

PATRÍCIA SANTOS PEREIRA LIMA

Identificação de genes regulados pelo mecanismo de metilação durante a expansão de células-tronco mesenquimais e na fase inicial da osteogênese.

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Genética

Orientador: Prof. Dr. Wilson Araújo da Silva Júnior

Ribeirão Preto
2008

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Lima, Patrícia SP

Identificação de genes controlados pelo mecanismo de metilação de durante a expansão de células-tronco mesenquimais e na fase inicial da osteogênese / Patrícia de Lima Santos; orientador: Wilson Araújo da Silva Júnior. Ribeirão Preto, 2008.

106 f. : fig.

Tese (Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Genética) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

1. Células-tronco Mesenquimais. 2. Osteogênese. 3. Metilação. 4. Expressão Gênica

À minha mãe, Dalva e ao meu pai, Aauto.
Amor incondicional

Agradecimentos

Ao meu orientador, Prof. Wilson, pela oportunidade e confiança.

Aos colegas do Laboratório de Genética Molecular: Cris Ayres, Greice, Anne, Adriana, Dalila, Fernanda, Thiago e Israel por toda ajuda em diversos momentos e de diversas formas. Em especial a Carla, pela grandiosa contribuição, muito obrigada amiga!

A Rodrigo Panepucci e Amélia Góes (Laboratório de Hematologia) pela confecção dos *microarrays*.

A Maristela, Karina, Sâmia, Taísa, Camila, Viviane e Sandra pelo auxílio no desenvolvimento deste trabalho.

A Meire, por todo auxílio e dedicação.

A Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto pela acolhida.

A Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, em especial ao Departamento de Ciências Naturais, pelo incentivo.

A SAEB (Secretaria da Administração do Estado da Bahia) pelo auxílio financeiro.

A família Costa: Cláudio, Emiliana e Gabriel, pelos inúmeros momentos divertidos que passamos juntos.

E, em especial, a minha família: meu esposo, Pierre e meu filho, Pedro. Obrigada por todo apoio e paciência nos momentos mais difíceis. Aos meus pais, irmãos, cunhados, sobrinhos, sogros. Obrigada por tudo! Amo a todos vocês!

RESUMO

LIMA, P. S. P. **Identificação de genes controlados pelo mecanismo de metilação durante a expansão de células-tronco mesenquimais e na fase inicial da diferenciação osteogênica.** 2008. 106 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

A medula óssea de adultos contém células-tronco mesenquimais (CTMs) que atuam na regeneração dos tecidos mesenquimais tais como ósseo, cartilaginoso, adiposo e muscular, além de ligamentos e tendões. Essas características elegem as CTMs como excelentes candidatas para o uso nos protocolos de medicina regenerativa. Os aspectos moleculares que governam a regulação para cada via de diferenciação são uma área de investigação ainda em estudo e a identificação de genes cuja expressão promova, por exemplo, a diferenciação osteoblástica ou iniba a diferenciação em outros tipos celulares é uma estratégia amplamente utilizada no esforço para a compreensão dos processos moleculares envolvidos na diferenciação tecidual. O objetivo deste estudo é identificar genes regulados pelo mecanismo de metilação durante a expansão e a diferenciação inicial em osteoblastos das CTMs. As CTMs foram obtidas da medula óssea de dois diferentes doadores, expandidas e tratadas por quatro dias com o agente demetilante 5-aza-2'-deoxicitidina. A diferenciação osteogênica foi estimulada por sete dias, sendo os quatro últimos dias de tratamento. Todos os experimentos foram realizados com seus respectivos controles. Ao final dos quatro dias de tratamento, as células foram coletadas para extração de RNA e DNA. Para a identificação de genes com expressão aumentada após o tratamento foi utilizada a plataforma de *microarrays CodeLink*. A validação da expressão dos genes selecionados foi realizada por RT-PCR em tempo real e o padrão de metilação da região promotora dos genes foi analisado por seqüenciamento após a modificação do DNA pelo bissulfito de sódio. Três genes de cada etapa foram selecionados para a análise: os genes *FBLN2*, *LAMB2* e *ADFP* na expansão e na diferenciação foram

selecionados *TBKBPI*, *ARHGEF17* e *ALPL*. Os genes *SAA2* e *MMP7*, cuja expressão aumentou durante a diferenciação (amostras controle), também foram selecionados. A expressão de todos os genes foi validada por qRT-PCR embora, em muitos casos, a diferença de expressão entre as amostras tratada e controle tenha sido maior pela metodologia do *microarray*. No entanto, a expressão destes genes nas amostras de diferentes indivíduos foi semelhante, com exceção para os genes *ADFP* e *ALPL*. A análise de metilação na ilha CpG dos genes *FBLN2*, *LAMB2*, *ADFP* e *ALPL* revelou a presença de metilação apenas na ilha CpG do gene *FBLN2*. A diminuição na densidade de metilação do gene *FBLN2* favoreceu o aumento da sua expressão, embora a metilação não pareça ser o único mecanismo responsável pela expressão deste gene. O aumento da expressão de genes que codificam para componentes da matriz extracelular (*FBLN2*, *LAMB2*, *SAA2* e *MMP7*) e de genes relacionados à diferenciação celular (*ADFP* e *ALPL*) assim como o perfil destas expressões após os sete dias de diferenciação em osteoblastos, indicam que a hipometilação favorece a diferenciação das CTMs.

Palavras-chave: células-tronco. Osteogênese. Metilação. Expressão gênica

ABSTRACT

LIMA, P. S. P. **Identification of genes regulated by methylation during the expansion of mesenchymal stem cells and initial osteogenic differentiation.** 2008. 106 f. Thesis (Doctoral) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

The adult bone marrow contains mesenchymal stem cells (MSC) that work in the regeneration of mesenchymal tissues such as bone, cartilage, fat and muscle, as well as ligaments and tendons. This features generated a great deal of interest as a potential source for cell-based therapeutic strategies and for use in the regenerative medicine protocols. The molecular details that govern the regulation for each differentiation is an area of research still under investigation and identification of genes whose expression promotes, for example, the osteogenic differentiation or inhibits differentiation into other cell types is a widely used strategy in the effort to understand the molecular processes involved in tissue differentiation. The aim of this study was to identify genes regulated by methylation during the expansion and initial osteogenic differentiation of MSC. MSC were derived from bone marrow from two different donors, expanded and treated during four days with the demethylation agent 5-aza-2'-deoxycytidine. Osteogenic differentiation was induced for seven days and cells were treated with 5-aza in the last four days. All experiments were performed with their respective controls. At the end of treatment, cells were harvested for DNA and RNA isolation. To identify genes with increased expression after treatment, CodeLink microarrays system was used. The expression of selected genes was validated by RQ-PCR and methylation status of their 5' upstream region was evaluated by sequencing of sodium bisulfite-treated genomic DNA. Three genes of each stage were selected for analysis: *FBLN2*, *LAMB2* and *ADFP* in the expansion stage and *TBKBPI*, *ARHGEF17* and *ALPL* in osteogênica differentiation phase. *SAA2* and *MMP7*, whose expression increased during osteogênica differentiation in control

samples were also selected. Expression of all genes was validated by qRT-PCR, although in many cases, the difference of expression between treated and non-treated cells was lower than observed in microarray data. However, the expression of these genes was similar in samples from two different donors except for *ADFP* and *ALPL*. Methylation analysis of *FBLN2*, *LAMB2*, *ADFP* and *ALPL* showed that the percentage of methylated dinucleotides in *FBLN2* CpG island was higher in non-treated than in treated cells and that methylation correlates with *FBLN2* mRNA expression, but does not appear to be the only responsible for the expression of this gene. Increased expression of genes that code for components of extracellular matrix (*FBLN2*, *LAMB2*, *SAA2* and *MMP7*) and genes related to cell differentiation (*ADFP* and *ALPL*) and the profile of their expression after seven days of osteogenic differentiation, indicate that hypomethylation promotes differentiation of MSC.

Keywords: Stem cells. Osteogenic. Methylation. Metilação. Gene expression.

SUMÁRIO

1. Introdução	12
1.1. Células-tronco Mesenquimais (CTMs)	13
1.2. A multipotencialidade das CTMs	15
1.3. Metilação do DNA e a diferenciação das CTMs	17
1.4. Multipotencialidade ou heterogeneidade celular?	23
1.5. Aplicações clínicas das CTMs	25
2. Materiais e Métodos	27
2.1. Amostras	28
2.2. Isolamento de células tronco mesenquimais (CTMs)	28
2.3. Citometria de fluxo	29
2.3.1. Imunofenotipagem das CTMs	29
2.3.2. Avaliação dos níveis de apoptose	30
2.3.3. Ensaio de proliferação celular por citometria de fluxo durante o tratamento com 5-aza-2'-deoxicitidina	30
2.4. Diferenciação das CTMs em osteoblastos e adipócitos	31
2.5. Tratamento das células mesenquimais com 5-aza-2'-deoxicitidina durante a expansão celular	33
2.6. Tratamento das células mesenquimais com 5-aza-2'-deoxicitidina durante o estímulo para a diferenciação osteoblástica	34
2.7. Colorações histoquímicas	34
2.8. Extração e modificação do DNA por bissulfito de sódio	35
2.9. Extração do RNA e síntese de cDNA	36
2.10. <i>Microarrays</i>	36

2.11. Seleção dos genes diferencialmente expressos	38
2.12. Validação dos resultados do <i>array</i> por qRT-PCR (RT-PCR quantitativo) pelo sistema <i>SYBER-Green</i>	38
2.13. <i>Nested</i> -PCR das ilhas CpGs dos genes selecionados	40
2.14. Clonagem e seqüenciamento do DNA modificado pelo bissulfito	40
3. Resultados	42
3.1. Citometria de fluxo	43
3.1.1. Avaliação dos níveis de apoptose	43
3.1.2. Ensaio de proliferação celular	43
3.1.3. Imunofenotipagem	45
3.2. Análise histoquímica das CTMs isoladas diferenciadas em osteoblastos e adipócitos	48
3.2.1. Diferenciação em osteócitos das CTMs tratadas com 5-aza	49
3.3. Seleção dos genes diferencialmente expressos	50
3.3.1. Seleção dos genes diferencialmente expressos após o tratamento na expansão	52
3.3.2. Seleção dos genes diferencialmente expressos na diferenciação osteoblástica após o tratamento	53
3.3.3. Seleção dos genes diferencialmente expressos entre as amostras não-tratadas	54
3.4. qRT-PCR pelo sistema de <i>Sybr-Green</i>	54
3.4.1. Expressão dos marcadores da superfície da CTM: <i>CD29</i> , <i>CD105</i> e <i>CD73</i>	55
3.4.2. Expressão dos genes na expansão celular	56
3.4.3. Expressão dos genes na diferenciação celular	58
3.4.4. Expressão dos genes entre as amostras não tratadas	60
3.5. Seqüenciamento do DNA modificado por bissulfito de sódio	60
3.5.1. Análise do estado de metilação das ilhas CpG dos genes selecionados na expansão celular	61

3.5.2. Análise do estado de metilação das ilhas CpG dos genes selecionados na diferenciação	65
4. Discussão	68
5. Conclusões	86
Referências	89
Apêndices	103

Introdução

2. INTRODUÇÃO

2.1. Células-tronco Mesenquimais (CTMs)

Na maioria dos tecidos adultos existem reservas de células com capacidade de multiplicar-se, diferenciando-se naquele tecido a que pertencem e ao mesmo tempo mantendo esta própria reserva de células indiferenciadas. Essas células, denominadas de células-tronco diferem de outras células do organismo por apresentarem três principais características: (1) são células indiferenciadas e não-especializadas; (2) são capazes de se multiplicar por longos períodos mantendo-se indiferenciadas, de forma que um pequeno número pode originar uma grande população de células semelhantes; (3) são capazes de se diferenciar em células especializadas de um tecido particular (ZAGO; DIMAS, 2006).

As primeiras células-tronco bem caracterizadas foram as progenitoras das células do sangue. Já na década de 1940 sabia-se que na medula óssea existem células indiferenciadas que repõem as células maduras do sangue que vão sendo eliminadas. Estas células são raras (menos de 1 em 10.000 células da medula), de difícil identificação morfológica e são denominadas de células-tronco hematopoéticas. Além de se localizarem na medula óssea, essas células-tronco circulam no sangue de adultos e, em especial, no sangue do feto. No momento do nascimento, o sangue fetal retido na placenta após a secção do cordão umbilical pode ser recuperado e constitui rica fonte dessas células, que podem ser usadas para fins terapêuticos (ZAGO; DIMAS, 2006).

Hoje está bem demonstrado que muitos tecidos humanos (ou talvez todos) possuem sua própria célula-tronco. As células-tronco já bem conhecidas células-tronco são as da pele, da mucosa intestinal, do epitélio olfativo, cérebro, fígado, gordura, córnea, retina, polpa dentária, pulmões, músculos esqueléticos e músculos cardíacos (ZAGO; DIMAS, 2006).

A medula óssea contém além das células-tronco hematopoéticas e das células-tronco endoteliais, uma população rara de células-tronco multipotenciais capaz de suportar a hematopoese e de se diferenciar em diversas linhagens celulares, como os condrócitos, os osteócitos, os adipócitos e os tenócitos. Estas células foram originalmente identificadas a partir das células mononucleares da medula óssea de camundongos por Alexander Friedenstein e colaboradores, em 1966, que as denominaram células formadoras de colônias fibroblásticas (*CFU-F = colony forming units – fibroblastic*). Mais recentemente estas células têm sido denominadas células-tronco mesenquimais (CTM) e constituem uma pequena população celular da medula óssea, correspondendo a cerca de 0,001% a 0,01% de todas as células nucleadas medulares (ZAGO; DIMAS, 2006).

Atualmente existem vários métodos para o isolamento das CTMs da medula óssea. Tradicionalmente, elas têm sido isoladas com base em sua aderência seletiva às superfícies plásticas quando comparadas com as células hematopoéticas. CTMs são fusiformes, semelhantes a fibroblastos e durante o crescimento inicial *in vitro* formam colônias (CFU-F). As células são negativas para marcadores de superfície hematopoéticas: CD34, CD45, CD14, CD31, CD133 e positivas para CD105, CD166, CD54, CD55, CD13 e CD44 (PITTENGER et al., 1999). Porém, há diferenças entre vários estudos em relação às características dos marcadores de superfície o que pode ser explicado pela variação nos métodos de cultura e/ou pelo estágio de diferenciação das células (KASSEM; KRISTIANSEN; ABDALLAH, 2004). Embora não existam marcadores específicos para as CTMs, a análise com um conjunto de anticorpos mais expressos nestas células permite determinar um perfil imunofenotípico das CTMs expandidas em culturas (ZAGO; DIMAS, 2006). Para Javazon, Beggs e Flake (2004), as características morfológicas e fenotípicas não podem ser usadas como os melhores critérios para uma identificação específica das CTMs e que talvez a identificação mais presumível seja

funcional como: a capacidade de diferenciação *in vitro* em tecidos ósseo, adiposo e cartilaginoso.

Com o objetivo de fornecer a comunidade científica um conjunto de critérios para definir a identidade das CTMs, baseado nos dados atualmente disponíveis, o Comitê da Célula Tronco Mesenquimal e de Tecido (*Mesenchymal and Tissue Stem Cell Committee*) da Sociedade Internacional para a Terapia Celular (*ISCT = International Society for Cellular Therapy*) propôs em 2006 três critérios para definir a CTM humana. Primeiro, as CTMs devem ser aderentes ao plástico quando mantidas em cultura usando frascos de cultura de tecidos. Segundo, 95% ou mais da população das CTMs devem ser positivas para CD105, CD73 e CD90 e negativas ($\leq 2\%$ positivas) para CD45, CD34, CD14 ou CD11b, CD79 α ou CD19 e HLA classe II. Terceiro, as células devem ser capazes de diferenciar em osteoblastos, adipócitos e condrócitos quando submetidas às devidas condições de diferenciação *in vitro* (DOMINICI et al., 2006).

As CTMs com características biológicas similares daquelas derivadas da medula óssea têm sido isoladas de outras fontes incluindo sangue periférico, sangue do cordão umbilical, membrana sinovial, dentes decíduos e recentemente fluido amniótico. Estas várias CTMs apresentam algumas propriedades e fenótipos de superfície em comum mas não se assemelham em seu potencial de diferenciação e no perfil de expressão gênica pois refletem o tecido de origem (ABDALLAH; KASSEM, 2008).

2.2. A multipotencialidade das CTMs

A multipotencialidade das CTMs derivadas da medula óssea, o seu fácil isolamento e cultivo, assim como seu alto potencial de expansão *in vitro*, fazem destas células uma ferramenta terapêutica atrativa em uma gama de aplicações clínicas incluindo terapia gênica e

celular (KASSEM; KRISTIANSEN; ABDALLAH, 2004; MINGUELL; ERICES; CONGET, 2001).

Muitos estudos *in vitro* têm sido conduzidos para avaliar o potencial de diferenciação das células progenitoras mesenquimais derivadas da medula óssea, bem como criar condições de cultivo, estímulos para a diferenciação, e métodos para a identificação de cada fenótipo diferenciado (MINGUELL; ERICES; CONGET, 2001).

Como já comentado, a característica fundamental das CTMs em cultura é a sua capacidade de se diferenciar em osso, cartilagem e gordura. A diferenciação *in vitro* em osteoblastos requer a presença de indutores que incluem beta-glicerolfosfato, ácido ascórbico, dexametasona e soro fetal bovino. Em contraste, a diferenciação em adipócitos ocorre quando as CTMs são tratadas com isobutilmetilxantina, dexametasona, insulina, e indometacina e, na diferenciação em condrócitos as células são cultivadas com soro bovino fetal e TGF- β 3 (*transforming growth factor*) (PITTENGER et al., 1999).

Antes de infundir as CTMs no paciente elas precisam ser diferenciadas na linhagem específica do tecido a ser tratado. Há uma preocupação de que o uso terapêutico das células-tronco indiferenciadas possa favorecer a proliferação e diferenciação descontroladas resultando em sérias complicações incluindo a formação de tumores (ABDALLAH; KASSEM, 2008).

Sendo assim, a identificação de genes que determinam o comprometimento da linhagem e diferenciação das células-tronco é um importante aspecto para a utilização das destas células na terapia celular (ABDALLAH et al., 2004). Embora os agentes que induzem a osteogênese, adipogênese, condrogênese e miogênese sejam conhecidos, o programa genético que governa a regulação de cada via continua a ser uma área de investigação (CAPLAN; BRUDER, 2001).

Alguns estudos têm identificado genes que controlam as vias de diferenciação osteoblástica das CTMs. Por exemplo, os genes *Ihh* (*Indian hedgehog*) e *FGF18* (*fibroblast*

growth factor 18) codificam para fatores de crescimento que apresentam um papel essencial durante a diferenciação osteoblástica. As proteínas morfogenéticas do osso (BMPs = *bone morphogenetic proteins*) são conhecidas por induzir a formação óssea *in vivo* e o TGF β (*transforming growth factor, beta 1*), que é mais abundante na matriz óssea do que as BMPs, também apresentam um papel durante a diferenciação osteoblástica. Por outro lado, o fator de crescimento mais abundante na matriz extracelular do osso são os fatores de crescimento IGF1 e IGF2 (*insulin-like growth factors*) os quais estimulam a proliferação osteoblástica *in vitro*. O controle transcricional da diferenciação osteoblástica é dominada pela via genética *Cbfa1/Runx2* (KARSENTY; WAGNER, 2002). Outros genes como Osterix (*Osx*) e o *Lrp5* (*low density lipoprotein receptor-related protein 5*) também participam do controle da diferenciação osteoblástica. Já os genes *PPAR γ 2* (*peroxisome proliferator-activated receptor γ*) e *Sox9* (*SRY – sex determining region Y-box 9*) induzem adipogênese e condrogênese, respectivamente (KASSEM; ABDALLAH; SAEED, 2008). A figura 1 mostra outros genes que também participam do controle transcricional das diferenciações em miócitos, adipócitos, condrócitos e osteoblastos.

Está claro que as CTMs secretam constitutivamente fatores de crescimento específicos e citosinas e que a indução em cada via de diferenciação envolve a modulação da síntese destas moléculas (CAPLAN; BRUDER, 2001). Especificamente, genes associados com auto-renovação são silenciados, enquanto genes específicos para um tipo de célula tornam ativos transcricionalmente durante a diferenciação (WU; SUN, 2006).

1.3. Metilação do DNA e a diferenciação das CTMs

Evidências sugerem que a iniciação e manutenção de mudanças na expressão gênica associadas com a diferenciação das CTMs envolvem a ação de um único programa

epigenético incluindo modificações covalentes do DNA e da cromatina assim como pequenos RNAs não codificantes mediadores da regulação pré e pós-transcricional (WU; SUN, 2006). Portanto, é importante determinar se o mecanismo dependente de metilação está envolvido na expressão dos genes da mesenquimal assim como na sua diferenciação para as múltiplas linhagens (KANG et al., 2007).

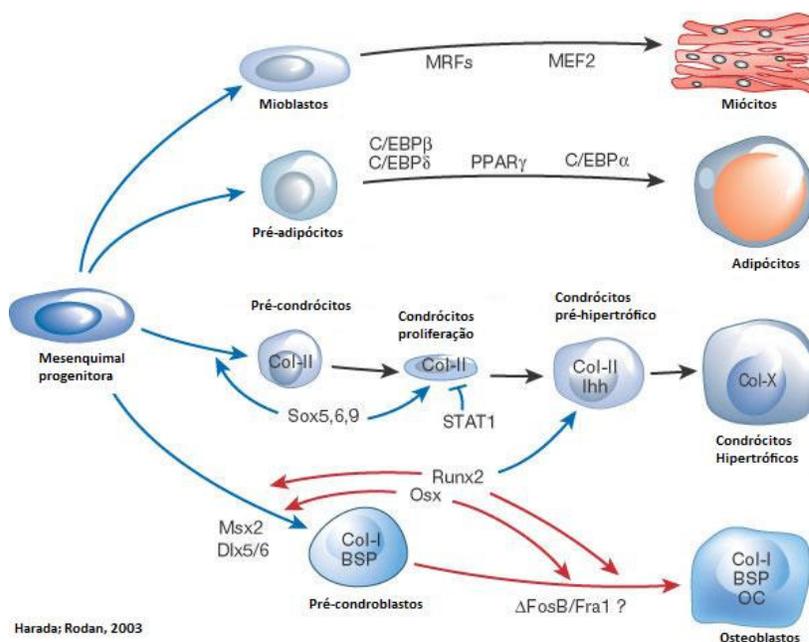


Figura 1. Controle transcricional das diferenciações em miócitos, adipócitos, condrócitos e osteoblastos. *MRFs*, myogenic regulatory factors; *MEF2*, myocyte-enhancer factor 2; *C/EBP*, CCAAT-enhancer-binding protein; *PPAR γ* , peroxisome proliferator-activated receptor γ ; *STAT1*, signal transducers and activators of transcription-1; *Sox5,6,9,STAT1*, sinal transducer and activator of transcription 1; *Osx*, osterix; *Runx2*, runt-related transcription factor 2; *Col- I/II/X*, type I/II/X collagen; *Ihh*, Indian hedgehog; *BSP*, bone sialoprotein; *OC*, osteocalcin (Harada; Rodan, 2003).

de uma família de enzimas denominada DNA metil-transferases (DNMT) que catalisa a transferência do grupo metil da S-adenosilmetionina (*SAM*) para um resíduo de citosina que antecede uma guanina - dinucleotídeo CpG (STRATHDEE; BROWN, 2002).

Cinco membros da família DNMT já foram descritos em camundongos e o papel de cada uma deles durante o desenvolvimento foi estudado através da análise fenotípica de camundongos com mutações em seus genes (JAENISCH; BIRD, 2003). A enzima DNMT1

apresenta a função de manter o padrão de metilação após a síntese da nova fita do DNA, desde que a fita mãe também esteja metilada uma vez que ela exibe maior atividade no DNA hemi-metilado do que no não-metilado (STRATHDEE; BROWN, 2002). Subseqüentemente, duas outras enzimas – DNMT3a e DNMT3b – foram também identificadas. Ao contrário da DNMT1, estas enzimas não apresentaram preferência por DNA hemi-metilado e suas funções relacionam-se principalmente com a metilação *de novo* (JONES; BAYLIN, 2002). Foi demonstrado que a perda homozigótica de qualquer uma destas três enzimas é letal em camundongos e a ação delas é provavelmente vital para o correto padrão da expressão gênica durante o desenvolvimento (STRATHDEE; BROWN, 2002). Os dois últimos membros da família da DNMT são a DNMT3L e a DNMT2. A primeira é uma proteína que não apresenta atividade catalítica mas localiza-se juntamente com DNMT3a e DNMT3b sendo essencial para o estabelecimento do *imprinting* em linhagens germinativas femininas. Por último, a deleção da DNMT2 não apresentou nenhuma alteração no fenótipo de camundongos, no entanto, este gene é conservado em *Drosophila* sendo altamente expresso durante a oogênese (JAENISCH; BIRD, 2003).

Aproximadamente 70% dos dinucleotídeos CpG do genoma humano de mamíferos estão dispersos pelo genoma e encontram-se metilados (JONES, 2000). No entanto, certas regiões do genoma apresentam pequenas extensões de 0,5-5 kb ricas em CpG e que são denominadas de ilhas CpG (STRATHDEE; BROWN, 2002). Estima-se que o genoma humano apresenta aproximadamente 29.000 ilhas CpG (NEPHEW; HUANG, 2003) e 50-60% destas ilhas estão localizadas próximas a região promotora de genes ativos podendo também se estender para dentro do primeiro exon (JONES, 2003).

Uma ilha CpG é definida como uma região de DNA, maior que 200 pb, com um conteúdo de GC acima de 0,5 e a razão da frequência entre o observado e o esperado de CpG (ob/esp) maior que 0,6 (LI; DAHIYA, 2002).

A importância funcional das ilhas CpG dentro dos promotores está associada com a repressão transcricional dos genes (STRATHDEE; BROWN, 2002). Segundo Baylin e Herman (2000), os mecanismos moleculares que permeiam o silenciamento gênico por hipermetilação da região promotora envolvem a integração da metilação do DNA com a organização da cromatina e a regulação da acetilação das histonas.

O mecanismo inibitório exerce seu efeito através da ligação de proteínas específicas às seqüências de DNA metilado (MUKAI; SEKIGUCHI, 2002). Uma família de proteínas denominada MBD (*Methyl-Binding Domain*) é conhecida por apresentar domínios de ligação ao DNA metilado. No mínimo, três dos cinco membros conhecidos desta família (MeCP2, MBD2 e MBD3) estão associadas com grandes complexos protéicos contendo histonas desacetilases (HDAC1 e HDAC2) e proteínas com atividade remodeladora da cromatina (STRATHDEE; BROWN, 2002). MeCP2 e MBD1 também apresentam um domínio de repressão transcricional (TRD) no qual o co-repressor *mSin3A* pode se ligar (MUKAI; SEKIGUCHI, 2002, 2002).

O padrão de metilação normal das células é mantido através das sucessivas divisões celulares em tecidos adultos e a herança desta informação é denominada de Herança Epigenética (LAIRD, 2003). O estudo epigenético, no entanto, não se baseia apenas na metilação do DNA. Outro evento epigenético também está associado com a estrutura da cromatina e que também apresenta um papel importante no controle da expressão gênica, é a acetilação e metilação das histonas (MUKAI; SEKIGUCHI, 2002). Existe uma interação entre todos estes sistemas epigenéticos: metilação do DNA e acetilação, desacetilação e metilação das histonas (MACALUSO; PAGGI; GIORDANO, 2003; REIK; SANTOS; DEAN, 2003).

A metilação do DNA tem sido mostrada ser essencial para o desenvolvimento na inativação do cromossomo X e *imprinting* de genes nos quais o alelo não expresso (paterno ou materno) apresenta a sua região promotora metilada (JONES, 2002; STRATHDEE;

BROWN, 2002). Outro papel biológico da metilação do DNA em células normais é a repressão de transposons, retrovírus e alguns elementos repetitivos, limitando assim a propagação destes elementos pelo genoma (MUKAI; SEKIGUCHI, 2002).

O padrão de metilação do DNA é estabelecido gradualmente durante diferentes estágios críticos no início da embriogênese. O processo de reprogramação epigenética durante a embriogênese assegura o “apagamento” da informação epigenética durante a gametogênese e também “anula” o epigenoma das células-tronco pluripotentes da massa interna celular do blastocisto, fornecendo um amplo potencial de desenvolvimento (WU; SUN, 2006).

Para Wu e Sun (2006), a metilação do DNA poderá estar criticamente envolvida no silenciamento dos genes da diferenciação em células-tronco tecido-específico e/ou células diferenciadas e, a inativação de genes mediada pela modificação das histonas está principalmente envolvida na manutenção da propriedade de auto-renovação e silenciamento de genes da diferenciação em células-tronco embrionárias. De fato, como demonstrado por Cho et al., (2005), o tratamento células do estroma humano derivadas da medula óssea (*BMSC = bone marrow stromal cells*) e do tecido adiposo (*ATSC = adipose tissue stromal cells*) com um inibidor da desacetilase de histonas (HDAC), o ácido valpróico (VPA), assim como outro inibidor, a tricostatina A (TSA), aumentou a diferenciação osteogênica nos dois tipos de células.

Shiota et al. (2002), analisaram por RLGs (*Restriction Landmark Genomic Scanning*) o perfil de metilação do DNA das ilhas CpG do genoma de células-tronco de ratos (células-tronco embrionárias – CTE, células germinativas embrionárias – CGE e células-tronco trofoblásticas – CTT) antes e após a diferenciação. Os resultados mostraram que para cada tipo de célula-tronco havia um padrão específico de loci diferencialmente metilados e que em todos os tipos de célula-tronco estudados, o estado de metilação mudou durante a diferenciação. Após a diferenciação das CTEs e CGEs, 73 e 11 novos *spots* surgiram

(metilação *de novo*) e 35 e 50 desapareceram (demetilação), respectivamente. Na diferenciação das CTTs 15 novos *spots* surgiram e 15 apareceram. Portanto a diferenciação sempre envolve a demetilação e a metilação *de novo*. Para os autores, os resultados mostram claramente que o padrão de metilação do DNA está diferente antes e após a diferenciação e que os padrões são também diferentes mesmo entre tipos celulares similares, como as CTEs e as CGEs.

A metilação do DNA esta sendo um foco crescente nos estudos epigenéticos do desenvolvimento do osso. O ativador receptor do ligante NF-kB (RANKL) é um transdutor de sinal ligante da membrana necessário para a diferenciação e manutenção dos osteoclastos. A metilação do CpG ao redor do sítio inicial de transcrição do gene *RANKL* de ratos é responsável pela diferença de expressão entre as células do estroma e os osteoblastos (KITAZAWA; KITAZAW, 2002). Lee et al. (2006), demonstram que os sítios CpG da região promotora dos genes *Dlx5* e *Osx* em ratos, estão metilados em células não osteogênicas e que a demetilação induzida pela 5-AzadC induz os marcadores osteoblástico ALP e OC (osteocalcin) na linhagem C2C12 mioblástica. Em adição, o promotor do gene *Dlx5* foi hipometilado durante a formação osteoblástica nesta linhagem em resposta a BMP-2.

Kang et al. (2007), analisaram a metilação de sítios CpGs em dois tipos de células do estroma humana derivadas da medula óssea (*BMSC = bone marrow stromal cells*) e do tecido adiposo (*ATSC = adipose tissue stromal cells*). A metilação dos sítios CpGs dos genes *RUNX2* e *BGLAP* (específicos de osteoblastos), *PPAR γ 2* (específico de adipócitos), *CDKN2A* e *MLH1* (*housekeeping genes*) e *RUNX3* (considerado um gene não-relacionado com mesenquimal) foi avaliada por MSP (*methylation specific-PCR*). Os genes *RUNX2*, *BGLAP*, *CDKN2A* na BMSC, e o gene *PPAR γ 2* na ATSC estavam hipometilados. Nos dois tipos de célula a ilha CpG do gene *RUNX3* estava hipermetilado e o gene *MLH1*, hipometilado. A metilação do gene *PPAR γ 2* que estava fracamente metilado na BMSC foi completamente

hipometilado durante a diferenciação osteoblástica. Para os autores, estes resultados mostraram que a metilação estabelecida em células mesenquimais tende ser consistentemente conservada quando submetidas à diferenciação e que o observado para o gene *PPAR γ 2* nas BMSC sugere um mecanismo dependente de metilação sustentando a adipogênese na medula óssea.

1.4. Multipotencialidade ou heterogeneidade celular?

Ainda não se sabe se a multipotencialidade das CTMs se deve a existência de células precursoras que existem *in vivo* ou se o potencial da célula tronco emerge das condições de cultura *in vitro* (KANG et al., 2007).

Uma desvantagem do método de isolamento das CTMs (aderência seletiva) é a inevitável contaminação com as células hematopoéticas e a heterogeneidade celular das culturas. O conceito de heterogeneidade celular das CTMs refere-se às diferenças no potencial de diferenciação entre os clones de células das CTMs (KASSEM; ABDALLAH; SAEED, 2008). Kuznetsov et al. (1997), já haviam levantando esta questão: estas células precursoras são pluripotentes e homogêneas, isto é, verdadeiras células-tronco, ou elas são uma mistura de células comprometidas com várias linhagens de diferenciação?

No estudo realizado por estes pesquisadores foi analisada a formação do osso *in vivo* por uma população de células na quarta passagem derivadas de uma simples CFU-F de doadores humanos. Estas células foram usadas na implantação subcutânea em ratos imunodeficientes. Multi-colônias de CFU-F também foram transplantadas para servir de controle positivo. Após oito semanas, foi observada a formação óssea nos transplantes que utilizou as células derivadas das multi-colônias, enquanto que 20 das 34 (58,8%) simples-colônias derivadas de amostras de quatro doadores formaram osso. Estas colônias

desenvolveram tecido ósseo e hematopoiético, outras formaram pouco osso sem hematopoese, enquanto que as restantes formaram apenas tecido fibroso. Assim, provavelmente, aquelas colônias-simples que formaram tanto o osso quanto o microambiente hematopoiético, foram originadas de uma CFU-F pluripotente, isto é, de verdadeiras células-tronco. Células que formaram apenas tecido ósseo e/ou tecido fibroso foram originadas de CFU-Fs que já estavam comprometidas com uma linha particular de diferenciação. Estes achados conduzem para uma hipótese bastante aceita de que a população de CFU-F da medula esta dividida em dois compartimentos: células-tronco e células progenitoras comprometidas (KUZNETSOV et al., 1997).

Trabalho semelhante foi realizado por Gronthos et al. (2003), os quais isolaram da medula de humanos uma pequena subpopulação de células-tronco do estroma, representando, segundo os pesquisadores, a mais próxima população homogênea de CFU-F. Isto foi alcançado usando o anticorpo STRO-1 em combinação o CD106 (VCAM-1). Neste estudo, clones proliferativos, derivados de células STRO-1^{BRIGHT}/VCAM-1⁺, exibiram diferenciação osteogênica, condrogênica e adipogênica *in vitro*. No entanto, quando foi avaliada a capacidade destas células em gerar tecido ósseo humano em ratos SCID (*Severe Combined Immunodeficiency*), apenas um pouco mais da metade dos clones exibiu o potencial de formar osso *in vivo*. Assim como no trabalho de Kuznetsov et al. (1997), Gronthos et al. (2003) semelhantemente concluem que CFU-F da medula óssea de adultos representa uma população mista de multi-, bi- e unipotente progenitoras em diferentes estágios de diferenciação.

1.5. Aplicações clínicas das CTMs

No tecido ósseo, duas linhagens de células ósseas são identificadas: células formadoras do osso (osteoblastos, osteócitos e células de revestimento interno) e as células

que reabsorvem o osso (osteoclastos) que junto com outros tipos de células mediam o “rejuvenescimento” ósseo em um mecanismo chamado “remodelamento óssea”. Durante a fase de formação do osso, os osteoblastos são recrutados das CTMs presentes na medula óssea. Por outro lado, os osteoclastos são derivados das células-tronco hematopoéticas. O entendimento do mecanismo controlador da diferenciação das células osteoblásticas a partir das CTMs é conseqüentemente uma das áreas fundamentais da pesquisa na biologia do osso (KASSEM; ABDALLAH; SAEED, 2008).

O uso das CTMs nas aplicações clínicas requer o entendimento das suas características biológicas e como explorar esta informação para isolar, expandir e diferenciar estas células em uma linhagem específica necessária a terapia. Também, novas abordagens para administrar as células no lugar certo para o reparo e regeneração de tecidos precisam ser desenvolvidas. Neste contexto, são quatro os aspectos que precisam ser melhor entendidos ou resolvidos: a identificação de uma população homogênea de CTMs, a senescência e o potencial proliferativo limitado das CTMs durante o cultivo prolongado *in vitro*, controle da diferenciação e a distribuição sistêmica das CTMs (ABDALLAH; KASSEM, 2008).

Quatro áreas para o uso clínico da MSC têm sido exploradas: implantação local para determinadas doenças, transplantação sistêmica, terapia com células-tronco combinado com terapia gênica e uso em protocolos de engenharia de tecidos. O uso destas células na terapia tem mostrado resultados promissores na fase I dos testes clínicos. No entanto, são necessárias informações adicionais quanto à eficácia terapêutica das células transplantadas e quanto à segurança e tolerabilidade. Também, novas descobertas que aumentem o “*homing*” das CTMs em locais específicos e limite seu potencial de diferenciação para uma linhagem desejável, será necessário para realizar um completo potencial terapêutico das células transplantadas (KASSEM; KRISTIANSEN; ABDALLAH, 2004).

Material e Métodos

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Amostras

O material utilizado neste trabalho faz parte do projeto temático do Centro de Terapia Celular (CTC) inscrito junto à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e aprovado pelo comitê de ética do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (HCFMRP) e pela comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP). Duas amostras da medula óssea (D1 e D2) foram coletadas por um aspirado medular de doadores cadastrados no REDOME (Registro Brasileiro de Doadores Voluntários de Medula Óssea) com consentimento informado. Também foi coletada uma amostra de tecido adiposo obtida por lipoaspiração.

2.2. Isolamento de células tronco mesenquimais (CTMs)

As células mononucleares da medula óssea foram isoladas através da centrifugação em gradiente de densidade utilizando-se *Ficoll-Paque* (Amersham Biosciences). Para procedermos à separação das células mononucleares, diluímos o volume de medula óssea com PBS 1x (*Phosphate-Buffered Saline*) na proporção de 1:2, respectivamente. Em seguida, 13 ml de *Ficoll* foram adicionados cuidadosamente ao fundo do tubo de 50 ml e a amostra centrifugada a 2000 rpm por 30 minutos a 25°C. O anel de células mononucleares foi coletado com uso de pipeta *Pasteur* e transferido para um tubo novo onde as células foram lavadas duas vezes com 30 ml de PBS 1x e centrifugadas a 1500 rpm por 10 minutos a 25°C e ressuspensas em 1ml de PBS 1x. Para o isolamento das células mesenquimais do tecido adiposo, a amostra lipoaspirada foi lavada extensivamente com PBS 1x. Em seguida foi

acrescentado um volume de 3x de colagenase tipo I (1mg/ml) para a digestão da matriz extracelular a 37°C. Após 30 minutos de digestão, foi adicionado um volume igual de meio RPMI (*Sigma*) suplementado com 5% de soro bovino fetal (SBF - *GIBCO*) e centrifugado a 1500 rpm por 10 min. As células foram então ressuspensas em 1 mL de PBS 1x.

Uma pequena alíquota das células isoladas da medula óssea e do tecido adiposo foi retirada e corada com solução Turk's para a contagem do número de células em câmara de *Neubauer*. Após contagem as células foram plaqueadas em garrafa de cultura contendo meio α -MEN (*α -modified Eagle's medium*) suplementado com 15% de SBF, 2 mM de L-glutamina (*GIBCO*) e 100 U de Penicilina-estreptomicina (*GIBCO*). As células foram então cultivadas em estufa a 37°C e 5% de gás carbônico. Após uma semana de cultivo metade do meio foi trocado e ao atingirem aproximadamente 90% de confluência as células foram tripsinizadas (*Trypsin-EDTA 10x, Sigma*), contadas e novamente plaqueadas em garrafas de cultura. Ao atingirem a 3ª passagem (cada passagem é marcada quando se tripsiniza a garrafa) uma garrafa foi tripsinizada e as células encaminhadas a citometria de fluxo para a imunofenotipagem. Estas células também foram avaliadas segundo a habilidade de se diferenciarem em osteoblastos e adipócitos *in vitro* para a caracterização enquanto células mesenquimais. Uma vez caracterizadas como CTMs e ao atingirem a 4ª passagem foi iniciado o experimento com o tratamento da cultura com um agente demetilante do DNA 5-aza-2'-deoxicitidina (5-aza) assim como o estímulo para a diferenciação em osteoblastos por sete dias.

2.3. Citometria de fluxo

2.3.1. Imunofenotipagem das CTMs

A imunofenotipagem das células mesenquimais foi realizada com a utilização de anticorpos monoclonais conjugados com ficoeritrina (*phycoeritrin - PE*) ou isotiocianato de fluoresceína (*fluorescein isothiocyanate- FITC*) que reconhecem antígenos de superfície da membrana da célula. Para a identificação dessas células foi montado um painel contendo os seguintes marcadores: CD73⁺, CD90⁺, CD29⁺, CD13⁺, CD105⁺, CD34⁻, CD45⁻, CD14⁻, CD31⁻ e Glycophorin⁻ (*Pharmingen*). A intensidade de fluorescência foi captada por citometria de fluxo pelo aparelho FACSort™ (Becton Dickinson, San Jose, CA, EUA). Os dados foram analisados com o *software* CELLQuest™ (Becton Dickinson, San Jose, CA, EUA).

2.3.2. Avaliação dos níveis de apoptose

A avaliação da citotoxicidade da 5-aza nas células mesenquimais foi realizada pela detecção de células apoptóticas através da marcação com Anexina V e PI (iodeto de propídeo). As CTMs isoladas e expandidas foram tratadas por quatro dias com 5-aza e ao final do tratamento as células foram coletadas e submetidas à citometria de fluxo.

2.3.3. Ensaio de proliferação celular por citometria de fluxo durante o tratamento com 5-aza-2'-deoxicidina

Para caracterizar a atividade proliferativa das células mesenquimais durante o tratamento com 5-aza foi realizado o ensaio de proliferação com o marcador carboxifluoresceína (CFSE - *Carboxy-fluorescein diacetate succinimidyl ester – Molecular Probes*). Inicialmente foi necessário padronizar o protocolo para utilização deste marcador nas células mesenquimais no intuito de se identificar a concentração ideal do CFSE para esta

marcação. Para tanto, foram realizados vários ensaios para testar diferentes concentrações. Como o experimento com tratamento e diferenciação foi realizado na 4ª passagem, células mesenquimais na 3ª passagem foram tripsinizadas, centrifugadas e ressuspensas em 1 ml de meio α -MEN 15% SBF para contagem em câmara de *Neubauer*. Uma alíquota de células foi separada para o controle do experimento (sem marcação) e ao restante das células foi acrescentado meio α -MEN 15% SBF para obter uma concentração de 0.25×10^6 células/mL. O CFSE, diluído em PBS 0,1% albumina humana em diferentes concentrações, foi adicionado ao meio com as células para a marcação. O tempo de marcação foi de 10 minutos a 37° C, homogeneizando a cada 3 minutos. A marcação foi interrompida adicionando cinco vezes o volume de meio RPMI 10% de SBF e incubando-se por 5 minutos em gelo e no escuro. As células foram então lavadas por três vezes com 20 mL de RPMI 10% SBF e ressuspensas em 1 ml de meio α -MEN 15% SBF para a contagem. Uma alíquota de células foi separada para verificar a intensidade de marcação das células com CFSE no dia da marcação (dia zero) em citômetro de fluxo.

Após a determinação da concentração ideal para a marcação das células mesenquimais o experimento foi realizado seguindo os protocolos do tratamento na expansão e na diferenciação (descritos no item 2.5 e 2.6). Portanto, CTMs marcadas com CFSE foram plaqueadas em 19 garrafas de cultura de 25 cm² e cobertas com papel alumínio para evitar perda de fluorescência durante o experimento. As coletas das amostras (tratadas e controles) foram feitas conforme demonstrado na figura 2.

2.4. Diferenciação das CTMs em osteoblastos e adipócitos

Para a caracterização das CTMs, a diferenciação osteoblástica e adipogênica foi induzida em placas de 35 mm e posteriormente coradas e fotografadas. A diferenciação em

osteoblastos é alcançada aos 21 dias de cultivo das células em meio contendo α -MEN 15% SBF suplementado com 200 μ M/ml de ácido ascórbico, 10 mM/ml de β -glicerolfosfato e 0,1 μ M/ml de dexametasona (Decadron, Prodome Química e Farmacêutica Ltda). Para o primeiro

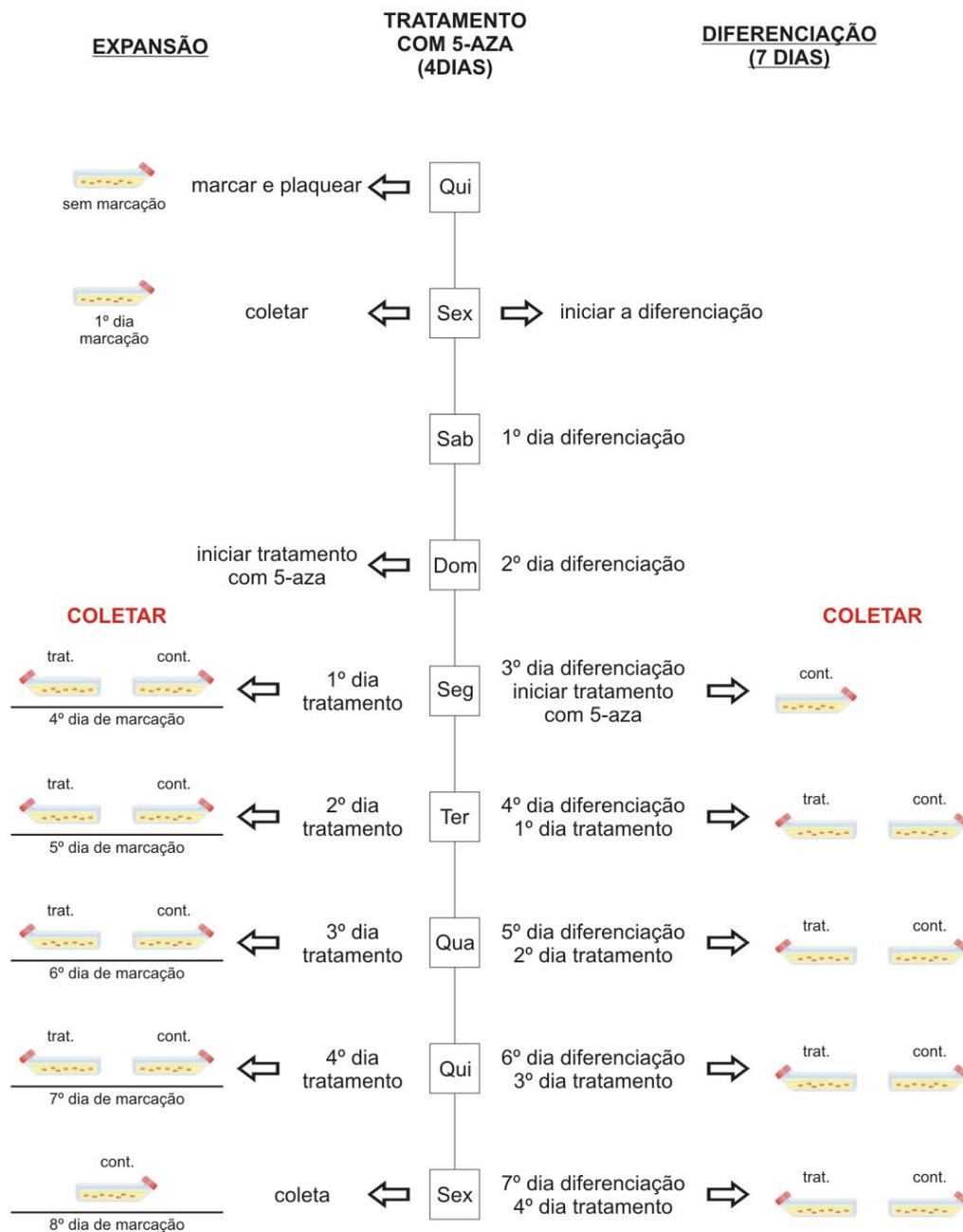


Figura 2. Sistema de coletas para leitura da marcação do CFSE por citometria de fluxo. Trat., células tratadas; cont., células controle (sem tratamento).

dia de diferenciação todo o meio de cultivo inicial (α -MEN 15% SBF) foi substituído pelo meio de diferenciação e em dias alternados metade do meio foi trocado. Para a diferenciação adipogênica, alcançada aos 15 dias de diferenciação, o meio utilizado foi α -MEN 15% SBF suplementado com 10 μ g/ml de insulina (*Sigma*), 100 μ M/ml de indometacina (*Sigma*) e 1 μ M/ml de dexametasona. O procedimento de troca de meio foi o mesmo realizado para a diferenciação em osteoblastos. As amostras foram cultivadas em estufa úmida a 37°C com 5% de CO₂.

2.5. Tratamento das células mesenquimais com 5-aza-2'-deoxicitidina durante a expansão celular

Ao atingirem a 4^a passagem e cerca de 80% de confluência, as células de uma garrafa de cultura de 75 cm² foram tripsinizadas para a extração do DNA e RNA servindo de controle para o experimento (células sem tratamento – CTM-C). O tratamento durante a expansão foi realizado trocando-se todo o meio de cultivo (α -MEN 15% SBF) durante quatro dias e adicionando-se a este meio 5 μ M de 5-aza. Ao término do tratamento as células foram tripsinizadas e parte do material coletado foi encaminhada a citometria de fluxo para a imunofenotipagem com os marcadores de mesenquimal e para a avaliação dos níveis de apoptose através dos marcadores anexina V-FITC e PI. Outra parte foi utilizada para a extração do RNA e do DNA. Duas placas de cultivo 35 mm também foram expandidas, um controle e a outra tratada durante a expansão, no entanto ao final dos quatro dias de tratamento, todo o meio foi retirado e substituído pelo meio de diferenciação em osteoblastos. Após os 21 dias de diferenciação as placas foram coradas e fotografadas.

2.6. Tratamento das células mesenquimais com 5-aza-2'-deoxicitidina durante o estímulo para a diferenciação osteoblástica

Quando as células atingiram aproximadamente 80% de confluência foi iniciado o estímulo para a diferenciação em osteoblastos por sete dias. Para o primeiro dia de diferenciação todo o meio de cultivo foi substituído pelo meio suplementado para a diferenciação. No terceiro dia de diferenciação trocou-se todo o meio de cultivo, substituindo por meio α -MEN 15% SBF suplementado para a diferenciação acrescido com 5 μ M de 5-aza para o início do tratamento. Este procedimento foi repetido durante quatro dias consecutivos perfazendo no total sete dias de diferenciação osteoblástica, sendo os quatro últimos dias de tratamento com a droga. Este experimento foi acompanhado com um controle do tratamento sendo o mesmo somente estimulado para a diferenciação e metade do seu meio trocado em dias alternados. Ao término dos sete dias de diferenciação as células foram tripsinizadas e parte do material coletado foi encaminhada a citometria de fluxo para a imunofenotipagem com marcadores de mesenquimal. Outra parte foi utilizada para a extração do RNA e do DNA. Células mesenquimais de duas placas de 35 mm também foram induzidas a diferenciação, um controle e a outra com tratamento durante a diferenciação, no entanto ao final dos quatro dias de tratamento, todo o meio foi retirado e substituído pelo meio de diferenciação. Após os 21 dias de diferenciação as placas foram coradas e fotografadas.

2.7. Colorações histoquímicas

2.7.1. Coloração para osteoblastos – Método de Von Kossa

As células cultivadas nas placas de 35 mm foram fixadas em paraformaldeído a 4% por 15 minutos à temperatura ambiente, lavadas em água destilada e coradas com solução de

nitrate de prata a 5%, no escuro por 30 minutos. Em seguida, foram lavadas em água destilada, expostas a lâmpada de 100W por 60 minutos e então, lavadas rapidamente com tiosulfato de sódio a 5%, em seguida novamente lavadas em água destilada, contra-coradas com hematoxilina de Harris e por fim lavadas em água destilada.

2.7.2. Coloração para adipócitos – Método de Sudan II

As CTMs obtidas tanto do tecido adiposo lipoaspirado quanto da medula óssea também foram cultivadas em placas de 35 mm para a diferenciação adipogênica. Ao final dos 15 dias, as células diferenciadas em adipócitos e os seus controles foram fixados em paraformaldeído a 4%, por 15 minutos, à temperatura ambiente, e após, lavadas em água destilada e incubadas em álcool 70% por 2 a 3 minutos. A seguir, foram coradas com a solução de sudan II-escarlata por 2 a 5 minutos, lavadas em álcool 70%, em seguida em água corrente e contra-coradas com hematoxilina de Harris por 2 minutos.

2.8. Extração e modificação do DNA por bissulfite de sódio

O DNA genômico foi extraído das células mesenquimais utilizando o *Wizard[®] Genomic DNA Purification Kit (Promega)* e quantificado em espectrofotômetro em comprimento de onda de 260nm. Para a modificação do DNA por bissulfite foi utilizado o *EZ DNA MethylationTM Kit (Zymo Research)*. A extração e a modificação do DNA foram realizadas em conformidade com as orientações dos fabricantes dos respectivos kits.

Na reação com bissulfite, todas as citosinas não-metiladas são convertidas em uracil, mas aquelas que estão metiladas são resistentes a esta modificação e permanecem como citosinas.

2.9. Extração do RNA e síntese de cDNA

O RNA total foi isolado com TRIZOL[®] *Reagent (Invitrogen)* conforme a especificação do fabricante. A concentração e a qualidade do RNA total foram avaliadas por espectrometria e por eletroforese em gel de agarose, respectivamente. A síntese de cDNA foi realizada com o *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystem)*, também em conformidade com a orientação do fabricante.

2.10. Microarrays

Para a realização dos experimentos de análise da expressão gênica foi utilizado a plataforma de *microarray CodeLink Expression Assay Reagent Kit (GE Healthcare)* e *microarrays* de DNA contendo 10.000 genes. Este experimento foi realizado no laboratório de Hematologia do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto. O *microarray* foi realizado com as amostras obtidas do primeiro doador (D1).

2.10.1. Preparação do cRNA

Inicialmente 2 µg de RNA total foi incubado com *primer* T7 oligo (dT) por 10 min a 70⁰C. Um conjunto de mRNAs de bactérias (*araB*, *entF*, *gnd*, *fixB*, *hisB*, *leuB*), serviu de controle para a síntese do DNA complementar (cDNA) e para as reações de transcrição *in vitro* (TIV). Estes controles foram adicionados a amostra de RNA total juntamente com o *primer* T7 oligo(dT). Cada passo dos procedimentos seguintes, incluindo a preparação do alvo e hibridação, pôde ser monitorado usando estes controles de RNA. Para a síntese da primeira fita do cDNA foi adicionado ao RNA total - mRNA controles - *primer* T7 oligo(dT),

o tampão 10x da primeira fita, dNTPs, inibidor de Rnase e a enzima *arrayScript* sendo a síntese realizada a 42° C durante 2h. Para a síntese da segunda fita de cDNA foram adicionados o tampão 10x da segunda fita, dNTPs, DNA polimerase e RNase H. O tempo de incubação para esta síntese foi de 2h a 16°C. Os cDNAs dupla fita foram purificados e usados para a síntese de RNA complementar (cRNA) pela reação de TIV a qual foi realizada na presença de NTPs biotinizados (para a marcação do cRNA), tampão de reação 10x e a enzima RNA polimerase T7. Esta reação ocorreu a 37° C durante 14h. A TIV amplifica aproximadamente 1000-5000 vezes a quantidade de RNA total inicial. Os cRNAs biotinizados foram purificados e avaliados quanto a concentração e qualidade por espectometria e eletroforese em gel de agarose 1,5%, respectivamente. O *CodeLink bioarray* somente foi realizado se a razão de A260: A260 estivesse entre 1.8-2.1.

2.10.2. Hibridação e detecção de *microarrays*

Dez microgramas de cRNA foram fragmentados por aquecimento a 94°C durante 20 min numa solução tampão contendo magnésio. A reação de hibridização foi então preparada adicionando-se ao cRNA fragmentado o tampão de hibridização A e B e incubando-se a 90°C durante 5 min. Após a incubação, a mistura da reação de hibridização foi injetado nas microcâmeras das lâminas de *microarrays* para hibridização durante 18h 37° C, em um agitador a 300 rpm. Após a hibridização, os *microarrays* foram incubados durante 30 minutos com um conjugado cianina-5-streptavidina (Cy-5-streptavidina) e em seguida as lâminas foram lavadas e secadas. A intensidade de fluorescência da cianina-5 nas lâminas de *microarrays* foi detectada em um *scanner GenePix 4000B* utilizando o *software GenePix Pro 6.0* (Axon Instruments, Foster City, CA, USA). As imagens obtidas foram analisadas e quantificadas pelo programa *CodeLink Expression Analysis Software* (Amersham

Biosciences). Os valores de fluorescência obtidos nesta análise foram normalizados pela mediana dos valores de todos os genes da plataforma e os resultados exportados para planilhas do *software Microsoft Excel*.

2.11. Seleção dos genes diferencialmente expressos

Quatro tipos de amostras foram submetidos ao *array*: célula mesenquimal tratada (CTM-T), célula mesenquimal controle (CTM-C), célula mesenquimal diferenciada em osteoblastos por sete dias e tratada (DIF7-T) e a célula mesenquimal diferenciada por sete dias controle (DIF7-C). A seleção dos genes a partir do resultado do *array* foi realizada agrupando-se os dados da seguinte forma: (1) expressão diferencial após o tratamento na expansão celular, (2) expressão diferencial após o tratamento na diferenciação e (3) expressão diferencial após a diferenciação (sem tratamento). Inicialmente foi calculada a razão entre a expressão nas três condições: CTM-T / CTM-C, DIF7-T / DIF7-C e CTM-C / DIF7-C. A seleção dos genes foi baseado no valor desta razão assim como na presença de ilha CpG na região promotora destes genes, avaliada pelo programa *MethPrimer*. Uma seqüência de 1000pb da região promotora e a seqüência do primeiro éxon foram consideradas para esta avaliação. O critério para a presença de ilha CpG não foi considerado para a condição CTM-C / DIF7-C.

2.12. Validação dos resultados do *array* por qRT-PCR (RT-PCR quantitativo) pelo sistema *SYBER-Green*

2.12.1. Validação de eficiência dos *primers*

A análise dos resultados do qRT-PCR foi feita pelo método de Pfaffl (PFAFFL, 2001). Este método fornece um meio para a quantificação do transcrito de um gene alvo, no caso os genes selecionados, em comparação a um gene de referência. Em nosso estudo foram utilizados três genes de referência, ou genes normalizadores: *GAPDH* (*glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*), *HPRT* (*hypoxanthine phosphoribosyltransferase*) e *TUBA1C* (*tubulin, alpha 1c*). Para a aplicação deste método se faz necessária a validação de eficiência do PCR (eficiência dos *primers*) a qual é obtida através da construção da curva padrão de amplificação produzida por diluições seriadas do cDNA (20ng, 10ng, 5ng, 2,5ng e 1,25ng) utilizando os *primers* dos genes selecionados e dos normalizadores. As reações foram realizadas em triplicatas e os valores obtidos da curva padrão de amplificação foram utilizados para calcular a quantificação relativa da expressão do gene em comparação com o gene normalizador.

As reações de qRT-PCR foram realizadas usando *Power SYBER[®] Green PCR Master Mix* em um aparelho *ABI Prism 7500 Detection System (Applied Biosystem)*. As condições das reações foram: 10 µL do *PCR Master Mix*, 0,4 µM de *primers*, 1 µL de cDNA (concentrações descritas acima) e H₂O para um volume final de 20 µL. As condições de termociclagem compreenderam uma incubação a 50°C por 2 minutos, seguida pela ativação da DNA polimerase a 95°C por 1º minutos, e 40 ciclos a 95°C por 15 segundos e 60° C por 1 minuto (desnaturação e extensão).

2.12.2. qRT-PCR das amostras e seus respectivos genes

As condições das reações do qRT-PCR das amostras foram as mesmas usadas para a validação de eficiência dos *primers*. A concentração de cDNA utilizada foi correspondente a

20 ng e como controle de qualidade das reações, o desvio padrão máximo permitido entre as triplicatas foi de 0,29, caso contrário, as reações foram repetidas.

2.13. *Nested*-PCR das ilhas CpGs dos genes selecionados

O DNA tratado com bissulfito foi amplificado por *nested*-PCR. As amplificações foram realizadas com um volume de 50 µl contendo tampão *tween* 10x [(NH₄)₂SO₄ 2M, Tris HCl 2M, MgCl₂ 1M, Tween 20 1%]; 1,25mM dNTP; 2,5 µM para cada *primer* e 2U de Taq DNA polimerase (*Biotoools*). As condições das duas reações foram: 94° C por 5 min, 35 ciclos de 94° C por 1 min, temperatura de anelamento por 1 min e 72° C por 2 min e por fim, 72° C por 10 min. O produto do PCR foi purificado usando o kit *Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-up System* (*Promega*), conforme orientação do fabricante.

2.14. Clonagem e seqüenciamento do DNA modificado pelo bissulfito

Após a purificação, o produto do PCR foi utilizado para o seqüenciamento direto (apenas um gene foi seqüenciado nesta condição) ou então ligado ao vetor TOPO 2.1 (*Invitrogen*) em uma reação de 10 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, 2µL da ligação foram inseridos em bactérias competentes (DH10β) através de eletroporação. Após a eletroporação, foram adicionados 500µL de meio líquido S.O.C. (*Invitrogen*) à mistura a qual foi então mantida no *Shaker* a 37°C, 200rpm. Após 1 hora, foi acrescentado mais 500µL de S.O.C. com posterior distribuição das bactérias em placas com meio ágar *LB Low Salt* contendo o antibiótico ampicilina (100mg/mL) e X-Gal (30mg/mL). As placas foram mantidas em estufa a 37°C, *overnight*. Em seguida, as colônias brancas formadas foram semeadas em placas de cultura de 96 poços contendo meio líquido *LB Low Salt*. Após

incubação em estufa a 37°C, *overnight*, 1µL desta cultura foi utilizada para reação de PCR com *primers* universais M13, nos dois sentidos. Os insertos amplificados foram visualizados em gel de agarose 1,5% e utilizados para a reação de seqüenciamento em seqüenciador automático *ABI PRISM® 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystem)*. As seqüências geradas foram analisadas usando o programa *FinchTV*.

Resultados

3. Resultados

3.1. Citometria de fluxo

3.1.1. Avaliação dos níveis de apoptose

Após quatro dias de tratamento com 5-aza-deoxicitidina durante a expansão, a média de morte celular por apoptose das CTMs foi de 8,59% para a marcação com anexina e de 10,5% para marcação com iodeto de propídeo (PI).

3.1.2. Ensaio de proliferação celular

O ensaio de proliferação foi realizado com a finalidade de se verificar o efeito do tratamento na proliferação celular durante a expansão e diferenciação celular. Inicialmente foram avaliadas várias concentrações do marcador CFSE, entre elas de 5 μ M, 10 μ M, 25 μ M e 35 μ M, para se buscar a concentração final ideal para a marcação das células. A figura 3 mostra os resultados das marcações para algumas das concentrações testadas. A concentração final do CFSE necessária para a marcação das células mesenquimais foi de 35 μ M e os resultados do ensaio de proliferação obtidos através da citometria de fluxo (figura 4) demonstram que o tratamento com 5-aza durante a expansão não afetou a taxa de proliferação celular. Durante a diferenciação por sete dias, as células diferenciadas e tratadas tiveram menor taxa de proliferação quando comparadas com as não tratadas. Também podemos observar uma diminuição na proliferação quando comparamos as células em expansão com as células submetidas à indução para a diferenciação por sete dias (figura 5).

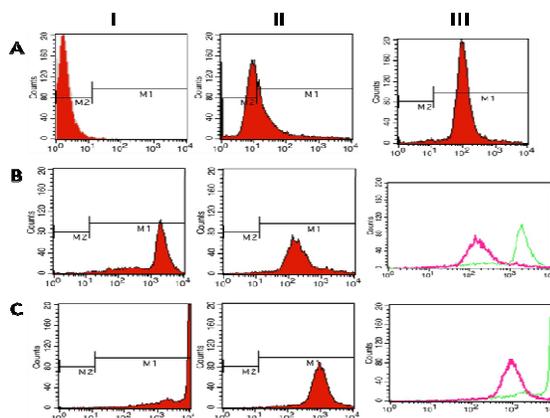


Figura 3. Determinação da concentração de CFSE para a marcação das células mesenquimais. **AI.** Células sem marcação. **AII e AIII.** Células marcadas com $5\mu\text{M}$ e $10\mu\text{M}$ de CFSE, respectivamente. **B.** Marcação com $25\mu\text{M}$ de CFSE; **BI**, dia da marcação e **BII**, 12 horas após a marcação. **BIII.** Sobreposição dos gráficos BI e BII mostrando a perda da fluorescência após 12 horas da marcação. **C.** Marcação com $35\mu\text{M}$ de CFSE. **CI**, dia da marcação e **CII**, 12 horas após a marcação. **CIII.** Sobreposição dos gráficos CI e CII mostrando a perda da fluorescência após 12 horas da marcação.

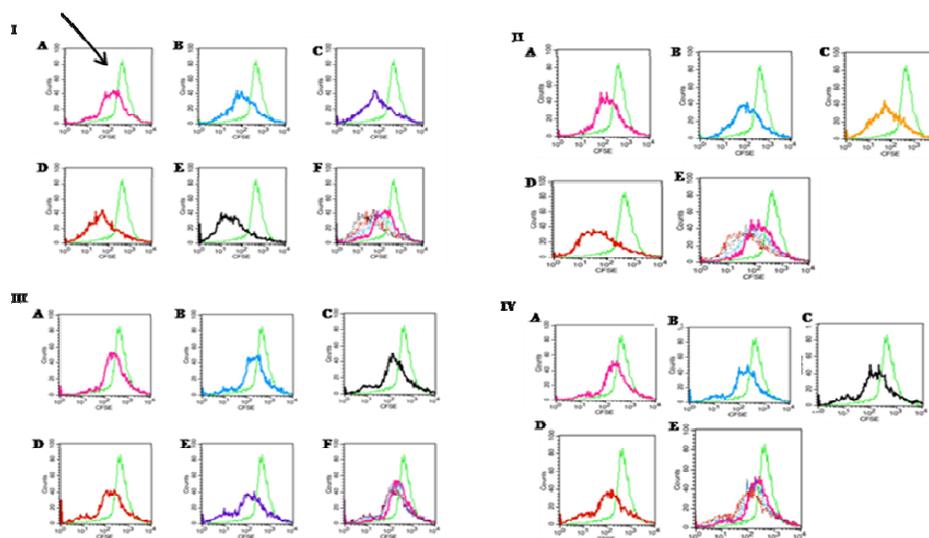


Figura 4. Ensaio de Proliferação. O pico indicado pela seta e comum a todos os gráficos representa o 1º dia de marcação (12 horas). **I. Expansão SEM tratamento.** **IA- IE.** 4º, 5º, 6º, 7º e 8º dia de marcação, respectivamente. **II. Expansão COM tratamento.** **IIA.** 4º dia de marcação e expansão e 1º dia de tratamento. **IIB.** 5º dia de marcação e expansão e 2º dia de tratamento. **IIC.** 6º dia de marcação e expansão e 3º dia de tratamento. **IID.** 7º dia de marcação e expansão e 4º dia de tratamento. **III. Diferenciação SEM tratamento** **IIIA.** 4º dia de marcação e 3º dia de diferenciação. **IIIB.** 5º dia de marcação e 4º dia de diferenciação. **IIIC.** 6º dia de marcação e 5º dia de diferenciação. **IIID.** 7º dia de marcação e 6º dia de diferenciação. **IIIE.** 8º dia de marcação e 7º dia de diferenciação. **IV. Diferenciação COM tratamento.** **IVA.** 5º dia de marcação, 4º dia de diferenciação e 1º dia de tratamento. **IVB.** 6º dia de marcação, 5º dia de diferenciação e 2º dia de tratamento. **IVC.** 7º dia de marcação, 6º dia de diferenciação e 3º dia de tratamento. **IVD.** 8º dia de marcação, 7º dia de diferenciação e 4º dia de tratamento. **IE, IIF, IIIF e IVF.** Deslocamento dos

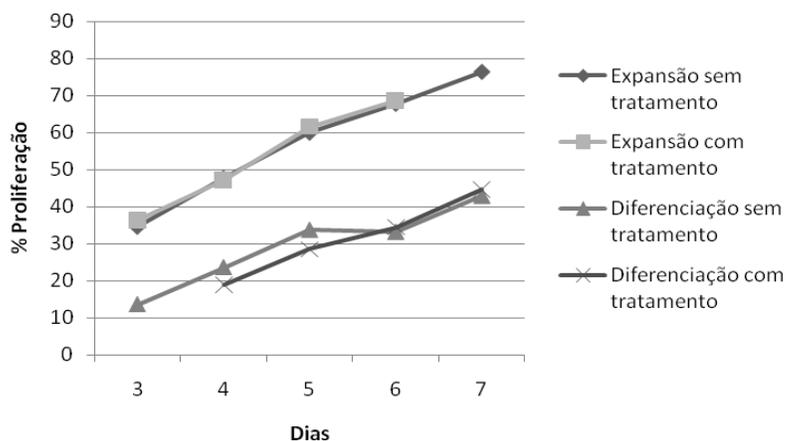


Figura 5. Proliferação celular das células tronco mesenquimais durante o tratamento com 5-aza na expansão celular e na diferenciação osteogênica (sete dias).

3.1.3. Imunofenotipagem

3.1.3.1 Imunofenotipagem das CTMs isoladas da medula óssea (D1) e do tecido adiposo

Os resultados da imunofenotipagem das CTMs isoladas da medula (D1) e do tecido adiposo (CTM-TA) estão representados nos histogramas das figuras 6 e 7, respectivamente.

Considerando-se os critérios estabelecidos pela ISCT, a qual enfatiza a presença dos antígenos de superfície celular CD73, CD90, CD105 e a ausência dos antígenos CD14, CD34 e CD45 como características fenotípicas das CTMs, foi observado que mais de 95% das células isoladas destas amostras expressaram os antígenos CD73 e CD90 e apresentaram expressão baixa ou ausente para os antígenos CD14, CD34 e CD45. Nestas amostras não foi realizada a marcação com o anticorpo CD105.

3.1.3.2 Imunofenotipagem das 1CTM-T, 1DIF7-C e 1DIF7-Ts histogramas das amostras

1CTM-T, 1DIF7-C e 1DIF7-T podem ser visualizados na figura 8. Os resultados encontrados

demonstraram que sete marcadores permaneceram com a

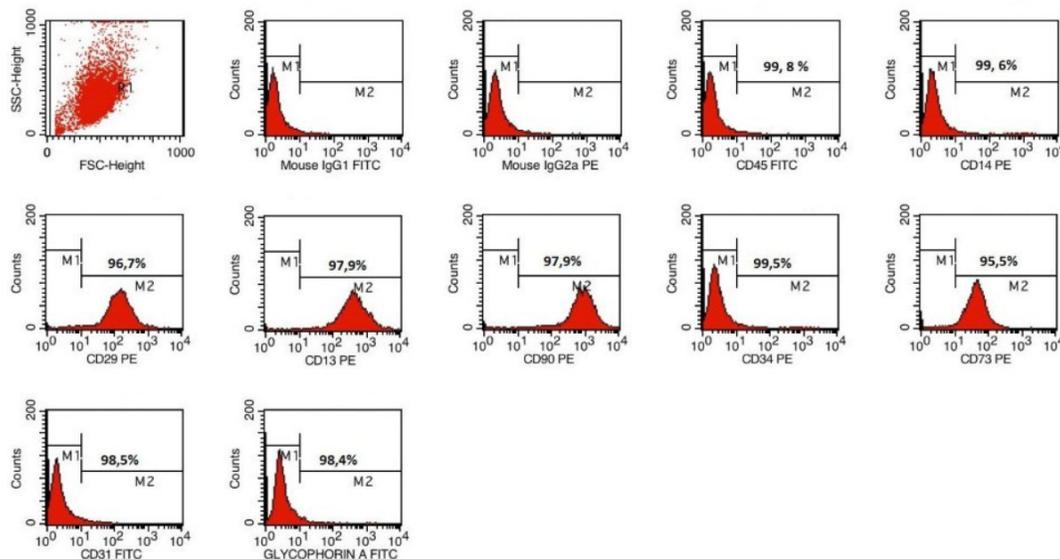


Figura 6. Histogramas da imunofenotipagem das células mesenquimais da amostra D1. As células são negativas para os marcadores CD45, CD14, CD34, CD31 e glycophorin e positivas para os marcadores CD29, CD13, CD90 e CD73.

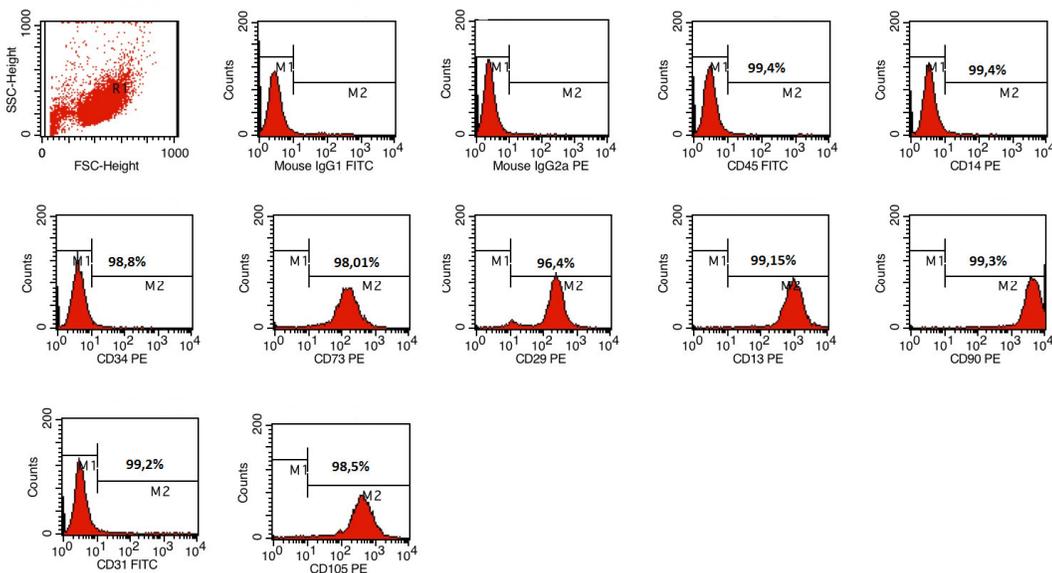
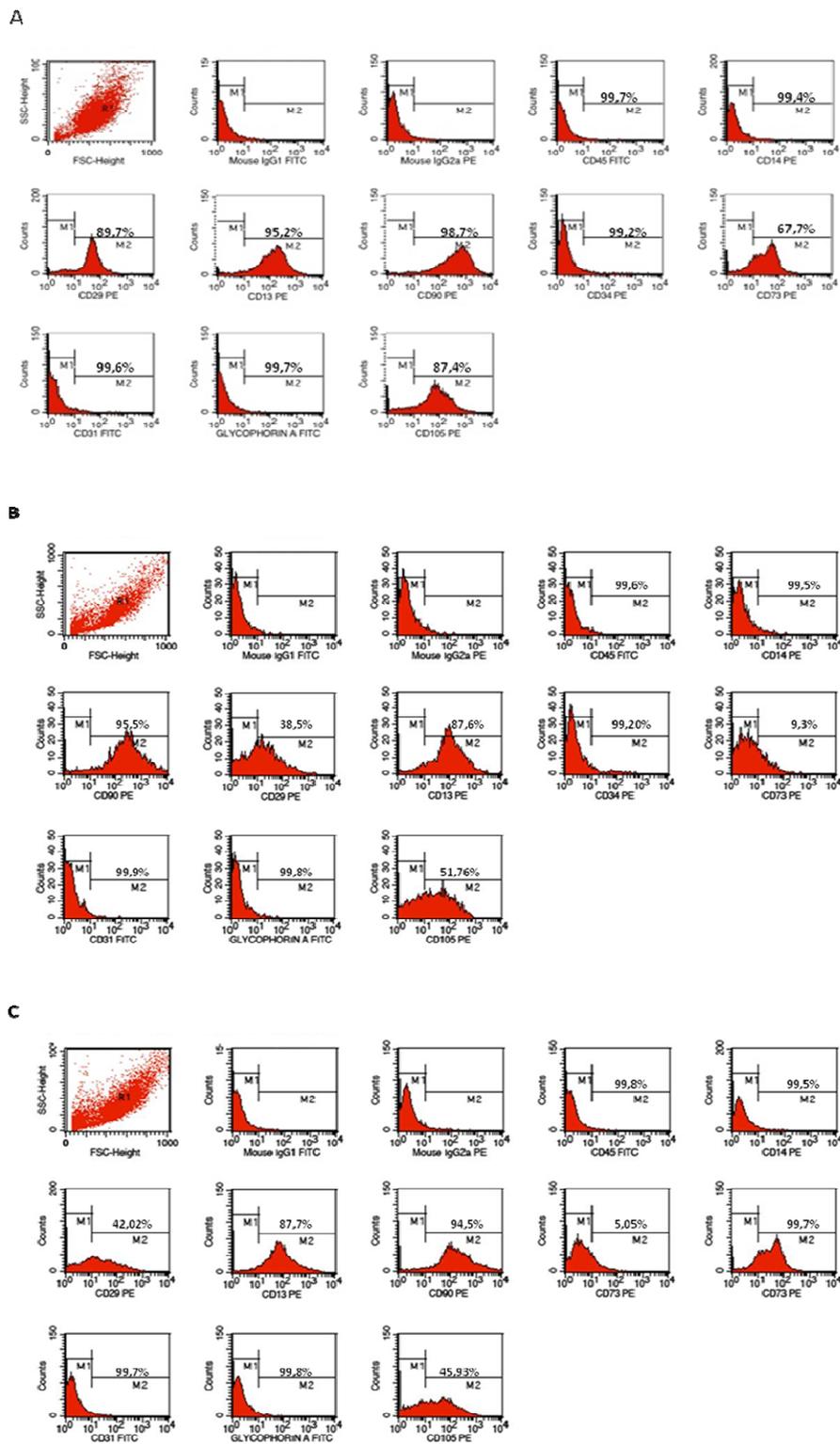


Figura 7. Histogramas da imunofenotipagem das células mesenquimais do tecido adiposo. As células são negativas para os marcadores CD45, CD14, CD34 e CD31 e positivas para os marcadores CD73, CD29, CD13, CD90, CD31 e CD105.



sua expressão semelhante a CTM-C (CD90, CD13, CD34, CD45, CD14, Glycophorin e CD31) enquanto a expressão dos antígenos CD73, CD29 e CD105 diminuiu principalmente durante a diferenciação (figura 9).

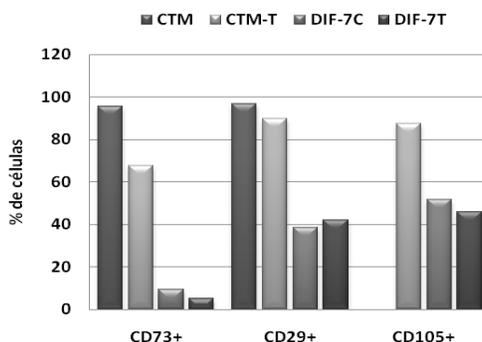


Figura 9. Imunofenotipagem dos antígenos CD73, CD29 e CD105 das células-tronco mesenquimais tratadas e não-tratadas com 5-aza durante a expansão e a diferenciação.

3.2. Análise histoquímica das CTMs isoladas diferenciadas em osteoblastos e adipócitos

As CTMs isoladas do primeiro doador (D1) foram somente induzidas à diferenciação em osteócitos, enquanto as células isoladas do segundo doador (D2) assim como do tecido adiposo foram também induzidas à diferenciação em osteócitos e adipócitos. Estas diferenciações foram evidenciadas após a coloração das placas de cultivo pelos métodos de Von Kossa e Sudan II, para osteoblastos e adipócitos, respectivamente. Após 15 dias de diferenciação adipogênica foi possível visualizar o acúmulo de gordura no citoplasma dos adipócitos. O acúmulo de cálcio na matriz extracelular dos osteoblastos foi observado após 21 dias de diferenciação (figura 10).

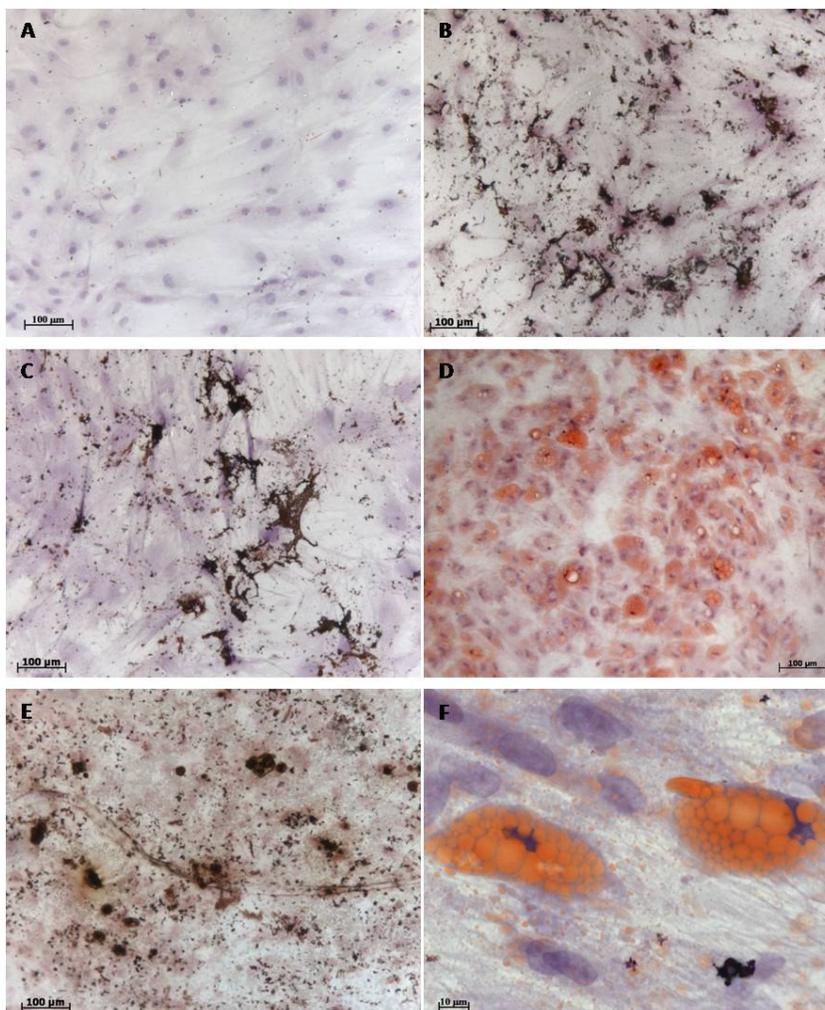


Figura 10. CTMs diferenciadas em osteoblastos e adipócitos. **A.** Células indiferenciadas. **B.** Diferenciação em osteócitos das células isoladas do doador D1. **C e D.** Diferenciação em osteócitos e adipócitos (respectivamente) das células isoladas do doador D2. **E e F.** Diferenciação em osteócitos e adipócitos (respectivamente) das

3.2.1. Diferenciação em osteócitos das CTMs tratadas com 5-aza

As CTMs tratadas durante a expansão e entre o 3º e 7º dia de diferenciação em osteoblastos foram induzidas até o final da diferenciação (21 dias). As fotos da figura 11 demonstram que o acúmulo de depósitos de cálcio, característicos desta diferenciação foi observado indicando que o tratamento durante a expansão, e no início da diferenciação, não afetou a diferenciação osteogênica ao final dos 21 dias.

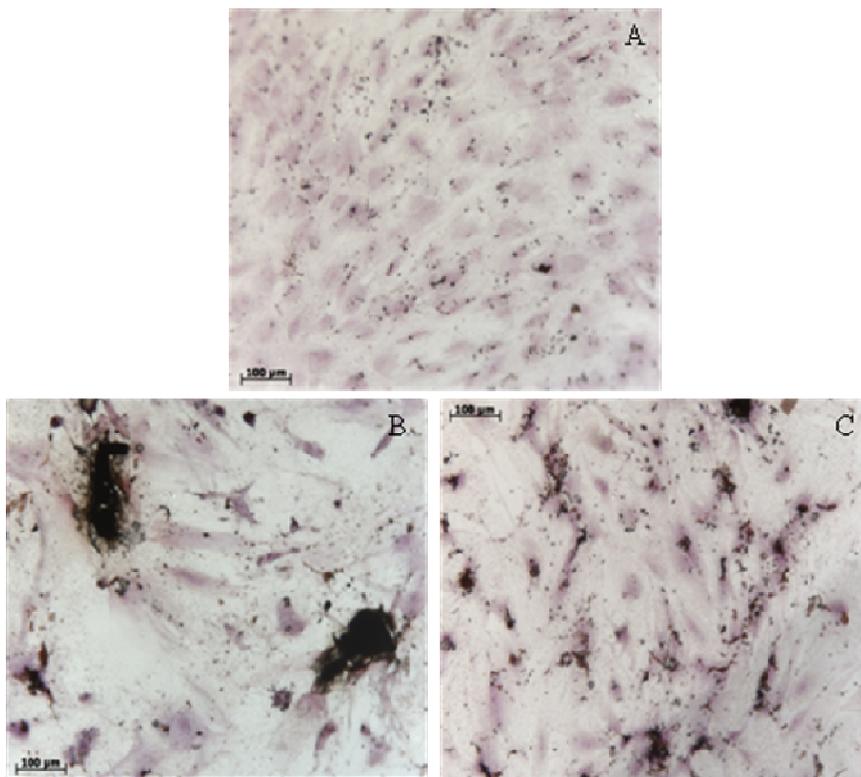


Figura 11. Diferenciação osteoblástica aos 21 dias das CTMs da medula. **A.** Células diferenciadas sem tratamento. **B.** Células tratadas durante a expansão e posteriormente diferenciadas **C.** Células tratadas entre o 3º e 7º dias de diferenciação.

3.3. Seleção dos genes diferencialmente expressos

Considerando a razão e a diferença de expressão entre as amostras testadas ≥ 2 assim como a presença de ilhas CpG (nas condições de tratamento) 271 genes tiveram a sua expressão aumentada durante o tratamento na expansão, 27 genes durante o tratamento na diferenciação e 216 genes aumentaram a sua expressão após sete dias de estímulo para a diferenciação sem tratamento. Na tabela 1 estão relacionados alguns dos genes mais expressos nas condições testadas.

Tabela 1. Relação dos genes diferencialmente expressos nas condições testadas: CTM-C X CTM-T; DIF7-C X DIF7-T e DIF7-C X CTM-C.

(continua)					
Anotação no NCBI	Genes diferencialmente expressos após o tratamento na expansão	1CTM-C	1CTM-T	T/C	T - C
NM_002089.1	<i>chemokine (C-X-C motif) ligand 2 (CXCL2)</i>	0,50	40,99	81,21	40,48
NM_005735.2	<i>ARP1 actin-related protein 1 homolog B, centractin beta (yeast) (ACTR1B)</i>	0,15	4,17	28,44	4,02
NM_002729.2	<i>hematopoietically expressed homeobox (HHEX)</i>	0,14	2,37	16,71	2,23
NM_147202.1	<i>chromosome 9 open reading frame 25 (C9orf25)</i>	0,38	5,22	13,73	4,84
NM_005101.1	<i>interferon, alpha-inducible protein (clone IFI-15K) (G1P2)</i>	3,65	32,01	8,77	28,36
NM_002135.3	<i>nuclear receptor subfamily 4, group A, member 1 (NR4A1)</i>	0,62	3,96	6,39	3,34
NM_001122.2	<i>adipose differentiation-related protein (ADFP)</i>	3,88	23,99	6,18	20,11
NM_000693.1	<i>aldehyde dehydrogenase 1 family, member A3 (ALDH1A3)</i>	1,09	6,53	5,98	5,44
NM_024693.2	<i>enoyl Coenzyme A hydratase domain containing 3 (ECHDC3)</i>	0,66	3,85	5,88	3,20
NM_017572.2	<i>MAP kinase interacting serine/threonine kinase 2 (MKNK2)</i>	1,16	6,71	5,76	5,55
NM_004753.4	<i>dehydrogenase/reductase (SDR family) member 3 (DHRS3)</i>	27,88	154,34	5,54	126,46
NM_030781.2	<i>collectin sub-family member 12 (COLEC12), transcript variant II</i>	8,06	43,07	5,34	35,01
NM_002506.2	<i>nerve growth factor, beta polypeptide (NGFB)</i>	2,07	10,98	5,29	8,91
NM_001710.4	<i>B-factor, properdin (BF)</i>	6,44	31,23	4,85	24,80
NM_000623.2	<i>bradykinin receptor B2 (BDKRB2)</i>	0,77	3,72	4,82	2,95
NM_004098.2	<i>empty spiracles homolog 2 (Drosophila) (EMX2)</i>	1,09	5,13	4,69	4,03
NM_001013002.1	<i>hect domain and RLD 6 (HERC6), transcript variant 2</i>	3,09	14,27	4,62	11,18
NM_004848.1	<i>chromosome 1 open reading frame 38 (C1orf38)</i>	4,00	17,95	4,49	13,95
NM_003706.1	<i>phospholipase A2, group IVC</i>	2,15	9,42	4,38	7,27
NM_001998.2	<i>fibulin 2 (FBLN2), transcript variant 2</i>	1,74	7,59	4,37	5,85
NM_002292.2	<i>laminin, beta 2 (laminin 5) (LAMB2)</i>	20,01	57,13	2,85	37,11
Anotação no NCBI	Genes diferencialmente expressos após o tratamento na diferenciação	1DIF7-C	1DIF7-T	T/C	T-C
NM_014726.1	<i>TBK1 binding protein 1 (TBKBP1)</i>	1,15	8,70	7,54	7,54
NM_014786.2	<i>Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 17 (ARHGEF17)</i>	14,98	50,82	3,39	35,85
NM_182487.1	<i>olfactomedin-like 2A (OLFML2A)</i>	4,58	12,01	2,62	7,44
NM_002338.2	<i>limbic system-associated membrane protein (LSAMP)</i>	1,31	3,44	2,62	2,12
NM_198148.1	<i>carboxypeptidase X (M14 family), member 2 (CPXM2)</i>	4,51	11,72	2,60	7,22
NM_000692.3	<i>aldehyde dehydrogenase 1 family, member B1 (ALDH1B1)</i>	4,61	11,59	2,52	6,99
NM_002899.2	<i>retinol binding protein 1, cellular (RBP1)</i>	4,19	10,42	2,48	6,23
NM_004737.3	<i>like-glycosyltransferase (LARGE), transcript variant 1</i>	2,06	4,88	2,37	2,82
NM_003632.1	<i>contactin associated protein 1 (CNTNAP1)</i>	4,83	10,91	2,26	6,08
NM_017823.3	<i>dual specificity phosphatase 23 (DUSP23)</i>	9,87	22,26	2,26	12,40
NM_000984.4	<i>ribosomal protein L23a (RPL23A)</i>	20,39	44,76	2,20	24,37
NM_006396.1	<i>Sjogren's syndrome/scleroderma autoantigen 1 (SSSCA1)</i>	2,81	6,13	2,18	3,32
NM_014760.2	<i>TatD DNase domain containing 2 (TATDN2)</i>	2,70	5,82	2,15	3,12
NM_000478.2	<i>alkaline phosphatase, liver/bone/kidney (ALPL)</i>	54,30	116,69	2,15	62,40
Anotação no NCBI	Genes diferencialmente expressos após a diferenciação	1CTM-C	1DIF7-C	CTM/DIF7	CTM-DIF7
NM_002423.2	<i>matrix metalloproteinase 7 (matrilysin, uterine) (MMP7)</i>	0,20	106,10	542,73	105,91
NM_030754.2	<i>serum amyloid A2 (SAA2)</i>	1,34	95,79	71,47	94,45
NM_020995.3	<i>haptoglobin-related protein (HPR)</i>	0,11	7,61	66,31	7,50
NM_000064.1	<i>complement component 3 (C3)</i>	0,97	53,84	55,66	52,87
NM_005408.2	<i>chemokine (C-C motif) ligand 13 (CCL13)</i>	0,13	5,97	47,24	5,84
NM_002089.1	<i>chemokine (C-X-C motif) ligand 2 (CXCL2)</i>	0,50	22,18	43,95	21,68
NM_005525.2	<i>hydroxysteroid (11-beta) dehydrogenase 1 (HSD11B1)</i>	0,14	5,72	41,88	5,58

Tabela 1. Relação dos genes diferencialmente expressos nas condições testadas: CTM-C X CTM-T; DIF7-C X DIF7-T e DIF7-C X CTM-C. (conclusão)

NM_000668.3	<i>alcohol dehydrogenase IB (class I), beta polypeptide (ADH1B)</i>	0,13	4,77	35,90	4,63
NM_004820.2	<i>cytochrome P450, family 7, subfamily B, polypeptide 1 (CYP7B1)</i>	0,06	2,13	34,60	2,07
NM_000584.2	<i>interleukin 8 (IL8)</i>	1,80	57,62	31,94	55,82
NM_013427.1	<i>Rho GTPase activating protein 6 (ARHGAP6), transcript variant 1</i>	0,16	4,42	28,05	4,27
NM_004726.1	<i>RALBP1 associated Eps domain containing 2 (REPS2)</i>	0,15	3,79	25,42	3,64
NM_001159.3	<i>aldehyde oxidase 1 (AOX1), mRNA</i>	1,18	23,72	20,17	22,55
NM_001025199.1	<i>chitinase 3-like 2 (CHI3L2), transcript variant 3</i>	1,13	21,26	18,83	20,13

3.3.1. Seleção dos genes diferencialmente expressos após o tratamento na expansão

Para a validação do *microarray* e posterior análise da metilação da região promotora foram selecionados os genes *FBLN2*, *LAMB2* e *ADFP* diferencialmente expressos após o tratamento na expansão.

FBLN2 (*fibulin 2*) pertence a família das fibulinas e codifica uma proteína da matriz extracelular a qual se liga a vários ligantes extracelulares e ao cálcio. As fibulinas são expressas durante os estágios iniciais da organogênese e estão especialmente envolvidas no desenvolvimento do coração, esqueleto e tecidos neural (SAZAKI et al., 1996). *FBLN2* se expressou 4,37 vezes mais nas células mesenquimais após o tratamento. A região promotora deste gene apresenta uma ilha CpG de 256 pares de bases (pb).

LAMB2 (*laminin, beta 2*) pertence a família das lamininas, uma família de glicoproteínas da matriz extracelular. Esta família participa de uma variedade de processos biológicos incluindo adesão celular, diferenciação, migração, sinalização e metástase (GU et al., 1999; SILLER et al., 2008). A razão de expressão deste gene após o tratamento foi de 2,85 vezes e a sua região promotora apresenta duas ilhas CpG com 188 pb e 197pb, respectivamente.

O gene *ADFP* (*adipose differentiation-related protein*) codifica para uma proteína que está associada com a superfície da membrana celular. Um aumento no nível de expressão deste gene é uma indicação da diferenciação adipogênica (EISINGER; SERRERO, 1993). Os dados de *microarray* indicam que este gene teve a sua expressão aumentada em 6,1 vezes nas células tratadas. A análise da região promotora deste gene identificou duas ilhas CpG, uma com 400pb e a outra com 249pb.

3.3.2. Seleção dos genes diferencialmente expressos na diferenciação osteoblástica após o tratamento

Os genes *TBKBPI*, *ALPL* e *ARHGEF* foram selecionados para validar sua expressão (qRT-PCR) e avaliar o seu estado de metilação na região promotora.

TBKBPI (*TBK1 binding protein 1*) codifica para uma proteína adaptadora que se liga ao *TBK1* e faz parte da via *TNF/NFKB* (BOUWMEESTER et al., 2004). Este gene passou a ser expresso 7,5 vezes mais após o tratamento e apresenta duas ilhas CpG, uma de 548pb e a outra de 298pb.

O gene *ALPL* (*alkaline phosphatase*) é considerado um marcador específico de osteoblasto cuja expressão demonstra o fenótipo osteoblástico (KULTERER et al, 2007). Ele se mostrou 2,1 vezes mais expresso após o tratamento durante a diferenciação. Foi identificada uma ilha CpG de 445pb na região promotora deste gene.

O gene *ARHGEF17* (*Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 17*) catalisa a mudança GDP/GTP de RhoA (RUMENAPP et al., 2002) e a expressão constitutiva de RhoA ativada induz marcadores de diferenciação osteoblástica em hMSCs (McBEATH et al., 2004; MEYERS et al., 2005). Este gene teve a sua expressão 3,3 vezes aumentada nas células

diferenciadas e tratadas. São identificadas duas ilhas CpG em seu promotor, uma de 375pb e a outra 1024pb.

3.3.3. Seleção dos genes diferencialmente expressos entre as amostras não-tratadas

Para a seleção dos genes diferencialmente expressos após os sete dias de diferenciação, a presença de ilhas CpG não foi considerada. Apenas dois genes foram selecionados nesta análise: os genes *SAA2* e *MMP7*.

O gene *SAA2* (*serum amyloid A2*) teve a sua expressão aumentada em 72 vezes nas CTMs em diferenciação em relação as CTMs não diferenciadas. O produto deste gene juntamente com o produto do gene *SAA1* formam a proteína *A-SAA* (*acute-phase serum amyloid A*). A expressão destes genes ocorre em vários tecidos normais e linhagens celulares (URIELE-SHOVAL; LINK; MATZNER, 2000).

O gene *MMP7* (*matrix metalloproteinase 7*) pertence a família das metaloproteinases que está envolvida na degradação de componentes estruturais da matriz (PAGE-McCAW; EWALD; WERB, 2007). A expressão deste gene foi 542 vezes maior nas células em diferenciação.

Além dos nove genes selecionados a partir do *microarray*, três outros genes foram incluídos para análise de expressão: *CD73*, *CD29* e *CD105*. Estes genes codificam proteínas marcadoras da superfície celular de células mesenquimais e que, de acordo aos dados obtidos pela citometria de fluxo, a presença destas proteínas na superfície celular foi alterada após o tratamento com 5-aza (figura 8).

3.4. qRT-PCR pelo sistema de *Sybr-Green*

A sequência dos *primers* utilizados no qRT-PCR assim como a validação da eficiência destes *primers* estão demonstrados nos apêndices I e II. A reação do qRT-PCR foi realizado em triplicatas com amostras dos doadores 1 e 2 (D1 e D2). A D1 foi a amostra utilizada também para o experimento do *microarray*. Os resultados do qRT-PCR foram analisados de acordo ao método de quantificação da expressão relativa dos genes alvos (selecionados) em comparação aos genes de referência (normalizadores) (PFAFFL, 2001). Para a análise final da expressão relativa dos genes selecionados, foi escolhido o normalizador cuja expressão variou menos durante o tratamento (tabela 2). Na amostra D1, a expressão do normalizador *GAPDH* foi a que menos variou após o tratamento na expansão e diferenciação. Na amostra D2 o *GAPDH* e o *TUBA1C* foram os genes selecionados como normalizadores para a análise da expressão após o tratamento na expansão e na diferenciação, respectivamente. Enquanto a expressão do *HPRT* foi a mais estável entre as células indiferenciadas (CTM-C) e diferenciadas (DIF-C) com e sem tratamento em ambas as amostras (D1 e D2).

Tabela 2. Expressão dos normalizadores nas amostras D1 e D2. Δ CP, média do *crossing point*; S, desvio padrão (n=3). O valor de S em negrito indica o normalizador cuja expressão foi pouco alterada durante o tratamento.

D1	CTM-C X CTM-T			DIF7- C X DIF7-T			CTM- C X DIF7-C			CTM-C X DIF7-T		
	Δ CP CTM-C	Δ CP CTM-T	S	Δ CP DIF7-C	Δ CP DIF7 -T	S	Δ CP CTM-C	Δ CP DIF7 C	S	Δ CP DIF7 -T	Δ CP CTM-C	S
<i>HPRT</i>	24,24	25,02	0,55	24,79	23,75	0,74	24,24	24,79	0,39	23,75	24,24	0,35
<i>GAPDH</i>	15,33	15,28	0,03	16,16	16,14	0,01	15,33	16,16	0,58	16,14	15,33	0,57
<i>TUBA1C</i>	16,34	17,63	0,91	17,91	17,72	0,13	16,34	17,91	1,11	17,72	16,34	0,98
D2												
<i>HPRT</i>	26,92	26,26	0,47	27,13	28,49	0,96	26,92	27,13	0,15	28,49	26,92	1,11
<i>GAPDH</i>	16,23	16,87	0,45	17,07	18,7	1,15	16,23	17,07	0,59	18,70	16,23	1,75
<i>TUBA1C</i>	19,93	18,5	1,01	20,61	21,72	0,78	19,93	20,61	0,48	21,72	19,93	1,27

3.4.1. Expressão dos marcadores da superfície da CTM: *CD29*, *CD105* e *CD73*

A expressão destes três marcadores nas duas amostras revela que a CTM-C apresenta maior expressão destes genes quando comparada a CTM-T, DIF7-C e DIF7-T, sendo esta última a que menos expressou estes genes (figura 11A e B). Quando comparada a expressão

entre a amostra D1 e D2 (figura 11C), os resultados mostram que estes marcadores estão mais expressos na D1 e mesmo com o estímulo para a diferenciação esta diferença persistiu. Apenas a expressão do *CD105* parece não ter sido afetada pela diferenciação (figura 11C).

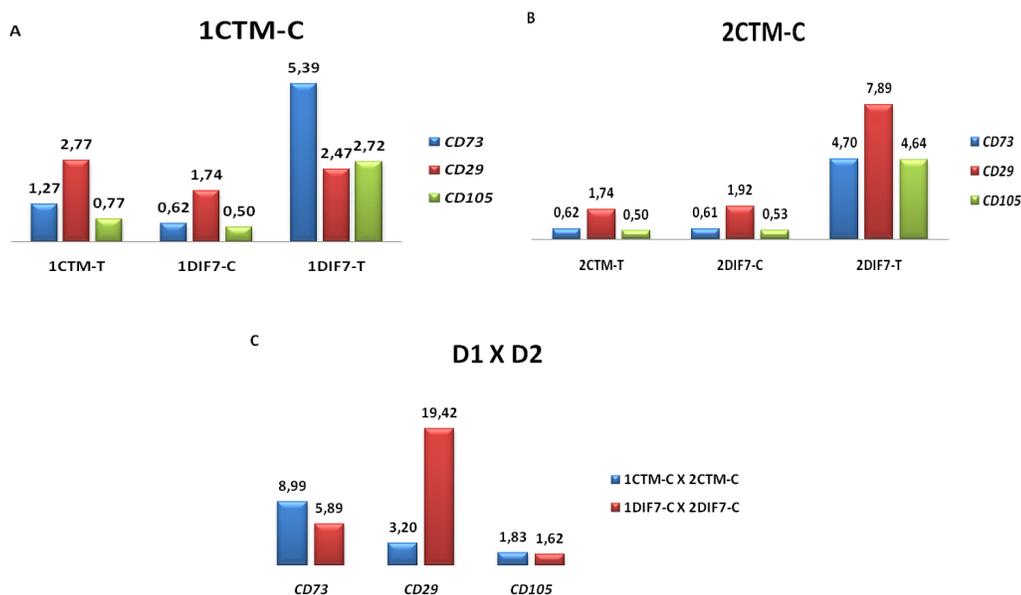


Figura 11. Expressão relativa dos genes de marcadores de superfície na CTM-C. **A.** 1CTM-C, célula-tronco mesenquimal do doador 1. **B.** 2CTM-C, célula-tronco mesenquimal do doador 2. **C.** Expressão relativa entre D1 e D2 na célula indiferenciada (CTM) e na diferenciada (DIF7).

3.4.2. Expressão dos genes *FBLN2*, *LAMB2* e *ADFP* na expansão celular

Os resultados do qRT-PCR das amostras D1 e D2 indicam, conforme os dados do *microarray*, que os genes *FBLN2* e *LAMB2* tiveram um aumento de expressão após o tratamento das CTM-C. No entanto, embora a expressão do gene *ADFP* na amostra D1 tenha sido validada, o resultado obtido na amostra D2 sugere que o tratamento da CTM-C pode não ter produzido o mesmo efeito na expressão do gene cuja razão de expressão em relação a amostra D1 foi 13 vezes menor (figura 12). A expressão destes genes foi também verificada após os sete dias de diferenciação, com ou sem o tratamento (figura 13). Na amostra D1, partindo da CTM-C, a diferenciação com ou sem tratamento aumentou a expressão dos três genes. Enquanto na amostra D2, a diferenciação teve o seu maior efeito apenas na expressão

do gene *FBLN2*. A comparação entre as amostras diferenciadas (DIF7-T x DIF7-C) revelou a menor variação de expressão destes genes.

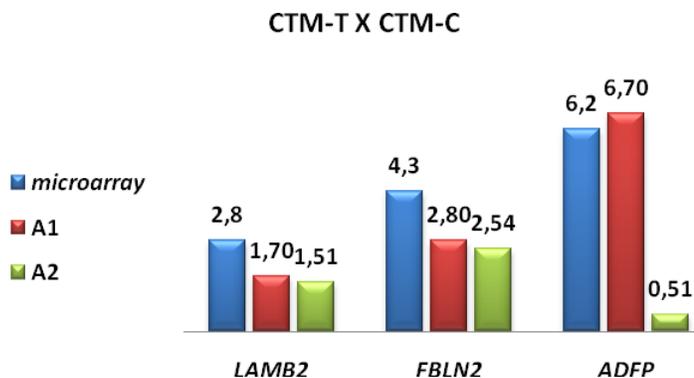


Figura 12. Análise por qRT-PCR dos genes selecionados na expansão. Os números acima das barras representam o valor da expressão relativa do gene entre as amostras CTM-T X CTM-C. O valor descrito na barra *microarray* representa a razão de expressão do gene entre as amostras CTM-T X CTM-C.

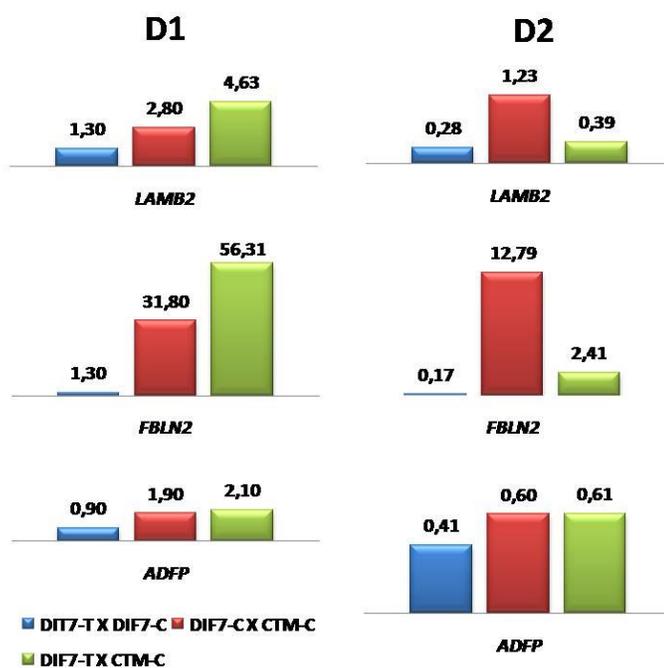


Figura 13. Perfil da expressão dos genes *LAMB2*, *FBLN2* e *ADFP* após o estímulo com e sem tratamento. Os números acima das barras representam o valor da expressão relativa do gene entre as amostras.

A expressão do gene *ADFP* também foi avaliada nas CTMs isoladas do tecido adiposo (CTM-TA) e nestas células diferenciadas em adipócitos (DIF ADIPO TA). Este gene mostrou um nível de expressão semelhante entre os dois tipos de CTMs (da medula e do tecido adiposo). O estímulo para a diferenciação adipogênica induziu a expressão do *ADFP* mais nas CTMs do tecido adiposo do que nas CTMs da medula óssea (figura 14).

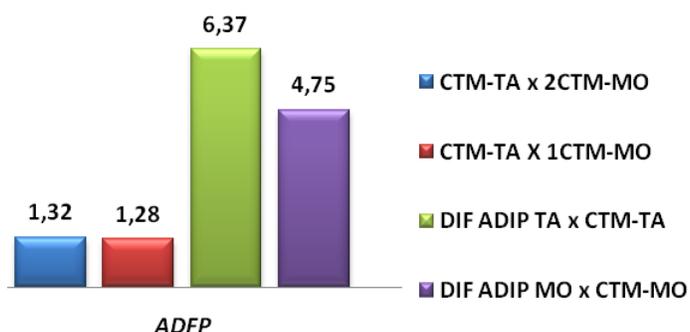


Figura 14. Análise por qRT-PCR do gene *ADFP* na CTM do tecido adiposo (CTM-TA) em relação as CTM da medula óssea (CTM-MO, D1 e D2) e após a diferenciação adipogênica.

3.4.3. Expressão dos genes *TBKBPI*, *ALPL* e *ARHGEF17* na diferenciação celular

Dos três genes selecionados apenas o gene *ALPL*, na amostra D1, apresentou um padrão similar de expressão entre o qRT-PCR e o *microarray*. Para os outros genes, embora a expressão dos mesmos tenha se mostrado maior pela metodologia do *microarray* o perfil desta expressão foi semelhante entre as amostras D1 e D2 pelo método qRT-PCR (figura 15).

O perfil da expressão destes genes partindo da célula não diferenciada (CTM-C) na amostra D1 indica que a diferenciação promoveu a expressão destes genes e que o tratamento ao final dos quatro dias de diferenciação potencializou esta expressão. Na amostra D2 os sete dias de diferenciação não promoveram o aumento da expressão destes genes, salvo para o gene *ALPL* sendo que o tratamento não potencializou esta expressão (figura 16).

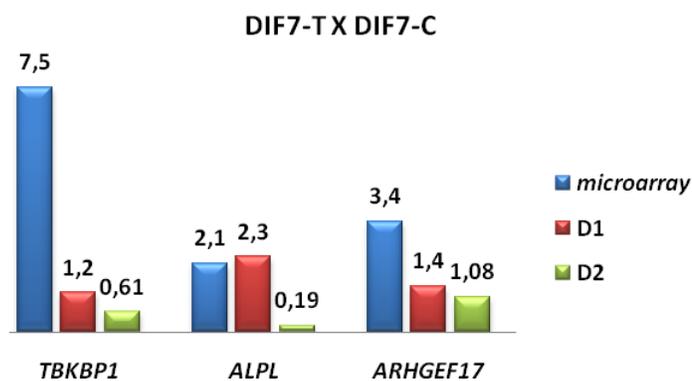


Figura 15. Análise por qRT-PCR dos genes selecionados na diferenciação. Os números acima das barras representam o valor da expressão relativa do gene entre as amostras DIF7-T X DIF7-C. O valor descrito na barra *array* representa a razão de expressão do gene entre as amostras DIF7-T X DIF7-C.

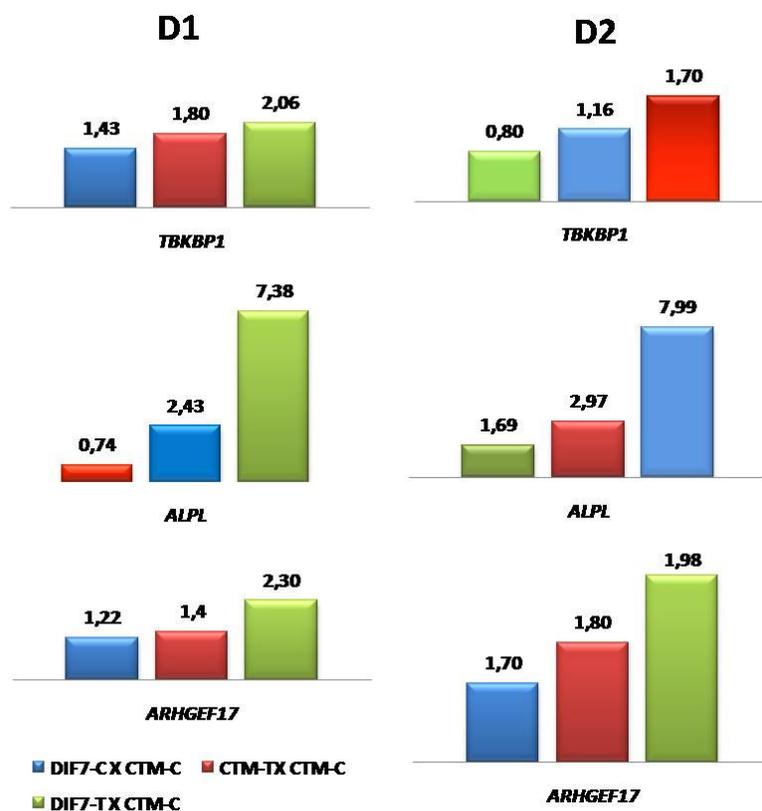


Figura 16. Perfil da expressão dos genes *TBKBP1*, *ALPL* e *ARHGEF17* após o estímulo com e sem tratamento e após o tratamento na expansão. Os números acima das barras representam o valor da expressão relativa do gene entre as amostras.

3.4.4. Expressão dos genes *SAA2* e *MMP7* entre as amostras não tratadas (DIF7-C x CTM-C)

Os resultados do qRT-PCR validaram o *microarray* embora estes genes mostraram estar bem mais expressos pela metodologia do qRT-PCR. Nas duas amostras a expressão destes genes foi bastante induzida com a diferenciação osteoblástica (figura 17). O gene *SAA2* apresentou ainda maior expressão quando o estímulo foi acompanhado com o tratamento. Para o gene *MMP7*, o tratamento parece não ter tido o mesmo efeito na D1 embora na D2 o tratamento reduziu a sua expressão (figura 18).

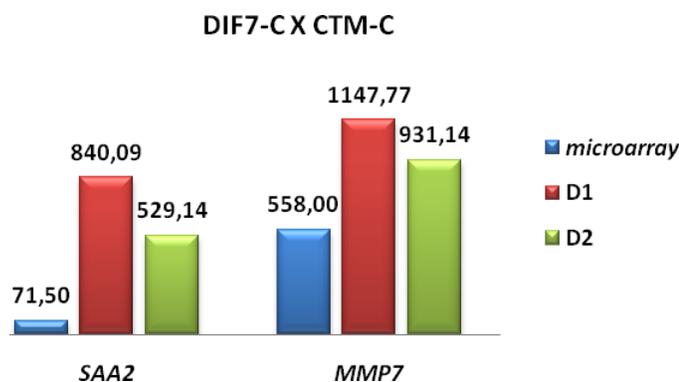


Figura 17. Análise por qRT-PCR dos genes selecionados das amostras controle. Os números acima das barras representam o valor da expressão relativa do gene entre as amostras DIF7-C X CTM-C. O valor descrito da barra *microarray* representa a razão de expressão do gene entre as amostras DIF7-C X CTM-C.

3.6. Seqüenciamento do DNA modificado por bissulfito de sódio

O DNA tratado com bissulfito foi amplificado por *nested*-PCR usando os *primers* descritos no apêndice III. Após a purificação, o produto do PCR foi seqüenciado diretamente ou clonado em vetor para posterior seqüenciamento.

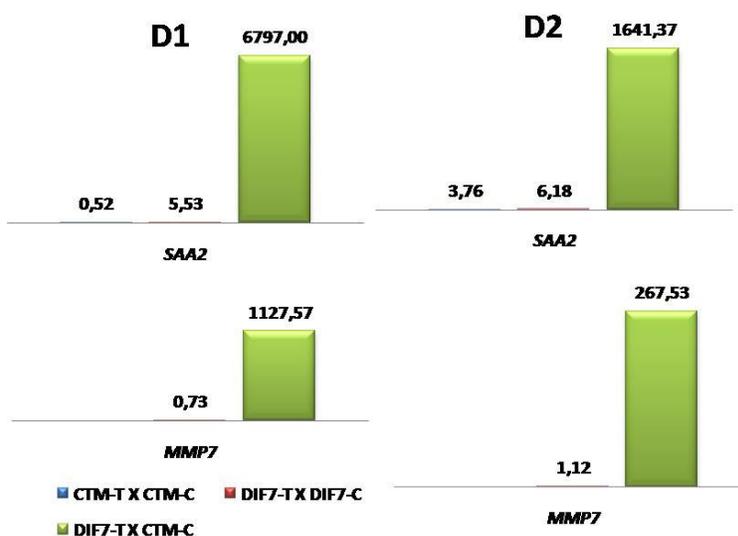


Figura 18. Perfil da expressão dos genes *SAA2*, e *MMP7* após o estímulo com e sem tratamento e após o tratamento durante a expansão. Os números acima das barras representam o valor da expressão relativa do gene entre as amostras.

3.5.1. Análise do estado de metilação das ilhas CpG dos genes selecionados na expansão celular

Análise do gene LAMB2

O gene *LAMB2* possui duas ilhas CpG em sua região promotora, uma localizada na posição -791 a -603 e outra na posição -125 a +72 do promotor. Esta última foi a escolhida para avaliação do estado de metilação. A sequência amplificada pelo *nested*-PCR contém 20 dinucleotídeos CpG e 13 destes pertencem a ilha CpG (figura 19). Foram analisados seis clones da amostra 1CTM-C e não foi encontrado dinucleotídeos CpG metilados.

Análise do gene FBLN2

Uma sequência de 654 pb contendo a ilha CpG do gene *FBLN2* foi amplificada pelo *nested*-PCR. Esta ilha CpG está localizada na posição -262 a +8 do gene e apresenta 51 dinucleotídeos CpG (figura 20). A porcentagem de metilação na ilha CpG foi calculado

dividindo-se o número total de dinucleotídeos CpG analisados pelo número de dinucleotídeos CpG metilados na amostra. Nove clones das amostras 1CTM-C e 1CTM-T foram seqüenciados e a porcentagem de metilação do controle foi de 7,4% caindo para 1,5% nas células tratadas (figura 21). Na amostra D2, cinco clones do controle e do tratado foram seqüenciados e a porcentagem de metilação foi de 18% e 9,5%, respectivamente (figura 22). Também foram seqüenciados seis clones da amostra 1DIF7-C e 1DIF7-T, sete clones da amostra 2DIF7-C e cinco da amostra 2DIF7-T sendo a porcentagem de metilação para cada amostra de 6,8%, 10,8%, 18,2% e 2%, respectivamente (figuras 21 e 22).

LAMB2

```

tgggccagagttggagatcccCGaagatctctcatttgctcctgccatgcccccaacttCG
tgagccctcttccaaggatagtttaaacaccaaacccttaccttccccctggccctCGt
ataggtgtgggcttgggggcacaataaagatttgtgggtgaagtggctctgtctctggttc
ctggggCGAAGGCAGTTTCGGAGGGAAGGGGTAGGGTTGGGGTGGGGCGCTCTCGCC
CGGTGTTCGCTCCTTCCCAGAATCCGCTCCGGCCTTTCCTTCCCTGCCCGCGATTCCCAAC
TTTGCTCAAAGTCGCTGGACTCTAAGCTGTCGGAGGGACCGCTGGACAGACCTGGGAACT
GACAGAGGGCCTGGAGGGAAACAGGCCAAAGACCCACAGGCAGAGTTGACACCGGAACCC
AAAGCAAGGAGGAGGGCTCGGGCCCGAGACCGTTCACCCTCCCTTATCCCTGTTCCCTC
TTCAGGATGGAGCTGACCTCAAGGGAAGAGGGAGGG

```

Figura 19. Seqüência de 517 pb do gene *LAMB2* obtida com os *primers* internos do *nested-PCR* e clonada para o seqüenciamento. Região sombreada, ilha CpG identificada pelo *Methprimer*. Letras maiúsculas indicam o primeiro exon do gene.

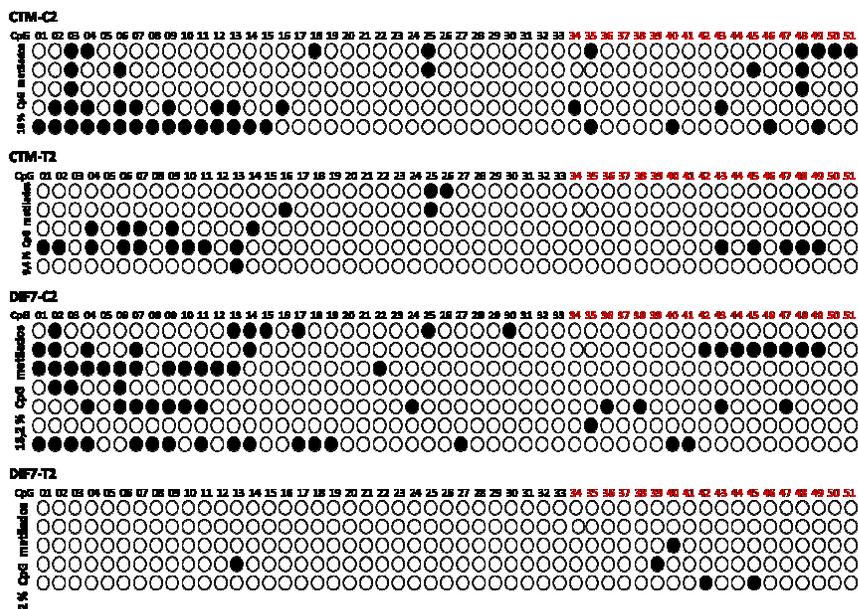


Figura 22. Esquema do seqüenciamento da região do gene *FBLN2* contendo 37 dinucleotídeos CpG das amostras do doador D2. Cada círculo representa um dinucleotídeo CpG; círculos abertos, CpG não-metilado; círculo fechado, CpG metilado. CTM, célula-tronco mesenquimal; DIF7, diferenciada sete dias; C- controle; T-tratada; 2, doador 2.

Análise do gene ADFP

A ilha CpG do gene *ADFP* identificada tem 404 pb com 30 dinucleotídeos CpG. Ela está localizada na posição -951 a -547 do sítio inicial de transcrição (figura 23). O seqüenciamento desta região foi realizado nas CTMs das amostras D1 e D2 (controles e tratadas), nas CTMs isoladas do tecido adiposo (CTM-TA) e nas CTM-TA induzidas a diferenciação adipogênica (DIF ADIPO TA). Na amostra D1, oito clones do controle e cinco do tratado foram seqüenciados e o perfil de metilação encontrado foi de 2% e 4,6%, respectivamente. O seqüenciamento de nove clones do controle e sete do tratado da amostra D2 indicou respectivamente 8% e 7,6% de metilação. O seqüenciamento das CTM-TA controle e diferenciadas em adipócitos apresentou semelhante perfil de metilação com apenas 2% dos seus dinucleotídeos CpG metilados (figura 24).

ADFP

accacctgggctcaaaagattctttcacctcagccacccaccgctgcccccaac
 cccgctaaacagccgggactagctgggactacaggcgcgccaccacgctgggct
 gctttctttgtattttgagagagacgggggtttcgccatggtggccaggctggtgat
 tccgctcgctcgccctcccaaagtgctaggattacaggcgtgagccaccgccc
 gccgcccacaaaacttttaaagttattacttcgctaaaataacagcgtagaagcc
 allglgcagcgcca cgcgalc lcgglcaclgcagcc lcgaccleccaggclcaag
 cgatcctcccatcttagcctcgcaqgtagctggggccacagggcgacacaccag
 ctgggctatTTTTTaaataaaaataaaaatcttcgcccaggctggtctcgaactcct
 aggctcgacagatcctctcgccctcagcatcccaaagtgttg

Figura 23. Seqüência de 491pb do gene *ADFP* obtida com os *primers* internos do *nested-PCR* e clonada para o seqüenciamento. Região sombreada, ilha CpG identificada pelo *Methprimer*.

3.5.2. Análise do estado de metilação das ilhas CpG dos genes selecionados na diferenciação

Análise do gene ALPL

A ilha CpG do gene *ALPL* tem 440 pb e contém 50 dinucleotídeos CpG. Ela está localizada na posição – 403 a +37 do sitio inicial de transcrição (figura 25). Esta ilha foi seqüenciada diretamente do produto da PCR das amostras 1CTM-C e 1DIF7-C e não foi encontrada metilação em nenhum dos dinucleotídeos CpG analisados.

ALPL

gacagagacagagagacagggacaCGtgggcagagaCGgataaagacagag
accagagaaagccagatatgttgacagacacagagacagaCGccagagag
gaaggcagacaaagagaCGggtggagacaaagactcccaccaagagaCGca
gaaggaagatgcccGCGgtaaagacaaaacaggagaCGCGCGcaaggagca
ggtcagagcccaggctCGctgagagaggaagggctgggctggggcagccCG
gaggcagagagacCGagagtgcCGgggCGggCGaggggaCGccagggcCGCGt
caccccagccCGttcctagctcCGctccCGgcagggggCGccctggcctCG
tggcaCGacCGgccCGCGgggCGCGgggctCGggcCGggggCGgggcCGgg
gcCGggctggggaggggtggggcCGggggCGggggagggggCGggctgcC
CGGGCCTCACTCGGGCCCCGCGGCCCGCCTTTATAAGGCGCGGGGGTGGT
GCCCGGGCCGCGTTGCGCTCCCGCCACTCCGCGCCCGCTATCCTGGCTCCG
TGCTCCCACCGCCTTGTGCC'TGGACGGACCCTCGCCAGTGTCTCTGCGCAGg
taaggattCGaCGctgcccCGCGccctggttccccagggccccagCGgaCG
tggtccatccccttctgcat

Figura 25. Sequência de 683pb do gene *ALPL* obtida com os *primers* internos do *nested-PCR* e clonada para o seqüenciamento. Região sombreada, ilha CpG identificada pelo *Methprimer*.

Para os demais genes selecionados na diferenciação, devido a pouca diferença de expressão após o tratamento detectado pelo qRT-PCR, não foi realizado o seqüenciamento das suas ilhas CpG.

Discussão

4. Discussão

As células-tronco mesenquimais isoladas da medula óssea, do tecido adiposo e cordão umbilical são definidas como células multipotentes capazes de auto renovação e podem diferenciar em adipócitos, condrócitos e osteoblastos (PITTENGER et al., 1999). Estas características fazem das células-tronco um alvo excelente para a terapia celular e gênica aplicada a várias doenças (ABDALLAH; KASSEM, 2008; CAPLAN; BRUDER, 2001; KASSEM; KRISTIANSEN; ABDALLAH, 2004).

A aplicação clínica das células-tronco requer o entendimento não só das características biológicas destas células mas também o conhecimento de como explorar estas informações para isolar, expandir e diferenciar as células em uma linhagem particular necessária para a terapia. Neste último caso, é necessário desenvolver protocolos que limite o potencial global de diferenciação das CTMs e direcione para um tipo celular. Para isto duas abordagens têm sido sugeridas: a da genética e a do micro-ambiente. Na primeira abordagem, fatores de transcrição específicos são super-expressos com a finalidade de induzir a diferenciação em uma determinada linhagem. Na segunda abordagem, as CTMs são expostas a diferentes misturas contendo fatores de transcrição, hormônios e componentes da matriz extracelular para induzir a diferenciação em uma linhagem específica em função dos sinais recebidos pela célula em seu microambiente (KASSEM; KRISTIANSEN; ABDALLAH, 2004).

Portanto, é esperado que o entendimento dos mecanismos celulares e moleculares envolvidos na osteogênese irá fornecer novos recursos para o tratamento das doenças degenerativas do osso incluindo a osteoporose (KASSEM; ABDALLAH; SAEED, 2008). A progressão de uma célula-tronco para a progênie diferenciada é quase sempre acompanhada por mudanças na morfologia e função celular. Estas mudanças são determinadas em cada estágio pelo padrão de expressão de genes distintos. Especificamente, os genes associados

com a auto-renovação são sempre silenciados, enquanto que os genes específicos a um tipo celular tornam-se ativos transcricionalmente durante a diferenciação celular (WU; SUN, 2006).

O tratamento de linhagens de células embrionárias de camundongos com 5-aza tem demonstrado que a droga é capaz de induzir a diferenciação em adipócitos, condrócitos e células musculares lisas (KONIECZNY; EMERSON, 1984; TAYLOR; JONES, 1979), além de induzir as células do estroma da medula óssea à diferenciação em cardiomiócitos (ANTONITSIS et al., 2007; BURLACU et al., 2008). Locklin, Oreffo, Triffitti (1999), relataram a capacidade da 5-aza em modular a diferenciação osteogênica a partir de linhagem celular de osteosarcoma humano (MG63) e de fibroblastos do estroma da medula óssea.

O objetivo deste estudo é identificar genes importantes para a diferenciação osteogênica diferencialmente expressos nas células-tronco mesenquimais e na etapa inicial desta diferenciação após o tratamento com 5-aza.

Metodologias atuais para o isolamento das células-tronco primitivas do estroma da medula são baseadas naquelas inicialmente descrita por Friedenstein e colegas, as quais contam com a rápida adesão da população progenitora estromal em garrafas de cultura plásticas e sua rápida proliferação *in vitro*. Estes protocolos resultam em uma população inicial de células heterogêneas e aderentes da medula a qual representa apenas uma pequena proporção de células-tronco multipotente do estroma da medula (GRONTHOS et al., 2003).

As colônias inicialmente formadas (CFU-F) após a aderência as superfícies plásticas da garrafa de cultura diferem umas das outras com respeito a sua capacidade osteogênica (KUZNETSOV et al., 1997) e mesmo quando isoladas clonalmente, as CFU-F ainda apresentam diferenças na capacidade de formar osso *in vitro* (GRONTHOS et al., 2003). Além destas diferenças observadas a partir do isolamento de CTMs de um mesmo doador, Siddappa et al. 2007, observaram que também existe uma extensa variação entre os doadores

no que diz respeito à composição das células (progenitoras e osteoblastos comprometidos), crescimento e resposta a sinais osteogênicos.

Muitos pesquisadores têm buscado diferentes métodos para enriquecer as culturas com CTMs multipotentes utilizando anticorpos monoclonais como STRO-1, combinado com CD106 (VCAM-1) ou CD146 e os anticorpos CD271 e CD18 ou marcadores de células-tronco embrionárias como SSEA-4. Enquanto estas pesquisas auxiliam na separação das CTMs das células hematopóéticas, elas não distinguem CTMs multipotentes de outras células precursoras presentes dentro da população das CTMs e conseqüentemente não fornecem qualquer vantagem sobre o método padrão de aderência ao plástico (KASSEM; ABDALLAH; SAEED, 2008).

Neste estudo, os experimentos foram realizados com duas amostras obtidas da medula óssea de diferentes doadores (D1 e D2) e uma amostra obtida do tecido lipoaspirado (CTM-TA). O critério de isolamento das CTMs foi a capacidade destas células em aderir a superfície plástica. Os resultados da imunofenotipagem e da análise histoquímica das diferenciações das amostras indicam que as células utilizadas em nosso estudo apresentam características de células-tronco mesenquimais.

Os ensaios para a avaliação do nível de apoptose e da proliferação celular demonstraram que o tratamento com 5-aza não afetou a viabilidade e a capacidade proliferativa das células. A droga 5-aza-2-deoxicitina é incorporada ao DNA das células em divisão inibindo a DNA metiltransferase (SHEIKHNEJAD et al., 1999). A taxa de proliferação durante o tratamento na expansão não foi diferente em relação ao experimento controle. Na diferenciação, a proliferação celular foi menor do que observado durante a expansão indicando que durante este processo há uma diminuição na taxa de proliferação (figura 5).

A característica imunofenotípica e a capacidade das CTMs diferenciarem em osteoblastos após o tratamento durante a expansão e durante a diferenciação também foram avaliadas. Após o tratamento durante a expansão celular, o número de células apresentando os antígenos CD73 e CD29 diminuiu. Embora o antígeno CD105 não tenha sido avaliado nas CTM-C, a presença deste marcador estava presente em apenas 51,76% das CTM-T. Aos sete dias de diferenciação osteogênica (com ou sem tratamento) a expressão destes três marcadores diminuiu ainda mais. A expressão destes três marcadores também foi avaliada por qRT-PCR confirmando os dados da citometria de fluxo. O tratamento durante a expansão e a diferenciação não interferiu na capacidade destas células em se diferenciarem em osteoblastos. No entanto, a expressão dos marcadores *CD73*, *CD29* e *CD105* na amostra 1CTM-C em relação a 2CTM-C é maior. Neste caso, isto pode significar que há uma diferença em relação ao estado de diferenciação destas células, sendo as CTM da amostra D1 menos diferenciadas do que da amostra D2 (figura 11).

Com base nos dados de *microarrays*, o número de genes que apresentou expressão aumentada após o tratamento foi bastante diferente quando este tratamento ocorria na expansão, 271 genes, ou na diferenciação, 27 genes. Esta diferença pode indicar que as células-tronco indiferenciadas apresentam um número maior de genes controlados direta ou indiretamente pela metilação do DNA e que durante os sete dias de estímulo para a diferenciação celular o padrão de metilação destas células é alterado e por isso o número de genes demetilados durante o tratamento na diferenciação foi bem menor. De fato, a análise realizada através de RGLS por Shiota et al. (2002), sugerem que a diferenciação das células-tronco está associada com mudanças no estado de metilação em muitos *loci* do genoma. Os resultados do *microarray* também demonstraram que após sete dias de diferenciação 216 genes tiveram a sua expressão aumentada (CTM-C x DIF7-C).

Três genes de cada etapa do tratamento foram selecionados para a análise: os genes *FBLN2*, *LAMB2* e *ADFP* na expansão das CTMs e na diferenciação osteogênica foram selecionados os genes *TBKBP1*, *ARHGEF17* e *ALPL*. Os genes *SAA2* e *MMP7*, cuja expressão aumentou durante a diferenciação (amostras controle), também foram selecionados para validação. A expressão destes genes foi validada por qRT-PCR. Embora, em muitos casos, a diferença de expressão entre as amostras comparadas (tratada x controle ou controle x controle) tenha sido maior pela metodologia do *microarray*, no entanto, a expressão destes genes nas duas amostras foi semelhante, com exceção para os genes *ADFP* e *ALPL*.

Os genes *FBLN2* e *LAMB2* foram selecionados por expressarem constituintes da matriz extracelular. O microambiente hematopoiético da medula óssea apresenta um papel fundamental na regulação da diferenciação, proliferação e migração das células hematopoiéticas. Uma parte essencial do microambiente da medula óssea é sua complexa matriz extracelular a qual é sintetizada por células hematopoiéticas e do estroma. Moléculas da matriz extracelular (glicoproteínas, proteoglicanas e a família de colágenos) estão envolvidas diretamente no controle da adesão celular e proliferação das células hematopoiéticas maduras assim como na apresentação de citosinas as células progenitoras hematopoiéticas (SILLER et al., 2000).

A família das fibulinas consiste de seis diferentes membros dos quais a *FBLN1* e *FBLN2* são funcionalmente mais caracterizadas e conhecidas. Estas fibulinas apresentam um repertório de ligações semelhantes, mas não completamente similares, com outras proteínas extracelulares como fibronectinas, nidogem, colágeno IV, lamininas e perlecan, indicando a participação das fibulinas na estruturação da matriz e, em particular, na estruturação microfibrilar. As fibulinas são expressas durante os estágios iniciais da organogênese e estão especialmente envolvidas no desenvolvimento do coração, esqueleto e tecidos neural (SASAKI et al., 1996a). A sua expressão também foi identificada em fibroblastos e estudos

de imunofluorescência sugerem a expressão também em muitos tipos de epitélio e em células mesenquimais (PAN et al., 1993; SASAKI et al., 1996b).

A *FBLN2* parece ser um componente importante nos estágios iniciais da formação da matriz extracelular da cartilagem. Na embriogênese de ratos, a expressão da *FBLN2* é maior durante o desenvolvimento da cartilagem. Quando a cartilagem começa a se tornar madura ou ser substituída por osso, a expressão da *FBLN2* desaparece (ZHANG et al., 1995; ZHANG et al., 1996). Tsuda et al. (2001), levantam a hipótese de que a formação da fibulina na matriz extracelular serve para facilitar uma boa migração, proliferação e diferenciação das células mesenquimais.

Hergeth et al. (2008), avaliaram o efeito da expressão de *FBLN1* e *FBLN2* na proliferação celular e na capacidade de formação de colônias das células progenitoras hematopóéticas $CD34^+$ e concluíram que a presença da *FBLN1* no nicho da célula-tronco pode ajudar a suprimir a proliferação e de mantê-las no estado quiescentes. As fibulinas são componentes essenciais do microambiente permitindo as células-tronco manter sua identidade.

O gene *LAMB2* pertence a família das lamininas. As lamininas são proteínas heterotriméricas composta pelas variantes das cadeias polipeptídicas α ($\alpha1$ - $\alpha5$), β ($\beta1$ - $\beta3$) e γ ($\gamma1$ - $\gamma3$). Tem sido demonstrado que as lamininas estão diretamente envolvidas na regulação da adesão e proliferação celular das células hematopóéticas apresentando uma variedade de atividades celulares que incluem a migração, adesão, e diferenciação (GU et al., 1999; GU et al., 2000; SILLER et al., 2000).

A cadeia $\beta2$ da laminina (*LAMB2*) foi inicialmente descrita como um marcador específico das junções neuromusculares e faz parte da lâmina basal de estruturas renais e artérias (SANES et al, 1990), bem como nas membranas basais e de embriões e em tecidos adultos diferenciados. Observa-se uma interrupção no desenvolvimento quando ocorre a perda

das isoformas das lamininas contendo a cadeia $\beta 2$. A expressão da laminina $\beta 2$ foi demonstrada em lesões associadas com a proliferação e desdiferenciação de tecidos adultos (VOGEL; KANZ; BRUGGER, 1999).

Vogel, Kanz e Brugger (1999), demonstraram que o gene *LAMB2* está expresso nas células da medula óssea humana, nas células progenitoras $CD34^+$ do sangue periférico, assim como nas células da medula óssea em longo período de cultura (*LTBMC - long term bone marrow cells*). Para estes pesquisadores a cadeia $\beta 2$ da laminina pode ser considerado como um fator de crescimento estrutural na hematopoiese normal.

O papel das lamininas no controle da diferenciação osteogênica das CTMs humanas (hCTMs) é pouco conhecido. A laminina-5 (Ln-5), composta pelas subunidades $\alpha 3$, $\beta 3$ e $\gamma 2$, está expressa no osso e nas hCTM. Foi demonstrado *in vitro* que a Ln-5 ativa sinais extracelulares relacionados com a quinase ERK (*extracellular signal-related kinase*) conduzindo a fosforilação de fatores de transcrição osteogênicos Runx2/CBFA-1. Células plaqueadas na presença de Ln-5 durante 16 dias aumentaram o nível de expressão de genes marcadores osteogênicos, e aquelas plaqueadas por 21 dias depositaram uma matriz mineralizada indicando a diferenciação osteogênica. Estes dados demonstram que *in vitro* a Ln-5 é capaz de induzir a expressão de genes osteogênicos e a mineralização da matriz (KLESS et al., 2005). Acredita-se que a adição do substrato da matriz extracelular na cultura durante a osteogênese poderá certamente alcançar uma diferenciação direta das células-tronco (HENG et al., 2004).

O fato dos genes *FBLN2* e *LAMB2*, ambos com funções relacionadas à diferenciação, apresentarem um aumento na expressão com o tratamento a reforça os achados de que esta droga apresenta um potencial de induzir a diferenciação. De fato, ao se verificar a expressão de ambos após a diferenciação sem o tratamento, os genes aumentaram a expressão quando a

células receberam o estímulo para a diferenciação. Embora, na amostra D2 o gene *LAMB2*, apresente expressão semelhante ao observado durante a expansão celular.

A análise de seqüenciamento da ilha CpG do gene *LAMB2* não detectou dinucleotídeos CpG metilados. No entanto, a análise do seqüenciamento revelou diferenças no padrão de metilação do gene *FBLN2* entre as amostras tratadas e o controle. Durante a expansão a porcentagem de dinucleotídeos CpG metilados no controle das amostras D1 e D2 foi, respectivamente, de 7,4% e 18% caindo para 1,5% e 9,4% após o tratamento (figura 21 e 22). Esta hipometilação da ilha CpG foi acompanhada com um aumento de expressão de 2 vezes nas duas amostras (figura 12). No entanto, em ambas as amostras (D1 e D2) a porcentagem de dinucleotídeos CpG metilados após a diferenciação, sem tratamento, permaneceu inalterado (aproximadamente 7% para D1 e 18% para D2). Este perfil de metilação foi acompanhado com um aumento de expressão de aproximadamente 32 vezes na amostra D1 e 13 vezes na amostra D2 (figura 13).

Segundo Bird (1992), um determinante crucial do silenciamento gênico mediado pela metilação é a densidade de CpG metilados próximo ao promotor. De acordo a esta densidade o promotor poderá ser fraco ou forte. Promotores fracos podem ser completamente reprimidos quando a metilação é dispersa mas quando o promotor é ativado (pela adição de um *enhancer*), a transcrição é restaurada sem a perda da metilação. No caso de promotores fortes, se a região próxima ao promotor estiver densamente metilada, mesmo na presença de um *enhancer*, a repressão permanecerá completa (figura 18).

A habilidade de genes fracamente metilados de superar a repressão quando a força do promotor é aumentada tem sido descrita em muitos sistemas. Por exemplo, quando um adenovirus apresentando o promotor do gene *E2A* metilado no sitio *HpaII* é introduzido em células, este gene esta reprimido, mas na presença dos *enhancer* E1A ou do citomegalovirus o gene passa a ser transcrito normalmente. Similarmente, as repetições terminais (LTR – *long*

terminal repeat) do HIV esta inativada pela metilação do sitio *HpaII* mas é reativada na presença do trans-ativador *tat*. Em ambos os casos o promotor ainda esta metilado na hora da ativação (BOYES; BIRD 1992).

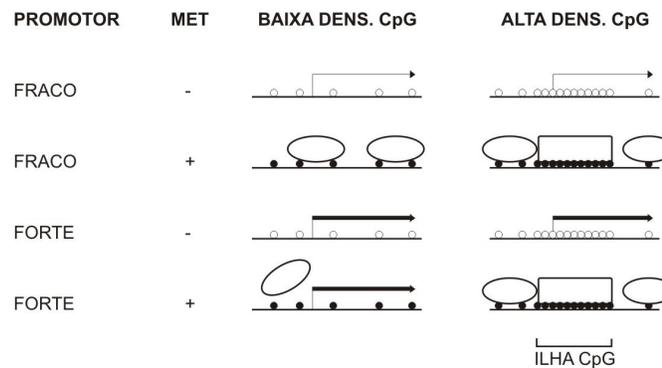


Figura 18. Efeito da metilação do DNA na transcrição. Moléculas de MeCP1 são mostradas se ligando levemente (oval) ou fortemente (retângulos). Setas finas e grossas representam a transcrição de um promotor fraco ou forte, respectivamente. Os círculos indicam CpGs que estão metilados (círculos fechados) ou não-metilados (círculos

Boyes e Bird (1992) sugerem que muitos dos efeitos observados da metilação do DNA na transcrição são consistentes com as propriedades bioquímicas da MeCP-1. A afinidade da MeCP-1 com o DNA metilado depende da concentração de metil-CpG no local. Repressão mediada por MeCP-1 pode ser suficiente pra evitar a transcrição em células onde o gene deve permanecer silenciado mas é irrelevante em células onde o promotor deve ser transcrito com o máximo de eficiência. Por outro lado, a forte repressão transcricional mediada por MeCP-1 irá ocorrer quando o DNA estiver densamente metilado. De acordo com esta descrição, a repressão mediada pela metilação é influenciada pela densidade de dinucleotídeos CpG metilados, pela relativa localização destes dinucleotídeos no promotor e pela eficiência do promotor.

A análise da metilação de dois genes adjacentes e duplicados no genoma de galinhas, *δ-cristalino 1* e *2*, mostra uma complexidade no padrão de metilação a qual pode ser explicada

pela existência de diferentes níveis no controle da expressão do δ -*crystalino*. Há diferentes sítios que sempre estão hipometilados e outros que são hipometilados após 50, 75 ou 96 horas de desenvolvimento. Estes últimos correlacionam-se com o baixo nível de expressão de um ou ambos os genes em muitos tecidos embrionários. No entanto, há sítios que permanecem sempre metilados no tecido dos olhos e a hipometilação destes sítios no $\delta 1$ -*crystalino* foi observada quando os níveis de expressão do mRNA aumentou dramaticamente após 50 h de desenvolvimento. Estes sítios podem estar associados com seqüências realçadoras as quais podem exercer um forte efeito quantitativo na transcrição tecido-específica. Parece haver uma distinção entre elementos realçadores, os quais são necessários para uma transcrição ativa, e modificação de seqüências controles pela hipometilação, a qual pode servir para manter uma transcrição basal (SULLIVAN et al., 1989).

O perfil da expressão e o padrão de metilação observados para o gene *FBLN2* parecem indicar a existência de um promotor fraco, segundo a densidade de metilação. Na expansão, o gene aumentou a sua expressão pela demetilação dos dinucleotídeos CpGs mas após a diferenciação, sem o tratamento, esta expressão foi ainda maior embora a região apresentasse um padrão de metilação semelhante a célula indiferenciada.

O terceiro gene selecionado na expansão foi o gene *ADFP*. Isolado e caracterizado por Eisinger e Serrero (1993). A expressão deste gene se mostrou acentuada no início da diferenciação adipogênica e a proteína por ele codificada está envolvida na absorção de ácidos graxos e na formação e estabilização das gotículas de gordura (YAO et al., 2007). A sua expressão também ocorre em diversas culturas de linhagens celular, incluindo fibroblastos e células endoteliais e epiteliais. O aumento da expressão do gene *ADFP* coloca-o como um possível marcador para a identificação de células especializadas contendo gotas de lipídeos e no caso de doenças associadas com o acúmulo de gordura nas células (HEID et al., 1998). Para Yao et al. (2007), detectaram que os níveis de expressão do gene *ADFP* fornece uma

importante informação prognóstica para a sobrevivência de pacientes com carcinoma das células renais.

Assim como observado em nossos estudos, Yamashita et al. (2005), ao tratarem com 5-aza uma linhagem de câncer gástrico, identificaram o gene *ADFP* entre os genes que apresentaram expressão aumentada após o tratamento e, a metilação deste gene avaliada por MSP (*Methylation Specific-PCR*), foi identificada em quatro das dez linhagens testadas e em uma das dez amostras de câncer gástrico primário analisadas.

O seqüenciamento da ilha CpG do gene *ADFP* mostrou que esta região é pobremente metilada e portanto, os perfis de expressão e metilação apresentado nas amostras indicam que o mecanismo de metilação não participa no controle da expressão do gene *ADFP*. Diferentemente do observado para os genes *FBLN2* e *LAMB2*, a expressão do *ADFP* não foi semelhante entre as duas amostras e a sua expressão foi a única que não aumentou com o estímulo para a diferenciação osteogênica (figuras 12 e 13). No entanto quando a CTM foi diferenciada para adipócitos, a expressão do gene aumentou em 4,7 vezes (figura 14). Estes resultados indicam que a expressão do *ADFP* é inibida na diferenciação osteogênica e que, conforme os dados da literatura esta expressão é induzida durante a diferenciação adipogênica. O aumento da expressão do gene *ADFP* após o tratamento na expansão observado na amostra D1 pode significar que a hipometilação na célula conduziu indiretamente ao aumento da expressão deste gene, no entanto, o mesmo efeito não foi observado na amostra D2.

Como o nível de expressão do *ADFP* é alto na adipogênese, a sua expressão foi também avaliada nas células-tronco isoladas do tecido adiposo (CTM-TA) e durante a adipogênese. No entanto, a expressão do gene *ADFP* na mesenquimal do tecido adiposo em relação as duas CTMs isoladas da medula é semelhante (figura 14). A CTM-TA assim como a

CTM-TA diferenciada em adipócitos também apresentaram poucos dinucleotídeos CpG metilados.

O perfil de expressão e metilação apresentado nestas três amostras apesar de indicar que o mecanismo de metilação não participa no controle da expressão do gene *ADFP*, parte da sequência de DNA localizada na posição 5´ e 3´ da ilha CpG contém muitos dinucleotídeos CpG e talvez o seqüenciamento de uma região mais ampla poderá realmente confirmar se o gene *ADFP* é regulado pela metilação do seu promotor.

Para a análise da expressão diferencial após o tratamento durante a etapa inicial da diferenciação osteogênica, três genes foram selecionados: *TBKPBI*, *ARHGEF17* e *ALPL*. De acordo aos resultados do qRT-PCR, os dois primeiros genes não apresentaram significativo aumento de expressão após o tratamento na diferenciação e nem mesmo após a diferenciação da CTM (figura 15 e 16).

Estudos têm revelado a participação destes dois genes na diferenciação em osteoclastos. O gene *TBKPBI* codifica para uma proteína adaptadora que se liga a TBK1 fazendo parte da rede de interação na via TNF/NFKB. A função exata desta proteína é pouco conhecida mas já foi observado que o silenciamento do mRNA deste gene usando RNA de interferência demonstrou que a proteína TBKBP1 apresenta um papel modulatório na transdução de sinais da via TNF/NFKB (BOUWMEESTER et al., 2004).

O fator de necrose tumoral (TNF – *tumor necrosis factor*) é um membro de uma grande família de citocinas inflamatórias que compartilham vias de sinalização comuns, incluindo a ativação do fator de transcrição NF-κB (*nuclear factor-kappa B*). No entanto, trabalhos têm demonstrado a participação desta via na osteoclastogênese. O NF-κB parece ser necessário no início do comprometimento da linhagem osteoclastos ou mais tarde na fase mitótica que ocorre um pouco antes da formação dos osteoclastos maduros (FRANZOSO et al., 1997; SCHWARZ et al., 2000) (figura 19 A).

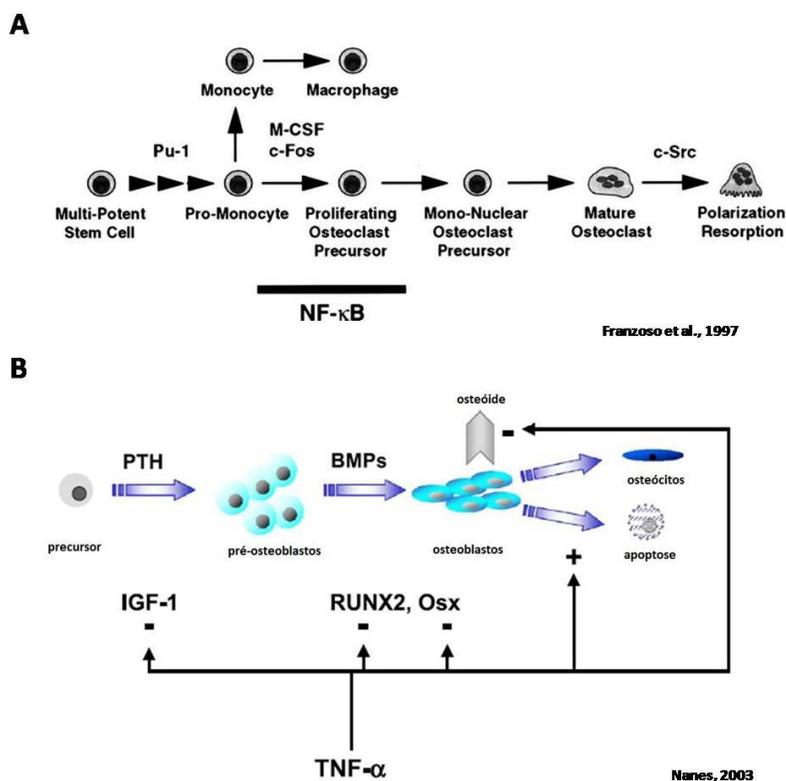


Figura 19. A. Modelo de desenvolvimento dos osteoclastos indicando os estágios em que o NF- κ B parece ser necessário (FRANZOSO et. al, 1997). **B.** Papel do TNF na diferenciação e sobrevivência dos osteoblastos. PTH e IGHF1 aumenta a população de células precursoras mesenquimais. BMP sinaliza a diferenciação. A expressão dos fatores de transcrição *RUNX2* e *Osx* são necessárias para o comprometimento do fenótipo osteoblástico. TNF inibe a diferenciação em osteoblastos pela supressão da expressão de *IGF-1*, *Runx2* e *Osx*. A apoptose de osteoblastos maduros é estimulada (NANES, 2003).

A via de sinalização TNF estimula a reabsorção óssea assim como inibe a formação do osso (figura 19 B). No primeiro caso, este estímulo é promovido pela produção de proteases (como as metaloproteinases) pelos osteoblastos e aumento da osteoclastogênese. No segundo caso, a inibição se dá pelo impedimento da diferenciação em osteoblastos através da regulação de genes relacionados à este mecanismos tais como: *COL1A1* (colágeno $\alpha 1$), *OC* (osteocalcin), *ALPL* (fosfatase alcalina), *RUNX2*, *Osx* (osterix), entre outros (NANES, 2003).

A proteína ARHGEF17, também chamada de p164-RhoGEF, foi identificada por Rumenapp et al. (2002), os quais caracterizaram está proteína como uma nova RhoGEF (*Rho guanine nucleotide exchange factor*). As GEFs (*guanine nucleotide exchange factor*) são

diretamente responsáveis pela ativação da família RhoGTPases catalizando a mudança de GDP para GTP em resposta a diversos estímulos extracelulares. A família das RhoGTPases contém proteínas regulatórias do citoesqueleto de actina que regulam a progressão do ciclo celular e transcrição gênica e tem sido implicada em processos celulares como a adesão, a migração, a fagocitose e a citocinese. Um dos membros desta família é a proteína RhoA (ROSSMAN; DER; SONDEK, 2005).

A proteína p164-RhoGEF (ARHGEF17) catalisa a mudança GDP/GTP de RhoA (RUMENAPP et al., 2002) e a expressão constitutiva de RhoA ativada, induz a diferenciação osteoblástica a partir das hMSCs (McBEATH et al., 2004, MEYERS et al., 2005).

A participação da via RhoGTPase-RhoGEF na osteoporose foi relatada por Mullin et al. (2008), os quais evidenciaram que polimorfismo dentro do gene *ARHGEF3* afeta a densidade dos ossos. Para identificar novos genes entre as RhoGTPases e RhoGEFs, Brazier et al. (2006) estabeleceram um perfil de expressão de famílias completas de RhoGTPases e RhoGEFs durante a osteoclastogênese e identificaram três novos genes com elevada expressão em osteoclastos, um RhoGTPase (*RhoU*) e dois RhoGEF (*Arhgef8* e *Dock5*).

Devido a importância da fosfatase alcalina na diferenciação osteogênica e a relação entre a expressão e a metilação do gene estabelecida por Locklin, Oreffo e Triffitti (1998), o gene *ALPL* foi selecionado para análise em nossos estudos.

A fosfatase alcalina é considerada um marcador específico de osteoblastos (MINGUELL; ERICES; CONGET, 2001). Estudos têm demonstrado que a expressão do gene *ALPL* inicia a partir do quarto dia de diferenciação osteogênica e diminui durante a fase de mineralização que ocorre a partir do décimo quarto ao vigésimo primeiro dia da diferenciação (KULTERER et al., 2007).

Locklin, Oreffo e Triffitti (1998), avaliaram o efeito da 5- α e da dexametasona na expressão da fosfatase alcalina em fibroblastos do estroma da medula óssea humano (HBM –

human bone marrow) e em células de linhagem de osteosarcoma humano (MG63 - células semelhantes a osteoblastos). Nas células HBM, a 5-aza sozinha não foi suficiente para induzir a expressão da fosfatase alcalina, enquanto que o tratamento com dexametasona manteve à atividade aumentada. No entanto, o tratamento com 5-aza seguido pelo tratamento com dexametasona aumentou a expressão acima do nível induzido pela dexametasona sozinha. Similares efeitos foram observados em células MG63, mas ao contrário das células HBM, a 5-aza sozinha resultou em um substancial aumento na expressão da fosfatase alcalina. Para os pesquisadores, isto indica que a redução na metilação é um importante passo na expressão da fosfatase alcalina mas não é o suficiente para indução da expressão nas células diferenciadas e que a metilação do gene da fosfatase alcalina é principal mecanismo de regulação gênica.

Considerando a presença da dexametasona entre os suplementos para a diferenciação osteogênica, os resultados obtidos em nossos estudos também demonstraram esta sinergia entre a 5-aza e a dexametasona. Na célula indiferenciada, a 5-aza não induziu a expressão do gene *ALPL*, mas na presença da dexametasona (durante a diferenciação), observou-se um maior nível de expressão do gene (figuras 15 e 16). No entanto, o seqüenciamento da sua ilha indica que este sinergismo não é devido a demetilação do gene *ALPL*. O seqüenciamento direto da ilha CpG nas células-tronco mesenquimais e nas células diferenciadas por sete dias, não revelou metilação do promotor do gene *ALPL*.

Embora a expressão do *ALPL* não tenha sido alterada após o tratamento durante a diferenciação da amostra D2, foi observado aumento na expressão após a diferenciação da CTM (figura 16). Portanto, o fato da 5-aza não ter potencializado esta expressão assim como não ter induzido a expressão do *ADFP* durante a expansão e dos genes *FBLN2* e *LAMB2* após a diferenciação, indica que o tratamento na amostra D2 pode não ter sido eficiente.

Nas células-tronco mesenquimais, dois genes tiveram a sua expressão fortemente induzida após os sete dias de estímulo para a diferenciação osteogênica, os genes *SAA2* e

MMP7. Em geral, a função destes dois genes esta relacionada com a estruturação da matriz extracelular.

O gene *SAA2* codifica para uma proteína que juntamente com outro membro da mesma família, o gene *SAA1*, formam a proteína do soro amilóide A (SAA). Este nome é um termo genérico para a família das proteínas sintetizadas durante resposta a fase aguda (KOVACEVIC et al., 2008). A expressão destes genes ocorre em vários tecidos normais, linhagens celulares e, como acontece com outros reagentes da fase aguda, o fígado é o maior sítio de expressão de *SAA* (URIELI-SHOVAL; LINKE; MATZNER, 2000).

Várias funções têm sido propostas para este gene. Entre elas o envolvimento no metabolismo e transporte de colesterol, na inibição da proliferação celular endotelial e de linfócitos, na indução da adesão, migração e na infiltração tecidual de monócitos, neutrófilos e linfócitos (URIELI-SHOVAL; LINKE; MATZNER, 2000).

KOVACEVIC et al. (2008), demonstraram que as linhagens de osteosarcoma humano MG-63 e SAOS-2 expressam a proteína SAA. Além disto, a expressão de *SAA1* estava presente nas CTMs isoladas da medula de pacientes com artrite, e abundantemente presente em CTM diferenciadas. A expressão de *SAA2* foi observada nas CTMs diferenciadas, semelhante a *SAA1*, porém estava presente nas células não diferenciadas somente em resposta a IL-1.

Os resultados encontrados em nossos experimentos revelam um aumento bastante expressivo de *SAA2* em ambas as amostras após os setes dias de diferenciação osteogênica. Esta expressão ainda foi mais acentuada na osteogênese após a o tratamento com 5-aza. Embora este gene não apresente ilha CpG e portanto o tratamento não exerce um efeito direto na sua expressão, este pode ser um efeito indireto através da ativação de outros genes. A diferença na expressão observada após o tratamento foi maior na amostra D1 do que na

amostra D2. Esta observação reforça a hipótese de que o tratamento nesta última amostra não foi eficiente.

A proteína SAA é capaz de induzir a transcrição de metaloproteinases em condrócitos e em fibroblastos sinovial apresentando um papel na degradação da matriz extracelular (MIGITA et.al., 1998; VALLON et.al., 2001). A SAA2 já foi demonstrada ser capaz de induzir a expressão de *MMP1* e *MMP13* em condrócitos humanos (VALLON et.al., 2001) e *MMP2* e *MMP3* em fibroblastos (MIGITA et.al., 1998). As *MMP13*, *MMP2* e adicionalmente *MMP14* participam ativamente na formação e remodelação do osso (PAGE-McCAW; EWALD; WERB, 2007).

A metaloproteinase *MMP7* foi o segundo gene com maior expressão após os sete dias de diferenciação em osteoblastos. Também conhecida como matrilisin, *MMP7* é fortemente induzida na mucosa epitelial de humanos e em linhagens de células pela exposição bacteriana (LÓPEZ-BOADO et al., 2000). Ela é também produzida constitutivamente em células de mieloma múltiplo, provavelmente participa na destruição óssea e metástase do tumor (BARILLÉ et al., 1999). A diminuição na expressão de *MMP7* parece contribuir para o envelhecimento acelerado das células mamárias epiteliais (BERTRAM; HASS, 2008).

As metaloproteinases (MMPs) compreendem uma família de enzimas que apresentam um papel na remodelação dos tecidos durante processos normais e patológicos e, portanto, a sua expressão é observada em uma variedade de tecidos neoplásicos mas também em muitos tecidos normais (WILSON; MATRISIAN, 1996).

As MMPs funcionam principalmente como enzimas que degradam componentes estruturais da matriz extracelular. A proteólise das MMPs cria espaços para a migração das células, produz fragmentos clivados de substrato específicos com atividades biológicas independentes, regula a arquitetura atuando na matriz extracelular e junções intercelulares e

pode ativar, desativar ou modificar a atividade de moléculas sinalizadoras, direta e indiretamente (PAGE-McCAW; EWALD; WERB, 2007).

Conclusões

5. Conclusão

Um das áreas da medicina regenerativa é a diferenciação das células-tronco na linhagem osteogênica para subsequente uso na engenharia de tecido ósseo e na cirurgia reconstrutiva. No entanto, o uso destas células depende principalmente da sua habilidade em alcançar a diferenciação osteogênica *in vitro*. Uma das limitações para este objetivo é a existência da variação individual entre os doadores assim como a variabilidade das células isoladas (de células progenitoras até células já inicialmente comprometidas para uma linhagem) devido aos métodos de isolamento ainda não muito específicos. Estas variações refletirão na capacidade das células em responder aos sinais osteogênicos, podendo portanto, comprometer o seu uso terapêutico.

A diferenciação osteogênica das células-tronco provavelmente envolve múltiplas vias de sinalização e muitos estudos procuram identificar fatores que participam desta via na tentativa de conhecer os mecanismos que governam a diferenciação e conseqüentemente obter um protocolo cada vez mais eficiente para minimizar as variações e assim alcançar o objetivo maior que é a aplicação terapêutica.

Neste contexto, os nossos resultados nos levam a concluir que:

- três observações indicam que de fato a hipometilação conduz à diferenciação das CTMs: (1) o aumento na expressão de genes que codificam para proteínas da matriz extracelular e que participam de processos de diferenciação (*FBLN2*, *LAMB2*, *SAA2* e *MMP7*); (2) o aumento na expressão de genes relacionados diretamente a diferenciação (*ADFP* e *ALPL*) e, (3) o perfil destas expressões após os sete dias de diferenciação em osteoblastos;

- o aumento da expressão dos genes *FBLN2*, *LAMB2*, *SAA2* e *MMP7* após os sete dias de diferenciação em osteoblastos revela a importância da abordagem do micro-ambiente na busca de uma melhor compreensão dos sinais envolvidos nas diferenciações celulares;

- o sequenciamento da ilha CpG do gene *FBLN2* mostrou a existência de metilação nesta região. A diminuição na densidade deste metilação, provocada pelo tratamento com 5-aza, favoreceu o aumento na expressão do gene, no entanto, a metilação não parece ser o principal mecanismo responsável pelo controle da expressão deste gene;

- os seqüenciamentos da ilha CpG dos genes *LAMB2*, *ADFP* e *ALPL* indicam que a metilação não controla a expressão destes genes;

- as variações de expressão observadas entre as amostras provavelmente são devidas ao fato de que na amostra D2 o tratamento com o agente demetilante não foi eficiente.

Referências

REFERÊNCIAS

ABDALLAH, B.M.; KASSEM, M. Human mesenchymal stem cells: from basic biology to clinical applications. **Gene Therapy**, vol. 15, p. 109-116, 2008.

ABDALLA, B.M.; JENSEN, C.H.; GUTIERREZ, G.; LESLIE, R.G.Q.; JENSEN, T.G.; KASSEM, M. Regulation of Human Skeletal Stem Cells Differentiation by Dlk1/Pref-1. **Journal of Bone and Mineral Research**, vol. 19, No. 5, p. 841-852, 2004.

ANTONITIS, P.; PAPAGIANNAKI, E.I.; KAIDOGLOU, A.; PAPAKONSTANTINOY, C. In vitro cardiomyogenic differentiation of adult human bone marrow mesenchymal stem cells. The role of 5-azacytidine. **Interactive CardioVascular and Thoracic Surgery**, vol. 6, p. 593–597, 2007.

BARILLE, S.; BATAILLE, R.; RAPP, M.J.; HAROUSSEAU, J.L.; AMIOT, M. Production of Metalloproteinase-7 (Matrilysin) by Human Myeloma Cells and Its Potential Involvement in Metalloproteinase-2 Activation. **The Journal of Immunology**, vol. 163, p. 5723–5728, 1999.

BERTRAM, C.; HASS, R. Matrix Metalloproteinase-7 and the 20S Proteasome Contribute to Cellular Senescence. **Science Signaling**, vol. 1, pt.1, 2008.

[BEZY, O.](#); [ELABD, C.](#); [COCHET, O.](#); [PETERSEN, R.K.](#); [KRISTIENSEN, K.](#); [DANI, C.](#); [AILHAUD, G.](#); [AMRI, E.Z.](#) Delta-interacting protein A, a new inhibitory partner of CCAAT/enhancer-binding protein beta, implicated in adipocyte differentiation. **Journal of Biological Chemistry**, vol. 280 (12), p. 11432-11438, 2005.

BIRD, A. The Essentials of DNA Methylation. **Cell**, vol. 70, p. 5-8, 1992.

BOYES, J.; BIRD, A. Repression of genes by DNA methylation depends on CpG density and promoter strength: evidence for involvement of a methyl-CpG binding protein. **The EMBO Journal**, vol. 11, no. 1, p. 327-333, 1992.

BOUWMEESTER, T.; BAUCH, A.; RUFFNER, H.; ANGRAND, P.O.; BERGAMINI, G.; CROUGHTON, K.; CRUCIAT, C.; EBERHARD, D.; GAGNEUR, J.; GHIDELLI, S.; HOPF, C.; HUHSE, B.; MANGANO, R.; MICHON, A.M.; SCHIRLE, M.; SCHLEG, J.; SCHWAB, M.; STEIN, M.A.; BAUER, A.; CASARI, G.; DREWES, G.; GAVIN, A.C.; JACKSON, D.B.; JOBERTY, G.; NEUBAUER, G.; RICK, J.; KUSTER, B.; FURGA, G.S.; A physical and functional map of the human TNF- α /NF- κ B signal transduction pathway. **Nature Cell Biology**, vol. 06, no. 2, p. 97-105, 2004.

BRAZIER, H.; STEPHENS, S.; ORY, S.; FORT, P.; MORRISON, N.; BLANGY, A. Expression Profile of RhoGTPases and RhoGEFs during RANKL-Stimulated Osteoclastogenesis: Identification of Essential Genes in osteoclasts. **Journal of Bone and Mineral Research**, vol. 21, no. 9, p. 1387-1398, 2006.

BUCKBINDER, L.; CRAWFORD, D.T.; QI, H.; KE, H.Z.; OLSON, L.M.; LONG, K.R.; BONNETTE, P.C.; BAUMANN, A.P.; HAMBOR, J.E.; GRASSER, W.A 3RD.; PAN, L.C.; OWEN, T.A.; LUZZIO, M.J.; HULFORD, C.A.; GEBHARD, D.F.; PARALKAR, V.M.; SIMMONS, H.A.; KATH, J.C.; ROBERTS, W.G.; SMOCK, S.L.; GUZMAN-PEREZ, A.; BROWN, T.A.; LI, M. Proline-rich tyrosine kinase 2 regulates osteoprogenitor cells and bone

formation, and offers an anabolic treatment approach for osteoporosis. **Proc. Natl. Acad. Sci U S A**, vol. 104 (25), p. 10619-10624, 2007.

BURLACU, A.; ROSCA, A.M.; MANIU, H.; TITORENCU, I.; DRAGAN, E.; JINGA, V.; SIMIONESCU, M. Promoting effect of 5-azacytidine on the myogenic differentiation of bone marrow stromal cells. **European Journal of Cell Biology**, vol. 87, p.173-184, 2008.

CAPLAN, A.I.; BRUDER, S.P. Mesenchymal stem cells: building blocks for molecular medicine in the 21st century. **TRENDS in Molecular Medicine**, vol. 7, no. 6, p. 259-264, 2001.

CARLO-STELLA, C.; GIANNI, M.A. Biology and clinical applications of marrow mesenchymal stem cells. **Pathologic Biology**, vol. 53: 162-164, 2005.

CHENG, L-C.; TAVAZOLE, M.; DOETSCH, F. Stem Cells: From Epigenetics to microRNAs. **Neuron**, vol. 46, p. 363-367, 2005.

CHO, H.H.; PARK, H.T.; KIM, Y.J.; BAE, Y.C.; SUH, K.T.; JUNG, J.S. Induction of Osteogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells by Histone Deacetylase Inhibitors. **Journal of Cellular Biochemistry**, vol. 96, p. 533-542, 2005.

DOMINICI, M.; BLANC, K.L.; MUELLER, I.; SLAPER-CORTENBACH, S.; MARINI, F.C.; KRAUSE, D.S.; DEANS, R.J.; KEATING, A.; PROCKOP, D.J.; HORWITZ, E.M. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, vol.8, no. 4, p. 315-317, 2006.

EISINGER, D.P.; SERRERO, G. Structure of the gene encoding mouse adipose differentiation-related protein (ADRP). **Genomics**, vol. 16, p. 638-644, 1993.

FRANZOSO, G.; CARLSON, L.; XING, L.; POLJAK, L.; SHORES, E.W.; BROWN, K.D.; LEONARDI, A.; TRAN, T.; BOYCE, B.F.; SIEBENLIST, U. Requirement for NF- κ B in osteoclast and B-cell development. **Genes and Development**, vol. 11, p. 3482–3496, 1997.

GROTHOS, S.; ZANNETTINO, A.C.W.; HAY, S.J.; SHI, S.; GRAVES, S.E.; KORTESIDIS, A.; SIMMONS, P.J. Molecular and cellular characterization of highly purified stromal stem cells derived from human bone marrow. **Journal of Cell Science**, vol. 116, p. 1827-1835, 2003.

GU, Y.C.; SOROKIN, L.; DURBEEJ, M.; HJALT, T.; JONSSON, J.I.; EKBLÖM, M. Characterization of Bone Marrow Laminins and Identification of α 5-Containing Laminins as Adhesive Proteins for Multipotent Hematopoietic FDCP-Mix Cells. **Blood**, vol. 93, no. 8, p. 2533-2542, 1999.

GU, Y.C.; KORTESMAA, J.; TRYGGVASON, K.; PERSSON, J.; EKBLÖM, P.; JACOBSEN, S.E.; EKBLÖM, M. Laminin isoform-specific promotion of adhesion and migration of human bone marrow progenitor cells. **Blood**, vol. 101, no. 3, p. 877-885, 2003.

HARADA, S.I.; RODAN, G.A. Control of osteoblast function and regulation of bone mass. **Nature**, vol. 423, p. 349-355, 2003.

HENG, B.C.; CAO, T.; STANTON, L.W.; ROBSON, P.; OLSEN, B. Strategies for Directing the Differentiation of Stem cells Into the Osteogenic Lineage In Vitro. **Journal of Bone and Mineral Research**, vol. 19, no. 9, p. 1379-1394, 2004.

HERGETH, S.P.; AICHER, W.K.; ESSL, M.; SCHREIBER, T.D.; SASAKI, T.; KLEIN, G. Characterization and functional analysis of osteoblast-derived fibulins in the human hematopoietic stem cells niche. **Experimental Hematology**, vol. 36, p. 1022-1034, 2008.

HEID, H.W.; MOLL, R.; SCHWETLICK, I.; RACKWITZ, H.R.; KEENAN, T.W. Adipophilin is a specific marker of lipid accumulation in diverse cell types and diseases. **Cell and Tissue Research**, vol. 249, p. 309-321, 1998.

JAISWAL, N.; HAYNESWORTH, S.E.; CAPLAN, A.I.; BRUDER, S.P. Osteogenic Differentiation of Purified, Culture-Expanded Human Mesenchymal Stem Cells In Vitro. **Journal of Cellular Biochemistry**, vol. 64, p. 295-312, 1997.

JAVASON, E.H.; BEGGS, K.J.; FLAKE, A.W. Mesenchymal stem cells: Paradoxes of passaging. **Experimental Hematology**, vol.32, p. 414-425, 2004.

KANG, M.I.; KIM, H.S.; JUNG, Y.C.; KIM, Y.H.; HONG, S.J.; KIM, M.K.; BAEK, K.H.; KIM, C.C.; RHYU, M.G. Transitional CpG Methylation Between promoters and Retroelements of Tissue-Specific Genes During Human Mesenchymal cell Differentiation. **Journal of Cellular Biochemistry**, vol. 102, p. 224-239, 2007.

KARSENTY, G.; WAGNER, E.F. Reaching a Genetic and Molecular Understanding of Skeletal Development. **Developmental Cell**, vol. 2, 389-406, 2002.

KASSEM, M.; KRISTIANSEN, M.; ABDALLAH, B.M. Mesenchymal Stem Cells: Cell Biology and Potential Use in Therapy. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, vol. 95, p. 209-214, 2004.

KASSEM, M.; ABDALLAH, B.M.; SAEED, H. Osteoblastic cells: differentiation and trans-differentiation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, vol. 473, p. 183-187, 2008.

KITAZAWA, S.; KITAZAWA, R. Epigenetic control of mouse receptor activator of NF-kappa B ligand gene expression. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, vol. 293 (1), p. 126-131, 2002.

KLESS, R.F.; SALASZNYK, R.M.; KINGSLEY, K.; WILLIAMS, W.A.; BOSKEY, A.; PLOPPER, G.E. Laminin-5 Induces Osteogenic Gene Expression in Human Mesenchymal stem cells through an ERK-dependent Pathway. **Molecular Biology of the Cell**, vol. 16, p. 881-890, 2005.

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

KONIECZNY, S.F.; EMERSON, C.P. 5-Azacytidine Induction of Stable Mesodermal Stem Cell Lineages from IOT1/2 Cells: Evidence for Regulatory Genes Controlling Determination. **Cell**, vol. 38, p. 791-800, 1984.

KOVACEVIC, A.; HAMMER, A.; STADELMEYER, E.; WINDISCHHOFER, W.; SUNDL, M.; RAY, A.; SCHWEIGHOFER, N.; FRIEDL, G.; WINDHAGER, R.; SATTLER, W.; MALLE, E. Expression of Serum Amyloid A Transcripts in Human Bone Tissues, Differentiated Osteoblast-Like stem Cells and Human Osteosarcoma Cell Lines. **Journal of Cellular Biochemistry**, vol. 103, p. 994-1004, 2008.

KUZNETSOV, S.A.; KREBSBACH, P.H.; SATOMURA, K.; KERR, J.; RIMINUCCI, M.; BENAYAHU, D.; ROBEY, P.G. Single-Colony Derived Strains of Human Marrow Stromal Fibroblasts Form Bone After Transplantation In Vivo. **Journal of Bone and Mineral Research**, vol. 12, no. 9, p. 1335-1347, 1997.

LEE, J.Y.; LEE, Y.M.; KIM, M.J.; CHOI, J.Y.; PARK, E.K.; KIM, S.Y.; LEE, S.P.; YANG, J.S.; KIM, D.S. Methylation of the Mouse *Dlx5* and *Osx* Gene Promoters Regulates Cell Type-specific Gene Expression. **Molecular and Cells**, vol. 22, no. 2, p. 182-188, 2006.

LI, L.C.; DAHIYA, R. MethPrimer: designing primers for methylation PCRs. **Bioinformatics**, vol. 18, p. 1427-1431, 2002.

LOCKLIN, R.M.; OREFFO, R.O.C.; TRIFFITT, J.T. Modulation of osteogênica differentiation in human skeletal cells *in vitro* by 5-azacytidine. **Cell Biology International** vol. 22, no. 3, p. 207-215, 1999.

LÓPEZ-BOADO, Y.S., WILSON, C.L.; HOOPER, L.V.; GORDON, J.I.; HULTGREN, S.J.; PARKS, W.C. Bacterial Exposure Induces and Activates Matrilysin in Mucosal Epithelial Cells. **The Journal of Cell Biology**, vol. 148, no. 6, p. 1305-1315, 2000.

MCBEATH, R.; PIRONE, D.M.; NELSON, C.M.; BHADRIRAJU, K.; CHEN, C.S. Cell Shape, Cytoskeletal Tension, and RhoA Regulate Stem Cell Lineage Commitment. **Developmental Cell**, vol. 6, p. 483-495, 2004.

MEYERS, V.E.; ZAYZAFOON, M.; DOUGLAS, J.T.; MCDONALD, J.M. RhoA and Cytoskeletal Disruption Mediate Reduced Osteoblastogenesis and Enhanced Adipogenesis of Human Mesenchymal Stem Cells in Modeled Microgravity. **Journal of Bone and Mineral Research**, 20(10), p. 1858-1866, 2005.

MIGITA, K.; KAWABE, Y.; TOMINAGA, M.; ORIGUCHI, T.; AOYAGI, T.; EGUCHI, K. Serum amyloid A protein induces production of matrix metalloproteinases by human synovial fibroblasts. **Laboratory Investigation**, 78(5), p. 535-539, 1998.

MINGUELL, J.J.; ERICES, A.; CONGET, P. Mesenchymal Stem Cells. *Experimental Biology and Medicine* vol. 226(6), p. 507-520, 2001.

MULLIN, B.H.; PRINCE, R.L.; DICK, I.M.; HART, D.J.; SPECTOR, T.D.; DUDBRIGE, F.; WILSON, S.G. Identification of a Role for the *ARHGEF3* Gene in Postmenopausal osteoporosis. **The American Journal of Human Genetics**, vol. 82, p. 1262-1269, 2008.

NANES, M.C. Tumor necrosis factor- α : molecular and cellular mechanisms in skeletal pathology. **Genes**, vol. 321, p. 1-15, 2003.

PAGE-MCCAW, A.; EWALD, A.J.; WERB, Z. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodeling. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, vol. 8, p. 221-233, 2007.

PFAFFL, M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, vol. 29, no. 9, p. 2002-2007, 2001.

PITTENGER, M.F.; MACKAY, A.M.; BECK, S.C.; JAISWAL, R.K.; DOUGLAS, R.; MOSCA, J.D.; MOORNAM, M.A.; SIMONETTI, D.W.; GRAIG, S.; MARSHAK, D.R. Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells. **Science**, vol. 284, p.143-147, 1999.

ROSSMAN, K.L.; DER, C.J.; SONDEK, J. GEF means go: turning on RHO GTPases with guanine nucleotide-exchange factors. **Molecular Cell Biology**, vol. 6, p. 167-180, 2005.

RUMENAPP, U.; BLOMQUIST, A.F.; WITTINGHOFER, B.; JAKOBS, K.H.; WIELAND, T. A mammalian Rho-specific guanine-nucleotide exchange factor (p164-RhoGEF) without a pleckstrin homology domain. **Biochemical Journal**, vol. 366, p. 721-728, 2002.

SANES, J.R.; ENGVALL, E.; BUTKOWSKI, R.; HUNTER, D.D. Molecular Heterogeneity of Basal Laminae: Isoforms of Laminin and Collagen IV at the Neuromuscular Junction and Elsewhere. **The Journal of Cell Biology**, vol. 111, p. 1685-1699, 1990.

SASAKI, T.; MANN, K.; MURPHY, G.; CHU, M.L.; TIMPL, R. Different susceptibilities of fibulin-1 and fibulin-2 to cleavage by matrix metalloproteinases and other tissue proteases.

European Journal of Cell Biology, vol. 240, p. 427-434, 1996a.

SASAKI, T.; WIEDEMANN, H.; MATZNER, M.; CHU, M.L.; TIMPL, R. Expression of fibulin-2 by fibroblasts and deposition with fibronectin into a fibrillar matrix. **Journal of Cell**

Science, vol. 109, p. 2895-2904, 1996b.

SCHWARZ, E.M.; LU, A.P.; GOATER, J.J.; BENZ, E.B.; KOLLIAS, G.; ROSIER, R.N.; PUZAS, J.E.; O'KEEFE, R.J. Tumor Necrosis Factor- α /Nuclear Transcription Factor- κ B Signaling in Periprosthetic Osteolysis. **Journal of Orthopedic Research**, vol. 18, p. 472-480, 2000.

SHEIKHNEJAD, G.; BRANK, A.; CHRISTMAN, J.K.; GODDARD, A.; ALVAREZ, E.; FORD, H.; MARQUEZ, V.E.; MARASCO, C.J.; SUFRIN, J.R.; O'GARA, M.; CHENG, X. Mechanism of Inhibition of DNA (Cytosine C5)-Methyltransferases by Oligodeoxyribonucleotides Containing 5,6-Dihydro-5-azacytosine. **Journal Molecular Biology**, vol. 285, p. 2021-2034, 1999.

SHIOTA, K.; KOGO, Y.; OHGANE, J.; IMAMURA, T.; URANO, A.; NISHINO, K.; TANAKA, S.; HATORRI, N. Epigenetic marks by DNA methylation specific to stem, germ and somatic cells in mice. **Genes to Cells**, vol. 7, p. 961-969, 2002.

SIDDAPPA, R.; FERNANDES, H.; LIU, J.; BLITTERSWIJK, C.; BOER, J. The Response of Human Mesenchymal Stem Cells to Osteogenic Signals and its Impact on Bone Tissue Engineering. **Current Stem Cell Research & Therapy**, vol. 2, p. 209-220, 2007.

SIDDAPPA, R.; LICHT, R.; BLITTERSWIJK, C.; BOER, J. Donor Variation and Loss of Multipotency during In Vitro Expansion of Human Mesenchymal Stem Cells for Bone Tissue Engineering. **Journal of Orthopaedic Research**, vol. 25, p. 1029-1041, 2007.

SILLER, U.; SEIFFERT, M.; PUCH, S.; RICHARDS, A.; TOROKO-STORB, B.; MULLER, C.A.; SOROKIN, L.; KLEIN, G. Characterization and functional analysis of laminin isoforms in human bone marrow. **Blood**, vol. 96, no. 13, p. 4194-4203, 2000.

SULLIVAN, C.H.; NORMAN, J.T.; BORRÁS, T.; GRAINGER, R.M. Developmental Regulation of Hypomethylation of δ -Crystallin Genes in Chicken Embryo Lens Cells. **Molecular and Cellular Biology**, vol. 9, no. 7, p. 3132-3135, 1989.

TAYLOR, S.M.; JONES, P.A. Multiple New Phenotypes Induced in IOT^{1/2} and 3T3 Cells Treated with 5-Azacytidine. **Cell**, vol. 17, p. 771-779, 1979.

TSUDA, T.; WANG, H.; TIMPL, R.; CHU, M.L. Fibulin-2 Expression Marks Transformed Mesenchymal Cells in Developing Cardiac Valves, Aortic Arch Vessels, and Coronary Vessels. **Developmental Dynamics**, vol. 222, p. 89-100, 2001.

TURKER, M.S. Gene silencing in mammalian cells and the spread of DNA methylation. **Oncogene**, vol. 21, p. 5388-5393, 2002.

URIELI-SHOVAL, S.; LINKE, R.P.; MATZNER, Y. Expression and function of serum amyloid A, a major acute-phase protein, in normal and disease states. **Current Opinion in Hematology**, vol. 7, p.64–69, 2000.

VALLON, R.; FREULER, F.; TSEDU, N.D.; ROBEVA, A.; DAWSON, J.; WENNER, P.; ENGELHARDT, P.; BOES, L.; SCHNYDER, J.; TSCHOPP, C.; URFER, R.; BAUMANN, G. Serum Amyloid A (apoSAA) Expression Is Up-Regulated in Rheumatoid Arthritis and Induces Transcription of Matrix Metalloproteinases. **The Journal of Immunology**, vol. 166, p. 2801–2807, 2001.

VOGEL, W.; KANZ, L.; BRUGGER, W. Expression of Laminin β 2 Chain in Normal Human Bone Marrow. **Blood**, 94(3), p. 1143-1145, 1999.

WU, H.; SUN, Y.E. Epigenetic Regulation of Stem Cell Differentiation. **Pediatric Research**, vol. 59, no. 4, p. 21R-25R, 2006.

YAMASHITA, S.; TSUJINO, Y.; MORIGUCHI, K.; TATEMATSU, M.; USHIJIMA, T. Chemical genomic screening for methylation silenced genes in gastric cancer cell lines using 5-aza-2'-deoxycytidine treatment and oligonucleotide microarray. **Cancer Science**, vol. 97, no. 1, p. 64-71, 2006.

[YANG, R.Z.](#); [LEE, M.J.](#); [HU, H.](#); [POLLIN, T.I.](#); [RYAN, A.S.](#); [NICKLAS, B.J.](#); [SNITKER, S.](#); [HORENSTEIN, R.B.](#); [HULL, K.](#); [GOLDBERG, N.H.](#); [GOLDBERG, A.P.](#); [SHULDINER, A.R.](#); [FRIED, S.K.](#); [GONG, D.W.](#) Acute-phase serum amyloid A: an inflammatory adipokine

and potential link between obesity and its metabolic complications. **PLoS Med**, vol. 3(6), p. 884-894, 2006.

YAO, M.; HUANG, Y.; SHIOI, K.; HATTORI, K.; MURAKAMI, T.; NAKAIGAWA, N.; KISHIDA, T.; NAGASHIMA, Y.; KUBOTA, Y. Expression of Adipose Differentiation-Related Protein: A Predictor of Cancer-Specific Survival in Clear Cell Renal Carcinoma. **Clinical Cancer Research**, 13(1), p. 152-160, 2007.

ZAGO, M.A.; DIMAS, T.C. (2006) Células-tronco: a nova fronteira da medicina. São Paulo: **Atheneu**, 245 p.

ZHANG, H.Y.; CHU, M.L.; PAN, T.C.; SASAKI, T.; TIMPL, R.; EKBLOM, P. Extracellular Matrix Protein Fibulin-2 is Expressed in the Embryonic Endocardial Cushion Tissue and is a Prominent Component of Valves in Adult Heart. **Developmental Biology**, vol. 167, p. 19-26, 1995.

ZHANG, H.Y.; TIMPL, R.; SASAKI, T.; CHU, M.L.; EKBLOM, P. Fibulin-1 and Fibulin-2 Expression During Organogenesis in the Developing Mouse Embryo. **Developmental Dynamics**, vol. 205, p. 348-364, 1996.

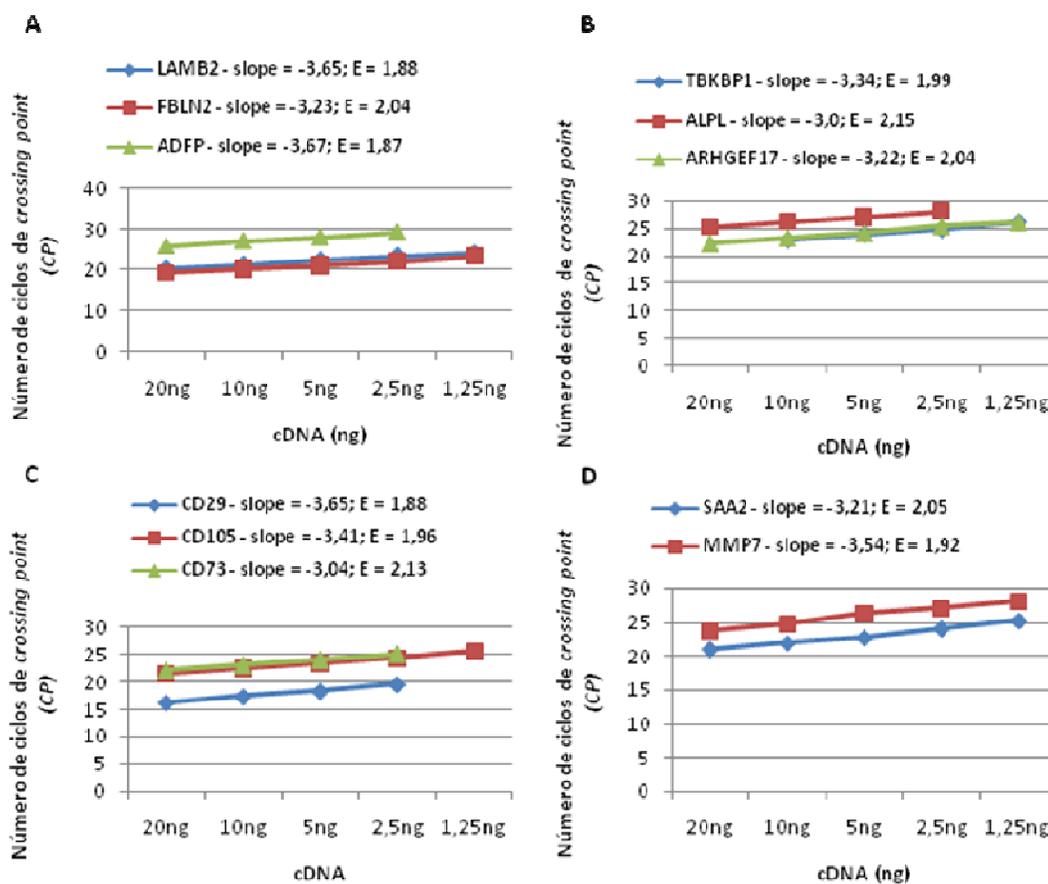
Apêndices

APÊNDICE I

Relação dos *primers* utilizados no qRT-PCR

Gene	Primer forward	Primer reverse
<i>GAPDH</i>	ACC CAC TCC TCC ACC TTT GA	CTG TTG CTG TAG CCA AAT TCG T
<i>PRT</i>	GAA CGT CTT GCT CGA GAT GTG A	TCC AGC AGG TCA GCA AAG AAT
<i>TUBA1C</i>	TCA ACA CCT TCT TCA GTG AAA CG	AGT GCC AGT GCG AAC TTC ATC
<i>FBLN2</i>	CCA GGA AGC CGC AAG TTC T	CAA GTC TCG ATC AGG TCC TT
<i>LAMB2</i>	AAC GGG CAG GAA ATA GTC TG	ACC GTC TGG TAC TGA TCA CC
<i>ADFP</i>	TGT GTG TGA GAT GGC AGA GA	CTT ACA GGC ATA GGT ATT GGC
<i>ALPL</i>	TGG AGC TCC AGA AGC TCA AC	AAC TTG TCC ATC TCC AGC CT
<i>TBKBP1</i>	GAA ATC AAG GAT GGC TCC CT	GGA TCA TCT CTC CAA GCT GT
<i>ARHGEF17</i>	CCT CAA TGC AAA GGA TGC TG	TGA TCA TGA GGT CAG ACA GC
<i>SAA2</i>	CGG CTC AGA CAA ATA CTT CC	GCC TGT GAG TCT CTG GAT AT
<i>MMP7</i>	GAG TGC CAG ATG TTG CAG AA	CGA TCC ACT GTA ATA TGC GG
<i>CD105</i>	CAA TGC CAT CCT TGA AGT CC	GCC AGG TGC CAT TTT GCT TG
<i>CD73</i>	AAA GTG AGG GGT GTG GAC GT	GCC CAT CAT CAG AAG TGA CT
<i>CD29</i>	ACT CAG ATC CAA CCA CAG CA	CAG GTC CAT AAG GTA GTA G

APÊNDICE II
Determinação da eficiência do PCR em tempo Real



A. Genes CTM-T X CTM-C. **B.** Genes DIF7-T X DIF7-C. **C.** Genes da DIF7-C X CTM-C. **D.** Genes marcadores da superfície da CTM. Os valores do CP e a concentração de cDNA foram usados para calcular o *slope* (média \pm S; n = 3). A eficiência foi calculada de acordo a equação: $E = 10^{[-1/slope]}$ (Pfaffli, 2001).

APÊNDICE III
Sequências dos *primers* utilizados para o *nested-PCR*

<i>Primers Externos</i>				
Gene	Forward	Reverse	pb	TA
<i>FBLN2</i>	AGG TAT ATG TAG TAG TAG TG	AAA AAA ATA AAA ACC CAA AAC	863	46
<i>LAMB2</i>	TGA GTT GAT GGT AAT TTT TA	CCT ACC ATC AAT TCC ACA A	669	49
<i>ALPL</i>	GGT GTA GAG TTA GAG GTG TA	CTA CCA TTA AAA TTC AAC CA	742	50
<i>Primers Internos</i>				
Gene	Forward	Reverse	pb	TA
<i>FBLN2</i>	TTT TAT AAT GTG TTT AAG GT	CAT CTA TAC ACT AAA TC	654	44,2
<i>LAMB2</i>	TGG TTT AGA GTT GGA GAT TT	CCC TCC CTC TTT CCC TTA AA	517	51,9
<i>ALPL</i>	GAT AGA GAT AGA GAG ATA GG	ATA CAA AAA AAA ATA AAC CA	683	46,8

Pb, pares de bases do fragmento amplificado; TA, temperatura de anelamento

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](#)