

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

JANAINA DE ANDRÉA DERNOWSEK

*Colinearidade de transcriptomas durante a diferenciação
osteoblástica de células tronco mesenquimais adultas
humanas e murinas*

Ribeirão Preto

2010

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

JANAINA DE ANDRÉA DERNOWSEK

Colinearidade de transcriptomas durante a diferenciação osteoblástica de células tronco mesenquimais adultas humanas e murinas

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

2010

Dernowsek, Janaina de Andréa

Colinearidade de transcriptomas durante a diferenciação osteoblástica de células tronco mesenquimais adultas humanas e murinas

Ribeirão Preto, 2010

151p. 30cm

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

Orientador: Passos, Geraldo Aleixo da Silva

1. Células tronco mesenquimais 2. Expressão gênica 3. Sintenia

FOLHA DE APROVAÇÃO

Janaina de Andréa Dernowsek

Colinearidade de transcriptomas durante a diferenciação osteoblástica de células tronco mesenquimais adultas humanas e murinas

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

Aprovado em: __/__/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho principalmente a meus pais,
Pela dedicação infinita...
Pelos confortos e vontades deixados de lado.*

*Tenham a certeza de apesar dos esforços para que eu tivesse uma boa educação,
A melhor educação que tive foi ter vocês como meus educadores.*

*Dedico também aos meus irmãos,
pelas horas de descontração, alegrias e incentivos...
ao meu namorado Aristides, pelo apoio incondicional,
amor e carinho, de todos estes anos...*

*Obrigada por me fazerem sentir capaz...
Serei eternamente grata por vocês terem feito a minha vida mais doce...*

*Mais fácil...
Mais divertida...
Mais interessante...
Mais humana...*

AGRADECIMENTOS

É durante a realização de um trabalho que sentimos a necessidade de termos amigos que nos auxiliem, nos guiem e nos orientem. Aqui, expresso minha gratidão:

Ao meu orientador Prof. Dr. Geraldo A. S. Passos por tudo o que me ensinou, me corrigiu, me orientou e pela convivência no dia a dia.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Imunogenética Molecular pelo companheirismo, alegria e ensinamentos, Cláudia, Thaís, Paulinha, Vanessa, Adriane, Cristina, Márcia, Danielle, Luciana, Natália, Shirlei e Deise.

Em especial a toda a “equipe das células tronco” coordenada pelo Prof. Geraldo Passos: Vanessa, Adriane, Rayana, Glauce e os Professores Dra. Karina F. Bombonato-Prado, Dr. Paulo Tambasco de Oliveira e Dr. Adalberto L. Rosa.

À Profa. Dra. Belinda Simões do Serviço de Transplante de Medula Óssea do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP por ceder os filtrados de medulas ósseas.

À Profa. Dra. Elza T. Sakamoto-Hojo e sua equipe pela disponibilização de seu laboratório para a realização de alguns experimentos.

Aos docentes, pós-graduandos e funcionários do Programa de Pós-Graduação de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto especialmente ao seu coordenador o Prof. Dr. Ademilson Espencer Egea Soares por toda a dedicação visando manter a excelência da nossa Pós-graduação.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro.

Enfim, a todos aqueles que me auxiliaram de alguma forma na elaboração desse trabalho.
Muito obrigada.

“Aprender é a única coisa de que a mente nunca se cansa, nunca tem medo e nunca se arrepende”.

Leonardo da Vinci

Resumo e Abstract

RESUMO

DERNOWSEK, J. A. Colinearidade de transcriptomas durante a diferenciação osteoblástica de células tronco mesenquimais adultas humanas e murinas, 2010. 151p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

As *células-tronco*, em termos funcionais, são definidas como células dotadas de capacidade de auto-renovação que estão no topo da hierarquia de uma linhagem e principalmente são capazes de gerar células diferenciadas de um dado tecido. Dentre as células-tronco adultas, as *mesenquimais* ocupam posição de destaque. São células multipotentes que podem originar células de origem mesodérmica, como osteoblastos, adipócitos e condrócitos. Além disso, essas células também podem se diferenciar em células de origem extra-mesenquimal, como neurônios e hepatócitos, fenômeno este denominado de *plasticidade*. O uso das células-tronco representa, no momento, grande esperança na medicina regenerativa devido a perspectiva de se reparar a perda de tecidos e/ou até mesmos órgãos nobres do corpo. Entretanto, o entendimento das bases genético-moleculares da diferenciação dessas células é ainda objeto de estudos. Precisamos de modelos experimentais adequados para estudarmos a expressão de genes que controlam a diferenciação celular. A medula óssea humana é fonte rica de células tronco mesenquimais e se prestam para esses estudos, mas por motivos óbvios, são de difícil obtenção. Como o camundongo *Mus musculus* representa um organismo modelo para estudos de genética molecular cujos resultados podem ser inferidos à espécie humana, decidimos realizar um estudo comparativo entre células tronco humanas e de camundongos na tentativa de melhor definirmos e adequar o sistema-modelo murino aos estudos moleculares de diferenciação celular. A evolução da expressão de genes conectada às suas mudanças evolutivas e de fenótipos é de fundamental importância para estimar a *taxa de evolução da expressão gênica*. Concebemos que comparando a expressão gênica de células tronco humanas e murinas poderemos melhor elucidar os mecanismos moleculares ainda obscuros responsáveis pela evolução do *transcriptoma*. No caso do presente trabalho da evolução do transcriptoma da diferenciação *osteoblástica* (diferenciação óssea) de células tronco mesenquimais. A *sintenia* compartilhada é um dos critérios mais confiáveis para o estabelecimento da *ortologia* de regiões genômicas entre espécies diferentes. Além disso, a conservação excepcional de sintenia pode refletir importantes relações funcionais entre os genes. Durante a concepção do presente trabalho, formulamos a *hipótese* que devido à colinearidade dos genomas humano e murino (*M. musculus*), é possível encontrar áreas cromossômicas conservadas que exibem um perfil transcricional próximo durante a

diferenciação celular. Para isso, montamos o sistema-modelo experimental no qual células-tronco mesenquimais de medula óssea humana e murina foram cultivadas *in vitro* e induzidas quimicamente à diferenciação em osteoblastos (meio α -MEM acrescido de dexametasona, ácido ascórbico e β -glicerosfosfato). Análises morfológicas, bioquímicas e de expressão transcricional foram realizadas em tempos pré determinados. O RNA total foi extraído das culturas de células tronco indiferenciadas (0 hora) e durante o processo de diferenciação (24 horas a 21 dias em cultura). Todo o processo de diferenciação foi monitorado com ensaios bioquímicos e por imunocitoquímica para a detecção de marcadores funcionais de diferenciação osteoblástica, como por exemplo a fosfatase alcalina. Para avaliar a expressão gênica transcricional das células tronco e durante o processo de diferenciação utilizamos a tecnologia dos *microarrays* e PCR em tempo real. Os dados de *microarrays* foram analisados com o auxílio de programas de bioinformática especializados como SAM (*significance analysis of microarrays*), Cluster-TreeView e GeneNetwork. Observamos a existência de vários genes com perfil de expressão semelhante entre células humanas e murinas. Para termos acesso às possíveis interações entre os genes expressos e envolvidos com o processo de diferenciação re-analisamos os dados utilizando o programa GeneNetwork, o que permitiu a reconstrução de redes transcricionais a partir dos dados atuais de *microarrays*. As então chamadas “redes gênicas” permitiram identificar nós gênicos particulares e comuns entre as espécies estudadas. Dentre os nós gênicos comuns estão o hHDHD1A (humano) (cromossomo X), Hdhd1a (murino) (cromossomo 18) e o hSCUBE3 (humano) (cromossomo 6), cScube3 (murino) (cromossomo 17). O gene SCUBE3 que codifica uma proteína que possui o domínio CUB-EGF - peptídeo sinal altamente conservada e que exibe alta expressão em osteoblastos primários e ossos longos. Além disso, observamos os nós gênicos COL1A2 (cromossomo 7) (Col1a2) (cromossomo 6), FN1 (cromossomo 2) (Fn1) (cromossomo 1), MYH9 (cromossomo 22) (Myh9) (cromossomo 15), PDXP (cromossomo 22) (Pdxp) (cromossomo 15) e TXNL2 (cromossomo 10) (Txnl2) (cromossomo 7), os quais estão relacionados à osteogênese. Nossas análises comparativas de dados do transcriptoma entre células tronco mesenquimais humanas e murinas, colhidas de medula óssea, permitiram evidenciar que eventos genético-moleculares essenciais à diferenciação osteoblástica são semelhantes entre as duas espécies. Portanto, para estudos básicos da biologia molecular da diferenciação óssea o sistema-modelo murino é adequado. Além disso, nossos resultados são importantes para evidenciar a colinearidade de transcriptomas, pelo menos nesse particular, de células tronco mesenquimais humanas e murinas.

Palavras chave: células-tronco mesenquimais, diferenciação osteogênica, expressão gênica, sintenia, redes gênicas transcricionais, transcriptoma.

ABSTRACT

DERNOWSEK, J. A. Collinearity of transcriptomes during osteoblast differentiation of human and murine adult mesenchymal stem cells, 2010. 151p. Master's Dissertation - Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

Stem cells, in functional terms are defined as cells that feature the capacity for self-renewal and in the of top hierarchy of a particular lineage. Moreover, these cells are able to generate differentiated cells of a given tissue. Among the adult stem cells, mesenchymal stem cells occupy a prominent position. They are multipotent cells that can lead cells of mesodermal origin such as osteoblasts, adipocytes and chondrocytes. Moreover, these cells also can differentiate into non-mesenchymal cells, as neurons and hepatocytes, a phenomenon called plasticity. The use of stem cells represent an expectation in regenerative medicine regarding the prospect for repairing the loss of tissue and / or even some important organs of the body. However, our understanding on the genetic and molecular basis of stem cell differentiation is still poor. We need experimental models to study the expression of genes that control cell differentiation. The human bone marrow is a rich source of mesenchymal stem cells (MSCs) and is suitable for such studies, but for obvious reasons, this tissue is difficult to obtain for experimental purposes. As the mouse *Mus musculus* is a model organism for molecular genetic studies, we decided to undertake a comparative study of human and murine stem cells in an attempt to better define the animal model system. Connecting the phenotype evolutionary changes to gene expression is of importance to estimate the rate evolution of the transcription patterns. Thus, comparing gene expression of human and murine stem cells we could better understanding the transcriptome. The shared synteny between these two species is an important criterion to establish orthologous genomic regions. Moreover, the exceptional conservation of synteny may reflect important functional relationships between their genes. We hypothesized that due to collinearity between human and murine genomes, is possible to find chromosomal regions that feature close transcriptional profile during cell differentiation. To test this, we set up an experimental model system in which human and murine MSCs were cultured differentiate in vitro to. Differentiation was confirmed by Morphological, specific immunocytochemistry for the detection of functional markers of osteoblast differentiation such as alkaline phosphatase and biochemical assays. Gene expression was determined by quantitative real-time PCR and microarrays. Total RNA was extracted from undifferentiated stem cells cultures and from

differentiation cultures whose medium composition included β -glycerolphosphate, dexamethasone and ascorbic acid (24 hours to 21 days in culture). The microarray data were analyzed by specialized bioinformatics programs such as SAM (significance analysis of microarrays), Cluster, TreeView and GeneNetwork. We observed the existence of several syntenic chromosomal regions harboring genes with similar expression profile between human and murine cells. To assess the possible interactions between genes involved with differentiation we re-analyzed the data using the GeneNetwork program, which allowed the reconstruction of transcriptional networks from actual microarray data. The so-called "transcriptional gene networks" enabled us to identify those specific and common genes. Among the common genes the hHDHD1A (human) (X chromosome), Hdh1a (murine) (chromosome 18) and hSCUBE3 (human) (chromosome 6), cScube3 (murine) (chromosome 17). The gene SCUBE3 encodes the CUB domain-EGF - highly conserved signal protein and feature high expression in primary osteoblasts and bones. Furthermore, we observed the COL1A2 gene (chromosome 7) (COL1A2) (chromosome 6), FN1 (chromosome 2) (FN1) (chromosome 1), MYH9 (chromosome 22) (MYH9) (chromosome 15), PDXP (chromosome 22) (Pdxp) (chromosome 15) and TXNL2 (chromosome 10) (Txnl2) (chromosome 7), which are related to osteogenesis. Our comparative transcriptome analysis has highlighted genetic and molecular events during osteoblast differentiation, showing similarities between the two species. Thus, for basic studies involving the molecular biology of bone differentiation the murine-system is similar to human cells. Moreover, our results are important to highlight the collinearity between human and murine transcriptomes.

Keywords: mesenchymal stem cells, osteogenic differentiation, gene expression, synteny, gene transcriptional networks, transcriptome.

Listas de Tabelas e Ilustrações

LISTA DE TABELAS

Tabela I. Seqüências <i>sense</i> e <i>antisense</i> dos oligonucleotídeos <i>primers</i> de genes humanos utilizados nas reações de PCR, suas respectivas temperaturas de anelamento	58
Tabela II. Seqüências <i>sense</i> e <i>antisense</i> dos oligonucleotídeos <i>primers</i> de genes murinos utilizados nas reações de PCR, suas respectivas temperaturas de anelamento	58
Tabela III – Primers Utilizados nas reações de qRT- PCR.....	79

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Diferenciação das células tronco multipotentes em células especializadas da linhagem mesodérmica (Adaptado de Captlan e Bruder, 2001).....	24
Figura 2. Multipotencialidade das células-tronco mesenquimais de medula óssea (Retirado de <u>Grassel</u> , 2007).....	25
Figura 3. Diagrama esquemático dos três estágios de diferenciação dos osteoblastos em linhagens MC3T3-E1. Adaptado de Beck, 2003.....	28
Figura 4. Representação gráfica dos blocos sintênicos entre homem e camundongo. Fonte: Church et al., 2009.....	33
Figura 5. Ilustração dos principais tipos de delineamento experimental de <i>microarrays</i> . A) Método fluorescente usando Cy3 e Cy5 e lâminas de vidro e B) Método radioativo usando ³³ P e membranas de náilon. (Modificada de Sakamoto-Hojo <i>et al.</i> 2003).....	35
Figura 6. Esquema dos principais tipos de delineamento experimental para <i>microarrays</i> . A, B e C - amostras controle; A',B' e C' - amostras teste; R – pool de RNA de referência.....	63
Figura 7. Preparação do cDNA marcado com <i>CyDye</i> utilizando os reagentes do kit “ <i>CyScribe Post Labelling</i> ” (<i>GE Healthcare</i>).....	66
Figura 8. “ <i>Pipeline</i> ” utilizado na análise de dados de <i>microarrays</i> em lâminas de vidro.....	73
Figura 9. Proliferação de células tronco mesenquimais e células cultivadas em meio indutor da osteogênese (A = humanas e B = murinas) após 7, 14 e 21 dias. Os resultados estão representados com média ± desvio padrão (n=5).....	82
Figura 10. Viabilidade celular após 7, 14 e 21 dias em meio de diferenciação com e sem a adição de meio osteogênico. A= Células humanas e B = murinas. Os resultados estão representados como média ± desvio padrão (n=5).....	83
Figura 11. Determinação de proteínas totais após 7, 14 e 21 dias de cultura de células-tronco mesenquimais humanas (A) e murinas (B) em meio de indução osteogênica ou controle. O conteúdo de proteínas totais é expresso em µg de proteína/10 ⁴ células. Os resultados estão representados como média ± desvio padrão (n=5).....	84
Figura 12. Atividade de fosfatase alcalina após 7, 14 e 21 dias de cultura de células-tronco mesenquimais humanas (A) e murinas (B) em meio de indução osteogênica ou controle. A atividade de fosfatase alcalina é expressa em µmol. timolftaleína/h/10 ⁴ células. Os resultados estão representados como média ± desvio padrão (n=5).....	85
Figura 13. CTMs humanas e murinas cultivadas em meio de cultura sem indução osteogênica (A e C) respectivamente e CTMs humanas e murinas apresentando depósito de matriz óssea durante 21 dias em cultura sob condição osteogênica (B e D). Coloração por vermelho de Alizarina.....	86

- Figura 14.** CTMs humanas e murinas cultivadas em meio de cultura sem indução osteogênica (**A e B**) respectivamente e CTMs humanas e murinas após 7 dias em cultura sob condição osteogênica (**C e D**). A marcação em vermelho revela a proteína osteopontina (OPN). Em verde (faloidina) evidencia-se o citoesqueleto e, em azul (DAPI) o núcleo celular. Microscópio de fluorescência; aumento de 40x 87
- Figura 15.** Eletroforese em gel de agarose de amostras de RNA total provenientes de células-tronco mesenquimais humanas nas diferentes situações: 1) CTMs (controle); 2)CTMs em meio indutor por 24 horas; 3) CTMs em meio indutor por 48 horas; 4) CTMs em meio indutor por 7 dias; 5) CTMs em meio indutor por 21 dias 88
- Figura 16.** Eletroforese em gel de agarose de amostras de RNA total provenientes de células-tronco mesenquimais murinas nas diferentes situações: 1) CTMs (controle); 2)CTMs em meio indutor por 24 horas; 3)CTMs em meio indutor por 48 horas; 4) CTMs em meio indutor por 7 dias; 5) CTMs em meio indutor por 21 dias 88
- Figura 17.** Eletroforese de produtos de RT-PCR semiquantitativa dos genes humanos ALPL, COL1A1, SPP1, RUNX2, BGLAP e GAPDH, realizada com as amostras controle (CTMs indiferenciadas e CTMs diferenciadas em meio α -MEM osteogênico por 7 e 21 dias..... 90
- Figura 18.** Eletroforese de produtos de RT-PCR semiquantitativa dos genes murinos Akp2, Colla1, Spp1, Runx2, Bglap2 e β -actina, realizada com as amostras controle (CTMs indiferenciadas e CTMs diferenciadas em meio α -MEM osteogênico por 7 e 21 dias..... 91
- Figura 19.** Eficiência das amplificações por PCR dos clones de cDNA IMAGE utilizados no preparo dos microarrays (Resultados típicos ilustrando as bibliotecas humana e murina). 93
- Figura 20.** Eletroforese em gel de agarose 1% dos produtos de PCR de alguns clones da biblioteca de cDNA IMAGE 93
- Figura 21.** Imagem de hibridização de microarray com sondas fluorescentes (Cy3 e Cy5) (Resultado típico) 94
- Figura 22.** Agrupamento hierárquico supervisionado dos perfis de expressão dos 75 genes sintênicos humanos (A) e murinos (B) de acordo com a diferenciação das células tronco mesenquimais em osteoblastos. Os agrupamentos foram conseguidos após tratamento dos dados pelos programas SAM e Cluster e Tree View 96
- Figura 23.** Rede de interações transcricionais envolvendo genes sintênicos (*H. sapiens* – *M. musculus*) durante a diferenciação de células tronco mesenquimais humanas em osteoblastos nos tempos de diferenciação 0, 24, 48 horas e 7 e 21 dias..... 98
- Figura 24.** Rede de interações transcricionais envolvendo genes sintênicos (*H. sapiens* – *M. musculus*) durante a diferenciação de células tronco mesenquimais murinas em osteoblastos nos tempos de diferenciação 0, 24, 48 horas e 7 e 21 dias..... 99
- Figura 25.** Sub-rede transcricional envolvendo genes sintênicos (*H. sapiens*-*M. musculus*) durante a diferenciação de células tronco mesenquimais humanas em osteoblastos nos tempos de diferenciação 0, 24, 48 horas e 7 e 21 dias..... 100

- Figura 26.** Sub-rede transcricional envolvendo genes sintênicos (*H. sapiens-M. musculus*) durante a diferenciação de células tronco mesenquimais murinas em osteoblastos nos tempos de diferenciação 0, 24, 48 horas e 7 e 21 dias..... 101
- Figura 27.** Gráficos dos valores de expressão relativa (QR) dos genes FN1 humanos e Fn1 murino (A e B), PPP1R11 e Ppp1r11 (C e D), UQCRC2 e Uqrc2 (E e F) durante a diferenciação osteogênica no período de 0, 24, 48 horas, 7 e 21 dias. (Análise estatística ANOVA; *** p<0.001; ** p<0.01, * p<0.05) 103
- Figura 28.** Blocos sintênicos entre o cromossomos 7 humano e 15 do camundongo e o perfil transcricional dos genes COL1A2 (7q21.3) e Col1a2 (6A1) respectivamente..... 109
- Figura 29.** Blocos sintênicos entre o cromossomo 22 humano e 15 do camundongo e o perfil de expressão dos genes MYH9 (22q13.1), PDXP (22-q12.3), Myh9 (15 E1) e Pdxp (15 E1) 110
- Figura 30.** Blocos sintênicos entre o cromossomo 6 humano e 17 do camundongo e o perfil de expressão dos genes PPP1R11 (6p21.3), Ppp1r11 (17 B1), SCUBE3 (6p21.3) e Scube3 (17 A3.3)..... 111
- Figura 31.** Bloco sintênico entre o cromossomo 10 humano e 7 do camundongo e o perfil de expressão dos genes TXNL2 (10q26) e Tnxnl2 (7 F5-C) 112
- Figura 32.** Bloco sintênico entre o cromossomo 17 humano e 11 do camundongo e o perfil de expressão dos genes P4HB (17q25) e P4hb (11 D-E) 113
- Figura 33.** Bloco sintênico entre o cromossomo 2 humano e 1 do camundongo e o perfil de expressão dos genes FN1 (2q34) e Fn1 (1 C1-C5)..... 114
- Figura 34.** Genes ortólogos HDHD1A humano (Xp21.32) e Hdhd1a(18 C) murino e seus respectivos perfis de expressão gênica semelhantes..... 115

Sumário

Sumário

1. INTRODUÇÃO	22
1.1 Células tronco: definição e classificação.....	22
1.2 Células tronco mesenquimais (CTMs).....	23
1.3 Diferenciação das células tronco mesenquimais em osteoblastos.....	26
1.4 Sistemas-modelo para estudo da osteopoiese.....	29
1.5 Colinearidade dos genomas humano e murino (conceito de sintenia).....	31
1.6 O uso dos microarrays no estudo da expressão gênica transcricional.....	33
1.7 Considerações sobre as redes de interação no estudo de dados de expressão gênica temporal em sistemas complexos	36
 2. HIPÓTESE DO TRABALHO.....	 40
 3. OBJETIVOS	 42
3.1 Objetivo Geral	42
3.2 Objetivos específicos.....	42
 4. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL & PIPELINE DA ANÁLISE	 44
4.1 Delineamento experimental.....	44
4.2 Pipeline da análise <i>in silico</i>	45
 5. MATERIAL E MÉTODOS	 48
5.1 Obtenção e cultura das células-tronco mesenquimais e indução da osteogênese.....	48
5.1.1 Medula óssea humana.....	48
5.1.2 Medula óssea de camundongos C57BL/6	49
5.1.3 Ensaio de osteogênese.....	51
5.1.4 Determinação da proliferação e viabilidade celulares.....	51
5.1.5 Determinação de proteína total.....	52
5.1.6 Determinação da atividade de fosfatase alcalina (ALP).....	52
5.2 Avaliação imunocitoquímica de osteopontina.....	53
5.3 Avaliação da formação de matriz mineralizada	53
5.4 Expressão numérica dos dados de osteogênese.....	54
5.5 Extração de RNA total das culturas de células.....	54
5.5.1 Preparação das amostras de RNA.....	56

5.5.2	Quantificação de RNA total	57
5.5.3	Avaliação da expressão de genes relacionados à osteogênese por RT-PCR semi-quantitativa	57
5.6	Preparação de cDNA microarrays em lâminas de vidro.....	59
5.6.1	Bibliotecas de cDNAs humanos e murinos	59
5.6.2	Amplificação dos insertos de cDNA para a confecção dos microarrays.....	60
5.6.3	Purificação dos produtos de PCR	61
5.6.4	Confecção das lâminas de microarrays	62
5.7	Delineamento das hibridações em microarrays	62
5.8	Marcação das sondas complexas de cDNA com fluorocromos Cy3 e Cy5	65
5.8.1	Preparação da primeira fita de cDNA por incorporação de AAdUTP	68
5.8.2	Purificação do cDNA com colunas de purificação CyScribe GFX.....	68
5.8.3	Incorporação de Cy3 e Cy5	69
5.8.4	Purificação do cDNA marcado com CyDye com colunas de purificação CyScribe GFX	69
5.8.5	Quantificação do CyDye incorporado no cDNA.....	70
5.9	Hibridação das lâminas de microarrays.....	70
5.10	Aquisição de imagens de microarrays	71
5.11	Quantificação e normalização dos dados de microarrays.....	71
5.12	Análise bioinformática dos dados de microarrays.....	74
5.12.1	Agrupamento hierárquico	74
5.12.2	Nomenclatura dos genes	76
5.12.3	Gene Network.....	76
5.12.4	Cytoscape	77
5.13	Confirmação dos dados de microarrays por PCR em tempo real.....	78
5.13.1	Análise estatística dos dados de qRT-PCR.....	80
6.	RESULTADOS	82
6.1	Caracterização do potencial osteogênico das células tronco mesenquimais	82
6.1.1	Proliferação celular.....	82
6.1.2	Viabilidade das Células	83
6.1.3	Conteúdo de proteínas totais	84
6.1.4	Atividade de fosfatase alcalina	85
6.1.5	Formação de matriz mineralizada.....	86
6.1.6	Avaliação imunocitoquímica do citoesqueleto e da presença de osteopontina (OPN)	86

6.2	Análise da expressão gênica transcricional	87
6.2.1	Avaliação da integridade das preparações de RNA total	87
6.3	Avaliação da expressão de genes marcadores da osteogênese por RT- PCR semi-quantitativa	89
6.4	Amplificação dos insertos de cDNA das bibliotecas IMAGE para a confecção dos microarrays	92
6.5	Aquisição de imagens dos microarrays por <i>scanning</i>	93
6.6	Perfil de expressão de genes sintênicos humanos e murinos.....	95
6.7	Redes de interações transcricionais (redes gênicas) durante a diferenciação das células tronco mesenquimais em osteoblastos.....	97
6.7.1	Sub-redes de interações transcricionais.....	99
6.8	Confirmação dos dados de microarrays por PCR em tempo real.....	101
7.	DISCUSSÃO	105
7.1	Ensaio de osteogênese.....	105
7.1.1	Proliferação e viabilidade celular	105
7.1.2	Determinação de proteínas totais.....	105
7.1.3	Determinação da atividade enzimática da fosfatase alcalina.....	105
7.1.4	Ensaio imunocitoquímico da osteopontina.....	106
7.1.5	Formação de matriz mineralizada.....	106
7.2	Avaliação da expressão de genes relacionados à osteogênese e adipogênese por RT-PCR semiquantitativa	107
7.3	Perfil de expressão gênica, redes de interações gênicas e associações sintênicas.....	108
8.	CONCLUSÕES.....	123
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	125
	ANEXOS	136

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1 Células tronco: definição e classificação

As células tronco, em termos funcionais, são definidas como células dotadas de capacidade de auto-renovação que estão no topo da hierarquia de uma linhagem e podem gerar células diferenciadas de um dado tecido (KOOY et al., 2000).

Com base em sua origem e propriedades biológicas, as células tronco podem ser classificadas em embrionárias ou adultas. As células tronco embrionárias são derivadas da camada interna do embrião no estágio de blastocisto e possuem capacidade de dar origem a mais de 200 tipos celulares diferenciados (ZHANG et al., 2006).

As células tronco adultas estão presentes em órgãos ou tecidos diferenciados (BARRY; MURPHY, 2004) e são responsáveis pela manutenção da integridade dos tecidos, pelo reparo diante de lesões e pela remodelação dos tecidos (ZAGO; COVAS, 2006).

De acordo com o potencial de diferenciação, as células tronco podem ser divididas em quatro categorias: totipotentes, pluripotentes, multipotentes e oligopotentes (ZHANG et al., 2006).

As células tronco totipotentes têm o potencial de diferenciação em células dos três folhetos embrionários (ectodérmicos, mesodérmicos e endodérmicos) bem como nos anexos embrionários. Uma célula deste tipo é capaz de originar um ser humano completo quando implantada em um útero normal. Cabe lembrar que em mamíferos apenas os zigotos são totipotentes (ZHANG et al., 2006)

Na fase de blastocisto, as camadas mais internas podem originar qualquer tipo celular, mas a placenta se originará apenas da camada mais externa. As células da camada interna são chamadas pluripotentes, estas continuam a se dividir e são progenitores de tecidos das três camadas germinativas (ZHANG et al., 2006).

As células multipotentes podem se diferenciar em alguns tipos celulares dentro de um determinado órgão. Células tronco oligopotentes podem originar poucos tipos celulares especializados (ZHANG et al., 2006).

Dentre os diversos tipos de células multipotentes, as células tronco mesenquimais (CTMs) compõem um grupo que vem despertando grande interesse nas comunidades científica e médica.

1.2 Células tronco mesenquimais (CTMs)

A medula óssea é um órgão composto por duas linhagens celulares distintas e dependentes, a hematopoiética e o estroma associado, que formam um sistema cooperativo. O estroma medular está relacionado à manutenção de um microambiente no qual as células tronco hematopoiéticas se mantêm e a progênie diferenciada recebe os sinais necessários para a maturação celular. (SCHWINDT, 2005)

A existência de células tronco não-hematopoiéticas na medula óssea foi inicialmente sugerida por Cohnheim (1967). No entanto, foi com os achados de Friedenstein e cols. (1971), que essa teoria veio a ser comprovada com a descoberta das células tronco mesenquimais. Os autores encontraram, em uma cultura de células da medula óssea, uma população de células aderidas ao plástico em forma de fuso, semelhantes a fibroblastos. Observaram também que essas células possuíam capacidade para se diferenciar em colônias que lembravam pequenos depósitos de osso ou cartilagem (Friedenstein e cols., 1971; PROCKOP, 1997).

Na medula óssea as CTMs fornecem o suporte para as células tronco hematopoiéticas, e estão sendo usadas em protocolos de transplante para aumentar a “pega” do enxerto. Outra propriedade interessante das CTMs é sua habilidade de reduzir a proliferação de linfócitos. Recentemente CTMs expandidas *ex vivo* tem sido usadas com sucesso para tratar doença do enxerto contra o hospedeiro (GVHD- Graft versus-host disease), demonstrando serem dotadas de propriedade imunossupressoras (BOCELLI-TYNDALL et al., 2007; AGGARWAL; PITTENGER, 2005).

O cultivo de CTMs é feito selecionando-se as células com propriedade de adesão ao plástico, enquanto as células que permanecem em suspensão são facilmente removidas. Outros tipos celulares “contaminantes” (como macrófagos e linfócitos) são eliminados depois de determinado número de passagens (JAVAZON EH, 2004).

Nas últimas duas décadas, houve um progresso significativo no nosso entendimento sobre as células tronco, que são definidas por sua capacidade de auto-replicação e diferenciação em multi-linhagens. As características das células tronco estão baseadas em sua habilidade de diferenciação em diversos tipos de células incluindo osteoblastos, condrócitos, células endoteliais e até células neuronais (Figura1). Essas propriedades as colocam como uma poderosa base celular para o tratamento de um largo espectro de doenças que não são efetivamente tratadas por métodos tradicionais. A compreensão da natureza e qualidade de células tronco específicas de cada tecido nos deixará mais próximos de utilizá-las como meio de substituir tecidos danificados por doenças ou traumas (MAYHALL et al, 2004).

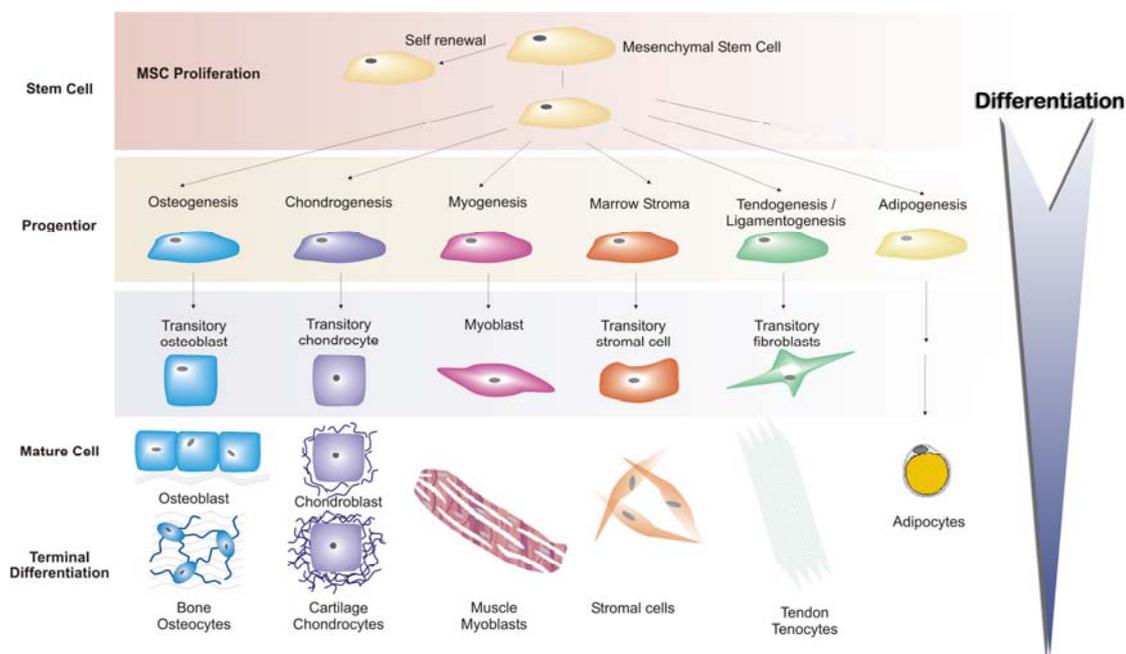


Figura1. Diferenciação das células tronco multipotentes em células especializadas da linhagem mesodérmica (Adaptado de Captlan e Bruder, 2001).

Estudos recentes indicam que células mesenquimais provenientes de tecidos específicos são capazes de se diferenciar em células de outros tecidos (KIM et al, 2004), oferecendo assim a perspectiva de novas estratégias terapêuticas para o reparo de tecidos lesados (CANCEDDA et al, 2003).

A versatilidade e a abundância de fontes para a obtenção destas células é notável. Assim como as demais células tronco adultas, vários estudos demonstram a plasticidade destas células *in vivo* e *in vitro* (Figura 2).

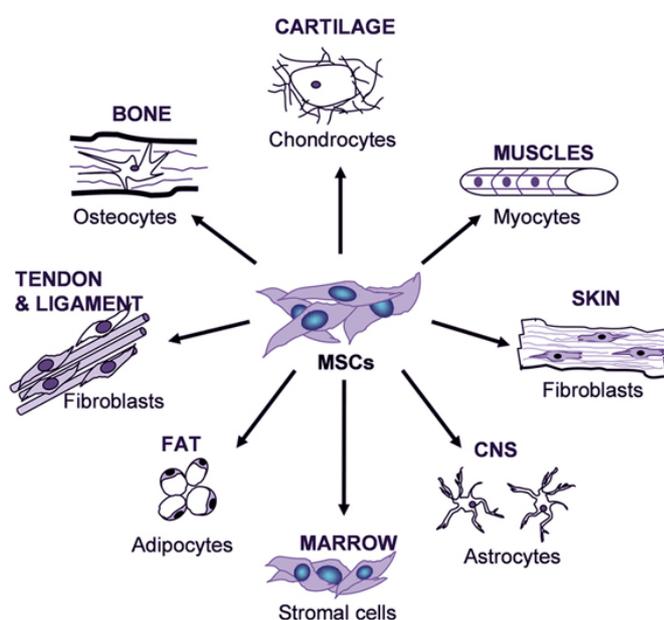


Figura 2. Multipotencialidade das células tronco mesenquimais de medula óssea (Retirado de [Grassel, 2007](#)).

A possibilidade de utilização das células mesenquimais como uma fonte de células tronco também é baseada na facilidade com que elas podem ser isoladas da medula óssea e expandidas muitas vezes *in vitro*.

Com o objetivo de promover o uso de uma terminologia padronizada para facilitar o intercâmbio de conhecimento entre pesquisadores da área, propuseram que as células aderentes ao plástico, atualmente chamadas células tronco mesenquimais, sejam nomeadas

células estromais mesenquimais multipotentes. A terminologia células tronco mesenquimais deve ser utilizada apenas para um subgrupo destas células que demonstrem atividade de células tronco por meio de critérios mínimos (HORWITZ et al., 2005).

Três critérios foram propostos para definir CTM: aderência ao plástico quando mantidas em cultura; expressão das moléculas de superfície CD105, CD73 e CD90, e não devem expressar CD45, CD34, CD14 ou CD11b, CD79a ou CD19 e HLA-DL; diferenciação em osteoblasto, condroblasto e adipócitos *in vitro* (DOMINICI et al., 2006).

1.3 Diferenciação das células tronco mesenquimais em osteoblastos

O sistema-modelo de diferenciação *in vitro* de células tronco mesenquimais em osteoblastos é um modelo clássico e de fácil reprodutibilidade para estudos de diferenciação celular.

As células osteoprogenitoras são células mesenquimais com grande potencial mitótico, que são encontradas em todas as superfícies ósseas e tem como função principal originar as células diferenciadas. Evidências sugerem a existência de precursores osteoblásticos diferenciados histologicamente reconhecidos como pré-osteoblastos que formam camadas de células que são morfológicamente semelhantes a osteoblastos, expressam os mesmos marcadores bioquímicos, mostram capacidade limitada de proliferação e sintetizam a parte orgânica da matriz óssea (colágeno tipo I, proteoglicanas e glicoproteínas adesivas) (QUARLES, 1992). Apesar disto, o principal papel destas células no osso, parece ser apenas o de serem células precursoras imediatas dos osteoblastos funcionais (OWEN, 1980).

Para que ocorra a osteogênese é necessário que haja o recrutamento e a proliferação de células precursoras de osteoblastos, que elas se diferenciem em osteoblasto e produzam matriz extracelular não-mineralizada, que será subseqüentemente calcificada (SCHWARTZ e BOYAN, 1994). Sistemas *in vitro* proporcionam a oportunidade de se avaliar, em um

ambiente controlado, eventos celulares e referentes à matriz extracelular que ocorrem durante a formação óssea (IRIE e cols., 1998). Em modelos *in vitro*, o período decorrido para que eventos relacionados à osteogênese sejam observados é da ordem de semanas (STEIN e cols., 1990).

Jaiswal et al. (1997) desenvolveram um sistema-modelo de indução de diferenciação de CTMs humanas adultas em osteoblastos e o protocolo otimizado inclui meio de cultura (DMEM ou α -MEM) suplementado com indutores químicos (100 nM dexametasona; 10 nM beta-glicerolfosfato e 0,05 nM ácido ascórbico).

Os glicocorticóides endógenos estão envolvidos no remodelamento e na formação óssea. A dexametasona é um potente corticosteróide muito utilizado na avaliação de respostas celulares *in vitro*. O ácido ascórbico, essencial em culturas de células osteogênicas, funciona como cofator na hidroxilação de resíduos de lisina e prolina do colágeno, atuando ainda como promotor da síntese de matriz óssea protéica (JAISWAL et al., 1997).

Segundo Long (2001) define-se como *osteopoiese* o processo de desenvolvimento de células ósseas que gera osteoblastos a partir de células tronco mesenquimais. O termo *osteogênese* deve ser reservado para a geração de matriz mineralizada por osteoblastos maduros.

A indução da osteopoiese é observada pelo aparecimento de morfologia de osteoblastos (forma cubóide), pelo aumento na atividade de fosfatase alcalina e formação de matriz mineralizada (JAISWAL et al., 1997).

Geralmente, este processo de diferenciação dos osteoblastos pode ser dividido em três estágios distintos a seguir representados:

- 1) Proliferação
- 2) Maturação da matriz
- 3) Mineralização

Algumas proteínas importantes, como colágeno tipo I, fosfatase alcalina (ALP), sialoproteína óssea (BSP), osteopontina (OPN) e osteocalcina (OC), são expressas em momentos específicos e são, portanto, parâmetros importantes para o estudo da osteogênese em culturas de células durante o processo de diferenciação celular (Figura 3).

O resultado final da diferenciação é a formação de hidroxiapatita mineral, que pode ocorrer por meio de dois mecanismos possíveis: por meio da formação de vesículas de matriz, as quais são pequenas vesículas que acumulam cálcio e fosfato e/ou, através da nucleação do colágeno, regulado por proteínas de matriz não colágenas (BECK, 2003).

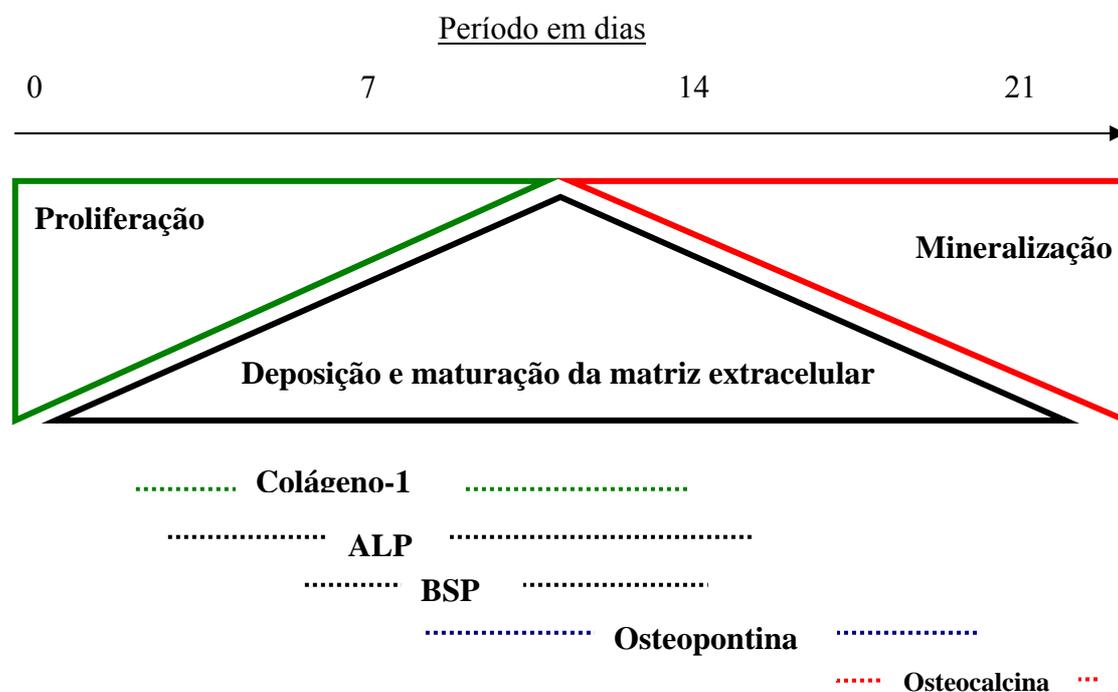


Figura 3. Diagrama esquemático dos três estágios de diferenciação dos osteoblastos em linhagens MC3T3-E1. (Adaptado de Beck, 2003).

Após um número limitado de divisões celulares, os osteoblastos cultivados na presença de ácido ascórbico e β -glicerosfosfato, se encontram em fase final de proliferação celular (7 dias aproximadamente). Durante o estágio de maturação da matriz, proteínas colágenas e não colágenas (BSP, OP, OC), entre outras, serão depositadas na matriz

extracelular e pequenas vesículas serão formadas, as quais são responsáveis pelo acúmulo de cálcio e fosfato. O estágio final do processo de diferenciação dos osteoblastos é marcado pela liberação das vesículas de matriz e pelo acúmulo de hidroxiapatita mineral, na matriz colágena.

1.4 Sistemas-modelo para estudo da osteopoiесе

A maior parte do entendimento da biologia das CTMs foi adquirido a partir de estudos sobre hCTMs (células tronco mesenquimais humanas). Esta é uma das situações incomuns, pois os pesquisadores já partiram das próprias células tronco humanas para as caracterizações, ou seja, as células humanas foram utilizadas como um sistema-modelo antes mesmo dos sistemas-modelo convencionais de animais de laboratório. As cCTMs (células tronco mesenquimais de camundongo) ainda são menos estudadas, em termos do seu fenótipo, o isolamento e proliferação. Mesmo que as células humanas e as murinas sejam semelhantes em termos gerais incluindo fenótipo e capacidade de diferenciação *in vitro*, estas células nas duas espécies expressam moléculas de adesão e integrinas de maneira diferente. Isto pode explicar suas diferenças de potencial de diferenciação e *homing* (LIECHTY et al., 2002; DEVINE et al., 2003).

Compreender as diferenças entre os modelos animais e seres humanos é essencial para o desenvolvimento da engenharia de tecidos ósseos (PEREIRA et al., 2009). Em se tratando de engenharia de tecidos, estudos anteriores sugeriram que as CTMs derivadas da medula óssea podem ser bons materiais para a terapia de regeneração óssea (BRUDER et al., 1998a; BRUDER ET AL., 1998b), devido ao seu elevado potencial de diferenciação osteogênica, que pode ser ainda mais estimulada por vários fatores, especialmente as proteínas morfogenéticas ósseas (SHEA et al., 2003; CHENG et al., 2001; MOUTSATSOS et al., 2001; SAMMONS et al., 2004).

Para que ocorra a osteogênese, é necessário que haja o recrutamento e a proliferação de células precursoras de osteoblastos, que elas se diferenciem em osteoblastos e produzam matriz extracelular não-mineralizada que será subsequentemente calcificada (SCHWARTZ e BOYAN, 1994). A utilização de culturas de células ósseas para o estudo da regulação da osteogênese tem sido gradativamente maior (AUBIN, 1998). Sistemas *in vitro* proporcionam a oportunidade de se avaliar, em um ambiente controlado, eventos celulares e referentes à matriz extracelular que ocorrem durante a formação óssea (IRIE e cols., 1998).

Em modelos *in vitro*, o período decorrido para que eventos relacionados à osteogênese sejam observados é da ordem de semanas (STEIN e cols., 1990,).

De acordo com Karsenty (2001), o progresso desta área de estudos se deve à elucidação, mesmo que parcial, dos mecanismos de transcrição gênica e diferenciação dos osteoblastos focando sua conservação entre camundongo e humanos.

Algumas proteínas importantes no progresso de osteogênese, como colágeno tipo I, fosfatase alcalina (ALP), sialoproteína óssea, osteopontina e osteocalcina, são expressas em momentos específicos e são, portanto, parâmetros importantes para o estudo da osteogênese em culturas de células humanas e murinas, (BECK Jr. et al., 2002; BECK Jr., 2003).

Além destas proteínas, o principal fator de transcrição responsável pelo processo de diferenciação osteoblástica, aliás, bastante conservado em ambas as espécies é o RUNX2/CBFA1, cujo *Cbfa1* murino foi identificado como um dos principais reguladores osteoblasto-específicos (KARSENTY, 2001). RUNX2/CBFA1 se liga a um elemento presente no gene da osteocalcina e isto é necessário e suficiente para conferir sua transcrição e de outros genes responsáveis pelo fenótipo osteoblástico das CTMs *in vitro* (KARSENTY, 2001).

1.5 Colinearidade dos genomas humano e murino (conceito de sintenia)

Os padrões e mecanismos da evolução de seqüências de DNA e proteínas foram extensivamente estudados nas últimas três décadas (LI, 1997; NEI AND KUMAR, 2000). Entretanto, até alguns anos atrás pouco havia sido descoberto sobre os padrões gerais da evolução da expressão gênica, até o surgimento de tecnologias de grande escala para o estudo de perfis de expressão gênica transcricional (transcriptoma) (CAVALIERI, TOWNSEND, AND HARTL 2000; ENARD et al. 2002; OLEKSIK, CHURCHILL, AND CRAWFORD 2002; RANZ, et al. 2003; RIFKIN, KIM, AND WHITE 2003; TOWNSEND, CAVALIERI AND HARTL 2003). A evolução da expressão transcricional conectada a mudanças evolutivas dos genes e fenótipos é de fundamental importância para estimar a taxa de evolução da expressão gênica e de procurar os mecanismos moleculares ainda obscuros mas responsáveis pela evolução do transcriptoma (LIAO AND ZHANG, 2006).

A evolução seja ela quer na escala genômica, transcriptômica ou proteômica tem suas bases fortemente corroboradas pelo estudo comparativo de *regiões sintênicas* entre as espécies.

De acordo com Passarge (1999), o termo *sintenia* se refere aos *loci* gênicos num dado cromossomo independente se estão, ou não, geneticamente “ligados” pela análise clássica de *linkage*. Esse termo foi introduzido em 1971 por John H. Renwick no 4º Congresso Interno de Genética Humana em Paris. Isto surgiu como uma consequência dos novos métodos no mapeamento genético usando células somáticas híbridas. O mapeamento de genes humanos que, embora, localizados em um mesmo cromossomo, mas com uma distância genética que não poderia ser determinada por frequência de recombinação, necessitou de um termo de referência “sintenia”.

Entretanto, esse termo é por vezes utilizado para indicar a preservação da ordem precisa dos genes em dado um cromossomo entre duas espécies diferentes, ordem esta

transmitida de um ancestral comum. Reconhecemos que alguns geneticistas são resistentes ao emprego desse termo para o caso de espécies diferentes, mas no presente trabalho decidimos adotá-lo dessa forma.

A identificação das associações sintênicas entre genomas relacionados facilita a reconstrução da evolução cromossômica e a identificação dos elementos ortólogos funcionais (SCHERTHAN et al., 1994; RETTENBERGER et al., 1995). *Sintenia conservada* é definida como a associação sintênica entre duas espécies distintas (ANDERSSON et al., 1996; HAIG, 1999) sem levar em consideração a ordem dos genes, devido à ocorrência de inversões e outros rearranjos intracromossômicos (MULLER et al., 2000; ROBINSON e SEIFFERT 2004), ou dos segmentos assintênicos não-contíguos intercalados entre os dois marcadores (ANDERSSON et al., 1996), bem como o tamanho dos segmentos pode ser diferente por subseqüentes translocações para outras regiões do genoma (ROBINSON e SEIFFERT, 2004).

As espécies podem diferir com relação ao número e morfologia de seus cromossomos devido aos blocos sintênicos estarem reunidos obedecendo a diferentes combinações. O número dos cromossomos pode aumentar ou diminuir por fissão ou fusão, respectivamente. Blocos de genes que estão juntos em uma dada espécie podem estar separados em diferentes cromossomos de outra (YANG et al., 1997).

A sintenia compartilhada é um dos critérios mais confiáveis para o estabelecimento da ortologia de regiões genômicas em espécies diferentes. Além disso, a conservação excepcional de sintenia pode refletir importantes relações funcionais entre os genes (DAWSON et al., 2007).

No presente trabalho adotamos o conceito de sintenia como regiões cromossômicas que abrigam blocos de genes ortólogos com distribuição igual ou muito próxima entre duas espécies distintas. Como a espécie humana e o camundongo *Mus musculus* apresentam alto grau de sintenia (Figura 4) e a comparação das seqüências nucleotídicas de seus genes mostra

alto grau de conservação (~80%) (CHURCH et al., 2009), decidimos fazer um estudo comparativo da expressão transcricional (RNAs mensageiros ou RNAm) dessas regiões.

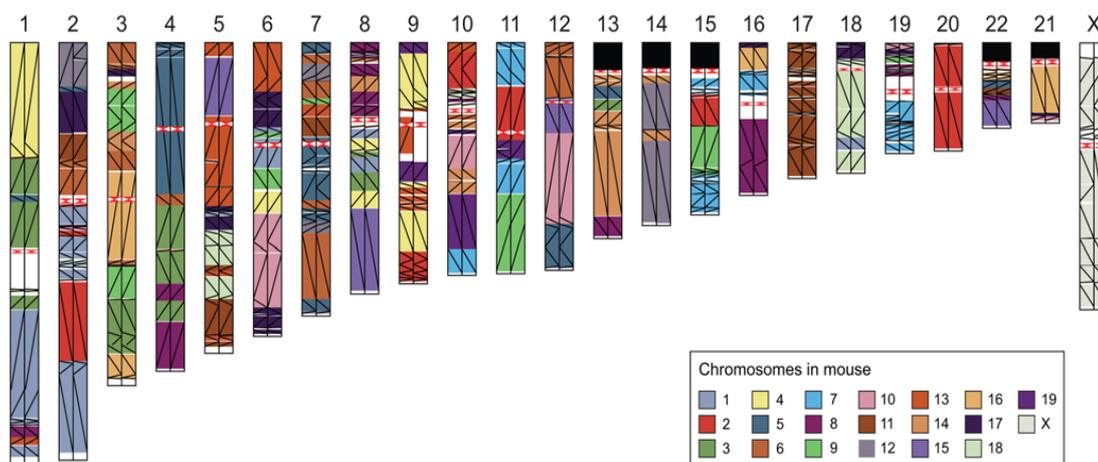


Figura 4. Representação gráfica dos blocos sintênicos entre homem e camundongo. (Retirado de Church et al., 2009).

1.6 O uso dos microarrays no estudo da expressão gênica transcricional

Os DNA microarrays constituem uma tecnologia que possibilita a mensuração da expressão de RNAm de centenas ou mesmo milhares de genes em um único ensaio de hibridação, tornando-se uma ferramenta atrativa para a obtenção de uma visão global do estado de células em termos de expressão transcricional em grande escala (transcriptoma) em diferentes situações fisiológicas ou patológicas. O poder dos microarrays como ferramenta experimental é resultado da complementaridade das bases A/T e C/G num experimento de hibridação (BROWN; BOTSTEIN, 1999).

Por esse motivo é que há grande interesse na pesquisa do controle da síntese de RNAm em grande escala, definindo assim o *perfil do transcriptoma* ou *assinaturas de expressão gênica*. Os desenvolvimentos recentes de tecnologias de determinação da expressão gênica, incluindo os microarrays, tornaram possível obter grande quantidade de perfis de

expressão, permitindo a mensuração simultânea de milhares de transcritos (GATTI *et al.*, 2007).

Como a quantidade de informações geradas nesses estudos é enorme, programas computacionais específicos foram desenvolvidos, como o Cluster e Tree View, utilizado para traçar as assinaturas de expressão gênica, muito útil para o agrupamento hierárquico de amostras e de genes diferencialmente expressos com base em distancia métrica por correlação de Pearson (EISEN *et al.*, 1998) ou o programa SAM (*significance analysis of microarrays*) utilizado para identificar os genes diferencialmente expressos com base estatística (TUSHER *et al.*, 2001) (Figura 5).

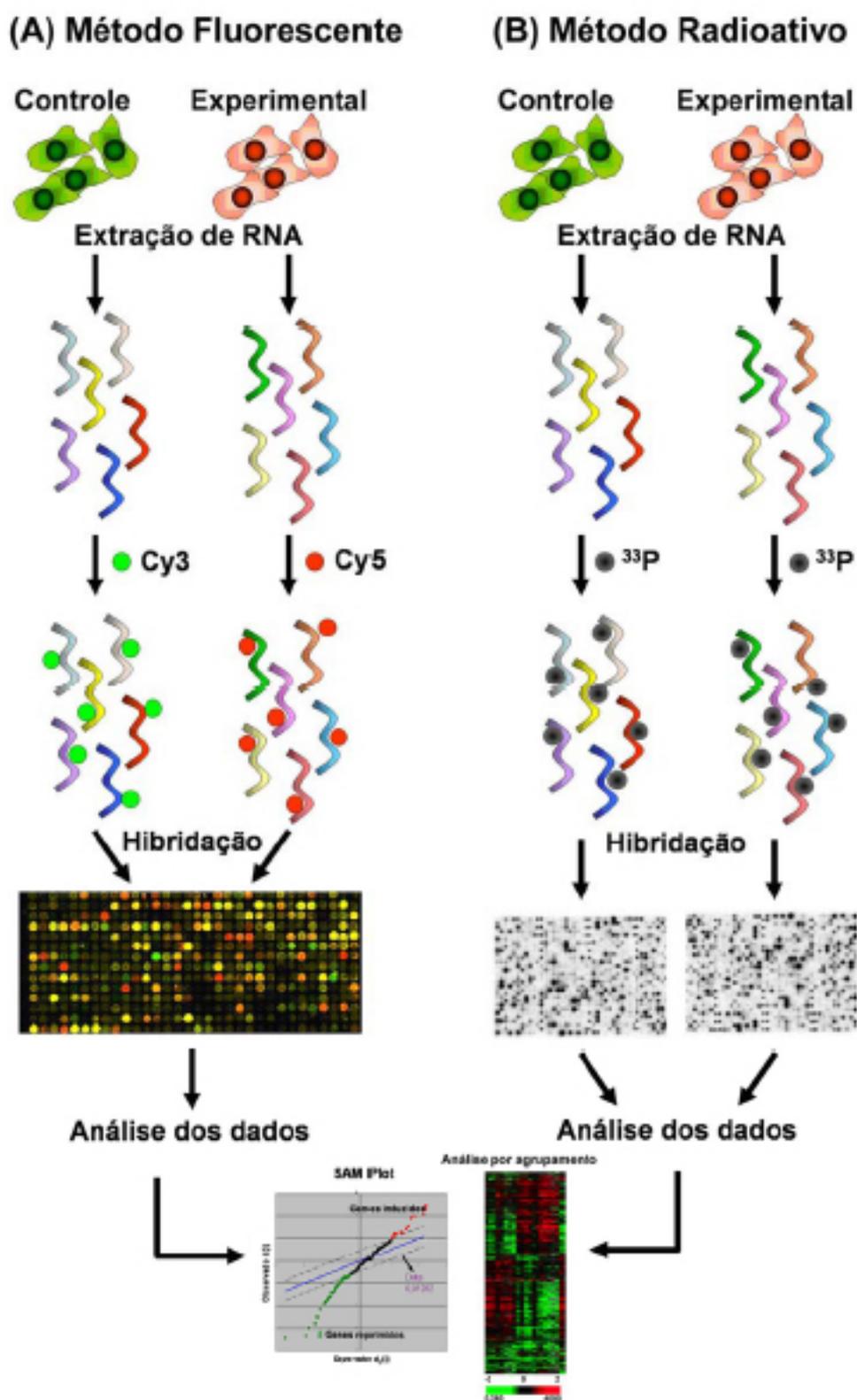


Figura 5. Ilustração dos principais tipos de delineamento experimental de *microarrays*. A) Método fluorescente usando Cy3 e Cy5 e lâminas de vidro e B) Método radioativo usando ^{33}P e membranas de náilon. (Modificada de Sakamoto-Hojo *et al.* 2003)

Os programas citados são bastante populares e já se tornaram clássicos na bioinformática de microarrays, mas ainda não respondem como montar os dados de maneira a construir um modelo preditivo de interação entre os genes. Inferir a estrutura de uma rede de interações gênicas também passou a ser uma tarefa imperativa a fim de avançar nossa compreensão sobre o mecanismo molecular do controle da expressão do transcriptoma (KIM *et al.*, 2007).

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

A análise dos dados de microarrays inclui agora um foco na reconstrução de redes regulatórias entre os genes, visando encontrar e entender as interações gene-a-gene a partir de dados de expressão transcricional (WANG *et al.*, 2006).

Os métodos de *engenharia reversa* fornecem uma boa maneira de se modelar interações baseadas em dados da expressão gênica durante o curso do tempo, cujos dados foram gerados por experimentos com microarrays. A rede gênica reconstruída terá, por enquanto, uma base puramente de probabilidade e estatística sendo claro que deverá ser finalmente validada experimentalmente (WU *et al.*, 2004a).

Dentre os algoritmos propostos na literatura para a inferência de redes gênicas, existem aqueles baseados no formalismo matemático da teoria da informação, como o ARACNE (BASSO *et al.*, 2005; MARGOLIN *et al.*, 2006), os que consideram equações diferenciais ordinárias, (NIR, NMI e TSNI) (GARDNER *et al.*, 2003; DI BERNARDO *et al.*, 2005; BANSAL *et al.*, 2006), e também aqueles que solucionam o problema de inferência por meio de redes Bayesianas, como o Banjo (YU *et al.*, 2004) e o GeneNetwork (WU *et al.*, 2004a).

Comparando esses algoritmos, o Genenetwork foi escolhido para o presente trabalho devido suas características peculiares. O algoritmo realiza a interpolação de dados e tem a habilidade de calcular a interação entre mais de mil genes. Além disso, a rede resultante é descrita por um gráfico orientado, no qual as setas positivas indicam indução e as negativas indicam repressão entre genes, respectivamente.

Nosso grupo já tem experiência prévia com o uso do algoritmo GeneNetwork (WU et al., 2004a), o qual se mostrou adequado na análise das redes de interação gênica em situações complexas como a ontogenia do timo de camundongo (MACEDO et al., 2008) ou as interações que ocorrem entre os *loci* de susceptibilidade a artrite reumatóide (SILVA et al., 2009) ou no controle da expressão de auto-antígenos por células do timo (MACEDO et AL., 2009).

O software GeneNetwork se encontra livre na Internet (<http://genenetwork.sbl.bc.sinica.edu.tw/index.asp>) e apresenta uma interface relativamente simples. 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 probabilidade de indução e as negativas indicam a probabilidade de repressão entre os transcritos (WU et al., 2004a).

Além disso, também utilizamos o *software* Cytoscape 2.6.2 para visualização e edição das redes geradas pelo algoritmo do GeneNetwork. O Cytoscape é uma plataforma de *software* para visualização e análise de redes de interação molecular e caminhos biológicos, além de integração dessas redes com anotações moleculares, perfis de expressão gênica e dados de outras fontes (SHANNON, 2003) (<http://www.cytoscape.org/>).

Tal *software* oferece funcionalidades para integração de dados arbitrários no gráfico, uma representação visual e dados integrados, ferramentas de seleção e filtragem, e uma

interface para métodos externos aplicados como *plugins* (SHANNON, 2003). Fizemos uso do *plugin* MCODE (Molecular Complex Detection), o qual é responsável por encontrar *clusters* (regiões altamente conectadas) em uma rede pré-estabelecida. O algoritmo MCODE opera em três estágios: valor do vértice (nó gênico), predição complexa e, opcionalmente, pós-processamento para filtrar ou adicionar genes nos complexos resultantes determinadas por critérios de conectividade (BADER & HOGUE, 2003).

Num esforço para conseguirmos conexões entre os dados transcricionais durante a diferenciação de células tronco mesenquimais em osteoblastos de duas espécies com certo relacionamento evolutivo (*Homo sapiens* e *Mus musculus*), dados esses obtidos por microarrays passamos a utilizar os programas de bioinformática acima especificados.

O programa SAM permitiu apontarmos os genes diferencialmente expressos com base estatística, para traçamos as assinaturas de expressão gênica por agrupamento hierárquico utilizamos o programa Cluster-TreeView e finalmente para reconstruímos as redes de interações baseadas em dados temporais de expressão gênica utilizamos o programa GeneNetwork.

Isto nos permitiu uma análise um tanto abrangente da evolução do transcriptoma camundongo-homem e também melhor caracterizar o sistema-modelo murino para estudos de diferenciação celular.

Hipótese do Trabalho

2. HIPÓTESE DO TRABALHO

Devido à colinearidade de genomas que ocorre entre humanos e camundongos, esperamos encontrar regiões cromossômicas ou áreas gênicas conservadas entre essas espécies exibindo um perfil de expressão transcricional próximo durante a diferenciação osteogênica de células-tronco mesenquimais dessas duas espécies.

Objetivos

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

O objetivo geral deste trabalho foi descrever o perfil de expressão de genes incluídos em regiões cromossômicas sintênicas entre a espécie humana e camundongos *Mus musculus*, durante a diferenciação osteoblástica de células-tronco mesenquimais de medula óssea destas duas espécies.

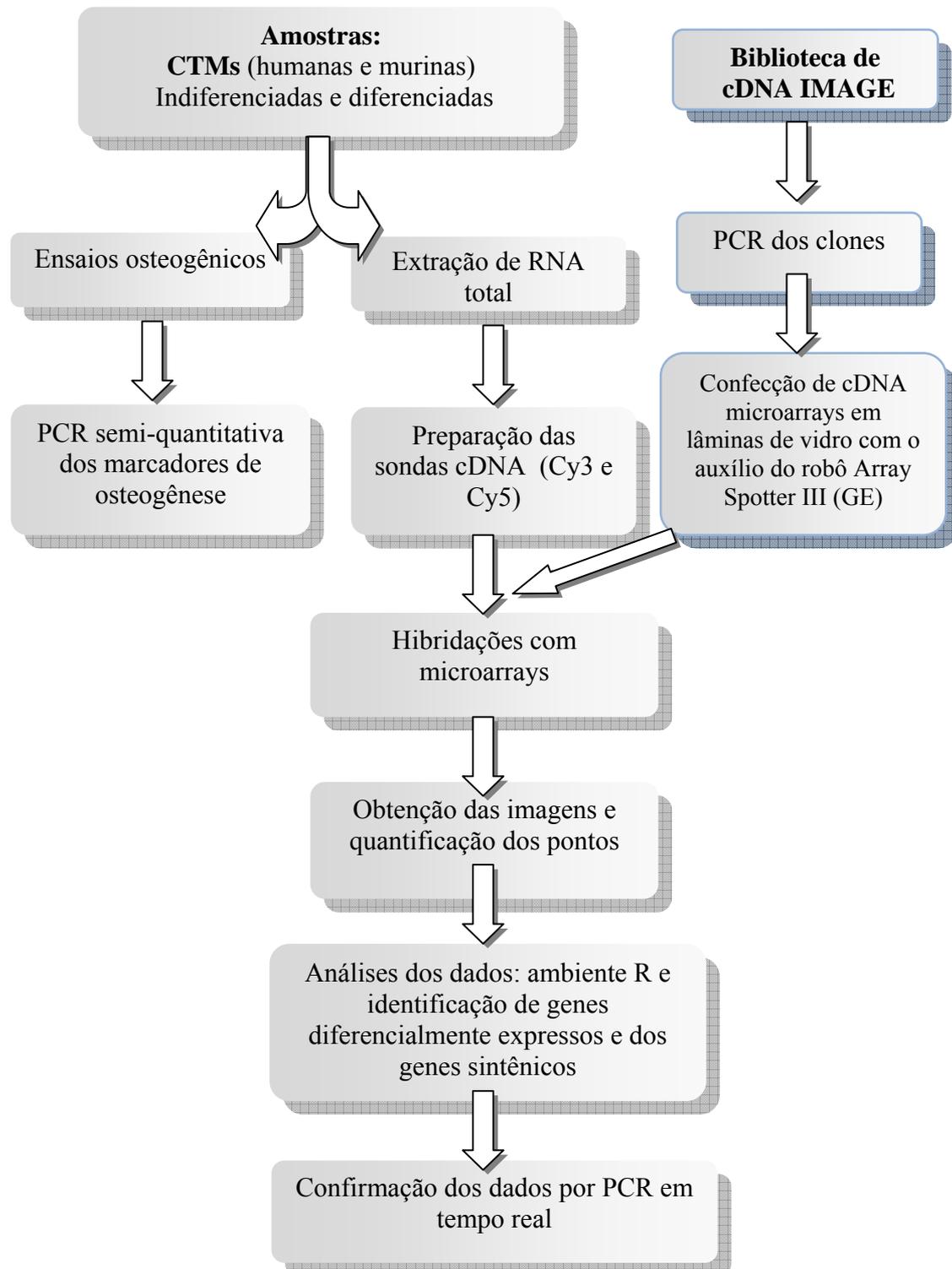
3.2 Objetivos específicos

1. Induzir quimicamente a osteogênese *in vitro* em células-tronco de medula óssea humana e de camundongos *Mus musculus* (diferenciação em osteoblastos).
2. Avaliar a osteogênese pelos os seguintes parâmetros indicadores de diferenciação: adesão celular, viabilidade e proliferação, dosagem de proteínas totais, atividade de fosfatase alcalina e formação de matriz mineralizada.
3. Traçar perfis de expressão gênica em grande escala das células-tronco durante o processo de diferenciação osteoblástica fazendo uso da tecnologia dos cDNA microarrays, avaliando a expressão diferencial quantitativa de aproximadamente 4.500 seqüências murinas e humanas.
4. Fazer uso de programas de bioinformática dedicados à análise dos dados de microarrays: SAM (*significance analysis of microarrays*) para identificar os genes diferencialmente expressos, Cluster - Tree View para traçar as assinaturas de expressão gênica por agrupamento hierárquico e GeneNetwork para reconstruir redes de interação transcricional.
5. Identificar regiões cromossômicas sintênicas entre as duas espécies estudadas que apresentem genes com mesmo perfil de expressão durante a osteogênese.

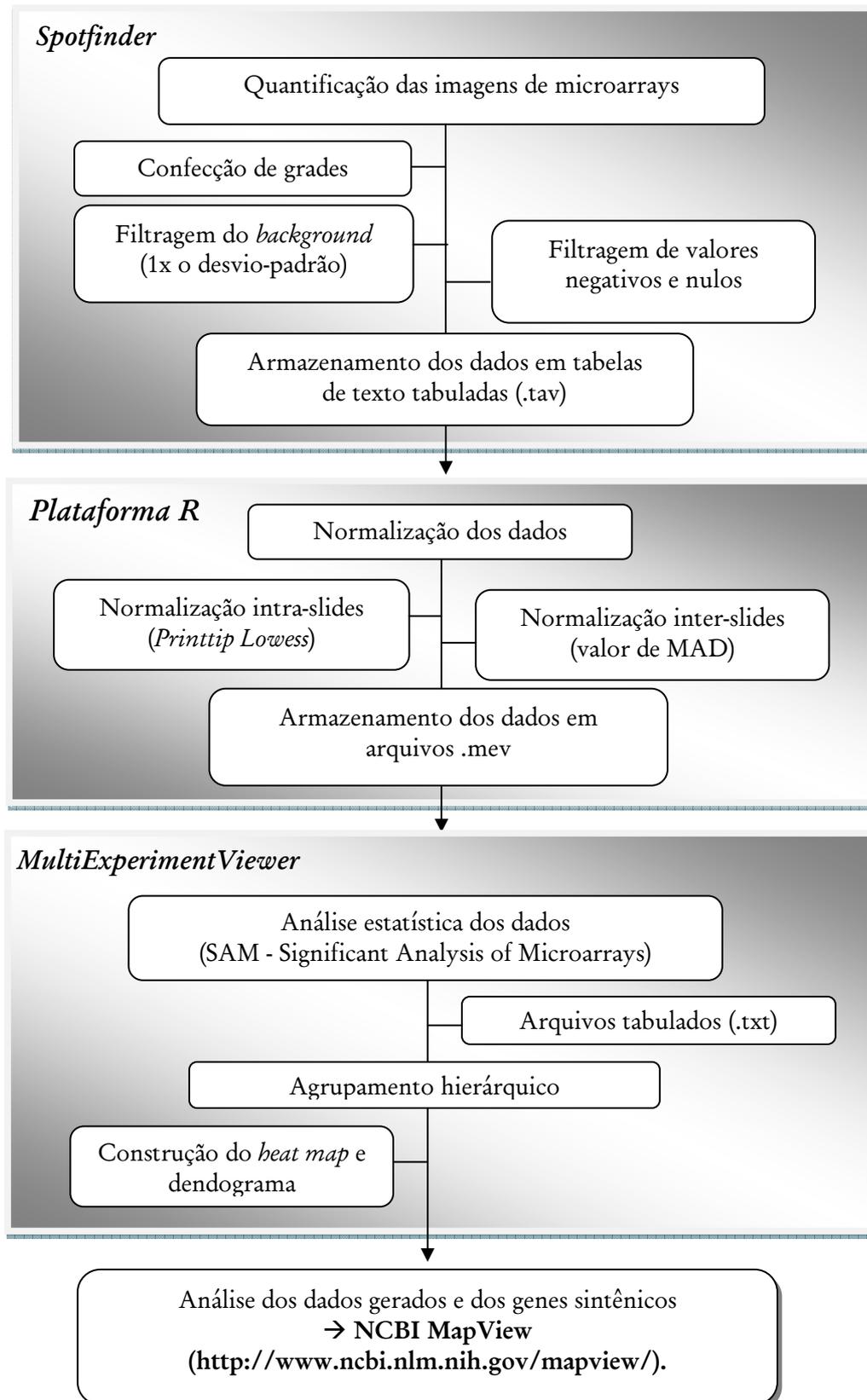
*Delineamento Experimental e Pipeline da
Análise dos Dados de Microarrays*

4. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL & PIPELINE DA ANÁLISE

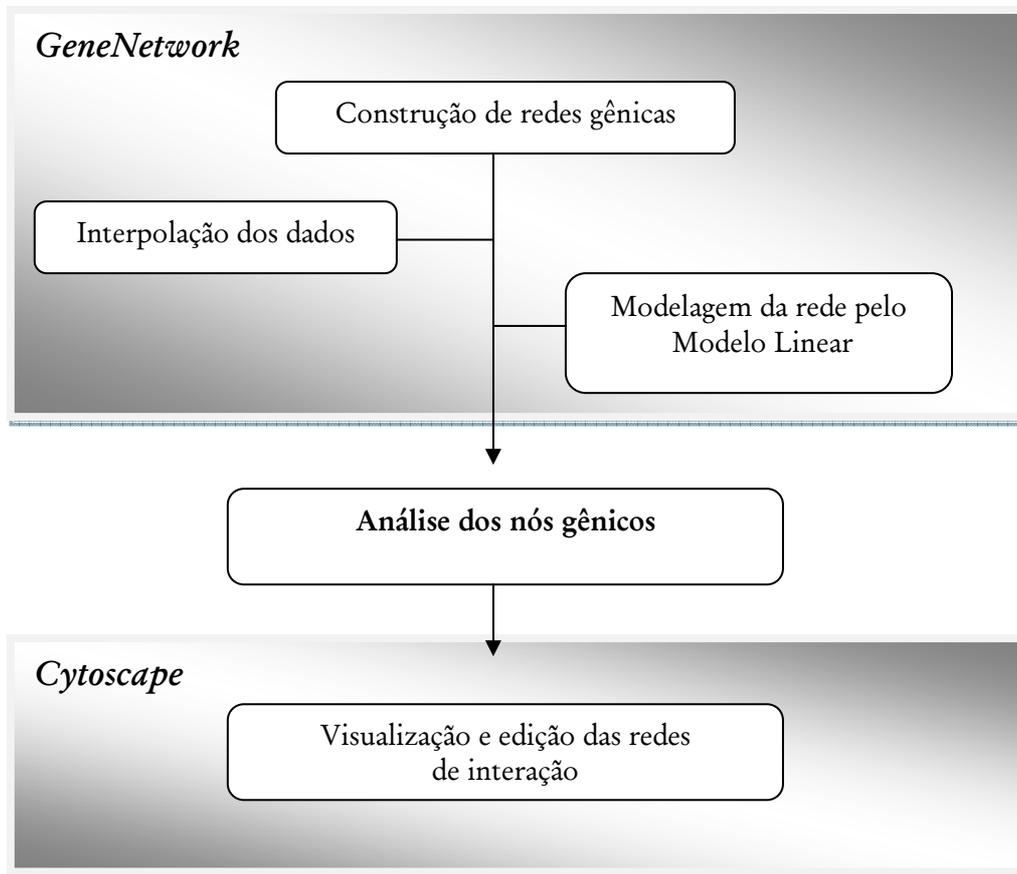
4.1 Delineamento experimental



4.2 Pipeline da análise *in silico*



Arquivo de input: dados normalizados e filtrados dos genes sintênicos diferencialmente expressos



Material e Métodos

5. MATERIAL E METÓDOS

5.1 Obtenção e cultura das células-tronco mesenquimais e indução da osteogênese

5.1.1 Medula óssea humana

Células de medula óssea humana foram separadas de aspirados coletados de doadores normais realizados pelo Serviço de Transplantes de Medula Óssea do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (USP) com a colaboração da Prof. Dra. Belinda Pinto Simões.

O presente trabalho foi realizado após aprovação do Comitê de Ética da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, USP (Protocolo de Aprovação No. 2005.1.670.58.4). Além disso, o material só foi levado ao laboratório de pesquisa mediante esclarecimento e termo de consentimento assinado pelos doadores (anexo A). Todo o trabalho foi realizado com material cedido por três doadores normais.

As células coletadas durante o procedimento convencional de transplantes de medula óssea foram filtradas em malha de filtração de medula óssea. O material retido no filtro foi recolhido em meio de transporte, composto de α -MEM (Minimum Essential Medium Eagle Alpha modified – Sigma Ref. MO644-10X1L) acrescido de 500 μ g/ml gentamicina (Sigma) e 3 μ g/ml anfotericina B (Sigma). É importante salientar que as células-tronco mesenquimais humanas utilizadas em nosso modelo experimental não seriam utilizadas nos transplantes, pois o referido procedimento no referido Hospital é realizado com células-tronco hematopoiéticas.

Uma vez em nosso laboratório, as suspensões de células foram centrifugadas a 2.000 rpm por 5 minutos e o meio de cultura e a gordura removida com pipeta volumétrica em câmara de fluxo laminar. As células foram ressuspensas em meio essencial mínimo (α -MEM

suplementado com 10% de soro bovino fetal (Gibco), 50 µg/ml gentamicina e 0,3 µg/ml anfotericina B), colocadas em frascos plásticos de cultura de 75 cm² (Corning ou BD Plastipak) e cultivadas em estufa com atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C até atingirem confluência. Os meios foram trocados a cada três dias, permitindo que apenas as células aderentes se mantivessem em cultura.

A indução química de diferenciação em osteoblastos foi conseguida pela adição de 10⁻⁷M dexametasona (Sigma), 5 µg/mL de ácido ascórbico (Sigma) e 2,16 g/mL de β-glicerofosfato (Sigma) ao α-MEM. Durante todo o tempo de cultivo as células foram mantidas a 37°C e atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ e 95% de ar atmosférico. Os meios foram trocados a cada três dias.

Após a confluência, as células foram removidas dos frascos de cultura por meio de lavagem com solução de EDTA 1mM (Gibco), tripsina 0,25% (Gibco) e 1% colagenase tipo II 8U/µl (Gibco) e ressuspensas em quantidade maior de meio de cultura a fim de diluir e interromper a ação enzimática. Procedeu-se então centrifugação para coletar as células. A contagem das células foi realizada em Câmara de Neubauer em microscópio óptico comum (coloração com azul de tripan 1% Sigma).

5.1.2 Medula óssea de camundongos C57BL/6

Células de medula óssea murina foram coletadas do fêmur e da tíbia de 10 camundongos C57Bl/6 machos adultos jovens com aproximadamente 18 gramas, procedentes do Biotério Central do Campus da USP de Ribeirão Preto, com aprovação do Comitê de Ética da Universidade de São Paulo, campus de Ribeirão Preto, (Protocolo de Aprovação No. 08.1.132.53.4). Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e em seguida banhados sucessivamente em solução de iodo 1% e clorexidina 2,5 % para assepsia antes do processo cirúrgico.

Os fêmures e as tíbias foram removidos, os músculos principais foram dissecados e em seguida essas estruturas passaram por um processo de limpeza, em banho de álcool 70% e depois clorexidina 2,5%. Ao final do processo de limpeza os ossos ficaram por 2 minutos em um meio de transporte α -MEM 20% com alta concentração de antibióticos e fungicidas. Em seguida, as epífises dos ossos (tíbia e fêmur) foram removidas e o canal medular exposto. Com a cavidade medular exposta, a medula foi extraída lançando um fluxo de meio de cultura no interior do canal através de uma seringa de 10 mL e agulha hipodérmica de calibre 20 (BD Plastipak). Este conteúdo medular foi coletado em tubo de 15 ml e então dividido em duas garrafas de cultura de 25 cm² (BD Plastipak) para a proliferação.

As células foram cultivadas em meio de cultura essencial mínimo – modificado α (α -MEM) (Gibco), suplementado com 20% de soro fetal bovino (Gibco), 50 μ g/mL de gentamicina (Gibco), 0,3 μ g/mL de anfotericina B (Sigma) e 45 μ g/mL de vancomicina (ACROS ORGANICS). A indução química de diferenciação em osteoblastos foi conseguida pela adição de dexametasona 10^{-7} M (Sigma), 5 μ g / mL de ácido ascórbico (Sigma) e 2,16 g / mL de β -glicerofosfato (Sigma) ao α -MEM. Estas condições de cultura induzem a diferenciação osteoblástica de células mesenquimais presentes na medula óssea (Rosa & Beloti, 2003; Coelho et al., 2000; Pittenger et al., 1999, Cheng et al., 1994). Durante todo o tempo de cultivo as células foram mantidas a 37°C e atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂ e 95% de ar atmosférico e os meios foram trocados a cada três dias.

Após a confluência, as células foram removidas dos frascos de cultura (BD Plastipak) por meio de EDTA 1mM (Gibco), tripsina 0,25% (Gibco) e 1% colagenase tipo II 8U/ μ l (Gibco) e colocadas em presença de quantidade suficiente de meio de cultura, para interromper a ação enzimática. Seguiu-se centrifugação para recolher as células. A contagem das células foi realizada em Câmara de Neubauer em microscópio óptico comum (coloração com azul de tripan 1% Sigma).

5.1.3 Ensaio de osteogênese

O sistema-modelo de diferenciação de células-tronco mesenquimais em osteoblastos utilizado neste trabalho é bastante consolidado. Confirmamos e monitoramos a diferenciação das células aderentes de medula óssea em osteoblastos por meio de ensaios de proliferação e viabilidade celular, determinação de proteínas totais e fosfatase alcalina, produção de matriz mineralizada e fenótipo de osteoblastos.

Para tais ensaios 2×10^4 células / poço foram colocadas em placas de cultura de 24 poços (TPP) e cultivadas em meio essencial mínimo e meio de diferenciação em estufa com atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C.

5.1.4 Determinação da proliferação e viabilidade celulares

Após remoção do meio de cultura, os poços contendo as células aderidas foram lavados três vezes com PBS (Phosphate buffered saline Gibco) aquecida a 37°C, para remoção das células não aderidas e do meio de cultura.

Em seguida, os poços foram preenchidos com 1ml de uma solução de EDTA 1mM e tripsina 0,25% (Gibco), para liberação das células aderidas.

O conteúdo dos poços foi recolhido em tubos de 2,0 mL contendo 0,5 mL de meio de cultura. Alíquotas de 100 µl desta solução foram incubadas, por 5 minutos, com o mesmo volume de azul de tripan 1%. Células viáveis foram contadas em microscópio utilizando câmara de Neubauer, para a determinação do número de células e da viabilidade celular.

A proliferação celular foi expressa em número de células $\times 10^4$ / poço e a viabilidade celular expressa como porcentagem de células vivas (que excluem o corante azul tripan). Ambos os parâmetros foram avaliados aos 7, 14 e 21 dias, após o plaqueamento.

5.1.5 Determinação de proteína total

A dosagem de proteínas totais foi realizada após 7, 14 e 21 dias em cultura, seguindo o método de Lowry e cols. (1951). O meio de cultura dos poços foi removido, os poços lavados três vezes com PBS a 37°C e preenchidos com 2 mL de água deionizada e as placas submetidas a 5 ciclos de choques térmicos, que consistem da colocação da placa em ambiente a -20°C por 20 minutos, seguida de 15 minutos a 37°C. Ao final dos cinco ciclos, 1 mL da solução de cada poço foi transferido para tubos de ensaio devidamente identificados, misturado com 1mL de solução de Lowry (Sigma) e deixados em repouso à temperatura ambiente por 20 minutos. Após esse período, foi adicionado a cada tubo 0,5 mL da solução de reagente de Folin-Ciocalteau (Sigma) e novamente deixado em repouso à temperatura ambiente por 30 minutos, para permitir o desenvolvimento de coloração. Em seguida, a absorvância de cada tubo foi medida em um espectrofotômetro (Ultrospec 2100, GE Healthcare) em 680 nm e a concentração de proteínas totais expressa em µg / mL. Uma curva padrão preparada com soro albumina bovina serviu de parâmetro para determinarmos a concentração de proteínas.

5.1.6 Determinação da atividade de fosfatase alcalina (ALP)

A atividade de ALP foi medida após 7, 14 e 21 dias em cultura, utilizando um kit comercial (Labtest, MG, Brasil). Para isso foram utilizados tubos de ensaio “branco”, “padrão” e “testes”. Em cada tubo de ensaio foram colocados 0,5 mL de solução tampão alcalino os quais foram mantidos em banho a 37°C. Um volume de 50 µl do reagente 1 (substrato timolftaleína monofosfato) foi acrescido em todos os tubos e incubados por 5 minutos. Acrescentou-se 50 µl das amostras e solução padrão (45U/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 Avaliação imunocitoquímica de osteopontina

Para a imunolocalização da osteopontina, as células foram cultivadas durante 7 dias sobre lamínulas Thermanox (Nunc) em meio mínimo e de diferenciação. Posteriormente, as células foram fixadas com paraformaldeído 4% em PBS por 1º minutos, e depois lavadas com 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.

O anticorpo primário, anti-osteopontina (policlonal LF166, 1:1000) foi incubado por 1 hora em atmosfera úmida. Em seguida procedeu-se lavagem com PBS por 3 vezes, incubou-se com o anticorpo secundário diluído 1:200. Para a visualização do citoesqueleto (actina) e dos núcleos de células aderidas foram utilizados, respectivamente, faloidina conjugada com Alexa Flúor 488 diluído 1:200 (Molecular Probes) e DAPI diluído 1:200 (Molecular Probes). Após montagem das lamínulas com meio de montagem Prolong Anifade (Molecular Probes), as marcações foram analisadas sob epifluorescência em microscópio de luz (Leica). Todas as etapas de imunolocalização foram realizadas no laboratório de Cultura Celular do Departamento de Morfologia da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, USP, sob a supervisão da Profª. Dra. Karina F. Bombonato-Prado.

5.3 Avaliação da formação de matriz mineralizada

Ao final dos 21 dias em cultura, o meio foi removido, os poços lavados três vezes com PBS aquecida a 37°C e preenchidos com 2 mL de formalina 10% (Labsynth, Brasil).

Decorridas 24 horas, após remoção da formalina, os poços foram desidratados em séries crescentes de alcoóis (30°GL, 50°GL, 70°GL e 100°GL) e a duração da desidratação para cada graduação alcoólica foi de 1 hora. Após secagem, os poços foram corados com vermelho de alizarina (Sigma) e as áreas de mineralização ricas em cálcio, foram evidenciadas pela coloração vermelha. Utilizando um microscópio de luz visível invertido com objetiva de 10 X. As imagens foram obtidas por fotografia dos poços.

5.4 Expressão numérica dos dados de osteogênese

Os dados relativos aos parâmetros de diferenciação celular acima especificados foram apresentados como média aritmética e desvio padrão \pm (n = 5).

5.5 Extração de RNA total das culturas de células

A fim de prevenir da contaminação por ribonuclease durante a extração e manuseio dos RNAs, toda vidraria, tubos plásticos, espátulas e pinças utilizadas foram previamente autoclavados. Os materiais plásticos (tubos e ponteiras) eram novos e mesmo assim foram previamente autoclavados. Todo o procedimento foi realizado usando luvas de látex sem talco e descartáveis.

Após 0, 24, 48 horas e 7 dias de indução química com meio de diferenciação, o RNA total de cada cultura foi extraído utilizando-se o kit MirVANA™ (Ambion), seguindo as instruções do fabricante. As CTMs sem indução (0 horas) e com indução química (24, 48 horas e 7 dias) foram destacadas das garrafas de cultura de 75 cm² utilizando-se 9,5 ml de solução de tripsina 0,25% com 0,5 ml de EDTA pH 8,0 por 10 minutos, seguido de inativação da tripsina com meio de cultura mais SBF. As células foram colhidas por centrifugação e lavadas duas vezes com PBS 1x, seguida de centrifugação a 10.000 x g durante 5 minutos. Adicionou-se 1 mL de solução de lise. Agitou-se vigorosamente (pipetagem e 10 segundos no

vórtex) para lisar completamente as células e obter um lisado homogêneo. Adiciona-se 100 µl de Mirna Homogenate Additive e misturou-se bem (vórtex 15 segundos). Deixou-se a mistura em banho de gelo picado por 10 minutos. Adicionou-se 1 mL de solução de fenol:clorofórmio e agitou-se vigorosamente no vórtex por 60 segundos. O lisado foi então centrifugado a 10.000 x g por 5 minutos à temperatura ambiente. A fase aquosa foi cuidadosamente transferida para um tubo novo e então foram adicionados 1,25x volume recuperado após a centrifugação de etanol 100% à temperatura ambiente. Para cada amostra é montada uma coluna em um tubo coletor. 700 µl da mistura foram pipetados na coluna e centrifugados 15 segundos à 10000xg. O líquido foi descartado e o procedimento foi repetido até que toda a mistura lisado/etanol tenha sido filtrado. Aplicou-se 700 µl de miRNA Wash Solution 1 à coluna e centrifugou-se por 10 segundos à 10000 xg. Descartou-se o líquido e 500 µl de miRNA Wash Solution 2/3 foram aplicados à coluna e centrifugados 10 segundos à 10000 xg. Repetiu-se o último passo e, após descartar o líquido, centrifugou-se 1 minuto para remover resíduos líquidos no filtro. A coluna foi transferida para um tubo novo coletor e a ela foram adicionados 100 µl de água DEPC pré-aquecida (95°C). Centrifugou-se 30 segundos para recuperar o RNA.

Ao RNA total recuperado na etapa anterior foram adicionados três volumes de etanol absoluto gelado a fim de precipitar e concentrar a amostra e a mistura deixada a -20°C por pelo menos 18 horas.

O RNA total foi coletado por centrifugação a frio e o precipitado foi lavado duas vezes com 1000 µL de etanol 70 % também a frio. O excesso de etanol foi removido do precipitado de RNA por evaporação em tubo aberto tomando cuidado para não ressecar as amostras. Finalmente as amostras de RNA foram dissolvidas em 13 µL de água Milli-Q estéril.

O grau de pureza das preparações de RNA total foi calculado por medidas espectrofotométricas (GENEQUANT – AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH) calculando

as razões entre as absorvâncias; $A_{260}/A_{280} \sim 2,0$ indicando que a preparação estava livre de proteínas e $A_{260}/A_{230} \sim 2,0$ livre de fenol, entretanto razões inferiores podem indicar contaminação com guanidina e/ou fenol. No presente trabalho, utilizamos somente preparações puras de RNA.

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

A agarose foi fundida em água Milli-Q autoclavada (1,5% de agarose), e quando à temperatura de 60°C , foi adicionado 10 mL de formaldeído (37%) e 11 mL de tampão de migração 5X concentrado (20,6 g de MOPS [ácido 3-(N-morfolino) propano sulfônico], dissolvidos em 800 mL de acetato de sódio 50mM, pH 7,0 ajustado com NaOH 2N e adicionados 10 ml de EDTA 0,5 M pH 8,0, volume final ajustado para 1000 mL). O gel foi solidificado em suporte de acrílico que foi, inicialmente, tratado com NaOH 0,5 M por 10 minutos, assim como a cuba e o pente para eliminação de RNAase sendo posteriormente lavado com água Milli-Q autoclavada.

5.5.1 Preparação das amostras de RNA

Em um tubo tipo *Eppendorf* novo e autoclavado colocado em banho de gelo picado foram adicionados 4,5 μL de solução de RNA (cerca de 3 μg de RNA), 2 μL de tampão de migração MOPS 5X (20,6g de MOPS 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 1000 ml); 3,5 μl de formaldeído (37%) e 10 μl de formamida. A solução foi incubada a 65°C por 15 minutos e imediatamente resfriada em banho de gelo. Às amostras desnaturadas foram acrescentados 1 μL de solução de brometo de etídeo diluído 1:3 (a partir de solução estoque 10 mg/mL) e 2 μL (1/10 do volume) de *dye loading solution*. A solução de RNA foi então aplicada no gel de agarose. A eletroforese foi realizada a 80 V por cerca de 2,5 horas.

A visualização de bandas de RNA foi conseguida iluminando o gel em luz UV de transiluminador o qual foi fotografado com câmara digital. Bandas bem definidas dos RNAs ribossômicos RNAr 28 S (4,8 Kb) e RNAr 18 S (1,9 Kb) assim como RNAr 5S e RNAt 4S permitiu a classificação da amostra como íntegra.

5.5.2 Quantificação de RNA total

O precipitado de RNA total foi dissolvido em 13 µl de água MilliQ previamente tratada com DEPC e autoclavada. A solução de RNA foi então diluída 100 x e submetida a dosagens em espectrofotômetro (GENEQUANT - AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH) usando luz ultravioleta. As dosagens tiveram como base a seguinte estimativa: 1U de A_{260} = 40 µg RNA/ml.

5.5.3 Avaliação da expressão de genes relacionados à osteogênese por RT-PCR semi-quantitativa

Para avaliar a expressão de genes relacionados à osteogênese durante a diferenciação, efetuamos reações de RT-PCR (*Reverse Transcription – Polymerase Chain Reaction*) semiquantitativa. As amostras dos cinco grupos citados anteriormente foram avaliadas segundo a expressão dos genes: ALPL (alkaline phosphatase), BGLAP (bone gamma-carboxyglutamate (gla) protein), também conhecida como osteocalcina, COL1A1 (collagen, type I, alpha 1), RUNX2 (runt-related transcription factor 2) e SPP1 (secreted phosphoprotein 1), também conhecida como osteopontina, além do gene usado como constitutivo GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) para amostras humanas e B-actina para amostras murinas.

Tabela I. Sequências *sense* e *antisense* dos oligonucleotídeos *primers* de genes humanos utilizados nas reações de PCR, suas respectivas temperaturas de anelamento.

<i>Genes</i>	<i>T_m</i>	<i>Primer Sense</i>	<i>Primer Antisense</i>
GAPDH	60°C	5'-CTGCACCACCCAAGTCTTA-3'	5'-CATGACGGCAGGTCAGGTC-3'
ALPL	57°C	5'-CCACGTCTTCACATTTGGTG-3'	5'-AGACTGCGCCTGGTAGTTGT-3'
RUNX2	57°C	5'-CCTTGGGAAAAATTCAAGCA-3'	5'-AACACATGACCCAGTGCAA-3'
COL1A1	57°C	5'-GTGCTAAAGGTGCCAATGGT-3'	5'-CTCCTCGCTTCCTTCCTCT-3'
SPP1	57°C	5'-GCCGAGGTGATAGTGTGGTT-3'	5'-GTGGGTTTCAGCACTCTGGT-3'
BGLAP	57°C	5'-GGCAGCGAGGTAGTGAAGAG-3'	5'-CTGGAGAGGAGCAGAAGTGG-3'

Tabela II. Sequências *sense* e *antisense* dos oligonucleotídeos *primers* de genes murinos utilizados nas reações de PCR, suas respectivas temperaturas de anelamento.

<i>Genes</i>	<i>T_m</i>	<i>Primer Sense</i>	<i>Primer Antisense</i>
β-actina	60°	5'-ATGGATGACGATATCGCT-3'	5'-ATGAGGTAGTCTGTTCAGG-3'
Akp2	55°C	5'-AACCCAGACACAAGCATTCC-3'	5'-GCCTTTGAGGTTTTTGGTCA-3'
Runx2	62°C	5'-CCGCACGACAACCGCACCAT-3'	5'-CGCTCCGGCCCACAAATCTC-3'
Col1a1	57°C	5'-CACCTCAAGAGCCTGAGTC-3'	5'-AGACGGCTGAGTAGGGAACA-3'
Spp1	55°C	5'-TCACCATTCGGATGAGTCTG-3'	5'-ACTTGTGGCTCTGATGTTCC-3'
Bglap2	57°C	5'-TTGGTGCACACCTAGCAGAC-3'	5'-ACCTTATTGCCCTCCTGCTT-3'

Os *primers* utilizados foram definidos utilizando-se o programa Primer3 (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3_www.cgi) selecionando somente aqueles situados em exons diferentes.

Dois microgramas de cada amostra de RNA total foram convertidos a cDNA utilizando a enzima transcriptase reversa “SuperScript II[®]” (Invitrogen). Cinco microlitros do produto da reação (cDNA) foram sucessivamente diluídos (1:2, 1:4, 1:8, até 1:1024) e serviram como *template* de reação de PCR semi-quantitativa. Foram usados pares de *primers* gene-específicos humanos (Tabela I) ou murinos (Tabela II). Um volume final de 25 µl de uma reação típica de PCR, contendo 200µM de dNTP, 1,5 mM de MgCl₂, 50 mM KCl, 10

mMTris-HCl (pH 8,4 a 25°C), 10 µM de cada primer e 2 U de Taq DNA polimerase, foi submetida a ciclagem térmica. O protocolo de ciclagem térmica para amplificação foi: 1 x (94°C durante 5 minutos), 30 x desnaturação (94°C, 30 segundos), anelamento (temperatura de acordo com o *primer*) (Tabelas I ou II), 30 segundos; extensão (72°C, 30 segundos). Após os ciclos as reações permaneceram a 72°C por 10 minutos e em seguida a 4°C por 10 minutos. A duração do programa foi de 3 horas e 15 minutos.

Os produtos da amplificação foram submetidos a uma eletroforese em gel de agarose 2% em paralelo ao lado de um marcador de peso molecular de 50 pb (Promega, EUA).

5.6 Preparação de cDNA microarrays em lâminas de vidro

5.6.1 Bibliotecas de cDNAs humanos e murinos

O Laboratório de Imunogenética Molecular (Departamento de Genética – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP) coordenado pelo Prof. Dr. Geraldo Passos, mantém uma biblioteca de cDNA humanos e uma biblioteca de cDNA murinos com cerca de 9.000 clones cada uma delas provenientes do “*IMAGE Consortium*” (<http://image.hudsonalpha.org/>), gentilmente cedida pela Dra. Catherine Nguyen, do INSERM-TAGC U928, Marseille, França.

Tais bibliotecas são normalizadas e foram preparadas utilizando três vetores de clonagem: Lafmid, Bluescript e pT7T3 e os insertos de cDNA têm em média 500 a 1.500 pb. Os clones também foram classificados de acordo com a distribuição cromossômica e o processo biológico referentes aos seus respectivos RNAm (cDNAs). Além dos clones caracterizados quanto aos seus respectivos RNAm (cDNAs), essas bibliotecas também abrigam grande número de clones de *expressed sequence tags* (ESTs), cujos RNAm ainda não tiveram suas proteínas identificadas. As seqüências depositadas nos microarrays

utilizados nesse trabalho podem ser recuperadas on-line nos endereços (www.rge.fmrp.usp.br/passos/hs_array) para as seqüências humanas e (www.rge.fmrp.usp.br/passos/mmu_array) para as seqüências murinas.

5.6.2 Amplificação dos insertos de cDNA para a confecção dos microarrays

A amplificação foi realizada de acordo com modificação do protocolo de Hedge et al., (2000). Os clones de *E. coli* repicados em placas de 96 poços contendo meio de cultura 2X LB + ampicilina foram incubados durante 16 horas, na proporção de 5 µl de cultura diluído em 45 µl de meio 2X LB¹ (volume final em cada poço: 50 µl). A seguir uma alíquota de 8µl da cultura foi transferida para outra placa de 96 poços, contendo 72 µl de água deionizada estéril, e esta placa incubada a 95° C por 10 min. para lise das células. Após centrifugação a 4000 x g por 5 minutos foi retirado 10µl do sobrenadante e adicionado a 40µl 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/µl) e água deionizada estéril q.s.p 50 µl. O programa para amplificação dos insertos teve como base aquele descrito por Menossi *et al.*, (2000): 1 x 5 minutos a 94°C, seguidos de 30 x (94°C, por 30 segundos; 55°C por 30 segundos, 72°C por 2 minutos), seguida por uma extensão final de 7 minutos a 72°C e 5 minutos a 4 °C.

As reações de PCR foram realizadas em um aparelho termociclador “*Mastercycler Gradient*” (*Eppendorf*), em placas de PCR 96 *wells* seladas com adesivo laminado para evitar evaporação. Cerca de quatro amplificações PCR de cada clone foram realizadas.

A avaliação da qualidade dos produtos de PCR foi feita por eletroforese em gel de agarose 1%, em tampão TAE 1X (Tris-acetato 0,04 M, EDTA 0,001 M) contendo brometo de

¹ Meio LB: 5 g/l de extrato de levedura, 10 g/l de triptona e 5 g/l de NaCl ph 7,2.

etídio (10mg / ml) a 80 V, durante 15 a 30 min. A visualização das bandas foi realizada utilizando transluminador UV e os géis foram fotografados.

5.6.3 Purificação dos produtos de PCR

Para eficiente fixação dos insertos de cDNA amplificados tanto nas lâminas de vidro foi necessária a remoção de nucleotídeos não incorporados e *primers* da reação de PCR (Hedge *et al.* 2000) assim como os sais da reação de PCR. Isso foi conseguido por precipitação do DNA amplificado com etanol gelado.

Os produtos de PCR (50 µl) foram transferidos para placas de cultivo com fundo em “V” e foram adicionados 10 µl de acetato de sódio 3M pH 4,8 em cada poço de uma placa de 96 poços. Em seguida, os produtos de duas PCR foram agrupados, totalizando 100 µl, que foram transferidos para esta mesma placa. Após a adição de 100 µl de etanol absoluto, as placas foram incubadas por 16 horas (*overnight*) a -20°C . Após este tempo, as placas foram centrifugadas a $4000 \times g$ por 60 min a 4°C . O sobrenadante foi desprezado e o *pellet* foi lavado em etanol 70%. Finalmente o *pellet* de DNA foi ressuspensão em 50 µl de água deionizada autoclavada.

Uma alíquota de 5 µl destes produtos foi eletroforizada em gel de agarose 1% contendo brometo de etídeo, os quais foram visualizados em transluminador UV e fotografados.

As placas foram secas em forno a 42°C e adicionou-se 27 µl de solução de *espotagem* (dimetil sulfóxido DMSO 50%) por poço da placa. Em seguida, estas placas foram levadas ao freezer -20°C e os produtos foram congelados e descongelados por 3 vezes para uma melhor dissolução dos cDNAs. Os clones foram transferidos para as placas 384 *wells* Genetix do robô Gen-III Amersham Molecular Dynamics, e estocadas a 4°C até a deposição dos produtos de PCR em lâminas de vidro.

5.6.4 Confeção das lâminas de microarrays

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 poços (*Genetix*). Por meio de um robô *Array Spotter III* (*Amersham Molecular Dynamics*) as amostras foram depositadas por um conjunto de 12 canetas que deposita um volume de 0,9 nl da amostra baseada na ação de capilaridade em superfície de lâminas de vidro (*Corning*® - *UltraGaps 40015*). Após a deposição de cada conjunto de amostras as canetas foram lavadas automaticamente em uma estação de lavagem que utiliza sucessivamente água purificada (18 megohm/cm), etanol absoluto (*Merck*), solução 0,2 M de KOH e água novamente. As canetas foram secas com nitrogênio 5.0 analítico antes das próximas amostras serem carregadas. A câmara de deposição das amostras em lâminas do robô *Array Spotter III* possui temperatura e umidade controladas. A umidade relativa de deposição das amostras foi de $\approx 55\%$ e a temperatura foi de $\approx 25^\circ\text{C}$. Este robô está instalado numa sala especial com ar limpo (sala limpa classe 100.000).

Após a deposição e secagem de todas as amostras nas lâminas, o DNA foi fixado por “*cross-linking*” por meio de irradiação ultravioleta a 500 mJ de energia (*Hoefer UV Crosslinker*).

5.7 Delineamento das hibridações em microarrays

Uma escolha chave em um projeto que envolve a tecnologia de microarray é utilizar comparações que podem ser diretas ou indiretas isto é, estabelecer comparações dentro 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 6). Mas, 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 a pergunta do trabalho.

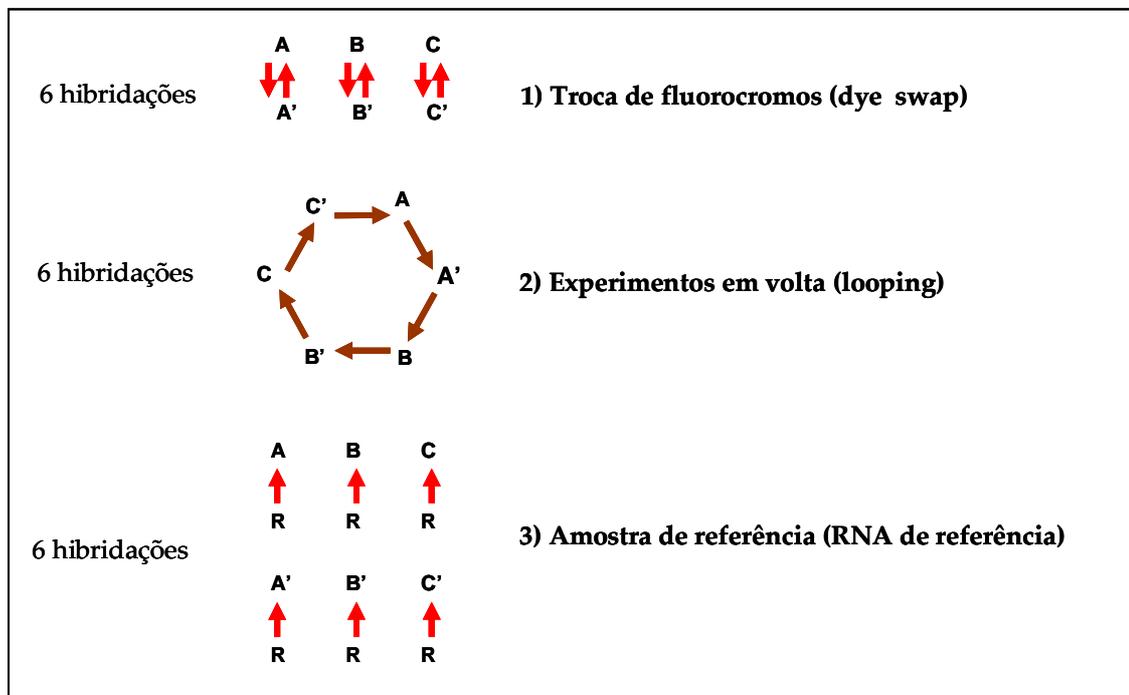


Figura 6. Esquema dos principais tipos de delineamento experimental para microarrays. A, B e C - amostras controle; A', B' e C' - amostras teste; R – pool de RNA de referência.

O pool de RNA humano foi preparado de linhagens celulares e o pool de RNA murino foi preparado de timos de camundongos C57BL/6 adultos jovens. Para fornecer a cobertura ótima dos genes depositados na lâmina, o pool equimolar de RNAs humanos foi constituído de diferentes linhagens celulares oriundas de astrocitoma cerebral, carcinoma de colo de útero (linhagem HeLa), linhagem tumoral de laringe (Hep-2) e a linhagem linfocítica Jurkat, e no caso do pool de RNA murino preparamos uma mistura “equimolar” de RNA total de timos. Nos experimentos com microarrays do presente trabalho adotou-se a estratégia do *RNA de referência* ao invés do *dye-swap*, pois para realizar os experimentos com troca de corantes seria necessário marcar a mesma amostra de RNA com os dois corantes (Cy3 e Cy5). Porém, tal abordagem passa a ser inviável, pois a quantidade de RNA seria insuficiente para a

repetição das hibridações. Além disso, o corante Cy5 apresenta incorporação ineficiente em relação ao Cy3. O sistema monocolor adotado (Cy3) para marcar as amostras teste elimina o problema da incorporação desigual dos corantes. O corante Cy5 foi utilizado para marcar somente o pool de referência.

Como neste trabalho escolheu-se o uso de RNA de referência, segue algumas considerações:

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 através 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.

Preparar o pool de RNA com um vasto número de linhagens celulares pode não melhorar necessariamente a representatividade total dos genes depositados no *array*, pois algumas linhagens celulares expressam significativamente mais genes do que outras e, nem todas as linhagens expressam todos os genes em níveis semelhantes. Misturar RNA de muitas linhagens celulares pode diluir os transcritos raros de modo que a sua representação no pool de RNA corre o risco de ficar abaixo do limite detectável (Yang *et al.* 2002).

O uso de 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, como já foi dito, evitando as diferenças de incorporação.

O delineamento das hibridações de *microarrays* consistiu em marcar todas as amostras de células tronco mesenquimais e células diferenciadas em diferentes condições com fluorocromo Cy3 e combiná-los numa mesma lâmina com amostras de RNA (cDNA) de referência marcados com Cy5.

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

5.8 Marcação das sondas complexas de cDNA com fluorocromos Cy3 e Cy5

Amostras de RNA foram copiadas em cDNA por transcrição reversa e marcadas utilizando o Kit *CyScribe Post-Labeling* (GE Healthcare - Buckinghamshire, UK) que envolve a preparação e adequação 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 RNAm e purificação do cDNA para remoção de nucleotídeos livres e oligômeros (figura 6). 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 (Figura 7)

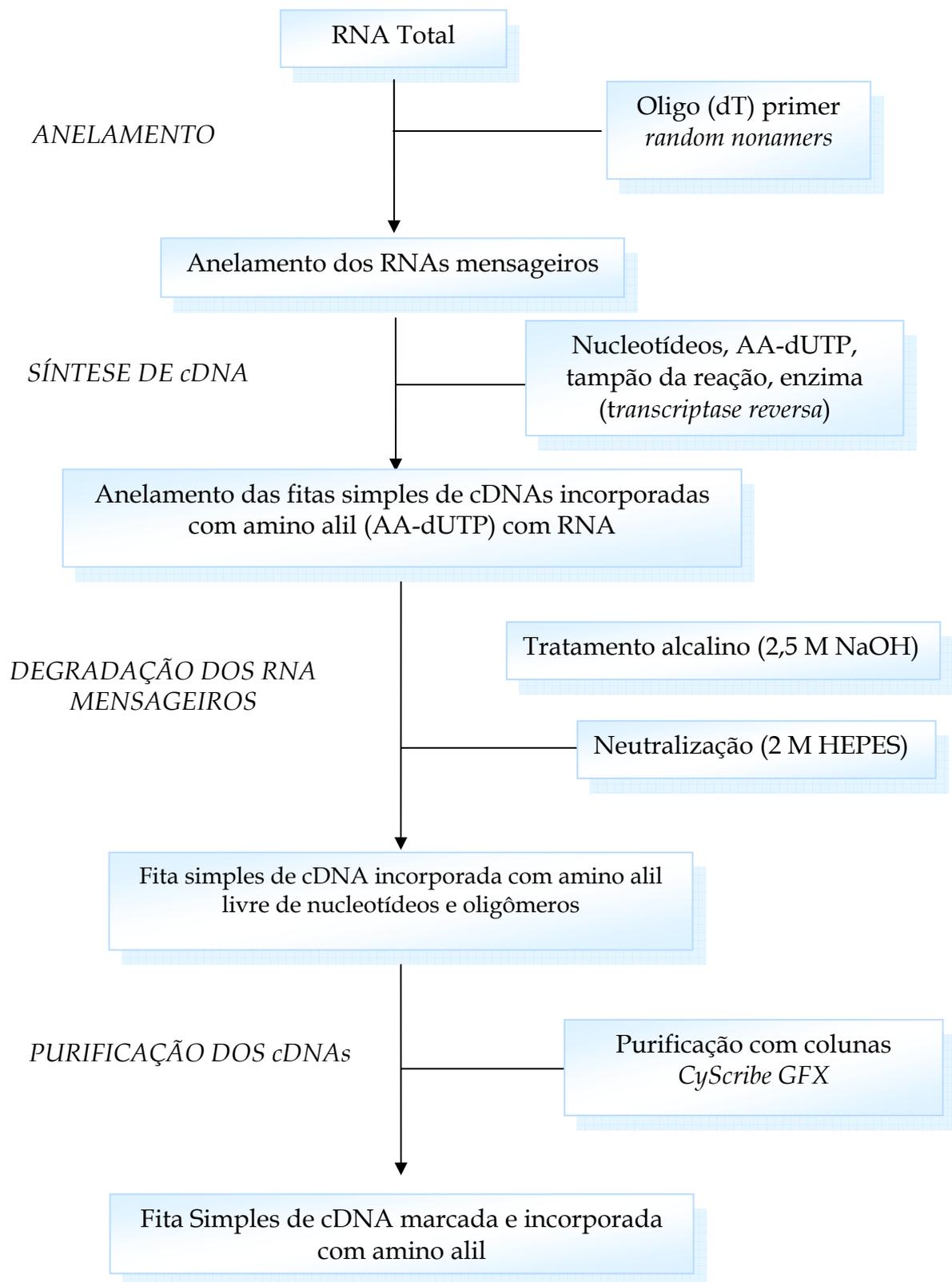


Figura 7. (continua à página seguinte)

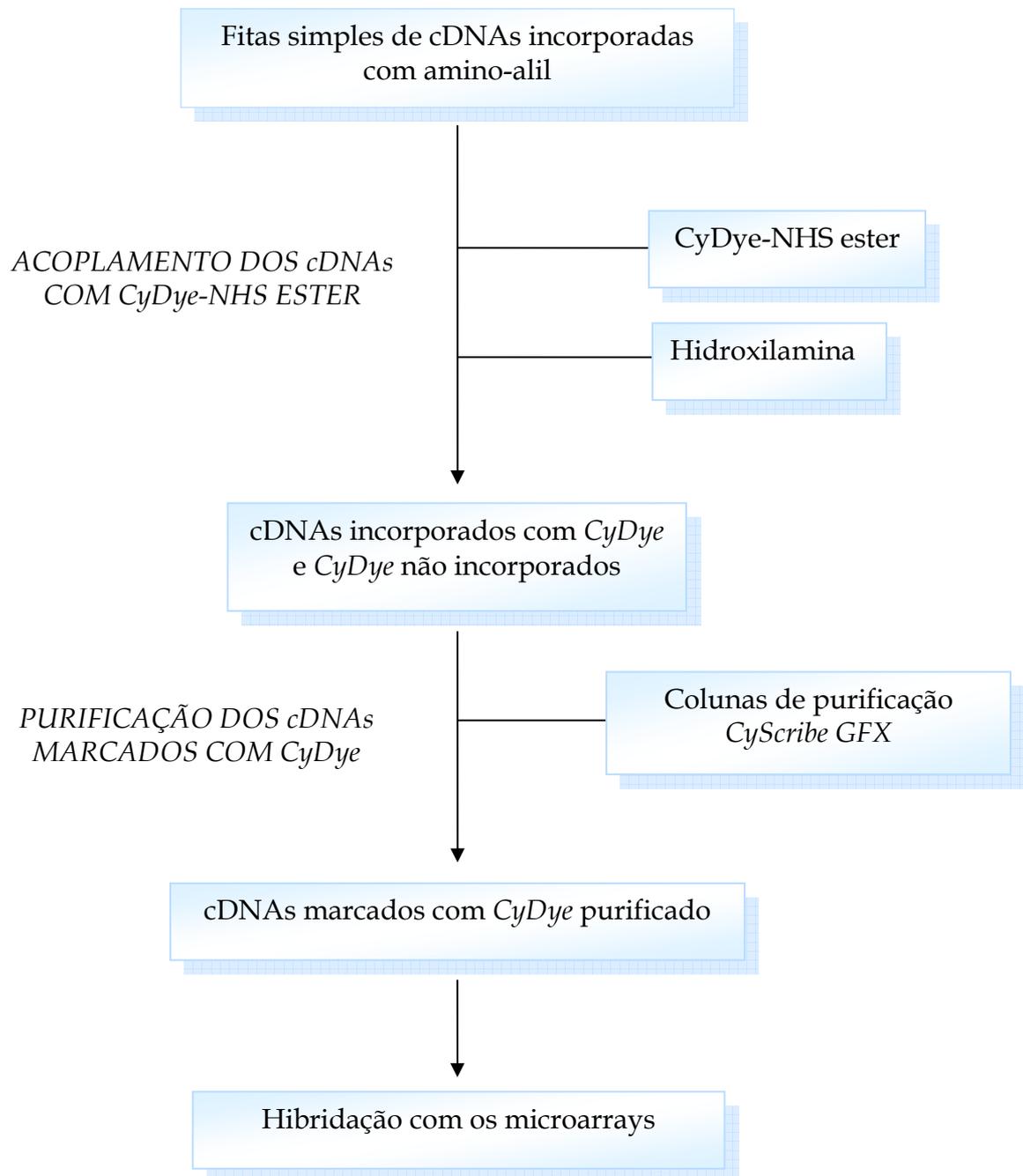


Figura 7. Preparação do cDNA marcado com CyDye utilizando os reagentes do kit “CyScribe Post Labelling” (GE Healthcare).

5.8.1 Preparação da primeira fita de cDNA por incorporação de AAdUTP

Em um tubo *Eppendorf* de 1,5 µl imerso em gelo picado foram adicionados 10 µg de RNA total, 1 µl de *primers* randômicos, 3 µl de oligo (dT) e 0,5 µl de controle denominado “*spike mix*” para o *Universal ScoreCard* em um volume total de 11 µl (Proporção de 2 µl de *spike mix* para cada 1 µg de RNA marcado). A reação foi cuidadosamente montada 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*, 2 µl de DDT 0,1 M, 1µl de nucleotídeo “*mix*”, 1µl de AA-dUTP (a quantidade de um tubo contendo AA-dUTP liofilizado foi ressuspenso em 30 µl de água livre de nucleases e mantido a -20°C por no máximo 30 dias), 1 µl de transcriptase reversa *CyScript*, em um volume final de reação de 20 µl. A reação foi incubada a 42°C por 1,5 hora. Procedemos à degradação do RNAm adicionando 2 µl de NaOH 2.5 M com incubação a 37°C durante 15 min, posteriormente foi adicionado 20 µl de HEPES 2M.

5.8.2 Purificação do cDNA 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 aminoalil não purificado foi adicionado à coluna e misturado 5 vezes. A centrifugação foi feita a 13.800 x g 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 600 µl de etanol 80%. A centrifugação foi feita a 13.800 x g por 30 seg. 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 seg. 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.

5.8.3 Incorporação de Cy3 e Cy5

A amostra de cDNA marcada com aminoalil purificado foi adicionada a um tubo com a alíquota de *CyDye* NHS éster e ressuspensa várias vezes. O material foi centrifugado a 13800 xg por 1 min e incubado, no escuro, durante 1 hora. Posteriormente, foi adicionado 15 µl de hidroxilamina 4M seguida de incubação no escuro, durante 15 min a temperatura ambiente.

5.8.4 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.

5.8.5 Quantificação do CyDye incorporado no cDNA

Após a purificação foi feita a monitoração de incorporação dos fluorocromos por meio de leitura em espectrômetro (*Ultrospec 2100, GE Healthcare*) em comprimento de onda a 550 nm para Cy3 e 650 nm para o Cy5 usando amostras diluídas 100X. A quantidade de Cy3 ou Cy5 incorporados no cDNA pode ser calculada através do 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 pela fórmula: $(A)/E \times Z \times \text{fator de diluição} \times 10^{12}$, onde:

A= absorbância 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 concentrada no aparelho “Speed Vacuum”. A seguir o cDNA foi dissolvido em 6 μl de água livre de nuclease e desnaturado a 95°C por 2 min. A solução foi imediatamente resfriada no gelo por 30 seg. A essa reação adicionamos 1,5 μl de A_{80} (1mg/ml) e incubamos a 75 °C por 45 min, estando assim pronta para o processo de hibridação.

5.9 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 independentes (12 lâminas por vez). 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 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 a 42°C, e novamente lavagem com isopropanol. Após as lavagens as lâminas foram aquecidas a 60°C para secagem. As lâminas estavam prontas para serem “lidas” em aparelho “scanner” a laser.

5.10 Aquisição de imagens de microarrays

As lâminas foram lidas num aparelho Generation III “Array Scanner” (Amersham Biosciences) com lasers de 532 nm para o Cy3 (verde) e 633 nm para o Cy5 (vermelho). A leitura da lâmina gera dois arquivos com imagens separadas com os pontos em preto para os dois canais (Cy3 e Cy5) e uma terceira imagem, agora colorida, sobrepondo Cy3 e Cy5 visualizadas usando o software ImageQuant (Amersham).

5.11 Quantificação e normalização dos dados de microarrays

A análise das imagens seguiu 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 o pacote AROMA (<http://www.maths.lth.se/help/R/aroma/>), 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. Na figura 8, observamos o fluxograma da “pipeline” desenvolvida para análise dos dados.

Utilizando o pacote LIMMA (Linear Models for Microarray Data) (Smith, 2004) foi aplicado o método Bayesiano empírico para análise estatística da expressão diferencial.

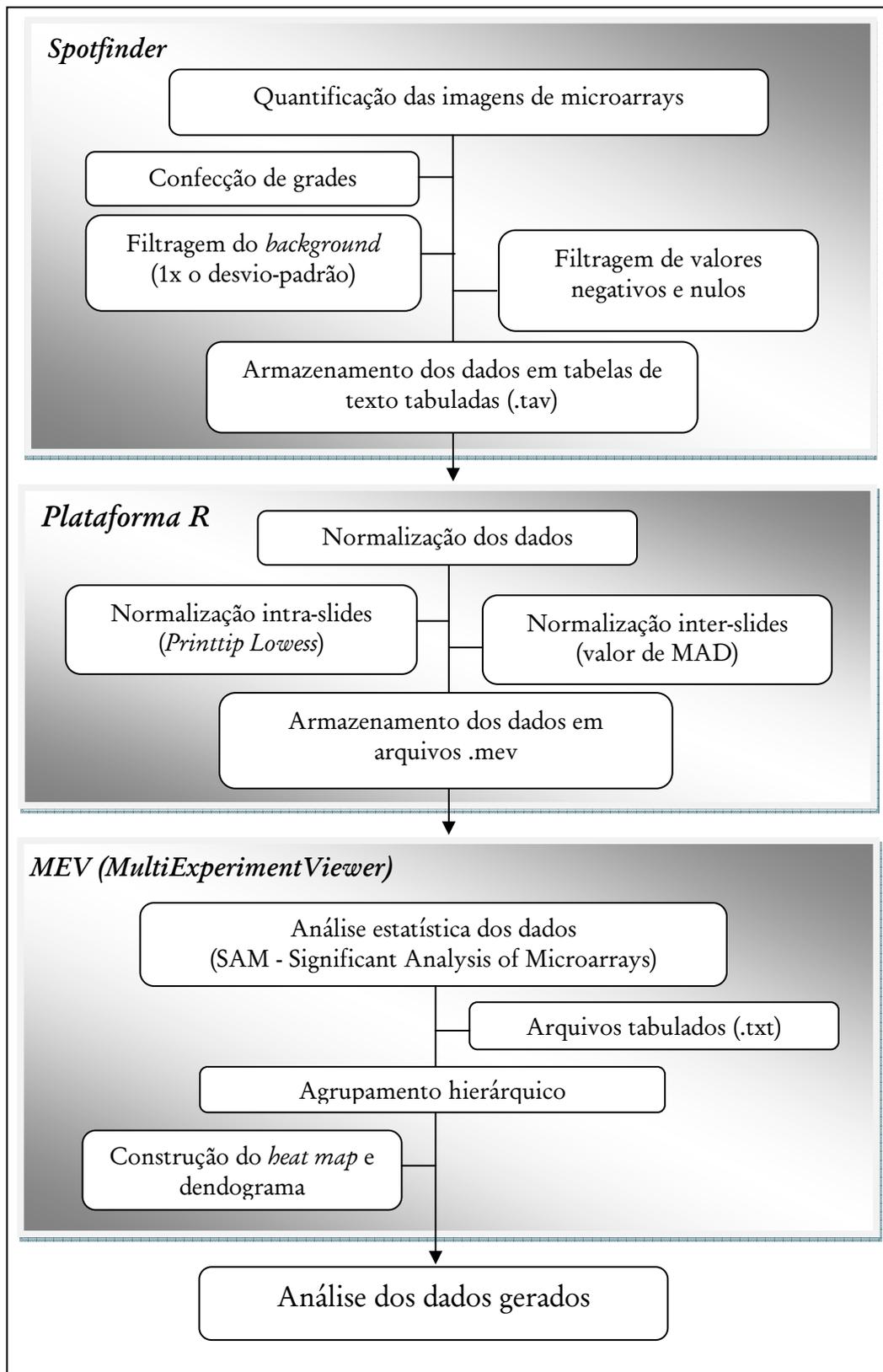


Figura 8. “Pipeline” utilizado na análise de dados de *microarrays* em lâminas de vidro.

5.12 Análise bioinformática dos dados de microarrays

5.12.1 Agrupamento hierárquico

A plataforma R irá gerar arquivos de extensão (.TAV), (.MOD) e (.MEV) que serão utilizados no programa TIGR MEV (The Institute for Genomic Research MultiExperiment Viewer) (<http://www.tm4.org/mev.html>) que inclui o programa SAM (Significance Analysis of Microarrays) (Tusher et al, 2001) utilizado para a detecção dos genes diferencialmente expressos (Smyth, 2004). O programa TIGR MEV gera um *heat map* (mapa de cores relacionado com o nível de expressão dos genes) para os valores. O *heat map* é composto por um código de cores a fim de facilitar a associação visual dos níveis de expressão gênica.

O programa SAM representa uma evolução dos softwares de análise estatística para a tecnologia de microarrays e encontra-se disponível no endereço (<http://www-stat.stanford.edu/~tibs/SAM/>). A análise baseia-se em uma série de testes-t específicos para cada gene, que são adaptados para a detecção da expressão gênica diferencial em larga escala. A partir da observação de que as flutuações casuais são específicas para cada gene, o teste SAM é baseado na razão entre a diferença das médias das situações, como por exemplo, CTMs controles (X_c) e CTMs diferenciadas (X_p), e o desvio padrão de cada gene, calculados a partir de repetição experimental. A diferença relativa $d(i)$ na expressão gênica é então definida pela equação 1:

$$[\text{EQUAÇÃO}] \quad d(i) = \frac{X_p(i) - X_c(i)}{S(i) + S_0}$$

$$\left\{ \begin{array}{l} d(i) = \text{diferença relativa} \\ X_p(i) = \text{níveis médios da expressão dos genes} \\ \quad \text{no timo} \\ X_c(i) = \text{níveis médios da expressão dos genes} \\ \quad \text{no pool de órgãos} \\ S(i) = \text{desvio padrão de medidas repetidas de} \\ \quad \text{expressão} \\ S_0 = \text{constante positiva} \end{array} \right.$$

onde $X_p(i)$ e $X_c(i)$ são definidos como níveis médios da expressão do gene nos estados p (timo) e c (pool de órgãos), respectivamente. A dispersão gene-específica $S(i)$ é o desvio

padrão de medidas repetidas de expressão, e a constante positiva S_0 no denominador da equação acima, servem para certificação de que a variância de $d(i)$ é independente da expressão gênica. Para a determinação de genes com mudanças significativas na expressão, utilizou-se um gráfico de dispersão $d(i)$, em relação à diferença relativa esperada $d_E(i)$. Para uma grande maioria de genes $d(i) \cong d_E(i)$, mas alguns genes são representados por pontos distantes da linha $d(i) \cong d_E(i)$. As alterações das expressões dos genes que se encontram a uma distância maior do que o limiar (Δ) é então considerado significativo.

O limiar (Δ) determina dois cortes, ou seja, o menor valor de $d(i)$ indica que o gene seja considerado significativamente induzido (hiperexpresso), e o valor menos negativo de $d(i)$ indica que o gene está significativamente reprimido (hipoexpresso).

A porcentagem de genes identificados por mudanças aleatórias é chamada de Frequência de Descobertas Falsas (FDR), um método inicialmente idealizado por Benjamini & Hochberg (1995) e definido como a proporção esperada de rejeições falsas. O cálculo de FDR e o número de genes com mudanças significativas estão intimamente relacionados com o limiar Δ . À medida que o valor de Δ diminui, o número de genes significativamente alterados aumenta à custa de um aumento de um FDR. Essa determinação do nível de significância pelo limiar providencia cortes assimétricos para genes induzidos e genes reprimidos. Essa assimetria é desejável, posto que os genes induzidos e genes reprimidos podem se comportar de maneira diferente em alguns experimentos. Ao utilizar o SAM, o usuário pode escolher o limiar Δ mais conveniente com base no nível de significância estimado pelo FDR e no número de genes com os quais se pretende trabalhar.

O programa SAM estabelece automaticamente uma ligação entre o número de acesso das seqüências utilizadas com as páginas de informações sobre o clone em questão, situados no banco de dados S.O.U.R.C.E. (“*Stanford Online Universal Resource for Clones and ESTs*”) (<http://source.stanford.edu/cgi-bin/source/sourceSearch>). O S.O.U.R.C.E. compila

informações de vários bancos de dados públicos (*UniGene, dbEST, Swiss-Prot, GeneMap99, RHdb, GeneCards e LocusLink*) e as disponibilizam de maneira a facilitar a identificação dos genes diferencialmente expressos.

O programa SAM permite ainda o agrupamento hierárquico, porém, o mais importante na elaboração deste agrupamento é a decisão sobre qual medida de similaridade será adotada, a necessidade de se transformar a escala dos valores de expressão (normalmente transformada em escala logarítmica) e a dependência dos genes entre si. O agrupamento hierárquico nos permite a definição de grupos de genes com o mesmo padrão de expressão, seja ele de indução ou de repressão.

Todas as informações citadas acima foram retiradas do trabalho de Tusher *et al.* 2001, do manual do software SAM e de relatórios técnicos publicados na página de Robert Tibshirani (<http://www-stat.stanford.edu/~tibs/SAM>).

5.12.2 Nomenclatura dos genes

Neste trabalho, optou-se por seguir a nomenclatura usual para os genes de camundongos, ou seja, o símbolo do gene em inglês com a primeira letra maiúscula e as seguintes minúsculas e para os genes humanos, o símbolo do gene em inglês com todas as letras em maiúsculo. Os nomes dos genes estão em inglês, pois toda a literatura e os bancos de dados internacionais como Source, GenBank etc. estão neste idioma. Além disso, todos os arquivos da biblioteca de cDNA estão em inglês.

5.12.3 Gene Network

O programa escolhido para a inferência de redes gênicas foi o GeneNetwork por ser aquele que melhor se aplica aos nossos conjuntos de dados. O GeneNetwork é um software

livre e encontra-se disponível aos usuários no site: <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 da inferência por engenharia reversa através do “Modeling controller” para gerar a matriz gênica regulatória que descreve como os genes se regulam; (4) extrair automaticamente a rede para a visualização, baseada na matriz regulatória; (5) comparar a rede intuitiva inferida com as bases de dados on-line tais como KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/>), baseado na informação do GraphViewer Network e do Information Viewer; e (6) a revisão dos conjuntos de experiências propostos e geração da hipótese (Wu et al., 2004).

Para facilitar a interpretação dos grafos gerados pelo programa GeneNetwork um dos alunos de mestrado do nosso laboratório, Guilherme Silva Liberato desenvolveu o programa Mandala, ainda não publicado. Seu algoritmo, escrito em linguagem de programação C, decodifica a matriz regulatória proveniente do GeneNetwork, desvendando as interações gênicas existentes sem que seja necessário analisar o grafo correspondente à rede. O resultado é apresentado em formato textual.

5.12.4 Cytoscape

O cytoscape é uma plataforma de software para visualização e análise de redes de interação molecular e caminhos biológicos, além de integração dessas redes com anotações, perfis de expressão gênica e dados de outra fonte (<http://www.cytoscape.org/>). (SHANNON, 2003)

O plug-in MCODE (Molecular Complex Detection) é responsável por encontrar clusters (regiões altamente conectadas) em uma rede pré-estabelecida. O algoritmo MCODE opera em três estágios, valor do vértice (nó gênico), predição complexa e, opcionalmente, pós-processamento para filtrar ou adicionar genes nos complexos resultantes determinadas por critérios de conectividade.

Para encontrar localmente regiões densas de um gráfico, o MCODE usa um valor de vértice com base no coeficiente de *clustering*, C_i , que agrupa medidas da região de um vértice. $C_i = 2n/k_i(k_i-1)$ onde k_i é o tamanho do vértice do grupo, i e n é o número de arestas. Não existe nenhuma definição de teoria dos grafos de densidade, mas as definições são normalmente com base no nível de conectividade. Densidade de um grafo, $G = (V, E)$, com o número de vértices, $|V|$, e número de arestas, $|E|$, é aqui definida como $|E|$ dividido pelo número máximo de arestas possíveis para o gráfico, $|E|_{max}$. Para obter um gráfico com loops (uma aresta conectando com o vértice de origem), $|E|_{max} = |V|(|V| + 1) / 2$ e para um gráfico sem alças, $|E|_{max} = |V|(|V| - 1) / 2$. Assim, a densidade de G , é, portanto, um número real variando 0,0-1,0. (BADER and HOGUE, 2003).

5.13 Confirmação dos dados de microarrays por PCR em tempo real

As análises por PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR) 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 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 de 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 $E=10(-1/\text{Slope})-1$ (*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 20 μl , contendo 0,8 μl de cada primer, 1X solução de SYBR Green e 1 μl de cDNA sintetizado a partir de uma quantidade padronizada de RNA total (2 μg de RNA).

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

Tabela III – Primers Utilizados nas reações de qRT- PCR

Símbolo do gene	Primer	Sequências	Amplicon (pb)	Tm
FN1	Forward	5'-AAAATGGCCAGATGATGAGC-3'	121	60°C
	Reverse	5'-TGCCACTGTTCTCCTACGTG-3'		
Fn1	Forward	5'-GGAACGTGTCGTTTCACATTG-3'	118	60°C
	Reverse	5'-ATGATGAGGTGCACGTGTGT-3'		
PPP1R11	Forward	5'-CTTCCTCCTCTCCTCCCTGT-3'	123	60°C
	Reverse	5'-ATGGTAAGGCTCCGGTTCTC-3'		
Ppp1r11	Forward	5'-GCCCCGAGGCTTCTCATAAAT-3'	108	60°C
	Reverse	5'-GAAACGCAAGCCAGAGAAGA-3'		
UQCRC2	Forward	5'-AGCCATGTTTTCCCTTGTTG-3'	117	60°C
	Reverse	5'-TTGCTGCGTCTTACATCCAG-3'		
Uqrc2	Forward	5'-ACCACCAACTGCTTCAATCC-3'	105	60°C
	Reverse	5'-TCCAACAACCTGGGAACCTC-3'		
GAPDH	Forward	5'-CTCTGCTCCTCCTGTTTCGAC-3'	112	60°C
	Reverse	5'-ACGACCAAATCCGTTGACTC-3'		
Gapdh	Forward	5'-GGGTGTGAACCACGAGAAAT-3'	142	60°C
	Reverse	5'-CCTTCCACAATGCCAAAGTT-3'		

Maiúsculas = gene humano, minúsculas = gene murino.

5.13.1 Análise estatística dos dados de qRT-PCR

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 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 Caracterização do potencial osteogênico das células tronco mesenquimais

6.1.1 Proliferação celular

As células tronco mesenquimais humanas e murinas, quando cultivadas em meio essencial mínimo (controle) a proliferação apresentou-se contínua até os 14 dias em células humanas e 7 dias em células murinas. Após este período observou-se redução da proliferação em ambas as culturas (controle e diferenciadas). Quando em contato com o meio indutor da diferenciação osteoblástica (α -MEM osteogênico), observou-se que a proliferação foi um pouco menor quando comparado ao grupo controle (Figura 9).

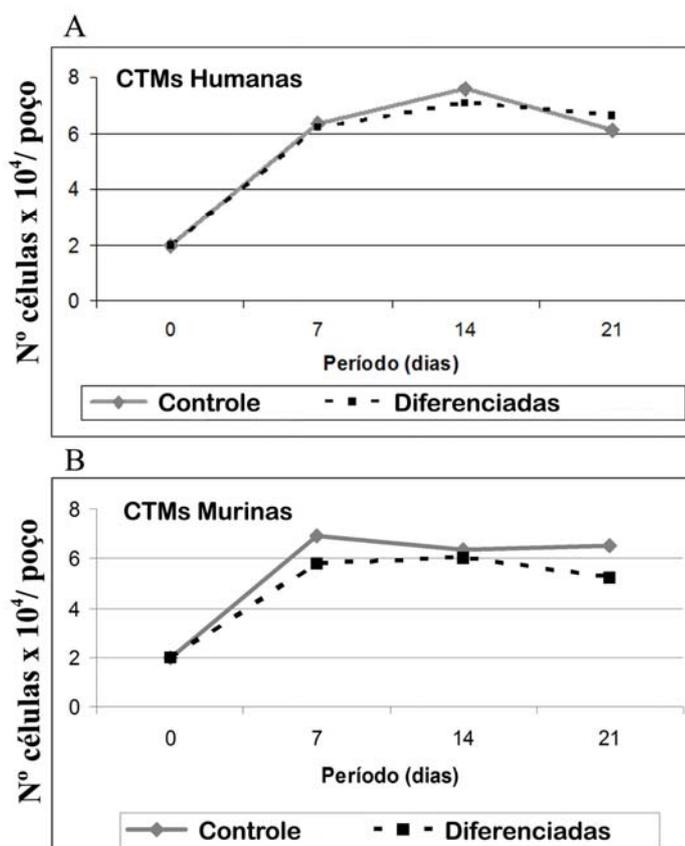


Figura 9. Proliferação de CTMs (controle) e cultivadas em meio indutor da osteogênese (A = humanas e B = murinas) após 7, 14 e 21 dias. Os resultados estão representados com média \pm desvio padrão (n = 5).

6.1.2 Viabilidade das Células

As células tronco mesenquimais humanas e murinas, quando avaliadas na presença e na ausência de meio α -MEM osteogênico mostraram viabilidade acima de 80%. Exceção da cultura de células murinas em meio indutor quando avaliada aos 21 dias, cuja taxa de viabilidade foi de 75%. O grupo de células humanas e murinas diferenciadas no período de 21 dias apresentaram viabilidade menor do que o grupo de células controle. (Figura 10).

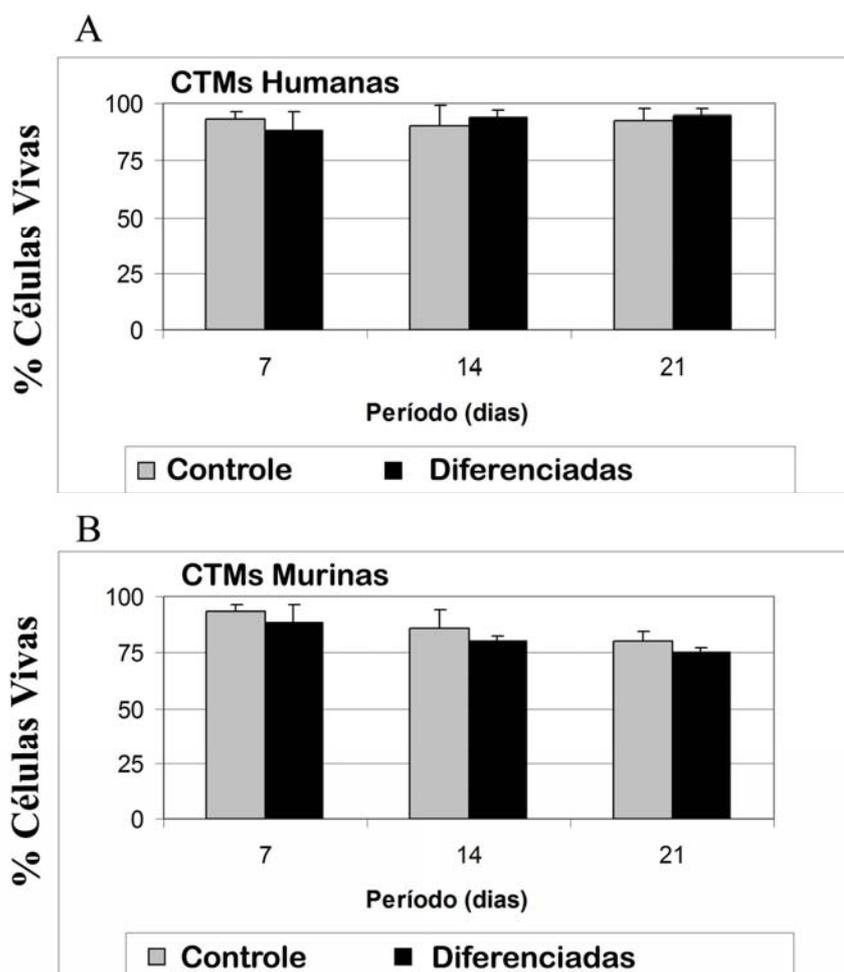


Figura 10. Viabilidade celular após 7, 14 e 21 dias em meio de diferenciação com e sem a adição de meio osteogênico. A= Células humanas e B = murinas. Os resultados estão representados como média \pm desvio padrão (n = 5).

6.1.3 Conteúdo de proteínas totais

As células tronco humanas e murinas cultivadas em meio mínimo tiveram um decréscimo no conteúdo de proteínas totais. Entretanto, quando cultivadas em meio indutor tiveram um aumento gradativo em células humanas e um aumento significativo em células murinas durante o mesmo período de tempo analisado. (Figura 11).

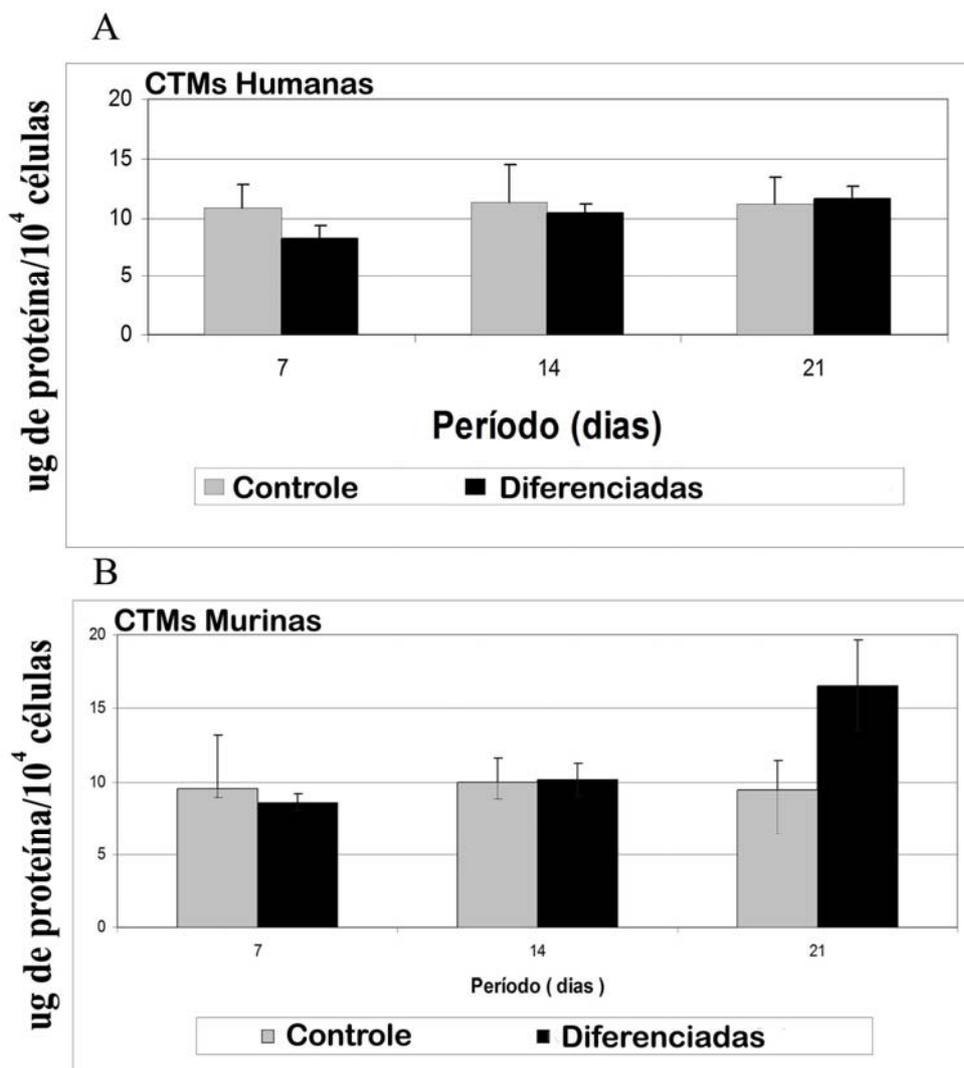


Figura 11. Determinação de proteínas totais após 7, 14 e 21 dias de cultura de células-tronco mesenquimais humanas (A) e murinas (B) em meio de indução osteogênica ou controle. O conteúdo de proteínas totais é expresso em μg de proteína/ 10^4 células. Os resultados estão representados como média \pm desvio padrão ($n = 5$).

6.1.4 Atividade de fosfatase alcalina

As células tronco mesenquimais humanas ou murinas quando cultivadas em meio α -MEM osteogênico mostraram aumento da atividade de fosfatase alcalina quando comparadas às células cultivadas em meio α -MEM (controle). Observamos que a cultura de células murinas apresentou atividade maior do que a cultura de células humanas. Todas as comparações foram estatisticamente significantes (Figura 12).

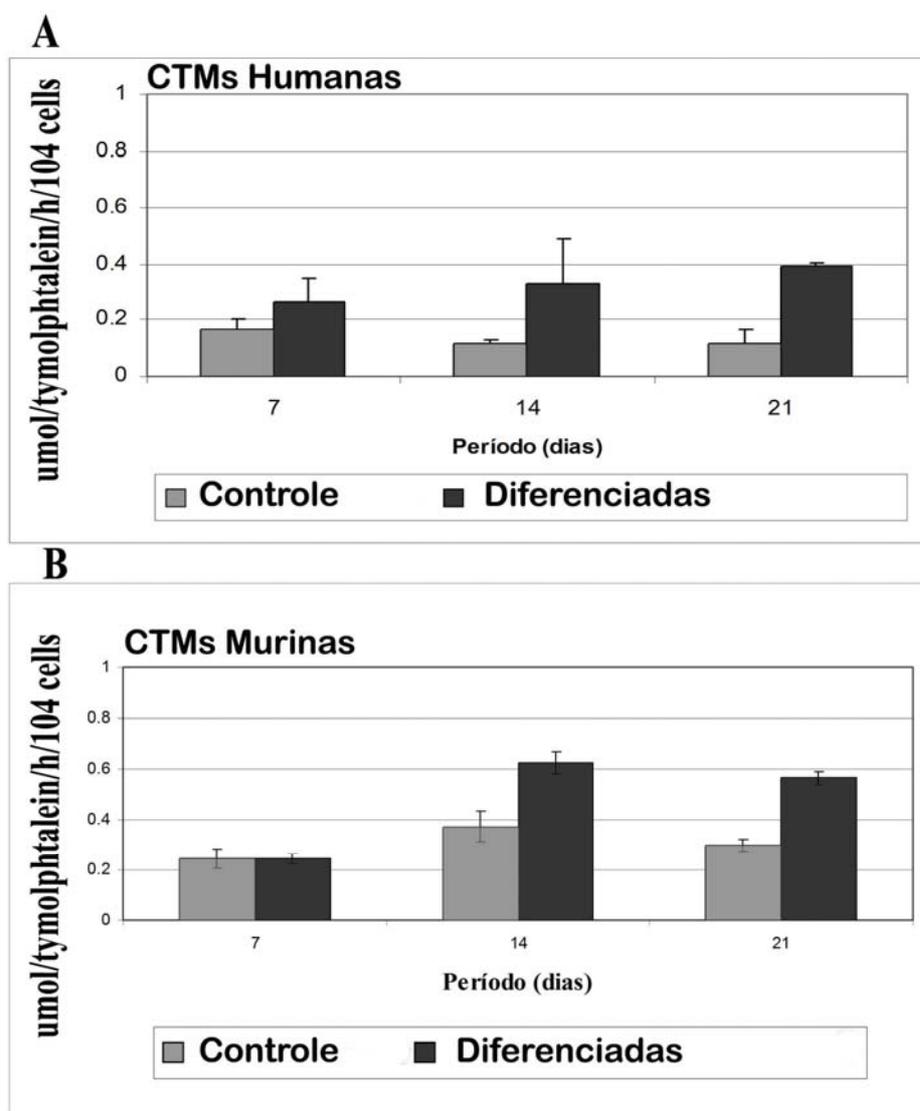


Figura 12. Atividade de fosfatase alcalina após 7, 14 e 21 dias de cultura de células-tronco mesenquimais humanas (A) e murinas (B) em meio de indução osteogênica ou controle. A atividade de fosfatase alcalina é expressa como μmol timolftaleína/h/10⁴ células. Os resultados estão representados como média \pm desvio padrão (n = 5).

6.1.5 Formação de matriz mineralizada

Culturas de células-tronco mesenquimais humanas ou murinas durante 21 dias em meio α -MEM osteogênico exibem a formação de nódulos de mineralização (Figura 13).

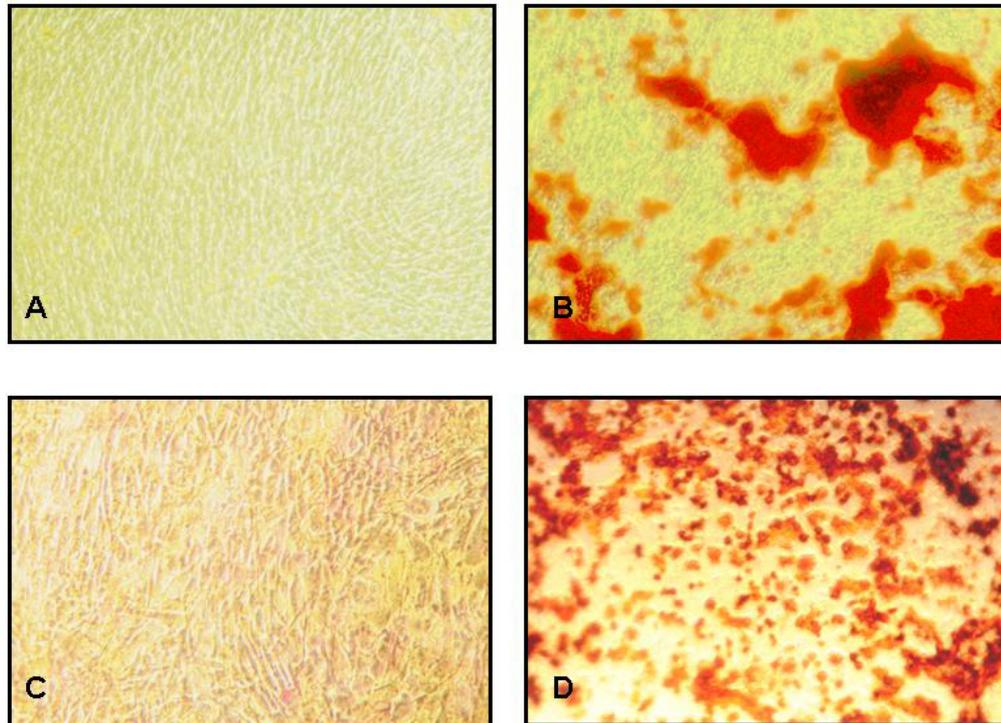


Figura 13. Células tronco mesenquimais humanas e murinas cultivadas em meio de cultura sem indução osteogênica (A e C) respectivamente e CTMs humanas e murinas cultivadas em α -MEM osteogênico apresentaram depósito de matriz óssea como observado aos 21 dias (B e D). Coloração por vermelho de Alizarina.

6.1.6 Avaliação imunocitoquímica do citoesqueleto e da presença de osteopontina (OPN)

A avaliação da morfologia das CTMs quando cultivadas em meio α -MEM revelou que o citoesqueleto é preferencialmente alongado, enquanto que as células quando cultivadas em meio α -MEM osteogênico apresentam citoesqueleto em formato poligonal.

A imunolocalização da proteína não-colágena osteopontina (OPN) foi realizada, pois ela é um marcador da diferenciação osteoblástica. A osteopontina é uma glicoproteína secretada na matriz extracelular óssea. Ela liga-se ao cálcio e interage com o receptor de vitronectina, além de se ligar covalentemente a fibronectina. Nos ossos é sintetizada pelos osteoblastos e osteoclastos. À

expressão de osteopontina foi localizada na região perinuclear, sendo que as células cultivadas durante 7 dias em meio indutor de diferenciação possui conteúdo maior desta proteína quando comparadas às células cultivadas em meio controle α -MEM (Figura 14).

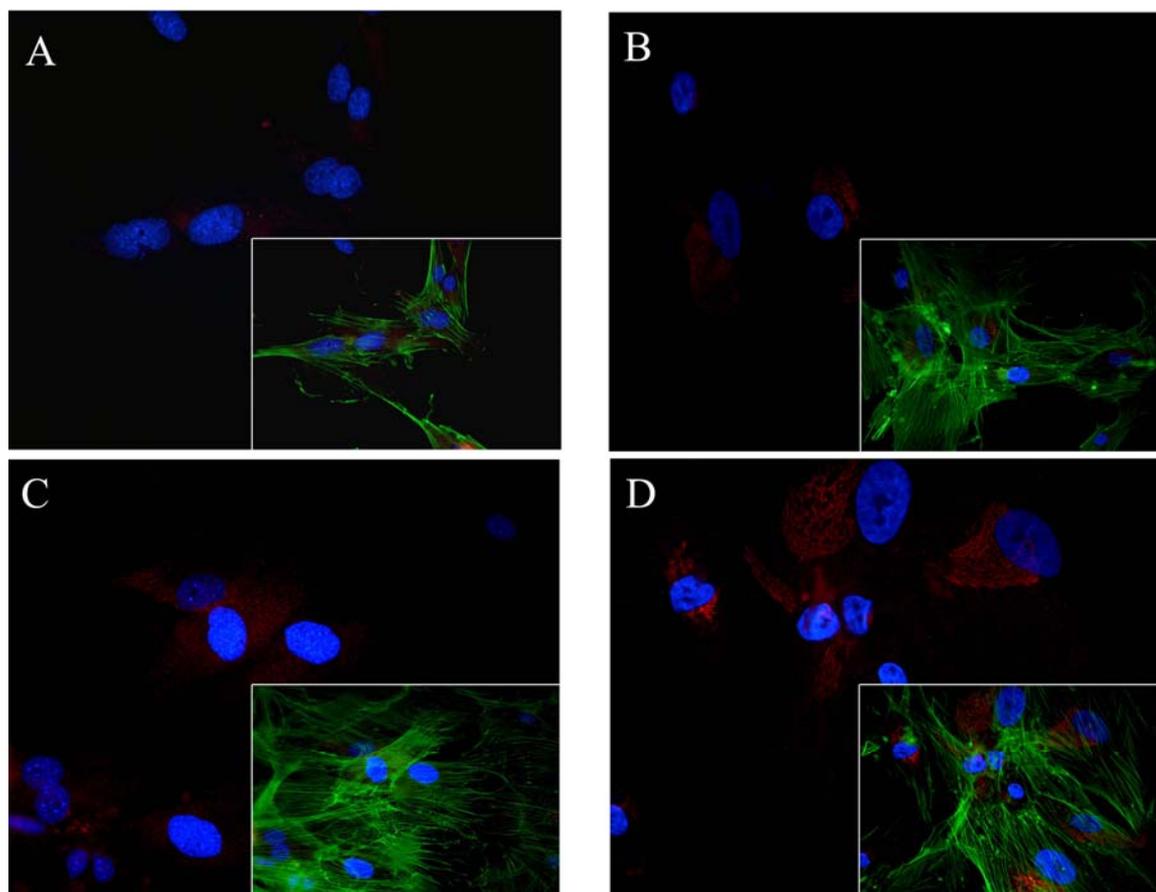


Figura 14. CTMs humanas e murinas cultivadas em meio de cultura sem indução osteogênica (A e B) respectivamente e CTMs humanas e murinas após 7 dias em cultura sob condição osteogênica (C e D). A marcação em vermelho revela a proteína osteopontina (OPN). Em verde (faloidina) evidencia-se o citoesqueleto e, em azul (DAPI) o núcleo celular. Microscópio de fluorescência; aumento de 40x.

6.2 Análise da expressão gênica transcricional

6.2.1 Avaliação da integridade das preparações de RNA total

As amostras de RNA total de células tronco mesenquimais humanas ou murinas, indiferenciadas ou diferenciadas foram submetidas à eletroforese em gel de

agarose 1% sob condições denaturantes. Utilizamos somente amostras que se apresentaram íntegras com relação às subunidades de RNAr 28S e 18S, e RNAt 4S, além de livres de proteínas ou de fenol, como avaliado por espectrofotometria UV (Figuras 15 e 16).

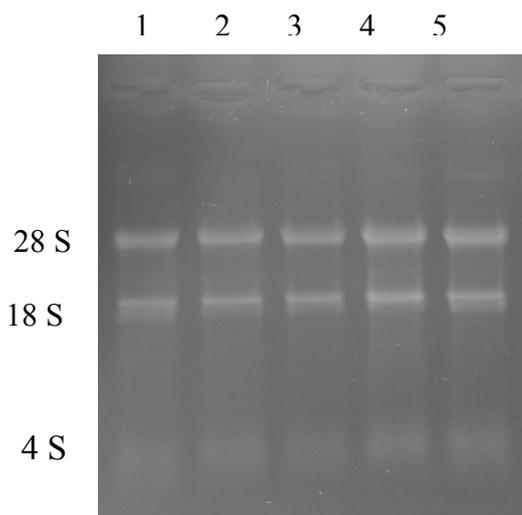


Figura 15. Eletroforese em gel de agarose de amostras de RNA total provenientes de células-tronco mesenquimais humanas nas diferentes situações: 1) CTMs (controle); 2)CTMs em meio α -MEM osteogênico por 24 horas; 3) CTMs em meio indutor por 48 horas; 4) CTMs em meio indutor por 7 dias; 5) CTMs em meio indutor por 21 dias.

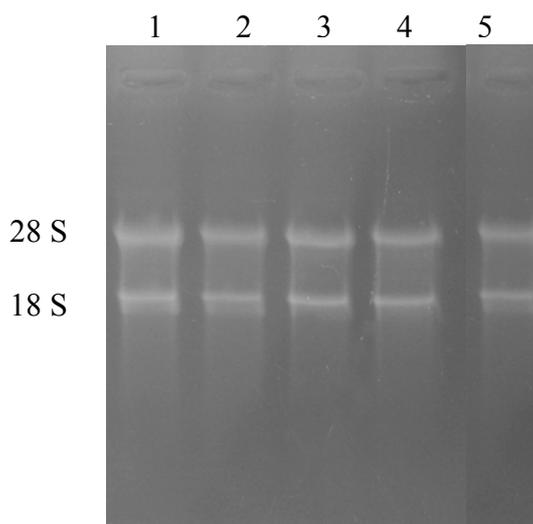


Figura 16. Eletroforese em gel de agarose de amostras de RNA total provenientes de células-tronco mesenquimais murinas nas diferentes situações: 1) CTMs (controle); 2)CTMs em meio indutor α -MEM osteogênico por 24 horas; 3) CTMs em meio indutor por 48 horas; 4) CTMs em meio indutor por 7 dias; 5) CTMs em meio indutor por 21 dias.

6.3 Avaliação da expressão de genes marcadores da osteogênese por RT-PCR semi-quantitativa

O objetivo deste ensaio foi o de avaliar a expressão de RNAm de genes importantes no processo de osteogênese durante os ensaios de diferenciação. As Figuras 17 e 18 mostram a evolução da expressão gênica ao longo da diferenciação de CTMs de células humanas e murinas, respectivamente.

Para avaliar a expressão dos transcritos dos genes marcadores da osteogênese humanos ALPL, COL1A1, SPP1, RUNX2, BGLAP e os genes murinos, Akp2, Colla1, Spp1, Runx2, Bglap2 foram realizadas RT-PCRs semi-quantitativas. Os genes GAPDH para humano e β -actina para murino foram escolhidos como padrão de expressão constitutiva.

É possível observar que as expressões dos genes humanos RUNX2, ALPL, SPP1 e BGLAP foram mais altas nas CTMs diferenciadas comparando-se com as CTMs controle evidenciando o comprometimento das células com a linhagem osteogênica (Figura 17). As expressões dos genes murinos, Colla1, Akp2, Spp1 e Bglap2 foram mais altas nas CTMs diferenciadas por 7 dias, entretanto houve baixa expressão nas CTMs diferenciadas por 21 dias. Apenas o gene Runx2 teve sua expressão gradativamente aumentada (figura 18).

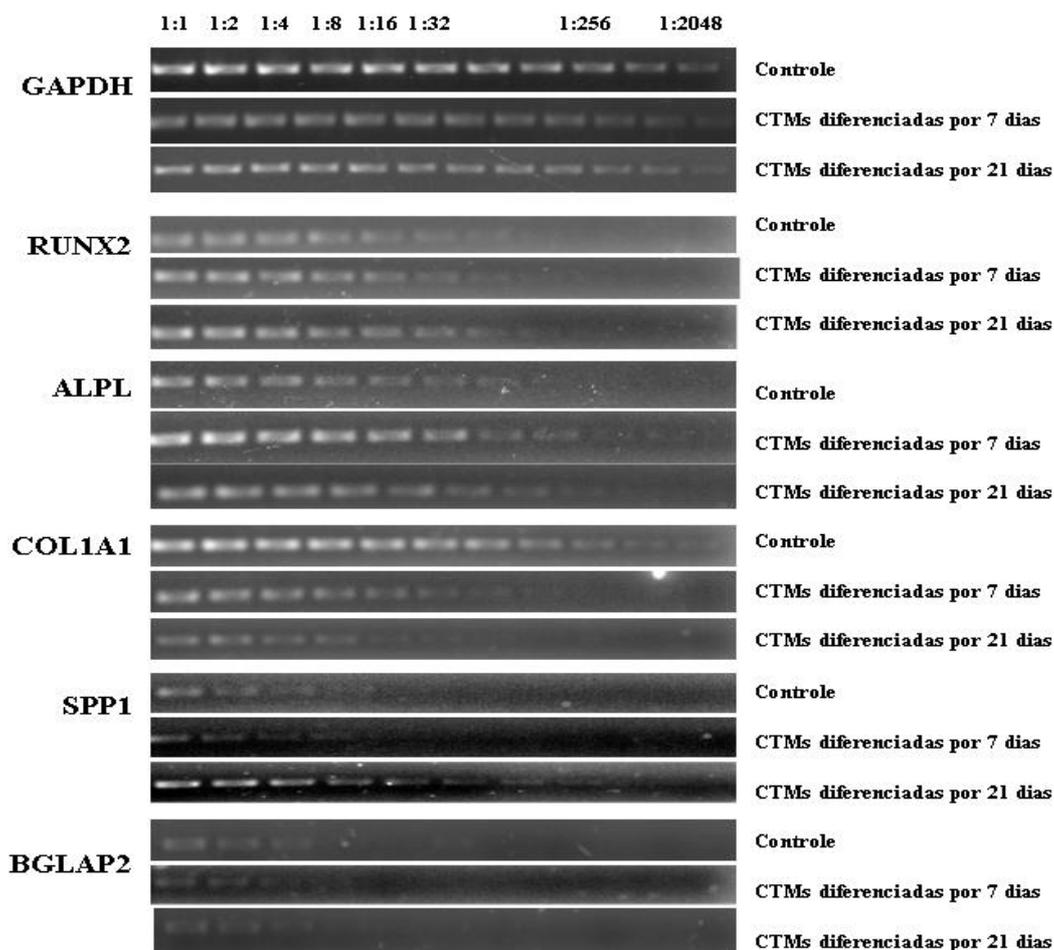


Figura 17. Eletroforese de produtos de RT-PCR semiquantitativa dos genes humanos ALPL, COL1A1, SPP1, RUNX2, BGLAP e GAPDH, realizada com as amostras controle (CTMs indiferenciadas e CTMs diferenciadas em meio α -MEM osteogênico por 7 e 21 dias).

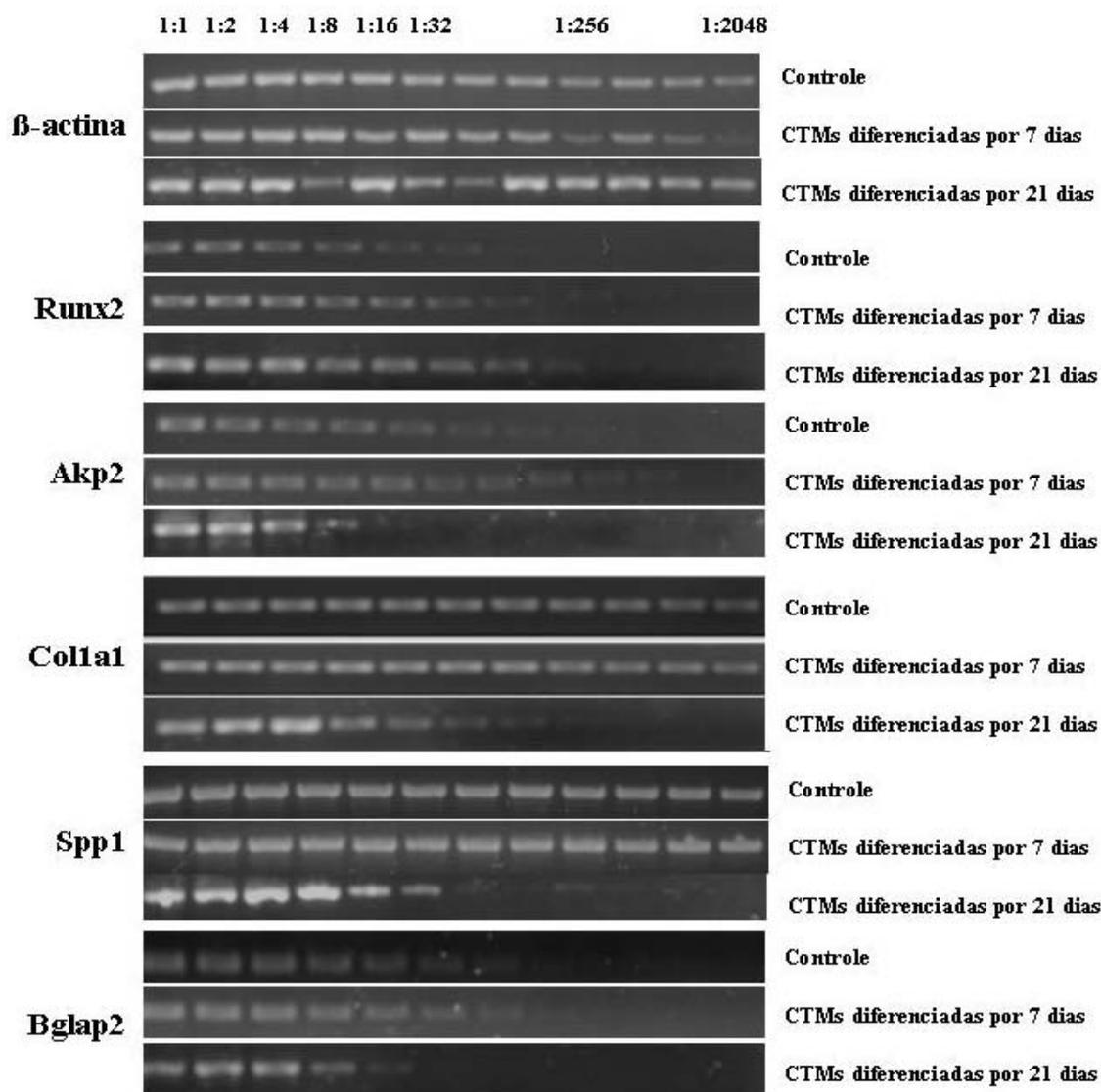


Figura 18. Eletroforese de produtos de RT-PCR semiquantitativa dos genes murinos Akp2, Coll1a1, Spp1, Runx2, Bglap2 e β -actina, realizada com as amostras controle (CTMs indiferenciadas e CTMs diferenciadas em meio α -MEM osteogênico por 7 e 21 dias).

O gene da fosfatase alcalina (humano ALPL e murino Akp2) mostrou maior expressão aos sete dias de diferenciação tanto em ambas as espécies, sugerindo sua participação em um momento importante de formação da matriz extracelular.

O gene do colágeno tipo 1A1 (COL1A1) apresentou maior expressão em 7 dias tanto de células humanas quanto murinas. O colágeno 1A1 é reconhecido como um marcador precoce de células osteoprogenitoras (JIKKO, et al 1999). O gene RUNX2, o qual é

importante na diferenciação osteogênica teve sua expressão gradativamente aumentada durante a diferenciação tanto de células humanas como murinas.

A osteopontina (SPP1) é uma proteína da matriz extracelular importante nos processos de adesão celular. É conhecido que essa proteína tem sua expressão por volta do quarto dia de diferenciação. Nossos resultados mostraram maior expressão desse gene por volta dos 7 dias de diferenciação nas duas espécies estudadas.

A osteocalcina (BGLAP) foi descrita como sendo um marcador tardio do desenvolvimento de osteoblastos aparecendo com a mineralização da matriz extracelular (AUBIN et al 1998), que é um processo tardio na diferenciação. Nossos resultados com células humanas mostram uma expressão alta do período de 21 dias de indução comparado com as de 7 dias. As células murinas exibiram aumento da expressão de BGLAP ao 7 dias com subsequente diminuição.

6.4 Amplificação dos insertos de cDNA das bibliotecas IMAGE para a confecção dos microarrays

A primeira etapa para a construção dos microarrays consistiu na amplificação por PCR dos insertos de cDNA (bibliotecas IMAGE) diretamente dos clones em cultura bacteriana (PCRs das colônias de *E. coli*).

Dentre os clones das bibliotecas humana e murina, 82,5% foram corretamente amplificados apresentando uma única banda em eletroforese em gel de agarose, 6,5% não amplificaram e 11% apresentaram bandas múltiplas (Figura 19). O resultado típico destas ampliações pode ser observado pela Figura 20.

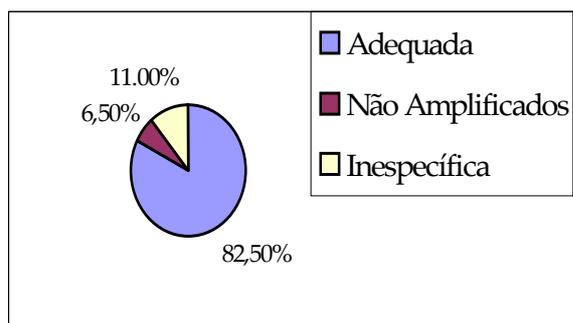


Figura 19. Eficiência das amplificações por PCR dos clones de cDNA IMAGE utilizados no preparo dos microarrays (Resultados típicos ilustrando as bibliotecas humana e murina).

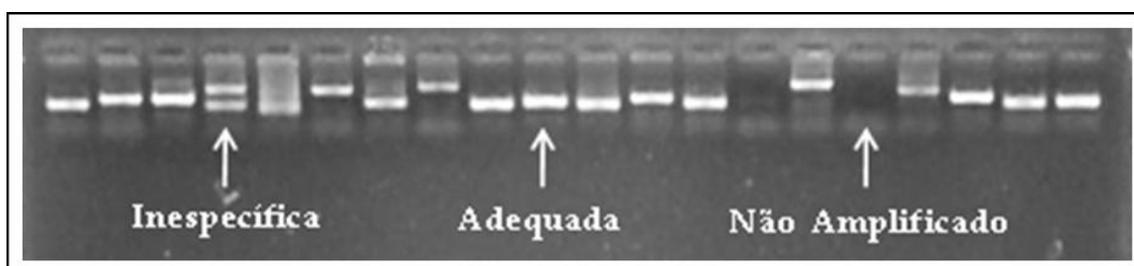


Figura 20. Eletroforese em gel de agarose 1% dos produtos de PCR de alguns clones da biblioteca de cDNA IMAGE (Resultados típicos ilustrando as bibliotecas humana e murina).

6.5 Aquisição de imagens dos microarrays por *scanning*

A Figura 21 ilustra uma imagem típica de hibridação de uma das lâminas de microarray. Neste caso utilizamos sonda complexa marcada com Cy3 (células tronco mesenquimais murinas nos pontos verdes) e o pool de referência foi marcado com Cy5 (pontos vermelhos). Os pontos amarelos correspondem aos genes cujas seqüências de RNAm (cDNAs) estavam presentes tanto em células tronco como no pool de referência.

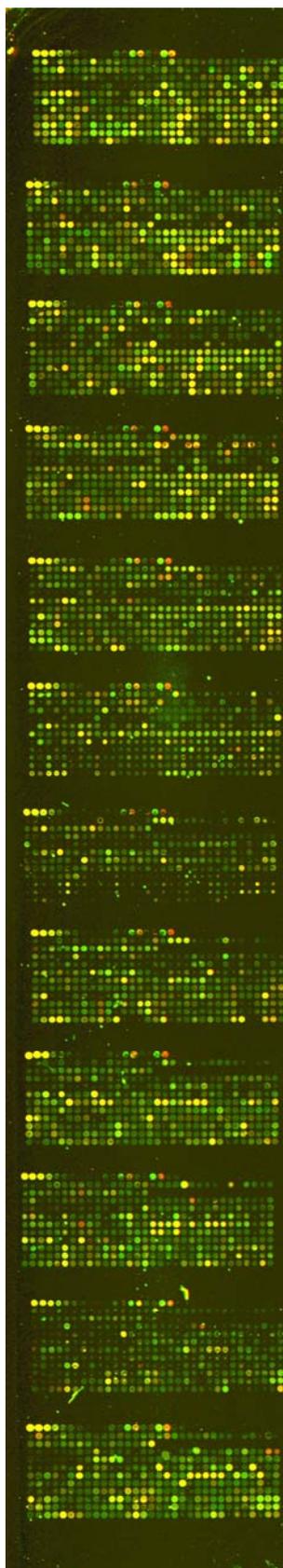


Figura 21. Imagem de hibridização de microarray com sondas fluorescentes (Cy3 e Cy5) (Resultado típico).

6.6 Perfil de expressão de genes sintênicos humanos e murinos

Após a correção do *background* e a normalização dos dados, as análises dentro do pacote MEV, foram realizadas com os genes expressos em, no mínimo, 80% dos experimentos. Os dados (amostras e genes) foram centralizados pela mediana e a partir da matriz gerada foram calculadas as medianas dos 6 valores para cada tempo de cada espécie (Figura 22).

Observamos que do conjunto total de 4.500 seqüências presentes em cada microarray, separamos somente 336 genes humanos e 550 genes murinos os quais foram classificados como diferencialmente expressos segundo análises estatísticas do programa SAM ($FDR \leq 10\%$, $p\text{-value} \leq 0.01$), ou seja, trabalhamos com 90 % de confiabilidade estatística.

Dos genes diferencialmente expressos, analisamos apenas aqueles considerados sintênicos (75 genes) entre as espécies humana e murina segundo consta no banco de dados do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/>). A maioria desses genes apresentou perfil de expressão semelhante e estão distribuídos nos diversos cromossomos das duas espécies. Os 75 genes sintênicos estão listados no Anexo B (humanos) e Anexo C (murinos).

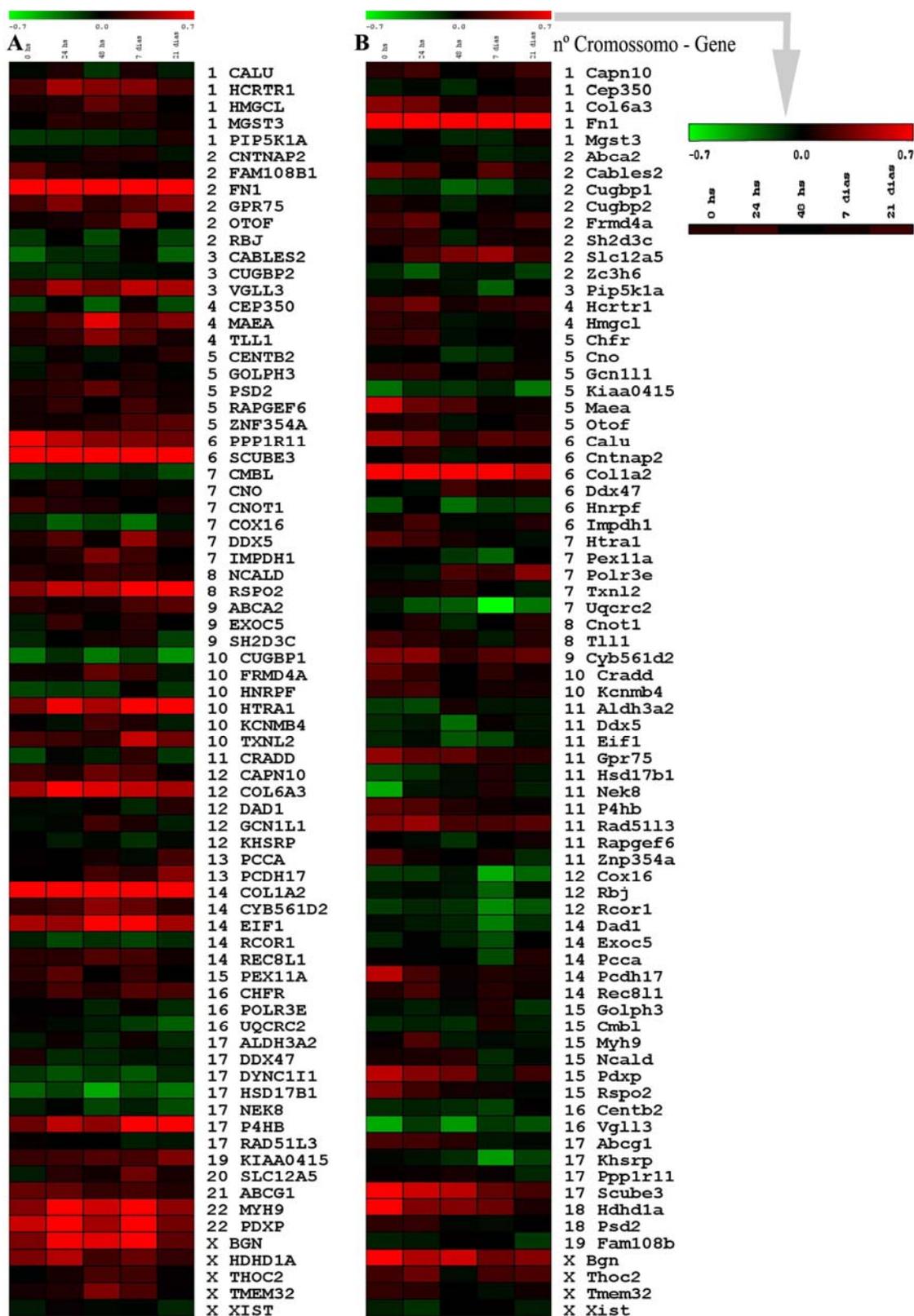


Figura 22. Agrupamento hierárquico supervisionado dos perfis de expressão dos 75 genes sintênicos humanos (A) e murinos (B) de acordo com a diferenciação das células tronco mesenquimais em osteoblastos. Os agrupamentos foram conseguidos após tratamento dos dados pelos programas SAM e Cluster e Tree View.

6.7 Redes de interações transcricionais (redes gênicas) durante a diferenciação das células tronco mesenquimais em osteoblastos

Redes de interações transcricionais, também chamadas de redes gênicas, foram obtidas com o uso do programa GeneNetwork (Wu et al., 2004) com entrada (*input*) dos dados atuais de microarrays dos tempos de diferenciação 0, 24, 48 horas e 7 e 21 dias. Realizamos a interpolação linear dos dados selecionados, a fim de inferir as prováveis interações durante o processo de diferenciação.

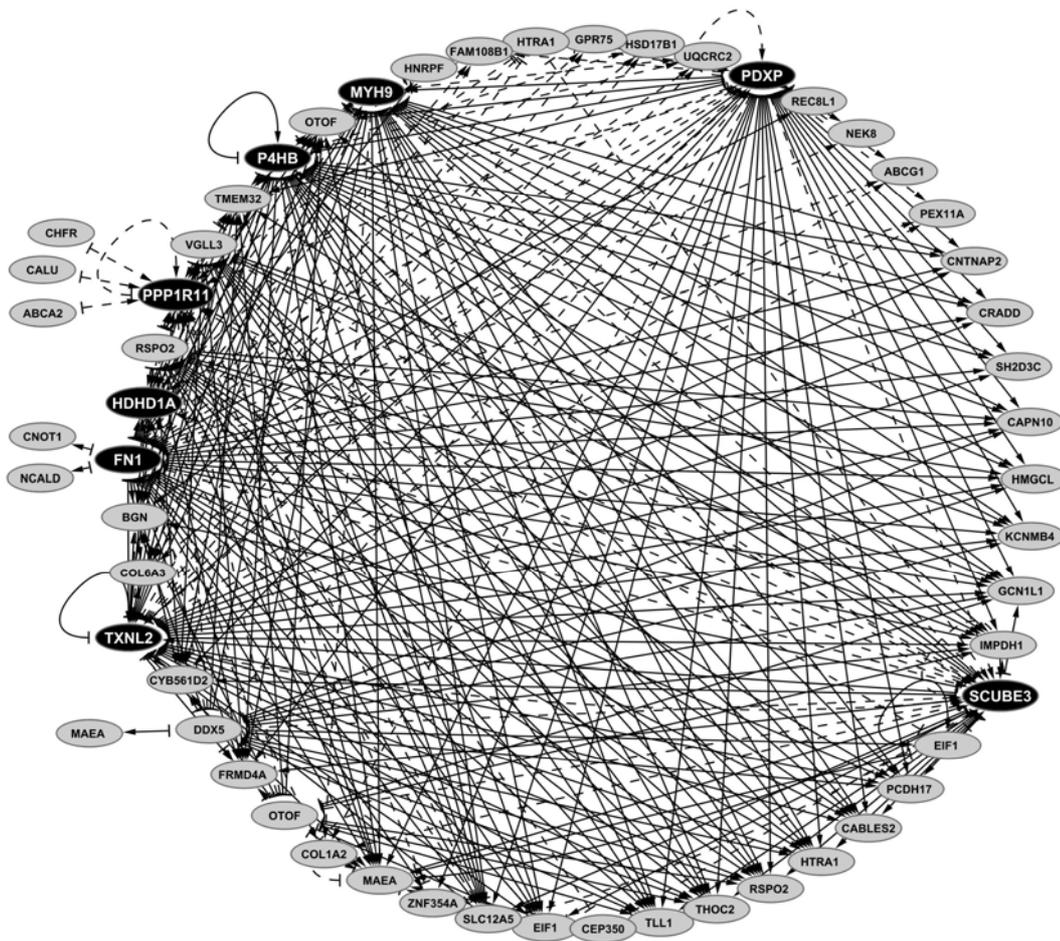
Para a construção do modelo linear, utilizamos o número de ligações igual ao número de genes de entrada. Nem todos os genes de entrada participaram das interações dentro da rede reconstruída, pois estes foram eliminados após a análise matemático-estatística. As redes geradas foram então visualizadas e editadas com o uso do software Cytoscape.

A rede gerada com dados das amostras de células humanas apresentou maior número de interações entre os genes o que nos pareceu mais complexa em relação à rede murina e gerou maior número de nós gênicos, (**PDXP**, **FN1**, **TXNL2**, **SCUBE3**, **HDHD1A**, **P4HB**, **MYH9** e **PPP1R11**) (Figura 23).

Com os dados das amostras murinas, obtivemos rede menos complexa com relação à humana a qual e apresentou apenas 3 nós gênicos (**Scube3**, **Colla2** e **Hdhd1a**) (Figura 24).

Observou-se que todos os nós gênicos de ambas as redes (humana e murina), ou seja, aqueles genes que apresentaram maior número de interações, também eram genes induzidos (nível de expressão maior em relação aos outros).

Os nós gênicos presentes nas redes estão listados no Anexo D, com seus respectivos símbolos e identidade conservada de suas sequências protéicas e de DNA.



Legenda

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

Figura 23. Rede de interações transcricionais envolvendo genes sintênicos (*H. sapiens* – *M. musculus*) durante a diferenciação de células tronco mesenquimais humanas em osteoblastos nos tempos de diferenciação 0, 24, 48 horas e 7 e 21 dias.

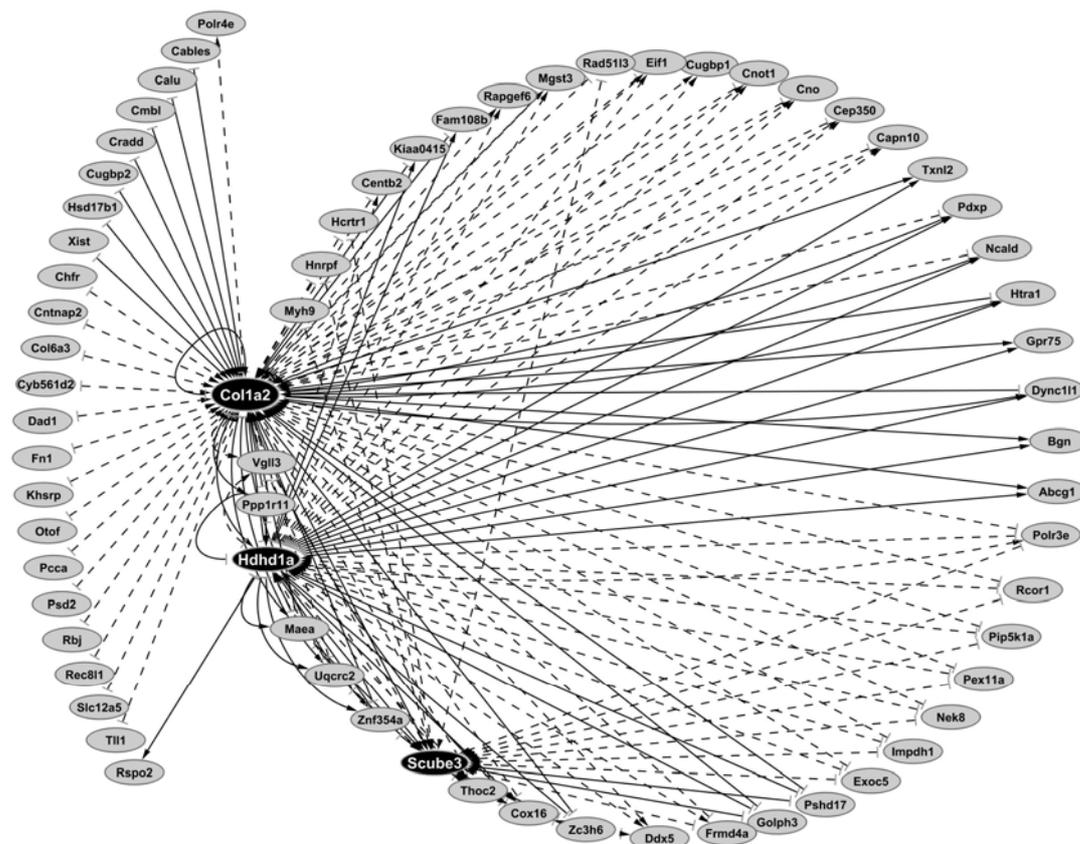


Figura 24. Rede de interações transcricionais envolvendo genes sintênicos (*H. sapiens* – *M. musculus*) durante a diferenciação de células tronco mesenquimais murinas em osteoblastos nos tempos de diferenciação 0, 24, 48 horas e 7 e 21 dias.

6.7.1 Sub-redes de interações transcricionais

Com a finalidade de facilitar a análise das interações transcricionais observadas, focando “regiões” de interesse, utilizamos o *plug-in* MCODE do software Cytoscape.

Dessa forma, geramos “sub-redes” da rede principal que inclusive têm um *score* estatístico. No caso da sub-rede humana (*score* = 6,36) esta apresentou maior número de interações entre os genes, preservando os mesmos nós gênicos iniciais: PDXP, FN1, TXNL2, SCUBE3, HDHD1A, P4HB, MYH9 e PPP1R11 (Figura 25).

A sub-rede murina (*score* = 3,03) apresentou menor complexidade em relação à humana (menor número de interações), mas conservou os mesmos nós gênicos da rede principal: Scube3, Col1a2 e Hdhd1a (Figura 26).

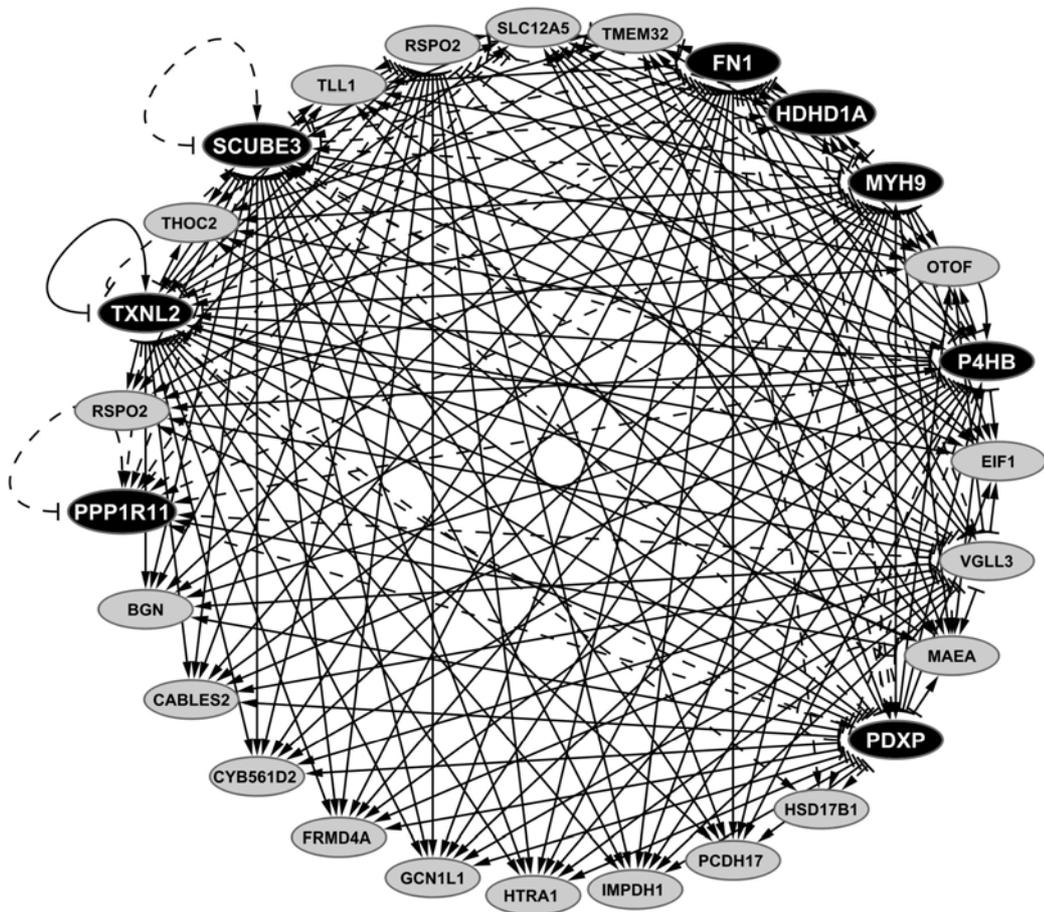


Figura 25. Sub-rede transcricional envolvendo genes sintênicos (*H. sapiens-M. musculus*) durante a diferenciação de células tronco mesenquimais humanas em osteoblastos nos tempos de diferenciação 0, 24, 48 horas e 7 e 21 dias.

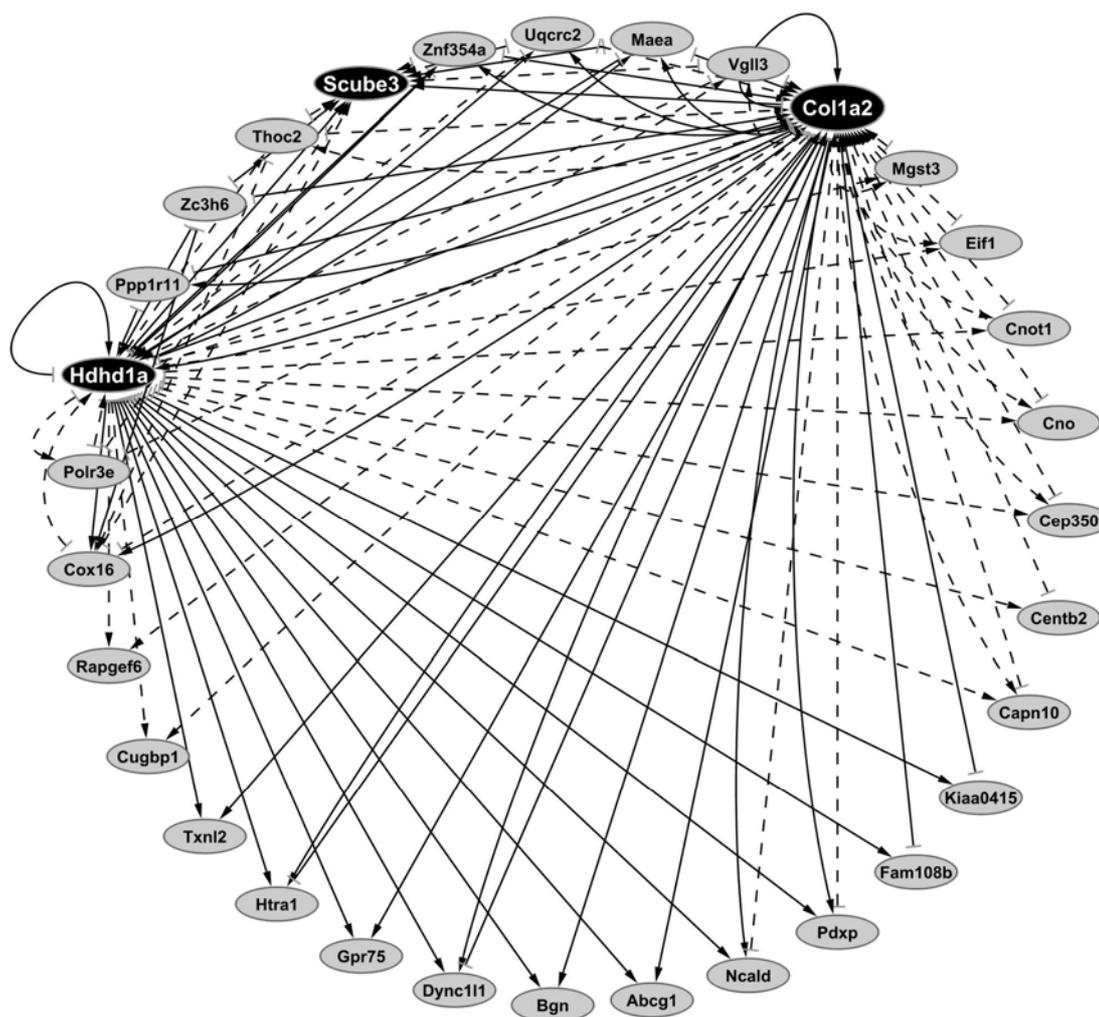


Figura 26. Sub-rede transcricional envolvendo genes sintênicos (*H. sapiens-M. musculus*) durante a diferenciação de células tronco mesenquimais murinas em osteoblastos nos tempos de diferenciação 0, 24, 48 horas e 7 e 21 dias.

6.8 Confirmação dos dados de microarrays por PCR em tempo real

As mesmas amostras utilizadas na preparação das sondas foram submetidas a Real Time PCR para alguns dos genes que se mostraram diferencialmente expressos nas análises feitas pelo SAM. Foram feitas triplicatas experimentais de cada uma das três amostras provenientes de doadores independentes (triplicatas biológicas).

Os genes escolhidos para a confirmação foram FN1, PPP1R11 e UQCRC2, os dois primeiros induzidos e o terceiro reprimido de acordo com a análise estatística feita pelo SAM.

O gene constitutivo mais apropriado para estas amostras, de acordo com o software *BestKeeper*, foi o GAPDH. Os gráficos foram construídos de acordo com os valores de RQ (Relative Quantification), calculados utilizando como calibrador a média dos valores de ΔC_t obtidas com as amostras correspondentes células indiferenciadas.

Observou-se que há bastante variabilidade entre as amostras de diferentes doadores, representados pelos desvios padrões nos gráficos correspondentes.

Em vista do calibrador ser o menor valor de expressão, o perfil de repressão encontra-se próximo ao valor de QR 0.00, enquanto o perfil de indução com valor próximo de 1.00.

Os genes FN1 e Fn1 apresentam induzidos nos tempos de 48 horas, 7 e 21 dias, mas só nos tempo de 48 horas, 7 e 21 dias do gene murino (Fn1) apresentam significância estatística. Tais genes se aproximam dos perfis de expressão gênica gerados pela técnica dos microarrays de ambos os genes, (figura 27. A e B).

Os genes PPP1R1 e Ppp1r11 apresentam um perfil de indução, apenas os tempos de 0 e 24 horas do perfil humano apresentam um perfil de repressão, o contrário do perfil de expressão gerado pela técnica dos microarrays, (figura 27. C e D).

Os genes UQCRC2 e Uqcrc2 apresentam um perfil de repressão apenas nos tempos de 7 e 21 dias de ambas espécies com significância estatística em concordância com os perfis de expressão gerados pela técnica dos microarrays, (figura 27. E e F).

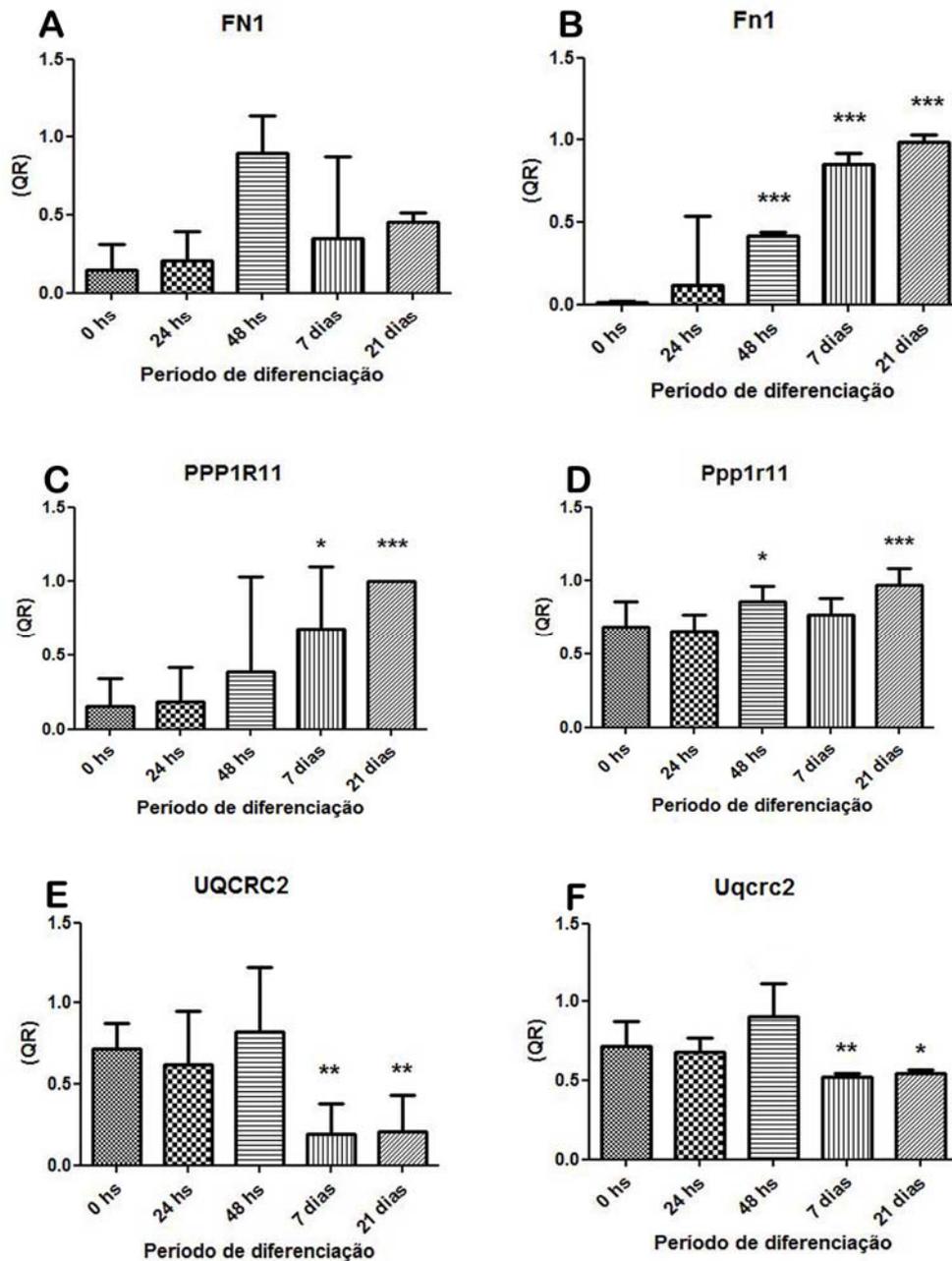


Figura 27. Gráficos dos valores de expressão relativa (QR) dos genes FN1 humanos e Fn1 murino (A e B), PPP1R11 e Ppp1r11 (C e D), UQCRC2 e Uqrc2 (E e F) durante a diferenciação osteogênica no período de 0, 24, 48 horas, 7 e 21 dias. (Análise estatística ANOVA; *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$).

Discussão

7. DISCUSSÃO

7.1 Ensaio de osteogênese

7.1.1 Proliferação e viabilidade celular

A capacidade proliferativa, assim como a viabilidade destas células em cultura foi confirmada. A redução na taxa de proliferação observada nas células após 14 dias em meio de diferenciação pode ser atribuída à progressiva redução da capacidade de auto-renovação e conseqüente especialização da célula em uma célula funcional, neste caso em direção aos osteoblastos.

7.1.2 Determinação de proteínas totais

À medida que as células vão se diferenciando em osteoblastos a quantidade de proteínas totais aumenta proporcionalmente ao número de células. Os osteoblastos são células maduras cuja principal característica é a síntese de grandes quantidades de matriz extracelular.

Grande parte desta matriz é protéica, composta por colágeno tipo I (90%), seguindo por osteocalcina, sialoproteína óssea, osteopontina e proteoglicanas (AUBIN, 1998).

7.1.3 Determinação da atividade enzimática da fosfatase alcalina

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 tem 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). Os ensaios demonstram um maior conteúdo de fosfatase nas células em diferenciação osteogênica comparado às células-tronco indiferenciadas e entre as espécies, há um maior conteúdo de fosfatase na cultura de células murinas.

7.1.4 Ensaio imunocitoquímico da osteopontina

O osso contém grande quantidade da proteína OPN, reforçando a possibilidade desta proteína estar envolvida na interação entre os minerais e as células ósseas (GIACHELLI e STEITZ, 2000). No tecido ósseo, a OPN é sintetizada por preosteoblastos, osteoblastos e osteócitos (BUTLER, 1989, McKEE e NANJI, 1996).

Em geral, acúmulos de OPN são detectados em regiões específicas do tecido mineralizado. A OPN, por exemplo, é observada em regiões amorfas e elétrópacas situadas nos amplos espaços interfibrilares da matriz óssea (McKEE e NANJI, 1996).

A avaliação imunocitoquímica da proteína osteopontina localizada na região perinuclear demonstrou uma maior expressividade em células diferenciadas do que em células não diferenciadas em ambas as espécies, evidenciando sua importante função na diferenciação celular do tecido ósseo.

O papel da OPN na remodelação do tecido ósseo inclui o controle da diferenciação, recrutamento, adesão (YOSHITAKE et al., 1999; SODEK et al., 2000) e função dos osteoclastos (McKEE e NANJI, 1996; GIACHELLI e STEITZ, 2000).

7.1.5 Formação de matriz mineralizada

A propriedade de sintetizar matriz mineralizada é uma das principais funções dos osteoblastos maduros. Sendo assim a presença de nódulos de mineralização após 21 dias em

meio osteogênico comprova a diferenciação em osteoblastos funcionais tanto em células humanas como em células murinas.

7.2 Avaliação da expressão de genes relacionados à osteogênese e adipogênese por RT-PCR semiquantitativa

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). É interessante notar que todos os transcritos apresentaram-se expressos nas CTMs indiferenciadas, sugerindo seu comprometimento com a linhagem osteobástica.

O gene da fosfatase alcalina (humano ALPL e murino Akp2) mostrou maior expressão aos sete dias de diferenciação em ambas as espécies. Este resultado sugere sua participação em um momento importante de formação da matriz extracelular.

A fosfatase alcalina é uma enzima importante no processo de biomineralização, promovendo a hidrólise do fosfato de 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 osteoblasto (PINERO et al., 1995).

O gene do colágeno tipo 1A1 (COL1A1) apresentou maior expressão em 7 dias tanto de células humanas quanto murinas. O colágeno 1A1 é reconhecido como um marcador precoce de células osteoprogenitoras (JIKKO et al 1999). O gene RUNX2, o qual é importante na diferenciação osteogênica teve sua expressão gradativamente aumentada durante a diferenciação tanto de células humanas como murinas.

A osteopontina (SPP1) é uma proteína da matriz extracelular importante nos processos de adesão celular. É conhecido que essa proteína tem sua expressão por volta do quarto dia de

diferenciação. Nossos resultados mostraram maior expressão desse gene por volta dos 7 dias de diferenciação nas duas espécies estudadas.

A osteocalcina (BGLAP) foi descrita como sendo um marcador tardio do desenvolvimento de osteoblastos aparecendo com a mineralização da matriz extracelular (AUBIN et al, 1998), que é um processo tardio na diferenciação. Nossos resultados com células humanas mostram uma expressão alta do período de 21 dias de indução comparado com as de 7 dias. As células murinas exibiram aumento da expressão de BGLAP aos 7 dias com subsequente diminuição.

7.3 Perfil de expressão gênica, redes de interações gênicas e associações sintênicas

Com o intuito de comparar os perfis de expressão gênica durante a diferenciação osteoblástica de células tronco mesenquimais entre *H. sapiens* e *M. musculus*, buscamos inicialmente informações sobre a sintenia compartilhada dos respectivos nós gênicos gerados pelo software GeneNetwork, ou seja, COL1A2, SCUBE3, HDHDL1A, PDXP, FN1, P4HB, MYH9 e PPP1R1. Para isto utilizamos o banco de dados NCBI Map Viewer (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/>).

Como já foi dito, as espécies podem diferir com relação ao número e morfologia de seus cromossomos, devido aos blocos sintênicos estarem reunidos em diferentes combinações. Entretanto, se considerarmos um determinado bloco sintênico, esse se apresenta evolutivamente conservado (como bloco) (YANG et al., 1997). As diferenças/semelhanças das localizações dos blocos sintênicos entre o homem e o camundongo podem ser visualizadas pela Figuras 28.

Com o presente estudo, pudemos notar que além da conservação estrutural desses blocos, há também conservação no comportamento transcricional dos genes que os compõe entre as duas espécies estudadas.

A Figura 27 mostra que o gene COL1A2 (7q21.3) que codifica a cadeia alfa 2 do colágeno tipo 1, possui sua expressão rigidamente controlada durante o desenvolvimento em um subconjunto de células mesenquimais e apresenta alta expressão no tecido ósseo (TARAS et al., 2005).

Esse gene possui identidade de 87,7 % na sequência do DNA e 90% na sequência de proteína codificada (Anexo D) entre homem e camundongo. Além disso, observamos o mesmo perfil de expressão em ambas as espécies durante a diferenciação das células tronco mesenquimais.

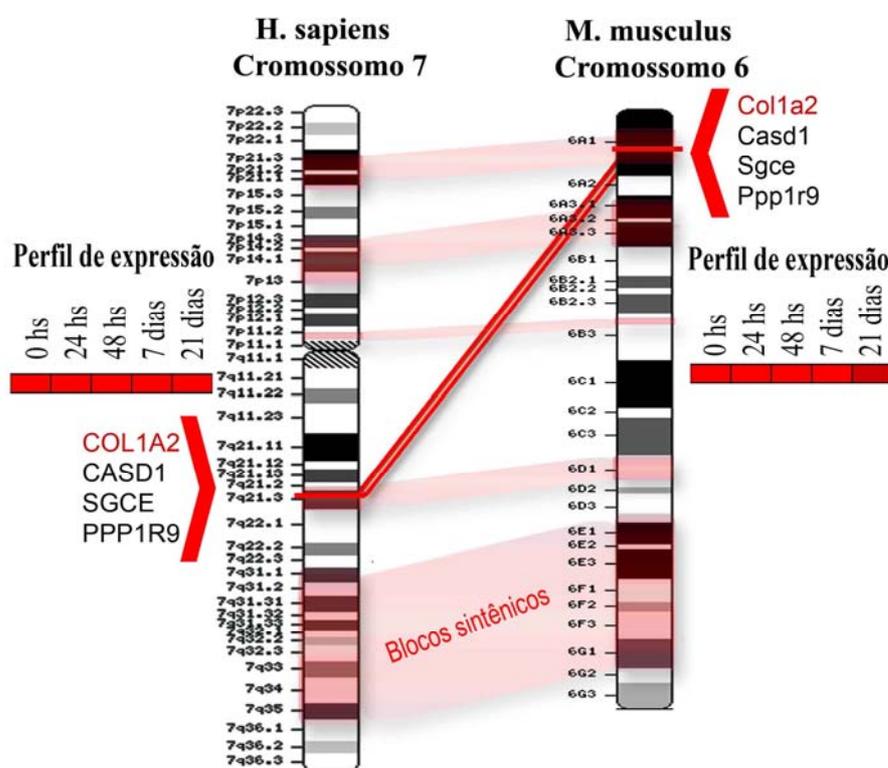


Figura 28. Blocos sintênicos entre os cromossomos 7 humano e 15 do camundongo e o perfil transcricional dos genes COL1A2 (7q21.3) e Col1a2 (6A1) respectivamente.

Na Figura 29 estão representados os genes MYH9 (22q13.1) e Myh9 (15 E1) que codifica miosina não muscular, tal proteína junto com outras, promove propagação e migração celular através do contato aderente com o colágeno (HUANG, 2009).

O gene MYH9 possui identidade de 97,1% na sequência do DNA e 90,5 % na sequência da proteína codificada entre homem e camundongo. Além disso, podemos notar um

perfil de expressão (gene induzido) semelhante nas células indiferenciadas e nas células com 24 horas de diferenciação.

O gene PDXP (22-q12.3), também representado na Figura 29, está localizado no mesmo bloco sintênico que o gene MYH9. Este gene codifica a proteína Piridoxal 5'-fosfato (PLP), forma ativa da vitamina B6 que atua como uma coenzima na manutenção da homeostase bioquímica. Esta função explica a conservação evolutiva entre homem e camundongo, a qual apresenta 92,5% de identidade na sequência protéica e um perfil de expressão semelhante durante os períodos de diferenciação das CTMs.

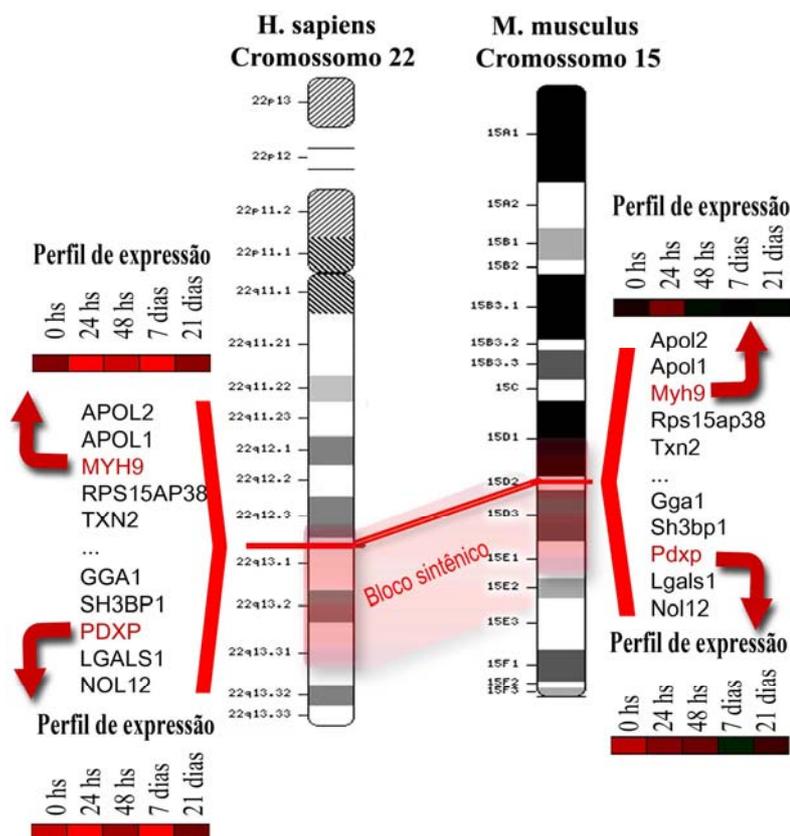


Figura 29. Blocos sintênicos entre os cromossomos 22 humano e 15 do camundongo e o perfil de expressão dos genes MYH9 (22q13.1), PDXP (22-q12.3), Myh9 (15 E1) e Pdxp (15 E1).

Na Figura 30 estão representados os genes PPP1R11 (6p21.3), Ppp1r11 (17 B1), SCUBE3 (6p21.3) e Scube3 (17 A3.3), os quais estão localizados no mesmo bloco sintênico do cromossomo 6 humano e do cromossomo 17 do camundongo.

O gene PPP1R11 codifica um inibidor específico da proteína fosfatase-1 (PP1), com uma diferencial sensibilidade para o metal-independente e metal em forma dependente da PP1; possui identidade de 88,9% na seqüência. O perfil de expressão desses genes durante a diferenciação das células tronco mesenquimais em osteoblastos foi semelhante entre as duas espécies.

O gene SCUBE3 é altamente conservado entre humanos e camundongos. Sua proteína codificada exibe identidade de 95,9% em suas seqüências. Além disso, esse gene exibiu um perfil de expressão semelhante entre as duas espécies (induzido), evidenciando um papel importante na formação de tecido ósseo.

Tal gene codifica uma proteína que possui o domínio CUB-EGF - peptídeo sinal que é altamente expresso em osteoblastos primários e ossos longos (WU, 2004b).

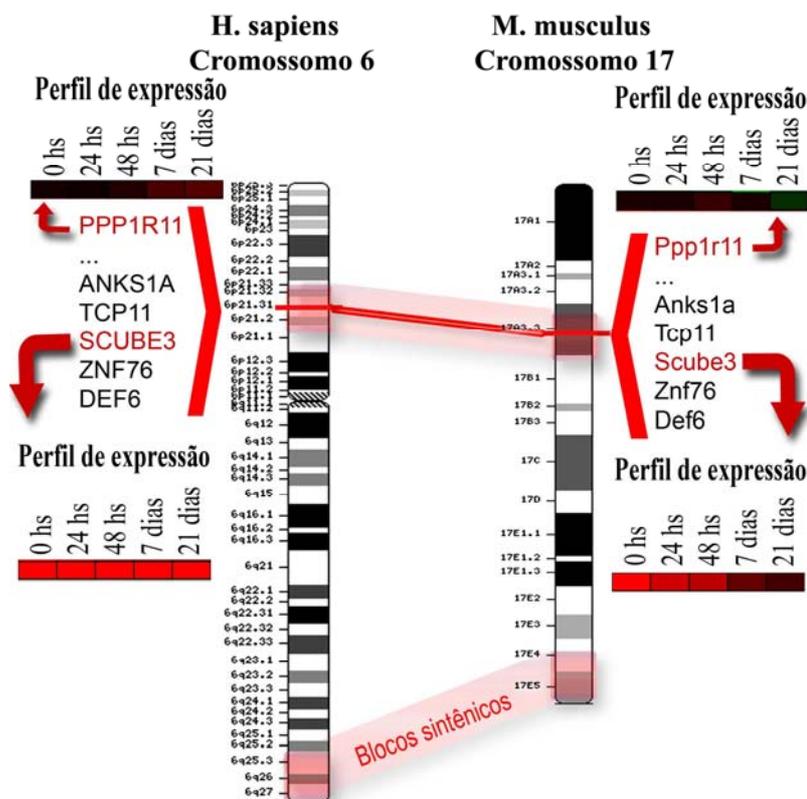


Figura 30. Blocos sintênicos entre os cromossomos 6 humano e 17 do camundongo e o perfil de expressão dos genes PPP1R11 (6p21.3), Ppp1r11 (17 B1), SCUBE3 (6p21.3) e Scube3 (17 A3.3).

O gene TXNL2 (10q26) apresenta identidade de 92,8% na sequência da proteína codificada. Além disso, exibiu perfil de expressão de indução próximo nos períodos iniciais de diferenciação (0 a 48 horas) e diferente nos períodos tardios (7 e 21 dias) (Figura 31).

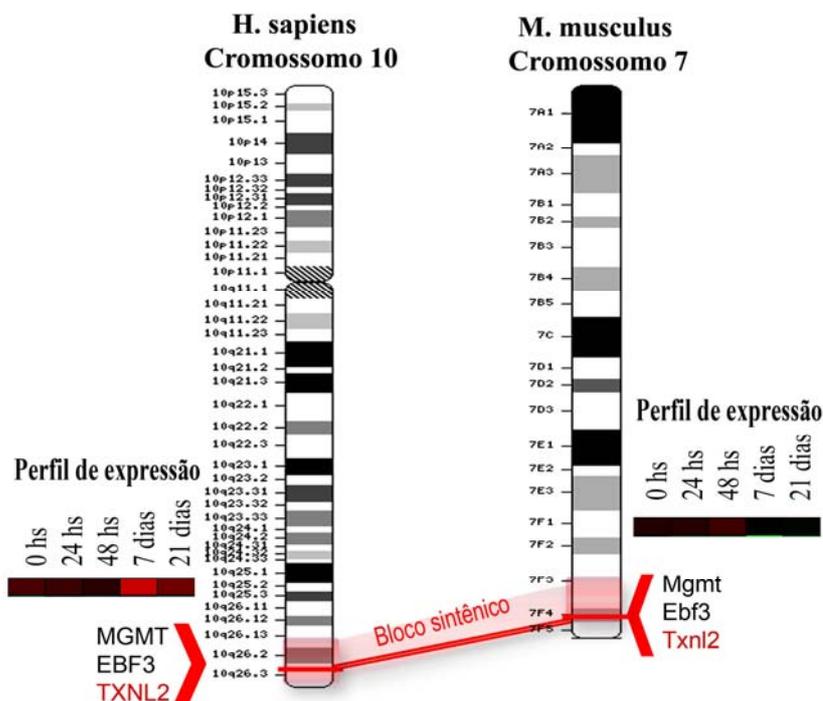


Figura 31. Bloco sintênico entre os cromossomos 10 humano e 7 do camundongo e o perfil de expressão dos genes TXNL2 (10q26) e Txnl2 (7 F5-C).

O gene P4HB (17q25) possui identidade entre as espécies estudadas de 94,3% na sequência da proteína codificada. Entretanto, apresentou um perfil de expressão próximo apenas no período inicial de diferenciação (0 a 24 horas) (Figura 32).

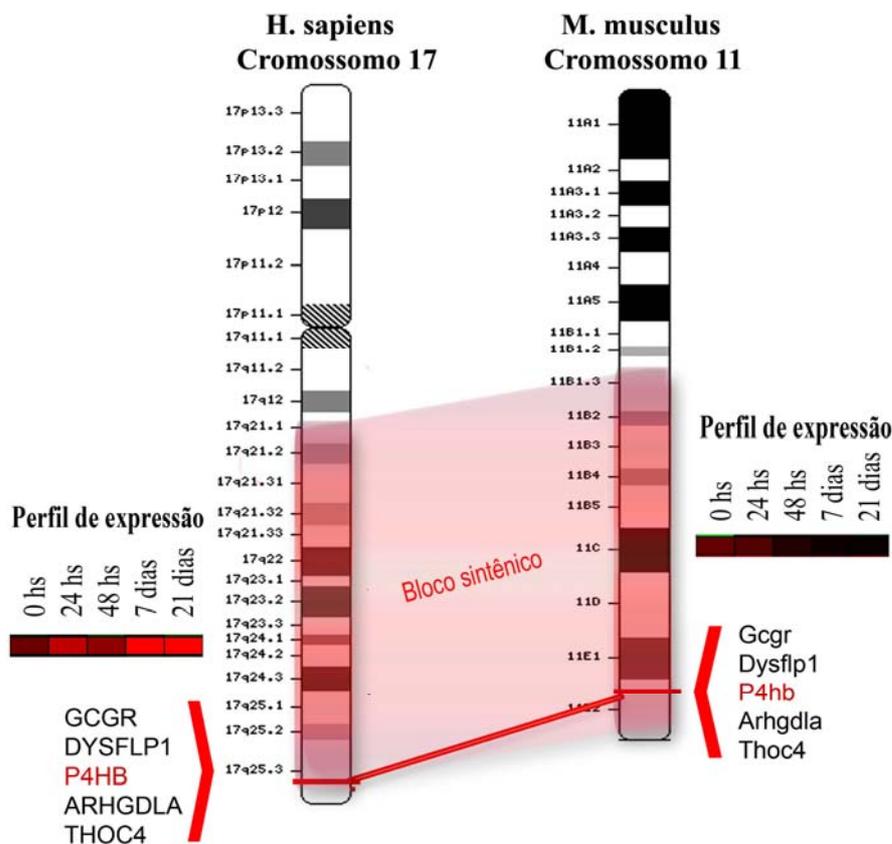


Figura 32. Bloco sintênico entre os cromossomos 17 humano e 11 do camundongo e o perfil de expressão dos genes P4HB (17q25) e P4hb (11 D-E).

O gene FN1 (2q34) possui identidade entre as espécies estudadas de 92,2% na seqüência da proteína codificada e apresentou um perfil de expressão de indução muito semelhante durante todo o período de diferenciação (Figura 33).

Este gene codifica uma proteína (fibronectina) membro de uma família de glicoproteínas de alto peso molecular que estão presentes na superfície das células, nos fluidos extracelulares, tecidos conectivos e membrana basal. A fibronectina é altamente expressa em tecido ósseo; interage com outras proteínas da matriz extracelular e ligantes celulares, tais como colágeno, fibrina e integrinas e estão envolvidas nos processos de migração e aderência celular (MURO et al., 2003).

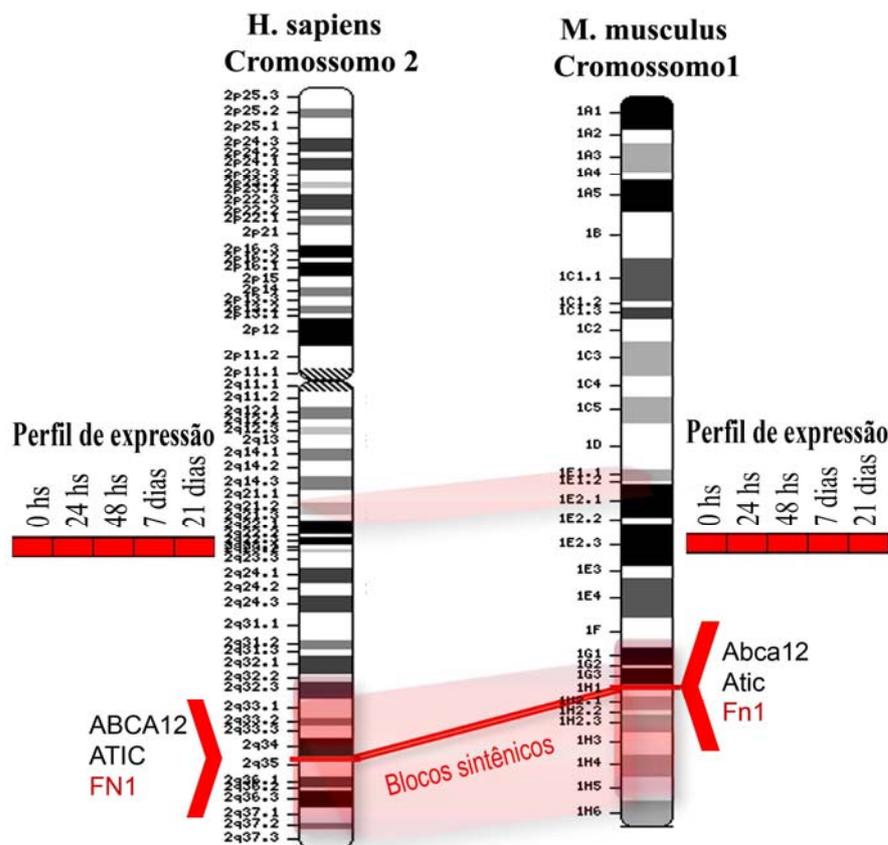


Figura 33. Bloco sintênico entre os cromossomos 2 humano e 1 do camundongo e o perfil de expressão dos genes FN1 (2q34) e Fn1 (1 C1-C5).

O gene HDHD1A (Xp21.32) não está localizado em um bloco sintênico, sendo considerado apenas como gene ortólogo, cuja identidade entre as espécies estudadas é de 71,2% na sequência da proteína codificada. Este gene apresentou um perfil de expressão de indução muito próximo durante a diferenciação entre as duas espécies estudadas e foi salientado neste trabalho devido seu perfil de expressão ser de indução e estar representado nas redes gênicas como nós gênicos (Figura 34).

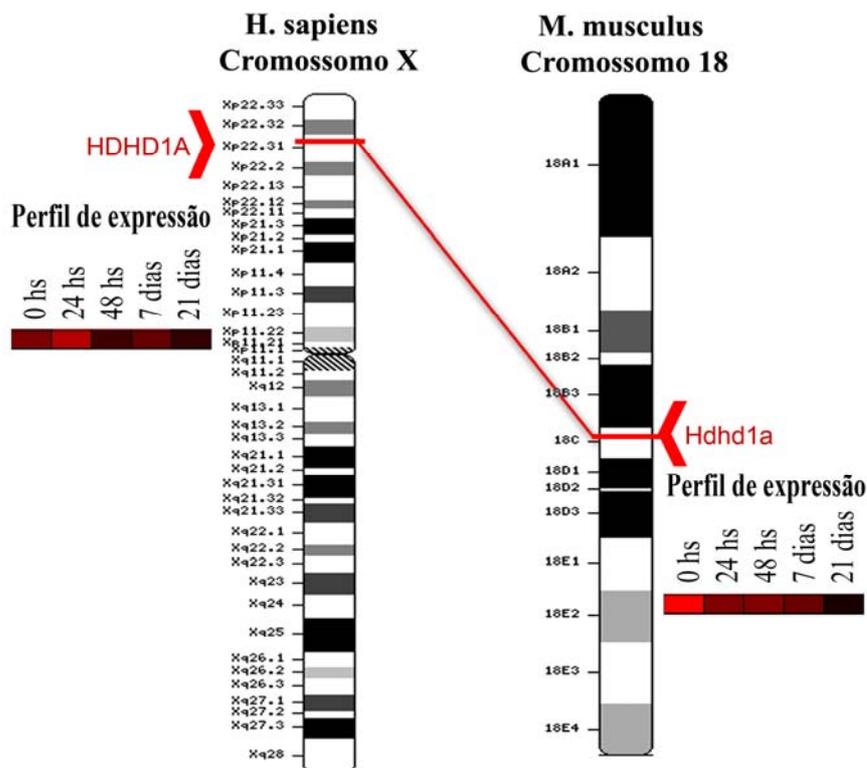


Figura 34. Genes ortólogos HDHD1A humano (Xp21.32) e Hdhd1a(18 C) murino e seus respectivos perfis de expressão.

A análise feita com o programa SAM revelou um grande número de genes significantes modulados durante a diferenciação das células-tronco mesenquimais em osteoblastos tanto em humanos como em murinos. De acordo com a figura 24, podemos notar a existência de um grande número de genes que apresentam um perfil de expressão semelhante em ambas as espécies, evidenciando a conservação evolutiva a nível não apenas estrutural, mas também transcricional.

Ortólogos são genes de espécies diferentes que têm evoluído de um gene ancestral comum de especiação e, em geral mantêm uma função semelhante no curso da evolução. A abordagem da expressão de genes ortólogos promove a aplicação da meta-análise do perfil de expressão gênica de multi-espécies em diversas condições e facilita a seleção de genes candidatos de interesse, com ênfase na atividade evolutivamente conservadas dos genes (GRIGORYEV, 2004).

É interessante notar que os perfis de expressão dos nós gênicos de cada rede apresentam-se induzidos durante todo o período de diferenciação celular inclusive em células não diferenciadas, evidenciando assim um importante papel no processo estudado.

O gene SCUBE3 esta representado nas redes tanto humano quanto murina, como um nó gênico de muitas interações. Tal resultado se deve ao seu papel ser importante no desenvolvimento ósseo.

SCUBE3 codifica uma proteína que possui o domínio CUB-EGF - peptídeo sinal; é altamente expressa em osteoblastos primários e ossos longos, e pode exercer suas funções biológicas em uma forma dependente de cálcio. Tal proteína esta relacionada à doença de Paget do osso (DPO). O gene cScube3 possui 96% identidade com hSCUBE3 e está localizado no cromossomo murino 17.B sintênica para 6p21.3 humano. (WU, B.-T, 2004).

O gene COL1A2 esta representado na rede murina como o principal nó gênico e na rede humana apenas como genes que realizam interações.

Os gene humano e murino que codifica a cadeia $\alpha 2$ de colágeno I (COL1A2 e Col1a2, respectivamente) compartilham uma estrutura comum, sendo que a estrutura da cromatina, o promotor proximal e as sequências enhancer mais a montante idênticos. Apesar destas homologias, as diferenças específicas entre as espécies têm sido relatadas sobre a função dos elementos cis individuais, tais como a seqüência do primeiro íntron na estrutura do gene humano, o qual apresenta um repressor. Estudos revelaram que as redes de regulação do gene de colágeno de mamíferos são organizadas de maneira muito diferente (Antoniv, 2005). Talvez esta característica explique o resultado do COL1A2 na rede humana, pois este gene não apresentou tantas interações como na rede murina.

O gene MYH9 que codifica uma miosina não muscular, apresentou mais interações na rede humana do que na rede murina, tornando-se um nó gênico apenas na rede humana. Este

resultado pode ser devido ao perfil de expressão menos indutivo do gene murino durante o processo,

Entretanto tal gene possui interação negativa com o COL1A2 em ambas as redes, evidenciando uma relação significativa destes genes no processo de diferenciação celular durante a osteogênese de células tronca mesenquimais.

MYH9 está implicada na regulação de célula de difusão e migração direcional em resposta a diversos estímulos. Receptores de domínio discoidin (DDR) 1 foram recentemente encontrados para servir como receptores para vários tipos de colágeno. Estes receptores têm sido encontrados para modular a proliferação celular e expressão de metaloproteases em resposta à estimulação do colágeno. A miosina e os DDR1 atuam na propagação e migração celular através do contato aderente com colágeno tipo I (HUANG, 2009).

O gene PDXP localizado no mesmo bloco sintênico que o gene MYH9 codifica a proteína Piridoxal 5-prime-fosfato (PLP) que é a forma ativa da vitamina B6. Este gene apresenta-se induzido durante o processo de diferenciação em ambas as espécies; possui interações com os genes Colla2 e Hdhd1a na rede murina e interações com quase todos os genes na rede humana. As poucas interações apresentadas na rede murina pelo gene Pdxp se deve ao perfil de expressão não ser tão induzido quanto o perfil humano.

Vários ensaios clínicos têm relatado vitaminas do complexo B ser associada com a osteoporose (HOLSTEIN, 2009). A Osteocalcina, descrita como sendo um marcador tardio do desenvolvimento de osteoblastos aparecendo com a mineralização da matriz extracelular (AUBIN et al, 1998), foi significativamente reduzida em indivíduos com uma baixa concentração de vitamina B6, demonstrando que baixas concentrações desta vitamina esta associada a uma alteração da morfologia do osso humano (HOLSTEIN, 2009).

O gene FN1 pertence a uma família de glicoproteínas de alto peso molecular que estão presentes na superfície das células, nos fluidos extracelulares, tecidos conectivos e membrana

basal. A fibronectina (FN) interage com outras proteínas da matriz extracelular e ligantes celulares, tais como colágeno, fibrina, e integrinas e estão envolvidas nos processos de migração e aderência celular (MURO et al., 2003). Foi demonstrado que a FN regula a adesão, migração e diferenciação de várias células mesenquimais (YAMADA et al., 1992).

A matriz óssea extracelular produzida por osteoblastos contém a glicoproteína fibronectina, que regula a adesão, diferenciação e função de várias células aderentes. Interações com fibronectina são necessários para diferenciação dos osteoblastos *in vitro* (GLOBUS et Al., 1998).

Este gene apresenta-se como nó gênico na rede humana, possuindo interações com praticamente todos os genes incluindo o COL1A2, diferente da rede murina, a qual o gene Fn1 possui apenas uma interação negativa com o Colla2, os quais possuem ligação no processo de osteogênese.

A matriz extracelular (MEC) produzida pelos osteoblastos é complexa e consiste de várias classes diferentes de moléculas que podem regular a modelagem e remodelagem do osso. A MEC contém componentes estruturais como o colágeno tipo I e fibronectina (FN), bem como de proteases que degradam a matriz. Agindo individualmente ou em conjunto, estes componentes da MEC, que são produzidos pelos osteoblastos, podem posteriormente afetar a diferenciação e sobrevivência, assim atuando através de mecanismos de feedback autócrino para regular a taxa de formação óssea (GLOBUS, et Al., 1998).

O gene PPP1R11 é um inibidor específico da proteína fosfatase 1 (PP1), apresenta-se com um leve perfil de indução em ambas as espécies, mas em relação às redes gênicas possui maior número de interação na rede humana, diferente da rede murina, a qual possui apenas interações com os genes Colla2 e Hdhd1a.

PPP1R11 possui uma sensibilidade diferenciada em relação ao metal independente e metal em forma dependente da PP1. Este gene é bem conservado evolutivamente, com os

genes relacionados em *M. musculus*, *S. cerevisiae*, *S. pombe*, *C. elegans*. Há uma direta relação recíproca entre os níveis da proteína fosfatase, isoforma PP1c2 e seu regulador PPP1R11, e a formação de complexos entre estes polipeptídeos de testículo podem impedir a proteólise de PPP1R11 e, portanto, em células germinativas a apoptose. (CHENG, 2009).

Não encontrei na literatura nenhuma informação do gene PPP1R11 com o processo de osteogênese.

O gene HDHD1A (Haloacid dehalogenase-like hydrolase domain containing 1A) possui grande número de interações em ambas as redes gênicas além de apresentar um perfil de indução semelhante durante o processo estudado. Tal gene possui atividade catalítica é conservado evolutivamente em várias espécies, como cachorro, bovino, rato, camundongo, galinha, etc. Não há na literatura informações precisas sobre as funções do gene HDHD1A, entretanto tal gene deve possuir alguma função no processo de osteogênese, seja ela direta ou indiretamente, pois apresenta interações com muitos genes tanto na rede humana quanto na rede murina, incluindo os genes já descritos no processo de diferenciação como o COL1A2, SCUBE3 e FN1.

O gene TXNL2 apresenta com um perfil de indução para a amostra humana e para a amostra murina um perfil de expressão leve de indução durante 0, 24 e 48 horas e um perfil leve de repressão durante 7 e 21 dias. Tais resultados caracteriza o gene TXNL2 como nó gênico na rede humana, pois apresenta um grande número de interações.

Jeong et al. (2008) afirma que PICOT (TXNL2) inibe a sobrecarga de pressão induzida pela hipertrofia cardíaca em roedores, concomitante com a função ventricular aumentada e contratilidade dos cardiomiócitos. Eles mostraram que o C-terminal de PICOT inibiu a hipertrofia cardíaca, em grande parte por perturbar a interação MLP - calcineurina e assim negativamente a regulação de sinalização calcineurina/NFAT.

PICOT atua de uma forma negativa na regulação da calcineurina (JEONG, 2008) e a sinalização Calcineurina / NFATc em osteoblastos controla a expressão de quimio atrativos que atraem os precursores dos osteoclastos da linhagem monocítica, assim ocorre a união entre formação e reabsorção óssea. Tais resultados indicam que NFATc1 regula a massa óssea de funcionamento em ambos os osteoblastos e osteoclastos (WINSLOW, 2006). Sabendo da atuação negativa de PICOT na regulação da calcineurina e extrapolando estas informações com meus resultados, fica evidente que durante o processo de diferenciação osteoblástica, deva ter um baixo nível da expressão deste gene para que ocorra a formação de matriz óssea. Com isso, é evidente que os resultados aqui alcançados, batem com a literatura.

O gene P4H9 (prolil 4-hidroilase, beta polipeptideo) apresenta um perfil de indução para a amostra humana e para a amostra murina um perfil de expressão de indução durante 0, 24 horas e um perfil leve de repressão durante 48 horas, 7 e 21 dias. Tais resultados caracterizam o gene P4hb como nó gênico na rede humana, pois apresenta um grande número de interações, diferente da rede murina que não possui o gene P4hb.

Este gene está envolvido na hidroxilação de resíduos de prolil em preprocolageno. Pihlajaniemi et al. (1987) clonaram o gene PROHB. Prolyl 4-hidroxilase é um tetrâmero composto de 2 subunidades Alpha (176710, 600608) e 2 subunidades beta de pesos moleculares de 64.000 e 60.000, respectivamente, para os monômeros. Quando presentes nas células em forma monomérica, a proteína serve a função de DSI, quando presentes em forma de tetrâmero, catalisa a formação de 4-hidroxiprolina em colágeno.

Assim, com o envolvimento do gene P4HB na formação do colágeno, podemos afirmar que ele esta indiretamente envolvido no processo estudado e que as interações existentes entre os vários genes presentes na rede humana servem como alvos para estudos futuros.

De acordo com Semon e Duret (2006), se houver um agrupamento físico da expressão gênica coordenada dentro da espécie, então é provável que a expressão do gene possa *evoluir* de uma forma coordenada. Um bloco de genes consecutivos onde a expressão evolui de uma forma coordenada imprime uma “assinatura evolutiva” que pode ser detectada pela correlação entre as espécies estudadas. Assim como perfis de expressão correlacionados são usados para identificar a co-expressão entre os genes nas espécies (COHEN et al., 2000; SPELLMAN et al., 2002), a mesma abordagem pode ser usada para analisar sua co-evolução. Esta abordagem pode identificar conjuntos de genes que exibem co-evolução dos perfis de expressão (MEZEY ET AL., 2008).

Yanai e Hunter (2009) também afirmam que análises genômicas mostram que os genes adjacentes são freqüentemente co-expressos. No entanto, ainda não está claro se a co-expressão é resultado de uma organização ou uma consequência funcional da cromatina adjacente. Os genes considerados *essenciais* parecem manter os seus perfis de expressão comparáveis entre espécies diferentes sugerindo uma forte pressão de seleção (Yanai e Hunter, 2009).

Visando avaliar a existência de padrões evolutivos comuns dos perfis de expressão gênica (co-expressão) durante a diferenciação osteoblástica entre as espécies estudadas, identificamos genes sintênicos apresentando um perfil semelhante durante esse processo. Tais genes podem ser considerados genes chaves do processo de osteogênese devido a sua colinearidade não só estrutural, mas funcional, os quais apresentaram um padrão comum de expressão gênica.

Conclusões

8. CONCLUSÕES

A reprodução do sistema-modelo *in vitro* de diferenciação de células-tronco mesenquimais humanas e murinas em osteoblastos foi alcançada com sucesso no presente trabalho.

As células tronco, independentemente da espécie, e durante o processo de diferenciação apresentam morfologia característica de osteoblastos e compartilham expressão de marcadores moleculares específicos.

Os resultados contribuem para uma visão abrangente, do ponto de vista molecular e bioquímico, do comprometimento e diferenciação da célula-tronco mesenquimal com a linhagem osteogênica de duas espécies diferentes. Apesar das diferenças aparentes entre a espécie humana e a murina no que se refere à organização cromossômica (tamanho, número e morfologia) no presente trabalho demonstramos que perfis transcricionais e o padrão de interações gênicas entre as regiões sintênicas se assemelham nas duas espécies.

As análises comparativas de dados do transcriptoma entre espécies prometem novas descobertas sobre o controle genético molecular dos processos celulares, facilitando a seleção de genes de interesse.

Referências Bibliográficas

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

AGGARWAL, S., PITTENGER, M. F. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood*, 105:1815-1822, 2005.

ANDERSSON, L.A., ARCHIBALD, M., ASHBURNER, M., AUDUN, S., BARENDSE, W., BITGOOD, J., BOTTEMA, C., BROAD, T., BROWN, S., BURT, D., CHARLIER, C., COPELAND, N., DAVIS, S., DAVISSON, M., EDWARDS, J., EGGEN A., ELGAR, G., EPPIG, J.T., FRANKLIN, I., GREWE, P., GILL, T. 3RD, GRAVES, J.A., HAWKEN, R., HETZEL, J., WOMACK, J. Comparative genome organization of vertebrates. The First International Workshop on Comparative Genome Organization. *Mamm. Genome*, 7: 717–734, 1996.

AUBIN J. E. Advances in the osteoblast lineage. *Biochem Cell Biol*, 76:889-910, 1998.

AUBIN J. E. Advances in the osteoblast lineage. *Biochem. Cell Biol*, 76: 899-910, 1998.

BADER, G., HOGUE, C. An automated method for finding molecular complexes in large protein interaction networks. *BMC Bioinformatics*, 4:2, 2003.

BATOULI, S., MIURA, M., BRAHIM, J., TSUTSUI, L.W., FISHER, L. W., GRONTHOS, S., ROBEY, P. G. SHI, S. Comparison of stem-cell-mediated osteogenesis and dentinogenesis. *J Dent Res*, 82(12):976-981, 2003.

BECK, G.R.JR., MORAN, E., KNECHT, N. Inorganic phosphate regulates multiple genes during osteoblast differentiation, including Nrf2. *Exp Cell Res.*, 288:288–300, 2003.

BECK, G.R.Jr. Inorganic phosphate as a signaling molecule in osteoblast differentiation. *J Cell biochem*, 90:234-243, 2003.

BOCELLI-TYNDALL, C., BRACCI, L., SPAGNOLI, G., BRACCINI, A., BOUCHENAKI, M., CEREDIG, R., PISTOIA, V., MARTIN, I., TYNDALL, A. Bone marrow mesenchymal stromal cells (BM-MSCs) from healthy donors and auto-immune disease patients reduce the proliferation of autologous and allogeneic-stimulated lymphocytes in vitro. *Rheumatology*, 46:403-408, 2007.

BODEN, S.D. The ABCs of BMPs. *Orthop Nurs*, 24:49 –52, 2005.

BRUDER, S.P., JAISWAL, N., RICALTON, N.S. Mesenchymal stem cells in osteobiology and applied bone regeneration. *Clin Orthop.*, 355: 247–256, 1998a.

BRUDER, S.P., KURTH, A.A., SHEA, M. Bone regeneration by implantation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells. *J Orthop Res.*, 16:155–162, 1998b.

BUTLER, W.T. The nature and significance of osteopontin. *Connect. Tissue Res.*, 23:123-136, 1989.

CANCEDDA, R. DOZIN, B., GIANNONI, P., QUART, R. Tissue engineering and cell therapy of cartilage and bone. *Matrix Biol.*, 22:81-91, 2003.

CAPLAN, A.; BRUDER, S.P. Mesenchymal stem cells: building blocks for molecular medicine in the 21st century. *Trends Molecular in Medicine*, 7:259-264, 2001.

CAVALIERI, D., TOWNSEND, J.P. AND . HARTL, D.L. Manifold anomalies in gene expression in a vineyard isolate of *Saccharomyces cerevisiae* revealed by DNA microarray analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:12369–12374, 2000.

CHENG, L., PILDER, S., NAIRN, A.C., RAMDAS, S., VIJAYARAGHAVAN, S. PP1 γ 2 and PPP1R11 Are Parts of a Multimeric Complex in Developing Testicular Germ Cells in which their Steady State Levels Are Reciprocally Related. *PLoS ONE*, 4:e4861, 2009.

CHENG, S.L., YANH, 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*, 134:277-286, 1994.

CHENG, S.L., LOU, J., WRIGHT, N.M. In vitro and in vivo induction of bone formation using a recombinant adenoviral vector carrying the human BMP-2 gene. *Calcif Tissue Int.*, 68:87–94, 2001.

CHURCH, D.M., GOODSTADT, L., HILLIER, L.W., ZODY, M.C., GOLDSTEIN, S., et al. Lineage-Specific Biology Revealed by a Finished Genome Assembly of the Mouse. *PLoS Biol.*, 7(5):, 2009

COELHO, M.J., CABRAL, A.T., FERNANDES, 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*, 21:1087-1094, 2000.

COHEN, B.A., MITRA, R.D., HUGHES, J.D., CHURCH, G.M. A computational analysis of whole-genome expression data reveals chromosomal domains of gene expression. *Nature Genetics*, 26:183–186, 2000.

DAWSON, D.A, AKESSON, M., BURKE, T., PEMBERTON, J.M., SLATE, J., HANSSON, B. Gene order and recombination rate in homologous chromosome regions of the chicken and a passerine bird. *Molecular Biology and Evolution*, 24:1537–1552, 2007.

DEVINE, S.M., COBBS, C., JENNINGS, M., BARTHOLOMEW, A. AND HOFFMAN, R. Mesenchymal stem cells distribute to a wide range of tissues following systemic infusion into nonhuman primates. *Blood*, 101:2999-3001, 2003.

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

EISEN, M. B., Spellman, P.T., Brown, P.O., Botstein, D. Cluster analysis and display of genome-wide expression pattern. *In Proc. of National Academy of Sciences*, 95:14863-14868, 1998.

ENARD, W., KHAITOVICH, P. KLOSE, J. et al. Intra- and interspecific variation in primate gene expression patterns. *Science*, 296:340–343, 2002

GIACHELLI, C.M., STEITZ, S. Osteopontin: a versatile regulator of inflammation and biomineralization. *Matrix Biol.*, 19:615-622, 2000.

GLOBUS, R.K., DOTY, S.B., LULL, J.C., HOLMUHAMEDOV, E., M. HUMPHRIES J., DAMSKY, C. H. Fibronectin is a survival factor for differentiated osteoblasts. *Journal of Cell Science*, 111:1385-1393, 1998.

GRASSEL S, AHMED N. Influence of cellular microenvironment and paracrine signals on chondrogenic differentiation. *Front Biosci.i*. 12:4946–56, 2007.

GRIGORYEV, D.N., MA, S.-F., IRIZARRY, R.A., YE, S.Q., QUACKENBUSH, J., GARCIA, J. G. Orthologous gene-expression profiling in multi-species models: search for candidate genes. *Genome Biology*, 5:R34, 2004.

GRONTHOS, S., MANKANI, M., BRAHIM, P., ROBEY, P.G., SHI, S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) *in vitro* and *in vivo*. *PNAS*, 97(25):13625-13630, 2000.

HAIG, D. A brief history of human autosomes. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.*, 354:1447-1470, 1999.

HANKS, C.T., SUN, Z.L., FANG, D.N., EDWARDS, C.A., WATAHA, J.C., RITCHIE, H.H., *ET AL.* Cloned 3T6 cell line from CD-1 mouse fetal molar dental papillae. *Connect Tissue Res.*, 37:233-249, 1998.

HOLSTEIN, J.H., HERRMANN, M., SPLETT, C., HERRMANN, W., GARCIA, P., HISTING, T., GRAEBER, S., ONG, M.F., KURZ, K., SIEBEL, T., MENGER, M.D., POHLEMANN, T. Low serum folate and vitamin B-6 are associated with an altered cancellous bone structure in humans. *Am. J. Clin. Nutr.*, 90:1440-5, 2009.

HORWITZ, E.M., LE BLANC, K., DOMININI, M., MUELLER, I., SLAPER-CORTENBACH, I., MARINI, F.C., DEANS, R. J., KRAUSE, D. S., KEATING, A. Clarification of the nomenclature for MSC: The international Society fo Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 7:393-395, 2005.

HUANG, Y., ARORA, P., MCCULLOCH, C. A., VOGEL, W. F. The collagen receptor DDR1 regulates cell spreading and motility by associating with myosin IIA. *J. Cell. Sci.*, 122:1637-1646, 2009.

HURST, L.D, PAL, C., LERCHER, M.J. The evolutionary dynamics of eukaryotic gene order. *Nature Reviews Genetics*, 5:299-310, 2004.

IRIE, K., ZALZAL, S., OZAWA, H., McKEE, M.D., NANCI, A. Morphological and immunocytochemical characterization of primary osteogênica cell cultures derived from fetal rat cranial tissue. *Anat Rec.*, 252:554-567, 1998.

JAVAZON, E. H., BEGGS, K. J., FLAKE, A. W. Mesenchymal stem cells: paradoxes of passing. *Exp Hematol*, 32:414-25, 2004.

JEONG, D., KIM, J.M., CHA, H., OH, J.G., PARK, J., YUN, S.H., JU, E.S., JEON, E.S., HAJJAR, R.J., PARK, W.J. PICOT attenuates cardiac hypertrophy by disrupting calcineurin-NFAT signaling. *Circ. Res.*, 102:711-9, 2008.

JIKKO, A., HARRIS, S.E., CHEN, D., MENDRICK, D.L., DAMSKY, C.H. Collagen Integrin Receptors Regulate Early Osteoblast Differentiation Induced by BMP-2. *Journal of Bone and Mineral Research*, 14:1075-1083, 1999.

KARSENTY, G. Minireview: transcriptional control of osteoblast differentiation. *Endocrinology*. 142:2731-2733, 2001.

KERKIS, I., KERKIS, A., DOZORTSEV, D., STUKART-PARSONS, G.C., GOMES, MASSIRONI, S.M., PEREIRA, L.V., CAPLAN, A.I., CERRUTI, H.F. Isolation and characterization of a population of immature dental pulp stem cells expressing OCT-4 and other embryonic stem cells markers. *Cells Tissues Organs*, 184:105-16, 2000.

KOOY, D., WEISS, S. Why stem cells? *Science*, 287:733-738, 2000.

LAKSHMIPATHY, U. AND HART, R. P. Concise Review: MicroRNA Expression in Multipotent Mesenchymal Stromal Cells. *Stem Cells and Regenerative Medicine*, 26(2): 356–363, 2008.

LI, W.-H.. Molecular evolution. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, 1997.

LIAO, B.Y., ZHANG, J. Evolutionary conservation of expression profiles between human and mouse orthologous genes. *Mol Biol Evol*, 23:530–40, 2006

LIECHTY, K.W., MACKENZIE, T C., SHAABAN, A.F., RADU, A., MOSELEY, A. M., DEANS, R., MARSHAK, D.R. AND FLAKE, A.W. Human mesenchymal stem cells engraft and demonstrate site-specific differentiation after in utero transplantation in sheep. *Nat. Med.* 11:1282-1286, 2002.

MACEDO, CLÁUDIA ; EVANGELISTA, ADRIANE F. ; MAGALHÃES, DANIELLE A. ; FORNARI, THAÍS A. ; LINHARES, LEANDRA L. ; JUNTA, CRISTINA M. ; SILVA, GUILHERME L. ; SAKAMOTO-HOJO, ELZA T. ; DONADI, EDUARDO A. ; SAVINO, WILSON . Evidence for a network transcriptional control of promiscuous gene expression in medullary thymic epithelial cells. *Molecular Immunology*, 46:3240-3244, 2009.

MACEDO, C. ; MAGALHÃES, DANIELLE A. ; TONANI, MONIQUE ; MARQUES, MÁRCIA C. ; JUNTA, CRISTINA M. ; PASSOS, GERALDO A. S. . Genes that code for T cell signaling proteins establish transcriptional regulatory networks during thymus ontogeny. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 318:63-71, 2008.

MEZEY, J.G., NUZHDIN, S.V., YE, F., JONES, C. D, Coordinated evolution of co-expressed gene clusters in the Drosophila transcriptome. *BMC Evolutionary Biology*, 8:1–17, 2008.

McKEE, M.D., NANJI, A. Osteopontin at mineralized tissue interfaces in bone, teeth and osseointegrated implants: ultrastructural distribution and implications for mineralized tissue formation, turnover and repair. *Microsc. Res. Tech.*, 33:141-164, 1996.

MEIRELLES, L.S., CHAGASTELLES, P.C., NARDI, N.B. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J Cell Sci*, 119:2204-2213, 2006.

MIURA, M., GRONTHOS, S., ZHAO, M., LU, B., FISHER, W., ROBEY, P. G., SHI, S. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *PNAS*, 100(10):5807-5812, 2003.

MOUTSATSOS, I.K., TURGEMAN, G., ZHOU, S. Exogenously regulated stem cell-mediated gene therapy for bone regeneration. *Mol Ther.*, 3:449 – 461, 2001.

MULLER, S., STANYON, R., FINELLI, P., ARCHIDIACONO, N., WIENBERG, J. Molecular cytogenetic dissection of human chromosomes 3 and 21 evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97:206-211, 2000.

MURO, A. F., CHAUHAN, A. K., GAJOVIC, S., IACONCIG, A., PORRO, F., STANTA, G., BARALLE, F. E. Regulated splicing of the fibronectin EDA exon is essential for proper skin wound healing and normal lifespan. *J. Cell. Biol.* 162: 149-160, 2003.

NANCI, A, ZALZAL, S, GOTOH, McKEE, MD. Ultrastructural characterization and immunolocalization of osteopontin in rat calvarial osteoblast primary cultures. *Microsc. Res. Tech.*, 33:214-321, 1996.

NEI, M., AND KUMAR, S. Molecular evolution and phylogenetics. Oxford University Press, New York, 2000.

OLEKSIK, M.F., CHURCHILL, G.A. AND CRAWFORD, D.L. Variation in gene expression within and among natural populations. *Nat. Genet.*, 32:261–266, 2002.

OWEN, M. The origin of bone cells in the postnatal organism. *Arthritis Rheum*, 23:1073-1077, 1980.

PASSARGE, E., HORSTHEMKE, B., FARBER, R.A. Incorrect use of the term synteny. *Nature Genetics*, 23: 387, 1999.

PATTERSON, J.M.K. Measurement of growth and viability of cells in culture. *Meth Enzymol*, 58: 141-152, 1979.

PEREIRA, C.T.M.B.S., HUANG, W., JARRAHY, R.M.D., RUDKIN, G.M.D., YAMAGUCHI, D.T.M.D., MILLER, T.A.M.D. Human and Mouse Osteoprogenitor Cells Exhibit Distinct Patterns of Osteogenesis in Three-Dimensional Tissue Engineering Scaffolds. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 124:1869-1879, 2009.

PFÄFFL, M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*. 29:45-, 2001.

PIERONI, F., OLIVEIRA, F.M., PANEPUCCI, 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.*, 37:801-802, 2006.

PIHLAJANIEMI, T., HELAAKOSKI, T., TASANEN, K., MYLLYLÄ, R., HUHTALA, M.-L., KOIVU, J., KIVIRIKKO, K. I. Molecular cloning of the beta-subunit of human prolyl 4-hydroxylase: this subunit and protein disulphide isomerase are products of the same gene. *EMBO J.*, 6: 643-649, 1987.

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*, 284:143-147, 1999.

PRIMER3: WWW primer tool. Desenvolvido por: Steve Rozen e Whitehead Institute/MT Center for Genome Research. Ferramenta de Bioinformática para a construção de primers. Disponível em: <http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi> Acesso em 28 mai. 2009. Site.

PROCKOP, D. J. Marrow Stromal Cells as Stem Cells for Nonhematopoietic tissues. *Science*, 276:71-74, 1997.

QUARLES, L.D., QUARLES, D.A., YOHAY, L.W., LEVER, R., CATON AND R.J. WENSTRUP. Distinct proliferative and differentiated stages of murine MC3T3-E1 cells in culture: an in vitro model of osteoblast development. *J. Bone Miner. Res.* 7:683-692, 1992.

RANZ, J.M., CASTILLO-DAVIS, C.I., MEIKLEJOHN, C.D. AND HARTL, D.L. Sex-dependent gene expression and evolution of the Drosophila transcriptome. *Science*, 300:1742-1745, 2003.

RETTENBERGER, G., KLETT, C., ZECHER, U., KUNZ, J., VOGEL, W., HAMEISTER, H. Visualization of the conservation of synteny between human and pigas by heterologous chromosomal painting. *Genomics*. 26:372-378, 1995.

RIFKIN, S.A., KIM, J. AND WHITE, K.P.. Evolution of gene expression in the Drosophila melanogaster subgroup. *Nat. Genet.* 33:138-144, 2003.

ROBINSON, T. J., SEIFFERT, E. Afrotherian origins and interrelationships: new view and future prospects. *Curr. Top. Dev. Biol.*, 63:37-60, 2004.

ROSA, A.L., BELOTI, M.M., Effect of cpTi surface roughness on human bone marrow cells. *Braz Dent J.*, 14:16-21, 2003.

SAKAMOTO-HOJO, E.T., MELLO, S.S., CARDOSO, R.S., PASSOS, G.A.S. Utilização de genômica funcional e proteômica em mutagênese (Cap. 12). *Mutagênese Ambiental*. Ed. ULBRA. Pp. 356.

SAMMONS, J., AHMED, N., EL-SHEEMY, M. The role of BMP-6, IL-6, and BMP-4 in mesenchymal stem cell-dependent bone development: Effects on osteoblastic differentiation induced by parathyroid hormone and vitamin D(3). *Stem Cells Dev.*, 13:273–280, 2004.

SCHWINDT, T. T., BARNABÉ, G.F., MELLO, L. E. A. M. Proliferar ou diferenciar? Perspectivas de destino das células-tronco. *Jornal Brasileiro de Neurocirurgia*, 16:13-19, 2005.

SCHWARTZ, Z., BOYAN, B.D. Underlying mechanisms at the bone biomaterial interface. *Journal of Cellular Biochemistry*, 56:340-347, 1994

SEMON, M., DURET, L. Evolutionary origin and maintenance of coexpressed gene clusters in mammals. *Mol Biol Evol.*, 23:1715–1723, 2006.

SEO, B.M., MIURA, M., GRONTHOS, S., BARTOLD, P.M., BATOULI, S., RAHIM, J. et al. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet*, 364:149-155, 2004.

SHANNON, P., MARKIEL, A., OZIER, O., BALIGA, N., WANG, J., RAMAGE, D., AMIN, N., SCHWIKOWSKI, B., IDEKER, T. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res.*, 13:2498-2504, 2003.

SHEA, C.M., EDGAR, C.M., EINHORN, T.A. BMP treatment of C3H10T1/2 mesenchymal stem cells induces both chondrogenesis and osteogenesis. *J Cellul Bioch.*, 90:1112–1127, 2003.

SHERTHAN, H., CREMER, T., ANARSON, U., WEIER, H. U., LIMA-SE-FARIA, A., FRONICKE, L. Comparative chromosome painting discloses homologous segments in distantly related mammals. *Nat. Genet.*, 6:342-347, 1994.

SHI, S., ROBEY, P.G., GRONTHOS, S. Comparison of human dental pulp and bone marrow stromal stem cells by DNA microarray analysis. *Bone*, 29:532-539, 2001.

SODEK, J., GANSS, B., MCKEE, M.D. Osteopontin. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.*, 11:279-282, 2000.

SOURCE. Produzido por Stanford University, 2000. Disponível em: <<http://smd.stanford.edu/cgi-bin/source/sourceSearch>>. Acessado em 10 Dez. 2009.

SPELLMAN, P.T., RUBIN, G.M. Evidence for large domains of similarly expressed genes in the drosophila genome. *J Bio.*, 1:5, 2002.

TARAS, T. A., SHIZUKO T., BAYAN, S., SARAH, DE V., KE L., LU, W., DOMINIC, J. W., GEORGE, B. AND FRANCESCO, R. Identification of a Repressor in the First Intron of the Human 2(I) Collagen Gene (COL1A2). *Journal of Biological Chemistry*, 280: 35417–35423, 2005.

TOWNSEND, J. P., CAVALIERI, D. AND Hartl, D.L. Population genetic variation in genome-wide gene expression. *Mol. Biol. Evol.* 20:955–963, 2003.

TUSHER, V.G., TIBSHIRANI, R., CHU, G. Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc Natl Acad Sci*, 98(9):5116-21, 2001.

UCCELLI, A., MORETTA, L., PISTOIA, V. Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nat Rev immunol.* 8(9), 726-36, 2008.

WINSLOW, M.M., PAN, M., STARBUCK, M., GALLO, E.M., DENG, L., KARSENTY, G., CRABTREE, G.R. Calcineurin/NFAT signaling in osteoblasts regulates bone mass. *Dev. Cell.*, 10:771-782, 2006.

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*, 20(18):3691-3, 2004a.

WU, B.-T., SU, Y.-H., TSAI, M.-T., WASSERMAN, S. M., TOPPER, J. N., YANG, R.-B. A Novel Secreted, Cell-surface Glycoprotein Containing Multiple Epidermal Growth Factor-like Repeats and One CUB Domain Is Highly Expressed in Primary Osteoblasts and Bones. *J. Biol. Chem.* 279: 37485-37490, 2004b.

YAMADA, K., AOTA, S., AKIYAMA, A. AND LAFLAMME, S. Mechanisms of fibronectin and integrin function during cell adhesion and migration. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, LVII, 203-212, 1992.

YANAI, I., AND HUNTER, C.P. Comparison of diverse developmental transcriptomes reveals that coexpression of gene neighbors is not evolutionarily conserved. *Genome Res.*, 19:2214-2220, 2009.

YANG, F. O'BRIEN, P. C. M., WIENBER, J., FERGUSON-SMITH, M.A. A reappraisal of the tandem fusion theory of karyotype evolution in the Indian muntjac using chromosome painting. *Chromosome Res.*, 5:109-117, 1997.

YOSHITAKE, H., RITTLING, S.R., DENHARDT, D.T., NODA, M. Osteopontin-deficient mice are resistant to ovariectomy-induced bone resorption. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 96:8156-8169, 1999.

ZAGO, M. A., COVAS, D. T. Células-tronco, a nova fronteira da medicina. *São Paulo: Ed. Atheneu*, 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. Stem cells and cardiovascular tissue repair: Mechanism, methods, and clinical applications. *Journal of Cardiothoracic-Renal Research*, 1:3-14, 2006

Anexos

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

O senhor (a) está 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 da análise dos genes destas células. Não será realizado nenhum outro procedimento além daquele que você será submetido no 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 a 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 célula 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 a pesquisa. A qualquer momento poderá desistir de participar do estudo sem que isso traga prejuízo a 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) 3602-3030

Prof^a. Dr^a. Karina Fittipaldi Bombonato Prado. Fone: (16) 3602-4052

ANEXO A

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE 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, a 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 asseguradas, a seguir relacionados:

1. A garantia de receber a resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento de qualquer dúvida dos procedimentos, riscos, benefícios e outras situações relacionadas com a pesquisa e o tratamento a que serei submetido.
2. A liberdade de retirar o meu consentimento e deixar de participar do estudo, a qualquer momento, sem que isso traga prejuízo a continuidade do meu tratamento.
3. A segurança de que não serei identificado e que será mantido o caráter confidencial da informação relacionada a minha privacidade.
4. o compromisso de que me será prestada informação atualizada durante o estudo, ainda que esta possa afetar a minha vontade de continuar dele participando.
5. O compromisso de que não serão realizados quaisquer outros procedimentos além daqueles necessários para o tratamento. Portanto, não haverá qualquer risco ou desconforto adicional.
6. 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 de pesquisa.
7. 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

Lista dos 75 genes diferencialmente expressos humano com seus respectivos símbolos e localizações cromossômicas.

Name	Símbolo	Cromossomo	Citobanda
ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 2	ABCA2	9	9q34
ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 1	ABCG1	21	21q22.3
Aldehyde dehydrogenase 3 family, member A2	ALDH3A2	17	17p11.2
Biglycan	BGN	X	Xq28
Cdk5 and Abl enzyme substrate 2	CABLES2	20	20q13.33
Calumenin	CALU	7	7q32.1
Calpain 10	CAPN10	2	2q37.3
ArfGAP with coiled-coil, ankyrin repeat and PH domains 2	CENTB2	3	3q29
Centrosomal protein 350kDa	CEP350	1	1p36.13-q41
Checkpoint with forkhead and ring finger domains	CHFR	12	12q24.33
Carboxymethylenebutenolidase homolog (Pseudomonas)	CMBL	5	5p15.2
Cappuccino homolog (mouse)	CNO	4	4p16.1
CCR4-NOT transcription complex, subunit 1	CNOT1	16	16q21
CContactin associated protein-like 2	CNTNAP2	7	7q35-q36
Collagen, type I, alpha 2	COL1A2	7	7q22.1
Collagen, type VI, alpha 3	COL6A3	2	2q37
COX16 cytochrome c oxidase assembly homolog (S. cerevisiae)	COX16	14	14q24.2
CASP2 and RIPK1 domain containing adaptor with death domain	CRADD	12	12q21.33-q23.1
CUG triplet repeat, RNA binding protein 1	CUGBP1	11	11p11
CUG triplet repeat, RNA binding protein 2	CUGBP2	10	10p13
Cytochrome b-561 domain containing 2	CYB561D2	3	3p21.3
Defender against cell death 1	DAD1	14	14q11-q12
DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 47	DDX47	12	12p13.1
DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 5	DDX5	17	17q21
Dynein, cytoplasmic 1, intermediate chain 1	DYNC1I1	7	7q21.3-q22.1
Eukaryotic translation initiation factor 1	EIF1	17	17q21.2
Exocyst complex component 5	EXOC5	14	14q22.3
Family with sequence similarity 108, member B1	FAM108B1	9	9q21.13
Fibronectin 1	FN1	2	2q34
FERM domain containing 4A	FRMD4A	10	10p13
GCN1 general control of amino-acid synthesis 1-like 1 (yeast)	GCN1L1	12	12q24.2

Golgi phosphoprotein 3 (coat-protein)	GOLPH3	5	5p13.3
G protein-coupled receptor 75	GPR75	2	2p16
Hypocretin (orexin) receptor 1	HCRTR1	1	1p33
Haloacid dehalogenase-like hydrolase domain containing 1A	HDHD1A	X	Xp22.32
3-hydroxymethyl-3-methylglutaryl-Coenzyme A lyase	HMGCL	1	1p36.1-p35 10q11.21-q11.22
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F	HNRPF	10	17q11-q21
Hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 1	HSD17B1	17	10q26.3
HtrA serine peptidase 1	HTRA1	10	7q31.3-q32
IMP (inosine monophosphate) dehydrogenase 1	IMPDH1	7	
Potassium large conductance calcium-activated channel, subfamily M, beta member 4	KCNMB4	12	12q
KH-type splicing regulatory protein KIAA0415	KHSRP	19	19p13.3
Macrophage erythroblast attacher	KIAA0415	7	7p22.2
Microsomal glutathione S-transferase 3	MAEA	4	4p16.3
Myosin, heavy chain 9, non-muscle	MGST3	1	1q23
Neurocalcin delta	MYH9	22	22q13.1
NIMA (never in mitosis gene a)- related kinase 8	NCALD	8	8q22.2
Otoferlin	NEK8	17	17q11.1
Prolyl 4-hydroxylase, beta polypeptide	OTOF	2	2p23.1
Propionyl Coenzyme A carboxylase, alpha polypeptide	P4HB	17	17q25
Protocadherin 17	PCCA	13	13q32
Pyridoxal (pyridoxine, vitamin B6) phosphatase	PCDH17	13	13q21.1
Peroxisomal biogenesis factor 11 alpha	PDXP	22	22cen-q12.3
Phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase, type I, alpha	PEX11A	15	15q26.1
Polymerase (RNA) III (DNA directed) polypeptide E (80kD)	PIP5K1A	1	1q22-q24
Protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 11	POLR3E	16	16p12.2
Pleckstrin and Sec7 domain containing 2	PPP1R11	6	6p21.3
RAD51-like 3 (<i>S. cerevisiae</i>)	PSD2	5	5q31.2
Rap guanine nucleotide exchange factor (GEF) 6	RAD51L3	17	17q11
DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 27	RAPGEF6	5	5q31.1
REST corepressor 1	RBJ	2	2p23.3
REC8-like 1 (yeast)	RCOR1	14	14q32.31
R-spondin 2 homolog (<i>Xenopus laevis</i>)	REC8L1	14	14q11.2-q12
Signal peptide, CUB domain, EGF-like 3	RSPO2	8	8q23.1
SH2 domain containing 3C	SCUBE3	6	6p21.3
Solute carrier family 12 (potassium-chloride transporter), member 5	SH2D3C	9	9q34.11
THO complex 2	SLC12A5	20	20q13.12
	THOC2	X	Xq25-q26.3

Tolloid-like 1	TLL1	4	4q32-q33
Membrane magnesium transporter 1	TMEM32	X	Xq26.3
Glutaredoxin 3	TXNL2	10	10q26
Ubiquinol-cytochrome c reductase core protein II	UQCRC2	16	16p12
Vestigial like 3 (Drosophila)	VGLL3	3	3p12.1
X (inactive)-specific transcript (non-protein coding)	XIST	X	Xq13.2
Zinc finger protein 354A	ZNF354A	5	5q35.3

ANEXO C

Lista dos 75 genes diferencialmente expressos murinos com seus respectivos símbolos e localizações cromossômicas.

Name	Símbolos	Cromossomo	Citobanda
ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 2	Abca2	2	2 A2-B
ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 1	Abcg1	17	0
Aldehyde dehydrogenase 3 family, member A2	Aldh3a2	11	11 B2
Biglycan	Bgn	X	X B
Cdk5 and Abl enzyme substrate 2	Cox16	12	12 D2
Calumenin	Fam108b	19	19 B
Calpain 10	Cables2	2	2 H4
ArfGAP with coiled-coil, ankyrin repeat and PH domains 2	Calu	6	6 A3.3
Centrosomal protein 350kDa	Capn10	1	1 D
Checkpoint with forkhead and ring finger domains	Centb2	16	16 B2-C
Carboxymethylenebutenolidase homolog (Pseudomonas)	Cep350	1	1 G3
Cappuccino homolog (mouse)	Chfr	5	5 F
CCR4-NOT transcription complex, subunit 1	Cno	5	5 B3
CContactin associated protein-like 2	Cnot1	8	8 D1
Collagen, type I, alpha 2	Ctnnap2	6	6 B2
Collagen, type VI, alpha 3	Col1a2	6	6 A1
COX16 cytochrome c oxidase assembly homolog (S. cerevisiae)	Col6a3	1	1 D
CASP2 and RIPK1 domain containing adaptor with death domain	Cradd	10	10 C2
CUG triplet repeat, RNA binding protein 1	Cugbp1	2	2 E1
CUG triplet repeat, RNA binding protein 2	Cugbp2	2	2 A2-A3
Cytochrome b-561 domain containing 2	Cyb561d2	9	9 F1
Defender against cell death 1	Dad1	14	14 C2
DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 47	Ddx47	6	6 G1
DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 5	Ddx5	11	11 E2
Dynein, cytoplasmic 1, intermediate chain 1	Eif1	11	11 D
Eukaryotic translation initiation factor 1	Exoc5	14	14 C1
Exocyst complex component 5	Fn1	1	1 C1-C5
Family with sequence similarity 108, member B1	Frmd4a	2	2 A1
Fibronectin 1	Gcn1l1	5	5 F
FERM domain containing 4A	Golph3	15	15 A1
GCN1 general control of amino-acid synthesis 1-like 1 (yeast)	Gpr75	11	11 A4

Golgi phosphoprotein 3 (coat-protein)	Hcrtr1	4	4 D2.2
G protein-coupled receptor 75	Hdhd1a	18	18 C
Hypocretin (orexin) receptor 1	Hmgcl	4	4 D3
Haloacid dehalogenase-like hydrolase domain containing 1A	Hnrpf	6	6 F1-C
3-hydroxymethyl-3-methylglutaryl-Coenzyme A lyase	Hsd17b1	11	11 D
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F	Htra1	7	7 F3
Hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 1	Impdh1	6	6 A3
HtrA serine peptidase 1	Kcnmb4	10	10 D2
IMP (inosine monophosphate) dehydrogenase 1	Khsrp	17	17 D
Potassium large conductance calcium-activated channel, subfamily M, beta member 4	Kiaa0415	5	5 G2-C
KH-type splicing regulatory protein	Cmb1	15	15 B2
KIAA0415	Maea	5	5 B1
Macrophage erythroblast attacher	Mgst3	1	1 H2
Microsomal glutathione S-transferase 3	Myh9	15	15 E1
Myosin, heavy chain 9, non-muscle	Ncald	15	15 B3.1
Neurocalcin delta	Nek8	11	11 B5
NIMA (never in mitosis gene a)- related kinase 8	Otof	5	
Otoferlin	P4hb	11	11 D-E
Prolyl 4-hydroxylase, beta polypeptide	Pcca	14	14
Propionyl Coenzyme A carboxylase, alpha polypeptide	Pcdh17	14	14 D3
Protocadherin 17	Pdpx	15	15 E1
Pyridoxal (pyridoxine, vitamin B6) phosphatase	Pex11a	7	7 D2
Peroxisomal biogenesis factor 11 alpha	Pip5k1a	3	3 F2.1
Phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase, type I, alpha	Polr3e	7	7 F3
Polymerase (RNA) III (DNA directed) polypeptide E (80kD)	Ppp1r11	17	17 B1
Protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 11	Psd2	18	18 B2
Pleckstrin and Sec7 domain containing 2	Rad51l3	11	11 C
RAD51-like 3 (<i>S. cerevisiae</i>)	Rapgef6	11	11 B1.3
Rap guanine nucleotide exchange factor (GEF) 6	Rbj	12	12 A1.1-C
DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 27	Rcor1	12	12 F1
REST corepressor 1	Rec8l1	14	14 15 B3.1-
REC8-like 1 (yeast)	Rspo2	15	B3.2
R-spondin 2 homolog (<i>Xenopus laevis</i>)	Scube3	17	17 A3.3
Signal peptide, CUB domain, EGF-like 3	Sh2d3c	2	2 B
SH2 domain containing 3C	Slc12a5	2	2 G2-G3
Solute carrier family 12 (potassium-chloride transporter), member 5	Thoc2	X	X A4
THO complex 2	Tll1	8	8 B3.1

Tolloid-like 1	Tmem32	X	X A5-C
Membrane magnesium transporter 1	Txn12	7	7 F5-C
Glutaredoxin 3	Uqcrc2	7	7 F2
Ubiquinol-cytochrome c reductase core protein II	Vgl13	16	16 C1.3
Vestigial like 3 (Drosophila)	Xist	X	X D
X (inactive)-specific transcript (non-protein coding)	Zc3h6	2	2 F1
Zinc finger protein 354A	Znp354a	11	11 B1.3

ANEXO D

Lista dos nós gênicos presentes nas redes com seus respectivos símbolos e identidade conservada de suas sequências protéicas e de DNA.

Espécies	Gene	Identidade (%)		
		Símbolo	Proteína	DNA
Homo sapiens		COL1A2		
vs. Mus musculus		Col1a2	90	87.7
vs. Rattus norvegicus		Col1a2	91.1	88.5
vs. Bos taurus		COL1A2	93	90.3
vs. Canis lupus familiaris		COL1A2	94.4	91.6
vs. Gallus gallus		COL1A2	83.8	80.3
Homo sapiens		HDHD1A		
vs. Mus musculus		Hdhd1a	71.2	74.8
vs. Rattus norvegicus		Hdhd1a	73.5	75.2
vs. Bos taurus		HDHD1A	81.6	77.8
vs. Canis lupus familiaris		HDHD1A	86.7	83.3
vs. Gallus gallus		HDHD1A	70.9	70.3
Homo sapiens		SCUBE3		
vs. Mus musculus		Scube3	95.9	89.6
vs. Rattus norvegicus		Scube3	95.9	89.6
vs. Bos taurus		-	-	-
vs. Canis lupus familiaris		SCUBE3	96.6	93.2
vs. Gallus gallus		SCUBE3	84.8	79.7
Homo sapiens		PDXP		
vs. Mus musculus		Pdpx	92.5	89.8
vs. Rattus norvegicus		-	-	-
vs. Bos taurus		PDXP	93.9	91.1
vs. Canis lupus familiaris		-	-	-
vs. Gallus gallus		-	-	-
Homo sapiens		FN1		
vs. Mus musculus		Fn1	92.2	87.5
vs. Rattus norvegicus		Fn1	92.3	87.3
vs. Bos taurus		FN1	94	90.4
vs. Canis lupus familiaris		FN1	95.2	90.9
vs. Gallus gallus		FN1	82.3	77.9

Homo sapiens	MYH9		
vs. <i>Mus musculus</i>	Myh9	97.1	90.5
vs. <i>Rattus norvegicus</i>	Myh9	96.2	89.8
vs. <i>Bos taurus</i>	-	-	-
vs. <i>Canis lupus familiaris</i>	MYH9	98.4	92.7
vs. <i>Gallus gallus</i>	MYH9	92.8	80.9

Homo sapiens	PPP1R11		
vs. <i>Mus musculus</i>	Ppp1r11	88.9	86.5
vs. <i>Rattus norvegicus</i>	Ppp1r11	95.2	90.2
vs. <i>Bos taurus</i>	PPP1R11	96	94.2
vs. <i>Canis lupus familiaris</i>	PPP1R11	96	92.3
vs. <i>Gallus gallus</i>	-	-	-

Homo sapiens	TXNL2		
vs. <i>Mus musculus</i>	Txnl2	92.8	90.1
vs. <i>Rattus norvegicus</i>	Txnl2	93.4	90.7
vs. <i>Bos taurus</i>	TXNL2	94.3	90.2
vs. <i>Canis lupus familiaris</i>	TXNL2	93.4	90.8
vs. <i>Gallus gallus</i>	TXNL2	82	78.5

Homo sapiens	P4HB		
vs. <i>Mus musculus</i>	P4hb	94.3	87
vs. <i>Rattus norvegicus</i>	P4hb	94.1	86.7
vs. <i>Bos taurus</i>	P4HB	95.3	89.6
vs. <i>Canis lupus familiaris</i>	P4HB	93.5	88.5
vs. <i>Gallus gallus</i>	P4HB	86.4	79

ANEXO E

Interações entre os nós gênicos e os genes regulados (redes gênicas humanas)

Genes que regulam	Genes regulados	Tipos de interação	Genes que regulam	Genes regulados	Tipos de interação	
FN1	BGN	Positiva	FN1	ABCG1	Negativa	
	CABLES2	Positiva		CNOT1	Negativa	
	CAPN10	Positiva		COL1A2	Negativa	
	CNTNAP2	Positiva		COL6A3	Negativa	
	CRADD	Positiva		FAM108B1	Negativa	
	CYB561D2	Positiva		GPR75	Negativa	
	EIF1	Positiva		HDHD1A	Negativa	
	FRMD4A	Positiva		HSD17B1	Negativa	
	GCN1L1	Positiva		NEK8	Negativa	
	HMGCL	Positiva		PDXP	Negativa	
	HNRPF	Positiva		PEX11A	Negativa	
	HTRA1	Positiva		PPP1R11	Negativa	
	IMPDH1	Positiva		SCUBE3	Negativa	
	KCNMB4	Positiva		UQCRC2	Negativa	
	MAEA	Positiva		MYH9	COL1A2	Negativa
	MYH9	Positiva			COL6A3	Negativa
	NCALD	Positiva	FAM108B1		Negativa	
	OTOF	Positiva	HDHD1A		Negativa	
	P4HB	Positiva	PPP1R11		Negativa	
	PCDH17	Positiva	SCUBE3		Negativa	
	REC8L1	Positiva	UQCRC2		Negativa	
	RSPO2	Positiva	P4HB		COL6A3	Negativa
	SH2D3C	Positiva		FAM108B1	Negativa	
	SLC12A5	Positiva		HDHD1A	Negativa	
THOC2	Positiva	HSD17B1		Negativa		
TLL1	Positiva	PDXP		Negativa		
TMEM32	Positiva	PPP1R11		Negativa		
TXNL2	Positiva	SCUBE3		Negativa		
VGLL3	Positiva	UQCRC2		Negativa		
ZNF354A	Positiva	PDXP	ABCG1	Negativa		
MYH9	BGN		Positiva	COL1A2	Negativa	
	CABLES2		Positiva	COL6A3	Negativa	
	CAPN10		Positiva	FAM108B1	Negativa	
	CNTNAP2		Positiva	GPR75	Negativa	
	CRADD		Positiva	HDHD1A	Negativa	
	CYB561D2		Positiva	HSD17B1	Negativa	
	EIF1		Positiva	NEK8	Negativa	
	FRMD4A	Positiva	PDXP	Negativa		

	GCN1L1	Positiva		PEX11A	Negativa	
	HMGCL	Positiva		PPP1R11	Negativa	
	HNRPF	Positiva		SCUBE3	Negativa	
	HTRA1	Positiva		UQCRC2	Negativa	
	IMPDH1	Positiva	PPP1R11	PPP1R11	Negativa	
	KCNMB4	Positiva	SCUBE3	COL1A2	Negativa	
	MAEA	Positiva		HDHD1A	Negativa	
	OTOF	Positiva		PPP1R11	Negativa	
	P4HB	Positiva		SCUBE3	Negativa	
	PCDH17	Positiva	TXNL2	ABCG1	Negativa	
	RSPO2	Positiva		COL6A3	Negativa	
	SH2D3C	Positiva		FAM108B1	Negativa	
	SLC12A5	Positiva		GPR75	Negativa	
	THOC2	Positiva		HDHD1A	Negativa	
	TLL1	Positiva		HSD17B1	Negativa	
	TMEM32	Positiva		PDXP	Negativa	
	TXNL2	Positiva		PEX11A	Negativa	
P4HB	BGN	Positiva			PPP1R11	Negativa
	CABLES2	Positiva			SCUBE3	Negativa
	CAPN10	Positiva			UQCRC2	Negativa
	CNTNAP2	Positiva		EIF1		Negativa
	CRADD	Positiva		DDX5		Negativa
	CYB561D2	Positiva		ABCA2		Negativa
	EIF1	Positiva	CALU		Negativa	
	FRMD4A	Positiva	CEP350		Negativa	
	GCN1L1	Positiva	CHFR	PPP1R11	Negativa	
	HMGCL	Positiva	HTRA1		Negativa	
	HTRA1	Positiva	OTOF		Negativa	
	IMPDH1	Positiva	RSPO2		Negativa	
	KCNMB4	Positiva	SLC12A5		Negativa	
	MAEA	Positiva	VGLL3		Negativa	
	OTOF	Positiva	ZNF354A		Negativa	
	P4HB	Positiva	VGLL3	HDHD1A	Negativa	
	PCDH17	Positiva	SLC12A5		Negativa	
	RSPO2	Positiva	DDX5		Negativa	
	SH2D3C	Positiva	HTRA1		Negativa	
	SLC12A5	Positiva	OTOF		Negativa	
THOC2	Positiva	RSPO2	SCUBE3	Negativa		
TLL1	Positiva	EIF1		Negativa		
TMEM32	Positiva	DDX5		Negativa		
TXNL2	Positiva	HTRA1		Negativa		
PDXP	BGN	Positiva	CEP350		Negativa	
	CABLES2	Positiva	OTOF		Negativa	
	CAPN10	Positiva	RSPO2		Negativa	
	CNTNAP2	Positiva	SLC12A5		Negativa	

	CRADD	Positiva	VGLL3		Negativa
	CYB561D2	Positiva	DDX5	PDXP	Negativa
	EIF1	Positiva	HTRA1		Negativa
	FRMD4A	Positiva			
	GCN1L1	Positiva			
	HMGCL	Positiva			
	HTRA1	Positiva			
	IMPDH1	Positiva			
	KCNMB4	Positiva			
	MAEA	Positiva			
	MYH9	Positiva			
	OTOF	Positiva			
	P4HB	Positiva			
	PCDH17	Positiva			
	REC8L1	Positiva			
	RSPO2	Positiva			
	SH2D3C	Positiva			
	SLC12A5	Positiva			
	THOC2	Positiva			
	TLL1	Positiva			
	TMEM32	Positiva			
	TXNL2	Positiva			
	ZNF354A	Positiva			
SCUBE3	BGN	Positiva			
	CABLES2	Positiva			
	CYB561D2	Positiva			
	EIF1	Positiva			
	FRMD4A	Positiva			
	GCN1L1	Positiva			
	HTRA1	Positiva			
	IMPDH1	Positiva			
	MAEA	Positiva			
	OTOF	Positiva			
	P4HB	Positiva			
	PCDH17	Positiva			
	RSPO2	Positiva			
	SLC12A5	Positiva			
	THOC2	Positiva			
	TLL1	Positiva			
	TMEM32	Positiva			
TXNL2	Positiva				
TXNL2	BGN	Positiva			
	CABLES2	Positiva			
	CAPN10	Positiva			
	CNTNAP2	Positiva			

	CRADD	Positiva
	CYB561D2	Positiva
	EIF1	Positiva
	FRMD4A	Positiva
	GCN1L1	Positiva
	HMGCL	Positiva
	HTRA1	Positiva
	IMPDH1	Positiva
	KCNMB4	Positiva
	MAEA	Positiva
	OTOF	Positiva
	P4HB	Positiva
	PCDH17	Positiva
	RSPO2	Positiva
	SH2D3C	Positiva
	SLC12A5	Positiva
	THOC2	Positiva
	TLL1	Positiva
	TMEM32	Positiva
	TXNL2	Positiva
MAEA	PPP1R11	Positiva
MAEA	SCUBE3	Positiva
RSPO2	TXNL2	Positiva
VGLL3		Positiva

ANEXO F

Interações entre os nós gênicos e os genes regulados (redes gênicas murinas)

Genes que regulam	Genes regulados	Tipos de interação	Gene que regulam	Genes regulados	Tipos de interação	
Col1a2	Abcg1	Positiva	Col1a2	Capn10	Negativa	
	Bgn	Positiva		Cep350	Negativa	
	Col1a2	Positiva		Cno	Negativa	
	Cox16	Positiva		Cnot1	Negativa	
	Dync111	Positiva		Cugbp1	Negativa	
	Gpr75	Positiva		Ddx5	Negativa	
	Hdhd1a	Positiva		Eif1	Negativa	
	Htra1	Positiva		Japmip3	Negativa	
	Maea	Positiva		Mgst3	Negativa	
	Ncald	Positiva		Polr4e	Negativa	
	Pdxp	Positiva		Rapgef6	Negativa	
	Ppp1r11	Positiva		Thoc2	Negativa	
	Scube3	Positiva		Vgll3	Negativa	
	Txn2	Positiva		Capn10	Negativa	
	Uqrc2	Positiva		Centb2	Negativa	
	Znf354a	Positiva		Cep350	Negativa	
Hdhd1a	Abcg1	Positiva	Hdhd1a	Cno	Negativa	
	Bgn	Positiva		Cnot1	Negativa	
	Col1a2	Positiva		Cugbp1	Negativa	
	Cox16	Positiva		Ddx5	Negativa	
	Dync111	Positiva		Eif1	Negativa	
	Fam108b	Positiva		Frmd4a	Negativa	
	Gpr75	Positiva		Japmip3	Negativa	
	Hdhd1a	Positiva		Mgst3	Negativa	
	Htra1	Positiva		Polr3e	Negativa	
	Kiaa0415	Positiva		Rapgef6	Negativa	
	Maea	Positiva		Thoc2	Negativa	
	Ncald	Positiva		Vgll3	Negativa	
	Pdxp	Positiva		A630047E20	Hdhd1a	Negativa
	Rspo2	Positiva		A630047E20	Scube3	Negativa
	Scube3	Positiva		Capn10	Col1a2	Negativa
	Txn2	Positiva		Centb2		Negativa
Uqrc2	Positiva	Cep350	Negativa			
Znf354a	Positiva	Chfr	Negativa			
Cradd	Col1a2	Cno	Negativa			
Cugbp2		Cnot1	Negativa			
Dync111		Cntnap2	Negativa			
Fam108b		A630047E20	Negativa			

Golph3		Positiva
Hsd17b1		Positiva
Htra1		Positiva
Kiaa0415		Positiva
Maea		Positiva
Pshd17		Positiva
Ppp1r11		Positiva
Xist		Positiva
Zc3h6		Positiva
Znf354a		Positiva
Maea	Hdhd1a	Positiva
Pshd17		Positiva
Pshd17	Scube3	Positiva
Maea		Positiva
Zc3h6		Positiva
Znf354a		Positiva
Golph3		Positiva
Ppp1r11	Hdhd1a	Positiva
Zc3h6		Positiva
Znf354a		Positiva
Golph3		Positiva

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](#)