Moustakas e Heldin, 2003). Durante a embriogênese, as vias Toll e TFG $\beta$ /BMPs interagem na formação do eixo

dorsiventral, e durante a resposta imune comportam-se antagonicamente. Por outro lado, camundongos deficientes de Ecsit apresentaram alterações na formação do epiblasto e mesoderma, morrendo no dia 7.5 (E7.5) (Xiao, Shim *et al.*, 2003). O mecanismo pelo qual esta proteína poderia estar envolvida em diferenciação osteoblástica é uma incógnita, que pode ser resolvida através de posteriores análises, mas sua interação com Smad1/4, proteínas que participam neste tipo de diferenciação, já é um indício de que participam deste processo.

Um último gene validado por qPCR que participa em vias de sinalização celular, é a proteína kinase C delta, PKC $\delta$ . Esta enzima pertence à família de serina/treonina quinases PKC, que consiste de 11 membros, incluindo as isoformas clássicas ( $\alpha$ ,  $\beta$ 1,  $\beta$ 2, $\gamma$ ) ativadas por diacilglicerol (DAG), fosfatidilserina (PS) e Ca<sup>2+</sup>, e a nova subfamília ( $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\eta$ ,  $\theta$ ) ativada por DAG e PS, e as isoformas atípicas ( $\lambda$ ,  $\iota$ ,  $\zeta$ ) ativadas unicamente por PS (Newton, 1997). Recentemente, utilizando células ST2, foi demonstrada a ativação de PKC $\delta$  através da via canônica de Wnt induzida por Wnt3a, e, também, na via não canônica induzida por Wnt7b utilizando células ST2 e C3H10T1/2, indicando a importância desta enzima durante a osteodiferenciação destas células (Tu, Joeng *et al.*, 2007). Outro estudo mostrou que a ativação da via PKC, especificamente através de PKC $\delta$ , é necessária para a expressão de Runx2 em células MC3T3 e C2C12 tratadas com FGF2 (Kim, Kim *et al.*, 2003). Como foi visto, o aumento do transcrito de PKC $\delta$  nas células tratadas, obtido neste estudo foi discreto, mas pequenos incrementos podem aumentar sua atividade enzimática, o que pode estar relacionado com modificações pós-traducionais de diversas proteínas que participam na diferenciação osteoblástica induzida por rhBMP2 e rhBMP7.

### **5.3.3 Proteínas associadas à matriz extracelular.**

Osteoblastos secretam um tipo de matriz extracelular (ECM) própria, formada por diversas proteínas, onde algumas específicas participam diretamente na mineralização deste tipo de matriz (Xiao, Gopalakrishnan *et al.*, 2002). Devido a isto, foram analisados oito genes, que representam proteínas secretadas, com a exceção da enzima intracelular Plod1. Um único gene, Spp1 (“Bone sialoprotein 1”) não foi confirmado por qPCR. A expressão de Ltbp2 (“latent transforming growth factor beta binding protein 2”) aumentou com o tratamento com rhBMP2 entre 4-24h, e entre 4-12h com rhBMP7. Esta proteína faz parte do complexo precursor de TGF $\beta$  latente, posicionando-o na ECM. Após ser removida do complexo, TGF $\beta$  é ativada (Saharinen, Hyytiainen *et al.*, 1999). Uma possível relação, entre Ltbp2, TGF $\beta$ 1 e osteodiferenciação das células C2C12 induzida por rhBMPs, que pode representar, em parte, o metabolismo ósseo “*in vivo*”, é que TGF $\beta$ 1 participa do processo de osteoclastogênese, onde existem evidências que indicam que esta proteína regula a expressão de OPG e RANKL no osteoblasto e RANK no osteoclasto, sendo importante que ela seja liberada desse complexo latente para ter esta atividade (Janssens, Ten Dijke *et al.*, 2005). Coincidentemente, os genes Grn, Postn, Plod1 e BMP1 foram induzidos durante 12-24h pós-tratamento. Grn (Granulins) são proteínas que participam em inflamação, reparação de feridas e remodelamento de tecidos. Seu papel em osteodiferenciação não é conhecido, mas bem Grn seria um gene de origem osteoclástico (Hopwood, Tsykin *et al.*, 2007). Possivelmente, Grn poderia participar do remodelamento ósseo, mas, obviamente, outros estudos devem ser levados a cabo para se conhecer, com maior detalhe, as funções destas proteínas no tecido ósseo. Postn (“Periostin”) ou OSF2 (Osteoblast Specific Factor 2) foi isolada como um fator específico de osteoblastos, encontrando-se

preferencialmente no periósteo. Sua função está relacionada ao recrutamento, união e extensão de osteoblastos (Balint, Lapointe *et al.*, 2003). Interessantemente, a expressão de Postn começa a aumentar após 12h e continua aumentando progressivamente até 24h, o que pode indicar que, a partir deste período, as células começam a adquirir as características próprias de osteoblastos diferenciados. Plod1 não é secretada, sendo uma enzima intracelular que participa na hidroxilação de lisina em colágeno tipo I, a principal proteína presente no osso. As hidroxilinas são sítios de união de carboidratos, sendo essenciais na estabilidade do entrecruzamento entre as moléculas de colágeno (Tasker, Macdonald *et al.*, 2006). Em concordância com os resultados obtidos nesta tese, um aumento na expressão de Plod1 foi registrado durante a diferenciação de células BMSCs (“bone marrow stromal cells”) e NSFs (“normal skin fibroblasts”) (Uzawa, Grzesik *et al.*, 1999). Portanto, um incremento na expressão desta enzima durante a osteodiferenciação, com a conseqüente estabilização de colágeno tipo I, pode indicar o começo da formação da matriz extracelular característica de osteoblastos. BMP1 é uma metaloproteinase importante em diversos processos morfogênicos em várias espécies. Durante a formação da ECM, realiza o processamento de moléculas precursoras transformando-as em componentes funcionais da ECM. Seus substratos incluem pro colágenos, precursores de proteoglicanos e proteínas associadas à mineralização de ECM de osso e dente. Outros substratos são complexos latentes de certos membros de família TGF $\beta$ , como TGF $\beta$ 1, BMP2, BMP4 (Ge, Fernandez *et al.*, 2007). Evidências recentes mostram que BMP1 cliva moléculas LTBP, liberando o complexo latente de TGF $\beta$ 1-LAP da ECM, sendo, posteriormente, a proteína LAP (“latency-associated peptide”) clivada por outro tipo de protease, resultando na ativação de TGF $\beta$ 1 (Ge e Greenspan, 2006). Este resultado poderia relacionar o

aumento na expressão de LTBP2 e BMP1 (mesmo perfil de expressão), obtidos em nosso estudo, com a possível participação de TGF $\beta$ 1 em osteoclastogênese, a qual já foi comentada anteriormente.

Htra1 é uma serina peptidase da família Htra (“High Temperature requirement”), existindo evidências que a relacionam com desenvolvimento e progressão de diversas patologias (Oka, Tsujimoto *et al.*, 2004). Recentemente, foi demonstrada a expressão de Htra1 durante a diferenciação osteoblástica de células 2T3 (Hadfield, Farrington Rock *et al.*, 2007). Além disso, este trabalho também mostrou que a superexpressão desta enzima causou uma inibição na mineralização da ECM. Os autores sugerem que isto pode ser devido a três causas: 1) que Htra1 module a expressão de genes específicos de osteoblastos, 2) que altere a atividade TGF $\beta$ /BMP ou 3) que clive proteínas que regulam a diferenciação ou mineralização da ECM. A inibição da mineralização da ECM nestas células devido à Htra1 poderia representar um mecanismo de controle da velocidade com que a mineralização é realizada, mas, obviamente, são necessárias maiores evidências para afirmar isto. O possível efeito de Htra1 em nosso modelo C2C12, poderia ser futuramente analisado.

IGFBP-r10 é membro da família de proteínas IGFBP (“Insulin Growth Factor Binding Protein”). Alguns indícios mostram que esta família de proteínas participa no crescimento e maturação de vários tecidos, através da sua associação com proteínas da ECM, mediando, assim, a adesão, migração e quimiotaxia celular. Assim, por exemplo, elas se ligam a integrinas modulando, possivelmente, as vias TGF $\beta$  e Wnt (Kuerner e Steinbeisser, 2006). Outro trabalho mostrou uma alta expressão de IGFBP-rP10 em osso e dente, sendo por isto chamada alternativamente, de Bono1 (*bone and odontoblasts*) (James, Jarvinen *et al.*, 2004).

Em concordância com nossos resultados foi mostrado que rhBMP2 é capaz de induzir a expressão deste gene em distintas linhagens celulares, além das células C2C12, sendo muito provável que IGFBP-rP10 participe ativamente na diferenciação e proliferação de osteoblastos durante a formação e remodelação óssea (Shibata, Tsukazaki *et al.*, 2004). De que forma esta proteína participaria nestes processos, representa um interessante desafio que poderia ser resolvido no futuro através de novos experimentos.

#### **5.3.4 Outras proteínas.**

A expressão do gene *Cfdp1* (“Craniofacial development protein 1”) ou *Cp27*, tem sido detectada em alguns tecidos, particularmente em dentes e ossos. Sua localização subcelular é no citoplasma e núcleo. Contém um domínio, chamado BCNT-c (“Bucentaur”) que apresenta homologia com uma das proteínas que compõem o complexo Swr1 de levedura, o qual altera o estado da cromatina, regulando, assim, a transcrição de diversos genes. Este gene foi clonado a partir de uma biblioteca de camundongo, e em humanos a região cromossômica equivalente a este gene, está associada a diversas síndromes craniofaciais. Sua função específica não é conhecida, mas se presume que é importante durante a embriogênese (Diekwisch, Marches *et al.*, 1999). Existem evidências que indicam que *Cfdp1* é importante durante o desenvolvimento dos dentes (Diekwisch, Luan *et al.*, 2002). É importante assinalar que os odontoblastos nos dentes têm uma função similar aos osteoblastos no osso, portanto pode ser que *Cfdp1* participe, também, em alguma etapa da formação óssea. Claramente, esta afirmação é especulativa e requer maiores estudos, para verificar se *Cfdp1* tem algum papel em osteogênese. Nossa análise mostrou que este gene parece ser primeiro ativado levemente por

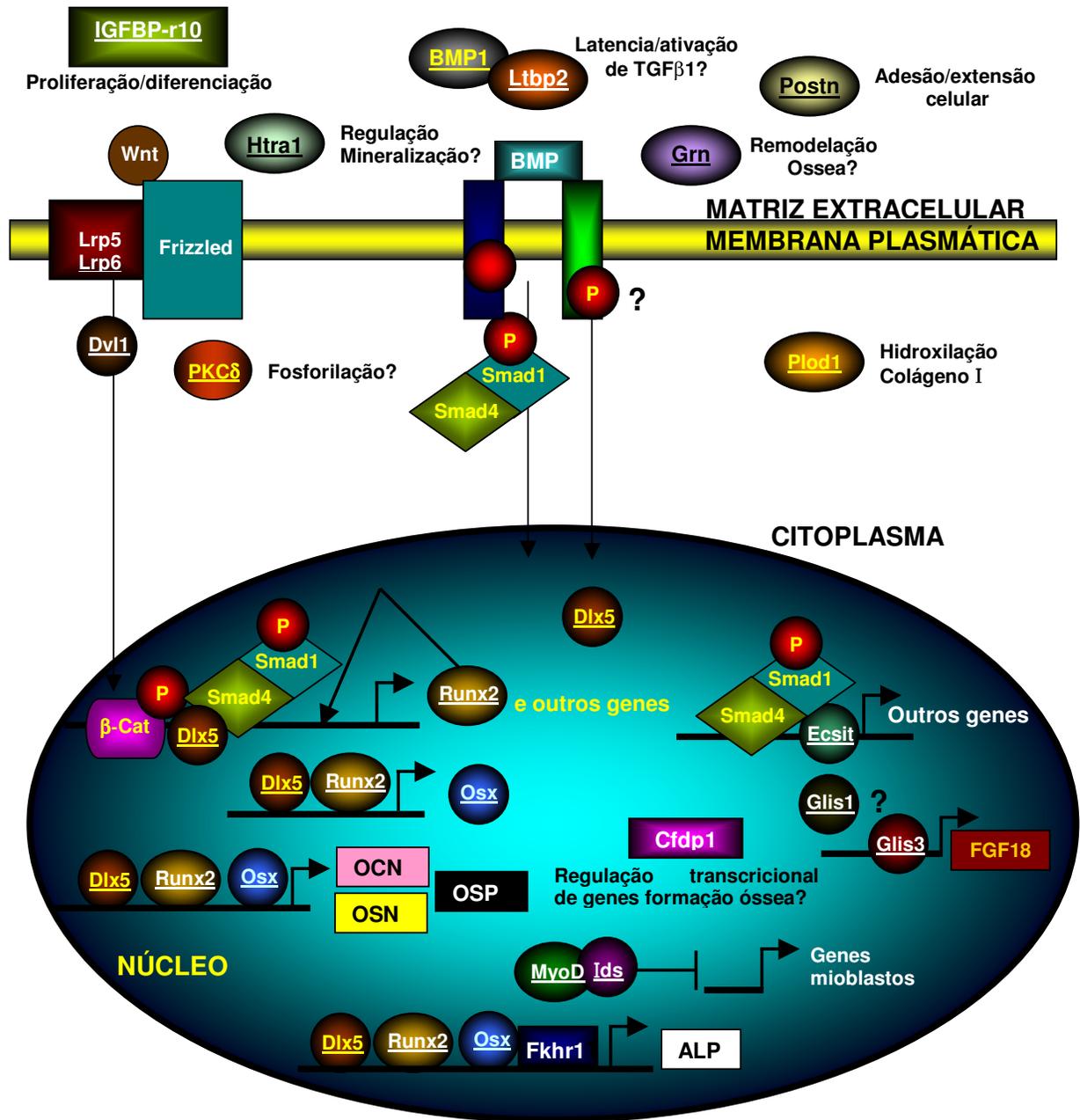
rhBMP2 (4-24h), em comparação a rhBMP7 (12-24h), mas, por agora, ainda não é possível explicar esta diferença.

### ***5.3.5 Integração das possíveis funções dos genes validados por qPCR .***

A análise da expressão de genes induzidos por rhBMP2 e rhBMP7 em células C2C12, realizada neste trabalho, mostrou que, na maioria dos casos, eles foram induzidos de forma similar por ambas proteínas. Alguns dos genes identificados já foram relacionados com diferenciação osteoblástica e formação óssea mas, apesar disto, em alguns casos, a maneira como eles participam não é muito clara, o que permite continuar com novos estudos para caracterizar a função de cada um deles. É claro que nossos dados poderiam estar influenciados pela presença de algumas moléculas presentes no soro, tais como FGFs, IGFs, Wnts entre outras, que podem atuar sinergisticamente com as rhBMPs, na osteodiferenciação de células C2C12. No entanto, combinando nossos resultados com as evidências existentes, já mencionadas para cada gene, é possível fazer um resumo que permita integrar todos estes dados onde, obviamente, na realidade, devem existir mais genes induzidos, envolvidos em osteodiferenciação. Na Figura 32, se mostram os possíveis eventos que ocorrem durante a diferenciação osteoblástica induzida por BMPs, onde os genes confirmados neste estudo estão sublinhados.

Após a interação entre BMP e seus receptores acontece a fosforilação de Smad1 (ou Smad5) e Smad4, formando-se um complexo entre estas proteínas que se translocam ao núcleo. Paralelamente, deve iniciar-se a indução da expressão de Dlx5 (Dlx1 ou Dlx2). Assim, Smad1/4,  $\beta$ -catenina, Dlx5 (Dlx1,2) ativam a expressão de Runx2, o qual, posteriormente, pode regular sua própria expressão.  $\beta$ -catenina

seria estabilizada pelo sinal Wnt (Lrp6 e Dvl1). As proteínas Ids (1, 2, 3) têm sua expressão aumentada, ligando-se a fatores similares a MyoD (reprimido neste estudo), inibindo a expressão de genes envolvidos em diferenciação mioblástica. Por outro lado, Smad1/4 e Ecsit, com ou sem outros fatores, poderiam regular a expressão de mais genes osteoblásticos. Runx2, junto com Dlx5, permitem que Osx seja expresso. Estes três fatores ativam a expressão de OCN, OSP e OSN, e, junto com Fkhr1, aumentam a expressão de ALP. Glis3 ativaria a expressão de FGF18 e outros genes, e Glis1 devido à homologia com Glis3 poderia fazer algo similar. No citoplasma, a fosforilação de substratos por parte de PKCδ, seria importante em potencializar o sinal osteoindutivo. Plod1 através da hidroxilação de lisinas presentes nas moléculas de colágeno tipo I, permitiria o posterior entrecruzamento e estabilização destas moléculas, que representam a principal proteína presente na matriz óssea. Extracelularmente IGFBP-r10 participaria da proliferação de osteoblastos, possivelmente como produto da sua interação com proteínas IGF, assim como também em diferenciação osteoblástica. Postn é importante no recrutamento, extensão e adesão de osteoblastos. A conexão entre BMP1 e Ltbp2 poderia regular a disponibilidade de TGFβ1, cuja função “*in vivo*” no tecido ósseo, entre outras, seria regular a osteoclastogênese. Grn é uma proteína que seria importante durante o reparo ou remodelação óssea. O grau de mineralização da ECM secretada por osteoblastos seria regulado pela atividade proteásica de Htra1. Por último, Cfdp1, que participa no desenvolvimento e formação do dente, possivelmente regulando a transcrição de diversos genes que participam neste processo, poderia desempenhar uma função similar no osso.



**Figura 32. Genes envolvidos em diferenciação osteoblástica.** Os genes confirmados, neste estudo como diferencialmente expressos devido ao tratamento das células C2C12 com rhBMP2 e rhBMP7, que se mostram sublinhados, foram relacionados com dados da literatura, para assim elaborar um modelo que possa integrar suas potenciais funções, tanto “*in vitro*” como “*in vivo*”. **Wnt**: “wingless-type MMTV integration site family, member”), **Dlx5** (Dlx1, Dlx2), **Ids** (Id1, Id2 e Id3). **Frizzled**: receptor Wnt, **Lrp5**: correceptor de Wnt junto com Lrp6. **OCN**: Osteocalcina, **OSN**: Osteonectina, **OSP**: Osteopontina, **ALP**: Fosfatasa alcalina.

#### **5.4 Clonagem e superexpressão de rhBMP2 e rhBMP7.**

Como foi mencionado anteriormente, as BMPs, devido a suas múltiplas funções, são fundamentais durante o desenvolvimento de diversos organismos. Normalmente, BMP2 e BMP7 participam ativamente em processos relacionados a formação de dentes e ossos. Em relação à formação óssea, ambas induzem a diferenciação de células mesenquimais em osteoblastos, os quais secretam a matriz óssea, sendo também utilizadas terapêuticamente em diversos tipos de fraturas severas, onde sua ação acelera o reparo ósseo (Granjeiro, Oliveira *et al.*, 2005). Portanto, é evidente que expressar e produzir estas proteínas é um grande desafio e uma oportunidade de sua utilização terapêutica, para ser, no Brasil, uma alternativa no mercado, permitindo diminuir os custos, em comparação aos tratamentos que utilizam rhBMPs produzidas no exterior.

Para superexpressar as duas proteínas, primeiramente, os respectivos cDNAs humanos que codificam cada proteína foram clonados no vetor de clonagem pENTR2B, e a análise através de seqüenciamento de DNA, revelou a identidade correta de cada um deles. Mostramos que as duas seqüências foram posteriormente subclonadas no vetor de expressão pCMV-IRES-EGFP, usado em células de mamíferos, no entanto, antes disto, os cDNAs foram subclonados em diversos vetores que permitem expressão em baculovirus, bactérias e células de mamíferos. Atualmente, os respectivos bacmídeos recombinantes já foram gerados e serão utilizados para a transfecção de células inseto e posterior obtenção de vírus recombinantes. Em bactérias, (dados não mostrados), tanto rhBMP2 como rhBMP7 foram expressas em alta quantidade, mas infelizmente, as proteínas foram produzidas como monômeros em estado desnaturado, portanto, sem atividade biológica. Apesar deste inconveniente, foram ensaiados alguns protocolos de

renaturação e dimerização *“in vitro”*, para se obter, em cada caso, o dímero funcional com o “folding” correto. Infelizmente, não foi possível obter um rendimento aceitável na dimerização, usando diversas metodologias, portanto, este sistema de expressão, foi descartado.

Paralelamente, ensaiou-se a superexpressão de ambas proteínas através de transfecções transitórias e estáveis em células de mamíferos. Como foi mencionado acima, os cDNAs que correspondem à hBMP2 e hBMP7 foram subclonados em vetores que permitem a expressão nestas células, onde sempre, em cada cDNA, foi adicionada a seqüência Kozak, com o propósito de aumentar a tradução dos respectivos transcritos. Infelizmente, com estes vetores, não foi possível alcançar uma quantidade de proteína que fosse detectável. Este problema foi solucionado com a subclonagem de cada cDNA no vetor pCMV-IRES-EGFP. Especificamente no caso de rhBMP7, as células HEK293T transfectadas transitória e estavelmente com o vetor pCMV-hBMP7-IRES-EGFP, resultaram na expressão de rhBMP7, sendo detectada por Western blot. No caso de rhBMP2, ainda não foi possível detectar a proteína com este ensaio, mas existem outros ensaios (funcionais por exemplo) que poderiam demonstrar a expressão de rhBMP2 nestas células.

#### **5.4.1 Superexpressão e caracterização de rhBMP7 em células HEK 293T.**

Como já foi descrito brevemente acima, foram realizadas transfecções transitórias e estáveis de células HEK293T, utilizando o vetor pCMV-hBMP7-IRES-EGFP, visando a expressão de rhBMP7. Foram gerados alguns clones de células que expressam estavelmente a proteína recombinante. Um deles, o clone N°12, foi escolhido devido à aparente maior expressão registrada por Western blot, para, a partir do seu meio de cultura, purificar e caracterizar rhBMP7. Nossos resultados

(Figura 26), demonstraram que, efetivamente, a proteína foi purificada mostrando claramente as características próprias de rhBMP7 como: a presença de dímeros funcionais (~34kDa), formados por uma ponte dissulfeto intermolecular, a qual é reduzida pelo tratamento com um agente redutor, resultando nos respectivos monômeros (~17kDa). Logicamente, isto representa um ensaio preliminar, que deverá ser otimizado, mas mostra claramente que a proteína está sendo expressa e que é possível purificá-la satisfatoriamente.

#### **5.4.2 Funcionalidade de rhBMP7 superexpressa em células 293TpCMV-hBMP7-IRES-EGFP N°12.**

Como foi visto, as células 293T-pCMV-hBMP7-IRES-EGFP N°12 superexpressam rhBMP7, porém isto não demonstra que a proteína seja funcional. Para responder esta incógnita, foram realizados 4 experimentos distintos, “*in vitro*” utilizando o meio condicionado (MC) das células que não expressam (vetor vazio) e que expressam rhBMP7, com o objetivo de induzir osteodiferenciação em células C2C12.

O primeiro deles foi uma análise da expressão do gene *Osx*, que, na literatura, assim como também em nossos dados (Figura 12), é regulado por BMP2 e BMP7. O perfil de expressão deste gene nas células tratadas com os respectivos MCs é similar ao obtido quando estas células foram tratadas com as proteínas recombinantes (comparar Figuras 12 e 27).

Outros dois experimentos mostram as diferenças morfológicas e mineralização da ECM resultante do tratamento das células C2C12 com os MCs. Ambos ensaios demonstram claramente, que rhBMP7, presente no meio de cultura das células 293T-pCMV-hBMP7-IRES-EGFP N°12, inibe a diferenciação em célula

muscular, favorecendo a osteoblástica, o que posteriormente leva à mineralização de ECM, unicamente nas células C2C12 tratadas com o MC que contem rhBMP7.

Um outro experimento *“in vitro”* foi medir a atividade de fosfatase alcalina (ALP), que aumenta especificamente durante a diferenciação osteoblástica. Um incremento na atividade ALP foi registrado nas células tratadas com o MC das células 293T-pCMV-hBMP7-IRES-EGFP N°12 e não no controle negativo. Desta forma foi possível, também, estimar a concentração de rhBMP7 produzida por estas células, que seria aproximadamente de 234ng/ml, o que em termos de produção é baixo, mas é suficiente para induzir osteodiferenciação *“in vitro”*. Coincidentemente, este valor se assemelha ao usado neste trabalho, que foi de 200ng/ml de rhBMPs comerciais, e analisando os gráficos de atividade ALP (Figura 30 vs 8), apesar de serem muito parecidos, existe uma atividade levemente maior nas células tratadas com o MC que contém rhBMP7 em comparação ao obtido com rhBMP7 comercial, que poderia significar a diferença de aproximadamente 34ng entre ambas.

Um último ensaio para determinar se rhBMP7 produzida em nosso laboratório é funcional, foi um ensaio *“in vivo”*. Neste ensaio, um biomaterial que contem MC das células que não superexpressam rhBMP7 foi implantado no lado direito do animal enquanto que no lado esquerdo foi implantado o biomaterial contendo MC das células que produzem rhBMP7. Os resultados demonstraram, claramente, que a proteína produzida pelas células 293T-pCMV-hBMP7-IRES-EGFP N°12 é capaz de induzir formação ectópica de osso, específica e unicamente no lado esquerdo do animal, e não no lado direito.

Nossas evidências, concernentes à diferenciação osteoblástica *“in vitro”* e formação óssea *“in vivo”*, indicam que rhBMP7 produzida em nosso laboratório, tem atividade biológica, o que permite continuar com novas estratégias que aumentem a

quantidade de proteína para implementar a futuro sua produção, e ser assim, utilizada terapeuticamente.

## 6. CONCLUSÕES.

- As células C2C12, representam um modelo válido e reprodutível de osteodiferenciação induzido por rhBMP2 e rhBMP7.
- Utilizando este modelo celular e a tecnologia de microarranjos de DNA, foram selecionados 33 genes induzidos por rhBMP2 e rhBMP7 após 12h de tratamento.
- Destes 33 genes, 31 foram analisados por qPCR, dos quais 24 foram validados como sendo diferencialmente expressos 12h pós-tratamento.
- Uma parte dos 24 genes identificados apresentaram expressão diferencial em outros períodos de tempo analisados: 4, 8 ou 24h.
- Do total de genes confirmados, 13 têm relação direta com regulação transcricional (Runx2, Id1, Id2, Id3, Dlx1, Dlx2, Dlx5, Fkhr1, Osx, Hoxc8, Glis1 e Glis3), e o gene Cfdp1 também poderia participar deste tipo de regulação, como componente do complexo SWR1, o qual modifica o estado de compactação da cromatina.
- Quatro genes confirmados por qPCR (Lrp6, Dvl1, Ecsit e PKC $\delta$ ), fazem parte de algumas vias de sinalização celular.
- Os restantes sete genes (Ltbp2, Grn, Htra1, BMP1, Plod1, Postn e IGFBP-r10) possivelmente estão associados à formação e remodelação da matriz extracelular óssea.
- Os cDNAs correspondentes à hBMP2 e hBMP7 foram clonados no vetor de clonagem pENTR2B, sendo posteriormente subclonados em diversos vetores de expressão, sendo que o vetor pCMV-IRES-EGFP gerou os melhores resultados de super-expressão.

- Como produto da transfecção estável das células HEK293T com o vetor pCMV-hBMP7-IRES-EGFP, foi possível gerar clones/linhagens celulares, que são capazes de expressar permanentemente rhBMP7.
- Um destes clones/linhagens celulares, o clone 293TpCMV-hBMP7-IRES-EGFP N°12, apresentou a maior expressão protéica.
- A proteína produzida e secretada pelo clone 293TpCMV-hBMP7-IRES-EGFP N°12, foi parcialmente caracterizada (cromatografia de troca iônica e “Western blot”) a partir do meio de cultura condicionado por estas células.
- Foi demonstrado que rhBMP7 produzida pelo clone celular 293TpCMV-hBMP7-IRES-EGFP N°12, tem a capacidade de induzir diferenciação osteoblástica “*in vitro*” e formação óssea “*in vivo*”.

## **7. PERSPECTIVAS.**

Diversas linhas de pesquisa podem ser derivadas a partir deste trabalho de Tese. Um número considerável de genes diferencialmente expressos foram identificados durante a diferenciação osteoblástica de células C2C12 induzida por rhBMPs. O estudo mais detalhado destes genes, sem dúvida poderia esclarecer os mecanismos moleculares que ocorrem durante a diferenciação osteoblástica. Atualmente, nossos esforços estão sendo dirigidos à clonagem dos genes que codificam os fatores de transcrição Dlx1, Dlx2 e Dlx5, que são diretamente induzidos por rhBMPs e de Osx, que é regulado por Dlx5, e, talvez, também por Dlx1 e Dlx2. No caso de Osx, o cDNA humano correspondente a este gene, já foi isolado e clonado num vetor de expressão, o que permitirá posterior análise funcional. Evidentemente, foram identificados outros genes muito interessantes, e o desafio, no futuro, é compreender melhor como seus produtos participam da osteodiferenciação e formação óssea.

Um inconveniente deste trabalho foi que a análise dos microarranjos de DNA foi baseada num único experimento, devido a problemas experimentais que afetaram os dados gerados pela réplica, os quais não puderam ser utilizados. Conforme mencionado anteriormente, 24 dos 31 genes identificados nos microarranjos de DNA, foram validados por qPCR utilizando-se cDNAs que representam replicas biológicas.

As células C2C12, constituem um modelo reprodutível de diferenciação osteoblástica induzida por rhBMPs, portanto, seria interessante fazer uma análise similar àquela feita neste estudo, com outros períodos de tempo de tratamento, como, por exemplo: menos de 4h ou mais de 24h, o que permitiria identificar novos genes envolvidos em diferenciação, e, ainda, definir melhor a variação da expressão

dos genes que já foram caracterizados nesta tese. Além do modelo C2C12, também podem ser retomados os ensaios de diferenciação celular em culturas primárias de células mesenquimais humanas, com o objetivo de lograr as condições ótimas que permitam diferenciar estas células em osteoblastos através do tratamento com rhBMP2 e rhBMP7.

A combinação entre microarranjos de DNA e qPCR resulta numa ferramenta que permite analisar a expressão de diversos genes ao nível transcricional. No entanto, devido ao fato de nem sempre o nível de um transcrito refletir nível equivalente de proteína, é necessário utilizar outros meios para analisar a expressão de uma proteína, assim, como as modificações pós-traducionais que esta poderia sofrer. Uma técnica que pode responder estas questões e complementar as análises realizadas nesta tese, é a análise proteômica. Durante uma parte deste trabalho, utilizando o modelo C2C12, foram realizados experimentos preliminares utilizando esta técnica, os quais poderiam ser retomados, com a vantagem que os resultados gerados seriam inéditos, pois, atualmente, não existem estudos de proteoma de osteodiferenciação de células C2C12 induzida por rhBMPs na literatura. Interessantemente, alguns genes identificados neste estudo através de microarranjos de DNA e qPCR, participam de vias nas quais diversas proteínas são fosforiladas. Uma análise através de Fosfoproteoma, por exemplo, geraria novas evidências, que, complementadas com aquelas obtidas a partir de qPCR, poderiam ajudar a compreender os diferentes mecanismos moleculares ligados à diferenciação osteoblástica e formação óssea.

A expressão de proteínas recombinantes em nosso laboratório é um caminho que vem sendo trilhado há cerca de duas décadas. No presente trabalho, mostra-se que a rhBMP7 produzida é capaz de induzir diferenciação osteoblástica, “*in vitro*” e

*“in vivo”*. O desafio principal daqui para frente é chegar à produção em escala desta proteína, assim como de rhBMP2, para serem utilizadas como biofármacos na clínica. A busca incessante de nosso laboratório por novas estratégias para aumentar a expressão de cada proteína, levou-nos ao sistema de expressão de células CHO DHFR<sup>-/-</sup>, o qual, devido aos bons resultados alcançados com a expressão de FVIII e FIX humanos (M.A.A. Demasi, N.V. Verbisck e M.C. Sogayar, não publicado), tem sido muito utilizado na produção comercial de diversas proteínas recombinantes. Atualmente, utilizando-se este sistema, estamos subclonando os cDNAs correspondentes à hBMP2 e hBMP7 no vetor de expressão pIQ-ID gerado em nosso laboratório, visando maior expressão de rhBMPs. Por outro lado, uma estratégia alternativa, o sistema de expressão em baculovirus (BEVS), no qual é possível obter grandes quantidades de proteína, também está sendo implementado, com o mesmo objetivo.

## 8. REFERÊNCIAS.

- Ausubel, F., R. Brent, et al. *Current Protocols in Molecular Biology* v. John Wiley 1999.
- Balint, E., D. Lapointe, et al. Phenotype discovery by gene expression profiling: mapping of biological processes linked to BMP-2-mediated osteoblast differentiation. *J Cell Biochem*, v.89, n.2, May 15, p.401-26. 2003.
- Barth, K. A., Y. Kishimoto, et al. Bmp activity establishes a gradient of positional information throughout the entire neural plate. *Development*, v.126, n.22, Nov, p.4977-87. 1999.
- Beak, J. Y., H. S. Kang, et al. Kruppel-like zinc finger protein Glis3 promotes osteoblast differentiation by regulating FGF18 expression. *J Bone Miner Res*, v.22, n.8, Aug, p.1234-44. 2007.
- Bessho, K., K. Kusumoto, et al. Comparison of recombinant and purified human bone morphogenetic protein. *Br J Oral Maxillofac Surg*, v.37, n.1, Feb, p.2-5. 1999.
- Bodine, P. V. e B. S. Komm. Wnt signaling and osteoblastogenesis. *Rev Endocr Metab Disord*, v.7, n.1-2, Jun, p.33-9. 2006.
- Bois, P. R. e G. C. Grosveld. FKHR (FOXO1a) is required for myotube fusion of primary mouse myoblasts. *Embo J*, v.22, n.5, Mar 3, p.1147-57. 2003.
- Breslauer, K. J., R. Frank, et al. Predicting DNA duplex stability from the base sequence. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.83, n.11, Jun, p.3746-50. 1986.
- Celeste, A. J., J. A. Iannazzi, et al. Identification of transforming growth factor beta family members present in bone-inductive protein purified from bovine bone. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.87, n.24, Dec, p.9843-7. 1990.
- Celil, A. B., J. O. Hollinger, et al. Osx transcriptional regulation is mediated by additional pathways to BMP2/Smad signaling. *J Cell Biochem*, v.95, n.3, Jun 1, p.518-28. 2005.
- Cook, S. D. e D. C. Rueger. Osteogenic protein-1: biology and applications. *Clin Orthop Relat Res*, n.324, Mar, p.29-38. 1996.
- Cserjesi, P., D. Brown, et al. Scleraxis: a basic helix-loop-helix protein that prefigures skeletal formation during mouse embryogenesis. *Development*, v.121, n.4, Apr, p.1099-110. 1995.
- Chen, Q., D. M. Johnson, et al. Progression and recapitulation of the chondrocyte differentiation program: cartilage matrix protein is a marker for cartilage maturation. *Dev Biol*, v.172, n.1, Nov, p.293-306. 1995.

- Cheng, H., W. Jiang, et al. Osteogenic activity of the fourteen types of human bone morphogenetic proteins (BMPs). *J Bone Joint Surg Am*, v.85-A, n.8, Aug, p.1544-52. 2003.
- Day, T. F., X. Guo, et al. Wnt/beta-catenin signaling in mesenchymal progenitors controls osteoblast and chondrocyte differentiation during vertebrate skeletogenesis. *Dev Cell*, v.8, n.5, May, p.739-50. 2005.
- Diekwisch, T. G., X. Luan, et al. CP27 localization in the dental lamina basement membrane and in the stellate reticulum of developing teeth. *J Histochem Cytochem*, v.50, n.4, Apr, p.583-6. 2002.
- Diekwisch, T. G., F. Marches, et al. Cloning, gene expression, and characterization of CP27, a novel gene in mouse embryogenesis. *Gene*, v.235, n.1-2, Jul 22, p.19-30. 1999.
- Ducy, P. e G. Karsenty. The family of bone morphogenetic proteins. *Kidney Int*, v.57, n.6, Jun, p.2207-14. 2000.
- Ducy, P., R. Zhang, et al. *Osf2/Cbfa1*: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell*, v.89, n.5, May 30, p.747-54. 1997.
- Ebendal, T., H. Bengtsson, et al. Bone morphogenetic proteins and their receptors: potential functions in the brain. *J Neurosci Res*, v.51, n.2, Jan 15, p.139-46. 1998.
- Fujita, A., J. R. Sato, et al. GEDI: a user-friendly toolbox for analysis of large-scale gene expression data. *BMC Bioinformatics*, v.8, p.457. 2007.
- Fujita, A., J. R. Sato, et al. Time-varying modeling of gene expression regulatory networks using the wavelet dynamic vector autoregressive method. *Bioinformatics*, v.23, n.13, Jul 1, p.1623-30. 2007.
- Fujita, A., J. R. Sato, et al. Evaluating different methods of microarray data normalization. *BMC Bioinformatics*, v.7, p.469. 2006.
- Gamradt, S. C. e J. R. Lieberman. Genetic modification of stem cells to enhance bone repair. *Ann Biomed Eng*, v.32, n.1, Jan, p.136-47. 2004.
- Gao, T., T. S. Lindholm, et al. Composites of bone morphogenetic protein (BMP) and type IV collagen, coral-derived coral hydroxyapatite, and tricalcium phosphate ceramics. *Int Orthop*, v.20, n.5, p.321-5. 1996.
- Gaur, T., C. J. Lengner, et al. Canonical WNT signaling promotes osteogenesis by directly stimulating *Runx2* gene expression. *J Biol Chem*, v.280, n.39, Sep 30, p.33132-40. 2005.
- Ge, G., C. A. Fernandez, et al. Bone morphogenetic protein 1 processes prolactin to a 17-kDa antiangiogenic factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.104, n.24, Jun 12, p.10010-5. 2007.

- Ge, G. e D. S. Greenspan. BMP1 controls TGFbeta1 activation via cleavage of latent TGFbeta-binding protein. *J Cell Biol*, v.175, n.1, Oct 9, p.111-20. 2006.
- Glass, D. A., 2nd, P. Bialek, et al. Canonical Wnt signaling in differentiated osteoblasts controls osteoclast differentiation. *Dev Cell*, v.8, n.5, May, p.751-64. 2005.
- Graff, J. M. Embryonic patterning: to BMP or not to BMP, that is the question. *Cell*, v.89, n.2, Apr 18, p.171-4. 1997.
- Granjeiro, J. M., R. C. Oliveira, et al. Bone morphogenetic proteins: from structure to clinical use. *Braz J Med Biol Res*, v.38, n.10, Oct, p.1463-73. 2005.
- Gregory, K. E., R. N. Ono, et al. The prodomain of BMP-7 targets the BMP-7 complex to the extracellular matrix. *J Biol Chem*, v.280, n.30, Jul 29, p.27970-80. 2005.
- Gu, K., L. Zhang, et al. Identification of potential modifiers of Runx2/Cbfa1 activity in C2C12 cells in response to bone morphogenetic protein-7. *Cells Tissues Organs*, v.176, n.1-3, p.28-40. 2004.
- Hadfield, K. D., C. Farrington Rock, et al. HTRA1 inhibits mineral deposition by osteoblasts: Requirement for the protease and PDZ domains. *J Biol Chem*, Dec 22. 2007.
- Hadjidakis, D. J. e Androulakis, li. Bone remodeling. *Ann N Y Acad Sci*, v.1092, Dec, p.385-96. 2006.
- Hama, J. e D. C. Weinstein. Is Chordin a morphogen? *Bioessays*, v.23, n.2, Feb, p.121-4. 2001.
- Hassan, M. Q., R. S. Tare, et al. BMP2 commitment to the osteogenic lineage involves activation of Runx2 by DLX3 and a homeodomain transcriptional network. *J Biol Chem*, v.281, n.52, Dec 29, p.40515-26. 2006.
- Helm, G. A., T. D. Alden, et al. Bone morphogenetic proteins and bone morphogenetic protein gene therapy in neurological surgery: a review. *Neurosurgery*, v.46, n.5, May, p.1213-22. 2000.
- Hogan, B. L. Bone morphogenetic proteins: multifunctional regulators of vertebrate development. *Genes Dev*, v.10, n.13, Jul 1, p.1580-94. 1996.
- Hollnagel, A., V. Oehlmann, et al. Id genes are direct targets of bone morphogenetic protein induction in embryonic stem cells. *J Biol Chem*, v.274, n.28, Jul 9, p.19838-45. 1999.
- Hopwood, B., A. Tsykin, et al. Microarray gene expression profiling of osteoarthritic bone suggests altered bone remodelling, WNT and transforming growth factor-beta/bone morphogenetic protein signalling. *Arthritis Res Ther*, v.9, n.5, Sep 27, p.R100. 2007.

- Huang, W., S. Yang, et al. Signaling and transcriptional regulation in osteoblast commitment and differentiation. *Front Biosci*, v.12, p.3068-92. 2007.
- James, M. J., E. Jarvinen, et al. Bono1: a gene associated with regions of deposition of bone and dentine. *Gene Expr Patterns*, v.4, n.5, Sep, p.595-9. 2004.
- Janssens, K., P. Ten Dijke, et al. Transforming growth factor-beta1 to the bone. *Endocr Rev*, v.26, n.6, Oct, p.743-74. 2005.
- Junqueira, L. e J. Carneiro. *Histologia Básica* Guanabara Koogan, n.9ª edição. 1999.
- Katagiri, T., A. Yamaguchi, et al. Bone morphogenetic protein-2 converts the differentiation pathway of C2C12 myoblasts into the osteoblast lineage. *J Cell Biol*, v.127, n.6 Pt 1, Dec, p.1755-66. 1994.
- Kim, H. J., J. H. Kim, et al. The protein kinase C pathway plays a central role in the fibroblast growth factor-stimulated expression and transactivation activity of Runx2. *J Biol Chem*, v.278, n.1, Jan 3, p.319-26. 2003.
- Kim, Y. S., G. Nakanishi, et al. GLIS3, a novel member of the GLIS subfamily of Kruppel-like zinc finger proteins with repressor and activation functions. *Nucleic Acids Res*, v.31, n.19, Oct 1, p.5513-25. 2003.
- Kokubu, C., U. Heinzmann, et al. Skeletal defects in ringelschwanz mutant mice reveal that Lrp6 is required for proper somitogenesis and osteogenesis. *Development*, v.131, n.21, Nov, p.5469-80. 2004.
- Kraus, P. e T. Lufkin. Dlx homeobox gene control of mammalian limb and craniofacial development. *Am J Med Genet A*, v.140, n.13, Jul 1, p.1366-74. 2006.
- Kuerner, K. M. e H. Steinbeisser. Expression analysis of IGFBP-rP10, IGFBP-like and Mig30 in early *Xenopus* development. *Dev Dyn*, v.235, n.10, Oct, p.2861-7. 2006.
- Langer, R. e J. P. Vacanti. Tissue engineering. *Science*, v.260, n.5110, May 14, p.920-6. 1993.
- Le, A. X., T. Miclau, et al. Molecular aspects of healing in stabilized and non-stabilized fractures. *J Orthop Res*, v.19, n.1, Jan, p.78-84. 2001.
- Le Mouellic, H., Y. Lallemand, et al. Homeosis in the mouse induced by a null mutation in the Hox-3.1 gene. *Cell*, v.69, n.2, Apr 17, p.251-64. 1992.
- Lee, M. H., Y. J. Kim, et al. BMP-2-induced Runx2 expression is mediated by Dlx5, and TGF-beta 1 opposes the BMP-2-induced osteoblast differentiation by suppression of Dlx5 expression. *J Biol Chem*, v.278, n.36, Sep 5, p.34387-94. 2003.

- Lee, M. H., T. G. Kwon, et al. BMP-2-induced Osterix expression is mediated by Dlx5 but is independent of Runx2. *Biochem Biophys Res Commun*, v.309, n.3, Sep 26, p.689-94. 2003.
- Lieberman, J. R., A. Daluiski, et al. The role of growth factors in the repair of bone. *Biology and clinical applications. J Bone Joint Surg Am*, v.84-A, n.6, Jun, p.1032-44. 2002.
- Liem, K. F., Jr., T. M. Jessell, et al. Regulation of the neural patterning activity of sonic hedgehog by secreted BMP inhibitors expressed by notochord and somites. *Development*, v.127, n.22, Nov, p.4855-66. 2000.
- Linkhart, T. A., S. Mohan, et al. Growth factors for bone growth and repair: IGF, TGF beta and BMP. *Bone*, v.19, n.1 Suppl, Jul, p.1S-12S. 1996.
- Locklin, R. M., B. L. Riggs, et al. Assessment of gene regulation by bone morphogenetic protein 2 in human marrow stromal cells using gene array technology. *J Bone Miner Res*, v.16, n.12, Dec, p.2192-204. 2001.
- Long, M. W. Osteogenesis and bone-marrow-derived cells. *Blood Cells Mol Dis*, v.27, n.3, May-Jun, p.677-90. 2001.
- Lopez-Rovira, T., E. Chaux, et al. Direct binding of Smad1 and Smad4 to two distinct motifs mediates bone morphogenetic protein-specific transcriptional activation of Id1 gene. *J Biol Chem*, v.277, n.5, Feb 1, p.3176-85. 2002.
- Mbalaviele, G., S. Sheikh, et al. Beta-catenin and BMP-2 synergize to promote osteoblast differentiation and new bone formation. *J Cell Biochem*, v.94, n.2, Feb 1, p.403-18. 2005.
- Miyazono, K. Signal transduction by bone morphogenetic protein receptors: functional roles of Smad proteins. *Bone*, v.25, n.1, Jul, p.91-3. 1999.
- Moustakas, A. e C. H. Heldin. Ecsit-ement on the crossroads of Toll and BMP signal transduction. *Genes Dev*, v.17, n.23, Dec 1, p.2855-9. 2003.
- Mundlos, S., F. Otto, et al. Mutations involving the transcription factor CBFA1 cause cleidocranial dysplasia. *Cell*, v.89, n.5, May 30, p.773-9. 1997.
- Nakanishi, G., Y. S. Kim, et al. Regulatory role for Kruppel-like zinc-finger protein Gli-similar 1 (Glis1) in PMA-treated and psoriatic epidermis. *J Invest Dermatol*, v.126, n.1, Jan, p.49-60. 2006.
- Nakashima, K., X. Zhou, et al. The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell*, v.108, n.1, Jan 11, p.17-29. 2002.
- Nerem, R. M. Tissue engineering in the USA. *Med Biol Eng Comput*, v.30, n.4, Jul, p.CE8-12. 1992.

- Newton, A. C. Regulation of protein kinase C. *Curr Opin Cell Biol*, v.9, n.2, Apr, p.161-7. 1997.
- Nishimura, R., Y. Kato, et al. Smad5 and DPC4 are key molecules in mediating BMP-2-induced osteoblastic differentiation of the pluripotent mesenchymal precursor cell line C2C12. *J Biol Chem*, v.273, n.4, Jan 23, p.1872-9. 1998.
- Oelgeschlager, M., J. Larrain, et al. The evolutionarily conserved BMP-binding protein Twisted gastrulation promotes BMP signalling. *Nature*, v.405, n.6788, Jun 15, p.757-63. 2000.
- Oka, C., R. Tsujimoto, et al. HtrA1 serine protease inhibits signaling mediated by Tgfbeta family proteins. *Development*, v.131, n.5, Mar, p.1041-53. 2004.
- Opperman, L. A. Cranial sutures as intramembranous bone growth sites. *Dev Dyn*, v.219, n.4, Dec, p.472-85. 2000.
- Ornitz, D. M. e P. J. Marie. FGF signaling pathways in endochondral and intramembranous bone development and human genetic disease. *Genes Dev*, v.16, n.12, Jun 15, p.1446-65. 2002.
- Osyczka, A. M., D. L. Diefenderfer, et al. Different effects of BMP-2 on marrow stromal cells from human and rat bone. *Cells Tissues Organs*, v.176, n.1-3, p.109-19. 2004.
- Patel, S. R. e G. R. Dressler. BMP7 signaling in renal development and disease. *Trends Mol Med*, v.11, n.11, Nov, p.512-8. 2005.
- Peng, Y., Q. Kang, et al. Inhibitor of DNA binding/differentiation helix-loop-helix proteins mediate bone morphogenetic protein-induced osteoblast differentiation of mesenchymal stem cells. *J Biol Chem*, v.279, n.31, Jul 30, p.32941-9. 2004.
- Pfaffl, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*, v.29, n.9, May 1, p.e45. 2001.
- Pugazhendhi, D., A. J. Sadler, et al. Comparison of the global gene expression profiles produced by methylparaben, n-butylparaben and 17beta-oestradiol in MCF7 human breast cancer cells. *J Appl Toxicol*, v.27, n.1, Jan-Feb, p.67-77. 2007.
- Rajpurohit, R., K. Mansfield, et al. Chondrocyte death is linked to development of a mitochondrial membrane permeability transition in the growth plate. *J Cell Physiol*, v.179, n.3, Jun, p.287-96. 1999.
- Rasmussen, R. Quantification on the LightCycler. In Meuer, S., Wittwer, C. and Nakagawara, K. (eds). *Rapid Cycle Real Time PCR. Methods and Applications* , . n.Spring Press, Heidelberg, p.pp21-34. 2001.

- Rawadi, G., B. Vayssiere, et al. BMP-2 controls alkaline phosphatase expression and osteoblast mineralization by a Wnt autocrine loop. *J Bone Miner Res*, v.18, n.10, Oct, p.1842-53. 2003.
- Reddi, A. H. Bone and cartilage differentiation. *Curr Opin Genet Dev*, v.4, n.5, Oct, p.737-44. 1994.
- Rengachary, S. S. Bone morphogenetic proteins: basic concepts. *Neurosurg Focus*, v.13, n.6, Dec 15, p.e2. 2002.
- Rose, F. R. e R. O. Oreffo. Bone tissue engineering: hope vs hype. *Biochem Biophys Res Commun*, v.292, n.1, Mar 22, p.1-7. 2002.
- Ross, J. J., O. Shimmi, et al. Twisted gastrulation is a conserved extracellular BMP antagonist. *Nature*, v.410, n.6827, Mar 22, p.479-83. 2001.
- Ryoo, H. M., M. H. Lee, et al. Critical molecular switches involved in BMP-2-induced osteogenic differentiation of mesenchymal cells. *Gene*, v.366, n.1, Jan 17, p.51-7. 2006.
- Saharinen, J., M. Hyytiainen, et al. Latent transforming growth factor-beta binding proteins (LTBPs)--structural extracellular matrix proteins for targeting TGF-beta action. *Cytokine Growth Factor Rev*, v.10, n.2, Jun, p.99-117. 1999.
- Sakou, T. Bone morphogenetic proteins: from basic studies to clinical approaches. *Bone*, v.22, n.6, Jun, p.591-603. 1998.
- Sambrook, J., E. Fritsch, et al. *Molecular cloning. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989.
- Sampath, T. K., K. E. Rashka, et al. Drosophila transforming growth factor beta superfamily proteins induce endochondral bone formation in mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.90, n.13, Jul 1, p.6004-8. 1993.
- Scott, I. C., I. L. Blitz, et al. Homologues of Twisted gastrulation are extracellular cofactors in antagonism of BMP signalling. *Nature*, v.410, n.6827, Mar 22, p.475-8. 2001.
- Shibata, Y., T. Tsukazaki, et al. Role of a new member of IGFBP superfamily, IGFBP-rP10, in proliferation and differentiation of osteoblastic cells. *Biochem Biophys Res Commun*, v.325, n.4, Dec 24, p.1194-200. 2004.
- Simonet, W. S., D. L. Lacey, et al. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell*, v.89, n.2, Apr 18, p.309-19. 1997.
- Sosic, D., B. Brand-Saberi, et al. Regulation of paraxis expression and somite formation by ectoderm- and neural tube-derived signals. *Dev Biol*, v.185, n.2, May 15, p.229-43. 1997.

- Tasker, P. N., H. Macdonald, et al. Association of PLOD1 polymorphisms with bone mineral density in a population-based study of women from the UK. *Osteoporos Int*, v.17, n.7, p.1078-85. 2006.
- Teitelbaum, S. L. Bone resorption by osteoclasts. *Science*, v.289, n.5484, Sep 1, p.1504-8. 2000.
- Tiret, L., H. Le Mouellic, et al. Increased apoptosis of motoneurons and altered somatotopic maps in the brachial spinal cord of Hoxc-8-deficient mice. *Development*, v.125, n.2, Jan, p.279-91. 1998.
- Tu, X., K. S. Joeng, et al. Noncanonical Wnt signaling through G protein-linked PKCdelta activation promotes bone formation. *Dev Cell*, v.12, n.1, Jan, p.113-27. 2007.
- Tuominen, T., T. Jamsa, et al. Bovine bone implant with bovine bone morphogenetic protein in healing a canine ulnar defect. *Int Orthop*, v.25, n.1, p.5-8. 2001.
- Urist, M. R. Bone: formation by autoinduction. *Science*, v.150, n.698, Nov 12, p.893-9. 1965.
- Urist, M. R., H. Iwata, et al. Bone morphogenesis in implants of insoluble bone gelatin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.70, n.12, Dec, p.3511-5. 1973.
- Urist, M. R., A. Mikulski, et al. Solubilized and insolubilized bone morphogenetic protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.76, n.4, Apr, p.1828-32. 1979.
- Uzawa, K., W. J. Grzesik, et al. Differential expression of human lysyl hydroxylase genes, lysine hydroxylation, and cross-linking of type I collagen during osteoblastic differentiation in vitro. *J Bone Miner Res*, v.14, n.8, Aug, p.1272-80. 1999.
- Vaes, B. L., K. J. Decherig, et al. Comprehensive microarray analysis of bone morphogenetic protein 2-induced osteoblast differentiation resulting in the identification of novel markers for bone development. *J Bone Miner Res*, v.17, n.12, Dec, p.2106-18. 2002.
- Vaes, B. L., K. J. Decherig, et al. Microarray analysis reveals expression regulation of Wnt antagonists in differentiating osteoblasts. *Bone*, v.36, n.5, May, p.803-11. 2005.
- Vandesompele, J., K. De Preter, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol*, v.3, n.7, Jun 18, p.RESEARCH0034. 2002.
- Von Bubnoff, A. e K. W. Cho. Intracellular BMP signaling regulation in vertebrates: pathway or network? *Dev Biol*, v.239, n.1, Nov 1, p.1-14. 2001.
- Walker, D. H. e N. M. Wright. Bone morphogenetic proteins and spinal fusion. *Neurosurg Focus*, v.13, n.6, Dec 15, p.e3. 2002.

- Wan, M., X. Shi, et al. Transcriptional mechanisms of bone morphogenetic protein-induced osteoprotegerin gene expression. *J Biol Chem*, v.276, n.13, Mar 30, p.10119-25. 2001.
- Wang, E. A., V. Rosen, et al. Purification and characterization of other distinct bone-inducing factors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.85, n.24, Dec, p.9484-8. 1988.
- Wharton, K. A., Jr. Runnin' with the Dvl: proteins that associate with Dsh/Dvl and their significance to Wnt signal transduction. *Dev Biol*, v.253, n.1, Jan 1, p.1-17. 2003.
- Wozney, J. M. The bone morphogenetic protein family: multifunctional cellular regulators in the embryo and adult. *Eur J Oral Sci*, v.106 Suppl 1, Jan, p.160-6. 1998.
- Wozney, J. M., V. Rosen, et al. Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science*, v.242, n.4885, Dec 16, p.1528-34. 1988.
- Xiao, C., J. H. Shim, et al. Ecsit is required for Bmp signaling and mesoderm formation during mouse embryogenesis. *Genes Dev*, v.17, n.23, Dec 1, p.2933-49. 2003.
- Xiao, G., R. Gopalakrishnan, et al. Bone morphogenetic proteins, extracellular matrix, and mitogen-activated protein kinase signaling pathways are required for osteoblast-specific gene expression and differentiation in MC3T3-E1 cells. *J Bone Miner Res*, v.17, n.1, Jan, p.101-10. 2002.
- Xiao, G., D. Jiang, et al. Fibroblast growth factor 2 induction of the osteocalcin gene requires MAPK activity and phosphorylation of the osteoblast transcription factor, Cbfa1/Runx2. *J Biol Chem*, v.277, n.39, Sep 27, p.36181-7. 2002.
- Yamaguchi, A., T. Komori, et al. Regulation of osteoblast differentiation mediated by bone morphogenetic proteins, hedgehogs, and Cbfa1. *Endocr Rev*, v.21, n.4, Aug, p.393-411. 2000.
- Yanagita, M. BMP antagonists: their roles in development and involvement in pathophysiology. *Cytokine Growth Factor Rev*, v.16, n.3, Jun, p.309-17. 2005.
- Yang, S., D. Wei, et al. In vitro and in vivo synergistic interactions between the Runx2/Cbfa1 transcription factor and bone morphogenetic protein-2 in stimulating osteoblast differentiation. *J Bone Miner Res*, v.18, n.4, Apr, p.705-15. 2003.
- Yang, X., X. Ji, et al. Smad1 domains interacting with Hoxc-8 induce osteoblast differentiation. *J Biol Chem*, v.275, n.2, Jan 14, p.1065-72. 2000.
- Yueh, Y. G., D. P. Gardner, et al. Evidence for regulation of cartilage differentiation by the homeobox gene Hoxc-8. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.95, n.17, Aug 18, p.9956-61. 1998.

Zhong, N., R. P. Gersch, et al. Wnt signaling activation during bone regeneration and the role of Dishevelled in chondrocyte proliferation and differentiation. *Bone*, v.39, n.1, Jul, p.5-16. 2006.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)