

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA

ADRIANE FEIJÓ EVANGELISTA

**Redes de regulação transcricional evidenciam vias de carcinogênese
durante a diferenciação osteoblástica de células-tronco
mesenquimais**

Ribeirão Preto

2009

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

ADRIANE FEIJÓ EVANGELISTA

**Redes de regulação transcricional evidenciam vias de carcinogênese
durante a diferenciação osteoblástica de células-tronco
mesenquimais**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas

Área de concentração: Genética
Orientador: Prof. Dr. Geraldo A. S. Passos

Ribeirão Preto

2009

Evangelista, Adriane Feijó

Perfil da expressão gênica revela interação entre genes envolvidos com a carcinogênese durante a diferenciação de células-tronco mesenquimais humanas em osteoblastos.

Ribeirão Preto, 2009

157p. 30cm

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP, Área de Concentração: Genética.

Orientador: Passos, Geraldo Aleixo da Silva

1. cDNA microarrays 2. Células tronco mesenquimais 3. Redes Gênicas

FOLHA DE APROVAÇÃO

Adriane Feijó Evangelista

Redes de regulação transcricional evidenciam vias de carcinogênese durante a diferenciação osteoblástica de células-tronco mesenquimais

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Mestre.
Área de concentração: Genética

Aprovado em: __/__/____

BANCA EXAMINADORA

Prof.Dr.: _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof.Dr.: _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof.Dr.: _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Dedico Especialmente este Trabalho

Aos meus pais Laércio e Rita, pelo exemplo de amor e superação, tão marcante em minha vida.

Ao meu irmão Renato, pelo apoio incondicional ao longo dessa jornada.

Ao meu noivo Hélio, que muito me motivou, principalmente na etapa final deste trabalho.

Ao meu tio Carlos Alberto (*in memoriam*), que tanto me incentivou a lutar pelos meus sonhos.

Agradecimentos

Agradeço especialmente ao meu orientador, **Prof. Dr. Geraldo Aleixo da Silva Passos Jr.**, pela oportunidade. Obrigada pela confiança, incentivo e por todos os ensinamentos.

Aos amigos do laboratório de Imunogenética Molecular: **Cristina, Márcia, Claudia, Danielle, Guilherme, Thais, Paula, Shirlei, Deyse, Aline, Natália e Fernando**. Um agradecimento em especial ao grupo de células-tronco: **Vanessa, Janaína, Rayana e Glauce**.

Aos docentes: **Dra. Karina Fitipaldi Bombonato-Prado, Dr. Adalberto Rosa, Dr. Paulo Tambasco de Oliveira, Dra. Elza Tiemi Sakamoto-Hojo e Dra. Silvana Guiliatti** pela colaboração para a realização deste trabalho.

Aos profissionais da equipe de Transplante de Medula Óssea (TMO) do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto, especialmente à **Dra. Belinda Pinto Simões** e aos profissionais da equipe de Obstetrícia da Santa Casa de Ribeirão Preto, pela concessão de material para a pesquisa.

Aos docentes pós-graduandos e funcionários do Departamento de Genética. Em especial agradeço ao coordenador **prof. Dr. Ademilson Espencer Egea Soares** e às secretárias **Susie e Maria Aparecida** pela dedicação.

Aos amigos do laboratório de Bioinformática, em especial ao **Luciano Bernardes**, pela imensa ajuda e paciência. Aos amigos do Bloco A do depto. de Genética, em especial à **Ana Durvalina Bontorim**, pelo apoio concedido durante a validação do trabalho, pelo companheirismo e apoio.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e o Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro que possibilitou o desenvolvimento desse projeto.

EVANGELISTA, A. F. **Redes de regulação transcricional evidenciam vias de carcinogênese durante a diferenciação osteoblástica de células-tronco mesenquimais.** 2009. 157p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

RESUMO

Estudos têm mostrado a possibilidade da ocorrência de plasticidade carcinogênica em células tronco, nas quais certo número de genes ativados no processo de diferenciação normal poderia estar envolvidos com a carcinogênese. A participação de elementos genéticos envolvidos com renovação tecidual e/ou diferenciação de células-tronco poderia ser uma das causas da origem do cancer a partir de células tronco adultas. Para testar essa hipótese, primeiramente padronizamos um sistema-modelo no qual células-tronco mesenquimais humanas (MSC) de duas fontes diferentes (medula óssea ou cordão umbilical) foram isoladas, cultivadas e diferenciadas *in vitro* sobre estímulos químicos com beta-glicerofosfato, dexametazona e ácido ascórbico. Em segundo lugar, estudamos os perfis de expressão gênica em grande escala durante o processo de diferenciação (24 h a 21 dias) dessas células utilizando o método de cDNA microarrays. Análise de dados utilizando programas de bioinformática dedicados a microarrays como o Cluster-Tree View permitiu identificar assinaturas de expressão gênica particulares de células MSC controle e daquelas em diferenciação. Para termos acesso às possíveis interações entre os genes expressos e envolvidos com o processo carcinogênico, reanalizamos os dados utilizando o programa GeneNetwork, o que permitiu a reconstrução de redes transcricionais a partir dos dados atuais de microarrays. Foram comparadas células MSC indiferenciadas com aquelas em diferenciação *in vitro* durante os tempos de 24h, 48h e 7 dias. Com esses dados,

reconstruímos redes de regulação transcricionais. As então chamadas “redes gênicas” permitiram identificar aqueles nós gênicos particulares e comuns, dependendo da origem das células tronco (medula óssea ou cordão umbilical), todos envolvidos com carcinogênese. Dentre os nós gênicos comuns, foi possível identificar aqueles que mostraram grande número de interações como PRKDC e GNG12. Dentre os nós exclusivos de MSC de medula óssea foram identificados os genes ALCAM e TP53. Aqueles que identificaram as células MSC de cordão umbilical foram NRCAM e PI3K1. Todos esses nós gênicos são considerados como elementos importantes no controle da carcinogênese. Além disso, a identificação de seqüências que interagem com fatores de transcrição que participam das redes gênicas obtidas reforça a possibilidade da ocorrência das interações propostas. Esses resultados permitem uma idéia panorâmica do mecanismo de controle observado nas MSC os quais estão envolvidos com a diferenciação normal e com a carcinogênese em dois níveis; 1) mecanismo de interação transcricional entre mRNAs e 2) seus elementos genéticos reguladores (fatores de transcrição). Essas observações mostram a participação de elementos genéticos (mRNAs e fatores de transcrição) os quais dependendo do controle fino da cascata de interações poderão decidir o destino das células tronco à diferenciação normal ou ao câncer.

Palavras chave: célula-tronco mesenquimal, diferenciação osteogênica, câncer, redes transcricionais gênicas, expressão gênica.

EVANGELISTA, A. F. **Transcriptional gene networks pinpoint carcinogenic pathways during osteoblastic differentiation of mesenchymal stem cells.** 2009. 157p. Master's Dissertation– Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

ABSTRACT

Studies have showed the possibility of carcinogenic plasticity in adult stem cells in which a number of genes activated in normal cellular differentiation process might be involved in carcinogenesis. The participation of genetic elements involved with normal self-renewal and/or differentiation of stem cells might be one of causes of cancer origin from adult stem cells. To test this hypothesis we firstly setup a model-system in which human mesenchymal stem cells (MSC) from two different origins (bone-marrow or umbilical cord) were isolated, cultured and differentiated *in vitro* under chemical stimuli with beta-glycerophosphate, dexamethazone and ascorbic acid. Secondly, the large scale gene expression profile during the differentiation process (24h to 21 days in culture) of these cells was studied by using the cDNA microarray method. Data analysis using dedicated microarray bioinformatics programs as SAM (significance analysis of microarrays) and Cluster-Tree View have permitted to identify particular expression signatures identifying control MSC or differentiating cells. In order to assess the possible interactions among the expressed genes involved in the carcinogenic process, we reanalyzed the data using the GeneNetwork program allowing reconstructing transcriptional networks from actual microarray data. Were analyzed the expression of transcripts (mRNAs) involved in carcinogenic pathways. Were compared undifferentiated MSC with *in vitro* differentiating cells in time points of 24h, 48h and 7 days. With these data, we reconstructed transcriptional regulation networks. The so-called gene networks allowed identifying those particular or common gene nodes depending

on cellular origin (bone marrow or umbilical cord MSC), all involved with carcinogenesis. Among the common gene nodes, it was possible to identify those featuring large number of interactions such as PRKDC and GNG12. Among the particular nodes exclusive for bone marrow MSC were identified the genes ALCAM and TP53. Those identifying umbilical cord MSC were NRCAM and PI3K1. All these gene nodes are considered as important elements controlling carcinogenesis. Moreover, the identification of sequences interacting with transcription factors participating in the gene networks obtained, reinforce the possibility for the occurrence of the proposed interactions. These results allow a panoramic idea for the controlling mechanism found in mesenchymal stem cells involved with normal differentiation and carcinogenesis at two levels; 1) transcriptional interaction mechanism between mRNAs and 2) their genetic regulatory elements (transcription factors). These observations show the participation of genetic elements (mRNAs and transcription factors), which depending on the fine cascade control may decide the stem cell fate to normal differentiation or cancer.

Key words: mesenchymal stem cells, osteogenic differentiation, cancer, gene networks and gene expression.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1. Esquema comparando as divisões simétricas que ocorrem na maioria dos tipos celulares e nas células-tronco embrionárias; e a divisão celular assimétrica observada nas células-tronco adultas. Fonte: SELL, 2004 26
- Figura 2. Esquema indicativo das vias canônicas envolvidas com o câncer identificadas em células-tronco. Fonte: TYSNES & BJERKVIG, 2007 27
- Figura 3. Modelo teórico da interação das quatro vias para a manutenção do balanço entre a auto-renovação e o câncer em uma célula tronco. Fonte: Liu *et al.* 2005 28
- Figura 4. Esquema indicativo das fases da osteogênese, bem como os antígenos de superfície característicos de cada etapa. Fonte: BRUDER *et al.* 1997 30
- Figura 5. Esquema representativo dos processos moleculares envolvendo as etapas de desenvolvimento, progressão e metástase do osteosarcoma a partir das MSCs. PAPACHRISTOU; PAPAVALASSILOU, 2007 33
- Figura 6. Esquema mostrando o uso dos microarrays. Fonte: DUGGAN, 1999 34
- Figura 7. Esquema dos principais tipos de delineamento experimental para microarrays. A, B e C- amostras controle; A', B' e C' - amostras teste; R – pool de RNA de Referência 62
- Figura 8. Imunofluorescência de células tronco mesenquimais. Fosfatase alcalina aparece em vermelho (anti-hALP); citoesqueleto aparece em verde e foi marcado com faloidina; núcleo aparece em azul e foi marcado com DAPI. (A) células de cordão umbilical indiferenciada; (B) células de cordão umbilical com 7 dias de indução osteogênica; (C) células de medula óssea indiferenciada; (D) células de medula óssea com 7 dias de indução osteogênica. Microscopia de fluorescência 40X 78
- Figura 9. Proliferação celular de células tronco mesenquimais em cultura após 7, 14 e 21 dias de indução osteogênica. (A) células de cordão umbilical, (B) células de medula óssea cultivadas em meio mínimo não osteogênico (MEM) ou de diferenciação (MTS). Análise estatística Mann-Whitney ($p \leq 0.05$) 79
- Figura 10. Viabilidade de células tronco mesenquimais em cultura após 7, 14 e 21 dias de indução osteogênica. (A) células de cordão umbilical, (B) células de medula óssea cultivadas em meio mínimo não osteogênico (MEM) ou de diferenciação (MTS). Análise estatística Mann-Whitney ($p \leq 0.05$). *Diferença estatística com $p=0,004$ somente para o grupo de células do cordão umbilical no período de 21 dias 80
- Figura 11. Quantidade de proteínas totais ($\mu\text{g}/10^4$ células) em células tronco mesenquimais de cordão umbilical (A) e medula óssea (B) obtidas após 7, 14 e 21 dias em meio mínimo (MEM) ou em meio de diferenciação (MTS). Análise estatística de Mann-Whitney ($p \leq 0.05$) 80

Figura 12. Atividade de fosfatase alcalina em células tronco mesenquimais após 7, 14 e 21 dias de indução osteogênica. (A) células do cordão umbilical, (B) células de medula óssea cultivadas em meio mínimo (MEM) ou meio de diferenciação (MTS). Análise estatística de Mann-Whitney ($p \leq 0.05$)	81
Figura 13. Coloração pelo vermelho de alizarina. A matriz mineralizada aparece em vermelho. (A) células de cordão umbilical indiferenciadas; (B) células de cordão umbilical com 21 dias de indução osteogênica; (C) células de medula óssea indiferenciadas; (D) células de medula óssea com 21 dias de indução osteogênica. Microscopia de contraste de fase 40X	82
Figura 14. Eletroforese em gel de agarose corado com brometo de etídeo para avaliação da integridade das amostras de RNA provenientes das linhagens que compõem o <i>pool</i> de referência.....	83
Figura 15. Eletroforese em gel de agarose corado com brometo de etídeo para avaliação da integridade das amostras de RNA total provenientes das células tronco de cordão umbilical (A) e de medula óssea (B)	84
Figura 16. Expressão gênica avaliada por RT-PCR semi-quantitativa em cordão umbilical (1) e medula óssea (2). A expressão dos genes ALPL (B), COL1A1 (C), RUNX2 (D), SPP1 (E), BGLAP(F) foram avaliadas em amostras de cDNA de células-tronco indiferenciadas (0h) e células em diferenciação in vitro após 24 h, 48 h e 7 dias	85
Figura 17. Localização do sítio de ligação para o fator de transcrição RUNX2-CREB (YGYGGTY) na região upstream (0 a -1000 pb a partir do ATG) dos genes marcadores da osteogênese. A marcação para cima da linha representa a ligação na fase de leitura +1, enquanto abaixo da sequência representada indica orientação -1.....	86
Figura 18. Análise da qualidade dos produtos de PCR dos clones de cDNAs humanos IMAGE. Eletroforese em gel de agarose 1% da amplificação PCR e purificação dos insertos dos genes selecionados da biblioteca de cDNA IMAGE. Banda única (A) representa amplificação específica, banda dupla (B), inespecífica e ausência de banda (C) representa falha no processo de amplificação	87
Figura 19. Heatmap construído por clusterização hierárquica supervisionada (Cluster &TreeView) a partir dos valores das medianas das lâminas de cada tempo de diferenciação osteogênica em células-tronco mesenquimais provenientes de cordão umbilical (UC) e de medula óssea (BM).	90
Figura 20. Rede de interações transcricionais durante a diferenciação de células tronco de cordão umbilical (0 a 7 dias) gerada pelo programa <i>GeneNetwork</i>	92
Figura 21. Rede de interações transcricionais durante a diferenciação de células tronco de medula óssea (0 a 7 dias) gerada pelo programa <i>GeneNetwork</i>	93
Figura 22: Esquema representativo das principais interações das redes transcricionais geradas durante a diferenciação de células tronco de cordão umbilical.	99

Figura 23: Esquema representativo das principais interações das redes transcricionais geradas durante a diferenciação de células tronco de cordão umbilical.	100
Figura 24. Representação na forma de logos das 10 sequências consenso (motifs) com melhor Evalue entre 30 nós gênicos, deduzidas pela ferramenta MEME. Esses padrões de 10 pb representam sítios putativos de ligação para fatores de transcrição que podem estar envolvidos na regulação das redes transcricionais geradas.	101
Figura 25. Gráfico dos valores de expressão relativa (QR) do gene PRKDC em células tronco derivadas de medula óssea (BM) e de cordão umbilical (UC).	105
Figura 26. Gráfico dos valores de expressão relativa (QR) para o gene GNG12 em células tronco derivadas de medula óssea (BM) e células tronco derivadas de cordão umbilical (UC).	106
Figura 27. Gráfico dos valores de expressão relativa (QR) para o gene MINA em células tronco derivadas de medula óssea (BM) e células tronco derivadas de cordão umbilical (UC).	106
Figura 28. Representação esquemática da sinalização das integrinas. Fonte: Banco de dados PathwayCommon: www.pathwaycommon.org	116
Figura 29. Interação entre transcritos da via WNT canônica e não-canônica. Fonte: www.uniscience.org	119
Figura 30. Esquema representativo da interação do oncogene RAS com determinadas vias de sinalização celular no balanço proliferação vs diferenciação de células-tronco. Fonte: Chakrabarty & Heumann, 2008.	121
Figura 31. Sinais extracelulares e fatores de interação com o RUNX2/CBFA1 que propiciam a diferenciação osteoblástica. Fonte: SCHROEDER et al., 2005	123

LISTA DE TABELAS

Tabela I. Caracterização fenotípica das CSCs. Fonte: Tysnes & Bjerkvig, 2007	24
Tabela II. Oligonucleotídeos <i>primers</i> e suas respectivas temperaturas de anelamento.....	58
Tabela III. Interações envolvendo o gene GNG12 durante a diferenciação células tronco de cordão umbilical (0 a 7 dias).....	94
Tabela IV. Interações envolvendo o gene PRKDC durante a diferenciação de células tronco de cordão umbilical (0 a 7 dias).....	95
Tabela V. Interações envolvendo o gene PIK3R1 durante a diferenciação de células tronco de cordão umbilical (0 a 7 dias).....	96
Tabela VI. Interações envolvendo o gene NRCAM durante a diferenciação de células tronco de cordão umbilical (0 a 7 dias)	96
Tabela VI. Interações envolvendo o gene GNG12 durante a diferenciação de células tronco de medula óssea (0 a 7 dias).....	97
Tabela VIII. Interações envolvendo o gene PRKDC durante a diferenciação de células tronco de medula óssea (0 a 7 dias).....	97
Tabela IX. Interações envolvendo o gene ALCAM durante a diferenciação de células tronco de medula óssea (0 a 7 dias).....	98
Tabela X. Identificação dos fatores de transcrição por similaridade com a sequência consenso dos nós gênicos identificados pelo MEME.....	102
Tabela XI. Oligonucleotídeos <i>primers</i> dos genes selecionados para validação.....	105

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
1.1. Conceitos básicos sobre as células-tronco	18
1.2. Células-tronco (<i>stem-like cells</i>) em tumores: identificação e implicações terapêuticas.....	21
1.3. Prováveis mecanismos de surgimento do câncer a partir de células-tronco	25
1.4. O processo de diferenciação osteogênica e sua provável ligação com osteossarcoma.....	29
1.5. A tecnologia dos microarrays para identificação de perfis de expressão gênica em células tronco	33
1.6. Considerações sobre as redes de interação gênica no estudo de dados de expressão gênica temporal em sistemas complexos	36
2. HIPÓTESE.....	40
3. OBJETIVOS.....	42
3.1. Objetivo Geral.....	42
3.2. Objetivos Específicos	42
4. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E PIPELINE DA ANÁLISE <i>IN SILICO</i>	44
4.1 Delineamento experimental.....	44
4.2. <i>Pipeline</i> da Análise <i>in silico</i>	45
5. MATERIAL E MÉTODOS	48
5.1. Cultura de células-tronco mesenquimais e indução de diferenciação em osteoblastos.....	48
5.1.1. Aspectos éticos e população de estudo	48
5.1.2. Processamento da medula óssea e do cordão umbilical e obtenção das células-tronco mesenquimais.	48
5.1.3. Indução da diferenciação em osteoblástica	50
5.2 Ensaio celulares e bioquímicos para confirmação da osteogênese	50
5.2.1. Ensaio de Proliferação e Viabilidade celular	50
5.2.2. Determinação de proteínas totais.....	51
5.2.3. Medida da atividade de fosfatase alcalina (ALP) por reação enzimática	51
5.2.4. Avaliação imunocitoquímica de fosfatase alcalina (ALP).....	52
5.2.5. Formação de matriz mineralizada.....	53
5.3. Extração de RNA Total	53
5.3.1. Quantificação do RNA total.....	54

5.4. RNA de referência ou pool de referência a partir de linhagens de células humanas...	55
5.5. Eletroforese de amostras de RNA em gel de agarose sob condições denaturantes	55
5.5.1. <i>Preparação do gel de agarose com formaldeído (denaturante)</i>	55
5.5.2. <i>Preparação das amostras de RNA para denaturação</i>	56
5.6. Reações de RT-PCR semi-quantitativa (SQ-PCR) para análise da expressão dos marcadores da osteogênese	56
5.7. Preparação de cDNA microarrays em lâminas de vidro.....	58
5.7.1. <i>Clones da biblioteca de cDNA humana (IMAGE)</i>	58
5.7.2. <i>Amplificação de cDNA para confecção dos microarrays</i>	59
5.7.3. <i>Purificação dos produtos de PCR dos clones de cDNA</i>	60
5.7.4. <i>Confecção das lâminas de microarrays</i>	61
5.8. Delineamento das hibridações com os microarrays	62
5.9. Marcação das sondas de cDNA com fluorocromos Cy3 e Cy5	64
5.9.1. <i>Preparação da primeira fita de cDNA por incorporação de AAdUTP</i>	64
5.9.2. <i>Purificação do cDNA com colunas de purificação CyScribe GFX</i>	65
5.9.3. <i>Incorporação de Cy3 e Cy5</i>	65
5.9.4. <i>Purificação do cDNA marcado com CyDye com colunas de purificação CyScribe GFX</i>	66
5.9.5. <i>Quantificação do CyDye incorporado no cDNA</i>	66
5.10. Hibridação das lâminas de microarrays	67
5.11. Aquisição de imagens de microarrays.....	68
5.12. Quantificação e normalização dos dados de microarrays	68
5.12.1. <i>Nomenclatura dos genes</i>	69
5.13. Análise bioinformática dos dados de microarrays	70
5.13.1. <i>Seleção de processos biológicos de interesse usando bancos de dados</i>	70
5.13.2. <i>Agrupamento hierárquico</i>	71
5.13.3. <i>Construção de redes de interação gênica</i>	72
5.13.4. <i>Predição de motivos de ligação cis-regulatórios de fatores de transcrição</i>	73
5.14. Confirmação dos dados de microarrays por PCR em tempo real	74
5.14.1 <i>Análise estatística dos dados de PCR em tempo real</i>	75
6. RESULTADOS	77
6.1. Cultura de células-tronco mesenquimais e indução de diferenciação em osteoblastos.....	77
6.1.1. <i>Morfologia celular</i>	77

6.1.2. Proliferação Celular	78
6.1.3. Viabilidade Celular	79
6.1.4. Determinação de proteínas totais	80
6.1.5. Medida da atividade de Fosfatase Alcalina por reação enzimática.....	81
6.1.6. Nódulos de mineralização	81
6.2. Avaliação da integridade do RNA total.....	82
6.2.1. Amostras utilizadas como pool de referência	82
6.2.2. RNA total de amostras das células tronco.....	83
6.3. RT-PCR semi-quantitativa e análise da região <i>upstream</i> dos transcritos dos marcadores clássicos da diferenciação osteogênica.....	84
6.4. Amplificação de cDNA para a confecção de microarrays.....	87
6.5. Aquisição de imagens de microarrays.....	87
6.6. Perfis de expressão gênica por agrupamento hierárquico	88
6.7. Redes transcricionais a partir de dados de microarrays	91
6.7.1. Redes de interações transcricionais de células-tronco mesenquimais.....	91
6.7.2 Sistematização dos nós gênicos para melhor compreensão das redes gênicas	94
6.8. Busca de motivos para fatores de transcrição nas seqüências dos nós gênicos (alinhamento de Markov).....	100
6.9. Confirmação da expressão dos genes por PCR em tempo real.....	104
6.9.1. Seleção dos genes e cálculo da eficiência da reação de dissociação dos oligonucleotídeos primers	104
6.9.2. Expressão de genes avaliada por PCR em tempo real.....	105
7. DISCUSSÃO	108
7.1. Sistema-modelo de diferenciação osteogênica <i>in vitro</i> a partir de células tronco mesenquimais humanas.....	108
7.2. A relação entre marcadores da osteogênese, a sinalização das adesinas/integrinas e a angiogênese: o papel das DNA-PKs nas células-tronco mesenquimais	112
7.3. As redes regulatórias gênicas no estudo do <i>cross-talk</i> das vias de sinalização	118
7.4. Fatores de transcrição envolvidos no processo em questão	123
7.5. Validação dos dados de expressão gênica por PCR em tempo real.....	126
7.6. Perspectivas futuras	126
8. REFERÊNCIAS	129
ANEXOS.....	149

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1. Conceitos básicos sobre as células-tronco

As células-tronco apresentam três características que as definem, ou seja, (a) são células indiferenciadas e não-especializadas; (b) são capazes de se multiplicar por longos períodos mantendo-se indiferenciadas, de forma que um pequeno número possa originar uma população de células semelhantes e (c) são capazes de se diferenciar em células especializadas de um tecido em particular (ZAGO; COVAS, 2006).

Além disso, é possível classificar as células-tronco segundo seu potencial de diferenciação e sua origem. Com relação ao seu potencial de diferenciação, estas podem ser totipotentes, pluripotentes, multipotentes ou oligopotentes, podendo se diferenciar em todos os tecidos embrionários, nos tecidos das três camadas germinativas, na maioria dos tecidos adultos de um determinado órgão ou em alguns tecidos especializados, respectivamente. Já com relação a sua origem e propriedades biológicas, as células-tronco podem ter origem embrionária ou somática (adultas) (ZHANG *et al.*, 2006).

Dentre os tipos de células-tronco adultas, as mesenquimais (MSCs do inglês *mesenchymal stem cells*) vêm despertando particular interesse. A facilidade de isolamento e a possibilidade de expansão *in vitro*, as tornam uma ferramenta terapêutica estratégica no contexto da terapia celular e gênica (MINGUELL *et al.*, 2001). As células-tronco, incluindo as MSCs, representam uma importante promessa de terapia celular e tem sido alvo de grande debate na mídia no mundo todo. As propriedades que caracterizam essas células, e que não ocorrem nas células maduras, têm sido vistas como uma ferramenta para o tratamento de

um largo espectro de doenças que não são efetivamente tratadas por métodos tradicionais (MAYHALL *et al.*, 2004).

Essas células foram inicialmente isoladas de células derivadas da medula óssea por FRIEDENSTEIN (1968), e caracterizadas como células clonogênicas e fibroblastóides. Apesar de muitas controvérsias acerca das características básicas e de marcadores de superfície que as caracterizem, a Sociedade Internacional de Terapia Celular (ISCT www.celltherapysociety.org) propôs três critérios para definir uma célula-tronco mesenquimal (DOMINICI *et al.* 2006):

1. As MSCs devem ser aderentes ao plástico quando mantidas em cultura.
2. A população de MSCs deve ser positiva para antígenos *CD105*, *CD73* e *CD90* e negativa para antígenos da linhagem hematopoiética *CD45*, *CD34* e marcadores de monócitos, macrófagos e células B.
3. As células devem ser capazes de se diferenciar em osteoblastos, condroblastos e adipócitos. A diferenciação deve ser demonstrada por protocolos bem estabelecidos e aceitos internacionalmente.

Apesar de ainda polêmicos, alguns estudos têm apontado evidências de que as células-tronco mesenquimais possuem a capacidade de diferenciação em outros tipos celulares além dos três tipos citados. São necessários mais estudos para avaliar a plasticidade das células-tronco adultas por meio de protocolos reprodutíveis (ZAGO; COVAS, 2006).

Hoje está bem demonstrado que não somente a medula óssea, mas outros tecidos humanos possuem células-tronco, e estas constituem uma reserva no caso de lesão ou desgaste para a remodelação do tecido de injúria. Diversos grupos têm isolado células-tronco mesenquimais de praticamente todos os tecidos adultos. DA SILVA MEIRELES *et al*

(2006) isolaram MSCs de cérebro, timo, fígado, pâncreas, rim, músculo e pulmões de camundongos adultos. Além disso, o cordão umbilical humano tem sido grande fonte de células-tronco mesenquimais mais jovens, e, portanto, com maior potencial de diferenciação (ERICES; CONGET; MINGUEL *et al.* 2000). As isoladas do tecido adiposo humano também têm sido consideradas uma opção promissora (ZUK *et al.* 2002).

Vários estudos clínicos e em modelos animais empregaram as células-tronco mesenquimais. Porém, na prática, a terapia com células-tronco adultas restringe-se a poucas doenças. GIORDANO *et al.* (2007) descreveram os progressos significativos envolvendo o tratamento de doenças cardiovasculares como infarto agudo do miocárdio e isquemia, osteogênese imperfeita, doenças neurológicas como esclerose amiotrófica lateral, recuperação de pacientes pós-transplantados, síndrome de *Hurler* e periodontite. O site (<http://clinicaltrials.gov/>) do *National Institute of Health* (NIH, USA) oferece informações atualizadas acerca de diversos estudos clínicos em andamento no mundo. Ao realizar uma busca com a palavra chave *mesenchymal stem cells* encontramos que os seguintes estudos clínicos estão em andamento: doença de Crohn, diabetes do tipo I e II, lúpus eritematoso sistêmico, esclerose múltipla, osteonecrose, nefrite, doenças pulmonares crônicas, hipercolesterolemia, infarto do miocárdio e queimaduras.

Além disso, muitos estudos têm se voltado para a possibilidade de ocorrência de GVHD (*graft versus host disease*). Entende-se por GVHD como uma forma de rejeição na qual as células transplantadas passam a atacar tecidos ou órgãos, tais como o trato digestório, a pele e o fígado. Em geral, transplantes alogênicos realizados com células-tronco hematopoiéticas (HSCs) ocasionam GVHD, o que não ocorre quando co-transplantadas com MSCs. As células-tronco mesenquimais escapam do sistema imune uma vez que, na ausência de estímulos específicos, estas não expressam antígenos HLA de classe II na superfície. Além

disso, essas células exercem um efeito imunossupressor, o que controlaria as reações de GVHD (UCELLI *et al.* 2008). Acredita-se que, por essas células não serem imunogênicas, escapariam do reconhecimento por linfócitos T, e seus efeitos imunossupressores estão apenas começando a serem desvendados (LE BLANC *et al.* 2005).

Apesar da grande promessa, muitas perguntas ainda permanecem: questões correspondentes ao fenótipo das MSCs, funções destas *in vivo*, eficácia em longo prazo e segurança, sinais de sobrevivência e a possibilidade de migração dessas células para tumores (JORDAN, 2004).

1.2. Células-tronco (*stem-like cells*) em tumores: identificação e implicações terapêuticas

Os teratocarcinomas representam os mais conhecidos tumores originários de células-tronco. Como exemplo, o tumor de Wilms do rim, que se desenvolve na infância, oferece pistas da relação das células-tronco embrionárias e o câncer. Esses tumores constituem uma população heterogênea de células não-diferenciadas e diferenciadas originadas de células-tronco embrionárias (SELL, 2004). Apesar desse tipo de evidência, as células-tronco embrionárias têm motivado a elaboração de protocolos terapêuticos de várias doenças humanas. Esses protocolos já estão sendo colocados em prática, mas, infelizmente, estão aparecendo efeitos colaterais envolvendo o surgimento de câncer oriundo das próprias células-tronco transplantadas.

Recentemente, houve grande impacto na mídia, o caso clínico de um paciente portador de ataxia telangectasia que foi submetido a injeções repetidas com células-tronco embrionárias. Após quatro anos do tratamento, o paciente manifestou neoplasma glioneural. O tumor apresentava não somente astrócitos, como ocorre em tumores

glioneuronais convencionais, mas também células ependimais. Estudos citogenéticos e moleculares da biópsia tumoral revelaram que tais células se originaram de células progenitoras neuronais advindas de pelo menos dois fetos. Os autores discutem a possibilidade de que o cultivo para expansão das células neurais, que constam fatores de crescimento como bFGF e EGF, tenham promovido a transformação dessas células. Além disso, a injeção dessas células num microambiente fisiológico diferente do natural, pode gerar o crescimento celular e sua diferenciação anormal (AMARIGLIO *et al.* 2009).

Em contrapartida, uma tentativa pioneira para a comprovação da segurança dessas células foi feita pela empresa GERON® (<http://www.geron.com>), que em 23 de janeiro de 2009 anunciou a aprovação do FDA (*U.S. Food and Drug Administration*) da aplicação clínica de uma linhagem de células progenitoras de oligodendrócitos derivadas de células-tronco embrionárias (linhagem GRNOPC1) para restauração de lesões na medula espinal. Segundo as informações disponibilizadas pela empresa, foram realizados 24 estudos em um modelo animal de camundongos *scid* para a comprovação da segurança dessa linhagem. Constataram ausência de: formação teratomas após 12 meses da injeção, migração das células injetadas, toxicidade sistêmica, imunossupressão, além do controle de que a mortalidade dos animais não foi alterada após o tratamento. Cabe ressaltar que esses testes foram realizados em modelo animal e ainda não encontramos os dados publicados na literatura especializada internacional até o momento da redação dessa dissertação.

Muito se tem discutido acerca da segurança das células-tronco embrionárias. No entanto, mesmo em relação à utilização clínica de células-tronco adultas, existem vários relatos de casos envolvendo o desenvolvimento de câncer. HAMAKI *et al.* (2008) mostraram o caso de um paciente cujo transplante de células-tronco hematopoiéticas do sangue de cordão umbilical originou leucemia aguda, com translocação do gene MLL. PIERONI *et al.*

(2006) relataram o desenvolvimento de leucemia mielóide aguda após o transplante alogênico de células-tronco hematopoiéticas oriundas da medula óssea.

Também foram relatados casos de desenvolvimento de câncer a partir de células-tronco mesenquimais. Uma busca realizada no banco de dados da divisão de transplante de medula óssea do *Memorial Sloan-Kettering Cancer Center*, identificou que nove casos que apresentaram cânceres sólidos secundários após o procedimento convencional de transplantes alogênicos, e foi demonstrado que esses tumores foram originados a partir das células-tronco mesenquimais advindas dos doadores (AVITAL *et al.* 2007).

Finalmente, o isolamento de células-tronco adultas de massas tumorais veio comprovar essa possibilidade. SELL (2004) que isolou células-tronco com fenótipo hematopoiético a partir de leucemias e também células-tronco com fenótipo mesenquimal de tumores sólidos, cunhou o termo *cancer stem cells*, CSCs. BONNET *et al.* (1997) identificaram uma população com imunofenótipo hematopoiético $CD34^+CD38^-$ em diversos tipos de leucemia mielóide aguda e demonstraram seu potencial de auto-renovação. As questões acerca dos mecanismos envolvidos nesse processo lançaram as bases para os primeiros modelos sobre a origem do câncer a partir de células-tronco (JORDAN, 2004).

Até então se acreditava que os tumores eram originários somente da transformação de células-tronco tecido-específicas, até que HOUGHTON *et al.* (2004) encontraram que o câncer gástrico poderia ser originário de células advindas da medula óssea, colocando as MSCs como as possíveis candidatas.

Evidências experimentais indicam que as MSCs podem ser transformadas e que essa transformação pode ocorrer espontaneamente (SERANKINCI *et al.* 2004), podendo gerar um sarcoma *in vivo* (TOLAR *et al.* 2007). Diversos tipos de cânceres a partir de MSCs já foram

identificados, entre eles tumores epiteliais, tumores endoteliais, tumores de pobre diferenciação, tumores mistos, e teratomas (LIU *et al* 2006).

A partir do princípio de que uma população de células presentes em um tumor retém marcadores expressos por células-tronco normais, um grande esforço tem sido realizado para a identificação de marcadores que potencialmente caracterizam as *cancer stem cells* (CSCs) para diversos tipos de cânceres. Linhagens celulares originárias de camundongos transgênicos suscetíveis a tumores, como o *NOD/SCID*, ampliaram os estudos em modelos animais (LAPIDOT *et al.*, 1994; AL-HAJJ *et al.*, 2003; SINGH *et al.*, 2003; DONTU *et al.*, 2003; SETOGUCHI *et al.*, 2004; KONDO *et al.*, 2004; TYSNES; BJERKVIG, 2007). A Tabela I mostra os diversos marcadores de superfície identificados em CSCs.

A comunidade científica continua clamando para a elaboração de protocolos para o uso terapêutico das células-tronco, principalmente das embrionárias.

Tabela I: Caracterização fenotípica das CSCs.

Fonte: TYSNES & BJERKVIG (2007)

Tumor type	Cell surface markers	Tumorigenic
Acute myeloid leukemia	CD34 ⁺ CD38 ⁻	In SCID mice
Acute myeloid leukemia	CD34 ⁺ CD38 ⁻	In NOD/SCID mice
Breast tumors	CD44 ⁺ CD24 ^{-/low} Lineage ⁻	In NOD/SCID mice
Brain tumors	CD133 ⁺	In NOD/SCID mice
Bone sarcomas	Stro-1 ⁺ CD105 ⁺ CD44 ⁺	Self-renewal and colony formation capacity <i>in vitro</i>
Lung adenocarcinomas	Sca-1 ⁺ CD45 ⁻ Pecam ⁻ CD34 ⁺	Self-renewal, colony formation and multilineage differentiation capacity <i>in vitro</i>
Metastatic melanomas	CD20 ⁺	In SCID mice
Prostate cancers	CD44 ⁺ alpha2beta1 ^{hi} CD133 ⁺	Self-renewal and extensive proliferation capacity <i>in vitro</i>

Surgiu então nova conceituação para a origem do câncer como proveniente de massa celular constituída por uma hierarquia de células em diferentes estágios de diferenciação de CSCs. Essa hipótese se baseia na habilidade de auto-renovação de uma sub-população celular identificada dentro do tumor. (SELL, 2004).

Novas estratégias clínicas para o futuro procurarão utilizar as CSCs como alvo terapêutico, visto que essas não respondem à terapia tradicional, podendo gerar tumores recorrentes. WICHA *et al.* (2006) propõem uma mudança de paradigma no processo da carcinogênese com implicações na terapêutica, baseada na eliminação das CSCs.

Todos esses fatos nos motivaram a elaboração do presente estudo, no qual investigamos as bases genético-moleculares associadas a carcinogênese em células-tronco mesenquimais humanas.

1.3. Prováveis mecanismos de surgimento do câncer a partir de células-tronco

Os mecanismos de proliferação celular e a auto-renovação não são sinônimos. O mecanismo de auto-renovação geralmente ocorre por divisões mitóticas assimétricas, nas quais uma célula permanece indiferenciada enquanto a outra parte para o processo de diferenciação. Isso tem implicações no modelo de CSCs, uma vez que um câncer que se origina de uma célula-tronco normal, a maquinaria de auto-renovação pode ser utilizada para a divisão, se tornado uma célula imortalizada (CLARKE *et al* 2004). (Figura 1).

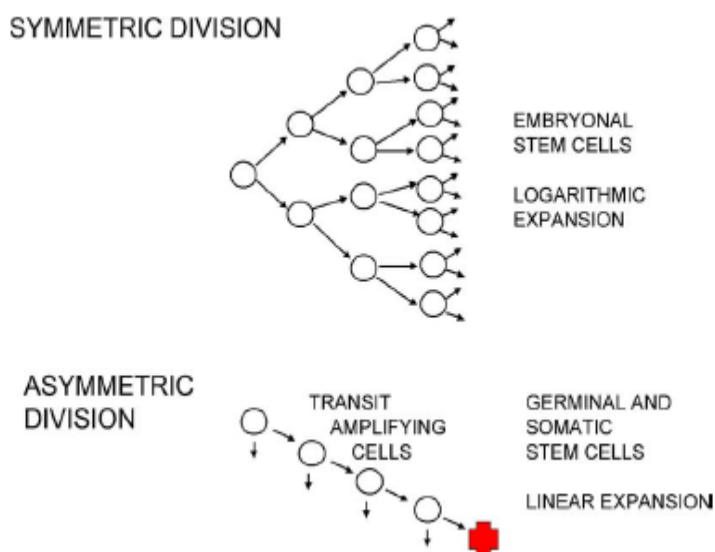


Figura 1. Esquema comparando as divisões simétricas que ocorrem na maioria dos tipos celulares e nas células-tronco embrionárias; e a divisão celular assimétrica observada nas células-tronco adultas.

Fonte: SELL, 2004

A divisão celular assimétrica acaba por manter um estoque de células-tronco em tecidos adultos por toda a vida do indivíduo, por meio de expansão linear. Assim, uma das características chave do câncer é a divisão celular ilimitada, propriedade considerada remanescente da auto-renovação das células-tronco (TSAI *et al.* 2004).

Os mecanismos de regulação da auto-renovação nas células-tronco estão relacionados com a manutenção da homeostase do corpo. Tal regulação inclui o controle de fatores intrínsecos e extrínsecos, e a perda desse controle é proposta como um ponto chave da ligação com o processo carcinogênico. A idéia geral está relacionada à possibilidade do surgimento de mutações oncogênicas cumulativas (perda de controle intrínseco) seguida por modificações do micro-ambiente ou nicho (perda de controle extrínseco). (LI *et al.*, 2006).

Evidências sugerem que o processo de desenvolvimento do câncer ocorra por meio da desregulação de vias de sinalização envolvidas com o processo de auto-renovação de células-tronco normais, resultando na expansão descontrolada (NELSON & NUSSE, 2004). Foi

demonstrado que as vias *BMI-1*, *NOTCH*, *WNT* e *HEDGEHOG* fazem parte desse grupo (REYA *et al*, 2003; CLARKE *et al* 2004). A Figura 2 mostra um esquema dessas quatro principais vias celulares associadas ao processo em questão.

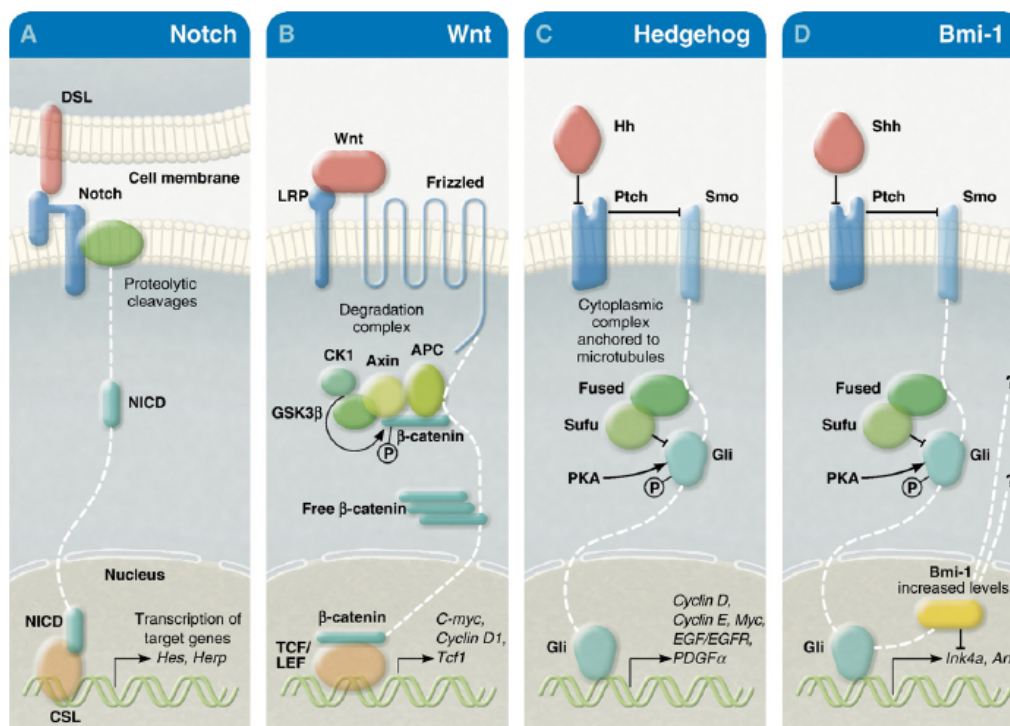


Figura 2. Esquema indicativo das vias canônicas envolvidas com o câncer identificadas em células-tronco.

Fonte: TYSNES & BJERKVIG, 2007.

A via *NOTCH*, conforme já citado, tem sido associada ao novo paradigma, uma vez que a expressão de genes alvos de *HES* e *HERP* permite que a célula permaneça no estado indiferenciado. A via *WNT* é a mais associada ao câncer, estando envolvida nos processos de diferenciação, proliferação celular, auto-renovação e migração. Já a via *HEDGEHOG* apresenta diversos genes conhecidos por serem supressores tumorais, como *SMO*, *SHH*, *GLI-1*, and *GLI-2*, e *PTCH1*. E finalmente, a via do membro do grupo *polycomb* *BMI-1*, funciona como um repressor transcricional da auto-renovação das células-tronco no sistema nervoso, cujos alvos *INK4a-ARF* possuem um papel conhecido no câncer por inibir a proliferação e

causar a morte celular (TYSNES & BJERKVIG, 2007). Diversos modelos têm sido propostos para o estudo da interação dessas vias em um processo como um todo. A Figura 3 mostra um modelo hipotético do *cross-talk* dessas vias, sugerindo que os pontos de interação poderiam ser alvos para o desenvolvimento de novas terapias (LIU *et al.* 2005).

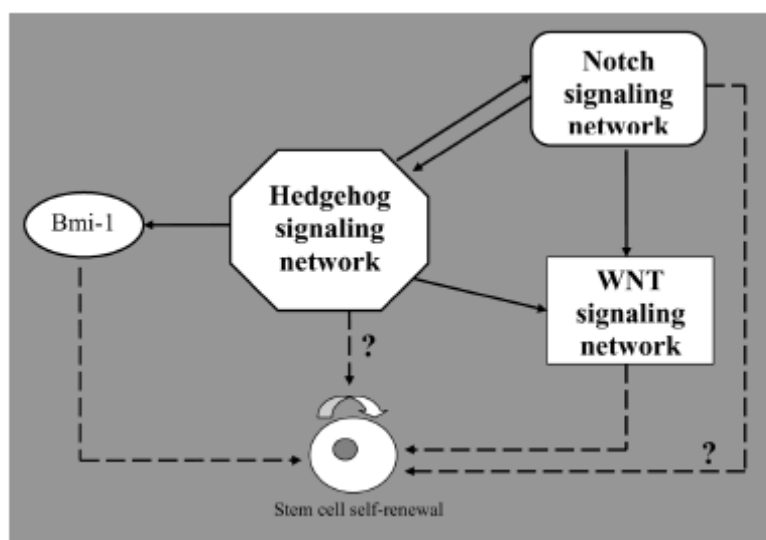


Figura 3. Modelo teórico da interação das quatro vias para a manutenção do balanço entre a auto-renovação e o câncer em uma célula tronco.

Fonte: LIU *et al.*, 2005

Estudos têm associado essas quatro vias indicando que *HEDGEHOG* e *NOTCH* poderiam formar um *loop* regulatório do desenvolvimento normal, cuja desregulação estaria envolvida com a decisão entre os processos de auto-renovação e câncer, influenciando as outras vias. Na pele identificou-se que a ativação de dois marcadores da via *WNT*, a β -*catenina* e o *LEF*, estão associados com a transformação *NOTCH*-dependente de células tronco mesenquimais (LIU *et al.* 2005). A integração de outras vias também tem sido associada ao processo carcinogênico em células-tronco (NELSON & NUSSE, 2004).

1.4. O processo de diferenciação osteogênica e sua provável ligação com osteossarcoma

O modelo de diferenciação *in vitro* de células-tronco mesenquimais em osteoblastos está bem caracterizado. Para a indução desse tipo de diferenciação, uma combinação de ácido ascórbico e uma fonte de fosfato (o β -glicerofosfato é o mais utilizado) constituem o mínimo necessário para a ocorrência do processo (GARTLAND et al., 2005).

O ácido L-ascórbico atua como um co-fator na hidroxilação dos aminoácidos lisina e prolina no colágeno, sendo essencial para sua síntese e secreção. A adição de ácido L-ascórbico nas culturas derivadas de osso humano aumenta a proliferação e a secreção do colágeno tipo I. Ocorre também um aumento na síntese de proteínas não-colagenosas, de forma mais importante a osteocalcina e a sialoproteína óssea, e deposição aumentada de matriz. (GARTLAND et al., 2005). Noventa por cento da matriz óssea consiste de colágeno tipo I, os 10% restantes possuem várias proteínas não-colagenosas e pequenos proteoglicanos. (GARANT, 2003).

O hormônio corticóide sintético dexametasona, a vitamina D3 e/ou fatores de crescimento como as BMPs (*bone morphogenetic proteins*), também são usadas com frequência como complemento para culturas de osteoblastos. Esse sistema tem sido amplamente utilizado para estudar mecanismos tecido-específicos (BINDERMAN et al., 1974; VATS et al., 2005). Durante o processo de diferenciação osteogênica, observa-se um aumento na expressão de fosfatase alcalina e de outros marcadores, com depósito de matriz extracelular mineralizada rica em cálcio (PROCKOP, 1997; PITTENGER, 1999).

A diferenciação de células-tronco mesenquimais em linhagem osteogênica pode ser compartimentada nos seguintes estágios de desenvolvimento (HENG et al., 2004) :

- 1) célula-tronco mesenquimal,
- 2) osteoprogenitor,
- 3) pré-osteoblastos,
- 4) osteoblasto
- 5) osteocisto maduro

Nesse processo, as células osteoprogenitoras acometem a linhagem de células ósseas, sendo responsáveis pela expansão de osteoblastos e proliferação. Como pode ser observado na Figura 4, os pré-osteoblastos constituem uma fase intermediária entre as células progenitoras e o osteoblasto. Os osteoblastos são as células desta linhagem responsáveis pela formação óssea, podendo ser transitórios, secretórios ou osteocíticos. Já os osteocistos maduros constituem a última fase da diferenciação e estão embutidos nas lacunas dos ossos (LONG, 2001).

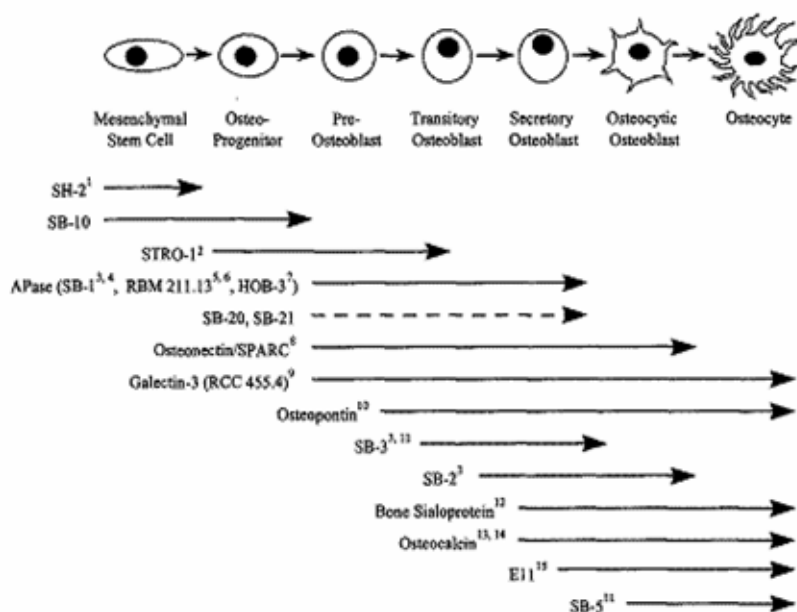


Figura 4. Esquema indicativo das fases da osteogênese, bem como os antígenos de superfície característicos de cada etapa.

Fonte: BRUDER *et al.* 1997

Estudos têm apontado marcadores que evidenciam cada etapa do processo para o monitoramento da diferenciação, conforme mostrado na Figura 4. Nos últimos anos, o estudo da diferenciação osteoblástica tem sido aplicado na investigação dos seguintes aspectos: a bioquímica básica e a fisiologia da formação óssea, as bases celulares e moleculares das doenças ósseas humanas e a participação dessas células na regulação da reabsorção óssea. Ainda utilizam tal sistema-modelo para testar e desenvolver agentes terapêuticos potenciais, assim como novos biomateriais (BOMBONATO-PRADO *et al.* 2009; BELLESINI *et al.* 2009) e aplicar à terapia celular e à engenharia tecidual para transplante ósseo (GARTLAND *et al.*, 2005).

Entretanto, o mecanismo da regulação molecular da osteogênese ainda não está totalmente compreendido. Sabe-se que as *bone morphogenetic proteins* (BMPs), fatores de crescimento, e a via de sinalização WNT estão envolvidos nesse processo. Sabe-se que em processos normais a via WNT promove a osteogênese pela regulação do fator de transcrição *RUNX2* (GAUR *et al.*, 2005).

O *CBFA/RUNX2/AML3* é conhecido como fator chave para a diferenciação de MSCs em osteoblastos e à formação óssea, por estimular diretamente genes que codificam a osteocalcina, o colágeno tipo I, a osteopontina e a colagenase 3 através da ligação a uma região *enhancer* específica PuCCPuCA (DUCY *et al.*, 1997; KERN *et al.*, 2000; SELVAMURUGAN *et al.*, 2001).

Acredita-se que alteração da expressão do fator de transcrição *RUNX2* possa estar envolvida com o surgimento de osteossarcomas (PAPACHRISTOU; PAPAVALASSILIOU, 2007). YANG *et al.* 2001 mostraram que células provenientes de câncer de próstata podem induzir a diferenciação osteoblástica em um sistema de co-cultura *in vitro*, com a participação do transcrito *RUNX2*. Mais recentemente, observou-se que células provenientes de sarcomas

ósseos expressam genes característicos de osteoblastos, sintetizam proteínas da matriz óssea e, em muitos casos, respondem a hormônios reguladores de cálcio, incluindo hormônio paratiroídeo (GIBBS *et al.*, 2005).

Osteosarcomas são tumores malignos, derivados de células da linhagem osteoblástica, que correspondem à cerca de 0,2% de todos os cânceres humanos. O osteossarcoma convencional é um sarcoma intramedular primário que corresponde a 75% de todos os tumores ósseos (SPINA *et al.* 1998). Diversos genes foram identificados como mutados em osteossarcoma esporádico, entre esses genes encontram-se aqueles sabidamente envolvidos com o processo, como genes do ciclo celular, *Rb*, *TP53* e *C-MYC*, além de genes envolvidos com a formação óssea, como *MDM2* e a osteocalcina (GRONINGEN, 2006).

Como pode ser observada no esquema da Figura 5, a evidência da participação de fatores ligados à osteogênese, como *JUNB*, *COX-2*, *MMPs*, catepsinas, *PDGF*, *ER* e *IGF*, no desenvolvimento, progressão e metástase do osteossarcoma, indica a importância do balanço diferenciação vs proliferação celular (PAPACHRISTOU; PAPAVALASSILIOU, 2007).

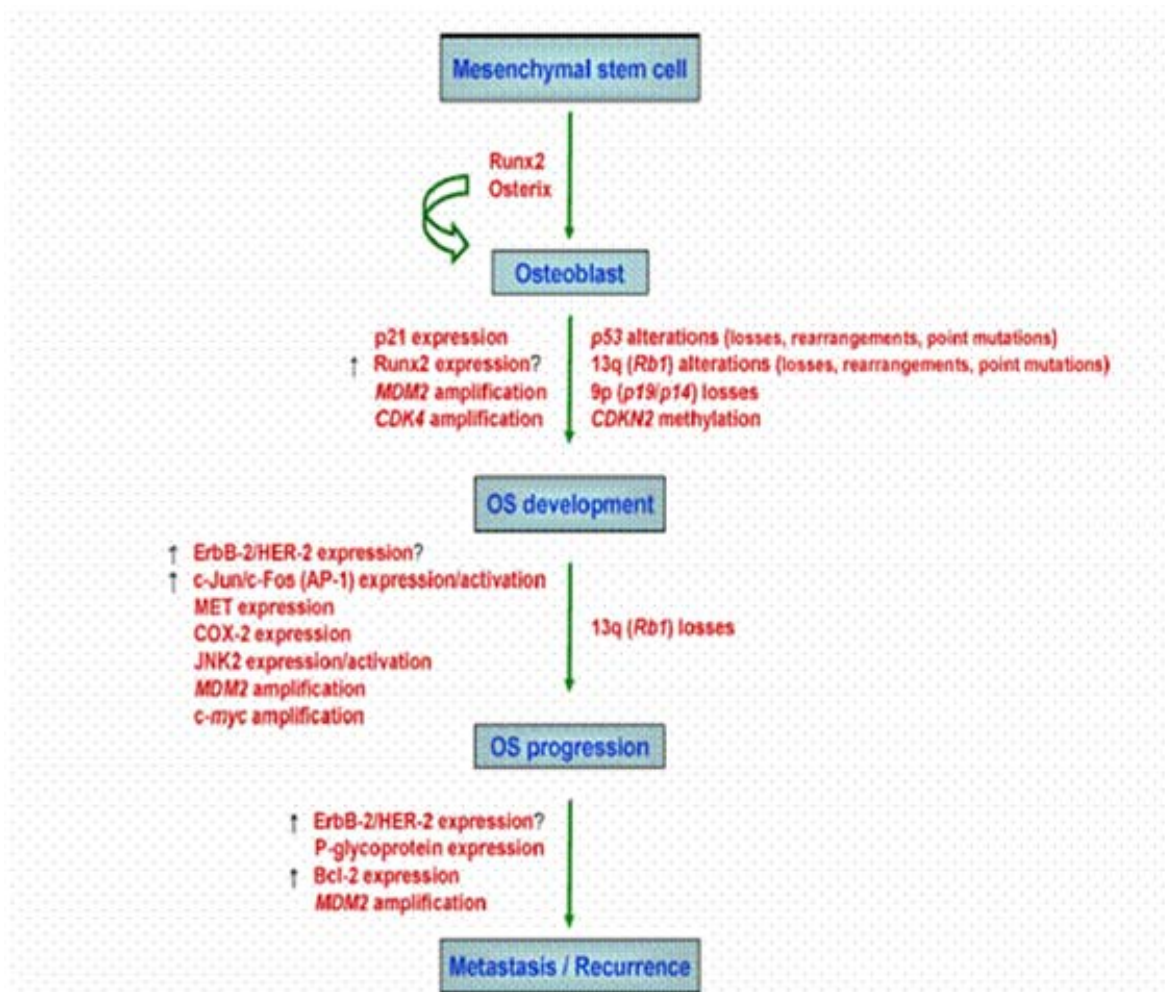


Figura 5. Esquema representativo dos processos moleculares envolvendo as etapas de desenvolvimento, progressão e metástase do osteosarcoma a partir das MSCs.

Fonte: PAPACHRISTOU; PAPAVALASSILIOU, 2007

1.5. A tecnologia dos microarrays para identificação de perfis de expressão gênica em células tronco

Durante todo o processo de diferenciação celular e tecidual, um conjunto de transcritos é mobilizado como resultado de expressão diferencial destes. Portanto, pode-se dizer que durante os processos complexos, o primeiro ponto de controle molecular é a expressão gênica em nível do conjunto de mRNA, definido como transcriptoma. Sabe-se hoje que o transcriptoma das células e tecidos é reflexo da razão entre a biossíntese de mRNA

mediada por fatores de transcrição e sua degradação, causada pelos microRNAs (SEVIGNANI *et al.*, 2006).

Como um método de análise do transcriptoma, os microarrays consistem em arranjos de sequências de cDNA ou de oligonucleotídeos depositados, com o uso de robôs de alta precisão, ordenadamente em suportes sólidos, como lâminas de vidro. Conforme representado na Figura 6, amostras de mRNA são copiadas em cDNA, marcadas com fluorocromos e então hibridadas com os microarrays. Após a hibridação, as imagens são capturadas com auxílio de um *scanner* especializado, as intensidades de cada *spot* de hibridação (ponto no microarray) são convertidas em valores numéricos (quantificação das intensidades de hibridação) e finalmente analisadas com auxílio de programas de matemática, estatística e bioinformática para a análise de dados de microarrays (HARRINGTON *et al.*, 2000).

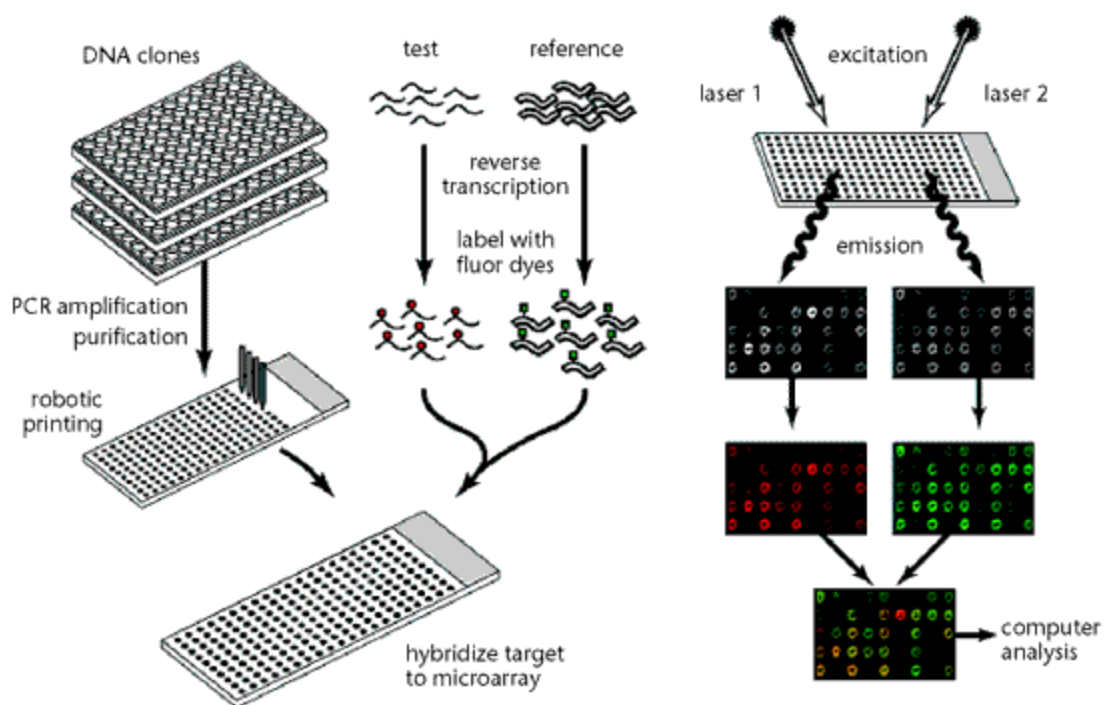


Figura 6. Esquema mostrando o uso dos microarrays.
Fonte: DUGGAN, 1999

Este sistema representa uma revolução nos métodos tradicionais de estudo de expressão gênica e tem sido utilizado com inúmeros propósitos. A tecnologia dos microarrays permite a obtenção de um *fingerprint* molecular da expressão gênica, que se refere à assinatura de hibridação proveniente de uma determinada intervenção terapêutica (GROUSE *et al.*, 2001). Assim, genes que são expressos de forma coordenada em um tipo celular ou durante uma resposta biológica, compõem as chamadas “assinaturas de expressão gênica” (HASELTON *et al.*, 2000).

Estudos têm sido realizados para definir as assinaturas moleculares de expressão gênica de células-tronco, utilizando a técnica de microarrays. Entre eles, pode-se citar o trabalho que descreve uma assinatura contendo 92 genes, característica de células-tronco embrionárias (BHATTACHARYA *et al.* 2004). Dentre os estudos comparativos, encontram-se assinaturas de células-tronco embrionárias, hematopoiéticas e mesenquimais (KIM *et al.* 2006), de células-tronco mesenquimais da medula óssea, cordão umbilical, líquido amniótico e membrana amniótica (TSAI *et al.* 2007), de células-tronco mesenquimais e células de tumores mesenquimais (GALIÈ *et al.* 2008) e de células-tronco da polpa dentária com linhagens de osteosarcoma (PALMIERI *et al.* 2008).

Além disso, foram criados bancos de dados públicos na Internet mostrando as assinaturas de células-tronco. Entre os mais famosos encontra-se o *StemBase* em Ontário, que pode ser acessado através do site (<http://www.stembase.ca/?path=/>), e reúnem os principais estudos sobre microarrays em diversos tipos de células-tronco. Esse banco conta atualmente com 61 experimentos de 215 amostras de células-tronco humanas, de ratos e de camundongos. Já o *Stem Cell Database* (SCDb <http://stemcell.mssm.edu/v2/>) cataloga genes diferencialmente expressos em células-tronco hematopoiéticas do fígado fetal murino, bem como seus tipos diferenciados.

A técnica de microarrays tem sido utilizada para o prognóstico do câncer a partir de assinaturas moleculares de vias oncogênicas em células-tronco. GLINSKY et al. (2005) propuseram uma assinatura de hibridação multi-câncer de genes relacionados com o processo de auto-renovação de células-tronco. Mais recentemente, o mesmo grupo propôs um algoritmo conhecido como *CTOP* (*cancer therapy outcome predictor*) que combina nove assinaturas gênicas que têm sido testadas com sucesso para o prognóstico do câncer de mama, próstata, pulmão e ovário (GLINSKY, 2008)

A tecnologia dos microarrays representa uma inovação na área de medidas de expressão gênica em grande escala, sendo largamente aplicada em biologia e medicina na aquisição de novos conhecimentos básicos e também na área diagnóstica. Com os microarrays pode-se medir a expressão de milhares de genes num único experimento e, por isso, tornou-se o método de escolha na exploração do transcriptoma em diversas situações normais e patológicas, sendo de grande interesse para o estudo de processos complexos como a diferenciação de células-tronco e o câncer.

1.6. Considerações sobre as redes de interação gênica no estudo de dados de expressão gênica temporal em sistemas complexos

Os experimentos de microarray possibilitam uma lista de genes diferencialmente expressos que poderão participar no controle do comportamento celular. A análise minuciosa desta lista proporciona uma grande quantidade de informações relevantes. Além das assinaturas de expressão, muitos úteis para o agrupamento de amostras e/ou de pacientes, as análises dos dados de microarrays também têm sido focadas na reconstrução de redes transcricionais regulatórias, ou seja, as interações entre moléculas de mRNAs. Tais

redes visam encontrar e entender a interação gene-gene a partir de dados de expressão (WANG et al., 2006).

As redes transcricionais gênicas são (re)construídas por meio de algoritmos que utilizam a engenharia reversa, ou seja, a elucidação da estrutura de um sistema analisando o comportamento das reações anteriores (HARTEMINK, 2005). Essas metodologias representam um bom modo para modelar as interações genéticas que são exibidas como um diagrama de rede de interação entre elementos. O algoritmo se baseia na medida de dados de expressão gênica temporal, gerados de experimentos com microarrays (WU et al., 2004).

A combinação dos dados experimentais de microarrays é realizada por meio de ferramentas computacionais. Um estudo interessante nesse sentido foi desenvolvido por WANG *et al* (2007) onde é construída uma rede regulatória a partir de experimentos de cDNA microarrays *time course* envolvendo sete intervalos de tempo numa amplitude de 0.5 a 24 h durante a transição epitelial-mesenquimal (EMT).

Outro estudo envolvendo câncer foi realizado a partir de perfis de expressão gênica de 336 amostras em diferentes estágios de malignização de células B. Para isso, foi desenvolvido um algoritmo conhecido como ARACNE (*Algorithm for the Reconstruction of Accurate Cellular Networks*). O modelo deste é baseado no formalismo matemático da teoria da informação (BASSO *et al.*, 2005, MARGOLIN *et al.*, 2006).

Atualmente, uma grande variedade de metodologias vem sendo proposta para inferir redes gênicas regulatórias a partir de dados temporais de expressão gênica. Todos esses modelos levam em consideração que o nível de expressão de um gene, num determinado intervalo de tempo, é dado em função do nível de expressão de outros genes nos tempos anteriores (WANG et al., 2006).

Nosso grupo já tem experiência prévia nesse sentido utilizando o algoritmo *GeneNetwork* (WU et al., 2004), o qual se mostrou adequado na análise das redes de interação gênica de duas situações diferentes; numa delas estudou-se a ontogenia do timo de camundongos (MACEDO *et al.*, 2008) e na outra as interações que ocorrem entre os loci de susceptibilidade para a artrite reumatóide e outros genes (mRNAs) (SILVA *et al.* 2009).

Para desenvolvermos o presente estudo, também escolhemos o algoritmo *GeneNetwork*, cabendo notar suas características peculiares. É um software livre, com uma interface relativamente simples e o algoritmo realiza a interpolação de dados de expressão computando mais de mil genes. Além disso, o *GeneNetwork* permite a utilização de um experimento temporal utilizando o cálculo de probabilidade linear, construindo uma rede descrita por um grafo orientado, no qual setas positivas indicam a probabilidade de indução e as negativas indicam a probabilidade de repressão entre os transcritos (WU et al., 2004).

A utilização dessa metodologia de inferência de redes gênicas permite avaliar a interação entre transcritos envolvidos, por exemplo, no processo de diferenciação/carcinogênese. No presente estudo utilizamos o modelo linear do programa *GeneNetwork*, baseando-se em dados temporais de expressão gênica, os quais foram obtidos por meio da técnica dos cDNA microarrays. Estudamos a diferenciação osteoblástica de células-tronco focando as interações gênicas (mRNAs) envolvidas com o processo da carcinogênese.

Hipótese

2. HIPÓTESE

Na diferenciação de células-tronco há a participação de cascatas de regulação gênica envolvidas com a carcinogênese.

Objetivos

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Identificar genes modulados e sua probabilidade de interação transcricional durante a diferenciação osteoblástica *in vitro* de células-tronco mesenquimais humanas, focando aqueles envolvidos com carcinogênese.

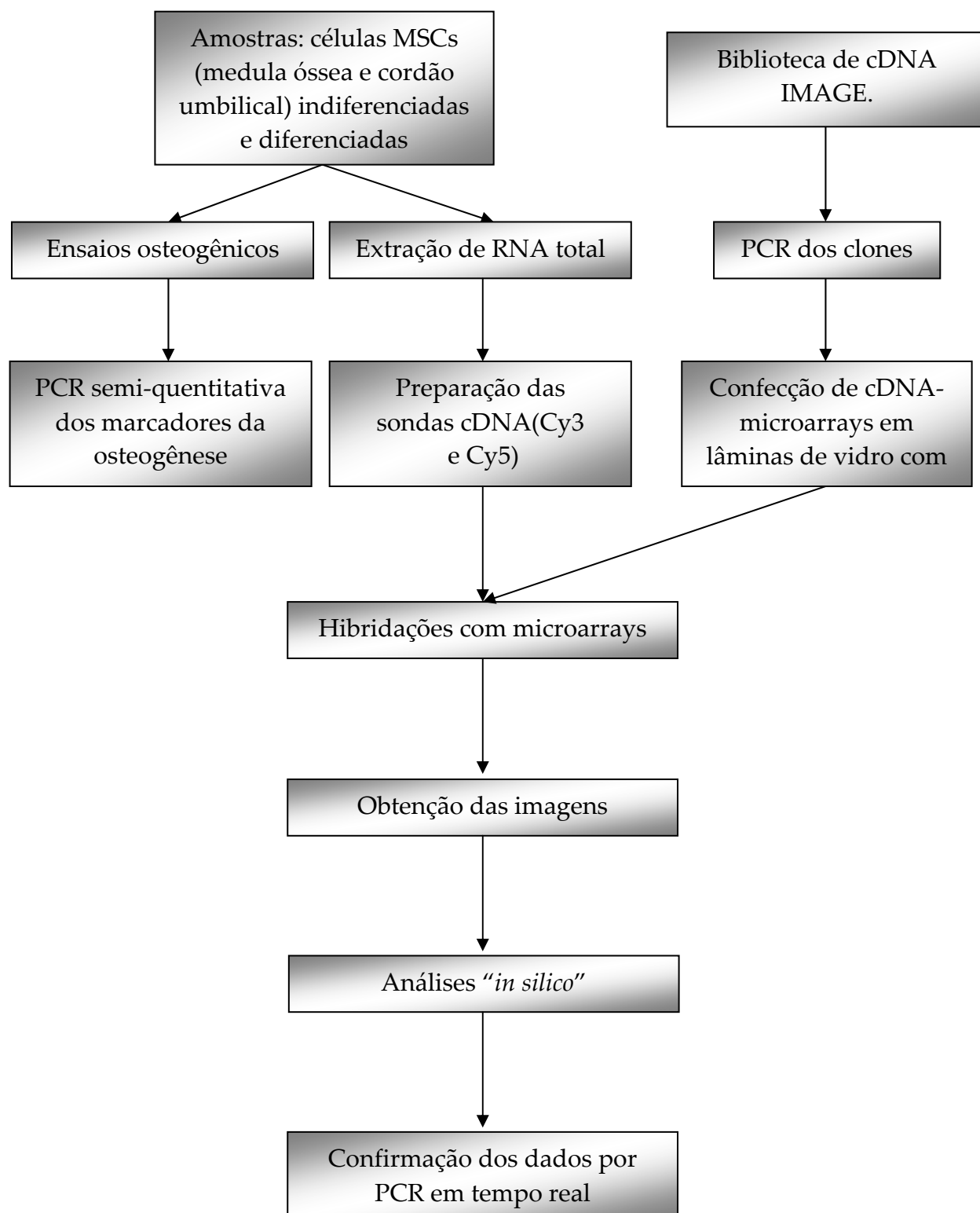
3.2. Objetivos Específicos

- 1) Reproduzir o modelo *in vitro* de diferenciação osteoblástica de células-tronco mesenquimais derivadas de medula óssea e de cordão umbilical humanos.
- 2) Avaliar a expressão gênica em grande escala durante a diferenciação dessas células usando a tecnologia dos cDNA microarrays.
- 3) Utilizar ferramentas de bioinformática para identificar as assinaturas de expressão gênica, reconstruir redes de interação e localizar os sítios putativos de ligação a fatores de transcrição nos genes identificados.

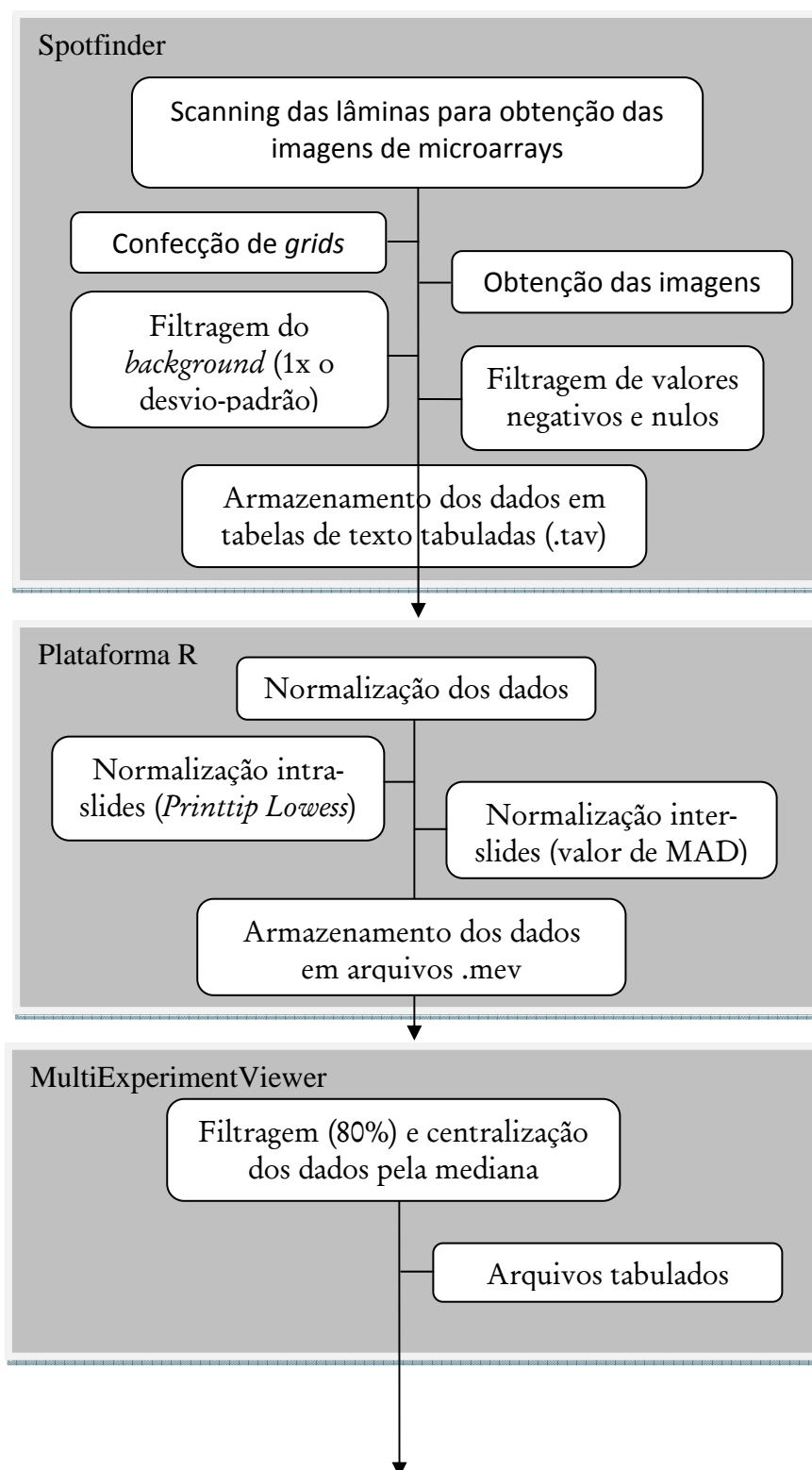
***Delineamento Experimental &
Pipeline da Análise in silico***

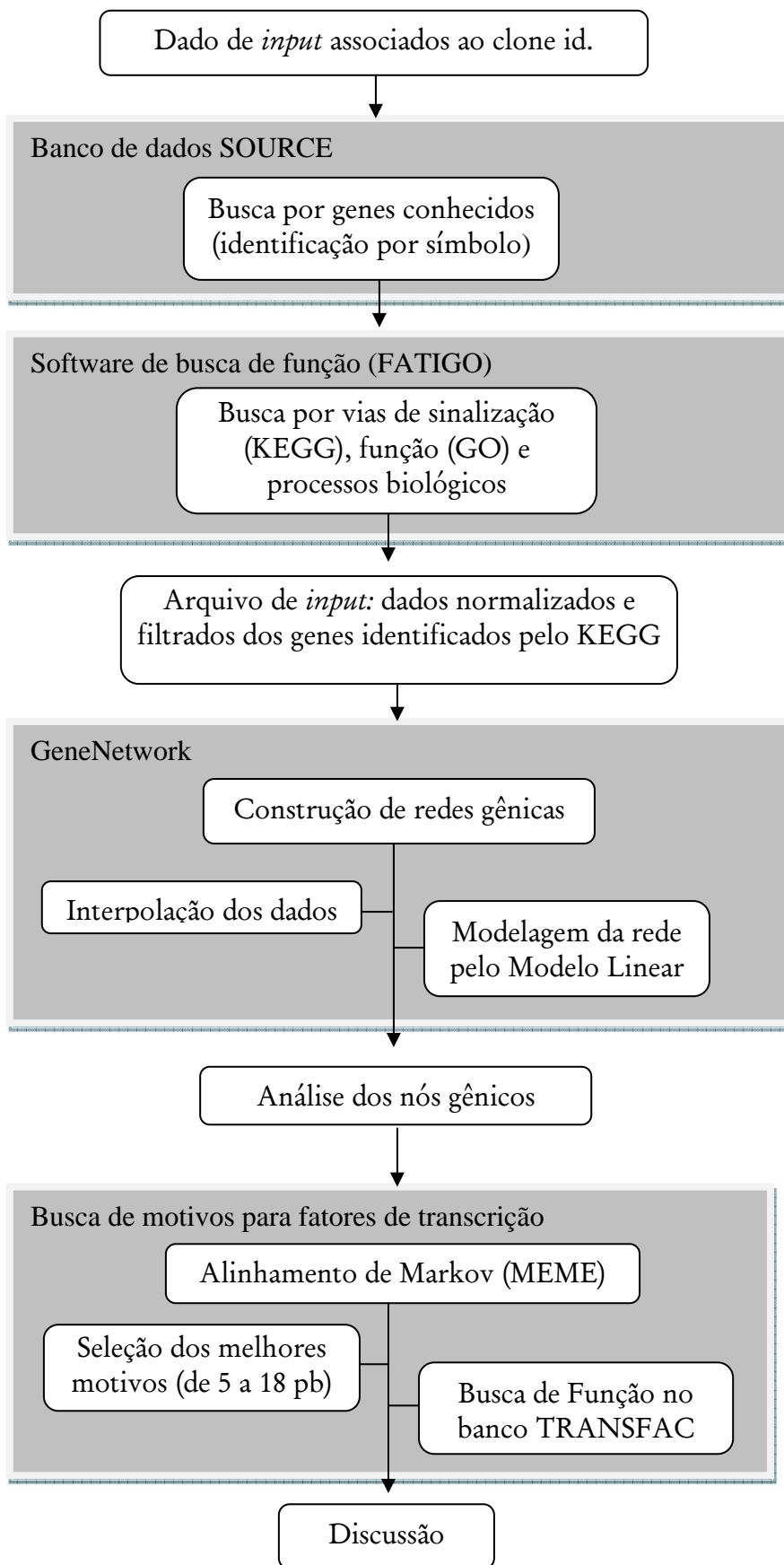
4. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E PIPELINE DA ANÁLISE *IN SILICO*

4.1 Delineamento experimental



4.2. Pipeline da Análise *in silico*





Material e Métodos

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Cultura de células-tronco mesenquimais e indução de diferenciação em osteoblastos

5.1.1. Aspectos éticos e população de estudo

As células de medula óssea humana foram obtidas a partir de descartes de aspirados de medula obtidos a partir de três doadores saudáveis originários da população urbana da região de Ribeirão Preto, SP, gentilmente cedidos pela Profa. Dra. Belinda Pinto Simões do Serviço de Transplante de Medula Óssea do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP. As células de cordão umbilical foram obtidas após o consentimento de doação de cada gestante, gentilmente cedido pelo Serviço de Ginecologia e Obstetrícia da Santa Casa de Ribeirão Preto. Também foram utilizados três doadores saudáveis originários da população urbana da região de Ribeirão Preto, SP.

Este trabalho foi realizado com aprovação do Comitê de Ética Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, USP, mediante esclarecimento e com termo de consentimento assinado pelos doadores (anexo A).

5.1.2. Processamento da medula óssea e do cordão umbilical e obtenção das células-tronco mesenquimais.

As células coletadas da medula óssea foram provenientes do material retido no filtro durante o procedimento hospitalar, não sendo, portanto, utilizadas para o transplante dos pacientes. O descarte foi recolhido no centro cirúrgico em meio de transporte, composto de α -MEM (Minimum Essential Medium Eagle Alpha Modification – Sigma) acrescido de 500

$\mu\text{g/mL}$ gentamicina (Sigma) e $3 \mu\text{g/mL}$ anfotericina B (Sigma) e transportado para o Laboratório de Imunogenética Molecular no Departamento de Genética FMRP USP. As suspensões de células foram centrifugadas a $2000 \times g$ por 5 minutos e o meio de transporte removido. As células foram ressuspensas em meio essencial mínimo (α -MEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco), $50 \mu\text{g/mL}$ gentamicina e $0,3 \mu\text{g/mL}$ anfotericina B), colocadas garrafas de cultura de 75 cm^2 (Corning).

As células provenientes de cordões umbilicais de aproximadamente 10 cm de comprimento também foram recolhidas em meio de transporte como descrito acima. A veia umbilical foi cateterizada e lavada internamente com PBS e sua extremidade distal fechada por meio de clampe. A veia foi então preenchida com 1% de colagenase tipo II (Sigma) em PBS e a extremidade proximal também clampada. Seguiu-se imersão em PBS a 37°C por 30 min (banho-maria) e a solução de colagenase foi drenada. As células das camadas endoteliais e subendoteliais foram coletadas por lavagem com meio de cultura α -MEM e 20% de soro fetal bovino. A suspensão de células foi centrifugada por 5 minutos a $2000 \times g$ e o pellet foi ressuspenso em meio α -MEM, 20% de soro fetal bovino, $50 \mu\text{g/mL}$ de gentamicina, $0,3 \mu\text{g/mL}$ anfotericina B.

As células de medula óssea ou de cordão umbilical foram então cultivadas em meio de cultura α -MEM e 20% de soro fetal bovino, em garrafas de cultura de 25 cm^2 em incubadora a 37°C com atmosfera de 5% CO_2 . Após a confluência, as células foram destacadas com tripsina 0,25% (Gibco) e EDTA 20mM, lavadas em PBS, ressuspensas em meio de cultura e cultivadas em garrafas de 75 cm^2 até atingirem a confluência trocando-se o meio de cultura a cada três dias.

5.1.3. Indução da diferenciação em osteoblástica

A indução química de diferenciação em osteoblastos foi conseguida pela adição de dexametasona 10^{-7} M (Sigma), $5\mu\text{g/mL}$ de ácido ascórbico (Gibco) e $2,16\text{g/mL}$ de β -glicerofosfato (Sigma) ao meio de cultura. Estas condições de cultura induzem a diferenciação osteoblástica de células mesenquimais indiferenciadas (ROSA & BELOTI, 2003; COELHO *et al.*, 2000; PITTENGER *et al.*, 1999, CHENG *et al.*, 1994).

5.2 Ensaio celulares e bioquímicos para confirmação da osteogênese

Para o monitoramento da osteogênese foram analisados os seguintes parâmetros: ensaios de proliferação e viabilidade celular, determinação de proteínas totais e atividade de fosfatase alcalina (ALP), além de avaliação da produção da matriz mineralizada pelas células com fenótipo de osteoblastos.

Para tais ensaios as células foram colocadas em placas tipo multiwell (24 poços) na proporção de 2×10^4 células/poço e cultivada em meio essencial mínima e meio de diferenciação em estufa com atmosfera de 5% de CO_2 a 37°C . Todos os ensaios foram feitos em quintuplicata.

5.2.1. Ensaio de Proliferação e Viabilidade celular

Ao final de 7, 14 e 21 dias em cultura, as células foram destacadas com tripsina 0,25% e EDTA 20mM, coradas com corante azul de Tripán 1% na proporção 1:2 e contadas em câmara de Neubauer para avaliação da viabilidade celular.

A viabilidade celular foi expressa como porcentagem de células viáveis com relação ao número total de células contadas. Foram consideradas inviáveis aquelas células cuja coloração mostrou-se azulada ao microscópio óptico, indicando que a integridade da membrana plasmática foi alterada, o que permitiu a entrada do corante na célula.

5.2.2. Determinação de proteínas totais

A dosagem de proteínas totais foi realizada após 7, 14 e 21 dias em cultura, empregando o método de Lowry. O meio de cultura dos poços foi removido e os mesmos foram lavados três vezes com PBS aquecido a 37°C e preenchidos com 2mL de água deionizada. As placas foram colocadas por 20 minutos a -20°C e, posteriormente, 15 minutos a 37°C por 5 vezes para lise celular.

Após os ciclos de lise, as células foram homogeneizadas e foi adicionado 1mL de solução de Lowry (Sigma) e deixados em repouso à temperatura ambiente por 20 minutos. Após esse período, foi adicionado a cada tubo 0,5mL da solução de reagente de Folin-Ciocalteu (Sigma) e novamente deixados em repouso à temperatura ambiente por 30 minutos, para permitir o desenvolvimento de coloração. Em seguida, a absorbância de cada tubo foi medida em um espectrofotômetro (Ultrospect 2100, GE Healthcare) utilizando o comprimento de onda de 680 nm e a concentração de proteínas totais foi expressa em µg/mL, baseando-se em uma curva padrão preparada com soroalbumina bovina.

5.2.3. Medida da atividade de fosfatase alcalina (ALP) por reação enzimática

A atividade de ALP foi medida após 7, 14 e 21 dias em cultura, utilizando o kit Fosfatase alcalina (Labtest, São Paulo, Brasil). Em cada tubo de ensaio foram colocados 0,5

mL de solução de tampão alcalino mantidos em banho a 37°C. Um volume de 50 µl do reagente 1 (substrato timolftaleína monofosfato) foi acrescentado em todos os tubos e incubados por 5 minutos. Acrescentou-se 50 µl das amostras e solução padrão (45 U/L) nos respectivos tubos. Após incubação por 10 minutos adicionou-se 2 mL do reagente de cor às reações. Estas foram lidas utilizando o comprimento de onda de 590 nm e a determinação da fosfatase alcalina foi calculada segundo a equação:

$$FA (U/L) = \frac{\text{Abs teste} \times 45}{\text{Abs Padrão}}$$

5.2.4. Avaliação imunocitoquímica de fosfatase alcalina (ALP)

As células foram cultivadas durante 7 dias sobre lamínulas Thermanox (Nunc) acondicionadas em placas de 24 poços (TPP), distribuídas em dois grupos; meio mínimo α -MEM com 10% de soro fetal bovino e meio de diferenciação MTS com 10%. As células foram fixadas às lamínulas com paraformaldeído 4% em PBS por 10 minutos, e depois lavadas em PBS. A permeabilização foi feita com solução de Triton X-100 a 0,5% em PBS por 10 minutos, seguida de bloqueio com leite desnatado a 5% em PBS por 30 minutos.

Uma solução 1:100 de anticorpo primário (Monoclonal Hybridoma B4-78, Developmental Studies Hybridoma Bank, Iowa City, IA), o qual reconhece a isoforma bone/liver/kidney da fosfatase alcalina foi gotejada sobre a lamínula seguindo-se incubação em atmosfera úmida por 1 hora a temperatura ambiente. Em seguida procedeu-se a lavagem em PBS por três vezes e incubou-se com solução 1:200 de anticorpo secundário marcado com Alexa Fluor 594 (Molecular Probes).

Para a visualização do citoesqueleto (actina) e dos núcleos de células aderidas foram utilizados, respectivamente, faloidina conjugada com Alexa Fluor 488 diluído 1:200 (Molecular Probes) e DAPI diluído 1:300 (Molecular Probes). Após montagem das lamínulas com meio de montagem ProLong Antifade (Molecular Probes), as marcações foram analisadas sob epifluorescência em microscópio de luz (Leica).

5.2.5. Formação de matriz mineralizada

Células-tronco mesenquimais derivadas de medula óssea e cordão umbilical foram cultivadas poços de placas multiwell em meio de diferenciação MTS com 10% de soro fetal bovino e, ao final de 21 dias em cultura, o meio foi removido, os poços foram lavados três vezes com PBS aquecido a 37°C e preenchidos com solução de formalina 10%. Em seguida, o material dos os poços (células aderidas com matriz mineralizada) foi desidratado em série de concentrações crescentes de etanol (30% a 96%).

A matriz mineralizada foi corada com Alizarin red S (Sigma) 20 mg/mL pH 4,2 por 10 minutos, que evidencia em vermelho os nódulos de mineralização, ricos em cálcio. Finalmente, os poços foram lavados em água deionizada e fotografados em microscópio invertido em aumento de 40X.

5.3. Extração de RNA Total

As células-tronco mesenquimais mantidas em cultura correspondentes aos quatro grupos segundo cada origem (medula óssea ou cordão umbilical): indiferenciadas (cultivadas em meio essencial mínimo), diferenciadas (cultivadas em meio de diferenciação) durante 24

h, 48 h, e 7 dias, foram removidas das garrafas de cultura com solução contendo tripsina 0,25% e EDTA 20 mM, lavadas em PBS e contadas com auxílio de microscópio e câmara de Neubauer com corante azul de tripan 1% na proporção 1:2.

As células foram divididas em tubos eppendorf contendo até 10^6 células/tubo e submetidas ao procedimento de extração de RNA total utilizando o *kit SV Total RNA Isolation System* (Promega), seguindo as instruções do fabricante. Os passos desse protocolo incluem: purificação do RNA, tratamento com DNase e eluição do RNA. Todas as manipulações com RNAs foram realizadas com luvas cirúrgicas descartáveis e sem talco.

As amostras foram precipitadas com três volumes de isopropanol gelado e incubadas a -20°C por 18 horas e então centrifugadas a $12000 \times g$ por 10 minutos. O precipitado de RNA foi lavado com etanol 75% em $15 \mu\text{L}$ de água mili-Q previamente tratada com dietil-pirocarbonato (DEPC).

5.3.1. Quantificação do RNA total

O precipitado de RNA total foi dissolvido em água deionizada e previamente tratada com DEPC e uma alíquota dessa solução foi diluída 100X e submetida a dosagens em espectrofotômetro usando luz ultravioleta (GENEQUANT –PHARMACIA BIOTECH). As dosagens tiveram como base a seguinte estimativa: $1\text{U de } A_{260} = 40\mu\text{g RNA/mL}$.

O grau de pureza foi avaliado pelas razões entre absorbâncias $A_{260}/A_{280} = 1,8$ a $2,0$, indicando que a preparação estava livre de proteínas e $A_{260}/A_{230} = 1,8$ a $2,0$, indicando que livre de fenol e/ou guanidina.

A integridade das preparações foi avaliada por meio de eletroforese denaturante em gel de agarose, corado com brometo de etídeo, seguindo protocolo convencional.

5.4. RNA de referência ou pool de referência a partir de linhagens de células humanas.

Nos experimentos com cDNA microarrays utilizamos um padrão de RNA considerado como “RNA de referência” ou pool de referência, o qual foi preparado misturando quantidades iguais de amostras de RNA de linhagens de células humanas de origens diferentes.

Foram utilizadas para composição desse pool, quatro linhagens celulares: 1) linhagem tumoral de cérebro humano (astrocitoma) U343 MG-a gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Carlos Gilberto Carlotti Jr (Depto de Cirurgia-FMRP-USP) a qual foi cultivada em meio de cultura HAM F10 + DMEM suplementado de 15% de SBF, 2) a linhagem tumoral de carcinoma de colo de útero Hela foi cultivada nas mesmas condições, 3) a linhagem tumoral de laringe Hep2 cedida pelo Prof. Dr. Eurico de Arruda Neto (FMRP-USP) e 4) A linhagem linfocítica Jurkat cedida pela da Profa. Dra. Enilza Maria Espreafico (FMRP-USP), foram cultivadas em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de SBF.

É importante salientar que o RNA de referência não corresponde ao controle experimental que neste caso foi RNA extraído de células-tronco indiferenciadas. O RNA total dessas linhagens foi preparado e quantificado como já descrito e, para a preparação do pool de referência, as amostras de RNA foram misturadas em quantidades iguais.

5.5. Eletroforese de amostras de RNA em gel de agarose sob condições denaturantes

5.5.1. Preparação do gel de agarose com formaldeído (denaturante)

Um volume de 70 mL de agarose (1,5 %) fundida à quente foi misturado a 20 mL de formaldeído 37% e mais 22 mL de tampão de migração 5X concentrado (20,6g de MOPS

[ácido propano sulfônico 3-(N-morfolino)], dissolvidos em 800 mL de acetato de sódio 50mM, pH 7,0 ajustado com NaOH 2N e adicionado 10 mL de EDTA 0,5M pH 8,0; volume final ajustado para 1000mL). O gel foi solidificado em suporte de acrílico para eletroforese.

Importante: Esse suporte foi previamente tratado com NaOH 0,5M por 10 min e em seguida lavado com água Milli-Q autoclavada para eliminação de eventual contaminação com RNAses.

5.5.2. Preparação das amostras de RNA para denaturação

As amostras de RNA foram denaturadas em tubos tipo Eppendorf contendo 4,5 µL de solução de RNA (cerca de 3 µg RNA); 2,0 µL de tampão MOPS 5X; 3,5 µL de formaldeído 37% e 10,0 µL de formamida. A solução foi incubada por 15 minutos a 65°C, sendo colocada imediatamente em banho de gelo. Foi adicionado a essa solução 1,0 µL de brometo de etídeo diluído 3:1 (solução estoque 10mg/mL) e 2,0 µL de dye loading solution (1/10 do volume) e aplicadas aos pocinhos do gel de agarose. A eletroforese foi realizada a 80V durante 90 minutos, as bandas das espécies de RNA foram visualizadas em transiluminador UV, fotografadas utilizando uma câmera fotográfica digital Canon EOS Rebel Digital 350 D 8 Mega Pixels e as imagens foram transferidas a um microcomputador.

5.6. Reações de RT-PCR semi-quantitativa (SQ-PCR) para análise da expressão dos marcadores da osteogênese

A expressão quantitativa dos genes (mRNAs transcritos) marcadores clássicos da osteogênese: fosfatase alcalina (ALPL; NM_000478.3), colágeno tipo I (COL1A1; NM_000088.3), osteocalcina (BGLAP; NM_199173.2), osteopontina (SPP1;

NM_001040058.1; NM_000582.2 e NM_001040060.1) e RUNX2/Cbfa-1 (NM_001024630.2; NM_001015051.2 e NM_004348.3) foram analisadas por meio de reações de RT-PCR semi-quantitativa, utilizando-se a estratégia de realização de reações de PCR partindo de diferentes diluições (1:2 a 1:2048) de amostras de cDNAs sintetizadas a partir de RNA total das células-tronco de cordão umbilical e de medula óssea, tanto de células indiferenciadas, quanto submetidas ao processo de diferenciação. O gene (mRNA) GAPDH (NM_002046.3) foi também analisado e considerado como constitutivo. Os oligonucleotídeos primers foram desenhados com auxílio do software Primer3 (http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi) e todos os transcritos alternativos foram considerados. Observou-se também a posição de cada um dos primers (*forward* e *reverse*) para que estivessem posicionados em exons diferentes de cada um dos respectivos genes.

Dois microgramas de cada amostra de RNA total foram copiadas em cDNAs utilizando a enzima transcriptase reversa Superscript II® (Invitrogen). Dois microlitros do produto de reação (cDNAs) foram utilizados em reações de PCR em diluições sucessivas (1:2 a 1:2048) para cada variável estudada.

Os primers específicos de cada gene (mRNAs) estão indicados na Tabela 1. Um volume final de 25 µl, contendo 2µl de cDNA puro ou diluído, 1µl de dNTP 20 mM, 1µl de cada primer 10 µM, 0,5 µl de Taq DNA polimerase (Invitrogen), 2,5 µl de tampão 10X (Invitrogen), 17 µl de água mili-Q DEPC, foi submetido a PCR. Para todos os genes marcadores da osteogênese foram realizados os seguintes passos: (30 X) desnaturação a 94°C, 30 segundos; anelamento a 57°C, 30 segundos; extensão a 72°C, 30 segundos. Para o gene constitutivo GAPDH: desnaturação a 94°C, 30 segundos; anelamento a 60°C, 30 segundos; extensão a 72°C, 30 segundos.

Os produtos de PCR foram resolvidos por eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão TAE 1X com brometo de etídeo. Após 2 horas de eletroforese a 80V, o gel foi visualizado e fotografado.

Tabela II. Oligonucleotídeos *primers* para PCR semi-quantitativa e o tamanho do fragmento amplificado.

Gene	Sequência dos <i>primers</i>	Produto PCR (pb)
GAPDH (For)	5'-CTGCACCACCCAAGTCTTA-3'	296
GAPDH (Rev)	5'-CATGACGGCAGGTCAGGTC-3'	
ALPL (For)	5'-CCACGTCTTCACATTTGGTG-3'	196
ALPL (Rev)	5'-AGACTGCGCCTGGTAGTTGT-3'	
COL1A1 (For)	5'-GTGCTAAAGGTGCCAATGGT-3'	228
COL1A1 (Rev)	5'-CTCCTCGCTTTCCTCCTCT-3'	
RUNX2 (For)	5'-CCTTGGGAAAAATTCAAGCA-3'	181
RUNX2 (Rev)	5'-AACACATGACCCAGTGCAAA-3'	
BGLAP (For)	5'-GGCAGCGAGGTAGTGAAGAG-3'	230
BGLAP (Rev)	5'-CTGGAGAGGAGCAGAACTGG-3'	
SPP1 (For)	5'-GCCGAGGTGATAGTGTGGTT-3'	242
SPP1 (Rev)	5'-GTGGGTTTCAGCACTCTGGT-3'	

5.7. Preparação de cDNA microarrays em lâminas de vidro

5.7.1. Clones da biblioteca de cDNA humana (IMAGE)

Os microarrays deste trabalho foram preparados com 4.500 clones de cDNA provenientes da coleção do IMAGE (*Internacional Molecular Analysis of Genomes and their*

Expression) (LENNON *et al.*, 1996), os quais foram gentilmente cedidos pela Dra. Catherine Nguyen do INSERM de Marseille-Luminy (U928, Marseille, França). Essa biblioteca é composta de clones com seqüências de ESTs (*Expressed Sequence Tags*) provenientes de 229 tecidos humanos, com comprimentos que variam de 0,5 a 1,5 kb, sintetizados a partir da porção 3' do mRNA, clonados em três vetores diferentes (Lafmid, Bluescript e pT7T3) e seqüenciados. Essa biblioteca está conservada em placas de microtitulação (384 *wells*) a -80°C no Laboratório de Imunogenética Molecular do Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP com o Dr. Geraldo A. S. Passos.

As seqüências depositadas no microarray utilizadas nesse trabalho, bem como as informações como clone ID, o nome do gene e a função estão disponíveis *online* no endereço URL (www.rge.fmrp.usp.br/passos/hs_array). Os genes selecionados para constituição do microarray utilizado representam diversas vias de sinalização celular, os principais processos biológicos e câncer.

5.7.2. Amplificação de cDNA para confecção dos microarrays

Os clones de *E. coli* da biblioteca de cDNA IMAGE humana foram repicados em placas de 96 *well*, contendo meio de cultura 2X LB + ampicilina foram incubados durante 16 horas. A seguir uma alíquota de 10 µl da cultura foi transferida para uma outra placa com fundo em “U” de 96 *well* contendo 90 µl de água deionizada estéril e esta placa incubada a 95°C por 10 minutos para lise das células. Após centrifugação a 4.000xg por 5 minutos em uma centrífuga de placas Eppendorf, foram retirados 10µl do sobrenadante os quais foram misturados com 40 µl de um *mix* para PCR contendo tampão da reação de PCR (10X), solução de dNTP (2mM), *primers* com seqüências consenso aos três vetores presentes na biblioteca (10µM), *primer* LBP 1S

(5'TGTGGATTGTGAGCGGATAA3') e *primer* 1AS (5'GGGTTGAATTAGCGGAACG3'), Taq polimerase (5U/ μ L) e água deionizada estéril q.s.p. 50 μ L. O programa para amplificação dos insertos tem como base aquele descrito por Menossi *et al* (2000) e foi realizada em um aparelho Master Cycler Gradiente (Eppendorf) em placas de PCR seladas com adesivo para evitar evaporação.

Para avaliar a qualidade da amplificação dos insertos foi realizada eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão TAE 1X (Tris-acetato 0,04 M, EDTA 0,001 M) contendo brometo de etídeo (10 mg/mL) a 80V, durante 30 minutos. A visualização das bandas foi realizada utilizando transiluminador U.V. e os géis foram fotografados.

5.7.3. Purificação dos produtos de PCR dos clones de cDNA

A remoção dos debrís celulares (células de *E. coli* rompidas) e dos *primers* utilizados nas reações de PCR utilizamos a precipitação dos insertos de cDNA com etanol (HEDGE *et al.*, 2000). Os produtos de PCR (50 μ l) foram transferidos para placas de cultivo com fundo em "U" e adicionados de 5 μ l de acetato de sódio 3M pH 4,8 e 125 μ l de etanol absoluto. As placas foram incubadas por 16 horas a -20 °C e centrifugadas a frio e a 4.000xg por 60 minutos. O sobrenadante foi recolhido por aspiração com pipeta multicanal e o "pellet" foi ressuspenso em 175 μ l de etanol 70%, as placas foram centrifugadas novamente a 4.000xg por 30 min. O sobrenadante foi aspirado e o "pellet" foi seco a temperatura ambiente por 20 min e dissolvido em 12 μ l de água deionizada autoclavada. Uma alíquota de 2 μ l desta solução foi analisada por eletroforese em gel de agarose convencional, corada com brometo de etídeo para avaliar a qualidade dos produtos amplificados.

As placas foram secas em forno a 42°C e adicionou-se 27 μ l de solução (DMSO 50% - dimetil sulfóxido) por poço da placa. Em seguida as placas foram levadas ao freezer -20°C.

Os clones de cDNA (produtos de PCR) foram transferidos para as placas do robô e estocadas a 4°C até a deposição dos produtos de PCR em lâminas de vidro.

5.7.4. Confecção das lâminas de microarrays

Neste projeto utilizamos lâminas especiais para microarrays provenientes da Corning (Ultra-Gaps 40015).

Amostras de produtos de PCR purificados foram preparadas para deposição em lâminas de vidro adicionando-se mesmo volume (1:1) de reagente D (GE Healthcare) e transferidas para microplacas de 384 “well” próprias do robô (Genetix). Por meio do robô *Array Spotter Generation III* (Amersham Molecular Dynamics), as amostras foram depositadas sobre as lâminas por meio de um conjunto de 12 agulhas que depositam cada uma um volume de 0,9 nL da amostra baseada na ação de capilaridade na superfície das lâminas de vidro.

Após a deposição de cada conjunto de amostras as agulhas foram lavadas automaticamente em uma estação de lavagem que utiliza sucessivamente água purificada (18 megohm), etanol absoluto (Merck), solução 0,2 M de KOH e água novamente. As agulhas foram secas com jato de nitrogênio antes das próximas amostras serem carregadas. A câmara de deposição das amostras em lâminas do *Array Spotter Gen III* possui temperatura e umidade controladas. A umidade relativa de deposição das amostras permaneceu bem próxima de 55% e a temperatura em torno de 25 °C. Após a deposição e secagem de todas as amostras nas lâminas, os pontos contendo as seqüências de cDNA (também chamados de *spots*) foram fixados por *cross-linking* irradiando com 500 mJ de energia UV (Hoefer UV Crosslinker).

5.8. Delineamento das hibridações com os microarrays

Uma escolha chave em um projeto que envolve a tecnologia de microarray é definir as comparações que podem ser diretas ou indiretas isto é, estabelecer respectivamente comparações intra ou entre as lâminas. Existem três principais tipos de delineamento: 1) inversão de corantes (*dye-swap*), 2) experimentos em volta (*looping*) e 3) RNA de referência (Figura 9). Mas cabe salientar que não existe um delineamento experimental ideal para todas as situações, ou seja, diferentes desenhos experimentais são necessários para contextos experimentais diferentes. Qualquer que seja o tipo de desenho utilizado será requerido o mesmo número de hibridações, e a decisão sobre o tipo de delineamento deve considerar, antes de tudo, a pergunta do trabalho.

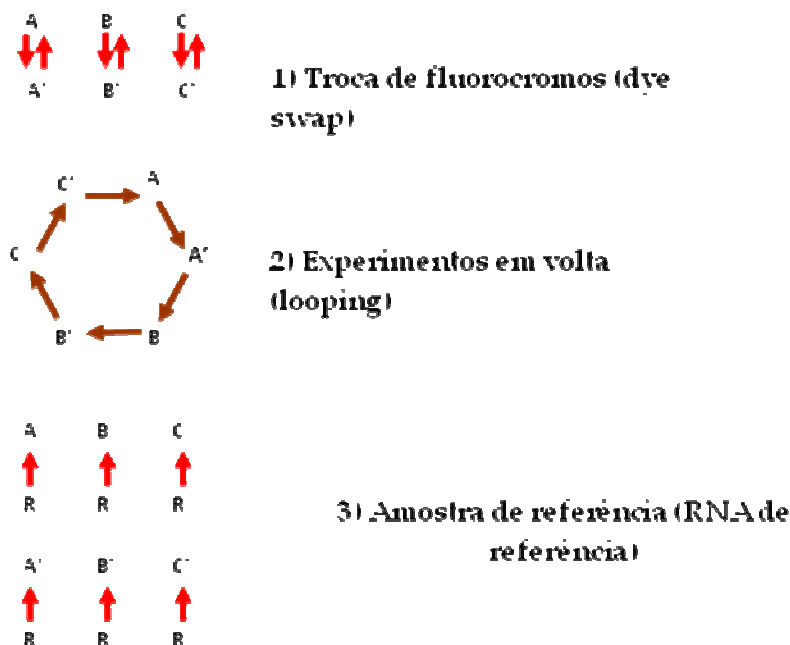


Figura 7. Esquema dos principais tipos de delineamento experimental para *microarrays*. A, B e C- amostras controle; A',B' e C'- amostras teste; R – pool de RNA de referência.

Fonte:

Ensaio de co-hibridação diferencial usando *microarrays* medem a expressão gênica relativa de amostras emparelhadas e de uma amostra referência, sendo que o poder da análise de microarray vem da identificação de padrões informativos de expressão de um gene por meio das experiências múltiplas. O cumprimento destes objetivos é facilitado usando uma amostra de referência comum para todos os experimentos que forneça uma medida da expressão base para cada gene, permitindo a normalização e a comparação de experimentos independentes.

Para fornecer a cobertura ótima dos genes depositados em lâmina, as amostras de referência são freqüentemente constituídas a partir de um grande número de linhagens celulares de vários tecidos diferentes. Um exemplo é o RNA referência humana universal comercializada pela Stratagene (<http://www.stratagene.com>).

Esta referência consiste em quantidades equimolares de RNA de dez linhagens celulares de tumores de tecidos diferentes (linfócitos B, mama, cérebro, cérvix, fígado, linfócitos, macrófagos, pele, linfócitos T e testículos). Entretanto, dez se mostrou um número excessivo de linhagens e, ao invés de garantir representatividade total de transcritos, pode ocasionar até uma “diluição” destes em termos de resultados globais. Conseqüentemente, misturar muitas linhagens celulares pode diluir os transcritos raros de modo que a sua representação no “pool” final do RNA esteja abaixo do limite detectável (YANG *et al.*, 2002).

O uso do RNA de referência passou a ser uma abordagem bastante adequada eliminando assim a necessidade de repetir as marcações de uma mesma amostra com dois corantes (*dye-swap*) e, conseqüentemente evitando as diferenças de incorporação.

Portanto, foi escolhido neste trabalho o RNA referência, produzido a partir de quatro tipos celulares humanos distintos (astrocitoma cerebral, útero, laringe e linfócitos a partir de sangue periférico e linhagem linfocítica). O delineamento experimental utilizando o RNA de

referência consiste em marcar as amostras de pacientes e controles com Cy3 e combiná-los numa mesma lâmina com amostras de RNA de referência marcados com Cy5.

As hibridações com cDNA oriundos de RNA de referência são importantes para os cálculos de normalização, pois reflete a estimativa da quantidade de material depositado em cada ponto do *microarray* (alvo).

5.9. Marcação das sondas de cDNA com fluorocromos Cy3 e Cy5

Amostras de RNA total foram copiadas em cDNAs e marcadas utilizando o *kit Cyscribe Post-Labeling* (GE Healthcare, EUA) que envolve a preparação do cDNA em dois passos. No primeiro passo ocorre a síntese da primeira fita de cDNA com a incorporação de nucleotídeos amino-alil dUTP modificados, com posterior degradação da cadeia de mRNA e purificação do cDNA para remoção de nucleotídeos livres e oligômeros. No segundo passo, o cDNA é marcado com formas reativas de ésteres NHS Cy3 e Cy5 que se ligam aos nucleotídeos modificados e após um processo de purificação para eliminação dos CyDye não incorporados a sonda está pronta para hibridação.

5.9.1. Preparação da primeira fita de cDNA por incorporação de AAdUTP

Em um tubo tipo Eppendorf imerso em banho de gelo foram adicionados 10 µg de RNA total, 1µl de *primer* randômico, 3 µl de oligo (dT) e 0,5 µl de controle denominado *spike mix* para o *Universal ScoreCard* em um volume total de 11µl (proporção de 2 µl de *spike mix* para cada 1µg de RNAm marcado). A reação foi misturada cuidadosamente e incubada a 70°C por 5 min, sendo posteriormente resfriada a 4°C durante 5 min. A extensão da cadeia de cDNA foi realizada utilizando 4 µl de tampão 5X CyScript , 2µl de DDT 0,1 M, 1µl de

nucleotídeo “mix”, 1µl de AA-dUTP (a quantidade de um tubo contendo AA-dUTP liofilizado será ressuspensão em 30µl de água livre de nucleases e mantido a -20°C até o uso), 1µl de transcriptase reversa CyScript, em um volume final de reação de 20 µl. A reação foi incubada a 42°C por 1,5 hora. Em seguida, a degradação dos RNAm adicionando 2 µl de NaOH 2.5 M com incubação a 37°C durante 15 min, e 20µl de HEPES 2M.

5.9.2. Purificação do cDNA com colunas de purificação CyScribe GFX

Para cada amostra de cDNA com volume entre 20 a 100 µl foram adicionados 500µl de solução “capture buffer” em uma coluna de purificação GFX colocada dentro de um tubo coletor. O produto de cDNA marcado com aminoalil não purificado foi adicionado à coluna e misturado 5 vezes. A centrifugação foi feita a 13800 xg por 30 seg. A coluna foi retirada e o líquido contido no tubo coletor foi descartado. A coluna foi novamente colocada no tubo coletor e foram adicionados 600µl de etanol 80%. A centrifugação foi feita a 13800 xg por 30 s. A coluna foi retirada e o líquido contido no tubo coletor foi descartado. Esta lavagem foi repetida mais duas vezes. Uma nova centrifugação foi feita a 13800 xg por 10 s. para retirada do excesso de etanol 80% da amostra. O tubo coletor foi descartado e a coluna contendo o cDNA foi colocada em um tubo de 1,5 µl. Foi adicionada a coluna 60 µl de bicarbonato de sódio 0,1 M pH 9,0 e incubado durante 5 minutos. O material foi centrifugado a 13800 xg por 1 min.

5.9.3. Incorporação de Cy3 e Cy5

A amostra de cDNA marcada com amino-alil purificada foi adicionada a um tubo com a alíquota de CyDye NHS éster e ressuspensão várias vezes. O material foi centrifugado a

13.800xg por 1 min e incubado no escuro durante 1 hora. Adicionou-se 15 µl de hidroxilamina 4M seguida de incubação no escuro durante 15 min a temperatura ambiente. Os cDNAs marcados também foram purificados com as colunas GFX.

5.9.4. Purificação do cDNA marcado com CyDye com colunas de purificação CyScribe GFX

Para cada amostra de cDNA com volume entre 20 a 100 µl foram adicionados 500 µl de solução “*capture buffer*” em uma coluna de purificação GFX colocada dentro de um tubo coletor. O produto de cDNA marcado com *CyDye* não purificado foi adicionado à coluna e misturado 5 vezes. A centrifugação foi feita a 13800 xg por 30 segundos. A coluna foi retirada e o líquido contido no tubo coletor foi descartado. A coluna foi novamente colocada no tubo coletor e foram adicionados 600 µl da solução “*wash buffer*”. A centrifugação foi feita a 13800 xg por 30 segundos. A coluna foi retirada e o líquido contido no tubo coletor foi descartado. Esta lavagem foi repetida mais duas vezes. Uma nova centrifugação foi feita a 13800 xg por 10 segundos para retirada do excesso da solução “*wash buffer*” da amostra. O tubo coletor foi descartado e a coluna contendo o cDNA foi colocada em um tubo de 1,5 µl. Foi adicionado a coluna 60 µl da solução “*elution buffer*” pré-aquecido à 65°C e incubado durante 5 minutos. O material foi centrifugado a 13800 xg por 1 minuto.

5.9.5. Quantificação do CyDye incorporado no cDNA

Após a purificação dos cDNAs marcados fizemos a monitoração de incorporação dos fluorocromos por meio de leitura em espectrofotômetro VIS (Ultrospec 2100, Amersham Biosciences) em comprimento de onda a 550 nm para Cy3 e 650 nm para o Cy5 com

amostras diluídas 100X. A quantidade de Cy3 ou Cy5 incorporada no cDNA foi calculada por meio de seu coeficiente de extinção molar $150\,000\text{ l mol}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ para Cy3 e $250\,000\text{ l mol}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ para Cy5. As proporções de Cy3 e Cy5 incorporados no cDNA foram calculados por meio da seguinte fórmula: $(A)/E \times Z \times \text{fator de diluição} \times 10^{12}$, onde:

A= absorvância de Cy3 a 550 nm ou Cy5 a 650 nm

E= coeficiente de extinção para Cy3 ou Cy5 $\times 10^{-6}$

Z= volume (μl) da sonda após purificação

Para hibridações com os dois fluorocromos foram adicionados os cDNA marcado com Cy3 e Cy5 em um tubo de microcentrífuga protegido da luz. A solução de cDNA foi evaporada em um aparelho “Speed Vacuum”. A seguir o cDNA foi dissolvido em 6 μl de água livre de nuclease e denaturado a 95°C por 2 min. A solução foi imediatamente resfriada no gelo por 30 seg. A essa reação adicionamos 1,5 μl de A80 (1mg/ml) e incubamos a 75°C por 45 min, estando assim pronta para o processo de hibridação.

5.10. Hibridação das lâminas de microarrays

As lâminas de microarrays foram hibridadas utilizando um processador automático de lâminas, “Lucidea Automated Slide Processor”—ASP (Amersham Biosciences) que permite a hibridação e lavagens de lâminas em câmaras independentemente controladas. Este aparelho inclui um software que automatiza a injeção de amostras líquidas e soluções de lavagens ou ar dentro das câmaras e possui parâmetros de controle de temperatura e velocidade de injeção e circulação destas soluções no interior das mesmas.

As sondas de cDNA marcadas com Cy3 e Cy5 foram feitas da mesma maneira que no item anterior, e as lâminas foram hibridadas por 15 horas a 42°C. As condições de lavagens foram: 1XSSC/0,2%SDS (2 x 20 seg à temperatura ambiente); 0,1X SSC/0,2% SDS (2 x 20 seg à temperatura ambiente); 0,1X SSC (2 x 20 seg à temperatura ambiente). A última lavagem das lâminas foi feita com isopropanol, sendo em seguida aquecidas à 42°C, e novamente lavagem com isopropanol. Após as lavagens as lâminas foram aquecidas a 60°C para secagem e posteriormente foram colocadas no “Array Scanner” (Amersham Biosciences) para obtenção das imagens.

5.11. Aquisição de imagens de microarrays

As lâminas foram colocadas num aparelho “Array Scanner Gen III” (Amersham Biosciences) e as imagens foram obtidas com feixes de raios laser para as duas cores, o comprimento de onda de excitação do laser de 532 nm para o verde e 633 nm para o vermelho para cada um dos “spots” sobre o microarray. A leitura da lâmina gera dois arquivos com imagens separadas para os dois canais de cores (Cy3 e Cy5) e uma imagem colorida de sobreposição com auxílio do programa *ImageQuant* (Amersham Biosciences).

5.12. Quantificação e normalização dos dados de microarrays

Após obtenção das imagens seguiu-se à análise realizada em duas etapas.

1. Inicialmente, os dados contidos nas imagens foram transformados em dados numéricos, utilizando o programa *Spotfinder* (<http://www.tigr.org/software>). Esse programa, além de transformar as informações das imagens em valores numéricos, também analisa a

qualidade dos pontos e calcula o "background". Dois parâmetros foram considerados para o controle de qualidade neste programa: os pontos de boa qualidade apresentam valores superiores e/ou igual a 1 valor "backgrounds" mais 1 valor desvio padrão.

2. Em seguida, estes dados foram normalizados. A normalização retira os erros experimentais sistemáticos por balancear a intensidade dos dois fluorocromos. Esses erros podem ocorrer devido à diferença de incorporação dos corantes, efeitos espaciais na lâmina e diferenças durante a aquisição das imagens nos dois canais. Para esses ajustes, utilizou-se a plataforma R (www.r-project.org), com os pacotes de programas AROMA (BENGTSSON, 2004), o Limma-Bioconductor (IHAKA; GENTLEMAN, 1996; GENTLEMAN *et al.*, 2004) e o KTH (<http://www.biotech.kth.se/molbio/microarray>) que retém as funções necessárias para a normalização dos dados de *microarrays*. Portanto, após a retirada do background pelo programa *Spotfinder*, os dados foram importados para o ambiente R e transformados para o formato de dados "M versus A", onde M é igual a $\log_2(R/G)$ e A é igual a $1/2 \cdot \log_2(R \cdot G)$. Em seguida, os métodos de normalização "*print-tip Lowess*" e "*absolute median deviation (MAD) re-scaling*" foram aplicados respectivamente. O primeiro método aplica uma regressão linear nos dados, para corrigir erros espaciais que possam ter sido gerados durante os experimentos. O segundo re-escala as razões de log para cada microarray, de maneira que cada slide adquira a mesma distribuição dos dados, de acordo com a MAD, capaz de estimar com robustez a variância de uma amostra.

5.12.1. Nomenclatura dos genes

Neste trabalho, optou-se por seguir a nomenclatura usual para genes humanos, ou seja, o símbolo do gene em inglês com as letras maiúsculas (exemplo: RUNX2). Os nomes dos

genes estão em inglês, pois toda a literatura e os principais bancos de dados internacionais como SOURCE (<http://source.stanford.edu/cgi-bin/source/sourceSearch>) ou GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) estão nesse idioma. Além disso, todos os arquivos da biblioteca de cDNA IMAGE estão em inglês.

5.13. Análise bioinformática dos dados de microarrays

5.13.1. Seleção de processos biológicos de interesse usando bancos de dados

O principal método de análise de dados de expressão gênica do presente trabalho foi o programa de redes gênicas a partir de dados de microarrays GeneNetwork (Wu et al 2004). Para a reconstrução da rede, focamos genes envolvidos nos processos de carcinogênese.

Os critérios para seleção dos genes para composição da rede foram: 1) função conhecida e 2) pertencerem às vias de sinalização e processos envolvidos com o câncer, identificados pelos bancos de dados SOURCE, KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/>) e FATIGO (<http://www.fatigo.org/>).

O banco de dados SOURCE foi utilizado visto que este compila informações de vários outros bancos públicos (UniGene, dbEST, Swiss-Prot, GeneMap99, RHdb, GeneCards e LocusLink) e as disponibilizam de maneira a facilitar a anotação dos genes diferencialmente expressos.

Por meio do símbolo dos genes, como aparece no banco SOURCE, foi feita uma busca dos genes presentes no perfil de expressão de células-tronco oriundas de cordão umbilical e de medula óssea. Esses genes foram utilizados então para as análises do presente trabalho. A lista de genes identificados foi organizada na forma de um arquivo de *imput* para outro

banco de dados, o FATIGO, que fornece informações sobre a anotação dos genes como função, processo biológico, função molecular, e as prováveis vias de sinalização celular apontadas a partir do banco de dados proteicos do KEGG. O FATIGO é muito útil aos estudos de expressão gênica em grande escala por processar centenas de genes de uma só vez.

É interessante ressaltar que apesar do KEGG constituir um banco de dados sobre proteínas e suas respectivas vias, ele oferece pistas para estudos moleculares de maneira geral. Foram utilizadas para construção de redes de interação gênica as vias de sinalização envolvidas com o processo carcinogênico, ciclo celular e apoptose.

5.13.2. Agrupamento hierárquico

Os dados de expressão gênica foram analisados pelo aplicativo *MultiExperiment Viewer* (MEV) desenvolvido pela TIGR. O aplicativo possui módulos analíticos que permitem a visualização dos dados de microarrays, bem como a identificação de genes e padrões de expressão de interesse. Foi empregado neste trabalho o algoritmo Cluster & TreeView, que compara as médias dos diferentes genes cujos desvios padrões não se sobrepõem, para construir um dendrograma que junta todos os elementos (genes e amostras) em uma única árvore (EISEN *et al.*, 1998).

Optou-se pela clusterização hierárquica supervisionada das amostras das variáveis temporais 0h, 24h, 48h e 7 dias para células-tronco originárias do cordão umbilical e da medula óssea, gerando dendrogramas apenas para os genes, estes previamente submetidos a uma filtragem de 80% dos dados. Os valores de expressão gênica foram centralizados pela mediana e transformados em log usando a distância métrica por correlação de Pearson para

clusterização hierárquica supervisionada. Optamos por essa análise por se tratar de um experimento temporal, não sendo, portanto, de interesse a separação das amostras.

Para uma melhor visualização, geramos as medianas dos 6 valores para cada variável temporal de cada material e os unimos em um único *Heatmap*, que esquematiza a similaridade entre os genes de interesse, ou seja, envolvidos com o processo e/ou vias de carcinogênese. Os valores utilizados são os mesmos para a construção das redes gênicas.

5.13.3. Construção de redes de interação gênica

O programa escolhido para a inferência das redes gênicas foi o GeneNetwork (Wu et al 2004) por ser aquele que melhor se aplica aos nossos conjuntos de dados. O GeneNetwork é um software livre e encontra-se disponível *online* no endereço: (<http://genenetwork.sbl.bc.sinica.edu.tw/index.asp>).

O fluxo do trabalho para GeneNetwork é como segue: 1) input dos dados experimentais no formato de texto limitado por tabulações, 2) procede a interpolação dos dados através do controlador de interpolação se o número de pontos de dados experimentais forem insuficientes para iniciar os cálculos de inferência, 3) executar a aproximação de inferência por engenharia reversa usando *Modeling controler* para gerar a matriz gênica regulatória que descreve como os genes que se regulam e 4) extrair automaticamente a rede para a visualização, baseada na matriz regulatória.

Para facilitar a interpretação dos grafos gerados pelo programa GeneNetwork um dos alunos de mestrado de nosso grupo, Guilherme Liberato Silva, desenvolveu uma ferramenta intitulada Mandala, ainda não publicada. Seu algoritmo, escrito em linguagem de programação C, decodifica a matriz regulatória proveniente do GeneNetwork, identificando

as interações gênicas existentes e gerando um resultado apresentado em formato textual. Isso facilita a interpretação das redes obtidas.

5.13.4. Predição de motivos de ligação cis-regulatórios de fatores de transcrição

Depois de realizada a construção das redes gênicas, foi feita uma análise dos genes com mais de 3 interações através do estudo da região *upstream* da sequência dos genes para busca de regiões consenso entre eles, visando a identificação de possíveis padrões regulatórios dentro da rede, bem como os fatores de transcrição putativos que ali se ligariam.

As seqüências gênicas envolvidas nas redes regulatórias foram analisadas quanto a presença de sítios de ligação de fatores de transcrição. Essa análise envolve duas etapas como segue:

- 1) Alinhamento pelo algoritmo de Markov (BAILEY *et al.* 2006) para busca de padrões em comum mais significativos, a partir do software MEME (http://meme.nbcr.net/meme4_1/cgi-bin/meme.cgi). Os padrões dessa busca incluem:
 - Tamanho de 5 a 18 nucleotídeos
 - Ocorrência de no mínimo 30 seqüências
 - Resultado analisado: 10 seqüências com os melhores *Evalue*
- 2) Busca por motivos com função conhecida no banco de dados TRANSFAC (MATYS *et al.* 2003) a partir do software TFscan (<http://www.gene-regulation.com/>).

Outra análise paralela foi realizada com os genes marcadores da osteogênese (COL1A1, BGLAP, SPP1 e ALPL) estudados por PCR semi quantitativa. Realizou-se a busca do sítio de ligação para o fator de transcrição heterodímero RUNX2 e CREB, cuja seqüência é conhecida e bem relatada na literatura (YOSHIDA *et al.* 2002). Sabe-se que o fator de transcrição RUNX2 regula os principais genes da osteogênese e, apesar dos sítios serem descritos na literatura, não encontramos nenhuma análise localizando o sítio de ligação para esse fator na seqüência *upstream* dos genes alvo. Para a análise utilizou-se a ferramenta *RSATtools* (<http://www.rsatools.org>).

5.14. Confirmação dos dados de microarrays por PCR em tempo real

As análises por PCR quantitativa em tempo real foram realizadas utilizando-se da metodologia SYBR Green, de acordo com o fabricante (Applied Biosystems) num aparelho 7500 Real Time PCR (Applied Biosystems).

A primeira etapa do processo consiste na avaliação da especificidade dos produtos de PCR por meio da análise de uma curva de dissociação. Para isso, é realizada quantificação absoluta de cada par de *primers*, inclusive dos genes constitutivos, utilizando diluições seriadas 1:10 a 1:10000 de cDNA para calcular a eficiência da reação e, conseqüentemente, a qualidade dos *primers*. A reação consiste de amplificação seguida da dissociação.

Os valores de *Slope* e de R^2 fornecidos após a construção de uma curva de regressão linear são utilizados para avaliação da eficiência da reação (E) utilizando-se a fórmula $E = 10^{(-1/Slope)-1}$ (*User Bulletin#2, ABI Prism 7700 Sequence Detection System*).

A segunda etapa consiste na reação quantitativa propriamente dita. Dessa forma, foi realizada quantificação relativa para avaliar a expressão gênica em cada amostra e compará-

las entre si. A reação final consiste em 25 μ l, contendo 10 ng de cada *primer*, 1X solução SYBR Green e 2 μ l de cDNA sintetizado a partir de uma quantidade padronizada de RNA total (2 μ g de RNA).

Os *primers* foram desenhados com auxílio do software *Primer3* (http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi) cujos parâmetros foram ajustados para que todos apresentassem temperatura de anelamento a 60°C.

5.14.1 Análise estatística dos dados de PCR em tempo real

É importante notar que a avaliação da expressão dos transcritos por PCR em tempo real ocorre por meio de análise diferente daquela empregada nos dados de microarrays. Os valores de quantificação relativa são calculados utilizando-se a comparação de genes constitutivos, conforme descrito por PFAFFL (2001).

Para a análise estatística dos dados, utilizou-se o teste estatístico *One-way ANOVA* por meio do software estatístico *GraphPad Prism 4.00* (<http://www.graphpad.com/prism/Prism.htm>).

Resultados

6. RESULTADOS

6.1. Cultura de células-tronco mesenquimais e indução de diferenciação em osteoblastos

6.1.1. *Morfologia celular*

Por meio da técnica de imunofluorescência e utilizando-se faloidina conjugada com Alexa-fluor 488 para visualização do citoesqueleto (em verde) e o núcleo marcado com DAPI (em azul), foi possível avaliar as modificações morfológicas ocorridas devido à indução da diferenciação. Além disso, foi feita a localização da enzima fosfatase alcalina utilizando o anticorpo anti h-ALP, (em vermelho), visto esta ser considerada como o principal marcador de osteogênese.

Observou-se que as células-tronco mesenquimais indiferenciadas apresentam formato fibroblastóide, ou seja, com o citoesqueleto disposto de maneira alongada. Durante a indução química, notou-se diferença na morfologia. As células passaram a apresentar um formato poligonal.

Quanto a imunolocalização da fosfatase alcalina, foi possível observar sua presença mesmo nas células indiferenciadas, característica essa mais evidente nas células tronco de medula óssea. Além disso, observamos que a presença de fosfatase alcalina apresentou-se bastante aumentada após o 7^o de indução.

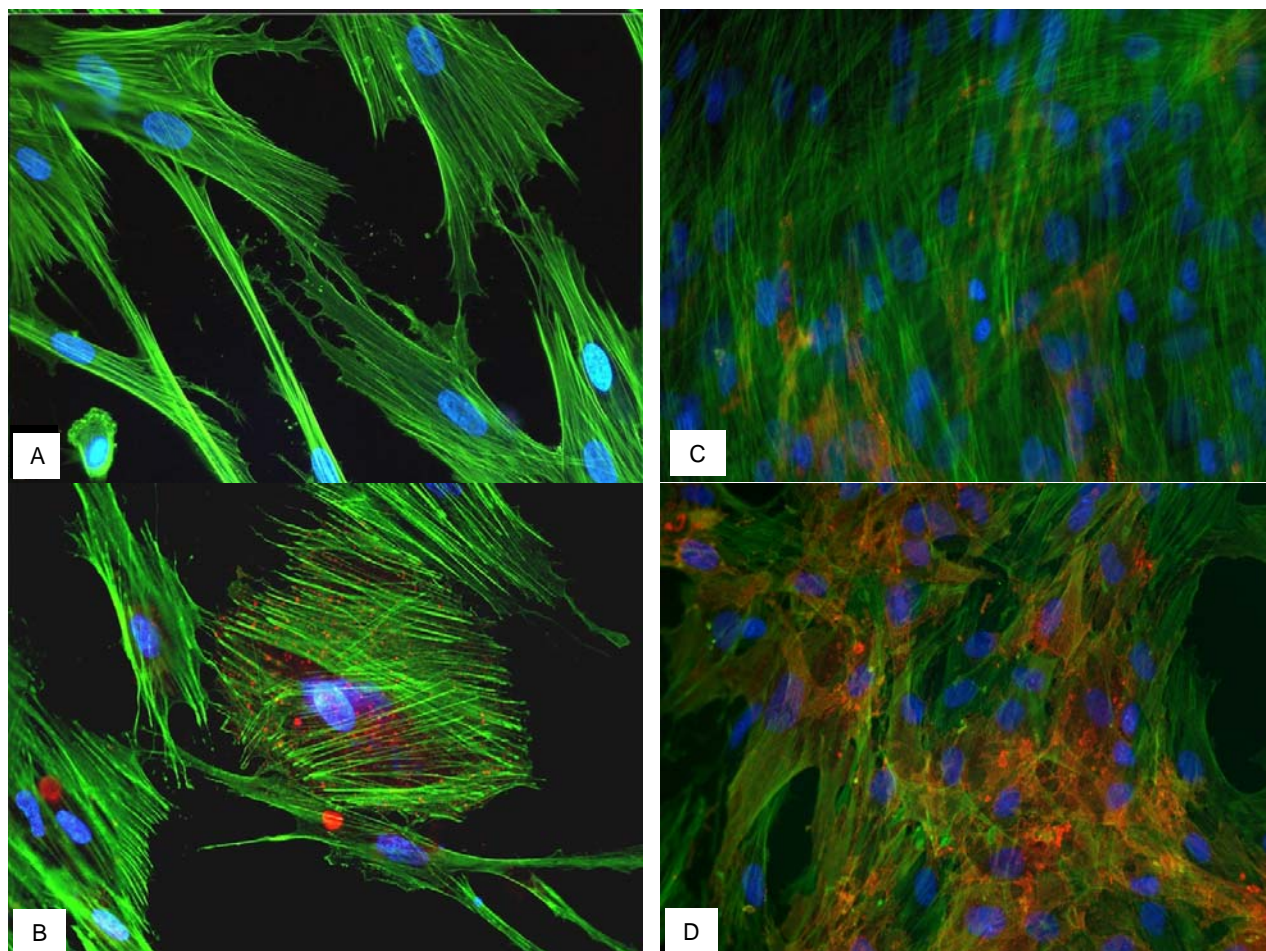


Figura 8. Imunofluorescência de células tronco mesenquimais. Fosfatase alcalina aparece em vermelho (anti-hALP); citoesqueleto aparece em verde e foi marcado com faloidina; núcleo aparece em azul e foi marcado com DAPI. (A) células de cordão umbilical indiferenciada; (B) células de cordão umbilical com 7 dias de indução osteogênica; (C) células de medula óssea indiferenciada; (D) células de medula óssea com 7 dias de indução osteogênica. Microscopia de fluorescência 40X.

6.1.2. Proliferação Celular

Foi avaliada a taxa de proliferação celular ao longo de 7, 14 e 21 dias das células submetidas a indução osteogênica e indiferenciadas utilizadas como controle. As células cultivadas em meio não osteogênico apresentam maior taxa de proliferação do que as células sob indução osteogênica. Isso pode ser visto mais claramente em células de cordão umbilical que apresentam maior taxa de proliferação, (Figura 9). É interessante notar um leve declínio na taxa de proliferação nas células indiferenciadas de cordão umbilical após o

7^o dia de indução osteogênica. Nas células provenientes de cordão umbilical, a diferença foi estatisticamente significativa em todos os períodos observados; já no grupo de medula óssea, não houve diferença estatística.

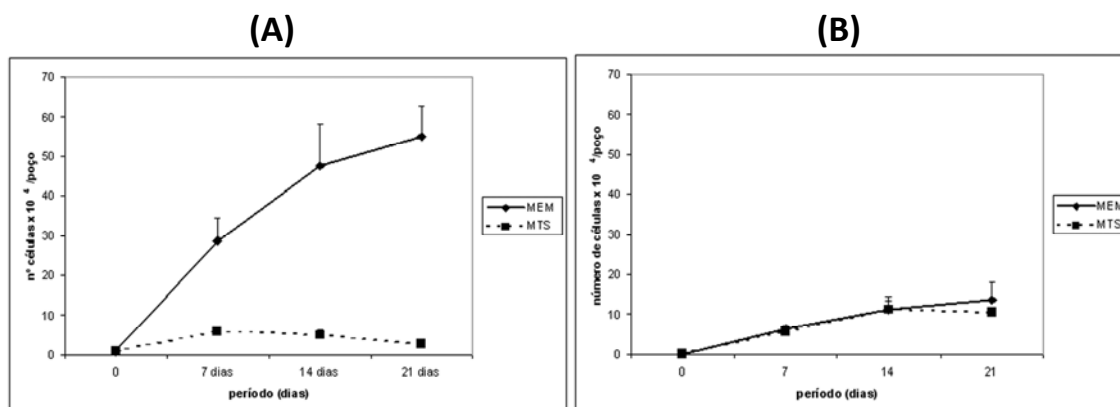


Figura 9. Proliferação celular de células tronco mesenquimais em cultura após 7, 14 e 21 dias de indução osteogênica. (A) células de cordão umbilical, (B) células de medula óssea cultivadas em meio mínimo não osteogênico (MEM) ou de diferenciação (MTS). Análise estatística Mann-Whitney ($p \leq 0.05$).

6.1.3. Viabilidade Celular

Foi avaliada a viabilidade celular ao longo de 7, 14 e 21 dias das células submetidas a indução osteogênica e indiferenciadas utilizadas como controle. Tanto em células de cordão umbilical quanto de medula óssea, as células, de maneira geral, apresentaram viabilidade acima de 80%. Somente no caso de células-tronco originárias de cordão umbilical é que a viabilidade no período de 21 dias apresentou-se próximo de 70%, sendo significativamente menor quando comparado ao grupo controle (Figura 10)

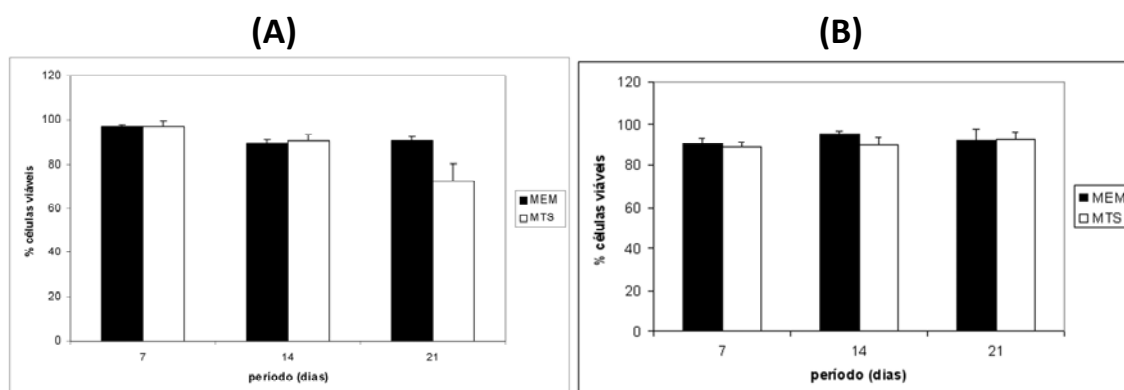


Figura 10. Viabilidade de células tronco mesenquimais em cultura após 7, 14 e 21 dias de indução osteogênica. (A) células de cordão umbilical, (B) células de medula óssea cultivadas em meio mínimo não osteogênico (MEM) ou de diferenciação (MTS). Análise estatística Mann-Whitney ($p \leq 0.05$). *Diferença estatística com $p=0,004$ somente para o grupo de células do cordão umbilical no período de 21 dias.

6.1.4. Determinação de proteínas totais

As células-tronco provenientes de cordão umbilical e cultivadas em meio osteogênico apresentaram aumento estatisticamente significativo na quantidade de proteínas totais em todos os períodos de indução osteogênica. As células provenientes de medula óssea, apresentaram tendência a diminuição na quantidade de proteínas totais, principalmente aos 7 dias de cultura. A partir desse ponto não observamos diferença estatística (Figura 11).

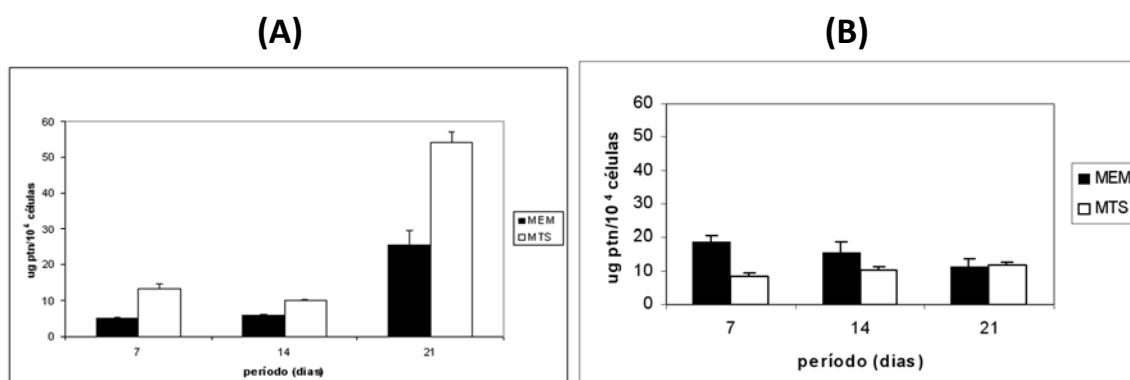


Figura 11. Quantidade de proteínas totais ($\text{ug}/10^4$ células) em células tronco mesenquimais de cordão umbilical (A) e medula óssea (B) obtidas após 7, 14 e 21 dias em meio mínimo (MEM) ou em meio de diferenciação (MTS). Análise estatística de Mann-Whitney ($p \leq 0.05$).

6.1.5. Medida da atividade de Fosfatase Alcalina por reação enzimática

As células-tronco provenientes de cordão umbilical e de medula óssea, cultivadas em meio de diferenciação osteogênica, apresentaram maior atividade de fosfatase alcalina quando comparadas com o grupo controle. Todas as comparações foram estatisticamente significantes, exceto no grupo de 7 dias das células tronco de cordão umbilical (Figura 12).

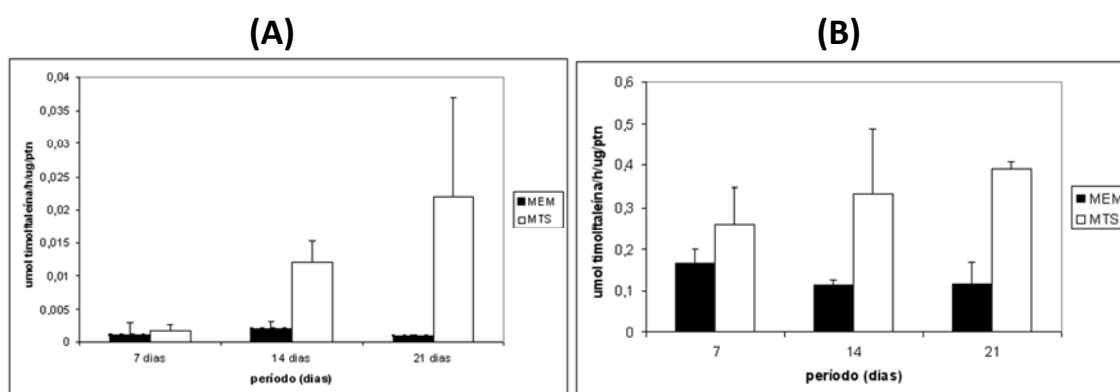


Figura 12. Atividade de fosfatase alcalina em células tronco mesenquimais após 7, 14 e 21 dias de indução osteogênica. (A) células do cordão umbilical, (B) células de medula óssea cultivadas em meio mínimo (MEM) ou meio de diferenciação (MTS). Análise estatística de Mann-Whitney ($p \leq 0.05$).

6.1.6. Nódulos de mineralização

Aos 21 dias de cultura observou-se que a formação de nódulos de mineralização ocorreu num padrão diferenciado tanto em células-tronco de cordão umbilical como de medula óssea. Em células provenientes do cordão umbilical humano, a mineralização mostrou-se num padrão puntiforme, enquanto que nas células provenientes da medula óssea, os nódulos foram maiores e mais coalescentes (Figura 13).

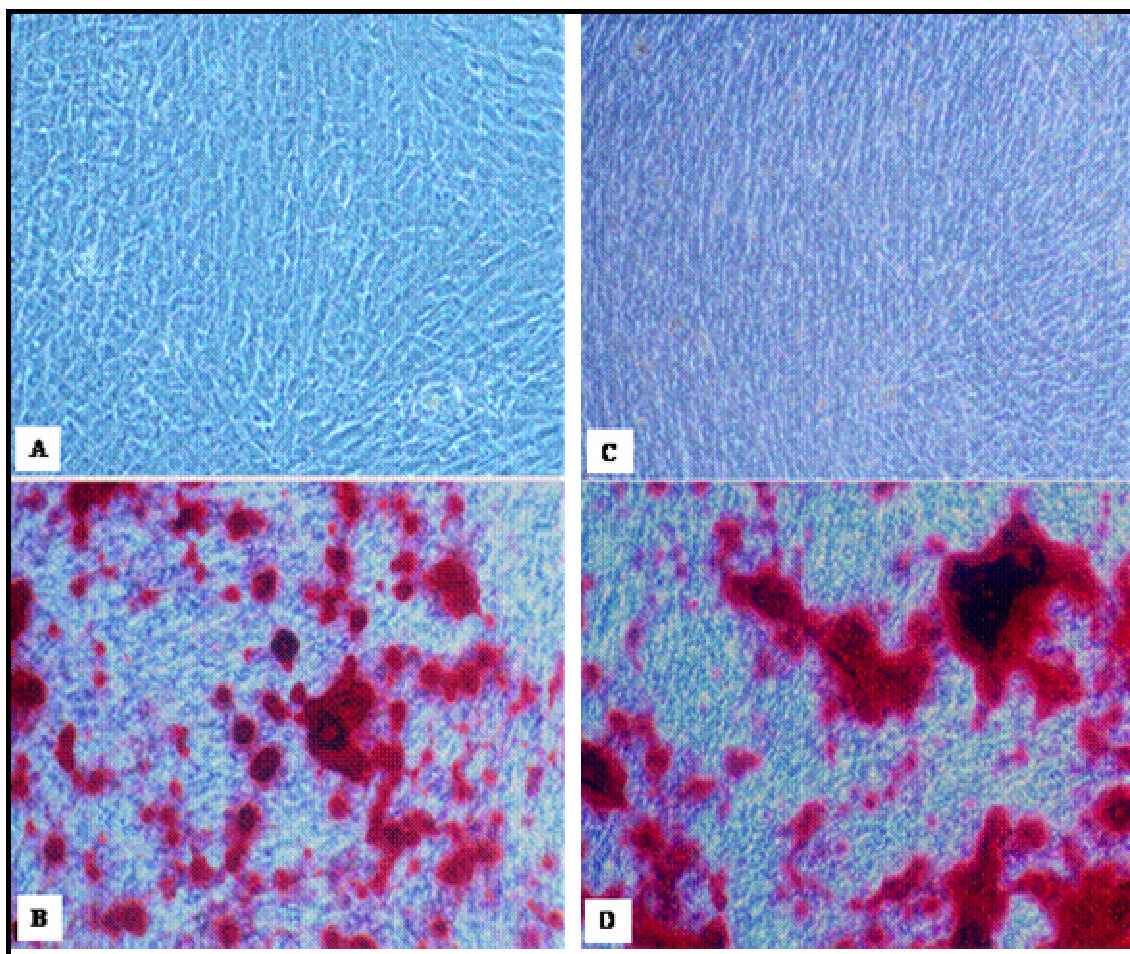


Figura 13. Coloração pelo vermelho de alizarina. A matriz mineralizada aparece em vermelho. (A) células de cordão umbilical indiferenciadas; (B) células de cordão umbilical com 21 dias de indução osteogênica; (C) células de medula óssea indiferenciadas; (D) células de medula óssea com 21 dias de indução osteogênica. Microscopia de contraste de fase 40X.

6.2. Avaliação da integridade do RNA total

6.2.1. Amostras utilizadas como pool de referência

A qualidade das amostras de RNA total provenientes das linhagens celulares foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 1% em condições denaturantes. As amostras que se apresentaram íntegras com relação às subunidades de rRNA 28S, 18S, 5S e tRNA,

além das avaliações espectrofotométricas, foram selecionadas para compor o *pool* de referência (Figura 14).

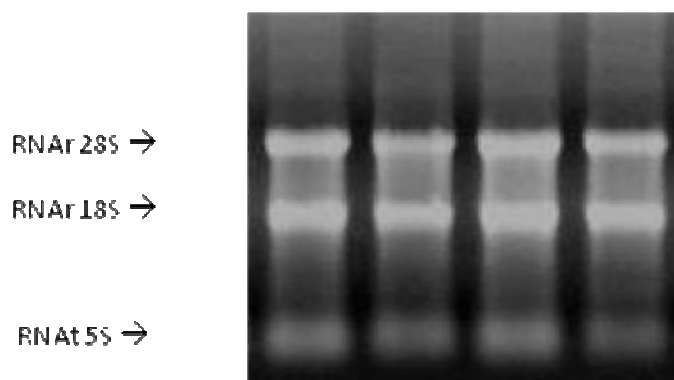


Figura 14. Eletroforese em gel de agarose corado com brometo de etídeo para avaliação da integridade das amostras de RNA provenientes das linhagens que compõem o *pool* de referência.

6.2.2. RNA total de amostras das células tronco

As amostras de RNA total extraídas de células tronco mesenquimais provenientes de cordão umbilical e de medula óssea apresentaram-se íntegras como avaliadas por meio de eletroforese em gel de agarose convencional (Figura 15). Além disso, essas amostras também apresentaram livres de fenol e de proteínas como avaliadas por espectrofotometria UV. Essas amostras foram selecionadas para marcação fluorescente.

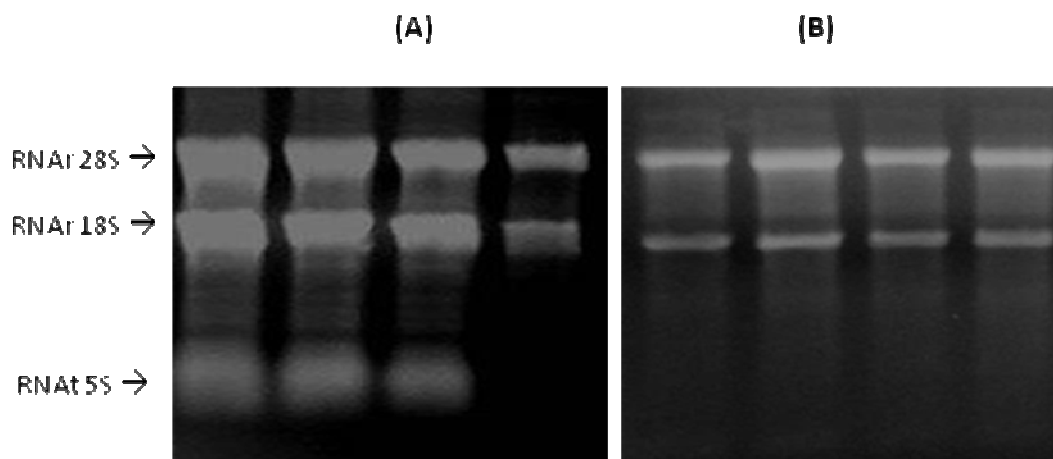


Figura 15. Eletroforese em gel de agarose corado com brometo de etídeo para avaliação da integridade das amostras de RNA total provenientes das células tronco de cordão umbilical (A) e de medula óssea (B).

6.3. RT-PCR semi-quantitativa e análise da região *upstream* dos transcritos dos marcadores clássicos da diferenciação osteogênica

Também foi avaliada a expressão de mRNA de genes importantes durante o processo de diferenciação osteogênica (ALPL, COL1A1, BGLAP, SPP1 e RUNX2). A Figura 16 mostra a evolução da expressão ao longo da diferenciação de MSC de cordão umbilical e medula óssea respectivamente para todos os tempos estudados: 0h (controle), 24 h, 48 h e 7 dias.

O gene GAPDH foi escolhido como padrão de expressão constitutiva (Figura 16A), comportando-se de uma maneira muito semelhante nas amostras analisada.

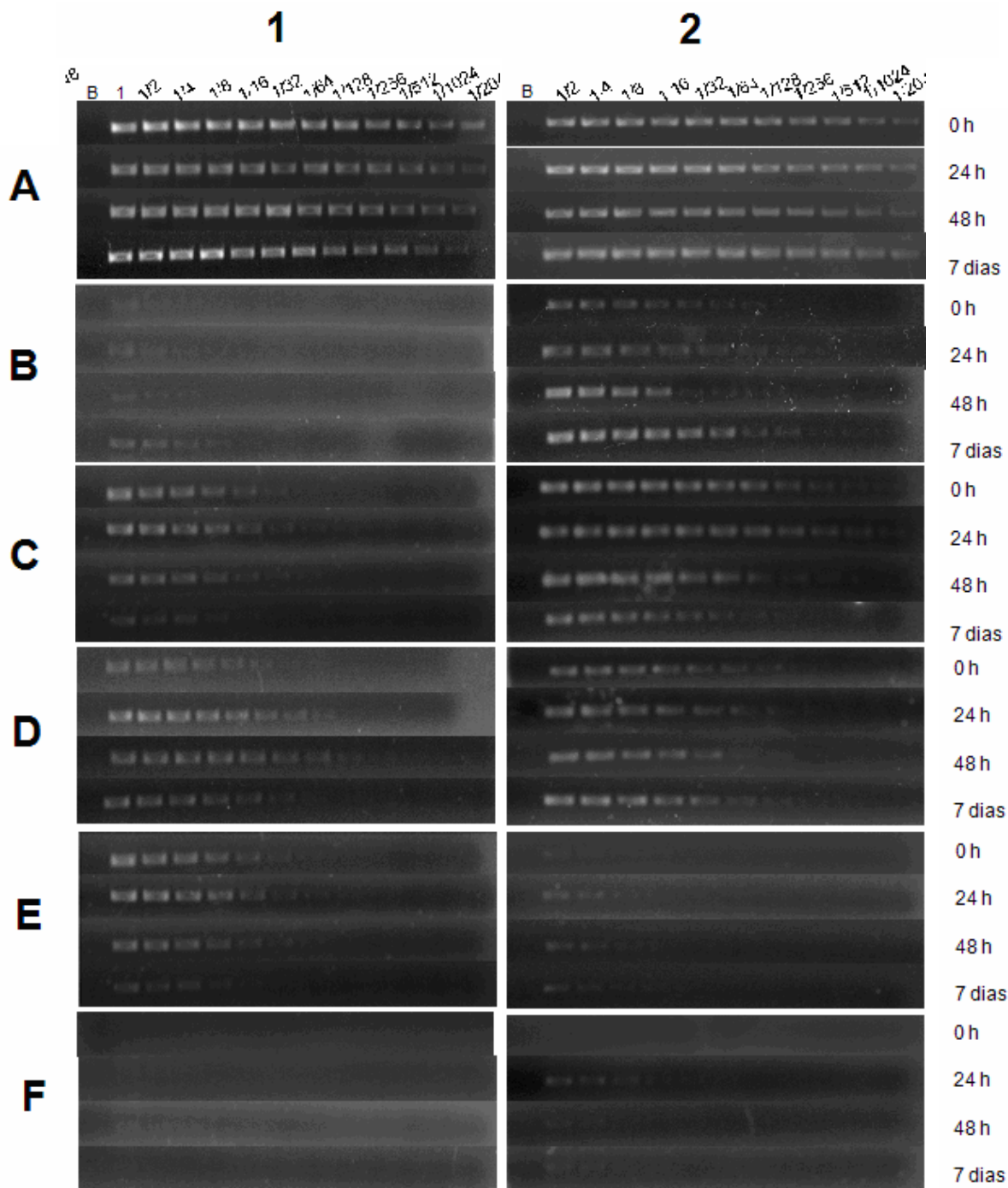


Figura 16. Expressão gênica avaliada por RT-PCR semi-quantitativa em cordão umbilical (1) e medula óssea (2). A expressão dos genes ALPL (B), COL1A1 (C), RUNX2 (D), SPP1 (E), BGLAP(F) foram avaliadas em amostras de cDNA de células-tronco indiferenciadas (0h) e células em diferenciação *in vitro* após 24 h, 48 h e 7 dias.

O gene da fosfatase alcalina (ALPL) mostrou maior expressão aos sete dias de diferenciação tanto em células tronco de cordão umbilical (Figura 16B-1) ou como de

medula óssea (2) (Figura 16B-2). Observamos que a expressão de mRNA de ALPL foi maior nas MSCs de medula óssea.

O gene do colágeno tipo 1A1 (COL1A1) apresentou um pico de expressão em 48 horas em MSC de cordão umbilical (Figura 16C-1) e em 24 horas em MSC de medula óssea (Figura 16C-2).

O gene RUNX2, teve sua expressão gradativamente aumentada durante a diferenciação tanto de MSC de cordão umbilical (Figura 16D-1) como em MSC de medula óssea (Figura 16D-2).

Nos nossos resultados, a osteopontina (SPP1) se comportou como um gene de baixa expressão, com maior expressão por volta de 24 horas de diferenciação tanto em MSCs de cordão umbilical (Figura 16E-1) como de medula óssea (Figura 16E-2).

A osteocalcina (BGLAP), não foi evidenciada expressão significativa desse gene durante esse período nos dois tipos celulares (figura 16F).

A análise de sequências para busca do sítio de ligação do fator de transcrição RUNX2 nos outros genes marcadores de osteogênese mostra a ocorrência de três sítios para a fosfatase alcalina (ALPL), e um sítio na região upstream da osteocalcina (BGLAP). Não foram encontrados sítios de ligação para o oligo testado no colágeno do tipo I (COL1A1) e para a osteopontina (SPP1) na região *upstream* das sequências analisadas (Figura 17).

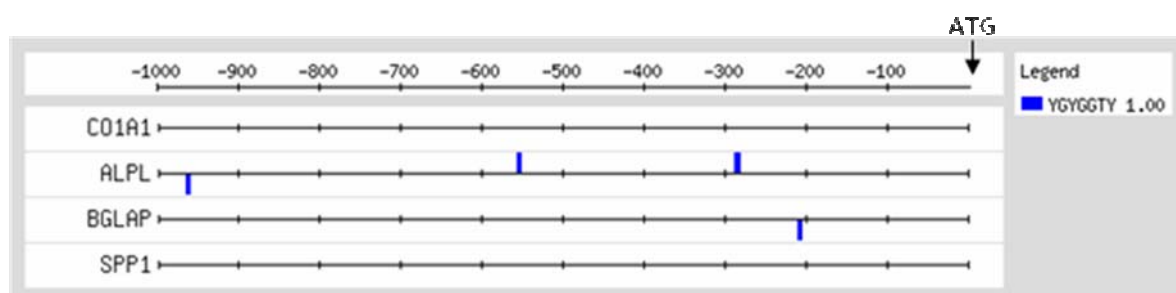


Figura 17. Localização do sítio de ligação para o fator de transcrição RUNX2-CREB (YGYGGTY) na região *upstream* (0 a -1000 pb a partir do ATG) dos genes marcadores da osteogênese. A marcação para cima da linha representa a ligação na fase de leitura +1, enquanto abaixo da sequência representada indica orientação -1.

6.4. Amplificação de cDNA para a confecção de microarrays

A primeira etapa para a construção dos microarrays consistiu na amplificação por PCR dos insertos de cDNA (biblioteca IMAGE) diretamente dos clones em cultura bacteriana (Figura 18).

O microarray utilizado neste trabalho foi preparado com sequências de cDNA de genes cujas funções são relacionadas à vias de sinalização celulares de interesse, câncer, sistema imune e também algumas ESTs (Expressed Sequence Tags) com função desconhecida.

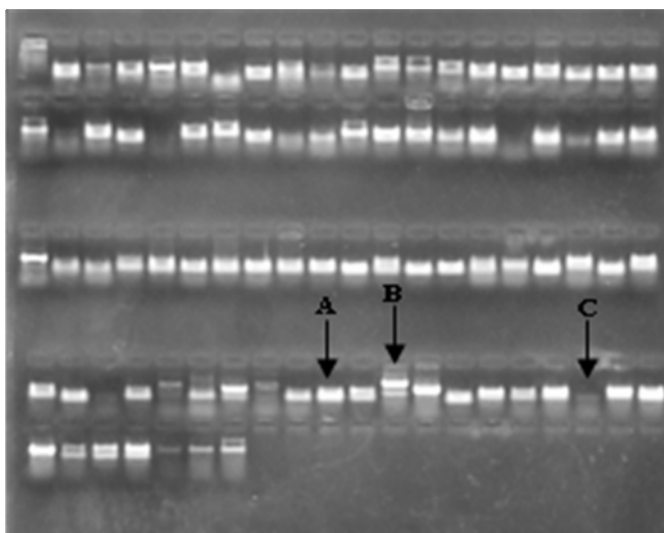


Figura 18. Análise da qualidade dos produtos de PCR dos clones de cDNAs humanos IMAGE. Eletroforese em gel de agarose 1% da amplificação PCR e purificação dos insertos dos genes selecionados da biblioteca de cDNA IMAGE. Banda única (A) representa amplificação específica, banda dupla (B), inespecífica e ausência de banda (C) representa falha no processo de amplificação.

6.5. Aquisição de imagens de microarrays

O anexo B ilustra uma imagem típica de hibridação de uma das lâminas de microarray, obtida por escaneamento a laser. Neste caso, foi utilizada a sonda marcada com

Cy3 para células tronco indiferenciadas e diferenciadas, e o pool de referência foi marcado com Cy5. Assim, os pontos verdes correspondem aos genes expressos somente nas amostras provenientes das células-tronco, enquanto os pontos vermelhos correspondem aos genes expressos no *pool* de referência e os pontos amarelos correspondem aos genes expressos em ambos.

No total foram utilizadas 12 lâminas para cada material, sendo triplicatas biológicas de 4 situações experimentais: células-tronco mesenquimais indiferenciadas (0 h), células em diferenciação por 24h, 48h e 7 dias.

6.6. Perfis de expressão gênica por agrupamento hierárquico

Os dados numéricos gerados pelo programa *Spotfinder*, foram normalizados no ambiente estatístico R. No aplicativo MEV, os valores foram filtrados, seguindo na análise apenas os genes expressos em, no mínimo, 80% dos experimentos. Os dados (amostras e genes) foram centralizados pela mediana. A partir da matriz gerada foram calculadas as medianas dos 6 valores para cada tempo de cada material (Figura 19).

Os genes envolvidos com a carcinogênese foram selecionados por meio da ferramenta FATIGO, que permite uma busca integrada com outros bancos de dados, especialmente o KEGG. Foram encontrados genes para as seguintes vias de sinalização e processos de interesse: WNT, NOTCH, HEDGEHOG, MAPK, ERK, GnRH, Jak-STAT, TGF- β , apoptose, ciclo celular e ubiquitinação, metabolismo do cálcio e adesão focal. Foram encontrados marcadores para: câncer de tireóide, carcinoma de célula basal e glioma (Anexos C e D).. Foram também incluídos os marcadores da diferenciação presentes na biblioteca de cDNA utilizada, o BGLAP, o SPP1 e o COL1A2 (Anexo D).

Para visualização dos genes envolvidos com a carcinogênese, geramos em um único *Heatmap* para células-tronco provenientes de cordão umbilical e medula óssea que esquematiza a similaridade entre os genes de interesse. A clusterização foi determinada pelo algoritmo *Cluster & TreeView*, com a distância métrica baseada na correlação de Pearson. A análise realizada foi a clusterização hierárquica supervisionada das amostras, gerando dendrogramas apenas para os genes.

É possível observar uma maior similaridade entre os tempos de 0h e 24h, e entre 48 h e 7 dias. A partir dessa observação, podemos inferir que a modulação da expressão gênica ocorre geralmente após 48 h de indução química, mantendo um padrão até o período de 7 dias em ambos materiais. Os valores e genes utilizados para construção deste *Heatmap* são os mesmos para a construção das redes gênicas.

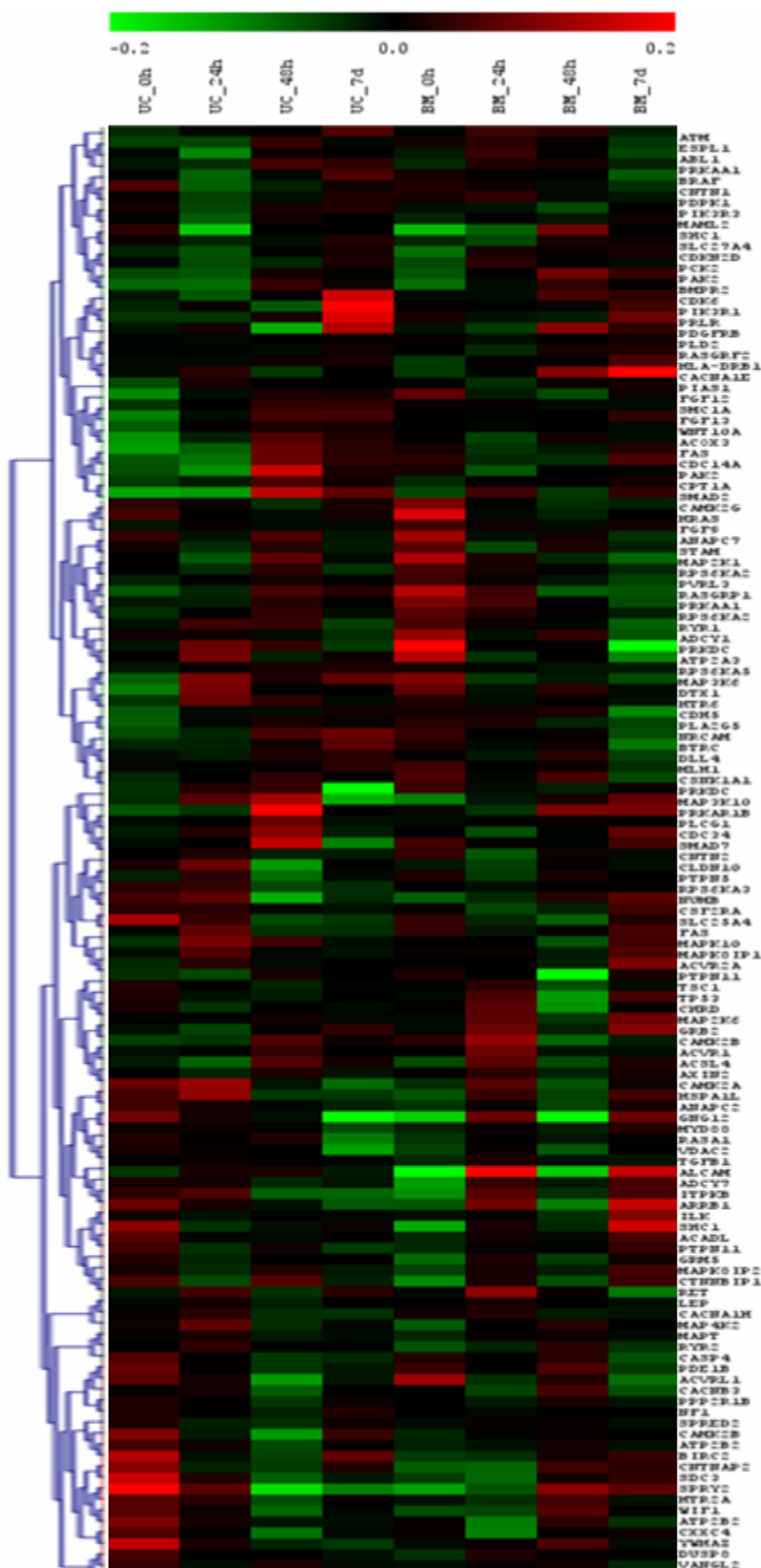


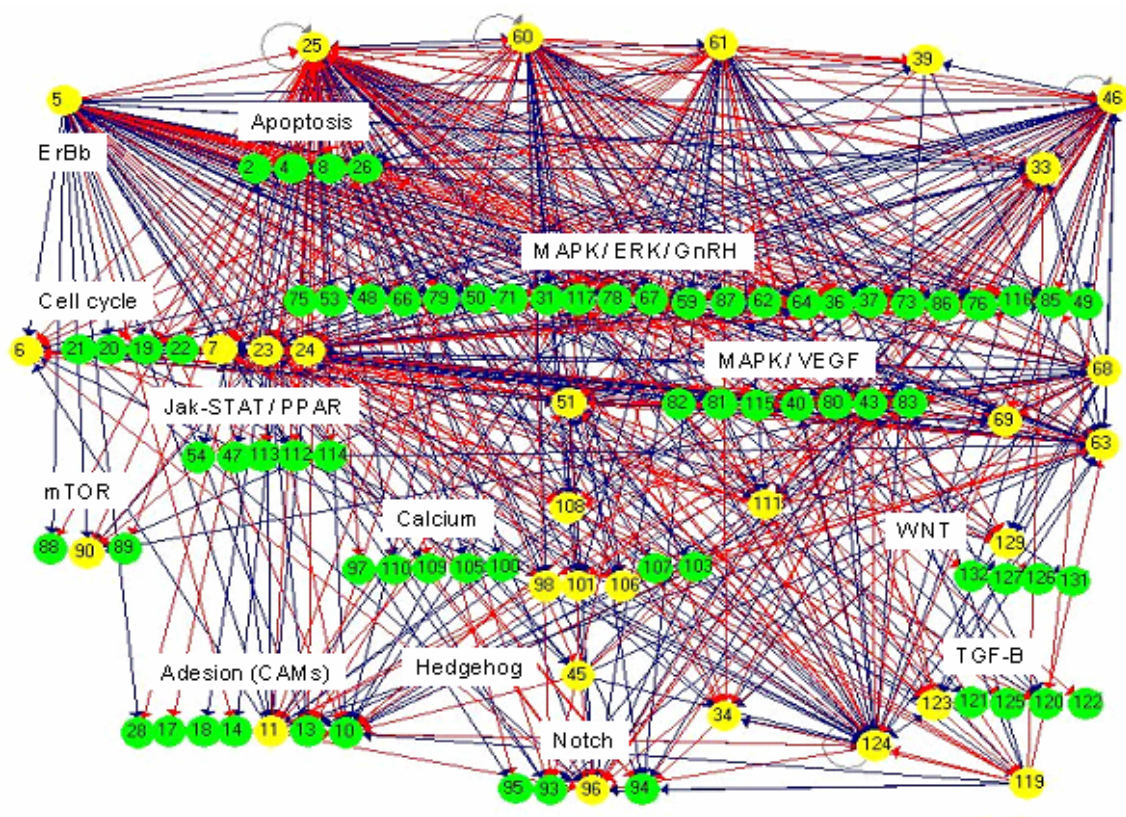
Figura 19. Heatmap construído por clusterização hierárquica supervisionada (Cluster & TreeView) a partir dos valores das medianas das lâminas de cada tempo de diferenciação osteogênica em células-tronco mesenquimais provenientes de cordão umbilical (UC) e de medula óssea (BM).

6.7. Redes transcricionais a partir de dados de microarrays

6.7.1. Redes de interações transcricionais de células-tronco mesenquimais

A partir dos dados dos microarrays normalizados, filtrados e finalmente utilizando-se o programa *GeneNetwork* (WU *et al.*, 2006), foi construída uma rede gênica entre os genes selecionados para todas as variáveis temporais (0 a 7 dias) de diferenciação osteogênica de células tronco de cordão umbilical e de medula óssea. Foi realizada a interpolação linear dos dados a fim de inferir as prováveis interações durante o processo de diferenciação.

Para a construção do modelo linear, foi utilizado o número de ligações igual ao número de genes de entrada. Nem todos os genes de entrada obtiveram uma ligação dentro da rede construída, sendo eliminados após a análise matemático-estatística realizada pelo programa *GeneNetwork*. As figuras 20 e 21 mostram os grafos resultantes dessa análise. Para melhor visualização, identificamos os nós gênicos e as via de sinalização



Legenda







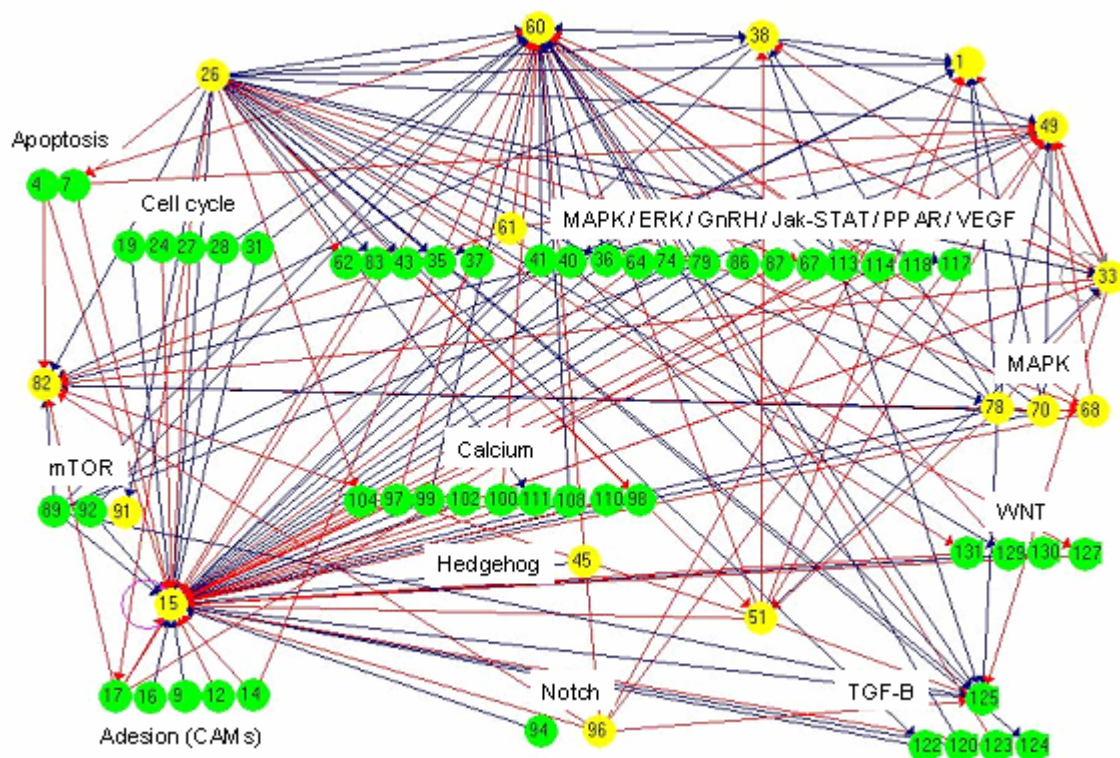
	Genes que realizam interações na rede
	Principais nós gênicos
	Interação positiva (ativação)
	Interação negativa (repressão)
	Auto-regulação positiva
	Auto-regulação negativa

Figura 20. Rede de interações transcricionais durante a diferenciação de células tronco de cordão umbilical (0 a 7 dias) gerada pelo programa *GeneNetwork*.



Legenda

- Genes que realizam interações na rede
- Principais nós gênicos
- Interação positiva (ativação)
- Interação negativa (repressão)
- ↻ Auto-regulação positiva
- ↻ Auto-regulação negativa

Figura 21. Rede de interações transcricionais durante a diferenciação de células tronco de medula óssea (0 a 7 dias) gerada pelo programa *GeneNetwork*.

6.7.2 Sistematização dos nós gênicos para melhor compreensão das redes gênicas

Conforme já descrito em material e métodos, com o software Mandala (SILVA *et al.*, 2009; não publicado; www.rge.fmrp.usp.br/genes), é possível a identificação textual a partir da matriz de interações entre os genes geradas pelo programa *GeneNetwork*. Para facilitar a visualização, os dados foram organizados em tabelas de acordo com os nós gênicos de interesse. Os nós escolhidos englobam basicamente todos os genes que realizam interações nas redes.

Avaliando o mecanismo da rede transcricional regulatória em cordão umbilical, encontra-se como base do mecanismo, a regulação por um transcrito que corresponde a uma subunidade da proteína G, o GNG12. O transcrito para essa proteína apresenta auto-regulação positiva, além de induzir diversos oncogenes, como o oncogene HRAS. O principal gene que regula o positivamente é o PRKDC, e negativamente, o PIK3R1 (Tabela III).

Tabela III. Interações envolvendo o gene GNG12 durante a diferenciação células tronco de cordão umbilical (0 a 7 dias).

CÉLULAS TRONCO DE CORDÃO UMBILICAL			
Genes regulados positivamente por GNG12	Genes regulados negativamente por GNG12	Genes que regulam positivamente GNG12	Genes que regulam negativamente GNG12
CLDN10 - PRKDC RET - MAPK10 - CAMK2A - SPRY2 - MAPK8IP1 - GNG12 - MAP4K2 - CACNB3 - PDGFRB - HRAS - RPS6KA3 - MAP3K6 - HSPA1L - PTPN5 - CACNA1H - CACNA1E - DTX1 - NUMB - HTR2A - HTR6 - SLC25A4 - ATP2A3 - ITPKB - ACVRL1	PIK3R3 - FAS - PRKAR1B - NRCAM - CNTN1 - ESPL1 - CDKN2D - CDK6 - CDC14A - SHC1 - ABL1 - GRB2 - CAMK2B - MAP2K1 - PRLR - PTPN11 - PAK2 - RASGRP1 - BRAF - PRKAA1 - MAML2 - ACOX3 - CPT1A - ACSL4 - SMAD7 - BMP2 - SMAD2 - CTNNBIP1	PRKDC - GNG12	PIK3R1

Para o principal regulador positivo do GNG12, o PRKDC, é mantido o mesmo padrão de regulação em relação à ocorrência de interações entre os oncogenes, porém, esse gene apresenta um maior número de interações, emitindo sinais para um maior número de vias, sendo portanto o maior nó encontrado nessa rede (Tabela IV).

Tabela IV. Interações envolvendo o gene PRKDC durante a diferenciação de células tronco de cordão umbilical (0 a 7 dias).

CÉLULAS TRONCO DE CORDÃO UMBILICAL			
Genes regulados positivamente por PRKDC	Genes regulados negativamente por PRKDC	Genes que regulam positivamente PRKDC	Genes que regulam negativamente PRKDC
CLDN10 - SDC3 - CNTN2 - PRKDC - RET - MAPK10 - CAMK2A - CSF2RA - SPRY2 - PIAS1 - LEP - MAPK8IP1 - GNG12 - MAP3K10 - MAP4K2 - CACNB3 - PDGFRB - HRAS - RPS6KA3 - MAPT - MAP3K6 - ARRB1 - HSPA1L - PTPN5 - CACNA1H - CACNA1E - DTX1 - NUMB - HTR2A - RYR2 - HTR6 - VDAC2 - ATP2B2 - SLC25A4 - RYR1 - ATP2A3 - ADCY7 - ITPKB - ACVRL1 - ACVR2A - WIF1 - CXXC4 - BGLAP - COL1A2 - FN1	PIK3R3 - BIRC2 - FAS - PRKAR1B - ATM - NRCAM - CNTN1 - CNTNAP2 - ESPL1 - CDKN2D - SMC1A - CDK6 - CDC14A - ANAPC7 - SHC1 - ABL1 - GRB2 - CAMK2B - MAP2K1 - BTRC - PRLR - PTPN11 - STAM - PAK2 - MAPK8IP2 - RASGRP1 - RPS6KA2 - BRAF - FGF13 - PDPK1 - PRKAA1 - MAML2 - DLL4 - GRM5 - PLCG1 - PCK2 - ILK - SLC27A4 - ACOX3 - CPT1A - ACSL4 - SMAD7 - ACVR1 - BMPR2 - SMAD2 - CHRDL - AXIN2 - CTNBP1 - VANGL2	PRKDC - CAMK2A - GNG12 - MAP3K10 - VDAC2 - SMAD7	BIRC2 - PIK3R1 - NRCAM - CDK6 - CAMK2B - BTRC - PRLR - PDGFRB - BRAF

Já para o nó gênico que atua regulador negativo do GNG12, o PIK3R1, também estão presentes os oncogenes, mas não foi identificado nenhum gene que o regula, tanto positivamente quanto negativamente nessas redes. Esse gene corresponde, portanto, a um nó regulador dessa rede (Tabela V).

Tabela V. Interações envolvendo o gene PIK3R1 durante a diferenciação de células tronco de cordão umbilical (0 a 7 dias).

CÉLULAS TRONCO DE CORDÃO UMBILICAL			
Genes regulados positivamente por PIK3R1	Genes regulados negativamente por PIK3R1	Genes que regulam positivamente PIK3R1	Genes que regulam negativamente PIK3R1
PIK3R3 - FAS - PRKAR1B - NRCAM - CNTN1 - ESPL1 - CDKN2D - CDK6 - CDC14A - ANAPC7 - SHC1 - ABL1 - GRB2 - CAMK2B - MAP2K1 - BTRC - PRLR - PTPN11 - PTPN11 - STAM - PAK2 - - MAPK8IP2 - RASGRP1 - RPS6KA2 - BRAF - FGF13 - PDPK1 - PRKAA1 - MAML2 - DLL4 - PLCG1 - PCK2 - ACOX3 - CPT1A - ACSL4 - SMAD7 - BMPR2 - SMAD2 - CTNNBIP1	CLDN10 - SDC3 - PRKDC - RET - MAPK10 - CAMK2A - SPRY2 - MAPK8IP1 - GNG12 - MAP4K2 - CACNB3 - PDGFRB - HRAS - RPS6KA3 - MAP3K6 - HSPA1L - PTPN5 - CACNA1H - CACNA1E - DTX1 - NUMB - HTR2A - HTR6 - SLC25A4 - ATP2A3 - ITPKB - ACVRL1	-	-

Finalmente, observa-se para o cordão umbilical que o gene NRCAM é característico, não estando presente na medula óssea. Apesar de não ser um nó com muitas interações, esse gene é regulado pelos principais nós PRKDC, GNG12 e PIK3R1, e integra múltiplas vias (Tabela VI).

Tabela VI. Interações envolvendo o gene NRCAM durante a diferenciação de células tronco de cordão umbilical (0 a 7 dias).

CÉLULAS TRONCO DE CORDÃO UMBILICAL			
Genes regulados positivamente por NRCAM	Genes regulados negativamente por NRCAM	Genes que regulam positivamente NRCAM	Genes que regulam negativamente NRCAM
FAS - PRKAR1B - CDC14A - SHC1 - PAK2 - ACSL4 - SMAD2	CLDN10 - PRKDC - CAMK2A - SPRY2 - HSPA1L - NUMB	PIK3R1 - CDK6 - PRLR	PRKDC - GNG12 - MAP3K10

Para medula óssea, as interações entre os nós ocorrem de forma diferenciada. Esse material apresenta um maior número de interações em relação ao cordão umbilical, além de diferenças nas interações entre os genes em comum para ambos materiais. Como pode ser observado na tabela abaixo, o GNG12 que regulava um grande número de genes em cordão umbilical, passa a ser o principal nó regulador em medula óssea (Tabela VI).

Tabela VI. Interações envolvendo o gene GNG12 durante a diferenciação de células tronco de medula óssea (0 a 7 dias).

CÉLULAS TRONCO DE MEDULA ÓSSEA			
Genes regulados positivamente por GNG12	Genes regulados negativamente por GNG12	Genes que regulam positivamente GNG12	Genes que regulam negativamente GNG12
-	-	PRKDC - ANAPC7 - RET - GRB2 - CAMK2B - MAP2K1 - CAMK2G - HRAS - PLA2G5 - RASGRP1 - RPS6KA2 - PRKAA1 - RPS6KA2 - ADCY1 - ATP2A3 - ACVRL1 - CHRD	BIRC2 - SDC3 - CNTNAP2 - SHC1 - SPRY2 - MAP3K10 - PDGFRB - CACNA1E - NUMB - GRM5 - RYR2 - SLC27A4 - BMPR2 - CTNNBIP1

Já para o gene PRKDC, que regula positivamente o GNG12 em cordão umbilical, passa a ser regulado positivamente por esse na medula óssea. Além disso, esse gene não regula nenhum outro na rede, sendo portanto, um nó regulado (Tabela VIII).

Tabela VIII. Interações envolvendo o gene PRKDC durante a diferenciação de células tronco de medula óssea (0 a 7 dias).

CÉLULAS TRONCO DE MEDULA ÓSSEA			
Genes regulados positivamente por PRKDC	Genes regulados negativamente por PRKDC	Genes que regulam positivamente PRKDC	Genes que regulam negativamente PRKDC
TP53 - ALCAM - SHC1 - MAP2K6 - GRB2 - MAPK10 - CAMK2B - CAMK2A - PTPN11 - GNG12 - RASGRP1 - ARRB1 - HSPA1L - TSC1 - ITPKB - ACSL4 - ACVR1 - SMAD2 - CHRD - CTNNBIP1	PRKAR1B - CNTNAP2 - SHC1 - SPRY2 - PAK2 - CACNB3 - PDGFRB - HTR2A - ATP2B2 - WIF1 - CXXC4 - BGLAP - COL12A - FN1	-	-

O gene PIK3R1 não apresenta nenhuma interação na medula óssea, assim como o gene NRCAM, ambos foram cortados na análise matemático-estatística do *GeneNetwork*.

Em contraste, o gene ALCAM é característico da medula óssea. Esse gene corresponde ao principal regulador da medula óssea, integrando um grande número de genes relacionados com o câncer, além de inúmeras vias (Tabela IX).

Tabela IX. Interações envolvendo o gene ALCAM durante a diferenciação de células tronco de medula óssea (0 a 7 dias).

CÉLULAS TRONCO DE MEDULA ÓSSEA			
Genes regulados positivamente por ALCAM	Genes regulados negativamente por ALCAM	Genes que regulam positivamente ALCAM	Genes que regulam negativamente ALCAM
-	ALCAM	CDH5 - PVRL3 - ESPL1 - PRKDC - ANAPC7 - RET - GRB2 - CAMK2B - MAP2K1 - CAMK2G - BTRC - HRAS - PLA2G5 - RASGRP1 - RPS6KA2 - CACNA1H - PRKAA1 - RPS6KA2 - DTX1 - ADCY1 - PDE1B - ATP2A3 - ACVRL1 - ACVR1 - CHRD - CSNK1A1	BIRC2 - PRKAR1B - HLA-DRB1 - SDC3 - ALCAM - CNTNAP2 - CDC14A - ANAPC2 - SHC1 - SPRY2 - MAP3K10 - MAP4K2 - PDGFRB - HSPA1L - CACNA1E - NUMB - GRM5 - RYR2 - ATP2B2 - ADCY7 - ITPKB - ILK - SLC27A4 - ACADL - BMPR2 - WIF1 - CTNNBIP1 - CXXC4

Finalmente, é possível organizar o nós gênicos e os principais genes relacionados a partir da importância para o processo biológico em questão. Nos esquemas abaixo, tanto para cordão umbilical (figura 22), como para medula óssea (figura 23), estão representados em branco os genes presentes nas duas fontes materiais, em cinza estão os genes que aparecem exclusivamente em cordão umbilical e em vermelho os genes presentes nas duas fontes que aparentemente estão envolvidos no processo de transformação celular. A flecha contínua representa interação positiva/ativação, e a flecha tracejada interação negativa/inibição.

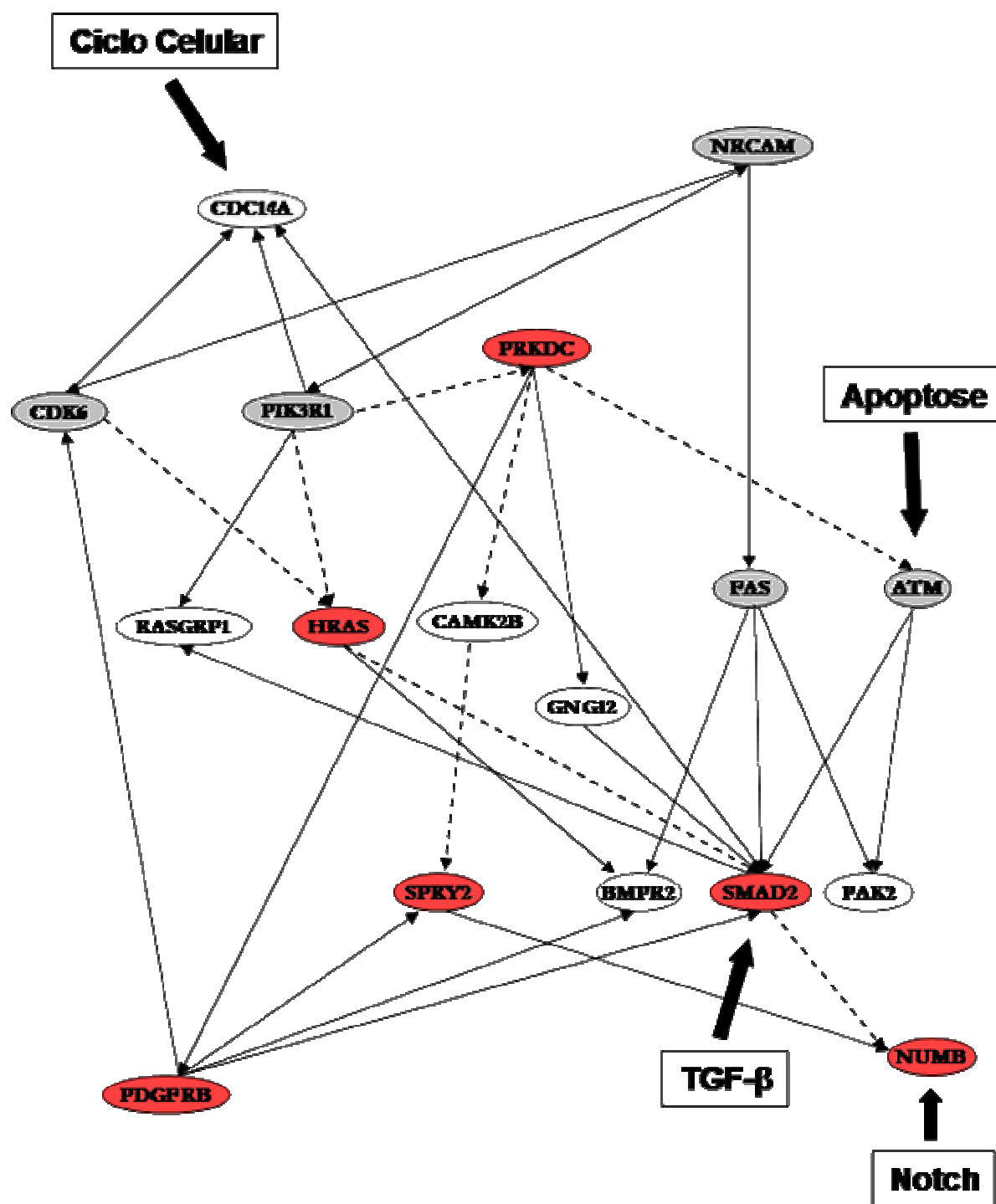


Figura 22: Esquema representativo das principais interações das redes transcricionais geradas durante a diferenciação de células tronco de cordão umbilical.

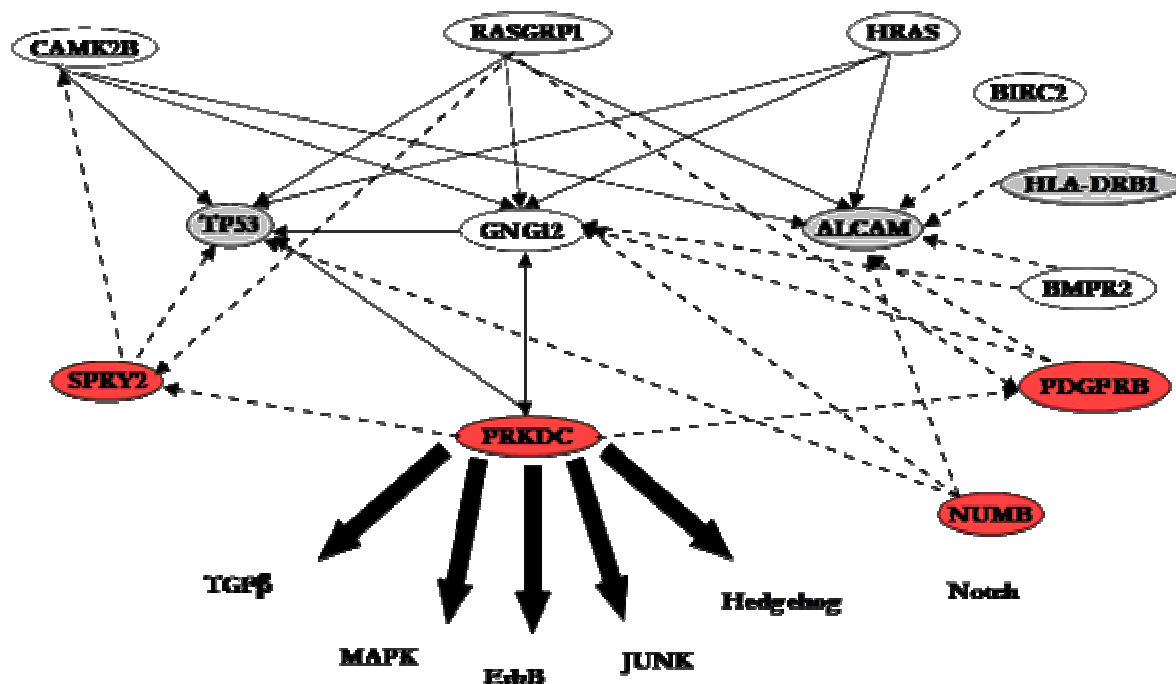


Figura 23: Esquema representativo das principais interações das redes transcricionais geradas durante a diferenciação de células tronco de cordão umbilical.

6.8. Busca de motivos para fatores de transcrição nas seqüências dos nós gênicos (alinhamento de Markov)

Para a análise da região *upstream* dos nós gênicos foram considerados os genes que apresentavam ao menos três interações.

Foi realizada a busca de padrões de ligação de sítios putativos de transcrição através do modelo de Markov pelo programa MEME. Para esse trabalho, os motifs com melhor *Value* foram os de 10 pb. A representação dos motifs por frequência de bases segue conforme esquematizado (Figura 24).

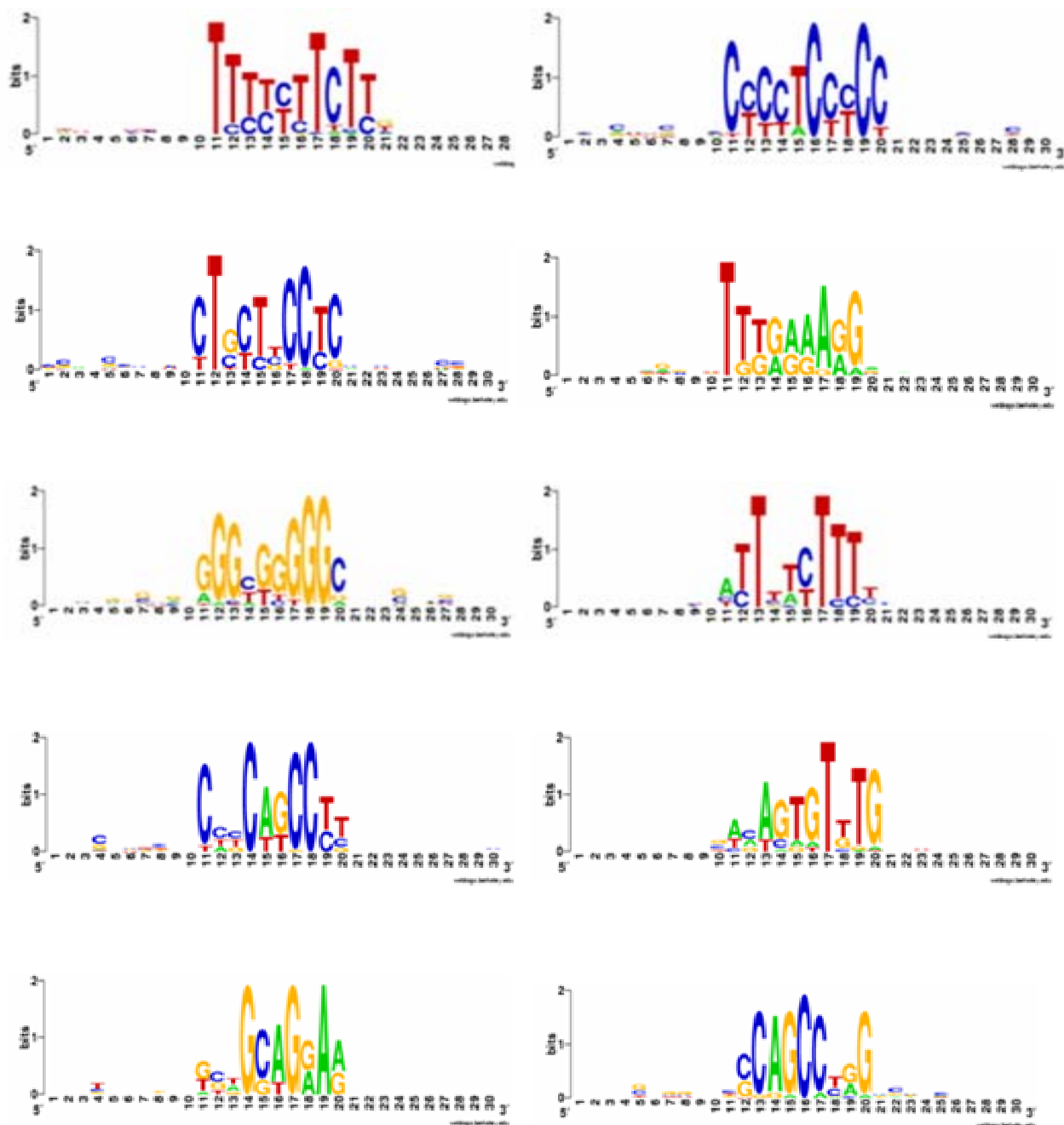


Figura 24. Representação na forma de *logos* das 10 seqüências consenso (*motifs*) com melhor *Evalue* entre 30 nós gênicos, deduzidas pela ferramenta MEME. Esses padrões de 10 pb representam sítios putativos de ligação para fatores de transcrição que podem estar envolvidos na regulação das redes transcricionais geradas.

Finalmente, buscou-se o fator de transcrição correspondente por similaridade da sequência dos *motifs* consenso no banco de dados TRANSFAC, conforme a Tabela X.

Tabela X. Identificação dos fatores de transcrição por similaridade com a sequência consenso dos nós gênicos identificados pelo MEME.

<i>Motif</i> consenso	<i>Evalue</i>	Fator de transcrição identificado pelo TRANSFAC	Ocorrência do fator (genes)
TTTTCTTCTT	3.55e-07	-	NUMB, MAP3K10, HTR2A, ABL1, NRCAM, SMAD7, TSC1, BMPR2, PTPN11, CDC14A, CDK6, PRKAA1, FAS, SMAD2, SHC1, PAK2, PRKDC, PIK3R1, TP53, ATP2B2, SPRY2, CTNNBIP1, HRAS, BTRC, PDGFRB, ALCAM, GNG12, ITPKB, PRKAR1B, HTR6, ARRB1, CAMK2B, NTRK2, RASGRP1
CCCCTCCCC	3.20e-06	MAZ	ITPKB, PDGFRB, PTPN11, SHC1, CDC14A, CDK6, ALCAM, BMPR2, ARRB1, MAP3K10, PRKAR1B, TP53, HTR6, BTRC, HRAS, CTNNBIP1, ABL1, SHC1, CAMK2B, FAS, NRCAM, SMAD7, ATP2B2, PIK3R1, PRKAA1, GNG12, PIK3R1, HTR2A, NTRK2, PAK2, RASGRP1, NUMB, SPRY2, PRKDC, TSC1, SMAD2
CTGCTTCTC	3.66e-06	-	NRCAM, FAS, PIK3R1, CTNNBIP1, SHC1, CDC14A, MAP3K10, ALCAM, PTPN11, PAK2, PRKDC, TP53, SMAD7, ABL1, CDK6, GNG12, ARRB1, CAMK2B, HRAS, ATP2B2, NUMB, TSC1, PDGFRB, SPRY2, PRKAA1, SMAD2, ITPKB, PRKAR1B, BMPR2, HTR6, PIK3R1, NTRK2, RASGRP1, HTR2A, BTRC
TTTGAAAGGA	5.63e-07	-	BMPR2, SPRY2, PIK3R1, NUMB, MAP3K10, PRKAR1B, PRKDC, PIK3R1, SMAD2, PAK2, NRCAM, RASGRP1, FAS, ABL1, NRCAM, PRKAA1, SMAD7, GNG12, TP53, ITPKB, HTR2A, CTNNBIP1, HTR6, HRAS, TSC1, PDGFRB, PTPN11, SHC1, CAMK2B, ARRB1, CDC14A, NTRK2, ALCAM, BTRC, CDK6, ATP2B2
GGGCGGGGGC	2.24e-06	SP1	SHC1, CDK6, TP53, ITPKB, HTR6, PRKAA1, ARRB1, HRAS, PTPN11, CAMK2B, ABL1, PIK3R1, MAP3K10, PRKAR1B, ATP2B2, CTNNBIP1, PDGFRB, BTRC, NTRK2, SMAD7, ALCAM, RASGRP1, BMPR2, FAS, PRKDC, CDC14A, PIK3R1, ABL1, PAK2, GNG12, TSC1, SMAD2, SPRY2, HTR2A, NRCAM, NUMB

<i>Motif</i> consenso	<i>Evalue</i>	Fator de transcrição identificado pelo TRANSFAC	Ocorrência do fator (genes)
ATTTTCTTTT	3.55e-07	-	TSC1, PIK3R1, SMAD7, FAS, HTR2A, PRKDC, SPRY2, NUMB, NRCAM, TP53, ABL1, NRCAM, CDK6, PIK3R1, PAK2, PTPN11, BTRC, CDC14A, ALCAM, SMAD2, RASGRP1, GNG12, PRKAR1B, CAMK2B, SHC1, PRKAA1, NTRK2, CTNNBIP1, PDGFRB, BMPR2, HRAS, MAP3K10, ITPKB, HTR6, ARRB1, ATP2B2
CCCCAGCCTT	1.12e-06	-	BMPR2, ABL1, NUMB, CTNNBIP1, HRAS, TP53, MAP3K10, ALCAM, NTRK2, CDK6, SMAD2, PRKAA1, PTPN11, NRCAM, BTRC, SHC1, CDC14A, ITPKB, HTR2A, CAMK2B, PRKAR1B, PDGFRB, RASGRP1, PAK2, PRKDC, HTR6, TSC1, ARRB1, GNG12, PIK3R1, SMAD7, FAS, ATP2B2, PIK3R1, SPRY2
ACAGTGTTTG	1.27e-06	-	SPRY2, PIK3R1, CTNNBIP1, ATP2B2, ARRB1, NRCAM, GNG12, PRKAA1, PAK2, ABL1, TSC1, HTR2A, PRKDC, CDC14A, RASGRP1, SMAD2, NUMB, PTPN11, SHC1, BTRC, TP53, CAMK2B, ALCAM, ITPKB, FAS, HRAS, MAP3K10, PIK3R1, NTRK2, PDGFRB, HTR6, CDK6, SMAD7, BMPR2, PRKAR1B
GCTGCAGGAA	2.02e-06	-	BMPR2, RASGRP1, PRKDC, CDK6, CTNNBIP1, PDGFRB, GNG12, TP53, CAMK2B, HTR2A, NRCAM, PIK3R1, SHC1, ITPKB, NTRK2, HRAS, ABL1, FAS, HTR6, SHC1, ARRB1, BTRC, ALCAM, PRKAR1B, PIK3R1, PAK2, SMAD2, TSC1, MAP3K10, PTPN11, SMAD7, CDC14A, NUMB, SPRY2, PRKAA1, ATP2B2
CCCAGCCTGG	1.78e-06	-	SHC1, ARRB1, TP53, PTPN11, ITPKB, MAP3K10, HTR6, ALCAM, NTRK2, CAMK2B, PRKAR1B, CTNNBIP1, GNG12, PRKAA1, PRKDC, NUMB, PAK2, HTR2A, SMAD7, FAS, ABL1, HRAS, PDGFRB, BMPR2, PIK3R1, CDC14A, CDK6, BTRC, NRCAM, PIK3R1, ATP2B2, TSC1, SPRY2, RASGRP1, SMAD2

6.9. Confirmação da expressão dos genes por PCR em tempo real

6.9.1. Seleção dos genes e cálculo da eficiência da reação de dissociação dos oligonucleotídeos primers

As mesmas amostras utilizadas na preparação das sondas foram submetidas a análise de PCR em tempo real, para os principais nós gênicos das redes, PRKDC, GNG12 e MINA, foram selecionados para validação por PCR em tempo real. Os genes constitutivos utilizados foram o GAPDH e o HPRT1. Foram feitas triplicatas experimentais de cada um dos doadores (triplicata biológica).

Os gráficos foram construídos de acordo com os valores de RQ (*Relative Quantification*), calculados utilizando como calibrador o menor dos valores de ΔCt obtidos. Ambos materiais foram normalizados juntos.

Para a validação por PCR em tempo real, os *primers* foram padronizados através da construção de curva padrão, para o cálculo de eficiência dos mesmos, e de uma curva de dissociação, para avaliar a ocorrência da amplificação de apenas um tipo de fragmento. Essas análises mostraram que os *primers* são eficientes. A curva de dissociação revelou que os *primers* não geraram fragmentos inespecíficos. A eficiência para a maioria dos *primers* utilizados foi de 99%.

Após a análise pelo software *Bestkeeper*, observou-se que o gene GAPDH apresentou-se mais constante e melhor representado, sendo esse o escolhido para a normalização dos dados por meio dessa técnica.

Tabela XI. Oligonucleotídeos *primers* dos genes selecionados para validação

Gene	Primers	Amplicon (pb)	Eficiência da reação
<i>GAPDH</i>	(For) 5' CTCTGCTCCTCCTGTTTCGAC 3' (Rev) 5' ACGACCAAATCCGTTGACTC 3'	120	99%
<i>HPRT1</i>	(For) 5' GACCAGTCAACAGGGGACAT 3' (Rev) 5' CTGCATTGTTTIGCCAGTGT 3'	121	99%
<i>MINA</i>	(For) 5' TACTTTGGCTCCTTGGTTGG 3' (Rev) 5' CCAGTGTTTCTCTCCCTCCA 3'	120	98%
<i>GNG12</i>	(For) 5' CAATATAGCCCAGGCAAGGA 3' (Rev) 5' ACTCCTGGCATGTTTCCTCAC3'	121	99%
<i>PRKDC</i>	(For) 5' CCAAGAGCTTCCCTCCTCTT 3' (Rev) 5' ATTCCCTCCACACGACAAAG 3'	119	99%

6.9.2. Expressão de genes avaliada por PCR em tempo real

O gene PRKDC mostrando repressão significativa em 24h e 7 dias em células tronco derivadas de medula óssea e no 7º dia em células tronco derivadas de cordão umbilical. Os níveis dos transcritos nos outros tempos estudados apresentaram picos discretos de expressão. Em vista do calibrador ser o menor valor de expressão, e este ocorrer no tempo de 7 dias, o perfil de repressão encontra-se próximo ao valor de QR 0.00, enquanto a indução com valor próximo de 1.00. (Figura 25).

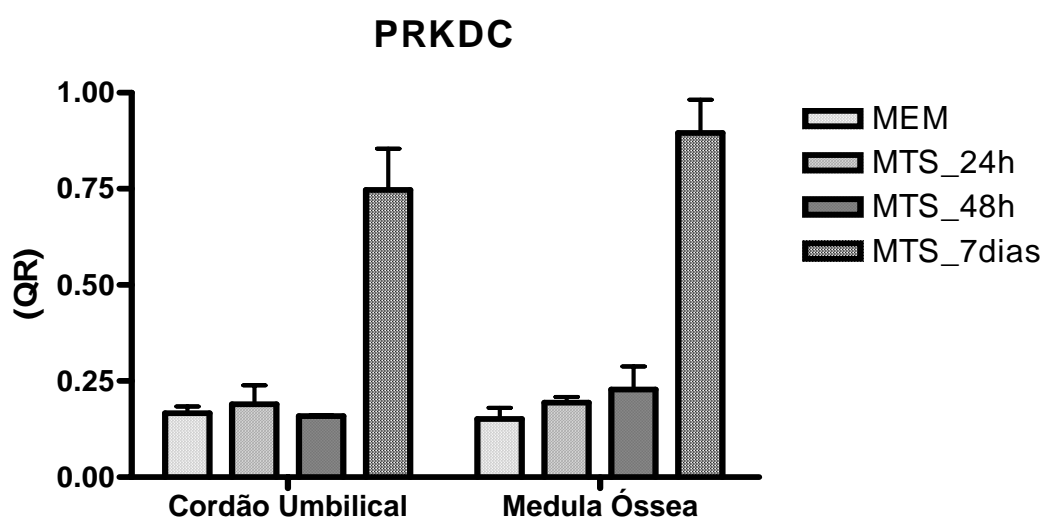


Figura 25. Gráfico dos valores de expressão relativa (QR) do gene PRKDC em células-tronco derivadas de cordão umbilical e de medula óssea, cultivadas em meio mínimo não osteogênico (MEM) ou de diferenciação (MTS). (Análise estatística ANOVA; P<0.05).

Os genes GNG12 e MINA não apresentaram diferença estatística nos tempos analisados (Figuras 26 e 27).

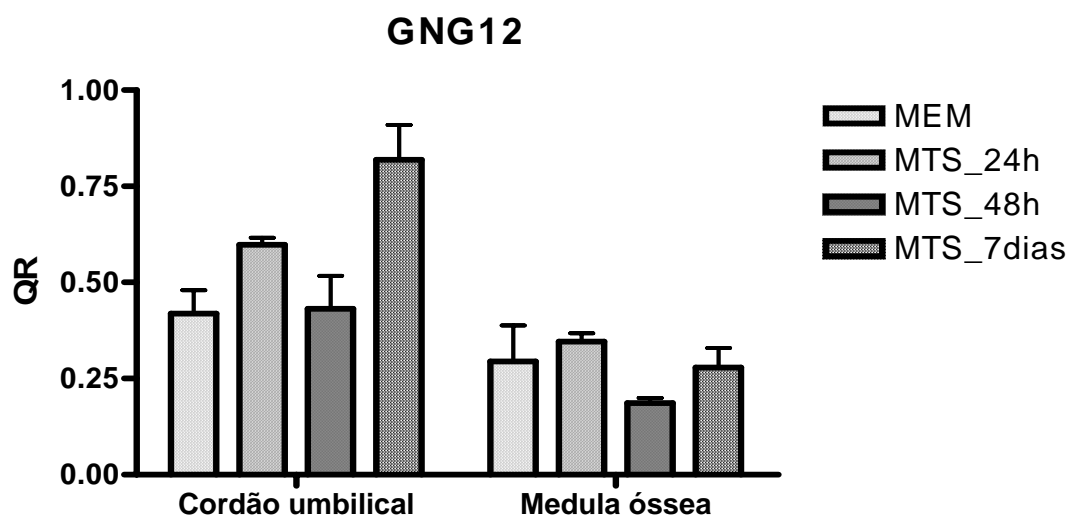


Figura 26. Gráfico dos valores de expressão relativa (QR) para o gene GNG12 em células tronco derivadas de cordão umbilical e de medula óssea, cultivadas em meio mínimo não osteogênico (MEM) ou de diferenciação (MTS). (Análise estatística ANOVA; $P > 0.05$).

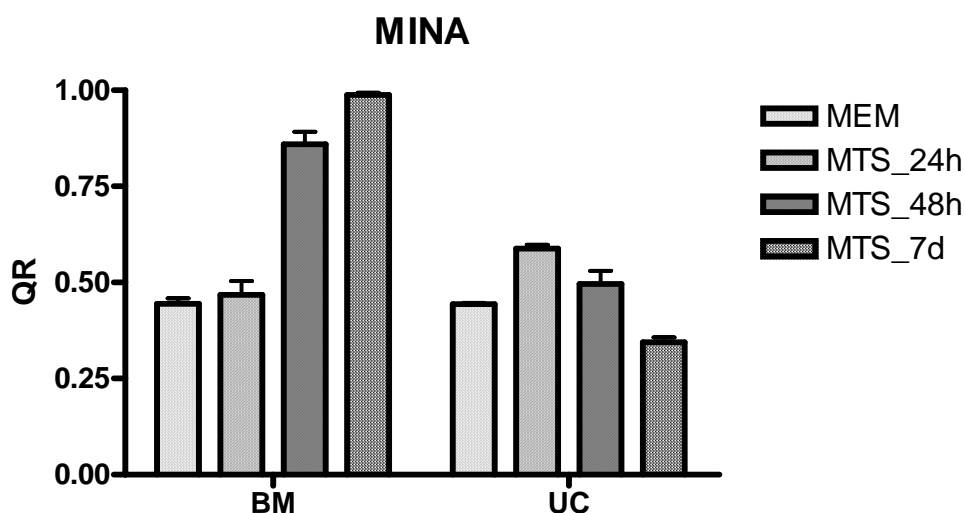


Figura 27. Gráfico dos valores de expressão relativa (QR) para o gene MINA em células tronco derivadas de cordão umbilical e medula óssea, cultivadas em meio mínimo não osteogênico (MEM) ou de diferenciação (MTS). (Análise estatística ANOVA; $P > 0.05$).

O padrão de expressão dos dados dos genes analisados por PCR em tempo real encontra-se semelhante ao gerado pelos microarrays. Em vista do principal nó gênico reproduzir esse padrão com valores estatisticamente significativos, os valores de expressão desses genes foram, portanto, considerados confirmados.

Discussão

7. DISCUSSÃO

7.1. Sistema-modelo de diferenciação osteogênica *in vitro* a partir de células tronco mesenquimais humanas

A indução química da diferenciação osteogênica utilizada neste trabalho abrangeu os tempos de 24 h, 48 h, 7 dias, 14 dias e 21 dias, com o objetivo de avaliar as modificações morfológicas e genético-moleculares ao longo do tempo. O tempo de 0 h correspondeu à cultura de células-tronco indiferenciadas.

Nos períodos de 0 h, 24 h, 48 h e 7 dias foi observado que as células apresentaram-se viáveis e com alta taxa de proliferação. O que não ocorreu de forma pronunciada nos períodos de 14 dias e 21 dias. Observamos que nos tempos mais tardios do processo de diferenciação ocorre a diminuição da taxa de proliferação e viabilidade celular (Figuras 9 e 10).

Também foi observada uma correspondência entre a diminuição da viabilidade e proliferação com o aumento do nível de proteínas totais nos períodos de 14 dias e 21 dias (Figura 11), o que nos permite inferir que a diferenciação osteogênica promove a morte celular por deposição de matriz extracelular. Em adição, obtivemos baixo rendimento nas quantificações de RNA para esses tempos. A análise da morfologia da deposição da matriz por coloração com vermelho de alizarina mostrou que no tempo de 21 dias em cultura ocorreu um grande aumento da matriz extracelular (Figura 13). Dessa forma, no presente estudo, para a construção dos cDNA microarrays e das redes gênicas foram utilizados somente os tempos em que as células apresentaram viabilidade acima de 85% e alta taxa de proliferação celular, ou seja, o intervalo estudado de 0 h a 7 dias.

É amplamente divulgado na literatura que o nível de atividade de fosfatase alcalina pode ser utilizado como um indicador sistêmico da formação óssea e a caracterização da atividade desta enzima por ensaios bioquímicos, moleculares e morfológicos têm sido utilizados na comprovação da ocorrência *in vitro* da diferenciação osteogênica (GARANT, 2003). A fosfatase alcalina é uma enzima importante no processo de biomineralização, promovendo a hidrólise do fosfato contido em substratos, produzindo ortofosfato e aumentando a deposição do fosfato de cálcio (AÇIL et al., 2000) e é expressa em altos níveis em osteoblastos (PINERO et al., 1995).

Devido à importância da fosfatase alcalina para no processo biológico estudado, também foram realizados ensaios bioquímicos para avaliar a atividade desta e, apesar de seu aumento expressivo em células-tronco oriundas da medula óssea, as MSCs provenientes do cordão umbilical não apresentaram mudanças significativas na atividade desta enzima (Figura 12). Comprovamos então, através da técnica de imunofluorescência, a presença da proteína fosfatase alcalina nas MSCs de diferentes origens, ou seja, células-tronco de medula óssea e de cordão umbilical em 7 dias de cultura (Figura 9).

Além disso, procedemos a análise dos níveis de mRNA por PCR semi-quantitativa nos períodos de 0 h a 7 dias para uma confirmação adicional. Os transcritos selecionados para avaliar o processo da osteogênese por meio dessa técnica foram: fosfatase alcalina (ALPL), colágeno tipo I (COL1A1), osteocalcina (BGLAP), osteopontina (SPP1), e o fator de transcrição RUNX2/CBFA1. É interessante notar que todos os transcritos apresentaram-se expressos nas MSCs indiferenciadas, sugerindo seu comprometimento com a linhagem osteoblástica (Figura 16).

Observamos que o transcrito da fosfatase alcalina (ALPL) apresentou um aumento bastante sutil no processo tanto em células-tronco oriundas de medula óssea quanto de

cordão umbilical. O ensaio de atividade da enzima propriamente dita foi, nesse caso, mais adequado à sua detecção em células-tronco de medula óssea. E, apesar da não obtenção de significância estatística para o aumento da atividade desta em células de cordão umbilical, observamos a presença dessa enzima por imunolocalização. A utilização de diferentes técnicas para a avaliação da fosfatase alcalina nos proporcionou uma maior segurança para delimitar o período máximo para a construção de um modelo linear da osteogênese, por meio da técnica dos cDNA microarrays.

Em relação aos outros transcritos avaliados por PCR semi-quantitativa, constatamos altos níveis de expressão do transcrito COL1A1. O colágeno tipo I é o produto primário dos osteoblastos durante a formação de matriz óssea, o qual é considerado como um marcador inicial da diferenciação osteoblástica, o que está de acordo com o período de tempo de diferenciação estudado, o osteoblasto progenitor (Figura 4); (GARANT, 2003). Entretanto, alguns autores relatam alta expressão durante estágios proliferativos, enquanto outros detectam a expressão dos transcritos deste apenas em estágios finais da maturação (AUBIN, 1998). Os nossos achados corroboram com a primeira evidência, uma vez que encontramos altos níveis de mRNA deste nos momentos iniciais no modelo de diferenciação osteogênica utilizado tanto para células-tronco provenientes de cordão umbilical, quanto de medula óssea.

Em contraste, não foram detectados níveis significativos da expressão da osteopontina (SPP1) e da osteocalcina (BGLAP) nas células dos dois materiais estudados. Sabe-se que ambos são expressos em tempos mais tardios da diferenciação osteoblástica. Em geral, a osteopontina é expressa na fase de pré-osteoblastos enquanto a osteocalcina é expressa na fase de osteoblasto secretório (Figura 4). É interessante ressaltar que estudos *in vivo* mostram que a expressão da osteocalcina é inibida por glicocorticóides, o que também

poderia explicar a baixa expressão em nosso modelo experimental, que inclui o glicocorticóide dexametasona (LECLERC *et al.* 2005). Já a osteopontina parece inibir a mineralização através do bloqueio dos cristais de hidroxiapatita, sendo dessa forma, inibida no início da formação óssea (ALFORD; HANKENSON, 2006).

Pode-se observar, que os níveis de mRNA da osteocalcina (BGLAP) e da osteopontina (SPP1) apresentaram-se reduzidos enquanto os níveis do fator de transcrição RUNX2/CBFA1 encontraram-se aumentados (Figura 13). Sabe-se que RUNX2/CBFA1 regula os principais genes marcadores da osteogênese, incluindo a osteocalcina e osteopontina (DUCY *et al.*, 1997; KERN *et al.*, 2000). Isso nos motivou a uma análise da região *upstream* dos genes analisados por PCR semi-quantitativa para avaliar a ocorrência de um sítio de ligação desse fator, sabidamente envolvido com o câncer, conforme descrito na literatura (ITO *et al.*, 2004).

Em consequência, genes envolvidos com a osteogênese conhecidos por serem regulados pelo RUNX2/CBFA1 também foram relacionados ao processo carcinogênico. A osteopontina (SPP1) é um membro da família das proteínas que reside na matriz mineralizada e tem sido referida como uma citocina, com numerosas funções diretas sobre as células, afetando a imunidade e a metástase (YOUNG, 2003).

WU *et al* (2003) mostraram que a base 198 antes do ATG na região *upstream* da osteocalcina apresenta um polimorfismo C/T que está associado ao aumento da incidência de câncer de próstata. De forma interessante, o motivo de ligação do heterodímero RUNX2/CBFA1-CBP na região *upstream* da osteocalcina (BGLAP) encontrado neste trabalho abrange esta região. A ligação desse fator na região de ocorrência desse polimorfismo não está descrita na literatura, sendo esse achado inédito.

Alteração na expressão de um gene pode modificar de forma significativa toda a estrutura de uma rede intrincada de interação de sinais. Essa rede de sinais é genericamente denominada "rede transcricional gênica". Não apenas os marcadores clássicos da osteogênese, mas diversos genes expressos durante a diferenciação osteogênica podem apresentar funções no processo de carcinogênese. A construção de um modelo linear através das redes gênicas, abordado nesse trabalho, permite um melhor entendimento das possíveis relações entre marcadores clássicos conhecidos na literatura por originar um câncer e a predição de novos alvos em células-tronco.

7.2. A relação entre marcadores da osteogênese, a sinalização das adesinas/integrinas e a angiogênese: o papel das DNA-PKs nas células-tronco mesenquimais

Dos genes avaliados por PCR semi-quantitativa, encontram-se na biblioteca genômica utilizada para a construção dos cDNA microarrays apenas a osteocalcina (BGLAP), osteopontina (SPP1) e a subunidade 2 da cadeia α do colágeno tipo I (COL1A2). Foi observado nos agrupamentos hierárquicos que tanto a osteocalcina quanto a osteopontina encontram-se reprimidas em células-tronco provenientes dos dois materiais estudados, concordando com os resultados obtidos por PCR semi-quantitativa. O COL2A1 encontra-se induzido em células-tronco de cordão umbilical (Figura 19).

É interessante notar que apesar dos baixos níveis de expressão do transcrito BGLAP, este apresenta uma interação com o gene PRKDC nas redes gênicas (Tabela 4). Isso comprova a sensibilidade do modelo, uma vez que, no contexto celular, mesmo baixas concentrações de mRNA podem representar processos biológicos de importância. Já o transcrito SPP1 foi cortado pela matemática-estatística da rede.

A proteína codificada pelo gene PRKDC, a DNA-PK, é uma quinase de serina/treonina nuclear que apresenta um papel central no reparo de quebra de fita dupla do DNA e na recombinação V(D)J (ANDERSON; LEES-MILLER, 1992; JACKSON; JEGGO, 1995; ANDERSON; CARTER, 1996). O produto do gene PRKDC também está envolvido no controle do ciclo celular (JACKSON; JEGGO, 1995; TAKATA *et al.*, 1998; LEE *et al.*, 2007).

No presente trabalho, o transcrito PRKDC encontra-se induzido em células-tronco indiferenciadas de medula óssea, porém, com uma repressão gradual ao longo dos tempos de diferenciação analisados. Já nas células-tronco provenientes de cordão umbilical, esse gene encontra-se induzido nos tempos de 0 h, 24 h, 48 h, sendo reprimido após 7 dias de diferenciação.

Devido a essa oscilação, a análise estatística do programa GeneNetwork apontou o PRKDC como o principal nó gênico nesse trabalho. Podemos observar, entre as interações com este gene em células-tronco derivadas de cordão umbilical, um provável balanço entre o ciclo celular, representado pelo gene CDK6, e apoptose, representada pela interação com os genes ATM e FAS, em células-tronco provenientes de ambos materiais (Figuras 23 e 24).

Durante o processo de diferenciação estudado, o gene CDK6 foi induzido em 48 h e 7 dias em MSCs oriundas de cordão umbilical. ATM foi induzido no período de 7 dias. Já o gene FAS, foi induzido no tempo 7 dias. Notou-se que os três genes encontram-se induzidos no tempo 7 dias, em MSCs de cordão umbilical, no qual o gene PRKDC apresentou-se reprimido (Figura 23).

Além disso, as DNA-PKs apresentam a capacidade de fosforilar proteínas que se ligam ao DNA, incluindo vários fatores de transcrição (JACKSON; JEGGO, 1999). Dessa forma, existe uma probabilidade de que os níveis de mRNA de diversos genes que apresentam relações nas redes com os níveis de expressão de PRKDC, sejam influenciados por este devido a

alterações na atividade de fosforilação dessa DNA-PK. Um exemplo de uma interação desse tipo é a PRKDC-TP53 em células-tronco de medula óssea. Um trabalho recente mostra que as DNA-PKs participam do processo de estabilização do supressor tumoral p53 (BOHEME *et al.* 2008). É possível observar que o supressor tumoral TP53 apresentou-se induzido, enquanto o oncogene HRAS foi reprimido em todos os tempos estudados em MSCs oriundas da medula óssea, enquanto o TP53 foi reprimido e o HRAS induzido em células-tronco de cordão umbilical. O gene TP53 apresentou maior número de interações na rede de medula óssea.

O COL2A1 também apresentou interações com o gene PRKDC e com a fibronectina FN1, sendo essa última também reprimida ao longo do tempo em ambos materiais. A interação entre o colágeno e a fibronectina FN1 tem sido relatada na literatura como causadora da adesão de células tumorais em metástase de próstata (LANG *et al.* 2007). A expressão alterada dos genes pertencentes ao sistema das adesinas/integrinas têm sido relacionada com a capacidade de resposta ao nicho e indução da migração em células-tronco. Estudos mostram que linhagens tumorais não são capazes de se aderir às MSCs na presença de anticorpos bloqueadores da integrina $\alpha 5\beta 1$ e da fibronectina FN1 (DOCHEVA *et al.* 2007).

Encontramos também que as adesinas ALCAM/CD166 e NRCAM apresentaram ligações com o gene PRKDC, e indiretamente, ao colágeno tipo I. Ambas moléculas apresentam domínios fibronectina em sua estrutura. Em células-tronco de medula óssea o gene NRCAM encontra-se induzido na célula indiferenciada (0 h) e reprimido em todos os tempos de diferenciação, enquanto o ALCAM/CD166 encontra-se reprimido na célula-tronco indiferenciada e foi induzido em 24 h, 48 h e 7 dias. Já nas MSCs de cordão umbilical, o gene NRCAM foi induzido em 48 h e 7 dias, enquanto o gene ALCAM/CD166 foi reprimido em

todos os tempos analisados. Dessa forma, o gene ALCAM/CD166 representou um nó gênico de importância em MSCs provenientes de medula óssea, e o NRCAM em cordão umbilical.

O gene ALCAM/CD166, codifica uma molécula de adesão celular ativadora de leucócitos. Apesar de ser uma molécula de origem hematopoiética, essa adesina foi identificada em células-tronco mesenquimais e tem sido relacionada com o direcionamento de células leucêmicas (MAJUMDAR *et al.* 2006). Alteração na expressão desse gene tem sido relatada para diversos tumores como melanomas, câncer de próstata e mama, carcinoma colon-retal, câncer de bexiga e esôfago (OFORI-ACQUAH *et al.* 2008). O nível de expressão desse gene tem sido proposto como um potencial marcador na terapia do câncer de mama, no envolvimento deste com a metástase óssea (DAVIES *et al.* 2008).

O gene NRCAM, codifica moléculas de adesão celular (CAMs) que são membros da superfamília das imunoglobulinas. Esse gene codifica uma molécula de adesão neuronal com domínios múltiplos imunoglobulin-like do tipo C2 domains e domínios fibronectina tipo III. Esse gene também é expresso em tecidos não neuronais, apresentando um papel geral na comunicação celular via domínios intracelulares para o citoesqueleto de actina durante a migração celular direcional (IYER *et al.* 2008).

Trabalhos mostram que NRCAM foi encontrado como diferencialmente expresso em adenoma hepático, e padrões de expressão desse gene têm sido utilizados para a identificação de células progenitoras presentes em tumores. Também foi relatada a relação entre expressão aumentada para esse gene e o desenvolvimento de carcinoma de tireóide (GÓRKA *et al.* 2007), e um papel na tumorigênese em melanomas e câncer de colon (CONACCI-SORRELL *et al.* 2002).

A sinalização das adesinas/integrinas é composta por proteínas citoesqueléticas, quinases de tirosina, quinases de serina/treonina moduladoras de pequenas GTPases,

fosfatases de tirosina, e outras enzimas incluindo a PI3K (DOCHEVA *et al.* 2007). Dessa forma, é importante analisar relação entre as moléculas de superfície que compõem esse sistema, conforme descrito, mas também as interações com o colágeno e o papel dos íons Ca^{2+} , de importância para o modelo de diferenciação estudado. A figura 28 mostra uma representação esquemática desse sistema.

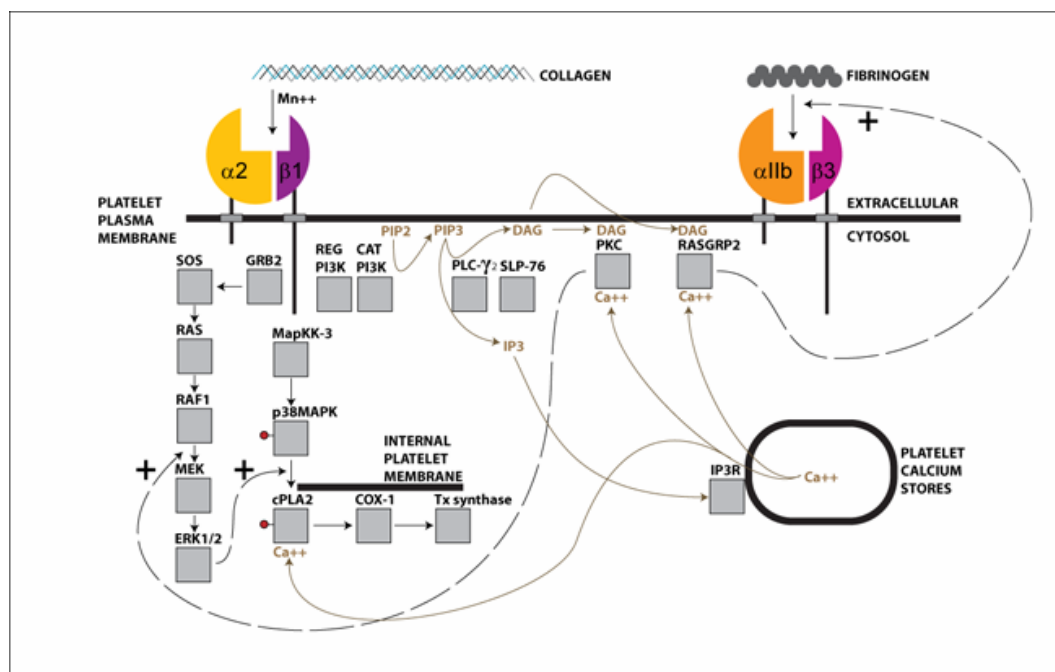


Figura 28. Representação esquemática da sinalização das integrinas.

Fonte: Banco de dados *PathwayCommon*: www.pathwaycommon.org

Observamos nas redes de cordão umbilical que a subunidade p85 da PI3K, a PI3KR1, apresenta interação indireta com o fator de crescimento PDGFRB, por meio do gene PRKDC. A ligação PI3KR1-PDGFRB está descrita na literatura (IGNATIUK *et al.*, 2006). Essa interação possui inúmeras implicações, uma vez que o gene PDGFRB codifica um receptor de quinase de tirosina que é mitógeno para células de origem mesenquimal e tem sido extensivamente vinculado ao estudo da angiogênese (FERRARA, 2004; WEIGEL *et al.*, 2009). Um trabalho recente mostra que mutações envolvendo moléculas da classe I da via PI3K como atuantes

chaves na transformação oncogênica (ZHAO; VOGT, 2008). É importante ressaltar que o gene PI3KR1 encontra-se induzido em cordão umbilical e reprimido em MSCs de medula óssea, e só realiza interações na rede de cordão umbilical.

O gene PI3KR1 também apresenta interações nas redes com genes da via NOTCH e TGF- β . Encontramos que esse gene apresenta interações com os genes SMAD2 e SMAD7 em células-tronco provenientes de cordão umbilical. Sabe-se que a via PI3K inibe a via TGF- β /Smad para células de neuroblastoma, através da inibição pela subunidade p85 mutada da PI3K, que corresponde ao PI3KR1 (QIAO *et al.*, 2006).

Um outro achado de interesse nas redes é a interação, também indireta, com participação do PRKDC, do gene PI3KR1 com o gene SPRY2 em células-tronco proveniente de cordão umbilical. O nó gênico SPRY2, encontra-se reprimido em cordão umbilical nos tempos de 48 h e 7 dias. Esse gene codifica uma proteína associada com a sinalização celular que pertence à família *sprouty*. EDWIN *et al* (2008) observaram que a proteína traduzida por esse gene modula a sinalização dos receptores de tirosina, regulando a migração e a proliferação celular, através de um domínio carboxi-terminar rico em cisteína que é essencial para a atividade inibitória nas proteínas de sinalização pelo receptor de cinase de tirosina e atua como um fator de crescimento.

O gene SPRY2 apresenta alta similaridade com o SPRY4, e o mRNA do SPRY4 é expresso em células-tronco embrionárias, cérebro, câncer de colon, tumores de cabeça e pescoço, melanoma e câncer pancreático. A indução do gene SPRY4 também tem sido associada à ativação da via WNT em células progenitoras estimulando os mecanismos de auto-renovação através da secreção de FGF. Sabe-se que o silenciamento epigenético e a perda de função de SPRY4 tem sido associado à carcinogênese em células progenitoras (KATOH *et al.*, 2007).

Em vista desses achados é possível observar que a alteração da expressão de um único nó gênico modifica toda uma rede de sinais. O resultado obtido pelas redes gênicas mostra que a integração de todos esses processos pode ser influenciada pelos níveis de expressão do transcrito PRKDC. Até o momento não encontramos na literatura estudos sobre o PRKDC em células-tronco. A possibilidade de interação entre genes sabidamente envolvidos com o processo carcinogênico com esse gene é também um achado inédito deste trabalho.

7.3. As redes regulatórias gênicas no estudo do *cross-talk* das vias de sinalização

O estudo do *cross-talk* de vias de sinalização tem sido utilizado para o desenvolvimento de biomarcadores diagnósticos, terapêuticos e prognósticos (KATOH & KATOH, 2006). Atualmente isso tem tornado realidade através do estudo mais aprofundado das vias por estudos moleculares e com o advento e a criação de novas ferramentas de bioinformática. Entre as vias de auto-renovação das células-tronco, a via WNT é mais estudada atualmente. O projeto WNT-oma humano ou WNT-transcriptoma humano, iniciado em 2002 no *National Cancer Center Research Institute* tem mostrado que áreas da oncologia, biologia do desenvolvimento, a biologia das células-tronco e a medicina regenerativa se relacionam.

A via WNT é relacionada com o câncer e com o próprio conceito de *cancer stem cells* (KATOH; KATOH, 2007). O próprio termo WNT vem de W (*wingless*) e INT1 (o oncogene INT). A página *WNT-cancer* (<http://www.stanford.edu/~rnusse/pathways/wntcancer.html>) aponta diversos genes dessa via como supressores tumorais e oncogenes. E mais recentemente, tem sido proposto que a interação entre diversas vias durante a carcinogênese para células-

tronco mesenquimais, tendo as vias WNT, Notch, Hedgehog, FGF, e BMP como candidatas (KATO et al. 2007).

O esquema da via WNT abaixo, retirado da interface web da *ArraySuperScience* (www.uniscience.org), mostra que diversos transcritos apresentam função compartilhada para a diferenciação, adesão e sobrevivência celular, além de interagir com outras vias. A partir desse princípio, podemos apontar diversas interações conhecidas que estão presentes nas nossas redes, além de novos achados gerados nesse trabalho.

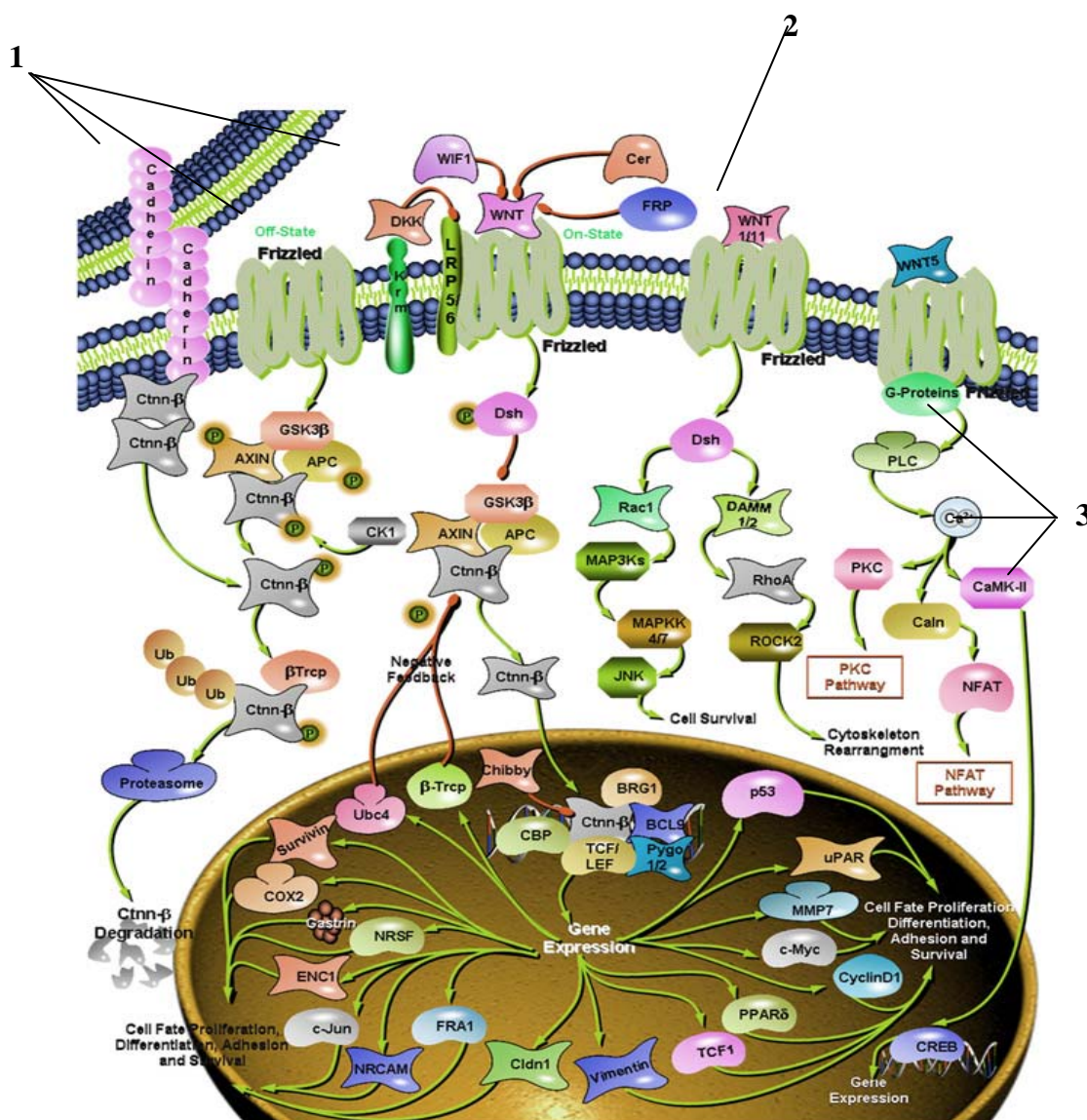


Figura 29. Interação entre transcritos da via WNT canônica e não-canônica.
 Fonte: www.uniscience.org

Em concordância com os dados obtidos pelas redes gênicas com a figura 29, é possível fazer três considerações, baseadas nas vias intracelulares distintas em que os sinais da via WNT são transduzidos: (1) A via canônica WNT/Ctnn-Beta (Catenina-beta) e as vias não canônicas (2) WNT/PCP (*Planar cell polarity*) e (3) WNT/Ca⁺² (via do cálcio).

(1) Esse ponto corresponde à via WNT canônica. NETH *et al* (2006) demonstraram que as MSCs usam essa via para a migração/invasão, de forma similar às células tumorais. A aquisição dessa habilidade pode representar parte de um programa de ativação de células-tronco necessária para o reparo de tecidos e regeneração. Pode ser observado na figura 29 que moléculas de adesão celular, como CD44 e NRCAM, são alvo WNT e têm sido relacionadas com a invasão e a metástase (AITKENHEAD *et al.*, 2002; GÓRKA *et al.* 2007).

Em relação à via canônica, foi identificado nas redes gênicas o transcrito CTNNBIP1, cujas proteínas são ligantes da catenina CTNNB1, inibindo as interações entre essas e os membros da família TCF, sendo considerados reguladores negativos da via WNT e, conseqüentemente do ciclo celular (KATOH; KATOH, 2007). O CTNNBIP1 apresenta diversas interações na rede, especialmente o PI3KR1.

Entre os genes identificados como alvo da regulação CTNNB/TCF estão transcritos que podem cooperar com outras vias de sinalização para alterar processos de remodelamento, entre eles, as ciclinas e o c-MYC. O c-MYC pode induzir a expressão de TP53 (COWLING; COLE, 2007; HOFFMAN.; LIEBERMANN, 2008). O gene c-MYC não está presente na biblioteca utilizada. Em contrapartida, encontramos que um gene alvo deste, o gene MINA, apresenta interações como o TP53 nas células-tronco provenientes de medula óssea. O gene MINA é conhecido por participar do desenvolvimento tumoral em diversos tipos de cânceres (TSUNEOKA *et al.*, 2004; TSUNEOKA *et al.*, 2004; TEYE *e tal.*, 2004; TEYE *et al.*, 2007; ISHIZAKI *et al.*, 2007).

(2) Na via WNT/PCP, após a ligação das proteínas WNT com os receptores Frizzled transmembrana, ocorre a ativação das pequenas GTPases RHO/RAC, além da JNK (Jun

cinase) via DSH para regulação da organização do citoesqueleto. A ativação de JNK ocorre via MAP3Ks e MAP2Ks. O bloqueio da via canônica estimula a via JNK. Dessa forma, um sinal de sobrevivência é enviado através das vias MAPK/JNK (KATOH *et al.*, 2005).

O transcrito RHOA, encontrado nas nossas redes, conhecido por coordenar a regulação do citoesqueleto (Figura 29), foi cortado pela estatística utilizada para a construção das redes. Porém, foram encontradas diversas MAPKs, entre elas podemos citar a MAP3K10, como reguladora dos principais nós gênicos estudados, apresentando interação com o nó gênico PRKDC, e conseqüentemente, interações com genes que fazem parte de diversas vias. Em concordância com esses achados, a figura 30 mostra como moléculas de sinalização da via MAPK interagem com as moléculas RAS, a via NOTCH e o sistema de integrinas, emitindo sinais que regulam a proliferação e/ou diferenciação, cruciais nas decisões celulares, com implicações para o modelo de indução de um câncer a partir de células-tronco.

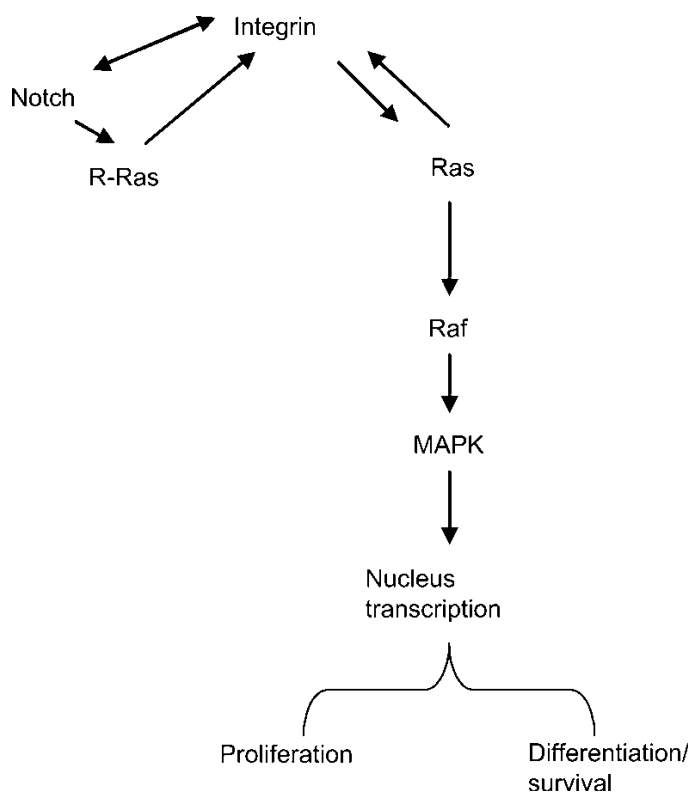


Figura 30. Esquema representativo da interação do oncogene RAS com determinadas vias de sinalização celular no balanço proliferação vs diferenciação de células-tronco.

Fonte: Chakrabarty; Heumann, 2008

(3) Acredita-se que via WNT/Ca²⁺ seja uma via de sinalização dependente da proteína G. Assim, essa via consiste de diversos processos celulares que envolvem a estimulação de proteínas G heterotriméricas, que ativam a PLC (*Phospholipase-C*), induzindo duas cinases, a CAMKII (*Ca²⁺- Calmodulin-dependent Protein Kinase-II*) e a PKC (*Protein Kinase-C*). Esses processos podem estimular fatores de transcrição como o NFAT e CREB (*cAMP Response Element-Binding Protein-1*) (KOHN; MOON, 2005).

Um nó gênico de grande representatividade nas redes geradas foi o GNG12, que codifica a subunidade de uma proteína rica em guanina que se liga aos receptores da proteína G. O gene *GNG12* (*guanine nucleotide binding protein G protein*), está envolvido no processo de transdução na sinalização do receptor de proteína G mediada por hormônios. A resposta a hormônios está vinculada ao processo de diferenciação osteogênica (LONG *et al.*, 2001). O GNG12 apresenta diversas interações, inclusive com CTNNBIP1, envolvido na via canônica.

Na biblioteca genômica utilizada, estão presentes isoformas da CAMKII: CAMK2A, CAMK2G, CAMK2B 1 e 8. Observamos que a isoforma 8 da CAMK2B apresenta um maior número de interações na rede. O produto do gene *CAMK2B* codifica a cadeia beta da CAMKII, uma cinase Ca(2+)/calmodulina-dependente (DAVID-DUFILHO *et al.*, 2005). Além da via de cálcio, esse gene participa dos mecanismos anti-apoptóticos mediado pela via ERK em osteoblastos (CONRADIE *et al.*, 2007). Esse gene é também conhecido como marcador para o glioma, FAS-mediado (YANG *et al.*, 2003).

Em síntese, podemos afirmar que a via WNT interage com praticamente todas as vias de sinalização e mecanismos estudados nesse trabalho, tendo inúmeras aplicações no estudo do câncer. Os nós gênicos presentes tanto na via WNT canônica como nas não-canônicas emitem sinais importantes para as decisões celulares que envolvem os mecanismos que regulam os processos de diferenciação, proliferação, adesão e sobrevivência celular. Os pontos de interação entre essas vias servem como alvos para estudos futuros

7.4. Fatores de transcrição envolvidos no processo em questão

Conforme já descrito, o fator de transcrição RUNX2/Cbfa1 é considerado o maior regulador da osteogênese. SCHROEDER *et al.* (2005) o define como organizador da transcrição gênica, uma vez que ele não é suficiente para a expressão gênica ótima ou formação óssea. Conforme esquematizado na figura 31, uma variedade de sinais e eventos cruciais são necessários para a maturação dos osteoblastos e formação óssea. Diversos fatores de transcrição, receptores de hormônios esteróides, e as proteínas SMADs, interagem com o RUNX2 em diversas vias de sinalização e com o ambiente extracelular, promovendo a osteogênese (NING; ROBINS, 1999; SELVAMURUGAN *et al.*, 2002; AFZAL *et al.*, 2005).

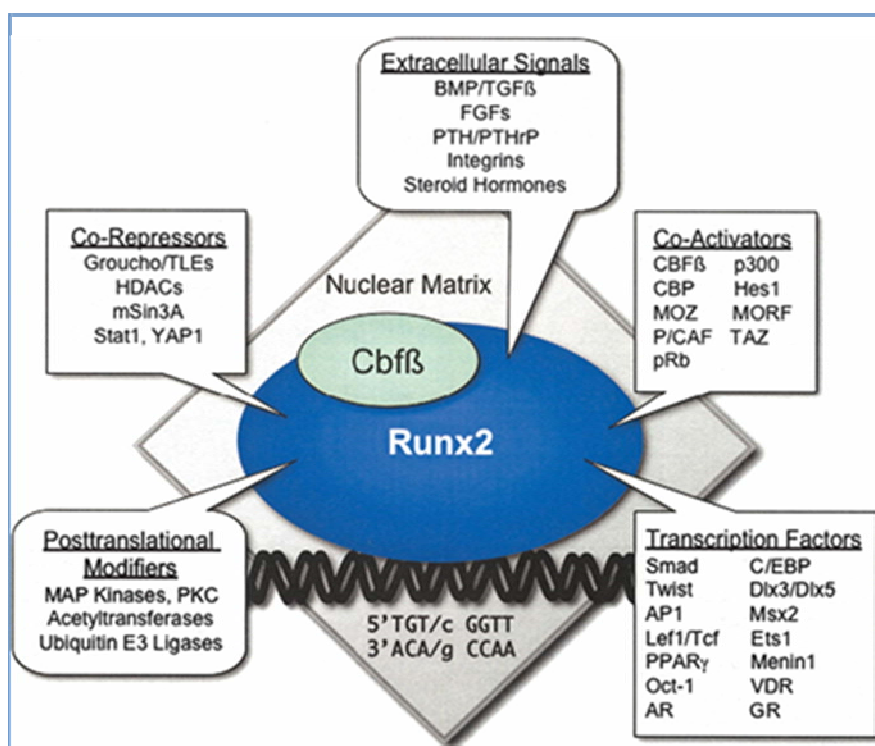


Figura 31. Sinais extracelulares e fatores de interação com o RUNX2/CBFA1 que propiciam a diferenciação osteoblástica.

Fonte: SCHROEDER *et al.*, 2005

A biblioteca de cDNA utilizada nesse trabalho possui poucos fatores de transcrição, o que nos motivou a uma análise da região *upstream* das sequências dos principais nós gênicos para avaliar a ocorrência de motivos de ligação de fatores de transcrição nestes. Através da análise por Markov, foi encontrada maior representatividade do fator de transcrição SP1 para os genes envolvidos com as vias carcinogênicas, o que corrobora com a função proliferativa dos fatores *zinc finger* (Qi *et al.*, 2003). A análise da região upstream dos nós gênicos pelo algoritmo de Markov mostra que a maioria os nós da rede são regulados pelo fator de transcrição SP1, entre eles o *NRCAM* e *ALCAM*, além dos genes *CDK6*, *TP53*, *HRAS*, *CAMK2B*, *PIK3R1*, *MAP3K10*, *PDGFRB*, *SMAD7*, *RASGRP1*, *BMP2*, *FAS*, *PRKDC*, *CDC14A*, *PIK3R1*, *PAK2*, *GNG12*, *SMAD2*, *SPRY2* e *NUMB*. Isso evidencia o SP1 como regulador e reforça a metodologia do programa *GeneNetwork* empregada.

O fator de transcrição SP1 é conhecido por regular a atividade promotora basal dos genes de osteocalcina de ratos e humanos. O papel no controle da diferenciação osteoblástica por SP1/SP3 tem sido descrito para o recrutamento do colágeno do tipo I (COL1A1). Um outro membro da família SP, o SP7 ou OSTERIX também tem sido associado com a osteogênese. Tanto o RUNX2 quanto o OSTERIX controlam diferentes vias regulatórias, sendo o primeiro de efeito antiproliferativo e o segundo promotor da proliferação em células progenitoras (SONG *et al.*, 2003).

A sequência de ligação para o fator SP1 é bastante similar à do fator MAZ. SONG *et al.* (2003) relataram esses fatores ligam-se aos mesmos elementos cis, porém, recrutando diferentes proteínas para o complexo regulatório. O fator de transcrição MAZ (*MYC-associated zinc finger*) tem sido associada à progressão do câncer de mama, inflamação crônica, como reguladora do ciclo celular em inflamação aguda.

Também foram encontrados para os principais nós gênicos os fatores de transcrição c-ETS2, NF-E e C/EBP delta, todos sabidamente envolvidos com o câncer. Os fatores de transcrição ETS estão envolvidos com os processos moleculares em células tronco, assim como com a tumorigênese. SATO; FURUKAWA (2007) relataram que o oncogene ETS-1 atua em conjunto com o SP1 na regulação da expressão do FASL em células endoteliais musculares. Os autores postularam que a atividade de SP1 é regulada por ETS-1 em células cancerosas. Em concordância com nossos achados, é possível que essa regulação também possa ocorrer com o c-ETS2, uma vez que ambos fatores regulam diversos genes.

Os fatores NF-E (*nuclear factor-erithroid derived*) ou GATA-1 modulam a diferenciação eritróide. Mutações desse gene está relacionado com o desenvolvimento de leucemia mielóide (ELAGIB *et al.*, 2007). ELAGIB *et al.* (2003) apontaram a interação entre esse fator e o RUNX-1 (um fator de transcrição mielóide da família do RUNX2) como co-expressos na diferenciação megacariocítica. Sabe-se que o RUNX-1/AML1 apresenta um papel crucial no desenvolvimento de leucemias. ELAGIB *et al.* (2004) aponta a interação desse fator com a via NOTCH, apontando uma nova via regulatória ligando os fatores c-JUN, HERP2 e GATA-1.

O C/EBP (*CCAAT/enhancer binding protein*) delta encontra-se envolvido com processos inflamatórios, resposta imune e inúmeros tipos de cânceres (REFS). WANG *et al* (2005) mostrou que esse fator é ativado pela via PI3-kinase/p38(MAPK)/CREB em células de carcinomas epidermóides A431. Mais recentemente, KO *et al.*(2008) demonstraram que o C/EBP delta apresenta interação física com o NF-E1/GATA-1 em câncer cervical e hepatocarcinoma celular.

Em análise dos resultados obtidos e em vista da literatura relacionada, podemos apontar a possibilidade de regulação dos nós gênicos analisados por esses fatores de

transcrição, envolvidos com o câncer e/ou diferenciação celular. Serão necessários estudos posteriores para a confirmação desses achados. Finalmente, essa análise por busca de motivos de ligação de fatores de transcrição pode ser considerada neste trabalho como uma validação *in silico* do modelo de redes, uma vez que comprova que genes que apresentam interações hipotéticas podem ser regulados pelo mesmo fator de transcrição.

7.5. Validação dos dados de expressão gênica por PCR em tempo real

Apesar das variações em termos das metodologias de normalização de cada técnica, a validação por experimentos de PCR em tempo real encontra-se de acordo com o perfil de expressão gênica através dos microarrays.

O único transcrito que apresentou significância estatística por PCR em tempo real foi o nó genico PRKDC, nos tempos de 24h e 7 dias em MSCs derivadas de medula óssea e 7 dias em cordão umbilical. Os transcritos GNG12 e MINA apresentaram um padrão de expressão similar ao dos cDNA microarrays. Tanto para o nó gênico GNG12, um gene da via do cálcio expresso em resposta a hormônios, quanto para o gene MINA, um alvo do c-MYC considerado marcador de cânceres sólidos, a variação entre os tempos não foi significativo para nenhum dos materiais estudados.

7.6. Perspectivas futuras

Este trabalho levanta questões que podem ser investigadas em estudos futuros, entre elas:

1. Das interações gênicas previstas pelas redes gênicas em nível de mRNA, quais os microRNAs atuantes nesse processo?
2. Saber se o modelo experimental de indução de sarcoma a partir de células-tronco mesenquimais em cultura descrito na literatura é reprodutível e, em caso afirmativo, quais os mecanismos moleculares atuantes e como os nós gênicos identificados se comportam.
3. Avaliar se os nós gênicos apresentam resposta em ensaios angiogênicos, principalmente os receptores de cinases de tirosina, como o PRKDC.

Além disso, o presente trabalho também apresentou várias ESTs (expressed sequence tags) que foram moduladas, além de vários genes que foram cortados na rede que pertencem a um outro conjunto de interações ainda a serem elucidadas.

Referências

8. REFERÊNCIAS

AÇIL, Y.; TERHEYDEN H.; DUNSCHE A.; FLEINER B.; JEPSEN S.; Three-dimensional cultivation of human osteoblast-like cells on highly porous natural bone mineral. **Journal of Biomedical Material Research.** v.51, n.4, p.703-710, 2000.

AFZAL, F.; PRATAP, J.; ITO, K.; ITO, Y.; STEIN, J.L.; VAN WIJNEN A.J., STEIN G.S., LIAN J.B., JAVED A. Smad function and intranuclear targeting share a Runx2 motif required for osteogenic lineage induction and BMP2 responsive transcription. **Journal of Cell Physiology.** v.204, n. 1, p. 63-72, 2005.

AITKENHEAD, M.; WANG, S. J.; NAKATSU, M. N.; MESTAS, J.; HEARD, C.; HUGHES, C. C. Identification of endothelial cell genes expressed in an in vitro model of angiogenesis: induction of ESM-1, (beta)ig-h3, and NrCAM. **Microvascular Research.** v. 63, n. 2, p. 159-171, 2002.

ALFORD, A.L.; HANLENSON, K.D. Matricellular proteins: Extracellular modulators of bone development, remodeling, and regeneration. **Bone.** v.38, p.749-757, 2006.

AL-HAJJ, M.; WICHA, M.S.; BENITO-HERNANDEZ, A.; MORRISON, S.J.; CLARKE, M.F. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. **Proceeding of National Academy of Sciences U S A.** v. 100, n. 7, p. 3983-3988, 2003.

AMARIGLIO, N.; HIRSHBERG, A.; SCHEITHAUER, B. W.; COHEN, Y.; LOEWENTHAL, R.; TRAKHTENBROT, L.; PAZ, N.; KOREN-MICHOWITZ, M.; WALDMAN, D.; LEIDER-TREJO, L.; TOREN, A.; CONSTANTINI, S.; RECHAVI, G. Donor-derived brain tumor following neural stem cell transplantation in an ataxia telangiectasia patient. **PLoS Medicine.** v.17; v.6, n. 2, p. e1000029, 2009.

ANDERSON, C.W.; CARTER, T.H.; The DNA-activated protein kinase-DNA-PK. **Current Topics on Microbiology Immunology.** v. 217, p. 91-111, 1996

ANDERSON, C.W.; LEES-MILLER, S.P.; The nuclear serine/threonine protein kinase DNA-PK. **Criticals Reviews of Eukaryotic Gene Expression.** v. 2, n. 4, p. 283-314, 1992.

ARRAY superscience. Desenvolvido por: uniscience. Site que disponibiliza conjunto de transcritos para construção de microarrays. Disponível em: <www.uniscience.org> Acesso em: 23 ago 2008 Site.

AVITAL, I.; MOREIRA, A. L.; KLIMSTRA, D. S.; LEVERSHA, M.; PAPADOPOLOUS, E.; BRENNAN, M.; DOWNEY, R. J.; Donor Derived Human Bone Marrow Stem Cells Contribute to Solid Organ Cancers Developing after Bone Marrow Transplantation. **Stem Cells**. v. 4, n. 9, p. 1-13, 2007.

AUBIN, J.E. Advances in the osteoblast cell lineage. **Biochemistry & Cell Biology**. v.36, p. 403-408, 1998.

BABELOMICS funcional analysis of genome-scale experiments. Desenvolvido por: Principe Felipe, Centro de Investigacion. Banco de Dados de busca funcional de informações relacionadas a genes. Disponível em: <<http://www.fatigo.org/>> Acesso em: 15 set. 2008. Site.

BAILEY, T. L.; WILLIAMS, N.; MISLEH, C.; LI, W. W.; MEME: Discovering and Analyzing DNA and Protein Sequence Motifs. **Nucleic Acid Research**. v. 34, p. W369-W373, 2006.

BASSO, K.; MARGOLIN, A.A.; STOLOVITZKY, G.; KLEIN, U.; DALLA-FAVERA, R.; CALIFANO, A. Reverse engineering of regulatory networks in human B cells. **Nature Genetics**. v. 37, n. 4 p. 382-90, 2005.

BELLESINI, L.S.; BELOTI, M.M.; CRIPPA, G.E.; BOMBONATO-PRADO, K.F.; JUNTA, C.M.; MARQUES, M.M.; PASSOS, G.A.; ROSA, A.L. The effect of TAK-778 on gene expression of osteoblastic cells is mediated through estrogen receptor. **Experimental Biology Medicine**. v. 234, p. 190-9, 2009.

BENGTSSON, H.; JÖNSSON, G.; VALLON-CHRISTERSSON, J.; Calibration and assessment of channel-specific biases in microarray data with extended dynamical range. **BMC Bioinformatics**. v. 5, p. 177, 2004.

BHATTACHARYA, B.; MIURA, T.; BRANDENBERGER, R.; MEJIDO, J.; LUO, Y.; YANG, A.X.; JOSHI, B.H.; GINIS, I.; THIES, R.S.; AMIT, M.; LYONS, I.; CONDIE, B.G.; ITSKOVITZ-ELDOR, J.; RAO, M.S.; PURI, R.K.; Gene expression in human embryonic stem cell lines: unique molecular signature. **Blood**. v. 103, n. 8, p. 2956-2964, 2004.

BINDERMAN, I.; DUKSIN, D.; HARELL, A.; KATZIR, E.; SACHS, L.; Formation of bone tissue in culture from isolated bone cells. **Journal of Cell Biology**. v. 61, n. 2, p. 427-439, 1974.

BOEHME, K. A.; KULIKOV, R.; BLATTNER C. p53 stabilization in response to DNA damage requires Akt/PKB and DNA-PK. **Proceeding of National Academy of Sciences U S A**. v. 105, n. 22 p. 7785-7790, 2008.

BOMBONATO-PRADO, K.F.; BELLESINI, L.S.; JUNTA, C.M.; MARQUES, M.M.; PASSOS, G.A.; ROSA, A.L. Microarray-based gene expression analysis of human osteoblasts in response to different biomaterials. **Journal of Biomedical Material Research**. v.88 p. 401-8, 2009.

BONNET, D.; DICK, J.E. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. **Nature Medicine**. v.3, n. 7 p. 730-7, 1997.

BRUDER, S.P.; HOROWITZ, M.C.; MOSCA, J.D.; HAYNESWORTH, S.E. Monoclonal antibodies reactive with human osteogenic cell surface antigens. **Bone**. v. 21, n. 3, p.225-35, 1997.

CHENG, S.L.; YANG, J.W.; RIFAS, L.; ZHANG, S.F.; AVIOLI, L.V. Differentiation of human bone marrow osteogenic stromal cells in vitro: induction of the osteoblast phenotype by dexamethasone. **Endocrinology**. v. 134, n. 1, p.277-86, 1994.

CLARKE, P. A.; TE POELE, R.; WORKMAN, P. Gene expression microarray technologies in the development of new therapeutic agents. **European Journal of Cancer**. v. 40, n. 17, p. 2560-91, 2004.

CLINICALTRIAL.GOV a service of the U.S. National Institute of Health. Desenvolvido por: United States National Institute of Health, 2009. Apresenta informações sobre ensaios clínicos. Disponível em: <<http://clinicaltrials.gov/>>. Acesso em 12 fev. 2009. Site.

CHAKRABARTY, K.; HEUMANN,R. Prospective of Ras signaling in stem cells. **Biology Chemistry**, v.386, n.7, p. 791-798, 2008.

COELHO, M.J.; CABRAL, A.T.; FERNANDE, M.H. Human bone cell cultures in biocompatibility testing. part I: osteoblastic differentiation of serially passaged human bone marrow cells cultured in alpha-MEM and in DMEM. **Biomaterials**. v. 21, n. 11, p. 1087-94, 2000.

CONACCI-SORRELL, M. E.; BEN-YEDIDIA, T.; SHTUTMAN, M.; FEINSTEIN, E.; EINAT, P.; BEN-ZE'EV, A. Nr-CAM is a target gene of the beta-catenin/LEF-1 pathway in melanoma and colon cancer and its expression enhances motility and confers tumorigenesis. **Genes & Development**. v. 16, n. 16, p. 2058-2072, 2002.

CONRADIE, M.M.; DE WET, H.; KOTZE, D.D.; BURRIN, J.M.; HOUGH, F.S.; HULLEY, P.A. Vanadate prevents glucocorticoid-induced apoptosis of osteoblasts in vitro and osteocytes in vivo. **Endocrinology**. v. 195, n. 2; p. 229-240, 2007.

COWLING, V.H.; COLE, M.D. E-cadherin repression contributes to c-Myc-induced epithelial cell transformation. **Oncogene**. v. 26, n. 24, p. 3582-3586, 2007

DA SILVA MEIRELES, L.; CHAGASTELLES, P. C.; NARDI, N. B. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. **Journal of Cell Science**. v. 119, n. 11, p. 2204-2213, 2006.

DAVID-DUFILHO, M.; MILLANVOYE-VAN, BRUSSEL, E.; TOPAL, G.; WALCH, L.; BRUNET, A.; RENDU, F. Endothelial thrombomodulin induces Ca²⁺ signals and nitric oxide synthesis through epidermal growth factor receptor kinase and calmodulin kinase II. **Journal of Biology Chemistry**. v. 280, n. 43, p. 35999-36006, 2005.

DAVIES, S.R.; DENT, C.; WATKINS, G.; KING, J.A.; MOKBEL, K.; JIANG, W.G. Expression of the cell to cell adhesion molecule, ALCAM, in breast cancer patients and the potential link with skeletal metastasis. **Oncology Reports**. v. 19, n. 2, p. 555-61, 2008.

DOCHEVA, D.; POPOV, C.; MUTSCHLER, W.; SCHIEKER, M. Human Mesenchymal Stem Cells in Contact with their Environment: Surface Characteristics and the Integrin System. **Journal of Cellular Molecular Medicine**. v. 11, n. 1, p. 21-38, 2007.

DOMINICI, M.; LE BLANC, K.; MUELLER, I.; SLAPER-CORTENBACH, I.; MARINI, F.; KRAUSE, D.; DEANS, R.; KEATING, A.; PROCKOP, D.J.; HORWITZ, E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**. v. 8, n. 4, p.315-317, 2006.

DONTU, G.; ABDALLAH, W.M.; FOLEY, J.M.; JACKSON, K.W.; CLARKE, M.F.; KAWAMURA, M.J.; WICHA, M.S. In vitro propagation and transcriptional profiling of human mammary stem/progenitor cells. **Genes & Development**. v. 17, p. 1253–1270, 2003.

DUCY, P.; ZHANG, R.; GEOFFROY, V.; RIDALL, A.L.; KARSENTY, G. *Osf2/Cbfa1: a transcriptional activator of osteoblast differentiation.* **Cell.** v. 89, n. 5, p. 747-54, 1997.

DUGGAN, D. J.; BITTNER, M.; CHEN, Y.; MELTZER, P.; TRENT, J. M. Expression profiling using cDNA microarrays. **Nature genetics.** v.21, p. 10-14, 1999.

EDWIN, F.; PATEL, T. B. A novel role of Sprouty 2 in regulating cellular apoptosis. **Journal of Biology Chemistry.** v. 283, n. 6, p. 3181-90, 2008.

EISEN, M.B.; SPELLMAN, P.T.; BROWN, P.O.; BOTSTEIN, D. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proceedings of National Academy of Science U S A.* v.95, n.25, p.14863-14868, 1998.

ELAGIB, K.E.; RACKE, F.K.; MOGASS, M.; KHETAWAT, R.; DELEHANTY, L.L.; GOLDFARB, A.N. RUNX1 and GATA-1 coexpression and cooperation in megakaryocytic differentiation. **Blood.** v. 101, n. 11, p. 4333-41, 2003.

ELAGIB, K. E.; XIAO, M.; HUSSAINI, I M.; DELEHANTY L, L.; PALMER, L. A.; RACKE, F. K.; BIRNER, M. J.; SHANMUGASUNDARAM, G.; MCDEVITT, M. A.; GOLDFARB, A. N. Jun blockade of erythropoiesis: role for repression of GATA-1 by HERP2. **Molecular Cell Biology.** v. 24, n. 17, p. 7779-7794, 2004.

ELAGIB, K.E. & GOLDFARB, A.N. Regulation of RUNX1 transcriptional function by GATA-1. **Critical Reviews on Eukaryotic Gene Expression.** v. 7, n. 4, p. 271-280, 2007.

ERICES, A.; CONGET, P.; MINGUELL, J. J. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. **British Journal of Haematology.** v. 109, p. 235-242, 2000.

FERRARA, N. Vascular endothelial growth factor. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology.** v. 29, n. 6, p. 789-791, 2009.

FRIEDENSTEIN, A. J.; PETRAKOVA, K. V.; KUROLESOVA, A. I.; FROLOVA, G. P. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. **Transplantation.** v. 6, n. 2, p. 230-247, 1968.

GALIÈ, M.; KONSTANTINIDOU, G.; PERONI, D.; SCAMBI, I.; MARCHINI, C.; LISI, V.; KRAMPERA, M.; MAGNANI, P.; MERIGO, F.; MONTANI, M.; BOSCHI, F.; MARZOLA, P.; ORRÙ, R.; FARACE,

P.; SBARBATI, A.; AMICI, A. Mesenchymal stem cells share molecular signature with mesenchymal tumor cells and favor early tumor growth in syngeneic mice. **Oncogene**. v. 27, n. (18), p. 2542-2551, 2008.

GARANT; P. R. (2003). Oral cells and tissues. Illinois: Quintessence. p195-226.

GARTLAND; A. (2005). Isolation and culture of human osteoblasts. In: PICOT; Joanna (Ed.). Human cell culture protocols. 2. ed. Totowa: Humana, p.29-54. (Methods in molecular medicine, v.107).

GAUR, T.; LENGNER, C. J.; HOVHANNISYAN, H.; BHAT, R. A.; BODINE, P. V.; KOMM, B. S.; JAVED, A.; VAN WIJNEN, A. J.; STEIN, J. L.; STEIN, G. S.; LIAN, J. B. Canonical WNT signaling promotes osteogenesis by directly stimulating Runx2 gene expression. **Journal of Biology Chemistry**. v. 280, n. 39, p. 33132-40, 2005.

GENE network. Desenvolvido por: Hsuan-Cheng Huang. Ferramenta de bioinformática para construção de redes gênicas a partir de dados de expressão gênica. Disponível em: <<http://genenetwork.sbl.bc.sinica.edu.tw/index.asp>> Acesso em: 26 nov. 2008. Site.

GENTLEMAN, R. C.; CAREY, V. J.; BATES, D. M.; BOLSTAD, B.; DETTLING, M.; DUDOIT, S.; ELLIS, B.; GAUTIER, L.; GE, Y.; GENTRY, J.; HORNIK, K.; HOTHORN, T.; HUBER, W.; IACUS, S.;

GERON. Desenvolvido por: Geron, 2009. Apresenta informações sobre a empresa Geron. Disponível em: <<http://www.geron.com>> Acesso em: 30 jan. 2009. Site.

IRIZARRY, R.; LEISCH, F.; LI, C.; MAECHLER, M.; ROSSINI, A. J.; SAWITZKI, G.; SMITH, C.; SMYTH, G.; TIERNEY, L.; YANG, J. Y.; ZHANG, J. Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. **Genome Biology**. v. 5, n. 10, p. R80, 2004.

GIBBS, C.P.; KUKKOV, V.G.; REITH, J.D.; TCHIGRINOVA, O.; SUSLOV, O.N.; SCOTT, E.W.; GHIVIZZANI, S.C.; IGNATOVA, T.N.; STEINDLER, D.A. Stem-like cells in bone sarcomas: implications for tumorigenesis. **Neoplasia**. v.7, n.11, p.967-976, 2005.

GIORDANO, A.; GALDERISI, U.; MARINO, I. R. From the laboratory bench to patient's bedside: an update on clinical trials with mesenchymal stem cells. **Journal of Cellular Physiology**. v. 211, p. 27-35, 2007.

GLINSKY, G. V.; BEREZOVSKA, O.; GLINSKII, A. B. Microarray analysis identifies a death-from-cancer signature predicting therapy failure in patients with multiple types of cancer. **The Journal of Clinical Investigation**. v. 115, n. 6, p. 1503-1521, 2005.

GLINSKY, G.V. "Stemness" genomics law governs clinical behavior of human cancer: implications for decision making in disease management. **Journal of Clinical Oncology**. v. 26, n. 17, p. 2846-2853, 2008.

GÓRKA B.; SKUBIS-ZEGADLO J.; MIKULA M.; BARDADIN K.; PALICZKA E.; CZARNOCKA B. NrCAM, a neuronal system cell-adhesion molecule, is induced in papillary thyroid carcinomas. **British Journal of Cancer**. v. 97, n. 4, p. 531-538, 2007.

GROUSE, L.H.; MUNSON, P.J.; NELSON, P.S. Sequence databases and microarrays as tools for identifying prostate cancer biomarkers. **Urology**. v. 57, n. 4, p. 154-159, 2001, Suplemento 1.

GUO, W.; GIANCOTTI, F.G. Integrin signalling during tumour progression. **Nature Reviews of Molecular Cell Biology**. n. 10, p. 816-26, 2004.

HAMAKI, T.; KAJIWARA, K.; KAMI, M.; MURASHIGE, N.; FUNAKI, M.; HARIMA, A.; KOGURE, K.; YAMADA, K.; KODO, H.; KOUZA, I Y. Donor cell-derived acute monoblastic leukemia involving MLL gene translocation in an adult patient who received umbilical cord blood transplantation. **Bone Marrow Transplantation**. v. 41, n. 1, p. 91-2, 2008.

HARRINGTON, C. A.; ROSENOW, C.; RETIEF, J. Monitoring gene expression using DNA microarrays. **Current Opinion on Microbiology**. v. 3, n. 3, p. 285-291, 2000.

HARTEMINK, A. J. Reverse engineering gene regulatory networks. **Nature Biotechnology**. v. 23, p. 554-555, 2005.

HASELTON, D. R.; LLOYD, P. M.; JOHNSON, W. T. A comparison of the effects of two burs on endodontic access in all-ceramic high lucite crowns. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology Endod**. v. 89, n. 4, p. 486-492, 2000.

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**. v.19, p. 1379-1394, 2004.

HOFFMAN, B.; LIEBERMANN, D.A. Apoptotic signaling by c-MYC. **Oncogene**. v. 27, n. 50, p. 6462-6472, 2008.

HOOD, J. D.; CHERESH, D. A. Role of integrins in cell invasion and migration. **Nature Reviews of Cancer**. v. 2, n. 2, p. 91-100, 2002.

HOUGHTON, J.; STOICOV, C.; NOMURA, S.; ROGERS, A. B.; CARLSON, J.; LI, H.; CAI, X.; FOX, J. G.; GOLDENRING, J. R.; WANG, T. C. Gastric cancer originating from bone marrow-derived cells. **Science**. v. 306, n. 5701, p. 1568-71, 2004.

IGNATIUK, A.; QUICKFALL, J.P.; HAWRYSH, A.D.; CHAMBERLAIN, M.D.; ANDERSON, D.H. The smaller isoforms of ankyrin 3 bind to the p85 subunit of phosphatidylinositol 3'-kinase and enhance platelet-derived growth factor receptor down-regulation. **Journal of Biology Chemistry**. v. 281, n. 9, p. 5956-5964, 2006.

IHAKA, R.; GENTLEMAN, R. R: a language for data analysis and graphics. **Journal of Computational and Graphical Statistics**. v. 5, n. 3, p. 299-314, 1996.

ISHIZAKI, H.; YANO, H.; TSUNEOKA, M.; OGASAWARA, S.; AKIBA, J.; NISHIDA, N.; KOJIRO, S.; FUKAHORI, S.; MORIYA, F.; MATSUOKA, K.; KOJIRO, M. Overexpression of the myc target gene Mina53 in advanced renal cell carcinoma.. **Pathology International**. v. 57, n. 10, p. 672-680, 2007.

ITO, Y. Oncogenic Potential of the RUNX Gene Family: 'Overview'. **Oncogene**. v. 23, n. 24, p. 4198-208, 2004.

IYER, A.; ROBERT, M. E.; BIFULCO, C. B.; SALEM, R. R.; JAIN, D. Different cytokeratin and neuronal cell adhesion molecule staining patterns in focal nodular hyperplasia and hepatic adenoma and their significance. **Human Pathology**. v. 39, n. 9, p. 1370-7, 2008.

JACKSON, S. P.; JEGGO, P. A. DNA double-strand break repair and V(D)J recombination: Involvement of DNA-PK. **Trends of Biochemistry Sciences**. v. 20 p. 412-415, 1995.

JEZIERSKA, A.; MATYSIAK, W.; MOTYL, T. ALCAM/CD166 protects breast cancer cells against apoptosis and autophagy. **Medical Science Monit**. v. 12, n. 8, p. BR263-BR273, 2006.

JORDAN, C. T. Cancer stem cell biology: from leukemia to solid tumors. **Current Opinion in Cell Biology**. v. 16, p. 708-712, 2004.

KATO, M. WNT/PCP signaling pathway and human cancer. **Oncology Reports**. v. 14, n. 6, p. 1583-1588, 2005.

KATO, M. Networking of WNT, FGF, Notch, BMP, and Hedgehog signaling pathways during carcinogenesis. **Stem Cell Reviews**. n. 3, n. 1, p. 30-8, 2007.

KATO, M.; KATO, M. Cross-talk of WNT and FGF signaling pathways at GSK3beta to regulate beta-catenin and SNAIL signaling cascades. **Cancer Biology Therapy**. v. 5, n. 9, p. 1059-64, 2006.

KATO, Y.; KATO, M. FGF signaling inhibitor, SPRY4, is evolutionarily conserved target of WNT signaling pathway in progenitor cells. **International Journal of Molecular Medicine**. v. 17, n. 3, p.529-532, 2006.

KATO, Y.; KATO, M. WNT signaling pathway and stem cell signaling network. **Clinical Cancer Research**. v. 13, n. 14, p. 4042-5, 2007.

KEGG Kyoto encyclopedia of genes and genomes. Desenvolvido por: Kanehisa Laboratories, 1995-2009. Banco de Dados de busca de vias de sinalização celular. Disponível em: <<http://www.genome.jp/kegg>> Acesso em: 15 set. 2008. Site.

KERN, B.; SHEN, J.; STARBUCK, M.; KARSENTY G. Cbfa1 contributes to the osteoblast-specific expression of type I collagen genes. **Journal of Biology Chemistry**. v. 276, n. 10, p. 7101-7107, 2001.

KIM, C. G.; LEE, J. J.; JUNG, D. Y.; JEON, J.; HEO, H. S.; KANG, H. C.; SHIN, J. H.; CHO, Y. S.; CHA, K. J.; KIM, C. G.; DO, B.; KIM, K. S.; KIM, H. Profiling of Differentially Expressed Genes in Human Stem Cells by cDNA microarray. **Molecules and Cells**. v. 21, n. 3, p. 343-355, 2006.

KO, C.Y.; HSU, H.C.; SHEN, M.R.; CHANG, W.C.; WANG, J.M. Epigenetic silencing of CCAAT/enhancer-binding protein delta activity by YY1/polycomb group/DNA methyltransferase complex. **Journal of Biology Chemistry**. v. 283, n. 45, p. 30919-32, 2008.

KOHN, A.D.; MOON, R.T. WNT AND CALCIUM SIGNALING: BETA-CATENIN-INDEPENDENT PATHWAYS. *CELL CALCIUM*. v. 38 n. 3-4, p. 439-446, 2005.

KONDO, T.; SETOBUCHI, T.; TAGA, T. Persistence of a small subpopulation of cancer stem-like cells in the C6 glioma cell line. **Proceeding of National Academy of Sciences U S A**. v. 101, n. 3, p. 781-786, 2004.

KTH microarrays center. Desenvolvido por: KTH Microarray Center, 2009. Site que disponibiliza a biblioteca KTH para normalização de dados de microarray. Disponível em: <<http://www.biotech.kth.se/molbio/microarray>> Acesso em: 16 out. 2007. Site.

LABORATÓRIO de imunogenética molecular. Desenvolvido por: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Banco de dados contendo os genes disponíveis no microarray. Disponível em: <www.rge.fmrp.usp.br/passos/hs_array> Acesso em: 18 nov. 2007. Site.

LAPIDOT, T.; SIRARD, C.; VORMOOR, J.; MURDOCH, B.; HOANG, T.; CACERES-CORTES, J.; MINDEN, M.; PATERSON, B.; CALIGIURI, M.A.; DICK, J.E. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. **Nature**. v. 17, p. 645-648, 1994.

LE BLANC, K.; RINGDEN, O. Immunobiology of human mesenchymal stem cell and future use in hematopoietic stem cell transplantation. **Biology of Blood and Marrow Transplantation**. v. 11, p. 321-334, 2005.

LECLERC, N.; NOH, T.; KHOKHAR, A.; SMITH, E.; FRENKEL, B. Glucocorticoids inhibit osteocalcin transcription in osteoblasts by suppressing Egr2/Krox20-binding enhancer. **Arthritis & Rheumatism**. v. 52, n. 3, p. 929-939, 2005

LEE, H. S.; CHOE, G.; PARK, K. U.; PARK, D. O. J.; YANG, H. K.; LEE, B. L.; KIM, W. H. Altered expression of DNA-dependent protein kinase catalytic subunit (DNA-PKcs) during gastric carcinogenesis and its clinical implications on gastric cancer. **International Journal of Oncology**. v. 31, n. 4, p. 859-866, 2007.

LEE, S. A.; HO, C.; ROY, R.; KOSINSKI, C.; PATIL, M. A.; TWARD, A. D.; FRIDLAND, J.; CHEN, X. Integration of genomic analysis and in vivo transfection to identify sprouty 2 as a candidate tumor suppressor in liver cancer. **Hepatology**. v. 47, n. 4, p. 1200-1210, 2008.

LI, L.; NEAVES, W. B. Normal stem cells and cancer stem cells: the niche matters. **Cancer Research**. v. 66, n. 9, p. 4453-4557, 2006.

LITO, P.; METS, B. D.; KLEFF, S.; O'REILLY, S.; MAHER, V. M.; MCCORMICK, J. J. Evidence that sprouty 2 is necessary for sarcoma formation by H-Ras oncogene-transformed human fibroblasts. **Journal of Biology Chemistry**. v. 283, n. 4, p. 2002-2009, 2008.

LIU, C.; CHEN, Z.; CHEN, Z.; ZHANG, T.; LU, Y. Multiple tumor types may originate from bone marrow-derived cells. **Neoplasia**. v. 8, n. 9, p. 716-24, 2006.

LIU, S.; DONTU, G.; WICHA, M.S. Mammary stem cells, self-renewal pathways, and carcinogenesis. **Breast Cancer Research**. v. 7, n. 3, p. 86-95, 2005.

LONG, M.W. Osteogenesis and bone-marrow-derived cells. **Blood Cells & Molecular Diseases**. v. 27, n. 3, p. 677-690, 2001.

MACEDO, C.; MAGALHÃES, D.A.; TONANI, M.; MARQUES, M.C.; JUNTA, C.M.; PASSOS, G.A. Genes that code for t cell signaling proteins establish transcriptional regulatory networks during thymus ontogeny. **Molecular Cell Biochemistry**. v. 318, n.1-2, p. 63-71, 2008.

MAJUMDAR, M.K.; KEANE-MOORE, M.; BUYANER, D.; HARDY, W.B.; MOORMAN, M.A.; MCINTOSH, K.R.; MOSCA, J.D. Characterization and functionality of cell surface molecules on human mesenchymal stem cells. **Journal of Biomedical Science**. v. 10, p. 228–241, 2003.

MANDALA. Desenvolvido por: Guilherme Liberato da Silva / Laboratório de Imunogenética Molecular. Ferramenta de bioinformática para análises das redes gênicas. Disponível em: <<http://rge.fmrp.usp.br/genes/>> Acesso em: 02 dez. 2008. Site.

MARGOLIN, A.A.; NEMENMAN, I.; BASSO, K.; WIGGINS, C.; STOLOVITZKY, G.; DALLA FAVERA, R.; CALIFANO, A. ARACNE: An algorithm for the reconstruction of gene regulatory networks in a mammalian cellular context. **BMC Bioinformatics**. v. 7, p. s7, 2006. suplemento 1

MATYS, V.; FRICKE, E.; GEFFERS, R.; GÖSSLING, E.; HAUBROCK, M.; HEHL, R.; HORNISCHER, K.; KARAS, D.; KEL, A.E.; KEL-MARGOULIS, O.V.; KLOOS, D.U.; LAND, S.; LEWICKI-POTAPOV, B.; MICHAEL, H.; MÜNCH, R.; REUTER, I.; ROTERT, S.; SAXEL, H.; SCHEER, M.; THIELE, S.; WINGENDER, E. TRANSFAC: transcriptional regulation, from patterns to profiles. **Nucleic Acids Research**. v. 31, n. 1, p. 374-378, 2003

MAYHALL, E.; PAFFET-LUGASSY, N.; ZON, L. I. The clinical potential of stem cells. **Current Opinion in Cell Biology**. v. 16, n. 6, p. 713-720, 2004.

MENOSI, M.; CREMONESE, N. JR.; MARON, L. G.; ARRUDA, P. Making colony PCR easier by adding gel-loading buffer to the amplification reaction. **Biotechniques**. v. 28, p. 424-426, 2000.

MINGUELL, J. J.; ERICES, A.; CONGET, P. Mesenchymal stem cells. **Experimental Biology Medicine** v. 226, n. 6, p. 507-20, 2001.

NELSON, W. J.; NUSSE, R. Convergence of Wnt, α -Catenin, and Cadherin Pathways. **Science**. v. 303, p. 1483-1487, 2004.

NETH, P.; CICCARELLA, M.; EGEA, V.; HOELTERS, J.; JOCHUM, M.; RIES, C. Wnt Signaling Regulates the Invasion Capacity of Human Mesenchymal Stem Cells. **Stem Cells**. v. 24, p. 1892-903, 2006.

NING, Y.M.; ROBINS, D.M. AML3/CBFalpha1 is required for androgen-specific activation of the enhancer of the mouse sex-limited protein (Slp) gene. **Journal of Biology Chemistry**. v. 274, n. 43, p. 30624-30, 1999.

OFORI-ACQUAH, S. F.; KING, J. A. Activated leukocyte cell adhesion molecule: a new paradox in cancer. **Translational Research**. v. 151, n. 3, p. 122-128, 2008.

PALMIERI, A.; PEZZETTI, F.; GRAZIANO, A.; RICCARDO, D.; ZOLLINO, I.; BRUNELLI, G.; MARTINELLI, M.; ARLOTTI, M.; CARINCI, F. Comparison between osteoblasts derived from human dental pulp stem cells and osteosarcoma cell lines. **Cell Biology International**. v. 3, n. 7, p. 733-738, 2008.

PAPACHRISTOU, D. J.; PAPAVALASSILOU, A. G. Osteosarcoma and chondrosarcoma: New signaling pathways as targets for novel therapeutic interventions. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**. v. 39, n. 5, p. 857-862, 2007.

PATHWAY commons. Desenvolvido por: Memorial Sloan-Kettering Cancer Center e a Universidade de Toronto. Banco de dados para busca de informação sobre vias biológicas. Disponível em: <www.pathwaycommon.org> Acesso em: 28 abril 2009. Site.

PFAFFL, M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**. v. 29, n. 9, p. e45, 2001.

PIERONI, F.; OLIVEIRA, F.M.; PANEPUCCHI, R.A.; VOLTARELLI, J.C.; SIMÕES, B.P.; FALCÃO, R.P. Development of donor cell derived acute myeloid leukemia after stem cell transplantation for chronic myeloid leukemia. **Bone Marrow Transplant.** v. 37, n. 8, p. 801-802, 2006

PINERO, GJ; FARACH-CARSON, MC; DEVOLL, RE; AUBIN, JE; BRUNN, JC; BUTLER, WT. Bone matrix proteins in osteogenesis and remodeling in the neonatal rat mandible as studied by imunolocalization of osteopontin, bone sialoprotein, 2HS-glycoprotein and alkaline phosphatase. **Archives of Oral Biology.** v. 40, n. 2, p. 145-55, 1995.

PITTENGER, M. F. ; MACKAY, A. M.; BECK, S. C.; JAISWAL, R. K.; DOUGLAS, R.; MOSCA, J. D.; MOORMAN, M. A.; SIMONETTI, D. W.; CRAIG, S.; MARSHAK, D. R. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. **Science.** v. 284, p. 143-147, 1999.

PRIMER3: WWW primer tool. Desenvolvido por: Steve Rozen e Whitehead Institute/MIT Center for Genome Research. Ferramenta de Bioinformática para a construção de primers. Disponível em: < http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi > Acesso em: 15 mar. 2007 e 28 set. 2008. Site.

PROCKOP, D. J. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. **Science.** v. 276, n. 5309, p. 71-74, 1997.

PUSZTAI, L.; AYERS, M.; STEC, J.; HORTOBÁGYI, G. N. Clinical Application of cDNA Microarrays in Oncology. **The Oncologist.** v. 8, p. 252-258, 2003.

QI, H.; AGUIAR, D.J.; WILLIAMS, S.M.; LA PEAN, A.; PAN, W.; VERFAILLIE, C.M. Identification of genes responsible for osteoblast differentiation from human mesodermal progenitor cells, **Proceedings of National Academy of Science U S A.** v. 100, n. 6, p. 3305-3310, 2003.

QIAO, J.; KANG, J.; KO, T.C.; EVERS, B.M.; CHUNG, D.H. Inhibition of transforming growth factor-beta/Smad signaling by phosphatidylinositol 3-kinase pathway. **Cancer Letters.** v. 242, n. 2, p. 207-14, 2006.

REYA, T.; CLEVERS, H. Wnt signalling in stem cells and cancer. **Nature.** v. 434, n. 14, p. 843-850, 2005.

ROSA, A. L.; BELOTI, M. M. Effect of cpTi surface roughness on human bone marrow cells. **Brazilian Dental Journal.** v. 14, p. 16-21, 2003.

RSAT: regulatory sequence analysis tools. Desenvolvido por: Jacques van Helden. Site de ferramentas de bioinformática para análises de seqüências. Disponível em: <<http://rsat.ulb.ac.be/rsat/>> Acesso em: 15 fev. 2009. Site.

SÁNCHEZ, A.; SETIÉN, F.; MARTINEZ, N.; OLIVA, J. L.; HERRANZ, M.; FRAGA, M. F.; ALAMINOS, M.; ESTELLER, M.; ROJAS, J. M. Epigenetic inactivation of the ERK inhibitor Spry2 in B-cell diffuse lymphomas. **Oncogene**. v. 27, n. 36, p. 4969-4972, 2008.

SATO, T.; FURUKAWA, K. Sequential action of Ets-1 and Sp1 in the activation of the human beta-1,4-galactosyltransferase V gene involved in abnormal glycosylation characteristic of cancer cells. **Journal of Biology Chemistry**. v. 282, n. 38, p. 27702-12, 2007.

SCDb the stem cell databade. Desenvolvido por: Ihor L. Lemischka, Kateri A. Moore e Christian Stoeckert. Banco de dados molecular de células-tronco. Disponível em: <<http://stemcell.mssm.edu/v2>> Acesso em: 14 maio 2009. Site.

SCHROEDER, T.M.; JENSEN, E.D.; WESTENDORF, J.J. Runx2: a master organizer of gene transcription in developing and maturing osteoblasts. **Birth Defects & Research of C Embryo Today**. v. 75, n. 3, p. 213-25, 2005.

SELL, S. Stem cell origin of cancer and differentiation therapy. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**. v. 51, p. 1–28, 2004.

SELVAMURUGAN, N.; JEFCOAT, S.C.; KWOK, S.; KOWALEWSKI, R.; TAMASI, J.A.; PARTRIDGE N.C. Overexpression of Runx2 directed by the matrix metalloproteinase-13 promoter containing the AP-1 and Runx/RD/Cbfa sites alters bone remodeling in vivo. **Journal of Cell Biochemistry**. v. 99, n. 2, p. 545-57, 2002.

SERAKINCI, N.; GULDBERG, P.; BURNS, J.S.; ABDALLAH, B.; SCHRØDDER, H.; JENSEN, T.; KASSEM, M. Adult human mesenchymal stem cell as a target for neoplastic transformation. **Oncogene**. v. 23, n. 29, p. 5095-8, 2004.

SETOGUCHI, T.; TAGA, T.; KONDO, T. Cancer stem cells persist in many cancer cell lines. **Cell Cycle**. v. 3, n. 4, p. 414–415, 2004.

SEVIGNANI, C.; CALIN, G.A.; SIRACUSA, L.D.; CROCE, C.M. Mammalian microRNAs: a small world for fine-tuning gene expression. **Mammalian Genome**. v. 17, n. 3, p. 189-202, 2006.

SILVA, G. L.; JUNTA, C. M.; SAKAMOTO-HOJO, E. T.; DONADI, E. A.; LOUZADA, J.R. P.; PASSOS, G. A. S. Genetic susceptibility loci in rheumatoid arthritis are differentially expressed, and their mRNAs establish regulatory networks with other gene transcripts. **Proceeding of National Academy of Sciences U S A**. in press, 2009.

SINGH, S.K; CLARKE, I.D; TERASAKI, M.; BONN, V.E.; HAWKINS, C.; SQUIRE, J.; DIRKS, P.B. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. **Cancer Research**. v. 63, n. 18, p. 5821–5828, 2003.

SONG, J; UGAI, H; NAKATA-TSUTSUI, H; KISHIKAWA, S; SUZUKI, E; MURATA, T; YOKOYAMA, KK. Transcriptional regulation by zinc-finger proteins Sp1 and MAZ involves interactions with the same cis-elements. **International Journal of Molecular Medicine**. v. 11, n. 5, p. 547-553, 2003.

SOROCEANU, L.; KHARBANDA, S.; CHEN, R.; SORIANO, R.H.; ALDAPE, K.; MISRA, A.; ZHA, J.; FORREST, W.F.; NIGRO, J.M.; MODRUSAN, Z.; FEUERSTEIN, B.G.; PHILLIPS H.S. Identification of IGF2 signaling through phosphoinositide-3-kinase regulatory subunit 3 as a growth-promoting axis in glioblastoma. **Proceeding of National Academy of Sciences U S A**. v. 104, n. 9, p. 3466-71, 2007.

SOURCE. Desenvolvido por: Stanford University, 2000. Banco de dados para análise genômica funcional. Disponível em: <<http://source.stanford.edu/cgi-bin/source/sourceSearch>> Acesso em: 21 ago. 2008. Site.

SPINA, V.; MONTANARI, N.; ROMAGNOLI, R. Malignant tumors of the osteogenic matrix. **European Journal of Radiology**. p. S98-109, 1998. Suplemento 1

STEMBASE Ontário genomics innovation centre. Desenvolvido por: Ottawa Health Research Institute, 2009. Banco de dados genômicos de células-tronco. Disponível em: <<http://www.steambase.ca/>> Acesso em: 3 fev. 2009. Site.

STRATAGENE na agilent technologies division. Desenvolvido por: Strategene, 2009. Site da empresa Strategene. Disponível em: <<http://www.stratagene.com>> Acesso em: 25 out. 2008. Site.

TAKATA, M.; SASAKI, M.S.; SONODA, E.; MORRISON, C.; HASHIMOTO, M.; UTSUMI, H.; YAMAGUCHI-IWAI, Y.; SHINOHARA, A.; TAKEDA, S. Homologous recombination and non-homologous end-joining pathways of DNA double-strand break repair have overlapping roles

in the maintenance of chromosomal integrity in vertebrate cells. **EMBO Journal**. v. 17, n. 18, p. 5497-508, 1998.

TEGNÉR, J.; YEUNG, M. K. S.; HASTY, J.; COLLINS, J. J. Reverse engineering gene networks: Integrating genetic perturbations with dynamical modeling. **Proceeding of National Academy of Sciences U S A**. v. 100, n. 10, p. 5944-5949, 2003.

TEYE, K.; TSUNEOKA, M.; ARIMA, N.; KODA, Y.; NAKAMURA, Y.; UETA, Y.; SHIROUZU, K.; KIMURA, H. Increased expression of a Myc target gene Mina53 in human colon cancer.. **American Journal of Pathology**. v. 164, n. 1, p. 205-216, 2004.

TEYE, K.; ARIMA, N.; NAKAMURA, Y.; SAKAMOTO, K.; SUEOKA, E.; KIMURA, H.; TSUNEOKA, M. Expression of Myc target gene mina53 in subtypes of human lymphoma. **Oncol Reports**. v. 18, n. 4, p. 841-848, 2007.

THE R Project for statistical Computing. Desenvolvido por: Department of Statistics and Mathematics of the WU Wien. Site que disponibiliza o software R. Disponível em: <www.r-project.org> Acesso em: 16 out. 2007. Site.

TIGR microarray tools. Desenvolvido por: J. Craig Venter Institute. Site que disponibiliza o aplicativo *Multi Experiment Viewer*. Disponível em: <<http://www.tigr.org/software>> Acesso em: 7 out. 2007. Site.

TOLAR, J.; NAUTA, A.J.; OSBORN, M.J.; PANOSKALTSIS-MORTARI, A.; MCELMURRY, R.T.; BELL, S.; XIA, L.; ZHOU, N.; RIDDLE, M.; SCHROEDER, T.M.; WESTENDORF, J.J.; MCIVOR, R.S.; HOGENDOORN, P.C.; SZUHAI, K.; OSETH, L.; HIRSCH, B.; YANT, S.R.; KAY, M.A.; PEISTER, A.; PROCKOP, D.J.; FIBBE, W.E.; BLAZAR, B.R. Sarcoma derived from cultured mesenchymal stem cells. **Stem Cells**. v. 25, n. 2, p. 371-9, 2007.

TRANSFAC. Desenvolvido por: Gene Regulation. Site que disponibiliza o banco de dados Transfac. Disponível em: <<http://www.gene-regulation.com/>> Acesso em: 15 fev. 2009. Site.

TSAI, M.S.; HWANG, S.M.; CHEN, K.D.; LEE, Y.S.; HSU, L.W.; CHANG, Y.J.; WANG, C.N.; PENG, H.H.; CHANG, Y.L.; CHAO, A.S.; CHANG, S.D.; LEE, K.D.; WANG, T.H.; WANG, H.S.; SOONG, Y.K. Functional network analysis of the transcriptomes of mesenchymal stem cells derived from amniotic fluid, amniotic membrane, cord blood, and bone marrow. **Stem Cells**. v. 25, n. 10, p. 2511-2523, 2007.

TSAI, R. Y. L. A molecular view of stem cell and cancer cell self-renewal. **International Journal of Biochemistry Cell Biology**. v. 36, n. 4, p. 684-694, 2004.

TSUNEOKA, M.; FUJITA, H.; ARIMA, N.; TEYE, K.; OKAMURA, T.; INUTSUKA, H.; KODA, Y.; SHIROUZU, K.; KIMURA, H. Mina53 as a potential prognostic factor for esophageal squamous cell carcinoma. **Clin Cancer Research**. v. 10, n. 21, p. 7347-7356, 2004.

TSUNEOKA, M.; KODA, Y.; SOEJIMA, M.; TEYE, K.; KIMURA, H. A novel myc target gene, mina53, that is involved in cell proliferation. **Journal of Biology Chemistry**. v. 277, n. 38, p. 35450-35459, 2002.

TYSNES, B.B.; BJERKVIG, R. Cancer initiation and progression: involvement of stem cells and the microenvironment. **Biochemistry Biophys Acta**. v. 1775, n. 2, p. :283-97, 2007.

UCELLI, A.; MORETTA, L.; PISTOIA, V. Mesenchymal stem cells in health and disease. **Nature Reviews Immunology**. v. 9, p. 726-36, 2008.

VATS, A.; BIELBY, R. C.; TOLLEY, N. S.; NEREM, R.; POLAK, J. M. Stem Cells. **Lancet**. v. 366, n. 9485, p. 592-602, 2005.

WANG, E.; LENFERINK, A.; O'CONNOR-MCCOURT, M. Cancer Systems Biology: Exploring Cancer associated Genes on Cellular Networks. **Cellular & Molecular Life Sciences**. n.64, p. 1752-1762, 2007.

WANG, J.M.; TSENG, J.T.; CHANG, W.C. Induction of human NF-IL6beta by epidermal growth factor is mediated through the p38 signaling pathway and cAMP response element-binding protein activation in A431 cells. **Molecular Biology of Cell**. v.16, n. 7, p. 3365-76, 2005.

WANG, Y.; JOSHI, T.; ZHANG, X.S.; XU, D.; CHEN, L. Inferring gene regulatory networks from multiple microarray datasets. **Bioinformatics**. v. 22, p. 2413-2420, 2006.

WEIGEL, M.T.; MEINHOLD-HEERLEIN, I.; BAUERSCHLAG, D.O.; SCHEM, C.; BAUER, M.; JONAT, W.; MAASS, N.; MUNDHENKE, C. Combination of imatinib and vinorelbine enhances cell growth inhibition in breast cancer cells via PDGFR beta signaling. **Cancer Letters**, v. 273, n.1, p. 70-79, 2009

WICHA, M. S.; Liu, S.; Dontu, G. Cancer Stem Cells: An Old Idea - A Paradigm Shift. **Cancer Research**. v. 66, n. 4, p. 1883-1890, 2006.

WILKENS, M. **On the molecular genetic etiology of osteosarcoma**: gene expression in osteoblasts, osteosarcoma cell lines and osteosarcoma tumours. 2006. 133 f. Tese (Doutorado) – Rijksuniversiteit, Groningen. Alemanha, 2006.

WNT cancer. Desenvolvido por: Stanford University. Site do WNTome. Disponível em: <<http://www.stanford.edu/~rnusse/pathways/wntcancer.html>> Acesso em: 14 jan. 2009. Site.

WU, C.C; HUANG, H.C.; JUAN, H.F.; CHEN, S.T. GeneNetwork: an interactive tool for reconstruction of genetic networks using microarray data. **Bioinformatics**. v. 20, n. 18, p. 3691-3693, 2004.

WU, H.C.; LIN, C.C.; CHEN, W.C.; CHEN, H.Y.; TSAI, F.J. Osteocalcin gene HindIII C/T polymorphism is a biomarker for prostate cancer and responsiveness to hormone therapy. **European Urology**. v. 43, n. 2, p. 197-200, 2003

YANG, B.F.; XIAO, C. ROA, W.H.; KRAMMER, P.H.; HAO, C. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II regulation of c-FLIP expression and phosphorylation in modulation of Fas-mediated signaling in malignant glioma cells. **Journal of Biology Chemistry**. v. 278, n. 9, p. 7043-7050, 2003

YANG, J.; FIZAZI, K.; PELEG, S.; SIKES, C. R.; RAYMOND, A. K.; JAMAL, N.; HU, M.; OLIVE, M.; MARTINEZ, L. A.; WOOD, C. G.; LOGOTHETIS, C. J.; KARSENTY, G.; NAVONE, N. M.; Prostate cancer cells induce osteoblast differentiation through a Cbfa1-dependent pathway. **Cancer Research**. v. 61, n. 14, p. 5652-5259, 2001.

YANG, Y.H.; SPEED, T. Design issues for cDNA microarray experiments. **Nature Reviews Genetics**. v. 3, n. 8, p. 579-88, 2002.

YIGZAW, Y.; POPPLETON, H.M.; SREEJAYAN, N.; HASSID, A.; PATEL, T.B. Protein-tyrosine phosphatase-1B (PTP1B) mediates the anti-migratory actions of Sprouty. **Journal of Biology Chemistry**. v. 278, n. 1, p. 284-288, 2003.

YOUNG, M.F. Bone matrix proteins: more than markers. **Calcification Tissue International**. v. 72, n. 1, p. 2-4, 2003.

YOSHIDA, C.A.; FURUICHI, T.; FUJITA, T.; FUKUYAMA, R.; KANATANI, N.; KOBAYASHI, S.; SATAKE, M.; TAKADA, K.; KOMORI, T. Core-binding factor beta interacts with Runx2 and is required for skeletal development. **Nature Genetics**. v. 32, n. 4, p. 633-638, 2002

ZAGO, M. A.; COVAS, D. T. Células-tronco: a nova fronteira da medicina. Ed.Atheneu. 245p., 2006

ZHANG, Q.; MADONNA, R.; SHEN, W.; PERIN, E.; ANGELI, F.S.; MURAD, F.; YEH, E.; BUJA, L.M.; DE CATERINA, R.; WILLERSON, J.T.; GENG, Y-J. Stem cells and cardiovascular tissue repair: mechanism, methods, and clinical applications. **Journal of Cardiothorac Renal Research**. v. 1, p. 3-14, 2006.

ZHANG, Q.; HU, C.M.; YUAN, Y.S.; HE, C.H.; ZHAO, Q.; LIU, N.Z. Expression of Mina53 and its significance in gastric carcinoma. **International Journal of Biology Markers**. v. 23, n. 2, p. 83-88, 2008.

ZHAO, L.; VOGT, P.K. Class I PI3K in oncogenic cellular transformation. **Oncogene**. v. 27, n. 41, p. 5486-96, 2008.

ZUK, P. A.; ZHU, M.; ASHJIAN, P.; DE UGARTE, D.; HUANG, J.; MIZUNO, H.; ALFONSO, Z. C.; FRASER, J. K.; BENHAIM, P.; HEDRICK, M. H. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells **Molecular Biology of Cell**. v. 13, p. 4279–4295, 2002.

Anexos

ANEXOS**ANEXO A.****ESCLARECIMENTOS AOS SUJEITOS DA PESQUISA**

O senhor (a) está sendo convidado (a) a participar de um estudo a ser realizado na Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, intitulado “Uso de cDNA Microarrays na Análise do Transcriptoma Durante a Diferenciação de Células-tronco Humanas em Osteoblastos”. O estudo tem como objetivo comparar a transformação de células-tronco de origens diferentes (de medula óssea e do cordão umbilical humanos) em osteoblastos através da análise dos genes destas células. Não será realizado nenhum outro procedimento além daquele que você será submetido no seu tratamento de rotina. Portanto, ao concordar em participar, você não correrá nenhum tipo de risco a mais. Você não terá que pagar nenhuma taxa por isso e receberá o acompanhamento e a assistência normalmente dados aos pacientes submetidos à procedimentos cirúrgicos rotineiros. Esta pesquisa não trará danos a você porque nós vamos utilizar apenas tecidos que são usualmente descartados de procedimentos cirúrgicos de transplante (medula óssea) ou após o parto (cordão umbilical). Esta pesquisa poderá trazer benefícios na compreensão da natureza e qualidade de células-tronco específicas de cada tecido, nos deixando mais próximos em utilizá-las como meio de substituir células danificadas por doenças ou traumas.

Além disso, você terá a garantia de receber a resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento de qualquer dúvida a respeito dos procedimentos, riscos, benefícios e outras situações relacionadas à pesquisa. A qualquer momento poderá desistir de participar do estudo sem que isso traga prejuízo à continuidade do seu tratamento. Você não será identificado e todos os dados serão confidenciais, ou seja, mantidos em segredo.

Você ainda poderá solicitar qualquer informação adicional aos pesquisadores responsáveis:

Prof. Dr. Geraldo A. S. Passos. Fone: (16) 602-3030

Profa. Dra. Karina Fittipaldi Bombonato Prado. Fone: (16) 602-4052

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu _____, abaixo assinado, tendo sido devidamente esclarecido sobre todas as condições que constam do documento “ESCLARECIMENTOS AO SUJEITO DA PESQUISA”, de que trata o Projeto de Pesquisa intitulado “Uso de cDNA Microarrays na Análise do Transcriptoma Durante a Diferenciação de Células Tronco Humanas em Osteoblastos”, que tem como pesquisador responsável o Prof. Dr. Geraldo A. S. Passos, especialmente no que diz respeito ao objetivo da pesquisa, aos procedimentos que serei submetido, aos riscos e aos benefícios, à forma de ressarcimento no caso de eventuais despesas, bem como a forma de indenização por danos decorrentes da pesquisa, declaro que tenho pleno conhecimento dos direitos e das condições que me foram assegurados, a seguir relacionados:

A garantia de receber a resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento de qualquer dúvida a respeito dos procedimentos, riscos, benefícios e outras situações relacionadas com a pesquisa e o tratamento a que serei submetido.

A liberdade de retirar o meu consentimento e deixar de participar do estudo, a qualquer momento, sem que isso traga prejuízo à continuidade do meu tratamento.

A segurança de que não serei identificado e que será mantido o caráter confidencial da informação relacionada a minha privacidade.

O compromisso de que me será prestada informação atualizada durante o estudo, ainda que esta possa afetar a minha vontade de continuar dele participando.

O compromisso de que serei devidamente acompanhado e assistido durante todo o período de minha participação no projeto, bem como de que será garantida a continuidade do meu tratamento, após a conclusão dos trabalhos da pesquisa.

O compromisso de que não serão realizados quaisquer outros procedimentos além daqueles necessários para o tratamento. Portanto, não haverá qualquer risco ou desconforto adicional.

O compromisso de que não haverá despesas extras e de que esta pesquisa não me trará nenhum tipo de dano.

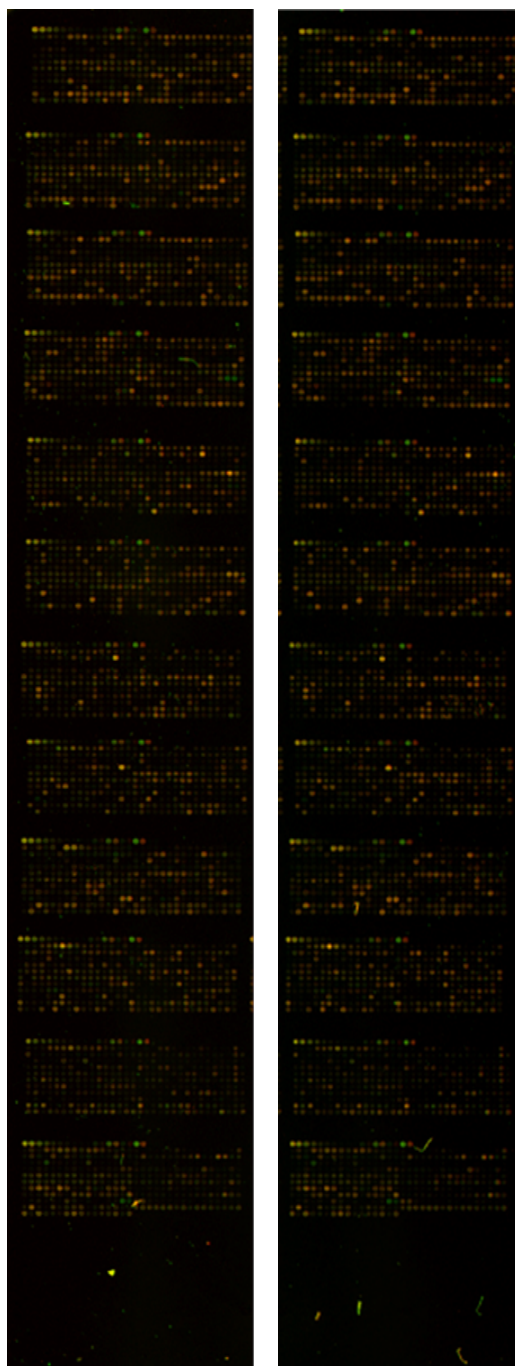
Declaro, ainda, que concordo inteiramente com as condições que me foram apresentadas e que, livremente, manifesto a minha vontade em participar do referido projeto.

Ribeirão Preto, _____ de _____ de 200_.

Assinatura do paciente

ANEXO B.

Imagem típica dos dois dados da lâmina de cDNA-microarray contendo 4500 seqüências



ANEXO C.

#Entity	Genes list	N°Genes list	Percentage list
MAPK signaling pathway	TP53 DUSP8 NF1 FGF12 TGFB1 MAP2K6 MAPK8IP1 GNG12 MAP3K10 GRB2 PAK2 MAP4K2 CASP4 MAPK10 MAPK8IF	24	1.80
Calcium signaling pathway	GRM5 HTR2A ATP2A3 ADCY1 RYR2 HTR6 PLCG1 PDE1B CAMK2B VDACC2 ATP2B2 CAMK2G PDGFRB SLC25A4 RYR1 PT	18	1.35
Cell cycle	TP53 CCNA2 ESPL1 TGFB1 CDKN2D ABL1 YWHAZ ANAPC7 SMC1A CDK6 CDC14A ANAPC2	12	0.90
Glioma	TP53 PIK3R3 GRB2 SHC1 PLCG1 FRAP1 CAMK2B MAP2K1 CAMK2G PDGFRB CDK6 HRAS	12	0.90
GnRH signaling pathway	ADCY1 MAP2K6 GRB2 MAPK10 CAMK2B MAP2K1 CAMK2G HRAS PLD2 ITPR2 PRKCD	11	0.82
Jak-STAT signaling pathway	PRLR PIK3R3 CSF2RA PTPN11 GRB2 STAM SPRY2 SPRED2 SPRY3 PIAS1 LEP	11	0.82
Chronic myeloid leukemia	TP53 PIK3R3 TGFB1 PTPN11 GRB2 SHC1 ABL1 MAP2K1 CDK6 HRAS	10	0.75
mTOR signaling pathway	PDPK1 PRKAA1 PIK3R3 TSC1 ULK2 FRAP1 RPS6KB1 RPS6KA3	8	0.60
Wnt signaling pathway	TP53 AXIN2 MAPK10 CAMK2B CAMK2G WIF1 WNT10A PPP2R1B	8	0.60
Colorectal cancer	TP53 PIK3R3 AXIN2 TGFB1 GRB2 MAPK10 MAP2K1 PDGFRB	8	0.60
TGF-beta signaling pathway	SMAD7 ACVRL1 TGFB1 ACVR2B ACVR2A RPS6KB1 ACVR1 BMPR2	8	0.60
Cell adhesion molecules (CAMs)	CDH5 NRCAM HLA-DRB1 CNTN1 PVRL3 CNTNAP2	6	0.45
Pancreatic cancer	TP53 PIK3R3 TGFB1 MAPK10 MAP2K1 CDK6	6	0.45
Apoptosis	TP53 PIK3R3 MYD88 BIRC2 FAS	5	0.37
Ubiquitin mediated proteolysis	HERC1 ANAPC7 WWP2 ANAPC2	4	0.30
Thyroid cancer	TP53 MAP2K1 RET HRAS	4	0.30
VEGF signaling pathway	PIK3R3 PLCG1 MAP2K1 HRAS	4	0.30
Notch signaling pathway	MAML2 DLL4 NUMB	3	0.22
Basal cell carcinoma	TP53 AXIN2	2	0.15
Hedgehog signaling pathway	WNT10A	1	0.07

ANEXO D.

#Entity	Genes list	NºGenes li: Percentage list
MAPK signaling pathway	TP53 DIUSP8 MRAS SOS1 PLA2G5 TGFB1 FGF12 TGFB2 MAP3K6 TGFB1 FGF9 GNG12 RASGRP1 MAP3K10 RPS6KA2 PAK2 CASP4 MAPK10 EGFR NF	42 2.47
Calcium signaling pathway	GRM5 ATP2A3 ADCY1 GRIN2A RYR2 HTR6 PLCG1 EGFR CHRM3 CALM1 PDE1B PDE1C VDACC2 ATP2B2 CAMK2G SLC25A4 RYR1 ITPKB CAMK2A CACNA1I	22 1.29
Wnt signaling pathway	TP53 DVL2 CTNBP1 CSNK1A1 SMAD2 AXIN2 CSNK2B MAPK10 VANGL2 CAMK2G WIF1 PPP2R2C ROCK1 WNT10A BTRC CAMK2A PPP2R1B	17 1
Colorectal cancer	TP53 SOS1 PIK3R3 DVL2 TGFB1 SMAD2 AXIN2 TGFB2 TGFB1 IGF1R MAPK10 EGFR ACVR1B MAP2K1 PIK3R1 BRAF	16 0.94
Cell cycle	TP53 CCNA2 SMAD2 ESPL1 TGFB2 TGFB1 PTPN11 SHC1 ABL1 NFKB1 ACVR1B MAP2K1 PIK3R1 BRAF	15 0.88
Chronic myeloid leukemia	TP53 SOS1 PIK3R3 TGFB1 TGFB2 TGFB1 PTPN11 SHC1 ABL1 NFKB1 ACVR1B MAP2K1 PIK3R1 BRAF	14 0.82
Glioma	TP53 SOS1 PIK3R3 IGF1R SHC1 PLCG1 EGFR FRAP1 CALM1 MAP2K1 PIK3R1 CAMK2G BRAF CAMK2A	14 0.82
TGF-beta signaling pathway	CHR1 SMAD7 TGFB1 SMAD2 INHBA TGFB2 TGFB1 LTBP1 BMPR1B ACVR1B ACVR2A RPS6KB1 ROCK1 BMPR2	14 0.82
Pancreatic cancer	TP53 PIK3R3 TGFB1 SMAD2 TGFB2 TGFB1 MAPK10 STAT3 EGFR NFKB1 ACVR1B MAP2K1 PIK3R1 BRAF	14 0.82
mTOR signaling pathway	PDPK1 PRKAA1 PIK3R3 TSC1 RPS6KA2 ULK2 FRAP1 PIK3R1 RPS6KB1 BRAF RPS6KA3	11 0.65
Apoptosis	TP53 PIK3R3 RIPK1 MYD88 BIRC2 NFKB1 PIK3R1 FAS CASP8 BID ATM	11 0.65
Cell adhesion molecules (CAMs)	CDH5 NRCAM CDH4 HLA-DRB1 PTPRF DARC ALCAM CNTNAP2 CNTN2 ITGB2	10 0.59
Ubiquitin mediated proteolysis	EDD1 WWP1 CDC34 NEDD4L UBE2E1 BTRC WWP2 ANAPC2	8 0.47
Notch signaling pathway	DVL2 MAML2 NOTCH1 DTX1 DLL4 NUMB MAML3	7 0.41
Thyroid cancer	TP53 RXRA MAP2K1 RET BRAF PAX8	6 0.35
Hedgehog signaling pathway	CSNK1A1 LRP2 WNT10A BTRC	4 0.24
Basal cell carcinoma	TP53 DVL2 AXIN2	3 0.18

ANEXO E.

Número na rede	Símbolo	Clone ID	Identificação do Gene (Gene name)
1	TP53	24415	Tumor protein p53
2	TP53	24415	Tumor protein p53
3	PIK3R3	23907	Phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 3 (gamma)
4	MYD88	190887	Myeloid differentiation primary response gene (88)
5	BIRC2	34852	Baculoviral IAP repeat-containing 2
6	PIK3R1	39808	Phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 1 (alpha)
7	FAS	222568	Fas (TNF receptor superfamily, member 6)
8	PRKAR1B	173325	Protein kinase, cAMP-dependent, regulatory, type I, beta
9	ATM	1877532	Ataxia telangiectasia mutated
10	CDH5	135239	Cadherin 5, type 2, VE-cadherin (vascular epithelium)
11	CLDN10	39874	Claudin 10
12	NRCAM	35271	Neuronal cell adhesion molecule (migration molecule)
13	HLA-DRB1	186767	Major histocompatibility complex, class II, DR beta 3
14	CNTN1	132304	Contactin 1
15	SDC3	40058	Syndecan 3
16	ALCAM	26617	Activated leukocyte cell adhesion molecule
17	PVRL3	141548	Poliovirus receptor-related 3
18	CNTNAP2	40338	Contactin associated protein-like 2
19	CNTN2	28510	Contactin 2 (axonal)
20	ESPL1	31489	Extra spindle pole bodies homolog 1 (<i>S. cerevisiae</i>)
21	CDKN2D	145503	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2D (p19, inhibits CDK4)
22	YWHAZ	39458	Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta polypeptide
23	SMC1A	31914	Structural maintenance of chromosomes 1A
24	CDK6	231497	Cyclin-dependent kinase 6
25	CDC14A	22306	CDC14 cell division cycle 14 homolog A (<i>S. cerevisiae</i>)
26	PRKDC	1613637	Protein kinase, DNA-activated, catalytic polypeptide
27	PRKDC	133637	Protein kinase, DNA-activated, catalytic polypeptide
28	ANAPC2	136462	Anaphase promoting complex subunit 2
29	ANAPC7	131110	Anaphase promoting complex subunit 7
30	CDC34	51328	Cell division cycle 34 homolog (<i>S. cerevisiae</i>)
31	MLH1	267569	MutL homolog 1, colon cancer, nonpolyposis type 2 (<i>E. coli</i>)
32	RET	160664	Ret proto-oncogene
33	SHC1	40303	SHC (Src homology 2 domain containing) transforming protein 1
34	SHC1	34282	SHC (Src homology 2 domain containing) transforming protein 1
35	ABL1	219976	C-abl oncogene 1, receptor tyrosine kinase
36	MAP2K6	45578	Mitogen-activated protein kinase kinase 6
37	GRB2	43571	Growth factor receptor-bound protein 2
38	MAPK10	23173	Mitogen-activated protein kinase 10
39	CAMK2B	25048	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase (CaM kinase) II beta
40	CAMK2B	50636	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase (CaM kinase) II beta
41	MAP2K1	33826	Mitogen-activated protein kinase kinase 1
42	CAMK2G	144025	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase (CaM

43	PLD2	150681	kinase) II gamma Phospholipase D2
44	CAMK2A	24907	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase (CaM kinase) II alpha
45	WNT10A	135346	Wingless-type MMTV integration site family, member 10A
46	BTRC	268524	Beta-transducin repeat containing
47	PRLR	141453	Prolactin receptor
48	CSF2RA	140352	Colony stimulating factor 2 receptor, alpha, low-affinity (granulocyte-macrophage)
49	PTPN11	23721	Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 11
50	PTPN11	23721	Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 11
51	STAM	33592	Signal transducing adaptor molecule (SH3 domain and ITAM motif) 1
52	SPRY2	40262	Sprouty homolog 2 (Drosophila)
53	SPRED2	24523	Sprouty-related, EVH1 domain containing 2
54	PIAS1	32565	Protein inhibitor of activated STAT, 1
55	LEP	181563	Leptin
56	DUSP8	250069	Dual specificity phosphatase 8
57	NF1	24723	Neurofibromin 1 (neurofibromatosis, von Recklinghausen disease, Watson disease)
58	FGF12	176904	Fibroblast growth factor 12
59	TGFB1	136821	Transforming growth factor, beta 1
60	MAPK8IP1	31918	Mitogen-activated protein kinase 8 interacting protein 1
61	GNG12	147355	Guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma 12
62	MAP3K10	147414	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 10
63	PAK2	265206	P21 (CDKN1A)-activated kinase 2
64	PAK2	134439	P21 (CDKN1A)-activated kinase 2
65	MAP4K2	37234	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase kinase 2
66	CASP4	183194	Caspase 4, apoptosis-related cysteine peptidase
67	MAPK8IP2	23959	Mitogen-activated protein kinase 8 interacting protein 2
68	CACNB3	25922	Calcium channel, voltage-dependent, beta 3 subunit
69	PDGFRB	40643	Platelet-derived growth factor receptor, beta polypeptide
70	HRAS	24907	V-Ha-ras Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog
71	NTRK2	40402	Neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 2
72	RASA1	137094	RAS p21 protein activator (GTPase activating protein) 1
73	RPS6KA5	258966	Ribosomal protein S6 kinase, 90kDa, polypeptide 5
74	RPS6KA3	156808	Ribosomal protein S6 kinase, 90kDa, polypeptide 3
75	PLA2G5	135692	Phospholipase A2, group V
76	MAPT	50764	Microtubule-associated protein tau
77	MAP3K6	165816	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 6
78	FGF9	52489	Fibroblast growth factor 9 (glia-activating factor)
79	RASGRP1	25016	RAS guanyl releasing protein 1 (calcium and DAG-regulated)
80	RPS6KA2	22711	Ribosomal protein S6 kinase, 90kDa, polypeptide 2
81	BRAF	268121	V-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1
82	FGF13	52217	Fibroblast growth factor 13
83	ARRB1	51672	Arrestin, beta 1
84	HSPA1L	50615	Heat shock 70kDa protein 1-like
85	RASGRF2	41311	Ras protein-specific guanine nucleotide-releasing factor 2
86	PTPN5	52979	Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 5 (striatum-enriched)

87	CACNA1H	24597	Calcium channel, voltage-dependent, T type, alpha 1H subunit
88	CACNA1E	35729	Calcium channel, voltage-dependent, R type, alpha 1E subunit
89	PDPK1	266720	3-phosphoinositide dependent protein kinase-1
90	PRKAA1	260234	Protein kinase, AMP-activated, alpha 1 catalytic subunit
91	PRKAA1	136180	Protein kinase, AMP-activated, alpha 1 catalytic subunit
92	TSC1	23736	Tuberous sclerosis 1 (mTOR regulator)
93	RPS6KB1	133432	Ribosomal protein S6 kinase, 70kDa, polypeptide 1
94	MAML2	144242	Mastermind-like 2 (Drosophila)
95	DTX1	52120	Deltex homolog 1 (Drosophila)
96	DLL4	135185	Delta-like 4 (Drosophila)
97	NUMB	39975	Numb homolog (Drosophila) (NOTCH1 association)
98	GRM5	23560	Glutamate receptor, metabotropic 5
99	HTR2A	40580	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 2A
100	ADCY1	27431	Adenylate cyclase 1 (brain)
101	RYR2	53099	Ryanodine receptor 2 (cardiac)
102	HTR6	31955	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 6
103	PDE1B	179617	Phosphodiesterase 1B, calmodulin-dependent
104	VDAC2	138552	Voltage-dependent anion channel 2
105	ATP2B2	40674	ATPase, Ca⁺⁺ transporting, plasma membrane 2
106	ATP2B2	40733	ATPase, Ca⁺⁺ transporting, plasma membrane 2
107	SLC25A4	40026	Solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; adenine nucleotide translocator), member 4
108	RYR1	25322	Ryanodine receptor 1 (skeletal)
109	ATP2A3	179935	ATPase, Ca ⁺⁺ transporting, ubiquitous
110	PLCG1	143748	Phospholipase C, gamma 1
111	ADCY7	133798	Adenylate cyclase 7
112	ITPKB	142096	Inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase B
113	PCK2	154642	Phosphoenolpyruvate carboxykinase 2 (mitochondrial)
114	ILK	147933	Integrin-linked kinase-2
115	SLC27A4	36117	Solute carrier family 27 (fatty acid transporter), member 4
116	ACOX3	22009	Acyl-Coenzyme A oxidase 3, pristanoyl
117	CPT1A	133565	Carnitine palmitoyltransferase 1A (liver)
118	ACSL4	133988	Acyl-CoA synthetase long-chain family member 4
119	ACADL	140131	Acyl-Coenzyme A dehydrogenase, long chain
120	SMAD7	148968	SMAD family member 7
121	ACVRL1	182661	Activin A receptor type II-like 1
122	ACVR2A	133013	Activin A receptor, type IIA
123	ACVR1	32711	Activin A receptor, type I
124	BMPR2	264556	Bone morphogenetic protein receptor, type II (serine/threonine kinase)
125	SMAD2	135888	SMAD family member 2
126	CHRD	23928	Chordin
127	AXIN2	135887	Axin 2 (conductin, axil)
128	WIF1	40908	WNT inhibitory factor 1
129	PPP2R1B	263846	Protein phosphatase 2 (formerly 2A), regulatory subunit A, beta isoform
130	CTNNBIP1	144878	Catenin, beta interacting protein 1
131	CSNK1A1	131996	Casein kinase 1, alpha 1
132	CXXC4	35804	CXXC finger 4
133	VANGL2	38363	Vang-like 2 (van gogh, Drosophila)

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](#)