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

VANESSA FONTANA

**Análise da expressão gênica em células-tronco mesenquimais de medula
óssea humana durante o comprometimento com a linhagem osteogênica**

Ribeirão Preto - SP

2009

VANESSA FONTANA

Análise da expressão gênica em células-tronco mesenquimais de medula óssea humana durante o comprometimento com a linhagem osteogênica

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Área de concentração: Genética

Orientador: Prof. Dr. Geraldo A. S. Passos

Ribeirão Preto - SP

2009

FONTANA, V.

ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA EM CÉLULAS-TRONCO
MESENQUIMAIS DE MEDULA ÓSSEA HUMANA DURANTE O
COMPROMETIMENTO COM A LINHAGEM OSTEOGÊNICA.

RIBEIRÃO PRETO, 2009

128p. il., 30cm.

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO. PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM GENÉTICA - FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO –
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO.

ORIENTADOR: PASSOS, GERALDO A.S.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Vanessa Fontana

Análise da expressão gênica em células-tronco mesenquimais de medula óssea humana durante o comprometimento com a linhagem osteogênica.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto para obtenção do título de Mestre.

Área de concentração: Genética

Aprovado em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho...

...com muito carinho e admiração ao meu grande amor e companheiro Ronaldo pelo apoio e incentivo incondicional em todos os momentos desta jornada. À minha mãe e meu irmão Vitor que estiveram sempre presentes mesmo geograficamente distantes. Aos colegas e amigos do grupo de Imunogenética Molecular.

AGRADECIMENTOS

Em especial, agradeço ao Prof. Geraldo, meu orientador, pelo acolhimento e confiança que sempre demonstrou ter por mim. Por permitir que eu me tornasse parte de uma grande equipe, acolhedora e cientificamente produtiva, o laboratório Imunogenética Molecular. Obrigada por tornar minha primeira experiência em pesquisa tão agradável e rica em aprendizado.

Aos colegas e amigos do laboratório de Imunogenética Molecular pelo companheirismo e pelas alegrias que marcaram estes três anos de convivência. Vocês estarão sempre em meu coração.

À toda a equipe das células-tronco coordenada pelo Prof. Dr. Geraldo Passos: as alunas Janaína, Adriane, Rayana, Glauce e os pesquisadores Profa. Dra. Karina F. Bombonato-Prado e Adalberto L. Rosa.

Ao Renato David Puga pela criação do programa de extração de dados do *GNF SymAtlas* que foi de extrema importância para a realização deste trabalho e certamente vai contribuir para inúmeros outros.

À Profa. Dra. Belinda Simões pela concessão das medulas ósseas fornecidas pelo Serviço de Transplante de Medula Óssea do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP.

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

Aos Profs.: Dr. Adalberto L. Rosa e Dr. Paulo Tambasco de Oliveira e sua equipe pela colaboração e disponibilização do laboratório para a realização de experimentos de cultura e imunofluorescência indireta.

Aos docentes, pós-graduandos, funcionários e especialmente ao coordenador Prof. Dr. Ademilson Espencer Egea Soares da Pós-Graduação do Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto 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 de suma importância para o desenvolvimento desse projeto.

RESUMO

FONTANA, V. **Análise da expressão gênica em células-tronco mesenquimais de medula óssea humana durante o comprometimento com a linhagem osteogênica**. 2009. 128 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

As células-tronco são definidas como células capazes de auto-renovação e diferenciação em células especializadas. Dentre as células-tronco adultas, as mesenquimais ocupam uma posição de destaque. São células multipotentes que podem originar células de origem mesodérmica, como osteoblastos, adipócitos e condrócitos. Além disso, vários estudos demonstraram que essas células também podem se diferenciar em células de origem extra-mesenquimal, como neurônios e hepatócitos, fenômeno este denominado plasticidade. Aspectos moleculares envolvidos com a plasticidade das células-tronco adultas, bem como durante o processo de comprometimento e diferenciação em células especializadas não estão completamente elucidados. Considera-se que as células-tronco expressam, embora em baixos níveis, uma gama diversa de genes relacionados aos diferentes destinos de diferenciação. Durante a diferenciação o repertório de genes expressos seria reduzido, acompanhado do aumento nos níveis de expressão de uma coleção menor de genes que orientariam a especialização celular. Para o presente estudo adotamos essa hipótese e elaboramos um sistema-modelo experimental no qual células-tronco mesenquimais de medula óssea humana foram induzidas *in vitro* à diferenciação em osteoblastos. As células-tronco mesenquimais foram obtidas de três doadores saudáveis de medula óssea e induzidas quimicamente à diferenciação em osteoblastos (meio α -MEM acrescido de dexametasona, ácido ascórbico e β -glicerofosfato) durante 24 h, 48 h, 7 dias e 21 dias. O RNA total foi extraído das culturas de células indiferenciadas (0h) e durante o processo de diferenciação (24 h, 48 h, 7 d e 21 d). Todo o processo de diferenciação foi monitorado com ensaios bioquímicos e por imunocitoquímica. Para avaliar a expressão gênica das células-tronco e durante o processo de diferenciação utilizamos a tecnologia dos *cDNA microarrays*. Os dados foram analisados com auxílio de programas de bioinformática especializados. Um banco público de dados de expressão gênica (*GNF Symatlas*) também foi consultado, o que nos auxiliou na interpretação dos dados. Sondas de

cDNA fluorescentes (Cy3) oriundas das amostras de RNA foram hibridizadas com os cDNA *microarrays* (4.500 seqüências alvo). Um *pool* de cDNAs irrelevantes marcados com Cy5 foi usada como referência na hibridização. A expressão gênica diferencial durante a diferenciação foi analisada pelo método SAM (*significance analysis of microarrays*) (FDR < 5%). Os genes diferencialmente expressos foram classificados segundo sua representação tecidual de acordo com os valores de expressão obtidos do banco de dados *GNF Symatlas*. Além disso, foi avaliada por RT-PCR semiquantitativa, a expressão de genes relacionados à osteogênese (ALPL, osteocalcina, COL1A1, RUNX2 e osteopontina), e um marcador de adipócitos, PPARG. Observamos que as células-tronco mesenquimais no seu estado “tronco” expressam, em níveis similares, genes característicos das linhagens osteo e adipocítica. Entretanto, ao longo do comprometimento com a linhagem osteoblástica o número de genes modulados (reprimidos e induzidos) é crescente. Revelamos que nas fases iniciais da diferenciação osteoblástica *in vitro* os genes que representam células-tronco adultas foram reprimidos. Entretanto, com o avanço do comprometimento com a linhagem osteoblástica observamos que certos genes foram induzidos como, por exemplo, BMP1, SMAD7, IGFBP4, ITGA5, FN1, BGN, CDH8, GDF10 e SCARB2, todos relacionados à osteogênese. Nossos resultados são importantes para um melhor entendimento das bases genético-moleculares associadas ao potencial “plástico” e de diferenciação das células-tronco mesenquimais.

Palavras chave: célula-tronco mesenquimal, plasticidade, diferenciação, osteogênese, expressão gênica.

ABSTRACT

FONTANA, V. **Gene expression analysis of mesenchymal stem cells from human bone marrow during the osteogenic commitment.** 2009. 128 f. Master's Dissertation –Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

Stem cells (SC) are defined by their property of self-renewal and differentiation into specialized cells. The adult mesenchymal stem cells (MSC) correspond to a special type of them. MSC are multipotent and can differentiate into several cell types of mesodermal origin, including osteoblasts, adipocytes and chondroblasts. Also, their capacity to differentiate into extra-mesenchymal cells, such as neurons and hepatocytes, was demonstrated and this phenomenon was termed plasticity. Nevertheless, the molecular basis of adult SC plasticity, as well during their commitment and differentiation into specialized cells isn't completely elucidated. It was hypothesized that SC express, although at low levels, many genes related to the differentiation cues that they could assume. According to this hypothesis, the repertory of genes is reduced during differentiation, at the same time that upregulating the expression of "specialized" genes, which characterize the future tissue. In this study, we adopted this hypothesis and to test it we used an *in vitro* osteogenic differentiation model-system. Mesenchymal stem cells were obtained from bone marrow of three healthy donors and induced to differentiate into osteoblasts in α -MEM media supplemented with dexametasone, ascorbic acid and betaglycerol phosphate during 24 h, 48 h, 7 and 21 days. The differentiation process was monitored by biochemical and immunocytochemistry assays. The total RNA was obtained from undifferentiated (0 h) and differentiated cells. To evaluate gene expression during the differentiation, we used the cDNA *microarray* technology. Fluorescent Cy3 cDNA probes originated from SC RNA samples were hybridized with a cDNA microarray containing 4,500 target sequences. A pool of irrelevant cDNA was labeled with Cy5 and used as reference. The differential gene expression during differentiation was analyzed by SAM (*Significance Analysis of Microarrays*) method (FDR < 5%). The public gene expression database (*GNF Symatlas*) was used to annotate the tissue representation of the modulated genes. The expression of some specific genes related to osteogenesis (ALPL, osteocalcin, COL1A1, RUNX2

e osteopontin) and an adipocyte marker (PPARG) was evaluated by semi-quantitative RT-PCR. It was observed that MSC in their “stem state” express, at similar levels, representative genes of the osteo and adipocyte lineages. However, during the osteoblastic differentiation process the number of modulated genes (repressed or induced) increased. It was observed that at early *in vitro* osteoblastic differentiation, adult SC characteristics genes were downregulated. Conversely, the osteoblastic commitment of these cells displayed upregulation of specific genes related to bone formation (BMP1, SMAD7, IGFBP4, ITGA5, FN1, BGN, CDH8, GDF10 and SCARB2). These results are important to provide a better understanding of the genetic and molecular basis of the plasticity and commitment phenomenon of adult MSC.

Key words: mesenchymal stem cells, plasticity, differentiation, osteogenesis, gene expression.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Possíveis explicações para a plasticidade celular. (a) Células de um determinado tecido podem existir em um órgão não-relacionado. (b) Fusão celular. (c) Transdiferenciação. (d) Persistência de células-tronco pluripotentes em tecidos adultos. Fonte: Verfaillie, 2002.....19
- Figura 2. Multipotencialidade das células-tronco mesenquimais de medula óssea. A habilidade de diferenciação em células da linhagem mesodérmica está representada por setas contínuas. As setas descontínuas referem-se à controversa capacidade de se diferenciar em outras linhagens (ectodérmica e endodérmica). Fonte: Ucelli; Moretta; Pistoia, 2008.....25
- Figura 3. Representação esquemática da hipótese de Zipori. (a) Célula-tronco expressando vários genes (RNAm) relacionados aos diferentes “destinos” de diferenciação. (b) Célula diferenciada expressando um número menor de genes (genes induzidos) cujas funções são relacionadas com a célula especializada. Fonte: Zipori, 2004b30
- Figura 4. *Pipeline* utilizado na análise de dados de *microarrays*. O banco de dados *GNF SymAtlas* foi utilizado na busca da representação tecidual dos genes diferencialmente expressos58
- Figura 5. Proliferação celular de células-tronco mesenquimais em cultura obtidas após 7, 14 e 21 dias cultivadas em meio mínimo (MEM) ou em meio de diferenciação (MED)63
- Figura 6. Viabilidade celular de células-tronco mesenquimais obtidas após 7, 14 e 21 dias cultivadas em meio mínimo (MEM) ou em meio de diferenciação (MED)64
- Figura 7. Quantidade de proteínas totais ($\mu\text{g}/10^4$ células) em células-tronco mesenquimais obtidas após 7, 14 e 21 dias cultivadas em meio mínimo (MEM) ou em meio de diferenciação (MED)64
- Figura 8. Imunofluorescência indireta para fosfatase alcalina. A: Células-tronco mesenquimais após 7 dias em cultura em meio mínimo (controle) e B: Células-tronco mesenquimais após 7 dias em cultura em meio de diferenciação osteogênica. A marcação em vermelho revela a proteína fosfatase alcalina (ALP). Em verde (faloidina) evidencia-se o citoesqueleto e, em azul (DAPI) o núcleo celular. Microscópio de fluorescência; aumento de 40x65
- Figura 9. Atividade de fosfatase alcalina ($\text{U/L}/10^4$ células) em células-tronco mesenquimais obtidas após 7, 14 e 21 dias cultivadas em meio mínimo (MEM) ou em meio de diferenciação (MED)66
- Figura 10. Coloração de matriz mineralizada com Alizarin Red. A: Células-tronco mesenquimais após 21 dias de cultivo em meio mínimo (controle) e B: Células-tronco mesenquimais após 21 dias de cultivo em meio de diferenciação osteogênica. Em vermelho observa-se a presença de nódulos de mineralização. Microscópio de contraste de fase invertido, aumento de 40 X.....66
- Figura 11. Eletroforese de RNA total em gel de agarose. Avaliação da integridade do RNA total das amostras experimentais. Gel de agarose desnaturante 1% corado com brometo de etídeo. Visualização em transiluminador UV67

Figura 12. Eletroforese de RNA total em gel de agarose. Avaliação da integridade do RNA total das amostras experimentais. Gel de agarose desnaturante 1% corado com brometo de etídeo. Visualização em transiluminador UV	68
Figura 13. Expressão gênica avaliada por RT-PCR semiquantitativa. A expressão dos genes ALPL, COL1A1, BGLAP, SPP1, RUNX2 e PPARG em amostras de cDNA de células-tronco mesenquimais indiferenciadas (0 h) e células em diferenciação <i>in vitro</i> após 24 hs, 48 hs, 7 d e 21 dias	70
Figura 14. Imagens típicas de lâminas de <i>microarrays</i> . Cada lâmina é composta de 4.500 clones de cDNA em duplicata. Em vermelho são os sinais gerados pelo fluoróforo Cy5 (RNA de referência) e em verde estão os sinais gerados pelo fluoróforo Cy3 (amostras experimentais)	72
Figura 15. Gráfico típico gerado pelo programa SAM a partir de uma análise pareada (por exemplo, 0 h vs 7 dias de diferenciação). Cada ponto representa um gene, os pontos em vermelho representam genes induzidos e os verdes reprimidos. A linha tracejada representa o valor delta. FDR = 0,05	74
Figura 16. Número de genes modulados durante a diferenciação segundo as análises pareadas feitas com o programa SAM. Número de genes modulados nas células diferenciadas <i>versus</i> indiferenciadas em diferentes tempos	74
Figura 17. Gráfico típico do banco <i>GNF Symatlas</i> da expressão de um dado gene em diferentes tecidos humanos	76
Figura 18. Porcentagem dos genes induzidos após 24 h de diferenciação classificados como representantes dos tecidos indicados	78
Figura 19. Porcentagem dos genes reprimidos após 24 h de diferenciação classificados como representantes dos tecidos indicados	78
Figura 20. Porcentagem dos genes induzidos após 48 h de diferenciação classificados como representantes dos tecidos indicados	78
Figura 21. Porcentagem dos genes reprimidos após 48 h de diferenciação classificados como representantes dos tecidos indicados	79
Figura 22. Porcentagem dos genes induzidos após 7 d de diferenciação classificados como representantes dos tecidos indicados	79
Figura 23. Porcentagem dos genes reprimidos após 7 d de diferenciação classificados como representantes dos tecidos indicados	79
Figura 24. Porcentagem dos genes induzidos após 21 d de diferenciação classificados como representantes dos tecidos indicados	80
Figura 25. Porcentagem dos genes reprimidos após 21 d de diferenciação classificados como representantes dos tecidos indicados	80
Figura 26. Quantificação relativa correspondente ao gene da fibronectina (FN1) no tempo zero e após diferentes períodos de diferenciação de células-tronco <i>in vitro</i>	81
Figura 27. Quantificação relativa correspondente ao gene ITGA5 no tempo zero e após diferentes períodos de diferenciação de células-tronco <i>in vitro</i>	81

LISTA DE TABELAS

Tabela I - <i>Primers</i> utilizados nas reações de RT-PCR semi-quantitativa.....	48
Tabela II - <i>Primers</i> utilizados nas reações de Real Time PCR.....	61
Tabela III - Genes diferencialmente expressos e relacionados à osteogênese	75

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 Diferenciação celular	15
1.2 Células-tronco: definição e classificação	16
1.3 Células-tronco adultas e plasticidade celular	17
1.4 Células-tronco mesenquimais: características e potencial de diferenciação	20
1.5 Células-tronco mesenquimais: diferenciação em osteoblastos	26
1.6 Bases moleculares da plasticidade celular	29
1.7 Medidas de expressão gênica usando microarrays	31
2 OBJETIVOS	34
2.1 Objetivo geral	34
2.2 Objetivos específicos	34
3. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	36
4 MATERIAIS E MÉTODOS	38
4.1 Processamento das medulas ósseas e isolamento das células tronco mesenquimais	38
4.2 Cultura das células-tronco mesenquimais e indução da diferenciação em osteoblastos	39
4.3 Ensaio de osteogênese	40
4.3.1 Determinação da proliferação e viabilidade celular	40
4.3.2 Determinação de proteínas totais	41
4.3.3 Avaliação imunocitoquímica para fosfatase alcalina	41
4.3.4 Determinação da atividade de fosfatase alcalina por reação enzimática	42
4.3.5 Avaliação da formação de matriz mineralizada	43
4.4 Avaliação da integridade do RNA total	43
4.5 Avaliação quantitativa e qualitativa das amostras de RNA total por espectrofotometria	44
4.6 Obtenção do RNA de referência	45
4.7 Avaliação da expressão de genes relacionados à osteogênese e adipogênese por RT-PCR semiquantitativa	46
4.8 Biblioteca de cDNAs humanos	48
4.9 Amplificação dos insertos de cDNA para a preparação dos microarrays	49
4.10 Purificação dos produtos de PCR	50
4.11 Preparação das lâminas de microarrays	50
4.12 Preparação das sondas de cDNA fluorescentes	51

4.13 Hibridação com os microarrays	54
4.14 Aquisição das imagens de hibridação	54
4.15 Análise dos dados dos microarrays	55
4.16 Anotação da representação tecidual pela expressão gênica.....	56
4.17 Confirmação dos dados de microarrays por Real Time PCR	59
5 RESULTADOS	63
5.1 Ensaio de osteogênese	63
5.1.1 Proliferação e viabilidade celular	63
5.1.2 Determinação de proteínas totais	64
5.1.3 Avaliação imunocitoquímica para fosfatase alcalina	65
5.1.4 Determinação da atividade de fosfatase alcalina por reação enzimática.....	65
5.1.5 Avaliação da formação de matriz mineralizada	66
5.2 Avaliação da integridade do RNA total.....	67
5.3 Avaliação da expressão de genes relacionados à osteogênese e adipogênese por RT- PCR semiquantitativa	68
5.4 Imagens dos microarrays	71
5.5 Análise dos dados dos microarrays	73
5.6 Anotação da representação tecidual pela expressão gênica.....	75
5.7 Confirmação dos dados de microarrays por Real Time PCR	80
6 DISCUSSÃO	83
6.1 Ensaio de osteogênese	83
6.1.1 Proliferação e viabilidade celular	83
6.1.2 Determinação de proteínas totais	83
6.1.3 Determinação da atividade enzimática da fosfatase alcalina e sua localização por imunocitoquímica	83
6.1.4 Formação de matriz mineralizada	84
6.2 Avaliação da expressão de genes relacionados à osteogênese e adipogênese por RT- PCR semiquantitativa	84
6.3 Análise dos dados dos microarrays	88
6.4 Anotação da representação tecidual pela expressão dos genes.....	92
7 CONCLUSÕES	95
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	97
ANEXOS	106

1 INTRODUÇÃO

1.1 Diferenciação celular

O organismo de um mamífero é composto de mais de 250 tipos celulares derivados de uma única célula inicial, o zigoto. Ao longo do desenvolvimento embrionário, células filhas são geradas por meio de divisões sucessivas, e se organizam em três folhetos germinativos classificados de acordo com a localização no embrião. O ectoderma constitui a camada mais externa, o mesoderma é a camada intermediária e o endoderma, o folheto mais interno. Nos três folhetos germinativos as células continuam a se dividir e se especializam gradativamente em estrutura e função, isto é, se diferenciam (GENESER, 2003).

Pode-se definir a diferenciação celular como o processo pelo qual se originam as diferenças entre as células de um indivíduo, caracterizada pela especialização gradual das células em termos estruturais e funcionais. Em geral, a diferenciação celular é acompanhada da perda simultânea de outras possibilidades de diferenciação, ou seja, perda da potência (GENESER, 2003).

De acordo com a potência ou capacidade de diferenciação, o zigoto tem capacidade máxima de diferenciação, é dito totipotente. Ao longo do desenvolvimento embrionário as células se tornam mais comprometidas com uma linhagem celular e conseqüentemente menos potentes. O comprometimento, também designado determinação celular precede a diferenciação morfológica e funcional. Diz-se que uma célula sofreu determinação ou comprometimento quando estabeleceu o seu destino (GENESER, 2003).

As células do endoderma formarão os epitélios, sistema nervoso e grande parte dos órgãos sensoriais. O mesoderma participa da formação dos tecidos conjuntivos, inclusive sangue, ossos, cartilagens, adipócitos, fibroblastos, músculos e contribui com a formação dos vasos sanguíneos, cavidades do corpo, gônadas e rins. O mesênquima é o tecido conjuntivo do embrião que se origina principalmente do mesoderma. Ele é composto de células precursoras de vários tipos de células do tecido conjuntivo, músculo cardíaco, músculo liso, endotélio, linfonodos, entre outros. O endoderma forma o revestimento da maior parte do trato digestivo e respiratório (O'RAHILLY; MULLER, 2005).

O fenômeno da diferenciação celular é guiado por modificações na atividade do material genético, uma vez que todas as células possuem material genético idêntico. A morfologia e função de cada tipo celular se devem à expressão de alguns genes específicos de cada tipo celular. A atividade dos genes durante a diferenciação é um processo bastante complexo e pouco compreendido, mas concebe-se que sua regulação deve ocorrer durante a transcrição de RNAs mensageiros (RNAm) e/ou por interações entre os próprios transcritos (RNAm e microRNAs).

1.2 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 na 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 (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 (ectodérmico, mesodérmico e endodérmico) bem como nos anexos embrionários. Uma célula deste tipo é capaz de originar um ser humano completo quando implantada em um útero normal. 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).

1.3 Células-tronco adultas e plasticidade celular

As células-tronco adultas têm sido isoladas de uma ampla variedade de tecidos, incluindo hematopoiético, neural, gastrointestinal, epidermal, hepático

(JIANG et al., 2002), vascular, muscular, pancreático (SPEES et al., 2003), cordão umbilical (KIM et al., 2004; LEE et al., 2004), dentre outros.

O papel fisiológico destas células em adultos ainda não está claro. Entretanto, sua evidente capacidade de diferenciação *in vitro* em vários tecidos está sendo explorada visando a regeneração de tecidos (BOCELLI-TYNDALL et al. 2007).

As células-tronco tecido-específicas, até recentemente, eram consideradas como capazes de se diferenciar somente em células do tecido de origem (multipotentes), entretanto, estudos recentes mostraram que estas células podem se diferenciar em outras linhagens além das do tecido de origem (JIANG et al., 2002).

Esta mudança de paradigma com relação à potência das células-tronco adultas é definida como *plasticidade celular*. A definição mais aceita de plasticidade se refere às descobertas de novas habilidades das células-tronco adultas de atravessar barreiras de linhagem e adotar fenótipos funcionais de células de outros tecidos (HERZOG et al., 2003).

Experimentos *in vivo* demonstram a plasticidade por meio de modelos de lesão induzida e observação da migração e diferenciação das células-tronco adultas para as áreas lesadas regenerando estas regiões (HERZOG et al., 2003). Quatro hipóteses são propostas para explicar a plasticidade observada em experimentos *in vivo* (Figura 1).

A primeira delas é atribuída à presença de células-tronco em um dado tecido que poderiam se diferenciar em células de um tecido não-relacionado, dando a falsa impressão de plasticidade (VERFAILLIE, 2002).

Um mecanismo alternativo seria a fusão celular de uma célula-tronco adulta com uma célula diferenciada, o que converteria o padrão de expressão da célula-

tronco no padrão da célula diferenciada. Entretanto, experimentos *in vitro* têm mostrado que este parece ser um evento bastante raro ($1/10^4$ a $1/10^6$) (JIANG et al., 2002; HERZOG et al., 2003; VERFAILLIE, 2002).

Há ainda a possibilidade de uma célula diferenciada sofrer reprogramação genética e tornar-se pluripotente, fenômeno denominado transdiferenciação ou desdiferenciação (VERFAILLIE, 2002).

Uma quarta explicação seria a permanência de células-tronco pluripotentes em tecidos adultos (JIANG et al., 2002; VERFAILLIE, 2002). A presença de células pluripotentes no organismo adulto não é aceita integralmente na comunidade científica, principalmente devido às contradições nos experimentos realizados *in vitro* e *in vivo*.

Figura 1. Possíveis explicações para a plasticidade celular. (a) Células de um determinado tecido podem existir em um órgão não-relacionado. (b) Fusão celular. (c) Transdiferenciação. (d) Persistência de células-tronco pluripotentes em tecidos adultos. Fonte: Verfaillie, 2002.

Song e Tuan (2004) mostraram que células-tronco mesenquimais humanas, conhecidas como células pré-comprometidas com a linhagem mesenquimal podem sofrer transdiferenciação *in vitro* em outros tipos celulares de acordo com o estímulo externo que recebem. Concluíram que quando trocado o agente indutor de diferenciação, as células totalmente diferenciadas (osteoblastos, condrócitos e adipócitos) poderiam sofrer transdiferenciação a um estágio indiferenciado através de reprogramação genética. Conseguiram originar adipócitos e condrócitos a partir de osteoblastos derivados de CTMs, bem como osteócitos e condrócitos a partir de adipócitos e, osteoblastos e adipócitos a partir de condrócitos.

Outros estudos mostraram uma série de eventos de transdiferenciação: células de músculo esquelético (células satélites) em células sanguíneas (TSAI; KITTAPPA; MCKAY, 2002; CAPLAN; BRUDER, 2001); do sistema nervoso central em musculares, hepatócitos, miocárdio e neurais; hematopoéticas em epitélio e tecidos endodérmicos e ectodérmicos (TSAI; KITTAPPA; MCKAY, 2002).

A falta de consenso na literatura envolve o fato de que os dados coletados são geralmente baseados em características morfológicas e ensaios imunohistoquímicos, o que pode ser insuficiente para concluir que estas células irão se integrar funcionalmente nos tecidos. Segundo Grove, Bruscia e Krause (2004) e Verfaillie (2002) sem a prova funcional *in vivo* não se pode concluir que estas células são efetivamente plásticas.

1.4 Células-tronco mesenquimais: características e potencial de diferenciação

Dentre os diversos tipos de células-tronco adultas, as células-tronco mesenquimais (CTM) compõem um grupo que vem despertando particular interesse.

Segundo Minguell, Erices e Conget (2001): “A multipotencialidade, bem como a facilidade de isolamento e sua expansão *in vitro* tornam as células-tronco mesenquimais uma alternativa terapêutica atrativa com um amplo espectro de aplicações clínicas no contexto de terapia celular.”

O interesse neste tipo celular cresceu exponencialmente nos últimos anos devido ao seu grande potencial de uso na regeneração de tecidos e órgãos lesados, como vem sendo demonstrado em inúmeros estudos clínicos e pré-clínicos (BARRY; MURPHY, 2004).

Encontra-se em andamento cerca de 2.200 ensaios clínicos com células-tronco registrados no NIH (*National Institutes of Health, USA*), a maioria utilizam células de medula óssea, destes 52 são com células-tronco mesenquimais purificadas (<http://www.clinicaltrials.gov>). As CTMs estão sendo testadas para o tratamento de doenças cardíacas isquêmicas e degenerativas, lesões ósseas, condrais, tendinosas, pulmonares, da medula espinhal, do sistema nervoso central, do fígado e em doenças genéticas como a osteogênese imperfeita (ZAGO; COVAS, 2006).

A presença de células-tronco não-hematopoiéticas na medula óssea foi inicialmente sugerida por Cohnheim, em 1867. A partir da década de 1970, Friedenstein, Gorskaja e Kulagina (1976 apud PROCKOP, 1997) consolidou a hipótese de que a medula óssea continha células aderentes de forma fibroblastóide, que se multiplicavam rapidamente, dotadas de habilidade em se transformarem em colônias que se assemelhavam com ossos e cartilagem.

Dando continuidade ao trabalho de Friedenstein, outros autores estabeleceram que estas células, agora denominadas células-tronco mesenquimais

eram multipotentes e poderiam se diferenciar em osteoblastos, condroblastos, adipócitos e eventualmente mioblastos. (PROCKOP, 1997).

Na medula óssea elas fornecem o suporte para células-tronco hematopoiéticas, e estão sendo usadas em protocolos de transplante para aumentar a “pega” do enxerto. Outra propriedade interessante é a 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).

Além disso, estas células possuem habilidade quimiotática e de migração para áreas de lesão ou inflamação, propriedade conhecida como *homing* (AGGARWAL; PITTENGER, 2005).

Como parte do nicho das células-tronco hematopoiéticas, as CTMs participam na regulação da sobrevivência, quiescência e diferenciação em células sanguíneas maduras. As CTMs exercem uma influência na formação inicial de linfócitos B, sendo a interação com as células estromais da medula óssea fundamental para o desenvolvimento normal dos progenitores de linfócitos B. Foi demonstrado que a galectina-1 (Gal-1) é um ligante da célula estromal para o receptor pré-B humano, que é indispensável para a sobrevivência do linfócito B imaturo. Interessantemente, a galectina-1 é altamente expressa em CTMs (AGGARWAL; PITTENGER, 2005).

Nos estudos com células de medula óssea já era conhecida a existência de um grande número de células que se aderiam ao plástico na cultura, proporcionando um micro-ambiente para o crescimento das CT hematopoéticas e para a diferenciação em granulócitos e eritrócitos. Observou-se que os precursores

hematopoéticos interagem diretamente com estas células aderentes, e estas compartilhavam muitas características com as CTMs (PROCKOP, 1997).

Pittenger et al. (1999) realizaram o isolamento, a expansão e a caracterização destas células a partir de medula óssea humana extraída da crista ilíaca. Estas células multipotentes, responsáveis pela composição em torno de 0,001% a 0,01% das células nucleadas da medula óssea adulta, crescem *in vitro* de maneira aderente, como células fibroblastóides em meio de cultura apropriado. Observou-se ainda a capacidade das células expandidas de se diferenciar, mediante estímulos específicos em linhagens mesenquimais tais como: ossos, cartilagens, adipócitos, tendões, músculos e estroma medular.

Do ponto de vista fisiológico, a diferenciação de CTM em osteoblastos é importante na manutenção das espículas trabeculares ósseas que compõem a medula óssea. Por outro lado, com a idade, a medula é parcialmente substituída por tecido adiposo, o que explicaria a diferenciação em adipócitos. Com relação aos condroblastos, pode estar relacionada ao reparo inicial de fraturas (PROCKOP, 1997).

As CTMs são encontradas tipicamente na fração estromal da medula óssea adulta, porém nos últimos anos, células exibindo características morfológicas de CTM foram isoladas de tecido adiposo (ZUK et al., 2001), trabéculas ósseas (SOTTILE et al., 2002), cordão umbilical (LEE et al., 2004; KIM et al., 2004) sangue fetal, fígado, pulmão, vilo coriônico da placenta e fluido amniótico (JACKSON et al., 2007).

A presença destas células em sangue periférico adulto é controversa. O estudo conduzido por Zvaifler et al. (2000) mostra que existem CTMs no sangue periférico de indivíduos normais. Outro trabalho mostra que são encontradas em todos os tecidos

exceto em sangue periférico, sugerindo um novo nicho para estas células, o compartimento perivascular (DA SILVA MEIRELLES; CHAGASTELLES; NARDI, 2006).

O método de isolamento tradicional baseia-se no fato de que as CTMs aderem seletivamente em superfícies plásticas, enquanto as hematopoiéticas são removidas com as trocas de meio de cultura. Não há um marcador específico que a identifique, diferentes grupos têm optado por uma variedade de combinações de marcadores, a maioria inclui CD29 e CD105 (JACKSON et al., 2007).

Em virtude do aumento significativo no interesse clínico e biológico nas CTM nas últimas duas décadas, o *Mesenchymal and Tissue Stem Cell Committee* do *ISCT* (*The International Society for Cellular Therapy*) gerou dois artigos com o intuito de uniformizar a nomenclatura e identificação destas células.

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 através de critérios mínimos (HORWITZ et al., 2005).

Três critérios mínimos 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-DR; diferenciação em osteoblastos, condroblastos e adipócitos *in vitro* (DOMINICI et al., 2006).

A versatilidade e a abundância de fontes para obtenção destas células são notáveis. 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. A habilidade de diferenciação em células da linhagem mesodérmica está representada por setas contínuas. As setas descontínuas referem-se à controversa capacidade de se diferenciar em outras linhagens (ectodérmica e endodérmica). Fonte: Ucelli; Moretta; Pistoia, 2008.

Um trabalho de bastante impacto foi desenvolvido por Jiang et al. (2002). O estudo evidencia a existência de uma subpopulação de CTMs, as MAPCs (*multipotent adult progenitor cells*) capaz de se diferenciar *in vitro* em células com características de mesoderma (endotélio), endoderma (hepatócitos) e neuroectoderma (astrócitos, oligodendrócitos e neurônios). Demonstraram que estas células eram capazes de se inserir nos tecidos quando injetadas em animais saudáveis. A existência de evento de fusão celular foi excluída, sugerindo a permanência de células-tronco pluripotentes em tecidos adultos.

Após transplante de medula óssea ou de CT hematopoéticas em humanos, foram detectados mioblastos esqueléticos, mioblastos cardíacos, endotélio, epitélio hepático, do ducto biliar, do pulmão, da pele e do intestino e células neuroectodérmicas de origem do doador (JIANG et al., 2002).

A diferenciação de células-tronco mesenquimais em células neurais foi demonstrada em vários trabalhos tanto *in vitro* como *in vivo*. Entretanto a capacidade de geração de neurônios com capacidade funcional é hipotética. De acordo com o estudo de Mareschi et al. (2006), a presença de marcadores e morfologia neurais, somadas às propriedades eletrofisiológicas características, demonstram a capacidade de células-tronco mesenquimais de medula óssea gerar células que se assemelham a neurônios.

Reyes et al. (2002) mostrou que as MAPCs diferenciam em células com morfologia e fenótipo endotelial tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Ferrari e Mavilio (2002) mostraram que as células de medula óssea entravam em processo de diferenciação miogênica frente a danos musculares, participando assim do reparo muscular.

Outros estudos sugerem que CTMs podem dar origem a endotélio, hepatócitos, células neurais após injeção em blastocistos (TSAI; KITTAPPA; MCKAY, 2002; MINGUELL; ERICES; CONGET, 2001; CAPLAN; BRUDER, 2001).

1.5 Células-tronco mesenquimais: diferenciação em osteoblastos

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

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

Os glicocorticóides endógenos estão envolvidos no remodelamento e formação ósseos. 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 óssea 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 extracelular mineralizada (JAISWAL et al., 1997).

Quatro estágios na maturação destas células são definidos de acordo com critérios morfológicos e histoquímicos: pré-osteoblasto, osteoblasto, osteócito e células de revestimento ósseo (AUBIN, 1998).

Segundo Long (2001) pode-se compartimentalizar de acordo com o estágio do desenvolvimento em: CTM, células osteoprogenitoras, pré-osteoblastos e osteoblastos. Os osteoprogenitores seriam células comprometidas com a linhagem óssea.

Osteoblastos são definidos como células pós-proliferativas, cubóides, fortemente positivas para fosfatase alcalina, que revestem a matriz óssea em regiões ativas de produção de matriz. Os osteoblastos podem ainda ser identificados pela capacidade de sintetizar macromoléculas fenótipo-específicas, como proteínas da matriz óssea, receptores de hormônios, citocinas e fatores de crescimento. O fenótipo de um osteoblasto maduro é definido pela habilidade de síntese de tecido mineralizado, conhecido como osso (AUBIN,1998).

Uma pequena proporção de osteoblastos (10-20%) é incorporada dentro da matriz extracelular recém formada, estes fazem parte do mais maduro estágio de diferenciação da linhagem osteoblástica, os osteócitos. Os osteócitos são menores que os precursores, perdem muitas organelas citoplasmáticas e são considerados metabolicamente inativos (AUBIN,1998).

No esqueleto adulto, a maioria das superfícies ósseas que não estão sendo remodeladas são cobertas por uma camada de células finas e alongadas, as células de revestimento ósseo, que representam a forma inativa do osteoblasto em termos de produção de matriz (AUBIN,1998).

Os ossos são responsáveis pelas funções: locomoção, suporte e proteção de órgãos vitais (encéfalo, medula espinhal, coração e pulmões), suporte da hematopoiese na medula óssea, reserva de minerais, especialmente cálcio, apoio para músculos, ligamentos e tendões.

Aproximadamente 10% da massa óssea de um indivíduo é renovada por ano. A deposição óssea e a reabsorção, efetuados por, respectivamente, osteoblastos e osteoclastos, são processos dinâmicos que ocorrem continuamente (COHEN, 2006).

A compreensão dos processos celulares e mecanismos moleculares da formação óssea requer a identificação de componentes (genes) envolvidos no comprometimento das CTMs, proliferação de osteoprogenitores, diferenciação e mineralização (LONG, 2001; NAKASHIMA; CROMBRUGGHE, 2003).

A obtenção de osteoblastos funcionais a partir de células-tronco mesenquimais tem sido utilizada amplamente na engenharia de tecidos e terapia celular. Ohgushi et al. (2004) coordenou um estudo envolvendo mais de 30 pacientes usando células-tronco mesenquimais autólogas para reconstrução de ossos após excisão cirúrgica. As células foram extraídas da medula óssea e cultivadas sobre próteses de hidroxiapatita e fosfato tricálcio e então implantadas nos locais lesados.

Infusões intravenosas de CTM humanas expandidas *ex vivo* foram bem toleradas em pacientes voluntários e parecem ser seguras (DEANS; MOSELEY, 2000).

1.6 Bases moleculares da plasticidade celular

A propriedade das células-tronco mesenquimais obtidas de tecidos adultos de gerar células de origem mesenquimal e extra-mesenquimal está bem demonstrada por meio de ensaios *in vitro*, porém pouco se conhece sobre os mecanismos moleculares subjacentes. É fundamental estudar a expressão gênica de populações de células mesenquimais adultas para conseguirmos melhor entendimento das bases molecular da plasticidade celular.

Zipori (2005) defende a hipótese se que as células-tronco não possuem um grupo de genes que as especifiquem, já que a auto-renovação não é específica de

células-tronco e pode acontecer por vias moleculares alternativas. Propõe ainda o conceito de “*stem state*”, colocando a propriedade “tronco” como um estado e não uma entidade, e sugere que a plasticidade seja a característica principal do “*stem state*”.

Segundo o autor, as células-tronco indiferenciadas expressam, embora em baixos níveis, um grupo de genes relacionados aos destinos de diferenciação que elas podem assumir. Durante a diferenciação o repertório de genes expressos seria reduzido, acompanhado do aumento nos níveis de expressão de uma pequena coleção de genes, que orientam a especialização celular (Zipori, 2004a) (Figura 3).

As células-tronco mesenquimais são bastante plásticas, entretanto, até o momento não foram demonstrados os passos intermediários de cada cascata de diferenciação. Zipori (2005) argumenta que as células-tronco mesenquimais podem assumir diferentes destinos sem a necessidade de um longo processo de comprometimento. No organismo adulto elas são rapidamente mobilizadas mediante a existência de lesões teciduais. Segundo o autor, essas células se encontram em um estado “*standby*”, no qual muitas famílias gênicas que caracterizam células diferenciadas são expressas em baixos níveis tornando a célula apta a mudar rapidamente para uma determinada direção mediante estímulo externo (Zipori, 2004b).

Figura 3. Representação esquemática da hipótese de Zipori. (a) Célula-tronco expressando vários genes (RNAm) relacionados aos diferentes “destinos” de diferenciação. (b) Célula diferenciada expressando um número menor de genes (genes induzidos) cujas funções são relacionadas com a célula especializada. Fonte: Zipori, 2004b.

Woodbury, Reynolds e Black (2002) relatam a expressão de genes de linhagens mesodérmicas, endodérmicas, ectodérmicas e germinativas em células-tronco mesenquimais indiferenciadas antes de qualquer estímulo de diferenciação. Os autores sugerem que as estas células são “multidiferenciadas” ao invés de indiferenciadas. A conclusão do trabalho é que as mudanças moleculares que ocorrem durante a diferenciação neural são modulações quantitativas na expressão de genes, e não apenas a indução de genes neurais.

Tremain et al. (2001) usando a técnica de microSAGE (*Microserial Analysis of Gene Expression*) catalogaram pouco mais de 2000 seqüências transcritas por uma colônia de células-tronco mesenquimais humanas derivadas de uma única célula. Observaram ainda a expressão simultânea de transcritos característicos de células estromais, osteoblastos, mioblastos, condrócitos, endotélio, epitélio e células da linhagem neural.

1.7 Medidas de expressão gênica usando *microarrays*

Os cDNAs *microarrays* constituem uma tecnologia que possibilita a mensuração da expressão de RNAs mensageiros de vários 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 gênica em diferentes situações fisiológicas ou patológicas. O poder dos *microarrays* como ferramenta experimental deriva da sua especificidade e afinidade da complementariedade das bases (BROWN; BOTSTEIN, 1999).

Os *microarrays* consistem em arranjos de seqüências de DNA ou de oligonucleotídeos depositados, com o uso de robôs de alta precisão, ordenadamente em suportes sólidos, como lâminas de vidro. Amostras de RNAm são copiadas em

cDNA e marcadas com fluorocromos e então hibridadas com os *microarrays*. Após a hibridação, as imagens são capturadas com auxílio de um *scanner* especializado, as intensidades de cada *spot* de hibridação (ponto no *microarray*) são convertidas em valores numéricos (quantificação das intensidades de hibridação) e finalmente analisadas com auxílio de programas de matemática, estatística e bioinformática dedicados à análise de dados de arrays (HARRINGTON; ROSENOW; RETIEF, 2000).

A principal aplicação dos *microarrays* é a determinação dos níveis de expressão gênica relativa. Os perfis de expressão gênica são fontes valiosas de informação que permitem fazer comparações entre diferentes tecidos, *backgrounds* genéticos, estados de doenças ou entre as mais diversas situações experimentais (STOUGHTON, 2005).

Os *microarrays* também podem ser utilizados para análise de DNA genômico, possibilitando a determinação do número de cópias de genes no genoma, identificação de mutações pontuais, genotipagem ou ainda na identificação de interações entre proteínas e seqüências de DNA (STOUGHTON, 2005).

Essa tecnologia representou uma opção importante e apropriada para testarmos a hipótese de Zipori sobre a plasticidade de expressão gênica das células-tronco. Os resultados gerados com os arrays podem contribuir para uma melhor compreensão dos mecanismos subjacentes à plasticidade de células-tronco adultas e à diferenciação celular.

O sistema-modelo de diferenciação *in vitro* de células-tronco mesenquimais de medula óssea em osteoblastos está bem caracterizado, desde a composição do meio de cultura com os indutores da osteogênese até os parâmetros de avaliação da diferenciação (PROCKOP 1997, PITTENGER et al., 1999).

Alinhada à hipótese de Zipori, a proposta deste trabalho é avaliar, por cDNA *microarrays*, o fenômeno da plasticidade de expressão gênica de células-tronco adultas utilizando o sistema-modelo de diferenciação supracitado.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a expressão gênica das células-tronco mesenquimais de medula óssea humana indiferenciadas e durante sua diferenciação *in vitro* em osteoblastos, utilizando a tecnologia dos *cDNA microarrays*.

2.2 Objetivos específicos

- Isolar células-tronco mesenquimais de medula óssea humana e induzi-las à diferenciação em osteoblastos.
- Confirmar a diferenciação por meio de:
 - a) parâmetros bioquímicos: atividade de fosfatase alcalina e determinação de proteínas totais
 - b) avaliação da formação de matriz mineralizada rica em cálcio
 - c) imunocitoquímica para fosfatase alcalina.
- Avaliar e comparar os níveis de expressão das 4.500 seqüências de cDNA humanas por meio da técnica de *microarrays* em diferentes fases da diferenciação em osteoblastos.
- Anotação da representação tecidual pela expressão gênica utilizando dados do banco *GNF SymAtlas*.

DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

3. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

MATERIAIS E MÉTODOS

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Processamento das medulas ósseas e isolamento das células tronco mesenquimais

Células de medula óssea humana foram separadas de aspirados coletados de doadores normais realizados pelo Serviço de Transplante de Medula Óssea do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP com a colaboração da Profa. Dra. Belinda Pinto Simões.

O presente trabalho foi realizado após aprovação do Comitê de Ética da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, USP e mediante esclarecimento e termo de consentimento (anexo A) assinado pelos doadores. Todo o trabalho foi realizado com material cedido por três doadores normais.

As células coletadas durante o procedimento convencional de transplante de medula óssea foram filtradas e o material retido no filtro foi recolhido em meio de transporte, composto de α -MEM (*Minimum Essential Medium Eagle Alpha Modification* – Sigma) acrescido de 500 $\mu\text{g/mL}$ gentamicina (Sigma) e 3 $\mu\text{g/mL}$ anfotericina B (Sigma). É importante salientar que as células-tronco mesenquimais empregadas em nosso modelo experimental não seriam utilizadas nos transplantes, pois o referido procedimento é realizado com células-tronco hematopoiéticas.

As suspensões de células foram centrifugadas a 2.000 rpm por 5 minutos e o meio de cultura e a gordura removidos 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 $\mu\text{g/mL}$ gentamicina e 0,3 $\mu\text{g/mL}$ anfotericina B), colocadas em frascos plásticos de cultura de 75 cm^2 (Corning)

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 na cultura.

4.2 Cultura das células-tronco mesenquimais e indução da diferenciação em osteoblastos

Atingida confluência maior que 90%, as células aderentes foram repicadas. Para isso, o meio de cultura foi removido, as células lavadas três vezes com 10 mL de PBS (solução salina tamponada com fosfato, pH 7,2) e em seguida incubadas a 37°C com solução contendo tripsina 0,25% (Gibco) e EDTA 1 mM. Passados 10 minutos, foi adicionado α -MEM contendo 10% SBF para inativar a tripsina. A suspensão foi centrifugada 2.000 rpm por 5 minutos e ressuspenida em meio de cultura contendo SBF. O número de células viáveis foi determinado através da contagem em câmara de Neubauer diluídas 1:2 com o corante azul de Tripán 1%.

Foram adicionadas 8×10^4 células em frascos de cultura de 75 cm² (Corning). Estas foram cultivadas em meio essencial mínimo (α -MEM suplementado com 10% de Soro Bovino Fetal e 50 μ g/mL gentamicina e 0,3 μ g/mL anfotericina B) até atingirem confluência de 50-70%. Os frascos foram divididos em cinco grupos segundo a fase de diferenciação: células indiferenciadas; diferenciadas durante 24 h; 48 h; 7 dias e 21 dias. Nos frascos correspondentes aos quatro últimos grupos o meio foi substituído pelo meio de diferenciação composto de α -MEM suplementado com 10% de soro fetal bovino, 50 μ g/mL gentamicina, 0,3 μ g/mL anfotericina B, acrescido dos indutores de diferenciação em osteoblastos: 10^{-7} M dexametasona

(Sigma), 5 µg/mL de ácido ascórbico (Sigma) e 2,16 g/mL de β-glicerofosfato (Sigma).

4.3 Ensaios de osteogênese

O sistema-modelo de diferenciação em osteoblastos utilizado neste trabalho é um modelo consolidado e bastante citado na literatura especializada. Ainda assim, optou-se por confirmar e monitorar 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 e produção de matriz mineralizada pelas células com 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.

4.3.1 Determinação da proliferação e viabilidade celular

Ao final de 7, 14 e 21 dias em cultura, as células foram removidas das placas com solução contendo tripsina 0,25% (Gibco) e EDTA 1 mM, diluídas 1:2 com o corante azul de Tripán 1% (Sigma) e contadas em câmara de Neubauer.

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

4.3.2 Determinação de proteínas totais

A determinação de proteínas totais foi realizada segundo o método de Lowry. O meio de cultura dos poços foi removido, os poços lavados três vezes PBS aquecido a 37°C e então preenchidos com 2mL de água deionizada. As placas foram colocadas por 20 minutos a -20°C e posteriormente 15 minutos a 37°C. Repetido o ciclo por 5 vezes, a suspensão de células lisadas foram vigorosamente homogeneizadas.

Para a determinação de proteínas totais, 1mL da suspensão de cada poço foi transferido para tubos de ensaio devidamente identificados, misturados com 1 mL de solução de *Lowry Reagent* (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 e Ciocalteu's phenol Reagent* (Sigma) e novamente deixados em repouso à temperatura ambiente por 30 minutos. Em seguida, a absorbância de cada tubo foi medida em espectrofotômetro (Ultrospec 2100, GE Healthcare) no comprimento de onda de 680nm. A concentração de proteínas totais expressa em µg/mL, em cada poço foi calculada a partir de uma curva padrão preparada com soroalbumina bovina.

4.3.3 Avaliação imunocitoquímica para fosfatase alcalina

Para a imunolocalização da fosfatase alcalina, as células foram cultivadas durante 7 dias sobre lamínulas Thermanox (Nunc) nos meios mínimo e de diferenciação. Posteriormente, as células foram fixadas com paraformaldeído 4% em PBS por 10 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 (*Monoclonal Hybridoma B4-78*, Developmental Studies Hybridoma Bank, Iowa City, IA), que reconhece a isoforma *bone/liver/kidney* da

fosfatase alcalina diluído 1:100; foi incubado por 1 hora em atmosfera úmida. Em seguida procedeu-se a lavagem com PBS por 3 vezes, incubou-se com o anticorpo secundário diluído 1:200 (Anti-coelho marcado com Alexa Flúor 594; Molecular Probes). Para a visualização do citoesqueleto (actina) e dos núcleos de células aderidas foram utilizados, respectivamente, faloidina conjugada com Alexa Fluor 488 diluído 1:200 (Molecular Probes) e DAPI diluído 1:300 (Molecular Probes). Após montagem das lamínulas com meio de montagem *ProLong Antifade* (Molecular Probes), as marcações foram analisadas sob epifluorescência em microscópio de luz (Leica). Todas as etapas de imunolocalização foram realizadas no Laboratório de Cultura de Células do Departamento de Morfologia da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, USP, sob a supervisão da Profa. Dra. Karina F. Bombonato-Prado.

4.3.4 Determinação da atividade de fosfatase alcalina por reação enzimática

Foram utilizadas as mesmas suspensões de células lisadas aplicadas na determinação de proteínas totais. A atividade de fosfatase foi medida através do Kit Fosfatase alcalina – Ensaio de ponto final (Labtest). Em tubos de ensaio foram colocados 0,5 mL de solução de tampão alcalino, os quais foram mantidos em banho a 37°C. Um volume de 50 µL do reagente 1 (substrato timolftaleína monofosfato) foi acrescentado em todos os tubos e incubados por 5 minutos. Acrescentou-se 50 µL das amostras e solução padrão (45 U/L) nos respectivos tubos. Após incubação por 10 minutos cronometrados adicionou-se 2 mL do reagente de cor às reações. Estas foram lidas a 590nm e a determinação de fosfatase alcalina foi dada segundo a equação:

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

4.3.5 Avaliação da formação de matriz mineralizada

Ao final de 21 dias em placas de cultura, o meio foi removido, os poços lavados três vezes com PBS pré-aquecido a 37°C e incubados com solução de formalina 10% por algumas horas. Em seguida, as células foram desidratadas com soluções de concentrações crescentes de etanol (30% a 96%). Os poços secos foram cobertos com o corante *Alizarin red S* (Sigma) 20 mg/mL pH 4,2 por 10 minutos. Os poços foram lavados com água destilada e então visualizados e fotografados em microscópio.

4.4 Avaliação da integridade do RNA total

As células mantidas em cultura correspondentes aos cinco grupos: indiferenciadas (cultivadas em meio essencial mínimo), diferenciadas (cultivadas em meio de diferenciação) durante 24 h, 48 h, 7 dias e 21 dias foram removidas dos frascos de cultura com solução contendo tripsina 0,25% e EDTA 1 mM, lavadas com PBS estéril e contadas em câmara de Neubauer.

As células foram divididas em tubos *ependorf* contendo até 10^6 células/tubo e submetidas ao procedimento de extração de RNA total segundo o protocolo do Kit *SV Total RNA Isolation System* (Promega), que inclui os passos de lise das células, purificação do RNA, tratamento com DNase e eluição do RNA com água livre de nuclease fornecido pelo fabricante.

Devido à baixa concentração de RNA obtida, optou-se por re-precipitar as amostras de RNA com isopropanol. Adicionados 3 volumes de isopropanol gelado sobre a solução aquosa de RNA, estas foram incubadas a -20° C por 18 horas e então centrifugadas a 12000 x g por 10 minutos. O precipitado de RNA foi lavado com etanol 75% e ressuspenso em 15 µL de água livre de nuclease.

4.5 Avaliação quantitativa e qualitativa das amostras de RNA total por espectrofotometria

A quantificação de RNA total foi realizada por leitura espectrofotométrica em comprimento de onda UV (260nm) usando cubetas de quartzo. As soluções de RNA foram diluídas 1:50 com água milli-Q autoclavada e lidas num espectrofotômetro (Ultrospec 2100, GE Healthcare) nos comprimentos de onda 230nm, 260nm e 280nm. A quantidade de RNA total é dada pela multiplicação do valor de absorbância a 260nm pelo fator 40, o que permite a estimativa da concentração de RNA total em µg/mL.

O grau de pureza das soluções de RNA foi avaliado pelas razões A_{260}/A_{280} e A_{260}/A_{230} . Uma solução pura de RNA apresenta razão A_{260}/A_{280} em torno de 2,0. Razões inferiores a 1,7 são indicativas de contaminação com proteínas. A razão A_{260}/A_{230} pode variar de 1,8 a 2,2, entretanto, razões inferiores podem indicar contaminação com guanidina e/ou fenol. No presente trabalho, utilizamos somente preparações puras de RNA.

A integridade do RNA foi avaliada por meio de eletroforese em gel de agarose 1% com formaldeído (eletroforese desnaturante). Um total de 35 mL de agarose fundida em água milli-Q autoclavada foi acrescido de 10 mL de formaldeído 37% (Merck) e 11 mL de tampão de migração 5X (20,6 g de MOPS dissolvidos em 800 mL de acetato de sódio 50 mM pH 7,0; 10 mL de EDTA 0,5 M pH 8,0; volume final ajustado para 1L). Paralelamente procedeu-se a desnaturação das amostras de RNA contendo 3 µg de RNA total em um volume de 4,5 µL, acrescida de 2 µL de tampão de migração 5X, 3,5 µL de formaldeído 37% e 10 µL de formamida. Esta reação foi incubada por 15 minutos a 65°C em banho-maria e imediatamente resfriada em banho de gelo.

Às amostras desnaturadas foram acrescentados 1 μ L de solução de brometo de etídeo diluído 1:3 (solução estoque 10mg/mL) e 2 μ L de *dye loading solution* (1/10 do volume) e aplicadas no gel de agarose. A corrida eletroforética foi realizada a 80V durante 90 minutos e em seguida foram visualizadas e fotografadas em transiluminador UV.

4.6 Obtenção do RNA de referência

Em experimentos de expressão gênica em grande escala, um RNA de referência deve conter a totalidade dos transcritos que compõe o *microarray*. Para atingir tal objetivo o nosso laboratório utiliza um *pool* de RNA derivado de quantidades equimolares extraídos de quatro linhagens celulares humanas. É importante salientar que o RNA de referência não corresponde ao controle experimental, que neste experimento são as células-tronco não-tratadas com os indutores de diferenciação (cultivadas em meio essencial mínimo).

As linhagens empregadas para o preparo do *pool* de referência foram: U343 MG-a, uma linhagem tumoral de astrocitoma, gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Carlos Gilberto Carlotti Jr. (Depto de Cirurgia da FMRP – USP), foi cultivada em meio de cultura HAM F10 + DMEM suplementado com 15% de SBF. A linhagem HeLa, uma linhagem de carcinoma de colo de útero, cedida pela Profa. Dra. Enilza Maria Espreafico (FMRP – USP) foi cultivada sob as mesmas condições da linhagem U343 MG-a. A linhagem tumoral de laringe, a Hep-2, cedida pelo Prof. Dr. Eurico de Arruda Neto (FMRP – USP), assim como a linhagem linfocítica Jurkat, também cedida pela Profa. Dra. Enilza Maria Espreafico (FMRP – USP), foram cultivadas em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de SBF.

Atingida a confluência das linhagens aderentes (U343 MG-a, Hep-2 e HeLa) e não-aderentes (Jurkat) seguiu-se a extração de RNA total com o reagente Trizol (Invitrogen).

Para cada frasco de cultura de 75 cm² (Corning), foram adicionados 7,5 mL de Trizol, homogeneizado vigorosamente e incubado por 15 minutos. A solução foi coletada em tubo de centrífuga de fundo cônico acrescentando-se 1,4 mL de salina 0,9% tratada com DEPC (inibidor de RNase) e 1,4 mL de clorofórmio (Merck). Após vigorosa agitação, os tubos foram centrifugados a 12.000 x g por 15 minutos. A fase aquosa (superior) foi removida para um novo tubo e foram adicionados 3 volumes de isopropanol. No dia seguinte, os tubos foram centrifugados a 12.000 x g por 10 minutos e os precipitados foram lavados duas vezes com etanol 75%. O precipitado de RNA foi eluído em 100 µL de água tratada com DEPC. As soluções de RNA foram avaliadas quali e quantitativamente conforme descrito anteriormente.

Concluída a extração de RNA das quatro linhagens, foram combinadas quantidades idênticas de RNA de cada uma delas, aliquotadas em tubos contendo 10 µg a uma concentração de 2 µg/µL e armazenadas a -80°C.

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

Para avaliar a expressão de genes relacionados à osteogênese e um gene relacionado ao fenótipo de adipócitos, durante o comprometimento com a linhagem dos osteoblastos, efetuamos reações de RT-PCR (*Reverse Transcriptase – 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*), SPP1 (*secreted phosphoprotein 1*), também conhecida como osteopontina, e um marcador de adipócitos, PPARG (*peroxisome proliferator-activated receptor gamma*), além do gene usado como constitutivo GAPDH (*glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*).

Os *primers* foram desenhados com auxílio do software *Primer3* (http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi) conforme mostrados na Tabela I. Para os genes que apresentavam transcritos alternativos, tomou-se o cuidado de desenhar *primers* que amplificassem todos os transcritos com o mesmo tamanho molecular.

A primeira etapa foi a síntese de cDNA. As reações de transcrição reversa foram realizadas com 2 µg de RNA total, 1 µL de oligo (dT) 1 µg/ µL, 1 µL de mix de nucleotídeos (2 mM), 4 µL de 5 X *First Strand Buffer* (Invitrogen), 2 µL de DTT 0,1 M, 1 µL de inibidor de RNase 40 U/µL (Promega) e 1 µL de transcriptase reversa 200 U/µL (SuperScript II- Invitrogen), volume final de 20 µL. As reações foram realizadas no termociclador *MasterCycler Gradient* (Eppendorf), a 42°C por 50 minutos seguidos de 15 minutos a 70°C. Em seguida, estas amostras foram diluídas 1:2 com água milli-Q autoclavada e armazenada a -20°C. A segunda etapa, a PCR semi-quantitativa foi feita até a diluição 1: 2048. Foram adicionados a 2 µL da reação de síntese cDNA puro ou diluído, 17 µL de água milli-Q autoclavada, 2,5 µL de tampão 10 X (Invitrogen), 1 µL de mix de nucleotídeos 2 mM, 1 µL de cada primer 10 µM (*forward* e *reverse*), 0,5 µL de Taq DNA Polimerase (Invitrogen). O protocolo de amplificação foi semelhante para todos os genes: 94°C por 5 minutos; 30 ciclos de 94°C por 45 segundos, temperatura variável de acordo com o gene (tabela II) por 45 segundos, 72°C por 45 segundos; 72°C por 10 minutos e 4°C por 10 minutos.

Para a análise dos produtos amplificados, uma alíquota de 10 µL foi aplicada em gel de agarose 1,5% em tampão TAE 1 X (Tris-acetato 0,04 M, EDTA 1 mM) contendo brometo de etídeo. Após 2 horas de eletroforese a 80 V, o gel foi visualizado e fotografado.

Tabela I - Primers utilizados nas reações de RT-PCR semi-quantitativa.

Número de acesso (GenBank)	Símbolo do gene	Primer	Seqüência	Amplicon (pb)	T _m
NM_000478.3	ALPL	ALPL (F) ALPL (R)	5'-CCACGTCTTCACATTTGGTG-3' 5'-AGACTGCGCCTGGTAGTTGT-3'	196	57°C
NM_199173.2	BGLAP	BGLAP (F) BGLAP (R)	5'-GGCAGCGAGGTAGTGAAGAG-3' 5'-CTGGAGAGGAGCAGAACTGG-3'	230	57°C
NM_000088.3	COL1A	COL1A (F) COL1A (R)	5'-GTGCTAAAGGTGCCAATGGT-3' 5'-CTCCTCGCTTTCCTCCTCT-3'	228	57°C
NM_001024630.2; NM_001015051.2 e NM_004348.3	RUNX2	RUNX2 (F) RUNX2 (R)	5'-CCTTGGGAAAAATTCAAGCA-3' 5'-AACACATGACCCAGTGCAAA-3'	181	57°C
NM_001040058.1; NM_000582.2; NM_001040060.1	SPP1	SPP1 (F) SPP1 (R)	5'-GCCGAGGTGATAGTGTGGTT-3' 5'-GTGGGTTTCAGCACTCTGGT-3'	242	57°C
NM_002046.3	GAPDH	GAPDH (F) GAPDH (R)	5'-CTGCACCACCAACTGCTTA-3' 5'-CATGACGGCAGGTCAGGTC-3'	296	60°C
NM_138712.3; NM_005037.5; NM_138711.3; NM_015869.4	PPARG	PPARG (F) PPARG (R)	5'-GAGCCCAAGTTTGAGTTTGC-3' 5'-CTGTGAGGACTCAGGGTGGT-3'	198	57°C

4.8 Biblioteca de cDNAs humanos

O laboratório de Imunogenética Molecular (Depto de Genética – FMRP – USP) mantém uma biblioteca de cDNAs humanos com cerca de 9.000 clones provenientes do IMAGE Consortium (<http://image.llnl.gov>), cedida pela Dra. Catherine Nguyen (INSERM U928 de Marseille-Luminy – França). A caracterização completa desta biblioteca foi realizada, a qual é composta de clones cujos insertos

têm de 0,5 a 1,5 Kb clonados em três vetores: Lafmid, Bluescript e pT7T3. As frequências da representação dos 229 tecidos humanos são mostradas no Anexo B. Os clones também foram classificados de acordo com a distribuição cromossômica (Anexo C) o processo biológico no qual estão envolvidos (Anexo D), além da grande porcentagem de *expressed sequence tags* (ESTs), às quais poderão ser atribuídas funções. As seqüências depositadas no *microarray* utilizado nesse trabalho podem ser recuperadas on-line no endereço URL (www.rge.fmrp.usp.br/passos/hs_array).

4.9 Amplificação dos insertos de cDNA para a preparação dos *microarrays*

A amplificação foi realizada de acordo com uma modificação do protocolo descrita por 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. A seguir uma alíquota de 10 µL da cultura foi diluída 1:10 com água milli-Q estéril e transferida para outra placa de 96 poços. Estas placas foram incubadas a 95° C por 10 minutos para lise das células e liberação dos plasmídeos. Após centrifugação a 4000xg por 5 minutos e 10µL do sobrenadante foi adicionado a 40µL de um *mix* para PCR contendo KCl 50 mM, Tris 10 mM pH 8.0, MgCl₂ 1,5 M, solução de dNTP (2mM), primers com seqüências consenso aos três vetores presentes na biblioteca (10µM), primer LBP 1S (5'-TGTGGATTGTGAGCGGATAA-3') e primer 1AS (5'-GGGTTGAATTAGCGGAACG-3'), Taq DNA polimerase (5U/µL) em volume final de 50 µL. Os insertos foram amplificados segundo o programa descrito por Menossi et al., (2000): 5 minutos a 94°C, seguidos de 30 ciclos (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 foram realizadas em um

termociclador *MasterCycler Gradient* (Eppendorf), em placas de PCR seladas com adesivo laminado para evitar evaporação.

4.10 Purificação dos produtos de PCR

Concluída a amplificação, os produtos de PCR foram purificados com etanol. O volume final de cada reação (50 μ L) foi transferido para placas de cultivo com fundo em “U” e foram adicionados 10 μ L de acetato de sódio 3M pH 4,8 e 200 μ L de etanol absoluto. As placas foram incubadas por 16 horas (overnight) a -20°C , centrifugadas a 4000xg por 60 minutos a 4°C . O sobrenadante foi desprezado e os precipitados ressuspensos em 175 μ L de etanol 70%. As placas foram novamente centrifugadas a 4000xg por 30 minutos a 4°C . O sobrenadante foi novamente desprezado e após a secagem dos precipitados estes foram ressuspensos em 12 μ L de água milliQ estéril. Para avaliar a pureza dos produtos amplificados, uma alíquota de 2 μ L foi aplicada em gel de agarose 1% contendo brometo de etídeo, visualizado em transluminador U.V. e fotografado.

4.11 Preparação das lâminas de *microarrays*

Aos produtos de PCR previamente amplificados e purificados, foi adicionado o mesmo volume de reagente D (GE Healthcare). Estes produtos de foram transferidos para placas de 384 *wells* (Genetix) e depositados em lâminas de vidro medindo 2,5 x 7,5 cm com auxílio de um Array Spotter Generation III (Amersham Molecular Dynamics). As lâminas de vidro são próprias para *microarrays*, tratadas com amino-propil-silano (lâminas Corning UltraGAPS 40015). O robô *spotter*

deposita 0,9 nL em cada ponto da lâmina, constituindo uma densidade de 9.000 pontos por lâmina, que representam 4.500 clones em duplicata. As lâminas secas passaram por um *cross-linking* para fixar o cDNA nas lâminas (UV 500 mJ) por meio de um aparelho de *crosslink* Hoefer UV Crosslinker e posteriormente foram armazenadas à vácuo em dessecador para prevenir da oxidação. Além dos 4.500 cDNAs, as lâminas contêm seqüências de DNA controles que servem para monitorar a qualidade das sondas marcadas com fluoróforo (Lucidea Universal ScoreCard - Amersham Biosciences). Os controles incluem seqüências de cDNA de organismos filogeneticamente distantes (*A. thaliana*) para avaliar o grau de hibridação inespecífica (*background*); seqüências de cDNA de genes constitutivos humanos que servem para avaliar a qualidade das amostras utilizadas nas hibridações; e seqüências de regiões intergênicas de leveduras complementares ao RNAm (spike mix Cy3 e Cy5) incorporado nas reações de preparações das sondas, estas servem como controles da preparação da sonda.

4.12 Preparação das sondas de cDNA fluorescentes

No presente trabalho definiu-se como sondas as preparações de cDNA marcadas com fluorocromo Cy3 (verde) originadas das amostras de RNA total das células-tronco. Os clones de cDNA (ou seqüências de cDNA) presentes no *microarray* foram definidas como alvos.

No preparo das sondas, os RNAm (presentes nas amostras de RNA total) foram copiadas em cDNA os quais foram marcados com o fluoróforo Cy3. Para isso utilizamos o kit *Amersham CyScribe Post-Labeling* (GE Healthcare). A primeira etapa da reação envolve reação de síntese de cDNA e a incorporação de um

nucleotídeo modificado (aminoalil-dUTP ou AA-dUTP) e posterior degradação da fita molde do mRNA com solução alcalina. Em seguida o cDNA contendo aminoalil-dUTP é purificado para a remoção dos nucleotídeos livres e oligômeros através de coluna cromatográfica GFX (GE Healthcare). A próxima etapa envolve a incorporação do fluoróforo às fitas de cDNA, por reação de seu grupamento NHS – éster com os grupos aminoalil dos nucleotídeos modificados. Uma nova etapa de purificação cromatográfica é feita para remover fluoróforos não-incorporados, minimizando assim a hibridação inespecífica. Neste trabalho optamos pelo sistema monocolor, ou seja, todas as amostras referentes aos cinco grupos analisados foram marcadas com Cy3 (fluoróforo verde). Somente os RNAs (cDNAs) de referência foram marcados com Cy5 (fluoróforo vermelho). O sistema monocolor uniformiza a intensidade da fluorescência dentro de um mesmo grupo de amostras.

Primeira etapa: Incorporação do AA-dUTP (dUTP amino alil)

Em tubos *eppendorf* em banho de gelo foram adicionados 10 µg de RNA total das amostras das células-tronco ou dos RNAs de referência, acrescido de 1 µL de primer randômico, 3 µL de oligo (dT) e 0,5 µL de spike mix (RNA complementar ao Scorecard depositado na lâmina). A reação foi ajustada a um volume final de 11 µL e incubada a 70°C por 5 minutos seguidos de 5 minutos a 4°C em termociclador *MasterCycler Gradient* (Eppendorf). A extensão da cadeia de cDNA foi realizada adicionando-se um *mix* contendo: 4 µL de tampão CyScript; 2 µL de DTT 0,1 M; 1 µL de *mix* de nucleotídeos; 1 µL de AA-dUTP e 1 µL de transcriptase reversa (CyScript). A reação foi incubada no termociclador a 42°C por 1,5 h. Em seguida, adicionou-se 2 µL de NaOH 2,5 M para a degradação do mRNA, incubando a 37°C por 15 minutos. Ao final da incubação, foram adicionados 20 µL de Hepes 2 M.

Purificação do cDNA modificado com AA-dUTP

Às colunas de purificação GFX foram colocados 500 µL de *capture buffer* e em seguida os cDNAs foram adicionados e homogeneizados. A centrifugação foi efetuada a 13.800 x g por 30 segundos, e o líquido do tubo coletor foi descartado. As colunas foram lavadas por 3 vezes com 600 µL de etanol 80% seguidos de centrifugação a 13.800 x g por 30 segundos. As colunas foram transferidas para tubos eppendorf de 1,5 mL e o cDNA purificado foi eluído com 60 µL de bicarbonato de sódio 0,1 M pH 9,0.

Segunda etapa: Marcação do cDNA modificado com CyDye

Os cDNAs modificados foram transferidos para tubos contendo CyDye NHS éster (Cy3 para as amostras das células-tronco e Cy5 para RNAs (cDNAs) de referência) e incubados por 1 hora em ambiente protegido da luz. Posteriormente foram adicionados 15 µL de hidroxilamina 4 M e a reação foi incubada por 15 minutos à temperatura ambiente.

Purificação do cDNA marcado com CyDye

Foram colocados 500 µL de *capture buffer* nas colunas de purificação GFX e em seguida os cDNAs foram adicionados e homogeneizados. A centrifugação foi efetuada a 13.800 x g por 30 segundos, e o líquido do tubo coletor foi descartado. As colunas foram lavadas por 3 vezes com 600 µL da solução *wash buffer* seguidos de centrifugação a 13.800 x g por 30 segundos. As colunas foram transferidas para tubos eppendorf de 1,5 mL e o cDNA marcado foi eluído com 60 µL da solução *elution buffer* pré-aquecida a 65°C.

Quantificação do CyDye incorporado no cDNA

As amostras foram diluídas 1:100 e lidas em espectrofotômetro nos comprimentos de onda 550nm para Cy3 e 650nm para Cy5 usando cubetas de

quartzo. Cada amostra (Cy3) foi agrupada com uma referência (Cy5) de acordo com as absorbâncias mais próximas. As soluções contendo as sondas (cDNA marcado) foram evaporadas em uma centrífuga à vácuo (*Speed Vac Plus SC110A - Savant*). Os liofilizados foram dissolvidos em 6 µL de água livre de nucleases, desnaturado a 95°C por 5 minutos e imediatamente resfriado em banho de gelo. Em seguida foram adicionados à reação 1,5 µL de poli-A₈₀ (poli-A₈₀ a 1 mg/mL) e incubados a 75°C por 45 minutos. Finalmente a cada reação foram acrescentados 55 µL de água, 63 µL de formamida e 125 µL de tampão de hibridação e a reação está pronta para o processo de hibridação.

4.13 Hibridação com os *microarrays*

As lâminas previamente preparadas foram colocadas nas câmaras de hibridação do equipamento *Lucidea Automated Slide Processor* (Amersham Biosciences), o qual realiza controle automático de hibridação e lavagens sucessivas e controladas por um *software*. As sondas foram injetadas em câmaras individuais de cada lâmina no aparelho com auxílio de uma seringa Hamilton de vidro. A hibridação e posteriores lavagens seguiu por 15 h a 42°C. A sequência de lavagens foi: 1X SSC/ 0,2% SDS; 0,1X SSC/ 0,2% SDS e 0,1X SSC. A última lavagem foi feita com isopropanol e as lâminas foram aquecidas a 42°C para secagem.

4.14 Aquisição das imagens de hibridação

As lâminas foram colocadas num aparelho *Array Scanner* (Amersham Molecular Dynamics), e lidas sob os comprimentos de onda de excitação do laser

532nm (para o Cy3) e 633 nm (Cy5). Dois arquivos foram gerados, um para cada um dos canais de fluorescência e as imagens de sobreposição foram visualizadas com auxílio do *software ImageQuant* (Amersham Molecular Dynamics). Ao final dos experimentos obtiveram-se triplicatas biológicas dos cinco grupos experimentais (células indiferenciadas; células diferenciadas com 24h, 48h, 7d e 21 d) providas de três doadores de medula óssea. Considerando que cada lâmina possui clones em duplicata, o experimento constituiu-se ainda de duplicatas técnicas (réplicas), providas da mesma amostra de RNA.

4.15 Análise dos dados dos *microarrays*

A análise segue o *pipeline* da ilustrado na Figura 4, inclui os passos de processamento das imagens, normalização dos valores numéricos e análise da expressão diferencial.

Processamento das imagens

O processamento das imagens foi feito com o uso do *software Spotfinder* criado pelo TIGR (*The Institute for Genomic Research*, <http://www.tigr.org/>) para a análise de arquivos gerados por experimentos de *microarrays*. O *software* utiliza algoritmos que delimitam a área do *spot* (ponto de hibridação), calculam a intensidade do sinal e corrigem através da subtração do *background* (sinal inespecífico, externo à área do spot).

Normalização dos dados

A normalização dos dados foi realizada no ambiente estatístico R, com o auxílio dos pacotes LIMMA, Bioconductor, Aroma e KTH. Foram aplicados métodos de normalização *Printtip Lowes* e re-escalamento dos valores M pelo valor MAD

(*Median Absolute Deviation*). A normalização elimina os erros sistemáticos gerados ao longo da realização do experimento, tornando possível a comparação dos dados intra e entre as lâminas.

Análise da expressão gênica diferencial

A análise da expressão gênica foi realizada pelo aplicativo *MultiExperiment Viewer* (MEV) desenvolvido pela TIGR. O aplicativo possui módulos analíticos que permitem a visualização dos dados de *microarrays*, bem como a identificação de genes e padrões de expressão de interesse. Foi empregado neste trabalho o algoritmo SAM (*Significance Analysis of Microarrays*), que é uma modificação do teste *t* voltado para análise estatística de grande quantidade de dados de array. O teste permite identificação de genes significantes baseados na expressão diferencial entre grupos de amostras (TUSHER; TIBSHIRANI; CHU, 2001). Optou-se pelo desenho de análise duas classes pareadas, comparando as células indiferenciadas (controle) com cada grupo de células diferenciadas (24h, 48h, 7d e 21 d) do mesmo doador, resultando assim em quatro análises diferentes. O SAM estima o FDR (*False Discovery Rate*), que é a proporção dos genes que podem ter sido erroneamente identificados.

4.16 Anotação da representação tecidual pela expressão gênica

Os genes diferencialmente expressos determinados pelo *software* SAM foram localizados no banco de dados *SymAtlas* v1.2.4 disponibilizado pelo *The Genomics Institute* da *Novartis Research Foundation* (<http://symatlas.gnf.org/SymAtlas/>). O banco contém dados de expressão gênica gerados a partir de experimentos de

microarrays Affymetrix de 46 tecidos, órgãos e linhagens celulares humanas (SU et al., 2002).

Utilizando os símbolos dos genes diferencialmente expressos buscamos no *SymAtlas* os valores numéricos de expressão nos tecidos, cujos resultados foram salvos em arquivos (.txt). Com o uso de uma ferramenta desenvolvida pelo estudante de pós-graduação Renato David Puga (<http://gbi.fmrp.usp.br/symatlas>), baseada em linguagem de programação Perl, o programa calcula a mediana desses valores nos diferentes tecidos e classifica como 1 (um) os valores maiores que a mediana e como 0 (zero) os valores menores ou iguais a mediana. Desta forma tornou-se possível classificar os genes como representantes dos tecidos, i.e, genes cuja expressão é maior que a mediana de expressão dos tecidos analisados.

Figura 4. Pipeline utilizado na análise de dados de microarrays. O banco de dados GNF SymAtlas foi utilizado na busca da representação tecidual dos genes diferencialmente expressos.

4.17 Confirmação dos dados de *microarrays* por Real Time PCR

As reações de transcrição reversa foram realizadas com 2 µg de RNA total, 1 µL de oligo (dT) 1 µg/ µL, 1 µL de mix de nucleotídeos (2 mM), 4 µL de 5 X *First Strand Buffer* (Invitrogen), 2 µL de DTT 0,1 M, 1 µL de inibidor de RNase 40 U/µL (Promega) e 1 µL de transcriptase reversa 200 U/µL (SuperScript II- Invitrogen), volume final de 20 µL. As reações foram realizadas no termociclador *MasterCycler Gradient* (Eppendorf), a 42°C por 50 minutos seguidos de 15 minutos a 70°C. Em seguida, estas amostras foram diluídas 1:2 com água milli-Q autoclavada e armazenada a -20°C. Os *primers* (Tabela II) foram desenhados com o uso do software *Primer3* (http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi) com os seguintes parâmetros: tamanho de 18-22 pb; tamanho do *amplicon* de 100-150 pb e *T_m* (*Temperature of melting*) em torno de 60°C. Os primers foram verificados quanto à complementaridade com seqüências inespecíficas (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) e à localização em éxons diferentes para evitar amplificação de eventual DNA genômico presente na amostra. Além dos genes alvo, foram desenhados *primers* para dois genes constitutivos, GAPDH (*Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*) e HPRT1 (*Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1*).

As reações de Real Time PCR foram realizadas no equipamento *7500 Real Time PCR System* (Applied Biosystems), que se utiliza compostos que emitem fluorescência na detecção quantitativa de seqüências de ácidos nucléicos (equipamento disponibilizado pela Profa. Dra. Zilá Luz Paulino Simões neste Departamento). Utilizamos o ensaio de quantificação relativa (*RQ - Relative*

Quantification) que permite determinar mudanças na expressão de genes em uma amostra com relação a uma amostra designada como calibrador.

O método químico utilizado foi o *SYBR[®] Green*, um corante que emite fluorescência quando ligado em DNA de dupla fita. Sendo assim, a cada ciclo, o número de fitas duplas é duplicado e a fluorescência gerada é detectada pelo equipamento em tempo real. O primeiro passo foi a realização de ensaios de dissociação com amostras diluídas até 1: 10000 para verificar se havia amplificação inespecífica com cada um dos *primers*.

As reações de Real Time PCR foram feitas a partir de 1 µL dos cDNAs sintetizados conforme descrito acima, acrescidos de 10 µL de *SYBR[®] Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems), 7,4 µL de água milli-Q autoclavada, 0,8 µL de cada primer 10 µM (*forward* e *reverse*). Para cada amostra foram feitas reações em triplicata. Para a escolha do gene constitutivo mais adequado às nossas amostras, utilizamos o *software BestKeeper* (PFAFFL et al., 2004). O aplicativo é utilizado para definir, dentre genes candidatos a constitutivos, aquele que apresenta menor variabilidade de expressão para cada conjunto de amostras.

Os valores numéricos de C_t (*Cycle Threshold*) que são inversamente proporcionais à quantidade de RNA na amostra foram usados em cálculos subseqüentes. A média das triplicatas de cada gene foi calculada para todas as amostras, e foi subtraído do C_t do gene constitutivo:

$$\Delta C_t = C_{t(\text{gene})} - C_{t(\text{constitutivo})}$$

O ΔC_t foi subtraído da amostra escolhida como calibrador, resultando no $\Delta\Delta C_t$:

$$\Delta\Delta C_t = \Delta C_t - \Delta C_{t(\text{calibrador})}$$

Então o RQ foi calculado para cada gene em cada amostra conforme a equação:

$$RQ = 2^{-\Delta\Delta C_t}$$

Tabela II - Primers utilizados nas reações de Real Time PCR

Número de acesso (GenBank)	Símbolo do gene	Primer	Seqüência	Amplicon (pb)	Tm
NM_002205.2	ITGA5	ITGA5 (F) ITGA5 (R)	5'-CCAAGGGGAATCAGAACTCA-3' 5'-TGGAGCAGGCCCAAATATAG-3'	124	60°C
NM_000194.1	HPRT1	HPRT1 (F) HPRT1 (R)	5'-GACCAGTCAACAGGGGACAT-3' 5'-CTGCATTGTTTTGCCAGTGT-3'	111	60°C
NM_002046.3	GAPDH	GAPDH (F) GAPDH (R)	5'-CTCTGCTCCTCCTGTTTCGAC-3' 5'-ACGACCAAATCCGTTGACTC-3'	112	60°C
NM_212482.1; NM_212475.1; NM_002026.2; NM_212478.1; NM_212476.1; NM_212474.1	FN1	FN1 (F) FN1 (R)	5'-AAAATGGCCAGATGATGAGC-3' 5'-TGCCACTGTTCTCCTACGTG-3'	121	60°C

RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 Ensaios de osteogênese

5.1.1 Proliferação e viabilidade celular

As células-tronco mesenquimais cultivadas em meio mínimo apresentaram uma taxa de proliferação celular constante ao longo dos 21 dias. Entretanto, as células cultivadas em meio de diferenciação apresentaram uma taxa de proliferação celular reduzida em comparação com as células indiferenciadas (Figura 5).

Figura 5. Proliferação celular de células-tronco mesenquimais em cultura obtidas após 7, 14 e 21 dias cultivadas em meio mínimo (MEM) ou em meio de diferenciação (MED).

As células mantidas em ambos os meios de cultivo, meio mínimo e meio de diferenciação, mostraram viabilidade superior a 85% em todos os períodos estudados (Figura 6).

Figura 6. Viabilidade celular de células-tronco mesenquimais obtidas após 7, 14 e 21 dias cultivadas em meio mínimo (MEM) ou em meio de diferenciação (MED).

5.1.2 Determinação de proteínas totais

Foi observado que, enquanto há um decréscimo na quantidade de proteínas totais nas células mantidas em meio mínimo, as células em diferenciação aumentam a quantidade de proteínas com relação ao número de células (Figura 7).

Figura 7. Quantidade de proteínas totais ($\mu\text{g}/10^4$ células) em células-tronco mesenquimais obtidas após 7, 14 e 21 dias cultivadas em meio mínimo (MEM) ou em meio de diferenciação (MED).

5.1.3 Avaliação imunocitoquímica para fosfatase alcalina

A avaliação da morfologia destas células revelou que o citoesqueleto das células-tronco mesenquimais cultivadas em meio mínimo é mais alongado enquanto as células cultivadas em meio de diferenciação osteogênica têm um formato poligonal. Com relação à expressão de fosfatase alcalina, as células cultivadas durante 7 dias em meio de diferenciação possuem conteúdo consideravelmente maior desta proteína quando comparadas às células controle (figura 8).

Figura 8. Imunofluorescência indireta para fosfatase alcalina. **A:** Células-tronco mesenquimais após 7 dias em cultura em meio mínimo (controle) e **B:** Células-tronco mesenquimais após 7 dias em cultura em meio de diferenciação osteogênica. A marcação em vermelho revela a proteína fosfatase alcalina (ALP). Em verde (faloidina) evidencia-se o citoesqueleto e, em azul (DAPI) o núcleo celular. Microscópio de fluorescência; aumento de 40x.

5.1.4 Determinação da atividade de fosfatase alcalina por reação enzimática

A atividade de fosfatase alcalina (Figura 9) das células em diferenciação aumenta com a exposição aos agentes indutores da diferenciação, enquanto que as células indiferenciadas mantêm sua atividade constante.

Figura 9. Atividade de fosfatase alcalina (U/L/10⁴ células) em células-tronco mesenquimais obtidas após 7, 14 e 21 dias cultivadas em meio mínimo (MEM) ou em meio de diferenciação (MED).

5.1.5 Avaliação da formação de matriz mineralizada

Ao final de 21 dias em cultura, observa-se a intensa coloração dos nódulos de mineralização, que se apresentam coalescentes, nas células cultivadas em meio de diferenciação, enquanto que nas células cultivadas em meio mínimo não há nódulos de mineralização (Figura 10).

Figura 10. Coloração de matriz mineralizada com Alizarin Red. A: Células-tronco mesenquimais após 21 dias de cultivo em meio mínimo (controle) e B: Células-tronco mesenquimais após 21 dias de cultivo em meio de diferenciação osteogênica. Em vermelho observa-se a presença de nódulos de mineralização. Microscópio de contraste de fase invertido, aumento de 40 X.

5.2 Avaliação da integridade do RNA total

A integridade dos RNAs mensageiros foi inferida com base na integridade das bandas correspondentes aos RNAs ribossômicos 18S e 28S, comprovando a qualidade do processo de extração, conforme mostrado na Figura 11.

Figura 11. Eletroforese de RNA total em gel de agarose. Avaliação da integridade do RNA total das amostras experimentais. Gel de agarose desnaturante 1% corado com brometo de etídeo. Visualização em transiluminador UV.

As amostras referentes ao RNA de referência também foram avaliadas em eletroforese em gel. Devido ao uso de método de extração diferente, além das bandas correspondentes aos RNAs ribossômicos (RNAr) 18S e 28S, podemos observar a banda referente ao RNAr 5S junto com os RNAs transportadores (RNAt), todas apresentaram-se íntegras, conforme Figura 12.

Figura 12. Eletroforese de RNA total em gel de agarose. Avaliação da integridade do RNA total das amostras experimentais. Gel de agarose desnaturante 1% corado com brometo de etídeo. Visualização em transiluminador UV.

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

O objetivo deste ensaio foi avaliar a expressão de RNAs mensageiros de alguns genes importantes no processo de osteogênese (ALPL, COL1A1, BGLAP, SPP1, RUNX2) e um gene relacionado à diferenciação em adipócitos (PPARG) durante a diferenciação osteogênica. A Figura 13 mostra a expressão destes genes nos tempos 0 h (controle), e 24 h, 48 h, 7 d e 21 d de diferenciação *in vitro* de células-tronco mesenquimais de medula óssea.

O GAPDH foi escolhido como gene de expressão constitutiva, comportando-se de maneira muito semelhante em todas as amostras analisadas.

O gene PPARG, relatado na literatura como um marcador da diferenciação em adipócitos, mostrou-se como um gene de alta expressão em células indiferenciadas e de expressão crescente ao longo da diferenciação em osteoblastos.

O gene da fosfatase alcalina (ALPL) mostrou uma expressão importante no controle (0 h), e um pico de expressão após 7 dias de diferenciação.

O gene do colágeno tipo 1A1 (COL1A1) apresentou uma expressão importante no controle, mantendo-se estável após 24 horas e subsequentemente apresentou uma redução na sua expressão.

O gene RUNX2 teve sua expressão relativamente constante ao longo da diferenciação e assim como os anteriores, apresentou uma importante expressão nas células-tronco mesenquimais indiferenciadas.

O gene da osteopontina (SPP1) comportou-se como um gene de baixa expressão, apresentando uma expressão discretamente maior nas células com 21 dias de diferenciação.

A expressão do gene osteocalcina (BGLAP) mostrou-se bastante baixa em todas os tempos de diferenciação analisados, com expressão detectável apenas nos tempos 24 h e 7 dias.

Figura 13. Expressão gênica avaliada por RT-PCR semiquantitativa. A expressão dos genes ALPL, COL1A1, BGLAP, SPP1, RUNX2 e PPARG em amostras de cDNA de células-tronco mesenquimais indiferenciadas (0 h) e células em diferenciação *in vitro* após 24 hs, 48 hs, 7 d e 21 dias.

5.4 Imagens dos *microarrays*

As lâminas de *microarrays* contêm 4.500 clones em duplicata, sendo que cada *spot* possui diâmetro de 250 μm e espaçamento entre eles de 30 μm . As lâminas utilizadas na confecção dos *arrays* são lâminas especiais tratadas com amino-propil-silano, o que proporciona ligação com moléculas de DNA (carregadas negativamente). As condições de deposição dos clones, como temperatura e umidade, possuem impacto significativo no tamanho e forma dos *spots*. A temperatura utilizada foi de, em média, 24,6°C e a umidade de 55%.

Para cada sonda marcada com Cy3 (amostras) foi preparada uma sonda marcada com Cy5 (RNA de referência). No total foram utilizadas 15 lâminas, sendo triplicatas biológicas de 5 situações experimentais: culturas de célula-tronco mesenquimais indiferenciadas (0 h), células em diferenciação por 24 h, 48 h, 7 d e 21 dias. As imagens resultantes destas hibridações foram obtidas por escaneamento a laser. A figura 14 representa uma das imagens obtidas dos nossos *microarrays*.

Figura 14. Imagens típicas de lâminas de *microarrays*. Cada lâmina é composta de 4.500 clones de cDNA em duplicata. Em vermelho são os sinais gerados pelo fluoróforo Cy5 (RNA de referência) e em verde estão os sinais gerados pelo fluoróforo Cy3 (amostras experimentais).

5.5 Análise dos dados dos *microarrays*

Os dados numéricos gerados pelo programa *Spotfinder*, foram normalizados no ambiente estatístico *R*. No aplicativo MEV, os valores foram filtrados, seguindo na análise apenas os genes expressos em, no mínimo, 80% dos experimentos. Uma matriz de expressão foi gerada, com os valores representados na forma de razão logarítmica ($\log_2 \text{Cy5/Cy3}$). A expressão gênica diferencial foi determinada pelo algoritmo SAM, de acordo com a distância métrica baseada na correlação de Pearson. Os perfis de expressão gênica foram comparados de acordo com o desenho de duas classes pareadas, ou seja, células-tronco indiferenciadas (0 h) versus diferenciadas (24 h, 48 h, 7 d, 21d).

O programa SAM gera um gráfico (Figura 15) que mostra os genes cujas diferenças de expressão (controle vs experimental) foram consideradas significantes sob ponto de vista estatístico. Os pontos em vermelho são genes induzidos e em verde reprimidos. O valor delta, que determina o limiar de inclusão dos genes nos grupos induzidos e reprimidos é calculado com base no FDR (*False Discovery Rate*) escolhido pelo usuário do *software*. O FDR (no presente trabalho fixado em 0,05) é a proporção dos genes que podem ter sido erroneamente identificados por chance como sendo significantes. Portanto, só foram considerados aqueles genes com valor de $\text{FDR} \leq 0,05$.

Figura 15. Gráfico típico gerado pelo programa SAM a partir de uma análise pareada (por exemplo, 0 h vs 7 dias de diferenciação). Cada ponto representa um gene, os pontos em vermelho representam genes induzidos e os verdes reprimidos. A linha tracejada representa o valor delta. FDR = 0,05.

Observamos que a modulação da expressão gênica é intensa ao longo da diferenciação osteogênica *in vitro* das células-tronco mesenquimais de medula óssea. O número de genes modulados com significância estatística é maior após 7 dias em meio de diferenciação, correspondendo a 19,5% dos genes analisados (3.161 genes analisados).

A Figura 16 mostra o número de genes modulados e o tipo de modulação nas células diferenciadas frente às células indiferenciadas (0 h).

Figura 16. Número de genes modulados durante a diferenciação segundo as análises pareadas feitas com o programa SAM. Número de genes modulados nas células diferenciadas *versus* indiferenciadas em diferentes tempos.

As listas dos genes reprimidos e induzidos após 7 dias de diferenciação estão apresentadas respectivamente nos anexos E e F.

As informações relevantes sobre os clones diferencialmente expressos (nome, localização cromossômica, descrição da função, dentre outras) foram atualizadas no banco de dados S.O.U.R.C.E. (*Stanford Online Universal Resource for Clones and ESTs* disponível em (<http://smd.stanford.edu/cgi-bin/source/sourceSearch>) que compila informações de vários bancos de dados públicos (DIEHN et al., 2003).

Dentre os genes diferencialmente expressos, encontramos alguns pertencentes a famílias gênicas relacionadas ao processo de osteogênese, conforme mostrado na Tabela III. Todos os genes são induzidos ao longo da diferenciação.

Tabela III - Genes diferencialmente expressos e relacionados à osteogênese.

Símbolo do gene	do	UGCluster	Nome do gene	Tempo de diferenciação
BMP1		Hs.1274	<i>Bone morphogenetic protein 1</i>	7 d
FN1		Hs.203717	<i>Fibronectin 1</i>	24 h, 7 d e 21 d
ITGA5		Hs.505654	<i>Integrin, alpha 5 (fibronectin receptor, alpha polypeptide)</i>	24 h, 7 d e 21 d
IGFBP4		Hs.462998	<i>Insulin-like growth factor binding protein 4</i>	24 h, 7 d e 21 d
BGN		Hs.821	<i>Biglycan</i>	24 h e 7 d
CDH8		Hs.368322	<i>Cadherin 8, type 2</i>	48 h
SMAD7		Hs.465087	<i>SMAD family member 7</i>	21 d
GDF10		Hs.2171	<i>Growth differentiation factor 10</i>	7 d

5.6 Anotação da representação tecidual pela expressão gênica

O objetivo de buscar os genes no banco de dados *GNF Symatlas* foi analisar se havia diferença no número de genes modulados relacionados aos diferentes

tecidos. A Figura 17 mostra um gráfico típico do banco *GNF SymAtlas* da expressão de um dado gene em diferentes tecidos humanos.

Figura 17. Gráfico típico do banco *GNF SymAtlas* da expressão de um dado gene em diferentes tecidos humanos.

A intenção principal desta busca foi avaliar se havia uma hiper-representatividade de genes relacionados à linhagem osteogênica no grupo dos genes induzidos, e quais tecidos tinham maior representatividade do grupo dos genes reprimidos.

Convencionou-se que um gene é representante de um tecido quando este gene tem uma expressão maior do que a sua mediana calculada a partir dos dados de todos os tecidos. Dentre os tecidos disponíveis no *SymAtlas*, foram escolhidos aqueles que têm alguma associação com células às quais as células-tronco mesenquimais possuem a capacidade de se diferenciar, ou seja, relacionados à propriedade plasticidade das células-tronco, e tecidos relacionados à localização destas células. Escolhemos ainda as células CD34+, que também são células-tronco, que co-habitam a medula óssea com as CTM.

Os tecidos e/ ou células escolhidos foram: adipócitos, células de medula óssea CD105+, células de medula óssea CD34+, miócitos cardíacos, músculo esquelético, músculo liso, encéfalo e medula óssea.

Para cada análise realizada (0 h *versus* 24 h; 0 h *versus* 48 h; 0 h *versus* 7 d; 0 h *versus* 21d) os genes induzidos e reprimidos foram analisados separadamente. Cada gene foi avaliado segundo sua expressão nos 8 tecidos citados. Os gráficos representados nas Figuras 18 a 25, mostram para cada grupo de genes (induzidos ou reprimidos) a porcentagem de genes representantes de cada tecido.

Figura 18. Porcentagem dos genes induzidos após 24 h de diferenciação classificados como representantes dos tecidos indicados.

Figura 19. Porcentagem dos genes reprimidos após 24 h de diferenciação classificados como representantes dos tecidos indicados.

Figura 20. Porcentagem dos genes induzidos após 48 h de diferenciação classificados como representantes dos tecidos indicados.

Figura 21. Porcentagem dos genes reprimidos após 48 h de diferenciação classificados como representantes dos tecidos indicados.

Figura 22. Porcentagem dos genes induzidos após 7 d de diferenciação classificados como representantes dos tecidos indicados.

Figura 23. Porcentagem dos genes reprimidos após 7 d de diferenciação classificados como representantes dos tecidos indicados.

Figura 24. Porcentagem dos genes induzidos após 21 d de diferenciação classificados como representantes dos tecidos indicados.

Figura 25. Porcentagem dos genes reprimidos após 21 d de diferenciação classificados como representantes dos tecidos indicados.

5.7 Confirmação dos dados de *microarrays* por Real Time PCR

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 ITGA5 e FN1, ambos induzidos 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 às células indiferenciadas.

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

Ambos os genes, FN1 e ITGA5, apresentam valores médios de expressão maiores (induzidos) em todos os tempos de indução da diferenciação com relação às células indiferenciadas, em concordância com os resultados dos *microarrays* (Figuras 26 e 27).

Figura 26. Quantificação relativa correspondente ao gene da fibronectina (FN1) no tempo zero e após diferentes períodos de diferenciação de células-tronco *in vitro*.

Figura 27. Quantificação relativa correspondente ao gene ITGA5 no tempo zero e após diferentes períodos de diferenciação de células-tronco *in vitro*.

DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

6.1 Ensaios de osteogênese

6.1.1 Proliferação e viabilidade celular

A capacidade proliferativa, assim como a viabilidade destas células em cultura foram confirmadas. 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.

6.1.2 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-se por osteocalcina, sialoproteína óssea, osteopontina e proteoglicanas (AUBIN,1998).

6.1.3 Determinação da atividade enzimática da fosfatase alcalina e sua localização por imunocitoquímica

Ambos os ensaios demonstram um maior conteúdo de fosfatase alcalina nas células em diferenciação osteogênica comparativamente às células-tronco indiferenciadas.

A fosfatase alcalina está bem caracterizada como um marcador das fases iniciais da osteopoiese (COHEN, 2006). O produto deste gene é uma enzima glicosilada ligada à membrana presente em uma variedade de tecidos. Em osteoblastos, seu papel envolve a geração de fosfato inorgânico para a mineralização a partir de ésteres de fosfato, como o β -glicerofosfato (ADDISON et al., 2007).

6.1.4 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.

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

Foram analisadas as expressões de genes marcadores de duas linhagens às quais as células-tronco mesenquimais podem se diferenciar, osteoblastos e adipócitos.

O gene PPARG (*peroxisome proliferator-activated receptor-gama*) é um membro da família de receptores nucleares de hormônios, responsável pela regulação da expressão de genes específicos de adipócitos e é essencial para a formação de células adiposas maduras. Ele é um fator de transcrição induzido por ligante que controla a expressão de genes alvo através do remodelamento de cromatina e modificações nas histonas (DAVID et al., 2007).

Os genes ALPL (fosfatase alcalina), BGLAP (osteocalcina), COL1A1, RUNX2 e SPP1 (osteopontina), são genes relacionados ao processo de diferenciação em osteoblastos. Duas observações importantes foram feitas com esses genes. A primeira é a de que as células-tronco mesenquimais em cultura expressam RNAm de genes marcadores de células diferenciadas, por exemplo ALPL, PPARG, RUNX2 e COL1A1. A segunda é que um gene envolvido na regulação da diferenciação em adipócitos apresenta expressão crescente durante a diferenciação em uma linhagem distinta, os osteoblastos.

A primeira observação é concordante com a hipótese de Zipori (2004a; 2004b; 2005) e das observações feitas por Woodbury, Reynolds e Black (2002), que consideram que as células-tronco se apresentam em um estado “multidiferenciado”, com expressão de genes relacionados aos diferentes destinos de diferenciação que elas podem assumir.

Entretanto, a crescente expressão do gene PPARG ao longo da diferenciação em osteoblastos, comprovada por alguns ensaios, como presença de matriz mineralizada, é discordante da hipótese de Zipori.

Segundo Zipori, durante a diferenciação o repertório de genes seria reduzido, acompanhado do aumento nos níveis de expressão de uma pequena coleção de genes, que orientam a especialização celular, neste caso, genes relacionados à osteogênese.

Diversos estudos têm demonstrado que a diferenciação em osteoblastos ocorre em detrimento da diferenciação em adipócitos, com participação dos dois principais fatores de transcrição relacionados às duas linhagens: PPARG e RUNX2.

Akune et al. (2004) avaliando os efeitos da deleções do gene PPARG na osteoblastogênese, conclui que nos camundongos heterozigotos e homozigotos

para essa deleção ocorriam aumento da osteoblastogênese. O resultado sugere que o PPARG funciona como um supressor do comprometimento e diferenciação com a linhagem osteoblástica, já que nas células progenitoras com a deleção a diferenciação ocorria espontaneamente, com indução do gene RUNX2.

Outro estudo (LECKA-CZERNIK et al., 1999) mostra que nas células estromais de medula óssea transfectadas com uma construção de expressão de PPARG, ocorria a supressão da expressão de RUNX2, COL1A e osteocalcina, conhecidos marcadores da linhagem dos osteoblastos.

A presença de transcritos, e não necessariamente proteínas, relacionados à linhagem adipogênica, mesmo nas células derivadas de células-tronco que estão comprometidas com a linhagem osteogênica pode estar relacionada à capacidade de transdiferenciação destas células, ou seja, mesmo comprometidas elas podem se desdiferenciar e rapidamente seguir um novo caminho de diferenciação.

O fator de transcrição RUNX2 (*Runt-related transcription factor*), também chamado de Cbfa1 (*core-binding factor-1*) é o primeiro fator específico de osteoblastos a ser identificado, ele tem um importante papel na manutenção do fenótipo osteo (Long, 2001). O RUNX2 é uma subunidade de um fator de transcrição heterodimérico que é composto das subunidades α e β . A subunidade α é um homólogo estrutural do gene *runt* de *Drosophila* (NAKASHIMA; CROMBRUGGHE, 2003).

Mutações neste gene causam anormalidades no esqueleto, pois ocorre falha na diferenciação de osteoblastos (LONG, 2001). A inativação de Cbfb causa letalidade em camundongos devido à ausência da hematopoiese hepática. Entretanto, expressando Cbfb em embriões, o camundongo sobrevive até o nascimento, porém com marcante retardo na diferenciação em osteoblastos e na

formação óssea. Esta disfunção óssea é menos severa que a causada por inativação de RUNX2, indicando que este controla a formação óssea até certo ponto, mesmo na ausência de Cbfb (NAKASHIMA; CROMBRUGGHE, 2003).

Observou-se uma alta expressão de fosfatase alcalina detectada por RT-PCR quando comparada à detecção da enzima por imunofluorescência indireta nas células-tronco indiferenciadas. Parece não haver uma relação direta entre quantidade de RNAm e da proteína correspondente, fosfatase alcalina, nestas células.

Sabe-se que a ALPL é um marcador das fases iniciais de diferenciação em osteoblastos e que sua expressão é estimulada por β -glicerofosfato, conhecido por promover mineralização em culturas de células (ORIMO; SHIMADA, 2008).

O colágeno tipo I é o produto primário dos osteoblastos durante a formação da matriz óssea, constituindo 90% do total de matriz orgânica no osso. Ele é expresso no estágio de pré-osteoblasto e apresenta indução precoce no processo de diferenciação. Entretanto, existem discrepâncias com relação aos resultados de expressão deste gene encontradas na literatura. Alguns autores relatam alta expressão durante estágios proliferativos e outros detectam RNAm apenas em estágios finais de maturação (AUBIN, 1998).

Cabe ressaltar que se trata de um experimento *in vitro* que pode não reproduzir alguns resultados de experimentos *in vivo*, devido às enormes divergências com relação ao ambiente ao qual a célula está inserida. Modelos de diferenciação *in vitro* são simplificações excessivas e servem apenas para guiar o estudo de questões de difícil acesso no organismo vivo, como é o caso da diferenciação celular.

Os genes SPP1 e BGLAP não apresentaram expressão detectável nas células-tronco indiferenciadas, comportando-se efetivamente como marcadores da diferenciação em osteoblastos. Ambos mostraram-se como genes de expressão baixa no sistema-modelo de diferenciação utilizado.

Apesar da osteocalcina (BGLAP) não exercer um papel crítico na diferenciação e formação ósseas, esta proteína representa expressão altamente restrita à linhagem dos osteoblastos (LECLERC et al., 2005). Estudos *in vivo* mostram que a expressão deste gene é inibida por glicocorticóides, o que poderia explicar a baixa expressão em nosso modelo experimental, que inclui o glicocorticoide dexametasona.

A osteopontina (SPP1) é uma das mais abundantes proteínas não-colagenosas que compõem a matriz extracelular em tecidos ósseos. Ela é secretada por osteoblastos e tem sido sugerido que ela tem um papel importante no metabolismo ósseo, mediando adesão celular e migração. Esta proteína parece inibir a mineralização através do bloqueio da formação dos cristais de hidroxiapatita (ALFORD; HANKENSON, 2006).

6.3 Análise dos dados dos *microarrays*

A análise feita com o programa SAM revelou um grande número de genes modulados durante a diferenciação das células-tronco mesenquimais em osteoblastos. Muitos genes são induzidos com apenas 24 horas no meio de diferenciação, entretanto o pico de modulação aparece após 7 dias. O pico de modulação coincide com o momento de maior expressão de fosfatase alcalina detectada por RT-PCR.

A fosfatase alcalina é um marcador da formação óssea. A isoforma tecido-não específica tem um papel chave na mineralização óssea, pois promove a formação de cristais de hidroxiapatita nas vesículas extracelulares formadas pelos osteoblastos. A ALPL degrada pirofosfato inorgânico presente na matriz extracelular, o qual inibe a formação de hidroxiapatita, permitindo assim que o fosfato inorgânico reaja com o cálcio para formar hidroxiapatita. O papel desta enzima na mineralização óssea foi confirmado por estudos de pacientes com hipofosfatasia, caracterizada por defeito no gene da fosfatase alcalina. Os portadores deste defeito apresentam hipomineralização de tecidos rígidos e elevados níveis plasmáticos de pirofosfato inorgânico (ORIMO; SHIMADA, 2008).

Dentre os genes induzidos (Tabela III) estão os genes BMP1, SMAD7, IGFBP4, ITGA5, FN1, BGN, CDH8, GDF10 e SCARB2.

As BMPs (*bone morphogenetic proteins*) constituem uma família de fatores de crescimento pertencentes à superfamília TGF β . As proteínas desta família possuem papéis relevantes no desenvolvimento neural, cardíaco, de cartilagens e formação óssea (CHEN; ZHAO; MUNDY, 2004). As proteínas TGF- β parecem permanecer de forma latente na matriz óssea, sendo ativadas pelo ambiente ácido dos osteoclastos. A ativação deste fator de crescimento resulta na estimulação das células osteogênicas (LONG, 2001).

As proteinases BMP1 são importantes no processamento de precursores de proteínas funcionais que compõe a matriz extracelular, incluindo colágenos tipo I, II, III, IV, VII e XI, as proteoglicanas biglicanas e osteoglicana, componentes de laminina e lisil-oxidase. As BMP1 afetam a morfogênese ativando BMP2 e BMP4 pela clivagem do antagonista extracelular cordina (GE; GREENSPAN, 2006).

Um estudo conduzido por LEE et al. (1997) sugere que BMP1 é induzida pela ativação de TGF β 1. Estes dados indicam um papel das proteinases BMP1 como reguladores da sinalização TGF β com deposição de matriz extracelular, processo pelo qual os osteoblastos são responsáveis na formação óssea.

Dentre as BMPs, a BMP2 está intimamente associada diferenciação de osteoblastos. A proteína BMP2 recombinante por si só induz a formação óssea *in vivo* e, em modelos *in vitro*, induz o aparecimento de fenótipo de osteoblasto, identificado pela expressão dos marcadores fosfatase alcalina, osteocalcina e PTH (hormônio paratireoideano) (THIES et al., 1992). Sabe-se que a ativação das vias TGF- β e BMP2 aumentam a atividade transcricional do RUNX2 através da ativação de Smad 1 e 3 (NAKASHIMA; CROMBRUGGHE, 2003).

Associadas à transdução de sinal acopladas aos receptores de BMPs estão as proteínas Smads 1,5 e 8, que traduzem o sinal do receptor para genes alvo no núcleo. Entretanto as Smads 6 e 7 são conhecidas como inibitórias. Existem evidências de que elas antagonizam a sinalização TGF β em culturas celulares. A sinalização TGF β induz a expressão de Smad7, sugerindo sua participação em um mecanismo de retroalimentação negativa da sinalização TGF β (NAKAO et al., 1997).

Além da TGF- β , outro grupo de citocinas exercem um papel central na osteogênese, as IGFs (*insulin-like growth factors*), atuando no equilíbrio entre reabsorção e formação óssea. Os mais abundantes mitógenos na matriz extracelular humana são IGF-II e TGF- β (LONG, 2001).

As IGFs são sintetizadas pelos osteoblastos, tem ação autócrina e parácrina estimulando a proliferação destes, através de MAPs quinases (ERK-1 e ERK-2), atingindo alvos como c-myc. As IGFBPs (*IGF-binding proteins*) inibem a atividade

biológica das IGFs. Em osteoblastos trabeculares ósseos são encontradas as IGFBPs 3, 4 e 5. A produção das IGFBPs 4 e 5 é inibida pelo TGF- β (LONG, 2001).

A IGFBP4 é um importante componente do sistema IGF em muitos tecidos, incluindo gônadas e ossos. O efeito inibitório *in vivo* foi demonstrado pela injeção de IGFBP4 recombinante em osso parietal e conseqüente inibição da formação óssea induzida por IGF (MAZERBOURG et al., 2004).

As proteínas de matriz extracelular constituem importantes sinais que influenciam vários aspectos do ciclo de vida dos osteoblastos durante o desenvolvimento e no processo de *turnover* dos ossos maduros.

As integrinas, uma família de glicoproteínas transmembrana que consistem das cadeias α e β , são os principais receptores de superfície responsáveis pela adesão celular à matriz. Os osteoblastos expressam uma variedade de integrinas que se ligam às proteínas de matriz: osteopontina, osteocalcina, vitronectina, colágeno tipo I, trombospondina e fibronectina. Os osteoblastos expressam altos níveis de integrinas $\alpha 5\beta 1$, $\alpha v\beta 3$ e $\alpha v\beta 5$, enquanto os pré-osteoblastos expressam menores quantidades (CHENG et al., 2000).

A diferenciação de osteoblastos é inibida pela interrupção das interações entre fibronectina e integrina, com supressão da formação de nódulos de mineralização e retardo na expressão de genes tecido-específicos, como a osteocalcina. Os osteoblastos são dependentes de fibronectina para a sobrevivência, na ausência de tal proteína ocorre apoptose maciça. Entretanto, em osteoblastos maduros a apoptose ocorre quando os receptores de proteoglicanas e as proteoglicanas de matriz são perturbados (DAMSKY, 1999).

As proteoglicanas são cruciais durante a osteogênese de células-tronco mesenquimais, especialmente para o processo de mineralização. A proteoglicana

biglica é altamente expressa em ossos e parece ser essencial para interações com colágeno tipo I e na regulação da deposição mineral e morfologia dos cristais (MÜLLER et al., 2008).

Durante a diferenciação a partir de progenitores mesenquimais, as células osteogênicas expressam um variável repertório de caderinas. As caderinas R- e -4 são reprimidas durante a diferenciação enquanto as -11 e N- são induzidas. As caderinas são importantes na adesão celular e na elaboração do fenótipo completo de osteoblasto (STAINS; CIVITELLI, 2005).

O GDF10 (*growth differentiation factor*) é um membro da família das BMPs, que atua regulando crescimento e diferenciação celular através de sua atividade proteolítica. O GDF10 é altamente relacionado com BMP3 e é expresso em ossos, sugerindo sua participação na morfogênese de tecidos esqueléticos (CUNNINGHAM et al., 1995).

6.4 Anotação da representação tecidual pela expressão dos genes

A primeira observação foi a de que a proporção dos genes representantes dos tecidos não varia muito entre os diferentes tempos de diferenciação. Em parte, isto se deve ao fato de que a maioria dos genes revelados como modulados nas quatro análises pareadas são comuns em todos os tempos analisados. Sendo assim, a discussão foi feita com base na representatividade dos genes induzidos e dos genes reprimidos durante a diferenciação osteogênica independentemente do tempo de diferenciação.

Analisando os genes induzidos nas células em diferenciação, observamos que as células CD34+, músculo liso, miócitos cardíacos e células CD105+ são as células onde há maior representatividade em todos os tempos analisados.

De fato, a inexistência de dados de expressão gênica de tecido ósseo ou osteoblastos no banco de dados *GNF SymAtlas* dificultou a identificação de genes induzidos relacionados à linhagem osteogênica. Outro fator limitante se deve à composição do nosso *array*, que não foi construído visando o estudo da diferenciação osteogênica, contendo poucos genes relevantes para o processo.

Com relação aos genes reprimidos, estes representaram principalmente células CD34+ e CD105+.

Sabe-se que a molécula de superfície CD34 é o principal marcador das células-tronco hematopoiéticas (KRAUSE et al., 1994), uma das células-tronco adultas mais bem estudadas. Da mesma forma, CD105 é um dos marcadores das células-tronco mesenquimais, conforme proposto pela *The International Society for Cellular Therapy* (DOMINICI et al., 2006).

Isto mostra que a repressão da transcrição gênica ao longo da diferenciação das células-tronco mesenquimais adultas se deu principalmente com os genes representantes das duas principais células-tronco adultas, a célula-tronco mesenquimal e a célula-tronco hematopoiética.

CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

A reprodução do sistema-modelo *in vitro* de diferenciação de células-tronco mesenquimais humanas em osteoblastos foi alcançada com sucesso no presente trabalho. Os resultados contribuem para uma visão abrangente, do ponto de vista molecular, do comprometimento e diferenciação de uma célula-tronco adulta, a célula-tronco mesenquimal.

A análise por *microarrays* revelou que a modulação da expressão gênica é intensa durante a transição de uma célula em estado tronco ou ainda “plástico”, para um estado diferenciado. Tal modulação atinge um pico após 7 dias de diferenciação *in vitro* e, de acordo com a representatividade tecidual, a maioria dos genes reprimidos são representantes das duas principais células-tronco adultas, a mesenquimal e a hematopoiética. Dentre os genes induzidos observamos alguns relacionados ao processo de osteogênese.

Além disso, nossos resultados mostraram que uma célula-tronco apresenta expressão de genes marcadores de células diferenciadas como os adipócitos e os osteoblastos, em concordância com a hipótese de Zipori (2004a; 2004b; 2005).

Nossos resultados são importantes para um melhor entendimento dos processos genético-moleculares da diferenciação de células-tronco mesenquimais adultas em osteoblastos e mostraram que a hipótese de Zipori procede. As células-tronco expressam uma diversidade de genes, os quais representam os vários tecidos nos quais elas poderão se diferenciar. Durante o processo de diferenciação essa diversidade de expressão diminui e há tendência de indução de genes relacionados com o tecido especializado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Addison WN, Azari F, Sorensen ES, Kaartinen MT, McKee MD. Pyrophosphate Inhibits Mineralization of Osteoblast Cultures by Binding to Mineral, Up-regulating Osteopontin, and Inhibiting Alkaline Phosphatase Activity. *The Journal of Biological Chemistry* 2007; 282 (21): 15872–15883.

Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood* 2005; 105 (4): 1815-1822.

Akune T, Ohba S, Kamekura S, Yamaguchi M, Chung U, Kubota N, Terauchi Y, Harada Y, Azuma Y, Nakamura K, Kadowaki T, Kawaguchi H. PPAR γ insufficiency enhances osteogenesis through osteoblast formation from bone marrow progenitors. *The Journal of Clinical Investigation* 2004; 113 (6): 846-855.

Alford AI, Hankenson KD. Matricellular proteins: Extracellular modulators of bone development, remodeling, and regeneration. *Bone* 2006; 38: 749–757.

Aubin JE. Advances in the osteoblast lineage. *Biochem. Cell Biol.* 1998; 76: 899–910.

Barry FP, Murphy JM. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2004; 36: 568–584.

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* 2007; 46: 403–408.

Brown PO, Botstein D. Exploring the new world of the genome with DNA microarrays. *Nature Genetics* 1999; 21: 33-37.

Caplan AI, Bruder SP. Mesenchymal stem cells: building blocks for molecular medicine in the 21st century. *TRENDS in Molecular Medicine* 2001; 7 (6): 259-264.

Chen D, Zhao M, Mundy GR. Bone Morphogenetic Proteins. *Growth Factors* 2004; 22 (4): 233–241.

Cheng S, Lai C, Fausto A, Chellaiah M, Feng X, McHugh KP, Teitelbaum SL, Civitelli R, Hruska KA, Ross FP, Avioli LV. Regulation of $\alpha V\beta 3$ and $\alpha V\beta 5$ Integrins by Dexamethasone in Normal Human Osteoblastic Cells. *Journal of Cellular Biochemistry* 2000; 77:265–276.

Clinical Trials. United States National Institutes of Health. Disponível em:<<http://www.clinicaltrials.gov>>

Cohen MM Jr. The new bone biology: Pathologic, molecular, and clinical correlates. Part A. *Am J Med Genet* 2006; 140A: 2646–2706.

Cunningham NS, Jenkins NA, Gilbert DJ, Copeland NG, Reddi AH, Lee SJ. Growth/differentiation factor-10: a new member of the transforming growth factor-beta superfamily related to bone morphogenetic protein-3. *Growth Factors* 1995; 12(2):99-109.

Da Silva Meirelles L, Chagastelles PC, Nardi NB. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J Cell Sci.* 2006; 119 (11):2204-2213.

Damsky CH. Extracellular Matrix–Integrin Interactions in Osteoblast Function and Tissue Remodeling. *Bone* 1999; 25 (1): 95–96.

David V, Martin A, Lafage-Proust M, Malaval L, Peyroche S, Jones DB, Vico L, Guignandon A. Proliferator-Activated Receptor γ in Bone Marrow Stromal Cells and Favors Osteoblastogenesis at the Expense of Adipogenesis. *Endocrinology* 2007; 148(5): 2553–2562.

Deans RJ, Moseley AB. Mesenchymal stem cells: Biology and potential clinical uses. *Experimental Hematology* 2000; 28: 875-884.

Diehn M, Sherlock G, Binkley G, Jin H, Matese JC, Hernandez-Boussard T, Rees CA, Cherry JM, Botstein D, Brown PO, Alizadeh AA. SOURCE: a unified genomic resource of functional annotations, ontologies, and gene expression data. *Nucleic Acids Research* 2003; 31 (1): 219–223.

Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Krause DS, Deans RJ, Keating A, Prockop DJ, Horwitz EM. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006; 8 (4): 315- 317.

Ferrari G, Mavilio F. Myogenic stem cells from the bone marrow: a therapeutic alternative for muscular dystrophy? *Neuromuscular Disorders* 2002; 12: S7-S10.

Ge G, Greenspan DS. BMP1 controls TGF β 1 activation via cleavage of latent TGF β -binding protein. *The Journal of Cell Biology* 2006; 175 (1): 111–120.

Geneser, F. Histologia. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan; 2003. p.119-123; 208-234.

GNF SymAtlas, v 1.2.4. Disponível em:<<http://symatlas.gnf.org/SymAtlas/>>

Grove, J.E.; Bruscia, E.; Krause, D.S. Plasticity of Bone Marrow-Derived Stem Cells. *Stem Cells* 2004; 22:487-500.

Harrington CA, Rosenow C, Retief J. Monitoring gene expression using DNA microarrays. *Current Opinion in Microbiology* 2000; 3: 285–291.

Hedge P, Qi R, Abernathy K, Gay C, Dharap S, Gaspard R, Hughes JE, Sniesrud E, Lee N, Quackenbush J. A concise guide to cDNA microarray analysis. *Biotechniques* 2000; 29 (3): 548-556.

Herzog EL, Chai L, Krause DS. Plasticity of marrow-derived stem cells. *Blood* 2003; 102 (10): 3483-3493.

Horwitz EM, Le Blanc K, Dominici M, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Deans RJ, Krause DS, Keating A. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2005; 7 (5): 393-395.

Jackson L, Jones DR, Scotting P, Sottile V. Adult mesenchymal stem cells: differentiation potential and therapeutic applications. *J Postgrad Med* 2007; 53 (2): 121-126.

Jaiswal N, Haynesworth SE, Caplan AI, Bruder SP. Osteogenic Differentiation of Purified, Culture-Expanded Human Mesenchymal Stem Cells *In Vitro*. *Journal of Cellular Biochemistry* 1997; 64: 295–312.

Jiang, Y.; Jahagirdar, B.N.; Reinhardt, R.L.; Schwartz, R.E.; Keenek, D.; Ortiz-Gonzalez, X.R.; Reyes, M.; Lenvik, T.; Lund, T.; Blackstad, M.; DU, J.; Aldrich, S.; Lisberg, A.; Lowk, W.C.; Largaespada, D.A. e Verfaillie, C.M. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 2002; 418: 41-49.

Kim JW, Kim SY, Park SY, Kim YM, Kim JM, Lee MH, Ryu HM. Mesenchymal progenitor cells in the human umbilical cord. *Ann Hematol* 2004; 83: 733–738.

Kooy D, Weiss S. Why stem cells? *Science* 2000; 287: 1439-1441.

Krause DS, Ito T, Fackler MJ, Smith OM, Collector MI, Sharkis SJ, May WS. Characterization of Murine CD34, a Marker for Hematopoietic Progenitor and Stem Cells. *Blood* 1994; 84 (3): 691-701.

Lecka-Czernik B, Gubrij I, Moerman EJ, Kajkenova O, Lipschitz DA, Manolagas SC, Jilka RL. Inhibition of Osf2/Cbfa1 Expression and Terminal Osteoblast Differentiation by PPAR γ 2. *Journal of Cellular Biochemistry* 1999; 74: 357–371.

Leclerc N, Noh T, Khokhar A, Smith E, Frenkel B. Glucocorticoids Inhibit Osteocalcin Transcription in Osteoblasts by Suppressing Egr2/Krox20-Binding Enhancer. *Arthritis & Rheumatism* 2005; 52 (3):929–939.

Lee OK, Kuo TK, Chen W, Lee K, Hsieh S, Chen T. Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Blood* 2004; 103 (5): 1669-1675.

Lee S, Solow-Cordero DE, Kessler E, Takahara K, Greenspan DS. Transforming Growth Factor- β Regulation of Bone Morphogenetic Protein-1/Procollagen C-proteinase and Related Proteins in Fibrogenic Cells and Keratinocytes. *The Journal of Biological Chemistry* 1997; 272 (30): 19059–19066.

Long MW. Osteogenesis and Bone-Marrow-Derived Cells. *Blood Cells, Molecules, and Diseases* 2001; 27(3): 677–690.

Mareschi K, Novara M, Rustichelli D, Ferrero I, Guido D, Carbone E, Medico E, Madon E, Vercelli A, Fagioli F. Neural differentiation of human mesenchymal stem cells: evidence for expression of neural markers and eag K α channel types. *Experimental Hematology* 2006; 34: 1563–1572.

Mazerbourg S, Callebaut I, Zapf J, Mohan S, Overgaard M, Monget P. Up date on IGFBP-4: regulation of IGFBP-4 levels and functions, in vitro and in vivo. *Growth Hormone & IGF Research* 2004; 14: 71–84.

Menossi M, Cremonese N, Maron LG, Arruda P. Making colony PCR easier by adding gel-loading buffer to the amplification reaction. *Biotechniques* 2000; 28 (3): 424-426.

Minguell JJ, Erices A, Conget P. Mesenchymal Stem Cells. *Experimental Biology and Medicine* 2001, .226 (6): 507-520.

Müller B, Prante C, Gastens M, Kuhn J, Kleesiek K, Götting C. Increased levels of xylosyltransferase I correlate with the mineralization of the extracellular matrix during osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Matrix Biology* 2008; 27: 139–149.

Nakao A, Afrakhte M, More' n A, Nakayama T, Christian JL, Heuchel R, Itoh S, Kawabata M, Heldin N, Heldin C, ten Dijke P. Identification of Smad7, aTGFβ-inducible antagonist of TGF-β signaling. *Nature* 1997; 389: 631-635.

Nakashima K, Crombrughe B de. Transcriptional mechanisms in osteoblast differentiation and bone formation. *TRENDS in Genetics* 2003; 19 (8): 458-466.

O'Rahilly R, Müller, F. Os tecidos primários. In: O'Rahilly R, Müller, F. Embriologia e Teratologia Humanas. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan; 2005. p.119-143.

Ohgushi H, Kitamura S, Kotobuki N, Hirose M, Machida H, Muraki K, Takakura Y. Clinical Application of Marrow Mesenchymal Stem Cells for Hard Tissue Repair. *Yonsei Medical Journal* 2004; 45: 61-67.

Orimo H, Shimada T. The role of tissue-nonspecific alkaline phosphatase in the phosphate-induced activation of alkaline phosphatase and mineralization in SaOS-2 human osteoblast-like cells. *Molecular and cellular biochemistry* 2008, 315 (1): 51-60.

Pfaffl MW, Tichopad A, Prgomet C, Neuvians TP. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper – Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnology Letters* 2004; 26: 509–515.

Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells. *Science* 1999; 284: 143-147.

Primer 3 Software. Whitehead Institute for Biomedical Research. Disponível em:<http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi>

Prockop DJ. Marrow Stromal Cells as Stem Cells for Nonhematopoietic Tissues. *Science* 1997; 276: 71-74.

Reyes M, Dudek A, Jahagirdar B, Koodie L, Marker PH, Verfaillie CM. Origin of endothelial progenitors in human postnatal bone marrow. *J. Clin. Invest.* 2002; 109:337–346.

Song L, Tuan RS. Transdifferentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow. *FASEB Journal* 2004; 18 (9): 980-982.

Sottile V, Halleux C, Bassilana F, Keller H, Seuwen K. Stem Cell Characteristics of Human Trabecular Bone-derived Cells. *Bone* 2002; 30 (5): 699-704.

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

Spees JL, Olson SD, Ylostalo J, Lynch PJ, Smith J, Perry A, Peister A, Wang MY, Prockop DJ. Differentiation, cell fusion, and nuclear fusion during ex vivo repair of epithelium by human adult stem cells from bone marrow stroma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2003; 100 (5): 2397–2402.

Stains JP, Civitelli R. Cell-to-cell interactions in bone. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2005; 328: 721–727.

Stoughton RB. Applications of DNA Microarrays in Biology. *Annu. Rev. Biochem.* 2005; 74: 53–82.

Su AI, Cooke MP, Ching KA, Hakak Y, Walker JR, Wiltshire T, Orth AP, Veja RG, Sapinoso LM, Moqrich A, Patapoutian A, Hampton GM, Schultz PG, Hogenesch JB. Large-scale analysis of the human and mouse transcriptomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2002; 99 (7): 4465–4470.

Thies RS, Bauduy M, Ashton BA, Kurtzberg L, Wozney JM, Rosen V. Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2 Induces Osteoblastic Differentiation in W-20-1 7 Stromal Cells. *Endocrinology* 1992; 130 (3): 1318-1324.

Tremain N, Korkko J, Ibberson D, Kopen GC, Digirolamo C, Phinney DG. MicroSAGE analysis of 2,353 expressed genes in a single cell-derived colony of undifferentiated human mesenchymal stem cells reveals mRNA of multiple lineages. *Stem Cells* 2001; 19: 408-418.

Tsai RYL, Kittappa R, McKay RDG. Plasticity, Niches, and the Use of Stem Cells. *Developmental Cell* 2002; 2: 707-712.

Tusher VG, Tibshirani R, Chu G. Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2001; 98 (9): 5116–5121.

Ucelli A, Moretta L, Pistoia V. Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nature Reviews Immunology* 2008; 8: 726-736.

Verfaillie CM. Adult stem cells: assessing the case for pluripotency. *TRENDS in Cell Biology* 2002; 12 (11): 502-508.

Woodbury D, Reynolds K, Black IB. Adult Bone Marrow Stromal Stem Cells Express Germline, Ectodermal, Endodermal, and Mesodermal Genes Prior to Neurogenesis. *Journal of Neuroscience Research* 2002; 96:908–917.

Zago MA, Covas DT. Células-tronco, a nova fronteira da medicina. São Paulo: Ed. Atheneu; 2006.

Zhang Q, Madonna R, Shen W, Perin E, Angeli FS, Murad F, Yeh E, Buja LM, De Caterina R, Willerson JT, Geng Y. Stem cells and cardiovascular tissue repair: Mechanism, methods, and clinical applications. *Journal of Cardiothoracic-Renal Research* 2006; 1: 3-14.

Zipori, D. The nature of stem cells: state rather than entity. *Nature Reviews in Genetics* 2004; 5: 873-878.

Zipori, D. Mesenchymal stem cells: harnessing cell plasticity to tissue and organ repair. *Blood Cells, Molecules, and Diseases* 2004; 33:211 –215.

Zipori, D. The Stem State: Plasticity Is Essential, Whereas Self-Renewal and Hierarchy Are Optional. *Stem Cells* 2005; 23:719-726.

Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH. Multilineage Cells from Human Adipose Tissue: Implications for Cell-Based Therapies. *Tissue Engineering* 2001;7 (2): 211-228.

Zvaifler NJ, Marinova-Mutafchieva L, Adams G, Edwards CJ, Moss J, Burger JA, Maini RN. Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals. *Arthritis Res.* 2000; 2:477–488.

ANEXO A

ESCLARECIMENTOS AOS SUJEITOS DA PESQUISA

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

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

Você ainda poderá solicitar qualquer informação adicional aos pesquisadores responsáveis:

Prof. Dr. Geraldo A. S. Passos. Fone: (16) 3602-3030

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

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

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

1. A garantia de receber a resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento de qualquer dúvida a respeito dos procedimentos, riscos, benefícios e outras situações relacionadas com a pesquisa e o tratamento a que serei submetido.
2. A liberdade de retirar o meu consentimento e deixar de participar do estudo, a qualquer momento, sem que isso traga prejuízo à continuidade do meu tratamento.
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 serei devidamente acompanhado e assistido durante todo o período de minha participação no projeto, bem como de que será garantida a continuidade do meu tratamento, após a conclusão dos trabalhos da pesquisa.
6. O compromisso de que não serão realizados quaisquer outros procedimentos além daqueles necessários para o tratamento. Portanto, não haverá qualquer risco ou desconforto adicional.

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

Representatividade dos clones de cDNA em relação aos diferentes tecidos e linhagens de células utilizados na construção da biblioteca humana IMAGE.

Tecidos	Frequência (%)
Cérebro infantil	7.50
Placenta	5.57
Baço e fígado fetal	5.47
Coração fetal	4.65
Melanócito	3.47
Mama	3.08
Célula B	3.06
Cérebro	3.06
Útero gravídico	2.97
Pulmão fetal	2.96
Cólon	2.62
Lesão de esclerose múltipla	2.53
Tumor ovariano	2.45
Cérebro fetal	2.14
Epitélio pigmentado da retina	1.92
Célula T da linhagem Jurkat	1.91
Cerebelo	1.61
Coração	1.49
Pulmão	1.44
Tumor glandular da paratireoíde	1.44
Baço fetal	1.34
Fibroblasto	1.30
Glândula pineal	1.29
Cóclea fetal	1.22
Ilhotas pancreáticas	1.20
Endotélio	1.19
Precursor neuronal.nt2	1.19
Fígado	1.17
Testículo	1.15
Músculo	1.15
Carcinoma de colo da linh. Hcc	1.09
Células Hela	1.05
Próstata	1.03
Embrião de 8 semanas	0.85
Vesícula biliar	0.83
Hipocampo	0.79
Tumor pancreático	0.79
Tumor de endométrio	0.78
Célula T ativada	0.75
Embrião de 12 semanas	0.75
Carcinoma de pulmão	0.68
Tireoíde	0.66
Ovário	0.62
Linfoma de célula T	0.59
Neuroepitélio nt 2 rami	0.58
Embrião	0.52

Rim fetal	0.51
Tumor de testículo	0.50
Retina fetal	0.50
Leucócitos	0.44
Epidídimo	0.42
Tumor de útero	0.41
Embrião de 9semanas	0.41
Carcinoma de cólon linh.caco2	0.40
Epitélio olfatório	0.37
Tumor de pele	0.37
Útero	0.35
Tumor colo retal	0.34
Baço	0.33
Tumor de glândula adrenal	0.33
Osso	0.30
Próstata neoplásica	0.30
Embrião de 6 semanas	0.25
Pancreas	0.24
Tumor de prostate	0.24
Fígado fetal	0.23
Intestino Delgado	0.23
Aorta	0.21
Glândula adrenal infantil	0.21
Membrana sinovial	0.20
Linhagem de fígado helpq2	0.20
Rim	0.20
Adrenal	0.16
Próstata	0.16
Corpúsculo ciliar ocular	0.16
Glândula tireoíde	0.16
Epidídimo	0.16
Tecido adipose	0.16
Olho	0.16
Medula óssea	0.14
Pele fetal	0.14
Pele	0.11
Adenocarcinoma de cólon	0.11
Timo	0.11
Glândula pituitária	0.10
Sangue	0.10
Mucosa do cólon	0.10
Tecido adipose	0.10
Linh. De tumor pancreático	0.08
Córtex cerebral	0.08
Tumor pulmonar	0.07
Epitélio de sarcoma	0.07
Monócito estimulado	0.07
Tonsila	0.07
Córnea	0.06
Miosarcoma abdominal	0.06
Embrião de sete semanas	0.06
Intestino	0.06
Prepúcio	0.06
Timo	0.06
Epiderme	0.06
Omentum	0.04

Adenocarcinoma	0.04
Cabeça e pescoço	0.04
Músculo fetal	0.04
Pool	0.04
Macrófago	0.04
Lesões fetais de esclerose múltipla	0.04
Tumor de traqueia	0.04
Glândula adrenal fetal	0.04
Nódulo linfóide	0.04
Linhagem de hipocampo	0.03
Embrião inteiro	0.03
Carcinoma de célula pequena	0.03
Melanoma melanocítico da linhagem mdh high	0.03
Células B namalwa	0.03
Linhagem de adenocarcinoma de endométrio	0.03
Linhagem de adenocarcinoma mamário	0.03
Linfoma	0.03
Carcinoma de célula grande	0.03
Medula	0.03
Linhagem de adenocarcinoma	0.03
Estômago	0.03
Células de neuroblastoma	0.03
Linhagem de testículo	0.03
Veia umbilical	0.03
Célula germinativa	0.03
Linhagem celular de carcinoma embrional	0.03
Carcinoíde	0.03
Hemisfério cerebral direito	0.03
Leiomioma sarcoma	0.03
Glândula adrenal	0.03
Plaqueta	0.03
Melanoma melanocítico	0.03
Pool de cólon, rim e estômago	0.03
Leucemia de célula T	0.03
Tumor de célula nervosa	0.03
Córtex cerebral	0.03
Linfócitos de sangue periférico	0.03
Linhagem de leiomioma sarcoma	0.03
Placenta normal	0.03
Carcinoma hepatocelular	0.03
Epitélio pigmentar da retina	0.03
Linhagem celular primária de célula B de tonsilas	0.03
Linfonodo	0.03
Mama normal	0.03
Amígdala	0.03
Coriocarcinoma	0.03
Tumor de esôfago	0.03
Pool de cérebro, pulmão e testículo	0.01
Pool de tumor 5	0.01
Adenocarcinoma de pulmão	0.01
Oligodendroglioma anaplásico	0.01
Leucócito	0.01
Célula metastática	0.01
Linfoma histiocítico	0.01
Pool de pâncreas	0.01
Córtex motor cerebral	0.01

Pool de pulmão	0.01
Neuroecderme primitiva	0.01
Tumor renal	0.01
Lobo frontal cerebral	0.01
Tumor de epidídimo	0.01
Carcinoma embrionário	0.01
Glioblastoma	0.01
Pool de rearranjos de cél mielóide 18 cml cases.bcr.abl	0.01
Linhagem de hipernefoma	0.01
Carcinoma epitelial	0.01
Tumor	0.01
Múculo esquelético	0.01
Ilhota pancreática purificada	0.01
Estômago	0.01
Retinoblastoma	0.01
Linhagem de adenocarcinoma duodenal	0.01
Epitélio normal	0.01
Striatum cerebral	0.01
Tecido hepático não tumoral	0.01
Córtex temporal cerebral	0.01
Lobo frontal cerebral	0.01
Insulinoma	0.01
Tumor juvenil granular	0.01
Pnet	0.01
Osteosarcoma	0.01
Linhagem de carcinoma hepatocelular	0.01
Cólon normal	0.01
Linhagem de carcinoma epitelial	0.01
Tecido de tumor ovariano	0.01
Meduloblastoma	0.01
Endometriose ovariana em metástase	0.01
Paratireoide	0.01
Pool	0.01
Iris	0.01
Adenocarcinoma de célula renal	0.01
Gordura marrom	0.01
Glioblastoma com amplificação egfr	0.01
Melanoma melanocítico com alto mdr	0.01
Córtex occipital cerebral	0.01
Pituitária	0.01
Adenocarcinoma moderadamente diferenciado	0.01
Adipose	0.01
Carcinoma não diferenciado	0.01
Cristalino	0.01
Tronco cerebral	0.01
Orelha	0.01
Tumor de omentum maior	0.01
Linfoma burkit	0.01
Linfócitos	0.01
Córtex frontal cerebral	0.01
Epitélio pigmentar da retina normal	0.01
Melanoma	0.01
Esôfago	0.01
Osso fetal	0.01
Linhagem de hipotálamo	0.01

Linhagem celular da córtex adrenal	0.01
Linhagem celular de papiloma transicional	0.01
Epitélio pigmentar da retina fetal	0.01
Teratocarcinoma fetal	0.01
Raiz do gânglio dorsal	0.01
Nervo normal	0.01
Veia umbilical neonatal	0.01
Feocromocitoma	0.01
Células leucêmicas mielógenas agudas	0.01
Pulmão normal	0.01
Hipotálamo	0.01
Glândula salivar	0.01
Pulmão embrionário	0.01
Pool do tumor wilms primário	0.01
Linhagem de carcinoma	0.01
Células de leucemia mielógena crônica	0.01
Neuroblastoma	0.01

ANEXO C**Distribuição cromossômica das seqüências de cDNA da biblioteca IMAGE.**

ANEXO D

Frequência dos clones da biblioteca IMAGE de acordo com o processo biológico.

ANEXO E

**Lista de genes reprimidos após 7 dias de indução química da diferenciação.
Análise SAM, FDR $\leq 0,05$.**

Símbolo do gene	UGCluster	Nome
ACVRL1	Hs.591026	Activin A receptor type II-like 1
ADAM12	Hs.655388	ADAM metallopeptidase domain 12 (meltrin alpha)
ADCY1	Hs.192215	Adenylate cyclase 1 (brain)
ALPP	Hs.284255	Alkaline phosphatase, placental (Regan isozyme)
ANAPC7	Hs.529280	Anaphase promoting complex subunit 7
APPL2	Hs.506603	Adaptor protein, phosphotyrosine interaction, PH domain and leucine zipper containing 2
ARHGEF7	Hs.508738	Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 7
ATP7B	Hs.492280	ATPase, Cu ⁺⁺ transporting, beta polypeptide
BCAT1	Hs.438993	Branched chain aminotransferase 1, cytosolic
BEAN	Hs.97805	Brain expressed, associated with Nedd4
BTRC	Hs.696242	Beta-transducin repeat containing
C13orf27	Hs.398111	Chromosome 13 open reading frame 27
C14orf112	Hs.137108	Chromosome 14 open reading frame 112
C9orf165	Hs.522085	Chromosome 9 open reading frame 165
CAMK2G	Hs.699281	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase (CaM kinase) II gamma
CDKL3	Hs.105818	Cyclin-dependent kinase-like 3
CEP72	Hs.591741	Centrosomal protein 72kDa
CHM	Hs.496449	Choroideremia (Rab escort protein 1)
CHST11	Hs.17569	Carbohydrate (chondroitin 4) sulfotransferase 11
CINP	Hs.129634	Cyclin-dependent kinase 2-interacting protein
CMBL	Hs.192586	Carboxymethylenebutenolidase homolog (Pseudomonas)
CNPY1	Hs.146751	Canopy 1 homolog (zebrafish)
COL6A2	Hs.420269	Collagen, type VI, alpha 2
COTL1	Hs.289092	Coactosin-like 1 (Dictyostelium)
CPEB3	Hs.131683	Cytoplasmic polyadenylation element binding protein 3
CRHBP	Hs.115617	Corticotropin releasing hormone binding protein
CRISPLD1	Hs.436542	Cysteine-rich secretory protein LCCL domain containing 1
CTNNA2	Hs.167368	Catenin (cadherin-associated protein), alpha 2

CWC15	Hs.503597	CWC15 homolog (<i>S. cerevisiae</i>)
CXXC1	Hs.180933	CXXC finger 1 (PHD domain)
CYP26B1	Hs.91546	Cytochrome P450, family 26, subfamily B, polypeptide 1
DARS	Hs.503787	Aspartyl-tRNA synthetase
DDX47	Hs.504828	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 47
DDX55	Hs.286173	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 55
DENND1C	Hs.236449	DENN/MADD domain containing 1C
DERL1	Hs.241576	Der1-like domain family, member 1
DFNA5	Hs.520708	Deafness, autosomal dominant 5
DTNA	Hs.695993	Dystrobrevin, alpha
FAM108B1	Hs.380389	Family with sequence similarity 108, member B1
FLJ41352	Hs.535622	FLJ41352 protein
FTSJ2	Hs.279877	FtsJ homolog 2 (<i>E. coli</i>)
GAL3ST3	Hs.208343	Galactose-3-O-sulfotransferase 3
GLE1L	Hs.522418	GLE1 RNA export mediator-like (yeast)
GOLGA1	Hs.133469	Golgi autoantigen, golgin subfamily a, 1
GRM2	Hs.121510	Glutamate receptor, metabotropic 2
HDAC4	Hs.20516	Histone deacetylase 4
HNRPM	Hs.465808	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M
IGSF1	Hs.22111	Immunoglobulin superfamily, member 1
KCMF1	Hs.654968	Potassium channel modulatory factor 1
KHSRP	Hs.699378	KH-type splicing regulatory protein (FUSE binding protein 2)
KIAA0319	Hs.26441	KIAA0319
KIAA0841	Hs.7426	KIAA0841
KLHL9	Hs.657270	Kelch-like 9 (<i>Drosophila</i>)
LCA5	Hs.21945	Leber congenital amaurosis 5
LMTK3	Hs.207426	Lemur tyrosine kinase 3
LOC147343	Hs.380030	Hypothetical protein LOC147343
LOC150568	Hs.107284	Hypothetical protein LOC150568
LOC152485	Hs.133916	Hypothetical protein LOC152485
LOC339674	Hs.517656	Hypothetical protein LOC339674
LOC51057	Hs.414952	Hypothetical protein LOC51057
LOC645561	Hs.527211	Hypothetical LOC645561
LRRN2	Hs.26312	Leucine rich repeat neuronal 2
MAP2K1	Hs.145442	Mitogen-activated protein kinase kinase 1
MED21	Hs.286145	Mediator complex subunit 21
MKLN1	Hs.44693	Muskelin 1, intracellular mediator containing kelch motifs
MLF2	Hs.524214	Myeloid leukemia factor 2

MOBP	Hs.121333	Myelin-associated oligodendrocyte basic protein
MRPS6	Hs.302742	Mitochondrial ribosomal protein S6
NBPF12	Hs.568235	Neuroblastoma breakpoint family, member 12
NSL1	Hs.497692	NSL1, MIND kinetochore complex component, homolog (S. cerevisiae)
OR2C3	Hs.23491	Olfactory receptor, family 2, subfamily C, member 3
PDIA3	Hs.591095	Protein disulfide isomerase family A, member 3
PDPK1	Hs.459691	3-phosphoinositide dependent protein kinase-1
POU2F3	Hs.227115	POU class 2 homeobox 3
PPP1R11	Hs.82887	Protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 11
PQLC2	Hs.647620	PQ loop repeat containing 2
PRKAA1	Hs.43322	Protein kinase, AMP-activated, alpha 1 catalytic subunit
PRKDC	Hs.700597	Protein kinase, DNA-activated, catalytic polypeptide
PRPSAP1	Hs.77498	Phosphoribosyl pyrophosphate synthetase-associated protein 1
PRR6	Hs.433422	Proline rich 6
PSG5	Hs.654415	Pregnancy specific beta-1-glycoprotein 5
PTGIR	Hs.458324	Prostaglandin I2 (prostacyclin) receptor (IP)
PWP2	Hs.449076	PWP2 periodic tryptophan protein homolog (yeast)
RAD51L3	Hs.631757	RAD51-like 3 (S. cerevisiae)
RASGRP1	Hs.591127	RAS guanyl releasing protein 1 (calcium and DAG-regulated)
RASIP1	Hs.233955	Ras interacting protein 1
RBM7	Hs.533736	RNA binding motif protein 7
RSBN1	Hs.486285	Round spermatid basic protein 1
RYR1	Hs.466664	Ryanodine receptor 1 (skeletal)
S100P	Hs.2962	S100 calcium binding protein P
SH3GL3	Hs.270055	SH3-domain GRB2-like 3
SNX10	Hs.571296	Sorting nexin 10
SNX26	Hs.515364	Sorting nexin 26
SPIN1	Hs.146804	Spindlin 1
STRA6	Hs.24553	Stimulated by retinoic acid gene 6 homolog (mouse)
TMEM107	Hs.513933	Transmembrane protein 107
TMLHE	Hs.133321	Trimethyllysine hydroxylase, epsilon
TNIK	Hs.34024	TRAF2 and NCK interacting kinase
TRIM58	Hs.323858	Tripartite motif-containing 58
TRRAP	Hs.203952	Transformation/transcription domain-associated protein
TSKU	Hs.8361	Tsukushin
TTLL12	Hs.517670	Tubulin tyrosine ligase-like family, member 12
WARS2	Hs.523506	Tryptophanyl tRNA synthetase 2, mitochondrial

WDR40A	Hs.699347	WD repeat domain 40A
WWC3	Hs.527524	WWC family member 3
YTHDF3	Hs.491861	YTH domain family, member 3
ZFAND6	Hs.654787	Zinc finger, AN1-type domain 6
ZNF641	Hs.23492	Zinc finger protein 641
ZNF691	Hs.20879	Zinc finger protein 691

ANEXO F

**Lista de genes induzidos após 7 dias de indução química da diferenciação.
Análise SAM, FDR < 0,05.**

Símbolo do gene	UGCluster	Nome
ABCB8	Hs.647118	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 8
ACACB	Hs.234898	Acetyl-Coenzyme A carboxylase beta
ACP5	Hs.1211	Acid phosphatase 5, tartrate resistant
ADAMTS1	Hs.643357	ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif, 1
ADCY7	Hs.513578	Adenylate cyclase 7
ALCAM	Hs.591293	Activated leukocyte cell adhesion molecule
ALDH3A2	Hs.499886	Aldehyde dehydrogenase 3 family, member A2
ANKRD34	Hs.620591	Ankyrin repeat domain 34
ANKRD49	Hs.29052	Ankyrin repeat domain 49
AOX1	Hs.484813	Amine oxidase (flavin containing) domain 1
APLP2	Hs.695920	Amyloid beta (A4) precursor-like protein 2
ARHGEF7	Hs.508738	Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 7
ARPC2	Hs.529303	Actin related protein 2/3 complex, subunit 2, 34kDa
ARRB1	Hs.503284	Arrestin, beta 1
ASB3	Hs.40763	Ankyrin repeat and SOCS box-containing 3
ASGR1	Hs.12056	Asialoglycoprotein receptor 1
ATP1B3	Hs.477789	ATPase, Na ⁺ /K ⁺ transporting, beta 3 polypeptide
ATP4A	Hs.36992	ATPase, H ⁺ /K ⁺ exchanging, alpha polypeptide
ATP6AP2	Hs.700634	ATPase, H ⁺ transporting, lysosomal accessory protein 2
ATR	Hs.271791	Ataxia telangiectasia and Rad3 related
ATXN7L3	Hs.512651	Ataxin 7-like 3
BGN	Hs.821	Biglycan
BIN1	Hs.193163	Bridging integrator 1
BLZF1	Hs.130746	Basic leucine zipper nuclear factor 1 (JEM-1)
BMP1	Hs.1274	Bone morphogenetic protein 1
BZW2	Hs.487635	Basic leucine zipper and W2 domains 2
C11orf59	Hs.530753	Chromosome 11 open reading frame 59
C11orf9	Hs.473109	Chromosome 11 open reading frame 9
C12orf52	Hs.524762	Chromosome 12 open reading frame 52
C14orf102	Hs.528131	Chromosome 14 open reading frame 102
C17orf55	Hs.631762	Chromosome 17 open reading frame 55

C1orf2	Hs.348308	Chromosome 1 open reading frame 2
C20orf103	Hs.22920	Chromosome 20 open reading frame 103
C5orf30	Hs.482976	Chromosome 5 open reading frame 30
C6orf148	Hs.433062	Chromosome 6 open reading frame 148
C9orf167	Hs.495541	Chromosome 9 open reading frame 167
CABLES2	Hs.301040	Cdk5 and Abl enzyme substrate 2
CABP5	Hs.117694	Calcium binding protein 5
CACNA1E	Hs.437444	Calcium channel, voltage-dependent, R type, alpha 1E subunit
CALU	Hs.7753	Calumenin
CAPN10	Hs.112218	Calpain 10
CCDC35	Hs.647273	Coiled-coil domain containing 35
CCDC94	Hs.21811	Coiled-coil domain containing 94
CCNG1	Hs.79101	Cyclin G1
CCNG2	Hs.13291	Cyclin G2
CDKN2D	Hs.435051	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2D (p19, inhibits CDK4)
CENTA1	Hs.644629	Centaurin, alpha 1
CHMP6	Hs.514560	Chromatin modifying protein 6
CMBL	Hs.192586	Carboxymethylenebutenolidase homolog (Pseudomonas)
CNTNAP2	Hs.655684	Contactin associated protein-like 2
COG7	Hs.185807	Component of oligomeric golgi complex 7
COL6A3	Hs.233240	Collagen, type VI, alpha 3
CORO1B	Hs.6191	Coronin, actin binding protein, 1B
CPD	Hs.446079	Carboxypeptidase D
CPNE8	Hs.40910	Copine VIII
CRADD	Hs.591016	CASP2 and RIPK1 domain containing adaptor with death domain
CRIPAK	Hs.26410	Cysteine-rich PAK1 inhibitor
CSGlcA-T	Hs.647084	Chondroitin sulfate glucuronyltransferase
CSTF2T	Hs.591358	Cleavage stimulation factor, 3' pre-RNA, subunit 2, 64kDa, tau variant
CTSA	Hs.652282	Cathepsin A
DAZAP2	Hs.369761	DAZ associated protein 2
DCLRE1C	Hs.656065	DNA cross-link repair 1C (PSO2 homolog, S. cerevisiae)
DDX5	Hs.279806	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 5
DIP2B	Hs.505516	DIP2 disco-interacting protein 2 homolog B (Drosophila)
DIXDC1	Hs.655626	DIX domain containing 1
DKFZp761E198	Hs.591957	DKFZp761E198 protein
DKFZp761P0423	Hs.657673	Homolog of rat pragma of Rnd2

DLG3	Hs.522680	Discs, large homolog 3 (neuroendocrine-dlg, Drosophila)
DLX6	Hs.249196	Distal-less homeobox 6
DLX6	Hs.249196	Distal-less homeobox 6
DNAJA1	Hs.445203	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily A, member 1
DSC2	Hs.95612	Desmocollin 2
EIF1	Hs.150580	Eukaryotic translation initiation factor 1
EIF4G1	Hs.433750	Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma, 1
ELAVL4	Hs.213050	ELAV (embryonic lethal, abnormal vision, Drosophila)-like 4 (Hu antigen D)
EPAS1	Hs.468410	Endothelial PAS domain protein 1
EPS15	Hs.83722	Epidermal growth factor receptor pathway substrate 15
EVL	Hs.125867	Enah/Vasp-like
EXOC3	Hs.646923	Exocyst complex component 3
FAM33A	Hs.463607	Family with sequence similarity 33, member A
FAM46A	Hs.10784	Family with sequence similarity 46, member A
FBXL3	Hs.508284	F-box and leucine-rich repeat protein 3
FER1L4	Hs.72222	Fer-1-like 4 (C. elegans)
FIGN	Hs.593650	Fidgetin
FLJ11171	Hs.72782	Hypothetical protein FLJ11171
FLJ31438	Hs.468590	Hypothetical protein FLJ31438
FLJ37078	Hs.694857	Hypothetical protein FLJ37078
FLJ43663	Hs.150556	Hypothetical protein FLJ43663
FN1	Hs.203717	Fibronectin 1
FOXP3	Hs.434286	Forkhead box N3
FMR1	Hs.52788	Fragile X mental retardation, autosomal homolog 2
GAPVD1	Hs.495134	GTPase activating protein and VPS9 domains 1
GCN1L1	Hs.298716	GCN1 general control of amino-acid synthesis 1-like 1 (yeast)
GDF10	Hs.2171	Growth differentiation factor 10
GJA5	Hs.447968	Gap junction protein, alpha 5, 40kDa
GLRX3	Hs.42644	Glutaredoxin 3
GNAZ	Hs.584760	Guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha z polypeptide
GNB1	Hs.700577	Guanine nucleotide binding protein (G protein), beta polypeptide 1
GNB4	Hs.173030	Guanine nucleotide binding protein (G protein), beta polypeptide 4
GNG12	Hs.700661	Guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma 12
GNG13	Hs.247888	Guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma 13

GNPDA1	Hs.633853	Glucosamine-6-phosphate deaminase 1
GOLPH3	Hs.408909	Golgi phosphoprotein 3 (coat-protein)
GPR158	Hs.499108	G protein-coupled receptor 158
GPX3	Hs.663430	Glutathione peroxidase 3 (plasma)
GSTP1	Hs.523836	Glutathione S-transferase pi
HADHB	Hs.534639	Hydroxyacyl-Coenzyme A dehydrogenase/3-ketoacyl-Coenzyme A thiolase/enoyl-Coenzyme A hydratase (trifunctional protein), beta subunit
HAX1	Hs.199625	HCLS1 associated protein X-1
HCRT1	Hs.388226	Hypocretin (orexin) receptor 1
HINT1	Hs.483305	Histidine triad nucleotide binding protein 1
HIPK3	Hs.201918	Homeodomain interacting protein kinase 3
HMGCL	Hs.533444	3-hydroxymethyl-3-methylglutaryl-Coenzyme A lyase (hydroxymethylglutaricaciduria)
HNRPF	Hs.808	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F
HPN	Hs.182385	Hepsin (transmembrane protease, serine 1)
HSPA1L	Hs.690634	Heat shock 70kDa protein 1-like
HSU79275	Hs.598507	Hypothetical protein HSU79275
HTRA1	Hs.501280	HtrA serine peptidase 1
HYAL3	Hs.129910	Hyaluronoglucosaminidase 3
IGFBP4	Hs.462998	Insulin-like growth factor binding protein 4
IMPA2	Hs.367992	Inositol(myo)-1(or 4)-monophosphatase 2
IMPDH1	Hs.654401	IMP (inosine monophosphate) dehydrogenase 1
ITFG1	Hs.42217	Integrin alpha FG-GAP repeat containing 1
ITGA5	Hs.505654	Integrin, alpha 5 (fibronectin receptor, alpha polypeptide)
ITPKB	Hs.528087	Inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase B
JMJD2C	Hs.157106	Jumonji domain containing 2C
KCNF1	Hs.23735	Potassium voltage-gated channel, subfamily F, member 1
KCNIP4	Hs.655705	Kv channel interacting protein 4
KCNT2	Hs.657046	Potassium channel, subfamily T, member 2
KCTD12	Hs.693617	Potassium channel tetramerisation domain containing 12
KIAA1409	Hs.126561	KIAA1409
KIAA1729	Hs.455089	KIAA1729 protein
KIDINS220	Hs.9873	Kinase D-interacting substrate of 220 kDa
KIF1C	Hs.435120	Kinesin family member 1C
KLHDC2	Hs.509264	Kelch domain containing 2
KLHL25	Hs.498371	Kelch-like 25 (Drosophila)
KLHL3	Hs.655084	Kelch-like 3 (Drosophila)

KSR1	Hs.133534	Kinase suppressor of ras 1
LCORL	Hs.446201	Ligand dependent nuclear receptor corepressor-like
LGALS1	Hs.445351	Lectin, galactoside-binding, soluble, 1 (galectin 1)
LHFP	Hs.507798	Lipoma HMGIC fusion partner
LIMCH1	Hs.335163	LIM and calponin homology domains 1
LOC286440	Hs.348844	Hypothetical protein LOC286440
LOC348692	Hs.656781	Hypothetical protein LOC348692
LOC643837	Hs.133183	Hypothetical protein LOC643837
LOC645323	Hs.12827	Hypothetical LOC645323
LOC728517	Hs.568606	Hypothetical protein LOC728517
LRCH2	Hs.65366	Leucine-rich repeats and calponin homology (CH) domain containing 2
LSM1	Hs.425311	LSM1 homolog, U6 small nuclear RNA associated (S. cerevisiae)
MAGIX	Hs.193170	MAGI family member, X-linked
MAP3K10	Hs.466743	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 10
MAP4K2	Hs.534341	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase kinase 2
MAP7D3	Hs.446275	MAP7 domain containing 3
MARCH1	Hs.696248	Membrane-associated ring finger (C3HC4) 1
MARK3	Hs.35828	MAP/microtubule affinity-regulating kinase 3
MAST2	Hs.319481	Microtubule associated serine/threonine kinase 2
ME3	Hs.199743	Malic enzyme 3, NADP(+)-dependent, mitochondrial
MED13	Hs.282678	Mediator complex subunit 13
MEIS3	Hs.380923	Meis homeobox 3
MFAP5	Hs.512842	Microfibrillar associated protein 5
MICAL2	Hs.501928	Microtubule associated monooxygenase, calponin and LIM domain containing 2
MIER3	Hs.657594	Mesoderm induction early response 1, family member 3
MLLT1	Hs.699150	Myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia (trithorax homolog, Drosophila); translocated to, 1
MORF4L1	Hs.374503	Mortality factor 4 like 1
MRE11A	Hs.192649	MRE11 meiotic recombination 11 homolog A (S. cerevisiae)
MRVI1	Hs.501898	Murine retrovirus integration site 1 homolog
MSN	Hs.87752	Moesin
MYH9	Hs.474751	Myosin, heavy chain 9, non-muscle
NACA	Hs.505735	Nascent polypeptide-associated complex alpha subunit
NAT9	Hs.144058	N-acetyltransferase 9
NFIA	Hs.191911	Nuclear factor I/A

NFKBIE	Hs.458276	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, epsilon
NNMT	Hs.503911	Nicotinamide N-methyltransferase
NOMO1	Hs.583391	NODAL modulator 1
NPTXR	Hs.91622	Neuronal pentraxin receptor
NRD1	Hs.584782	Nardilysin (N-arginine dibasic convertase)
NRGN	Hs.524116	Neurogranin (protein kinase C substrate, RC3)
NUMB	Hs.654609	Numb homolog (Drosophila)
OAS3	Hs.528634	2'-5'-oligoadenylate synthetase 3, 100kDa
OGT	Hs.405410	O-linked N-acetylglucosamine (GlcNAc) transferase (UDP-N-acetylglucosamine:polypeptide-N-acetylglucosaminyl transferase)
OTOF	Hs.91608	Otoferlin
P4HB	Hs.464336	Procollagen-proline, 2-oxoglutarate 4-dioxygenase (proline 4-hydroxylase), beta polypeptide
PAP2D	Hs.483948	Phosphatidic acid phosphatase type 2
PCMTD1	Hs.308480	Protein-L-isoaspartate (D-aspartate) O-methyltransferase domain containing 1
PCNP	Hs.654949	PEST proteolytic signal containing nuclear protein
PCYOX1	Hs.591572	Prenylcysteine oxidase 1
PDE4D	Hs.654358	Phosphodiesterase 4D, cAMP-specific (phosphodiesterase E3 duncce homolog, Drosophila)
PDGFRB	Hs.509067	Platelet-derived growth factor receptor, beta polypeptide
PDHX	Hs.502315	Pyruvate dehydrogenase complex, component X
PDK2	Hs.256667	Pyruvate dehydrogenase kinase, isozyme 2
PDYN	Hs.22584	Prodynorphin
PER1	Hs.445534	Period homolog 1 (Drosophila)
PIK3AP1	Hs.310456	Phosphoinositide-3-kinase adaptor protein 1
PKN3	Hs.300485	Protein kinase N3
POLE	Hs.657680	Polymerase (DNA directed), epsilon
PON1	Hs.370995	Paraoxonase 1
PPP1CB	Hs.591571	Protein phosphatase 1, catalytic subunit, beta isoform
PPP1R9B	Hs.514323	Protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 9B
PREPL	Hs.444349	Prolyl endopeptidase-like
PRKAR1B	Hs.520851	Protein kinase, cAMP-dependent, regulatory, type I, beta
PRSS23	Hs.25338	Protease, serine, 23
PSMB1	Hs.352768	Proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type, 1
PSMD10	Hs.522752	Proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase,

PSMD5	Hs.193725	Proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 5
PXMP3	Hs.437966	Peroxisomal membrane protein 3, 35kDa (Zellweger syndrome)
RAB2A	Hs.369017	RAB2A, member RAS oncogene family
RAB37	Hs.592097	RAB37, member RAS oncogene family
RAI16	Hs.491223	Retinoic acid induced 16
RBJ	Hs.434993	Rab and DnaJ domain containing
RBM23	Hs.4997	RNA binding motif protein 23
RBMS2	Hs.645521	RNA binding motif, single stranded interacting protein 2
REC8	Hs.419259	REC8 homolog (yeast)
RECQL4	Hs.31442	RecQ protein-like 4
RNF149	Hs.142074	Ring finger protein 149
RNF216L	Hs.520636	Ring finger protein 216-like
RP13-102H20.1	Hs.22905	Hypothetical protein FLJ30058
RPN1	Hs.518244	Ribophorin I
RSPO2	Hs.444834	R-spondin 2 homolog (Xenopus laevis)
SCARB2	Hs.349656	Scavenger receptor class B, member 2
SEPP1	Hs.700640	Selenoprotein P, plasma, 1
SERHL	Hs.656672	Serine hydrolase-like
SETMAR	Hs.475300	SET domain and mariner transposase fusion gene
SGCB	Hs.438953	Sarcoglycan, beta (43kDa dystrophin-associated glycoprotein)
SH2D3C	Hs.306412	SH2 domain containing 3C
SH3TC2	Hs.483784	SH3 domain and tetratricopeptide repeats 2
SHC1	Hs.433795	SHC (Src homology 2 domain containing) transforming protein 1
SHC1	Hs.433795	SHC (Src homology 2 domain containing) transforming protein 1
SLC12A5	Hs.21413	Solute carrier family 12, (potassium-chloride transporter) member 5
SLC19A3	Hs.221597	Solute carrier family 19, member 3
SLC44A2	Hs.631631	Solute carrier family 44, member 2
SNAP29	Hs.108002	Synaptosomal-associated protein, 29kDa
SORCS1	Hs.591915	Sortilin-related VPS10 domain containing receptor 1
SOX1	Hs.202526	SRY (sex determining region Y)-box 1
SPRY2	Hs.18676	Sprouty homolog 2 (Drosophila)
STAG1	Hs.412586	Stromal antigen 1
STARD7	Hs.469331	StAR-related lipid transfer (START) domain containing 7
STIP1	Hs.337295	Stress-induced-phosphoprotein 1 (Hsp70/Hsp90-organizing protein)

STYX	Hs.364980	Serine/threonine/tyrosine interacting protein
SUHW4	Hs.511477	Suppressor of hairy wing homolog 4 (Drosophila)
SULT2B1	Hs.369331	Sulfotransferase family, cytosolic, 2B, member 1
SV2B	Hs.592018	Synaptic vesicle glycoprotein 2B
SVEP1	Hs.522334	Sushi, von Willebrand factor type A, EGF and pentraxin domain containing 1
SVEP1	Hs.522334	Sushi, von Willebrand factor type A, EGF and pentraxin domain containing 1
SYP	Hs.632804	Synaptophysin
TCBA1	Hs.656604	T-cell lymphoma breakpoint associated target 1
THOC2	Hs.592243	THO complex 2
TICAM2	Hs.696163	Toll-like receptor adaptor molecule 2
TMEM102	Hs.655662	Transmembrane protein 102
TMEM138	Hs.406530	Transmembrane protein 138
TMEM176B	Hs.648445	Transmembrane protein 176B
TNKS1BP1	Hs.530730	Tankyrase 1 binding protein 1, 182kDa
TNRC4	Hs.26047	Trinucleotide repeat containing 4
TP53I11	Hs.554791	Tumor protein p53 inducible protein 11
TRAK2	Hs.152774	Trafficking protein, kinesin binding 2
TRHDE	Hs.199814	Thyrotropin-releasing hormone degrading enzyme
TRIM13	Hs.436922	Tripartite motif-containing 13
TRIM2	Hs.435711	Tripartite motif-containing 2
TRIM22	Hs.501778	Tripartite motif-containing 22
TRIP10	Hs.515094	Thyroid hormone receptor interactor 10
TTYH1	Hs.268728	Tweety homolog 1 (Drosophila)
UBAP2	Hs.493739	Ubiquitin associated protein 2
VGLL3	Hs.435013	Vestigial like 3 (Drosophila)
VGLL3	Hs.435013	Vestigial like 3 (Drosophila)
WDR57	Hs.33962	WD repeat domain 57 (U5 snRNP specific)
ZADH1	Hs.632344	Zinc binding alcohol dehydrogenase, domain containing 1
ZC3H6	Hs.190477	Zinc finger CCCH-type containing 6
ZCCHC6	Hs.655162	Zinc finger, CCHC domain containing 6
ZNF236	Hs.189826	Zinc finger protein 236
ZNF44	Hs.656794	Zinc finger protein 44