UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

CARLA MARTINS KANETO

**Análise da Expressão Gênica durante a diferenciação
osteogênica de células mesenquimais estromais de medula
óssea de pacientes portadores de Osteogênese Imperfeita**

Ribeirão Preto

2011

CARLA MARTINS KANETO

**Análise da Expressão Gênica durante a diferenciação
osteogênica de células mesenquimais estromais de medula
óssea de pacientes portadores de Osteogênese Imperfeita**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Doutor em Ciências
Biológicas

Área de Concentração: Genética

Orientador: Prof. Dr. Wilson Araújo da Silva
Junior

Ribeirão Preto

2011

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

FICHA CATALOGRÁFICA Kaneto, Carla Martins

Análise da Expressão Gênica durante a diferenciação osteogênica de
células mesenquimais estromais de medula óssea de pacientes portadores de
Osteogênese Imperfeita

Ribeirão Preto, 2011.

132 p. : il.; 30cm

Tese de doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão
Preto/USP.

Área de concentração: Genética.

Orientador: Silva-Junior, Wilson Araújo.

1. Células-tronco mesenquimais. 2. Osteogênese Imperfeita. 3. *COL1A1*
4. MicroRNA. 5. Expressão gênica. 6. Síndrome de Bruck.

AGRADECIMENTOS

Agradeço de coração a todos que de alguma forma contribuíram com a realização desta pesquisa.

Em especial, agradeço aos pacientes, que de forma altruísta, submeteram-se à dor física, com o único objetivo de ajudar a ciência a melhorar o tratamento de pessoas com doenças semelhantes às suas.

Ao Prof. Dr. Wilson Araújo da Silva Junior pela orientação, confiança e oportunidade de trabalhar em sua linha de pesquisa. Esses seis anos de trabalho em sob seu comando foram mais do que fundamentais para o meu crescimento e amadurecimento profissional.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, do Departamento de Genética da FMRP-USP, pelos excelentes professores e pela qualidade de formação que é oferecida. Agradeço em especial à Susie, que sempre me ajudou com muita atenção, eficiência e carinho em todos os momentos em que precisei.

Ao CNPq pelo apoio financeiro, imprescindível para a realização deste trabalho.

À equipe de Endocrinologia do Hospital das Clínicas da FMRP-USP pela atenção, dedicação, paciência e presteza na coleta das amostras dos pacientes. Em especial ao Prof. Dr. Francisco José de Albuquerque de Paula também pelo apoio e conhecimento compartilhado.

Agradeço especialmente à Dra. Karen Lima Prata, pela dedicação e ajuda imensurável desde o início desta pesquisa.

Ao Laboratório de Biologia Celular do Centro Regional de Hemoterapia de Ribeirão Preto do HCFMRP-USP. À Maristela, Sâmia, Taísa e Karina pela ajuda na realização deste trabalho, pela discussão dos experimentos, e principalmente, pela amizade, apoio e carinho nesses últimos anos.

A Patrícia Santos Pereira Lima por todos esses anos compartilhados, assim como pelos ensinamentos, conselhos, força e angústias divididas. Por sua amizade, apoio e por tudo o que pude aprender com você dentro e fora do laboratório. Essa amizade o tempo e a distância não vão diminuir.

A todos meus companheiros dos laboratórios de pesquisa do Hemocentro que de diferentes formas contribuíram para este trabalho. Agradeço pela amizade, força e ajuda nos experimentos. Em especial, a Meire Tarlá, por todo auxílio, paciência, dedicação e carinho.

Aos meus “amigos do lab” (você sabem quem são...) pela amizade e carinho sinceros, pela força, conselhos e apoio nos momentos em que precisei, pelos bons momentos compartilhados em nossas saídas e encontros, e também pelas nossas conversas sobre assuntos polêmicos na hora do café. Foi muito bom conviver com vocês!

Em especial a minha amiga Viviane Aline Oliveira Silva, que com sua delicadeza e outras qualidades imensuráveis chegou e conquistou um lugar muito especial no meu coração. Obrigada pelos bons momentos e por toda a boa influência que você representa em minha vida.

As minhas “irmãs”, Anne e Lúcia. Nada que eu possa escrever aqui representa bem o meu sentimento por vocês. Obrigada pela sua amizade, companheirismo e por todas as coisas que dividimos juntas ao longo de todos esses anos. Amo vocês.

Aos meus queridos pais, Carlos e Vera, e ao meu irmão Luciano pelo amor e apoio incondicionais que sempre recebi para ir à busca de meus sonhos. Saibam que cada conquista minha é um triunfo de vocês.

Ao meu querido Junior, meu amor, minha referência... Agradeço a Deus, sempre, por ter colocado você em minha vida. Obrigada pela compreensão, carinho, apoio e ajuda incondicionais, durante toda essa e outras trajetórias. Essa conquista também é sua e tenho certeza de que outros tantos sonhos nós conquistaremos juntos.

A Deus pela minha existência, pelo amor incondicional, pela saúde, força, capacidade e esperança que me dá todos os dias.

“Quero, um dia, dizer às pessoas que nada foi em vão...
Que o amor existe, que vale a pena se doar às amizades e às pessoas, que a vida é bela
sim e que eu sempre dei o melhor de mim...
e que valeu a pena.”

Mário Quintana

RESUMO

Kaneto, Carla Martins. **Análise da Expressão Gênica durante a diferenciação osteogênica de células mesenquimais estromais da medula óssea de pacientes portadores de Osteogênese Imperfeita.** 2011. 132 f. Tese (Doutorado) – Departamento de Genética – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, SP, 2011.

A osteogênese imperfeita (OI) é caracterizada como uma desordem genética na qual uma osteopenia generalizada leva a baixa estatura, fragilidade óssea excessiva e deformidades ósseas graves. As células mesenquimais estromais multipotentes (CTMs) são precursores presentes na medula óssea adulta capazes de se diferenciar em osteoblastos, adipócitos e mioblastos que passaram a ter grande importância como fonte terapia celular. O objetivo do presente estudo foi analisar o perfil de expressão gênica durante a diferenciação osteogênica a partir de células mesenquimais estromais multipotentes da medula óssea obtidas de pacientes diagnosticados com Osteogênese Imperfeita e de indivíduos controle. Foram coletadas amostras de três indivíduos normais e cinco amostras de pacientes portadores de Osteogênese Imperfeita. As células mononucleares (CMN) foram isoladas para a obtenção de células mesenquimais que foram expandidas até a terceira passagem quando iniciou-se o estímulo para diferenciação osteogênica. Também foram realizadas análises para contagem de CFU-F e para quatro das cinco amostras de pacientes portadores de OI, o número de CFU-F observado foi inferior ao geralmente encontrado para amostras de doadores normais. Foram coletadas células para análises de imunofenotipagem celular por citometria de fluxo e o RNA foi extraído originando a amostra denominada T0. As garrafas restantes tiveram suas células estimuladas para diferenciação osteogênica. Após um dia em cultura com estímulo, mais uma garrafa teve o RNA de suas células extraído (T1), e o mesmo procedimento foi realizado nos dias 2 (T2), 7 (T7), 12 (T12), 17 (T17) e 21 (T21). Todas as amostras demonstraram possuir potencial de diferenciação *in vitro* em osteoblastos e adipócitos. A imunofenotipagem de células mesenquimais foi realizada e as amostras de todos os pacientes apresentaram perfil imunofenotípico compatível com trabalhos anteriores. Foram identificadas mutações nos genes *COL1A1* e/ou *COL1A2* responsáveis pelo desenvolvimento da doença para quatro dos cinco pacientes avaliados. Para o paciente portador de Osteogênese Imperfeita e Síndrome de Bruck a região codificadora do gene *PLOD2* também foi seqüenciada, porém não foram encontradas mutações. A análise da expressão gênica foi realizada pela técnica de microarranjos e foram identificados vários genes com expressão diferencial. Alguns genes com importância fundamental na diferenciação osteoblástica apresentaram menor expressão nas amostras dos pacientes portadores de OI, sugerindo um menor comprometimento das CTMs desses pacientes com a linhagem osteogênica. Outros genes também tiveram sua expressão diferencial confirmada por PCR em Tempo Real. Foi observado um aumento na expressão de genes relacionados a adipócitos, sugerindo um aumento da diferenciação adipogênica em detrimento à diferenciação osteogênica. A expressão das variantes do gene *PLOD2* mostrou-se diferencial entre amostras normais, de OI e do paciente portador de Síndrome de Bruck. Também foi evidenciada uma expressão diferencial do microRNA 29b, um microRNA com papel estabelecido durante a diferenciação osteogênica, sugerindo um mecanismo de regulação dependente da quantidade de RNAm do seu gene alvo, o *COL1A1*.

ABSTRACT

Kaneto, Carla Martins. **Gene expression analysis of human multipotent mesenchymal stromal cells derived from bone marrow of Osteogenesis Imperfecta patients during osteoblast differentiation.** 2011. 132 f. PhD thesis – Department of Genetics – Ribeirão Preto School of Medicine – São Paulo University, SP, 2011.

Osteogenesis imperfecta (OI) is characterized as a genetic disorder in which a generalized osteopenia leads to short stature, bone fragility and serious skeletal deformities. Mesenchymal stem cells (MSCs) are precursors present in adult bone marrow that can differentiate into osteoblasts, adipocytes and myoblasts that have been given great importance as a source cell therapy. The aim of this study was to analyze the gene expression profile during osteogenic differentiation from mesenchymal stem cells from bone marrow taken from patients diagnosed with Osteogenesis Imperfecta and control subjects. Samples were collected from three normal individuals and five samples from patients with Osteogenesis Imperfecta. Mononuclear cells (MON) were isolated to obtain mesenchymal cells that were expanded until third passage when the stimulus for osteogenic differentiation was induced. Analyses were also conducted to count the CFU-F and for four of the five samples from patients with OI, the number of CFU-F observed was lower than generally found for normal samples. Cells were collected for analysis of cell immunophenotyping by flow cytometry and RNA was extracted from the resulting sample called T0. Remaining cells were stimulated for osteogenic differentiation. After a day in culture with stimulation, cells from another bottle had their RNA extracted (T1), and the same procedure was performed on days 2 (T2), 7 (T7), 12 (T12), 17 (T17) and 21 (T21). All samples have shown potential of *in vitro* differentiation into osteoblasts and adipocytes. Immunophenotyping of mesenchymal cells was performed and samples of all patients had immunophenotypic profile consistent with previous works. We identified mutations in *COL1A1* and / or *COL1A2* responsible for developing the disease for four of five patients. For the patient with Osteogenesis Imperfecta and Bruck Syndrome, coding region of the gene *PLOD2* was also sequenced, but no mutations were found. The gene expression analysis was performed by microarray and identified several genes with differential expression. Some genes of fundamental importance in osteoblast differentiation showed lower expression in samples from patients with OI, suggesting a minor involvement of MSCs of patients with osteogenic lineage. Other genes also confirmed their differential expression by Real Time PCR. We observed an increased expression of genes related to adipocytes, suggesting an increased adipogenic differentiation at the expense of osteogenic differentiation. The expression of *PLOD2* gene variants proved to be different between normal samples, OI and the patient with Bruck Syndrome. There was also evidence of differential expression of 29b microRNA, with established role during osteogenic differentiation, suggesting a mechanism dependent regulation of mRNA abundance of its gene target, *COL1A1*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema ilustrativo mostrando a participação de genes importantes para a diferenciação de CTMs em algumas linhagens específicas.....	17
Figura 2. Esquema ilustrando a composição do colágeno.....	21
Figura 3. Esquema ilustrativo das mutações no gene <i>COL1A1</i>	22
Figura 4. Representação esquemática dos genes <i>COL1A1</i> e <i>COL1A2</i>	22
Figura 5. Esquema representativo da abordagem utilizada no isolamento de células mononucleares humanas.....	28
Figura 6. Esquema ilustrativo do delineamento experimental de cultivo celular.....	30
Figura 7. CTMs indiferenciadas dos pacientes portadores de Osteogênese Imperfeita fotografadas em microscopia por contraste de fase.....	49
Figura 8. Exemplos de CTMs diferenciadas em adipócitos e osteoblastos.....	51
Figura 9. Exemplo da visualização do alinhamento realizado pelo software <i>Polyphred</i>	52
Figura 10. Esquema da estrutura do gene <i>COL1A1</i> mostrando a localização das mutações identificadas para cada um dos pacientes analisados.....	53
Figura 11. Esquema da estrutura do gene <i>COL1A2</i> mostrando a localização das mutações identificadas para cada um dos pacientes analisados.....	54
Figura 12. Gráficos das análises da expressão dos genes marcadores diferenciação osteoblástica.....	55
Figura 13. Exemplo de visualização do Programa Genesis.....	56
Figura 14. Fluxograma das análises realizadas para a seleção de gene.....	58
Figura 15. Distribuição do nível de expressão gênica em todas amostras.....	60
Figura 16. Gráfico ilustrando o agrupamento hierárquico simples dos 100 genes pré-selecionados.....	61
Figura 17. Gráfico ilustrando o agrupamento consenso dos 100 genes pré-selecionados.....	61
Figura 18. Gráfico ilustrando o agrupamento hierárquico simples dos 100	62

genes pré-selecionados com alteração na ordem dos grupos.....

Figura 19. Média dos valores de expressão dos genes classificados nos grupos C e D,..... 63

Figura 20. Classificação dos genes pertencentes ao grupo C quanto ao processo biológico..... 67

Figura 21. Classificação dos genes pertencentes ao grupo D quanto ao processo biológico..... 68

Figura 22. Gráfico do tipo vulcano mostrando os genes hiperexpressos e hipoexpressos..... 69

Figura 23. Perfil de expressão dos genes relacionados à diferenciação adipogênica pertencentes ao grupo D..... 70

Figura 24. Gráficos das análises da expressão dos genes selecionados ao longo da diferenciação osteoblástica..... 73

Figura 25. RT-PCR das isoformas LH2a e LH2b do gene *PLOD2*..... 76

Figura 26. Gráficos das análises da expressão do miR-29b e do gene *COL1A1* ao longo da diferenciação osteoblástica..... 77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sequência dos <i>primers</i> para amplificação e seqüenciamento dos éxons do gene <i>COL1A1</i>	34
Tabela 2. Sequência dos <i>primers</i> para amplificação e seqüenciamento dos éxons do gene <i>COL1A2</i>	35
Tabela 3. Sequência dos <i>primers</i> para amplificação e seqüenciamento dos éxons do gene <i>PLOD2</i>	37
Tabela 4. Sequência dos <i>primers</i> para avaliação da expressão dos genes relacionados à diferenciação osteoblástica.....	42
Tabela 5. Sequência dos <i>primers</i> para avaliação da expressão dos genes selecionados a partir dos dados gerados pelos experimentos de microarranjos.....	45
Tabela 6. Informações clínicas dos pacientes incluídos do estudo.....	48
Tabela 7. Número de Unidades Formadoras de Colônias (CFU-F) observadas nos pacientes com Osteogênese Imperfeita.....	50
Tabela 8. Imunofenotipagem das CTMs dos pacientes na terceira passagem.....	52
Tabela 9. Lista dos genes presentes no grupo C.....	64
Tabela 10. Lista dos genes presentes nos grupos D.....	65
Tabela 11. Número de genes hiper e hipoexpressos.....	70
Tabela 12. Análise Pair-wise de correlação e regressão do BestKeeper.....	73

SUMÁRIO

1. Introdução.....	14
1.1 Células mesenquimais estromais da medula óssea.....	14
1.2 Alterações na expressão gênica durante a diferenciação de CTMs.....	16
1.3 Potencial aplicação clínica das CTMs.....	18
1.4 Osteogênese Imperfeita.....	20
2. Objetivos.....	26
2.1 Objetivos Gerais.....	26
2.2 Objetivos Específicos.....	26
3. Material e Métodos.....	27
3.1 Coleta de Amostras.....	27
3.2 Isolamento e Cultivo Celular.....	28
3.2.1 Quantificação das Unidades Formadoras de Colônias Fibroblastóides (CFU-F).....	29
3.3 Diferenciação das CTMs.....	30
3.3.1 Diferenciação das CTMs em Osteoblastos para análise da expressão gênica.....	30
3.3.2 Diferenciação das CTMs em Osteoblastos e Adipócitos....	31
3.4 Imunofenotipagem das CTMs.....	32
3.5 Extração de RNA.....	32
3.6 Extração de DNA.....	33
3.7 Identificação e caracterização de mutações nos genes <i>COL1A1</i> , <i>COL1A2</i> e <i>PLOD2</i>	33
3.8 Síntese de cDNA.....	39
3.9 Experimentos de Microarranjos.....	39
3.9.1 Preparação do cRNA.....	40
3.9.2 Hibridação e detecção de <i>microarranjos</i>	40
3.10 Análises de Bioinformática.....	41
3.11 Avaliação da diferenciação osteogênica por PCR em Tempo Real (qRT-PCR).....	41
3.12 Análise da expressão gênica por qRT-PCR.....	42
3.13 Análise da expressão das isoformas do gene <i>PLOD2</i> por RT-PCR.....	46
3.14 Análises da expressão do microRNA 29b (MiR-29b).....	46
4. Resultados.....	48
4.1 Caracterização dos pacientes.....	48
4.2 Isolamento e cultivo das CTMs.....	49
4.3 Quantificação das Unidades Formadoras de Colônias Fibroblastóides (CFU-F).....	49
4.4 Diferenciação das CTMs.....	50
4.4.1 Diferenciação das CTMs em Osteoblastos e Adipócitos....	50
4.5 Imunofenotipagem das CTMs.....	51
4.6 Sequenciamento da região codificadora dos genes <i>COL1A1</i> e <i>COL1A2</i>	52

4.7 Análise da expressão dos marcadores específicos da osteogênese por PCR em Tempo Real.....	54
4.8 Análise preliminar dos dados de microarranjos.....	56
4.9 Análise de expressão durante a osteogênese.....	58
4.9.1 Análise não-supervisionada dos dados de microarranjos.....	59
4.9.1.1 Pré-processamento.....	59
4.9.1.2 Seleção dos genes com maior desvio padrão entre as amostras.....	59
4.9.1.3 Análise de agrupamento Hierárquico e consenso.....	60
4.9.1.4 Assinatura molecular dos grupos C e D.....	63
4.9.2 Análise supervisionada dos dados de microarranjos.....	69
4.9.2.1 Análise de expressão diferencial.....	69
4.10 Uso do PCR em Tempo Real para validação de um conjunto de genes selecionados pela análise de microarranjos.....	72
4.11 Análise da expressão das isoformas do gene <i>PLOD2</i> por RT-PCR.....	76
4.12 Análise da expressão do miR-29b.....	77
5. Discussão.....	78
5.1 Caracterização molecular da Síndrome de Bruck (SB).....	79
5.2 Análise da expressão de genes que atuam na osteogênese.....	80
5.3 Análise dos dados de microarranjos.....	81
5.4 Avaliação dos dados de microarranjos.....	86
5.5 Regulação do COL1A1 pelo miR-29b.....	88
5.6 Regulação das isoformas do gene <i>PLOD2</i>	89
6. Conclusões.....	91
7. Referências.....	92
8. Apêndices.....	99

1. INTRODUÇÃO

1.1 Células mesenquimais estromais da medula óssea

As células mesenquimais estromais ou células-tronco mesenquimais (CTMs) foram descritas pela primeira vez por Fridensteins *et al.* em 1976, como células clonais, aderentes ao plástico e como fonte das linhagens osteoblástica, adipogênica e condrogênica. A principal fonte de CTMs é a medula óssea. No entanto, essas células constituem somente uma pequena porcentagem do número total de células presentes neste tecido. Apenas cerca de 0,001% a 0,01% das células mononucleares isoladas por técnicas de separação por gradiente de densidade dão origem a colônias aderentes ao plástico semelhantes a fibroblastos (Pittenger, Mackay et al. 1999). Além disso, o número de CTMs isoladas ainda por variar em termos de número e qualidade, mesmo quando as células são obtidas de um mesmo doador (Phinney, Kopen et al. 1999).

Além da medula óssea, as CTMs também podem ser obtidas a partir de outros tecidos. Há um crescente número de relatos descrevendo a obtenção dessas células a partir de tecido adiposo (Gronthos, Franklin et al. 2001), sangue de cordão umbilical (Igura, Zhang et al. 2004), fluído amniótico (Tsai, Lee et al. 2004), sangue periférico (Zvaifler, Marinova-Mutafchieva et al. 2000), fígado fetal (Campagnoli, Roberts et al. 2001), pulmão (in 't Anker, Noort et al. 2003) e até mesmo polpa de dentes de leite (Miura, Gronthos et al. 2003).

As CTMs constituem uma população heterogênea de células em termos de morfologia, fisiologia e expressão de antígenos de superfície. Até o presente momento, não foi identificado um marcador específico para a identificação destas células. Por esse motivo, a Sociedade Internacional de Pesquisas com células-tronco determinou alguns critérios mínimos para a caracterização destas células, propondo a avaliação de um conjunto de marcadores de superfície celular (Dominici, Le Blanc et al. 2006). O trabalho

sugere que as células devem expressar os marcadores CD105, CD73 e CD90 e a ausência ou baixa expressão de CD45, CD34, CD14 e CD79. Além disso, as CTMs também expressam um grande número de moléculas de adesão, proteínas de matriz extracelular, citocinas e receptores de fatores de crescimento, associados com sua função e com a interação com outras células estromais da medula óssea (Devine and Hoffman 2000). No entanto, a expressão de alguns antígenos pode mudar durante o cultivo destas células *in vitro*, devido a condições de cultivo específicas e ao tempo de cultivo entre as passagens (Dazzi, Ramasamy et al. 2006).

As propriedades e funcionalidade das CTMs dependem das características ambientais a que são submetidas. Essas células podem ser expandidas em cultura e dar origem a CFU-F (*colony-forming unit fibroblast*) ou unidades formadoras de colônias fibroblásticas que, por sua vez, possuem alto potencial proliferativo *in vitro* (Dazzi, Ramasamy et al. 2006). Diversos protocolos tem sido desenvolvidos com o objetivo de se isolar e expandir as CTMs. Além disso, seu crescimento e multipotencialidade podem variar de acordo com a densidade em que as células são semeadas e, em condições ótimas, as CTMs podem ser mantidas em cultura durante 20 a 30 divisões celulares, mantendo o seu potencial de diferenciação (Bobis, Jarocha et al. 2006).

Com relação ao potencial de diferenciação, não está claro se há uma única CTM multipotente que dá origem a cada uma das células de origem mesodérmica ou se é a mistura de células progenitoras que está comprometida com as diferentes linhagens diferenciadas. A diferenciação bem sucedida dessas células tem sido atingida para uma grande variedade de linhagens celulares incluindo osteoblastos, condrócitos, adipócitos, fibroblastos, mioblastos e cardiomíócitos, hepatócitos e até mesmo neurônios (Egusa, Schweizer et al. 2005); (Jiang, Jahagirdar et al. 2002); (Makino, Fukuda et al. 1999); (Pittenger, Mackay et al. 1999); (Xu, Zhang et al. 2004).

No entanto, alguns cientistas levantam a hipótese de que a geração de linhagens celulares não-mesodérmicas seria devida a processos específicos de reprogramação da expressão gênica das CTMs (Sato, Araki et al.

2005). Os primeiros estudos envolvendo as CTMs foram focados na determinação dos meios e métodos de cultivo adequado, caracterização e diferenciação destas células e nos métodos para detecção das linhagens diferenciadas. Porém, nos últimos anos, tem crescido o número de estudos envolvendo a análise da expressão gênica das CTMs indiferenciadas (Silva, Covas et al. 2003) e durante os mais diversos processos de diferenciação em múltiplas linhagens (Kulterer, Friedl et al. 2007), (Luo, Kang et al. 2004), (Qi, Aguiar et al. 2003), (de Jong, Vaes et al. 2004), (Mrugala, Dossat et al. 2009).

1.2 Alterações na expressão gênica durante a diferenciação de CTMs

Alguns dos fatores envolvidos nos processo de diferenciação já estão bem estabelecidos. Dentre os fatores de transcrição envolvidos na osteogênese, por exemplo, estão Cbfa1/Runx2 (Doi, Nagano et al. 2002), Osterix, Δ FosB, Fra-1 e Osf1 (Bobis, Jarocha et al. 2006) (figura 1). Além disso, há a participação diferencial destes fatores ao longo do processo de diferenciação. O Cbfa1/Runx2 é necessário para a formação dos osteoblastos, mas somente o Dlx5 permite a distinção dos osteoblastos mineralizados. Mais recentemente, alguns pesquisadores tem concentrado seus esforços na obtenção de um perfil de expressão gênica que possa ser utilizado na identificação de cada fase da diferenciação. Em seu trabalho, Kulterer, Friedl *et al.* (2007) dividiram a diferenciação osteogenica em três grandes fases, de acordo com os perfis de expressão gênica: uma fase inicial onde as células estão em intensa atividade proliferativa; um segunda fase, de maturação da matriz extracelular, onde já existe um comprometimento das CTMs com a linhagem osteoblástica; e uma fase final, de mineralização da matriz óssea secretada.

Figura 1. Esquema ilustrativo mostrando a participação de genes importantes para a diferenciação de CTMs em algumas linhagens específicas.

Além disso, estudos recentes identificaram participação crucial dos microRNAs (MiRs) na regulação da expressão gênica, seja pela inibição da tradução ou pelo estímulo da degradação dos RNAs mensageiros (mRNAs) alvo, na regulação da determinação celular (Schoolmeesters, Eklund et al. 2009).

MicroRNAs são pequenos RNAs endógenos de aproximadamente 22 nucleotídeos que desempenham papéis importantes na regulação da expressão gênica pós-transcricional. Acredita-se que aproximadamente 1% dos genes de mamíferos seja capaz de dar origem a microRNAs (Kim, Bae et al. 2009). Os MicroRNAs são primeiramente transcritos como microRNAs primários por uma RNA Polimerase II e então são cortados por uma enzima RNase III, chamada Drosha, em precursores de aproximadamente 70 nucleotídeos, chamados pré-microRNAs que são transportados ao citoplasma. Outra enzima, denominada Dicer, converte os pré-microRNAs em microRNAs maduros que são recrutados em complexos silenciadores induzidos por RNA (RISC). Finalmente, esses RISCs interferem na tradução ou na estabilidade de RNAs mensageiros alvo se ligando a eles por complementaridade total, levando a

clivagem do RNA mensageiro, ou parcial, levando a repressão da tradução.

Recentemente, estudos de perfis de expressão gênica durante os estádios iniciais do desenvolvimento osteogênico mostraram um aumento da expressão de um conjunto de microRNAs cujos alvos são genes importantes no processo de desenvolvimento muscular (Li, Hassan et al. 2008), sugerindo uma participação fundamental desses miRNAs no desenvolvimento ósseo. Outros trabalhos descrevem a importância dos microRNAs no controle de fatores de transcrição (Huang, Zhao et al.) e proteínas extracelulares não colagenosas, levando a inibição do processo osteogênico (Kapinas, Kessler et al. 2009).

Por outro lado, existem microRNAs responsáveis pela indução do processo osteogênico (Kim, Bae et al. 2009). O MiR-29b, por exemplo, estimula a diferenciação osteogênica através de diversos mecanismos, como a diminuição da atividade de *COL1A1*, *COL5A3* e *COL4A2*, regulando o acúmulo de colágeno durante a fase de mineralização (Li, Hassan et al. 2009).

Porém, não há informações disponíveis sobre os padrões de expressão de genes ou de microRNAs relacionados a osteogênese de pacientes portadores de Osteogênese Imperfeita.

1.3 Potencial aplicação clínica das CTMs

As características específicas das CTMs, incluindo seu extenso potencial proliferativo e sua habilidade de se diferenciar em múltiplas linhagens fazem destas células uma ferramenta interessante no campo da medicina regenerativa. Este fato é especialmente evidente na terapia e biologia celular, resultando em um número considerável de estudos clínicos baseados no uso de CTMs. Aparentemente, essas células podem ser isoladas a partir de vários tecidos, expandidas em cultura e re-introduzidas nos pacientes (Sakai, Mochida et al. 2003); (Wakitani, Goto et al. 1994); (Young, Butler et al. 1998); (Bobis, Jarocho et al. 2006). Além disso, as CTMs podem ser infundidas na circulação periférica e migrar para um sítio específico de injúria, por exemplo. No

tratamento da Osteogênese Imperfeita, a abordagem para terapia celular da doença foi primeiramente investigada em modelos animais (Pereira, Halford et al. 1995). As CTMs foram isoladas de uma linhagem de camundongo transgênico e transplantadas em camundongos receptores. A localização das células transplantadas foi observada 1 a 5 meses depois da infusão. De acordo com os resultados, 1,5% a 12% das células transplantadas foram encontradas em diversos tecidos, inclusive nos ossos. Os primeiros passos para abordagem clínica no tratamento da OI foram dados em 1999 (Horwitz, Prockop et al. 1999). Nesse trabalho, 1,5% a 2% das células transplantadas foram localizadas na medula óssea dos pacientes transplantados. As CTMs demonstraram a capacidade de originar osteoblastos funcionais, resultando no aumento do conteúdo mineral ósseo, assim como melhora na velocidade de crescimento e redução da frequência das fraturas. Encorajados por esses resultados, os autores realizaram outros estudos clínicos (Horwitz, Prockop et al. 2001). Dentre os cinco pacientes avaliados em um segundo estudo, três apresentaram células do doador, e como resultado, apresentaram crescimento significativo de 7,5 cm, medidos seis meses após o transplante, em comparação com 1,25 cm para os pacientes do grupo controle. Além disso, o conteúdo mineral ósseo aumentou cerca de 50% a 77% em relação aos valores iniciais. O número de fraturas, visualizadas por radiografia, diminuiu de 10 para 2. Infelizmente, o seguimento do estudo demonstrou que a taxa de crescimento diminuiu ou seu manteve. Em contraste, a mineralização óssea continuou a aumentar.

Melhores resultados foram obtidos com a purificação da população de CTMs utilizadas no transplante (Horwitz, Gordon et al. 2002). Esse novo estudo reuniu seis crianças que receberam duas injeções de células alogênicas cada. As CTMs foram transduzidas com os vetores retrovirais LNC8 ou G1PLII, na tentativa de localizar as células depois de transplantadas nos pacientes. Os vetores continham o gene da neomicina fosfotransferase (neo^R) ou da B-galactosidade não expressa (β -gal), respectivamente. A eficiência de transdução variou de 2% a 25% e a localização das células incluiu ossos, pele e medula óssea, trazendo um efeito positivo na aceleração da velocidade de

crescimento.

Novas abordagens para o tratamento da OI tem sido desenvolvidas na área da terapia gênica. Em alguns casos da doença, o produto de alelo mutante interage com o produto do alelo normal, resultando na formação de fibrilas de colágeno anormais. A terapia gênica deveria ser então direcionada primeiramente ao silenciamento da expressão do alelo mutante e somente depois a reposição deste alelo. Entretanto, a estratégia de tratamento é complicada pela grande heterogeneidade genética da doença e ao fato de que, em sua maioria, as mutações causadoras da OI são de efeito dominante.

1.4 Osteogênese Imperfeita

A osteogênese imperfeita (OI) é uma das displasias ósseas mais freqüentes e ocorre igualmente entre todos os grupos étnicos com incidência de cerca de 1 em 10000 indivíduos, embora as formas menos severas provavelmente estejam subestimadas devido a grande dificuldade de diagnóstico (Forlino and Marini 2000). A doença é caracterizada como uma desordem genética na qual uma osteopenia generalizada leva a baixa estatura, fragilidade óssea excessiva e deformidades ósseas, que nos casos mais graves, podem levar a morte (Horwitz, Prockop et al. 1999).

Na maior parte dos casos, as características da doença são decorrentes da produção insuficiente ou defeituosa de moléculas de colágeno. O colágeno do tipo I compreende 95% do conteúdo de colágeno do osso e cerca de 80% do total de proteínas nele presente, além de ser componente essencial de outros tecidos, como pele, ligamentos, tendões e dentina. A proteína é composta por uma tripla hélice heterotrimérica que é formada por duas cadeias polipeptídicas do tipo alfa 1 e uma do tipo alfa 2, codificadas pelos genes *COL1A1* e *COL1A2*, respectivamente (Millington-Ward, McMahon et al. 2005). Essas cadeias polipeptídicas que formam o colágeno são compostas de seqüências de aminoácidos glicina-X-Y, sendo que X geralmente é uma prolina e Y uma hidroxiprolina. A glicina, o menor aminoácido existente, é

necessária para permitir a formação e estabilidade da tripla hélice (Millington-Ward, McMahon et al. 2005) (figura 2).

Figura 2. Esquema ilustrando a composição do colágeno, composto por três cadeias polipeptídicas que interagem entre si, formando uma tripla hélice.

A maior parte dos pacientes portadores de OI possuem mutações nos genes *COL1A1* ou *COL1A2* (figura 3). As formas mais brandas da doença, do tipo I, por exemplo, são geralmente causadas por mutações do tipo sem sentido no gene *COL1A1* que levam à formação de um alelo nulo. O stop códon prematuro gerado leva à produção de uma cadeia de colágeno instável que é removida, de forma que há a redução da quantidade de colágeno normal que é produzido, resultando numa alteração quantitativa. Já as formas mais severas, dos tipos II a IV, resultam de mutações de efeito dominante nos genes *COL1A1* ou *COL1A2*. Nestes casos, as fibrilas de colágeno são deformadas pela incorporação da cadeia protéica mutante, em que um dos resíduos essenciais de glicina é substituído por outro aminoácido, resultando em uma alteração qualitativa (Cheung and Glorieux 2008) (Figura 4). Essa incorporação errônea leva a alterações na conformação da proteína, ocasionando a produção de moléculas instáveis que são rapidamente degradadas.

Figura 3. Esquema ilustrativo das mutações no gene *COL1A1*, mostrando a ocorrência de alterações quantitativas ou qualitativas, a depender do tipo de mutação observado.

Figura 4. Representação esquemática dos genes *COL1A1* e *COL1A2*. (a) promotores (em amarelo), regiões TATA Box (em azul), 52 éxons e íntrons (em verde), sinal PoliA (em rosa) e regiões 3' não-traduzidas (linha verde). (b) a tripla hélice do colágeno tipo I consiste em duas cadeias do tipo alfa 1 e uma cadeia do tipo alfa 2. A formação e estabilidade da tripla hélice são dependentes da sequência repetida de aminoácidos G-X-Y presente nas cadeias. Uma substituição da glicina, indicada por um hexâmero vermelho, prejudica a formação da hélice e pode gerar a OI. (Figura modificada de Millington-Ward, McMahon et al. 2005).

Cerca de 85% das mutações atualmente descritas são mudanças em uma única base que leva a substituição de uma glicina na tripla hélice da proteína. Durante a formação desta hélice, essa mutação interfere na formação da estrutura e, na matriz extracelular, pode afetar o processamento ou interferir nas interações entre as moléculas de colágenos entre si ou com outras proteínas componentes da matriz extracelular. Alterações no processamento do éxons respondem por cerca de 12% das mutações estruturais e inserções, deleções e rearranjos no domínio da tripla hélice também formam reportados como causas da doença (Forlino and Marini 2000).

Atualmente, existem cerca de 650 e 420 mutações nos genes *COL1A1* e *COL1A2* (<http://www.le.ac.uk/ge/collagen/>), respectivamente, associadas à Osteogênese Imperfeita e não existe um local destes genes onde as mutações ocorram com maior frequência, de forma que as mutações podem ocorrer em qualquer região dos genes, que possuem 51 e 52 exons, respectivamente. Apesar dos esforços em se tentar encontrar alguma correlação entre o tipo de mutação, sua localização no gene o fenótipo observados, esta relação ainda não está suficientemente compreendida (Marini, Forlino et al. 2007).

A apresentação clínica da doença é heterogênea e variável e o diagnóstico é habitualmente feito mediante a história clínica, o aspecto ao exame físico e constatações radiográficas, não existindo exame complementar de uso prático que seja específico para a confirmação da doença (Sillence, Senn et al. 1979).

Em 1979, Sillence propôs uma classificação da osteogênese imperfeita em quatro tipos baseados em critérios clínicos, radiográficos e genéticos. Esta classificação é bastante aceita, embora não descreva completamente a complexidade do fenótipo da doença. A Osteogênese Imperfeita do tipo I é a forma mais branda da doença, com fraturas pré-púberes ocasionais geralmente nos ossos longos, deformidades esqueléticas mínimas e pouca diminuição da estatura. Já a do tipo II, engloba os casos mais graves e, em

geral, é letal ainda no período perinatal. Os pacientes com essa forma da doença apresentam deformidades severas nos ossos longos e no tórax, além de fraturas intra-uterinas. Em geral, insuficiência ou infecções pulmonares são a causa da morte. Na OI do tipo III, fraturas freqüentes causam deformidades ósseas progressivas. Esses indivíduos possuem estatura extremamente reduzida, face triangular e dentinogênese imperfeita, além de outras deformidades que contribuem para insuficiência pulmonar, principal causa da morte destes indivíduos. No caso do tipo IV, os indivíduos são afetados por deformidades que variam desde o grau mais brando até moderado, fraturas nos ossos longos que diminuem após a puberdade e diminuição moderada da estatura.

Atualmente, discute-se a existências de oito tipos de OI. Os pacientes do grupo V possuem uma grande incidência de calos hipertróficos e curiosamente, não possuem alterações detectáveis nas seqüências dos genes *COL1A1* e *COL1A2* (GLORIEUX *et al.*, 1997), sugerindo que outras alterações genéticas possam estar envolvidas no desenvolvimento da doença. O tipo VI seria extremamente raro e sua gravidade clínica moderada e semelhante a do tipo IV, porém o diagnóstico só pode ser feito através de biópsias ósseas. Já os tipos VII e VIII são semelhantes aos tipos IV e III, respectivamente, porém não são encontradas mutações nos genes *COL1A1* e *COL1A2* e sim, nos genes *CRTAP* e *LEPRE1* (Cheung and Glorieux 2008).

Diante da gravidade da doença e do fato de esta ser incurável, um grande número de pesquisadores tem trabalhado no sentido de determinar uma abordagem de terapia gênica apropriada para atenuar os sintomas ou melhorar a qualidade de vida dos pacientes portadores desta doença. No entanto, há evidências de que não somente o crescimento somático, mas também o crescimento celular esteja comprometido e que possa estar relacionado aos defeitos na matriz extracelular comuns nesta desordem. Fedarko e colaboradores (1995) investigaram as características relacionadas ao crescimento de fibroblastos dérmicos e osteoblastos trabeculares isolados de pacientes com osteogênese imperfeita e de sujeitos controle de diferentes faixas etárias, sugerindo uma ligação entre a síntese de colágeno tipo I e a proliferação

celular. Além disso, a variabilidade no fenótipo clínico não é totalmente explicada por mutações nos genes codificadores do colágeno do tipo I, uma vez que há indícios que sugerem que mecanismos regulatórios adicionais possivelmente estejam envolvidos na deposição e maturação da matriz (Roschger, Fratzl-Zelman et al. 2008).

Portanto, a relação entre o genótipo e fenótipo da Osteogênese Imperfeita ainda não é suficientemente compreendida e a carência de modelos de estudo apropriados tem limitado o desenvolvimento de abordagens de terapia gênica para esta desordem.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

O Objetivo geral do presente estudo foi identificar genes que são afetados indiretamente à mutação primária nos genes *COL1A1* e *COL1A2* e que contribuem para o fenótipo da Osteogênese Imperfeita. Para atingir tal objetivo, foi analisado o perfil de expressão gênica durante a diferenciação osteogênica a partir de células mesenquimais estromais multipotentes da medula óssea obtidas de pacientes diagnosticados com Osteogênese Imperfeita e de indivíduos controle.

2.2 Objetivos Específicos

1. Coletar, isolar e caracterizar as células mesenquimais estromais multipotentes de medula óssea de pacientes portadores de Osteogênese Imperfeita;
2. Avaliar as células coletadas quanto ao potencial de diferenciação osteogênica;
3. Identificar mutações nos genes *COL1A1* e *COL1A2*;
4. Analisar o perfil de expressão gênica em células-tronco mesenquimais indiferenciadas e em pelo menos quatro tempos da diferenciação osteogênica;
5. Avaliar comparativamente a expressão de genes relacionados à diferenciação osteogênica em amostras coletadas de pacientes portadores de OI e de indivíduos controle;
6. Identificar genes com expressão diferencial em pacientes e indivíduos controle durante a diferenciação osteogênica;
7. Identificar as vias gênicas que possam estar afetadas em pacientes portadores de OI.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Coleta de Amostras

As amostras de três indivíduos normais foram obtidas dentro do programa de coleta de medula óssea do Centro de Terapia Celular (CTC), inscrito junto à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) sob o número 98/14/2476. Foram incluídos nesta fase doadores de medula óssea sem qualquer tipo de alteração hematológica. As células de medula óssea controle foram coletadas por aspirado medular de doador cadastrado no REDOME (Registro Brasileiro de Doadores Voluntários de Medula Óssea), com termo de consentimento livre e esclarecido. As amostras de cinco pacientes portadores de Osteogênese Imperfeita (dois portadores do tipo I e três portadores do tipo III da doença) foram colhidas no Ambulatório de Hematologia da FMRP/HC/USP, sob a coordenação e supervisão do Prof. Dr. Dimas Tadeu Covas, após triagem feita pelos Ambulatórios de Doenças Ósseas e Endocrinologia e de Genética da FMRP/HC/USP, sob a coordenação e supervisão dos Professores Dr. Francisco José de Paula e Dr. João Monteiro de Pina Neto, respectivamente, com consentimento livre e esclarecido do paciente (apêndice A) e de acordo com a aprovação pelo Comitê de ética em Pesquisa sob o número 10188/2007 de 13 de fevereiro de 2008.

3.2 Isolamento e Cultivo Celular

Foram colhidos 4 a 5 mL de medula óssea (MO) dos pacientes e doadores por punção aspirativa da crista ilíaca anterior ou posterior, com material estéril, após anti-sepsia e anestesia local com lidocaína a 2% sem vasoconstritor (Genérico Hipolabor, Sabará, MG, Brasil). As amostras foram processadas imediatamente após terem sido coletadas.

As células mononucleares foram isoladas por gradiente de Ficoll-Hypaque (Figura 5) e mantidas em garrafas de cultura em concentração de 1×10^6 células por garrafa, para a obtenção de células mesenquimais. As células foram cultivadas em meio α -MEM (Gibco-BRL) acrescido de L-glutamina (2mM/L), penicilina (100U/L), streptomicina (100 ng/L), 2,4 g/L de Hepes e 2g/L de bicarbonato de sódio e enriquecido com 15% de Soro Bovino Fetal e mantidas em estufa a 37°C a 5% de CO₂.

Figura 5: Esquema representativo da abordagem utilizada no isolamento de células mononucleares humanas.

As CTMs foram isoladas de outras células mononucleares da medula óssea por sua capacidade de aderência ao plástico e de expansão, sem perda da sua capacidade multipotencial, em meio de cultivo pobre em glicose, com altas concentrações de aminoácidos e proteínas, sem citocinas.

As células foram cultivadas em garrafas de 75 cm² por aproximadamente sete dias, quando foi adicionado um novo meio de cultivo, após a remoção do meio antigo e das células não-aderentes. O cultivo celular foi monitorado sob microscopia de contraste de fase e o meio trocado três vezes por semana até que a confluência celular atingisse 80 a 100%, quando as células foram colhidas por tripsinização e novamente plaqueadas (1ª passagem) até que atingissem a terceira passagem. As células foram expandidas em 9 garrafas e então iniciou-se o estímulo para diferenciação osteogênica.

3.2.1 Quantificação das Unidades Formadoras de Colônias Fibroblastóides (CFU-F)

As CMN (Células mononucleares) separadas pelo gradiente de Ficoll foram também cultivadas na concentração de 5×10^5 células em quatro placas quadriculadas de 35 mm², sob as mesmas condições de cultivo, temperatura e concentração de CO₂ anteriormente descritas. Após sete dias de cultivo, foi adicionado um novo meio de cultivo após a remoção do meio antigo e das células não aderentes. As células foram mantidas em cultura pelo período de 7 a 14 dias a depender da confluência observada. Após esse período foram contadas as colônias com mais de 50 células fibroblastóides, com o auxílio de microscópio estereoscópio. A quantificação das CFU-F é dada pelo número de colônias com mais de 50 células dividido pelo número total de CMN plaqueadas.

3.3 Diferenciação das CTMs

3.3.1 Diferenciação das CTMs em Osteoblastos para análise da expressão gênica

Na terceira passagem, quando foi atingida a confluência de 60-70%, foram coletadas células de uma garrafa para análises de imunofenotipagem celular por citometria de fluxo e o RNA foi extraído das células de outra garrafa originando a amostra denominada T0. Além disso, as células de uma terceira garrafa foram colhidas para obtenção do DNA das amostras.

As garrafas restantes tiveram suas células estimuladas para diferenciação osteogênica com o meio para cultivo de CTMs suplementado com 200 μ M/mL de ácido ascórbico, 10 mM/mL de Beta-glicerolfosfato e 10 μ M/mL de dexametasona. Nesta ocasião, todo o meio de cultivo foi retirado e substituído pelo meio de indução da diferenciação. Após um dia em cultura com estímulo, mais uma garrafa teve o RNA de suas células extraído (dia 1; T1), e o mesmo procedimento foi realizado nos dias 2 (T2), 7 (T7), 12 (T12), 17 (T17) e 21 (T21), ao final da diferenciação (Figura 6).

Figura 6. Esquema ilustrativo do delineamento experimental de cultivo celular.

3.3.2 Diferenciação das CTMs em Osteoblastos e Adipócitos

Para avaliar o potencial de diferenciação das CTMs, alíquotas contendo 40.000 células/mL foram cultivadas em placas de 24 poços com lamínulas para a realização de estudos morfológicos. Quando a diferenciação foi iniciada, todo o meio de cultivo foi removido e substituído pelo meio de indução (para osteoblastos ou adipócitos) como já descrito para a diferenciação osteogênica ou somente meio α -MEM enriquecido com 7,5% de SBF como controle.

Para a diferenciação adipogênica foi utilizado meio α -MEM 15% SBF, suplementado com 20 μ M/mL de dexametasona, 10 μ g/mL de insulina (Sigma-Aldrich) e 0,1 mM de indometacina.

As CTMs foram continuamente avaliadas, por microscopia de contraste de fase, durante todo o processo de diferenciação. Foram também utilizadas colorações histoquímicas para avaliação da morfologia das células em processo de diferenciação.

As células diferenciadas em adipócitos e seus controles foram coradas pelo método de Sudan II: fixadas em paraformaldeído a 4% por 15 minutos em temperatura ambiente, lavados em água destilada e incubadas em álcool 70% por 3 minutos. A seguir, foram coradas com solução de Sudan II escarlate por 5 minutos e então lavadas com álcool 70%. Finalmente, as células foram contra-coradas com Hematoxilina de Harris por 5 minutos. Já as células diferenciadas em osteoblastos e seus controles foram coradas pelo método de Von Kossa. Após fixação em paraformaldeído 4% por 15 minutos e lavagem com água destilada, as células foram mantidas no escuro em presença de nitrato de prata a 5% por 30 minutos. Em seguida, foram lavadas em água destilada e expostas a lâmpada de 100 W por uma hora e 15 minutos, lavadas em tiosulfato de sódio a 5% e então contra-coradas com Hematoxilina de Harris.

A avaliação morfológica das células foi feita em microscópio de luz e as imagens foram capturadas com a câmera digital Carl Zeiss Axioskop 2 plus.

3.4 Imunofenotipagem das CTMs

Um dos critérios para a caracterização de células-tronco mesenquimais é a expressão de antígenos de superfície específicos. A maior parte das células isoladas deve expressar CD105, CD73 e CD90, medidos por citometria de fluxo. Adicionalmente, a expressão de CD45, CD34, CD14 ou CD11b e CD79 ou CD19 deve ser baixa ou ausente.

Para a correta identificação dos antígenos, os anticorpos monoclonais são conjugados com fluorocromos ficoeritrina (PE) e isotiocianato de fluoresceína (FITC). Controles positivos e negativos devem ser incluídos para a calibração do aparelho, análise dos resultados e definição da positividade da amostra. Neste trabalho, as células foram marcadas pela técnica direta, em que são utilizados anticorpos monoclonais previamente conjugados com o fluorocromo.

A imunofenotipagem de células mesenquimais foi realizada pela montagem de um painel contendo os seguintes marcadores: CD45 FITC, CD14 PE, CD29 PE, CD105 PE, CD90 PE, CD34 PE, CD31 FITC (Becton Dickinson) e CD73 PE (BD PharMingen), além dos controles negativos IgG1 FITC e IgG2a PE (Becton Dickinson). A intensidade de fluorescência foi captada pelo aparelho FACSTM (Becton Dickinson).

A viabilidade celular também foi avaliada, em alguns casos, por citometria de fluxo, através de marcação com o corante Iodeto de Propídeo (PI).

3.5 Extração de RNA

O RNA total de cada uma das culturas (T0, T1, T2, T7, T12, T17 e T21) foi isolado pelo método *TRIZOL Reagent* (Life technologies, USA – Molecular Research Center, Inc) de acordo com a metodologia proposta pelo fabricante. Posteriormente, foi realizada checagem em gel de agarose 1% e quantificação por espectrofotometria em comprimento de onda de 260nm.

3.6 Extração de DNA

O DNA genômico foi extraído das células mesenquimais indiferenciadas utilizando o Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega) de acordo com as instruções recomendadas pelo fabricante. A quantificação foi realizada em espectrofotômetro em comprimento de onda de 260 nm e a qualidade do DNA extraído foi checada em gel de agarose 1,5%. Os DNAs foram diluídos e utilizados para as reações de PCR na concentração de 100 ng/μL.

3.7 Identificação e caracterização de mutações nos genes *COL1A1*, *COL1A2* e *PLOD2*

As amostras de DNA dos pacientes portadores de Osteogênese Imperfeita foram analisadas quanto à presença de mutações nos genes *COL1A1* e *COL1A2*, responsáveis pela codificação das cadeias polipeptídicas formadoras da molécula do colágeno do tipo I. Uma vez não encontradas mutações nesses dois genes, foi analisado também o gene *PLOD2*, associado à Síndrome de Bruck, um tipo bastante específico de Osteogênese Imperfeita.

Para o gene *COL1A1* foram desenhados 27 pares de *primers* capazes de amplificar os 51 éxons do gene que possui 17.544 pares de bases. Os *primers* foram desenhados com base na sequência do gene disponível no banco de dados Genbank (número de acesso: NG_007400.1 em março de 2009) e o tamanho máximo dos fragmentos estabelecido foi de 702 pares de bases. Na tabela 1 podem ser vistos as sequências dos *primers*, sua temperatura de anelamento e o tamanho do fragmento gerado durante a amplificação.

Tabela 1. Sequência dos *primers* para amplificação e seqüenciamento dos éxons do gene *COL1A1*, seguido do tamanho dos fragmentos amplificados e temperatura de anelamento.

Sequência	Fragmento amplificado (pb)	Temp. Anel.
COL1A1-set1new-PF: CGGAGCAGACGGGAGTTTCT		
COL1A1-set1new-PR: CCGAGTCTCCGGATCATCCA	330	60°
COL1A1-set2new-PF: CGGGAAGTGAAAAATCCAAG		
COL1A1-set2new-PR: GGAGAAGAAACAAGAGGCCA	584	55°
COL1A1-set3new-PF: CTCCTGCCCTCGAATTTTGC		
COL1A1-set3new-PR: GCACATGTCACAACTGTGA	484	56°
COL1A1-set4new-PF: CCAGGAAGTGCATGATGTCA		
COL1A1-set4new-PR: GGTTAGAAGACAAGTCCCTG	575	56°
COL1A1-set5new-PF: GGAGAGATGCTCAGAGATCT		
COL1A1-set5new-PR: CCTTCCTCTGAGTATCGTTC	461	56°
COL1A1-set6new-PF: CCAAAGAAGACTGAGACCTT		
COL1A1-set6new-PR: GAGGTGCTTTTGGATGTCCA	465	55°
COL1A1-set7new-PF: CCAAGGCTCTTTCTCAGATC		
COL1A1-set7new-PR: GCTCCCATTGTGAGCCCCAA	682	58°
COL1A1-set8new-PF: GGTATGTTGGTCTGAACCC		
COL1A1-set8new-PR: GTGGCACAGAGAAAGGAGTG	594	57°
COL1A1-set9new-PF: CCCTTTGCCACTTTCTAACC		
COL1A1-set9new-PR: GGCTCCTCTTCCTTTCTGGA	582	57°
COL1A1-set10new-PF: CAGGAACCCCTGACACTGGA		
COL1A1-set10new-PR: GCCTGATCCAGAACGCCTCA	663	60°
COL1A1-set11new-PF: TGAGGCGTTCTGGATCAGGC		
COL1A1-set11new-PR: CCAGGACTCCTTCAAGTCTC	410	59°
COL1A1-set12new-PF: CCACTCAGAGTAAATGAGAG		
COL1A1-set12new-PR: CCTCTAGTTGATGGCTGTCT	750	55°
COL1A1-set13new-PF: GGAAGGACCGTGCTTTCCAG		
COL1A1-set13new-PR: ATCTCCATGGCTTTGGTCAT	414	57°
COL1A1-set14new-PF: GGAAACAAGCCTGGGAGATA		
COL1A1-set14new-PR: CCAGAGAGAAGGAGAGATGC	290	57°
COL1A1-set15new-PF: GCAGAGGGCCTCTCAGGAAA		
COL1A1-set15new-PR: GGAGTCAGATTGGAGAGATG	628	58°
COL1A1-set16new-PF: GTACAGAAGACCTGTTAAGA		
COL1A1-set16new-PR: GAGAGCACAGAGGCATCAAG	620	52°
COL1A1-set17new-PF: TGAGTGGCTTGGCCCTCTGT		
COL1A1-set17new-PR: AGGTGCCAGAGAGCAGCACA	702	60°
COL1A1-set18new-PF: GTGCCAGCTCAGATCTCTGC		
COL1A1-set18new-PR: AGAGAGAGAGAAGTGAGAGT	567	57°
COL1A1-set19new-PF: CCTGGTGAATCTGGACGTGA		
COL1A1-set19new-PR: CCTGACATCTTGACAGGATCT	525	57°
COL1A1-set20new-PF: TTGGGAGAGATGGCCACAGT		
COL1A1-set20new-PR: CCATGCCCCTTCATTATTCT	647	56°
COL1A1-set21new-PF: AGAATAATGAAGGGGCATGG		
COL1A1-set21new-PR: GGATTACCGGCATCCAAGTG	703	56°
COL1A1-set22new-PF: GGCAAAGATGGACTCAACGG		
COL1A1-set22new-PR: TTGGGGTCAATCCAGTACTC	610	57°
COL1A1-set23new-PF: GCCACTCTGACTGGAAGAGT		
COL1A1-set23new-PR: CCCAATGCACCGTTATATCG	549	57°
COL1A1-set24new-PF: CGATATAACGGTGCATTGGG		
COL1A1-set24new-PR: GGAGGTCTTGGTGGTTTTGT	540	56°
COL1A1-set25new-PF: GCTTCACCTACAGCGTCACT		
COL1A1-set25new-PR: GGAGAAAGGAGCAGAAAGGG	682	58°
COL1A1-set26new-PF: CCAAAAGTGCATTCAACCTT		
COL1A1-set26new-PR: CCATCACATAGATGTAGCAC	699	53°
COL1A1-set27new-PF: GGAGAGACTGTTCTGTTCTT		
COL1A1-set27new-PR: GGGTCATTTCCACATGCTTT	653	55°

Para o gene *COL1A2* foram desenhados 42 pares de *primers* capazes de amplificar os 52 éxons do gene que possui 36672 pares de bases. Os *primers* foram desenhados com base na sequência do gene disponível no banco de dados Genbank (número de acesso: NG_007405.1 em março de 2009) e o tamanho máximo dos fragmentos estabelecido foi de 756 bases. Na tabela 2 podem ser vistos as sequências dos *primers*, sua temperatura de anelamento e o tamanho do fragmento gerado durante a amplificação.

Tabela 2. Sequência dos *primers* para amplificação e seqüenciamento dos éxons do gene *COL1A2*, seguido do tamanho dos fragmentos amplificados e temperatura de anelamento.

Sequência dos primers	Fragmento amplificado (pb)	Temp. Anel.
COL1A2-exon1-PF: CCTACAAGTGGCCTACAGGG	703	58
COL1A2-exon1-PF: CCTCCCATCTAACCTCTCTA		
COL1A2-exon2-PF: GACCTGCATAATTTCTAGGT	467	51
COL1A2-exon2-PR: TTCATAGAAGCTGATCCTAA		
COL1A2-exon3-PF: TTAGGATCAGCTTCTATGAA	593	50
COL1A2-exon3-PR: CACCAGTTTGTATCACATAA		
COL1A2-exon4-PF: GCAGCTTCCAATCCTCCAGC	563	59
COL1A2-exon4-PR: GGACTGTGGTGGTAGGTAGA		
COL1A2-exon5-PF: CCCTGTGATATCTTAAGAGT	503	54
COL1A2-exon5-PR: CAGTGACACAAAGACCAGT		
COL1A2-exon6-PF: GAGGTGTCGGCCAAGTTTTT	573	54
COL1A2-exon6-PR: CCCAAGTTATGGTTACTATG		
COL1A2-exons7a9-PF: GGAATCAAACCACAACAATG	571	51
COL1A2-exons7a9-PR: CCATACATTAAGAGTTCTGT		
COL1A2-exon10-PF: ACAGAACTCTTAATGTATGG	550	51
COL1A2-exon10-PR: TCTAAGCACAGAGTGACAAA		
COL1A2-exon11-PF: TTTGTCACTCTGTGCTTAGA	560	52
COL1A2-exon11-PR: CCCTAGATAGGTCACTTAAC		
COL1A2-exon12-PF: GCTGGGACCTGGAACACTGGACTTC	260	65
COL1A2-exon12-PR: TGGAGGTCATGGGGAATTTCAATCA		
COL1A2-exons13a15-PF: CTGTGTGTCTGGCATAATTG	756	54
COL1A2-exons13a15-PR: AATGAAGAAGACAGCACCCA		
COL1A2-exon16-PF: GTGTCATGCCACTGTAAGCA	436	57
COL1A2-exon16-PR: CTCTCTGTGGTTGACTCTGG		
COL1A2-exon17-PF: CAGTAGCCAAGATGGCAGAATC	462	65
COL1A2-exon17-PR: CCAGTAAGGCCGTTTGCTCCAG		
COL1A2-exon18-PF: CGTTGGACCTCCTGTAAGTAG	306	58
COL1A2-exon18-PR: AAAATGCAGTGTGGTCCATTAGG		
COL1A2-exon19-PF: TAATGTGTGCTGCCTCTACAGC	330	58
COL1A2-exon19-PR: CATATAGCAGACGGGAGTGTAC		
COL1A2-exon20-PF: CTTGAGCTTCTCTTTACCTTGAC	324	60
COL1A2-exon20-PR: CACCACTGGGACCAGGAGGAC		
COL1A2-exon21-PF: CGTAAGTAGCTCTATCATCAC	363	55
COL1A2-exon21-PR: AAGGCAGATGGAAAGCAGATG		

Tabela 2. Sequência dos *primers* para amplificação e seqüenciamento dos éxons do gene *COL1A2*, seguido do tamanho dos fragmentos amplificados e temperatura de anelamento (continuação).

Sequência dos primers	Fragmento amplificado (pb)	Temp. Anel.
COL1A2-exons22a23-PF: GCAGGATGCTCATCTATGAA	555	54
COL1A2-exons22a23-PR: CTGTCAGCAAGACTACTAAC		
COL1A2-exon24-PF: AAAAAGTCGGGGGAAAAGGTGCCTT	350	65
COL1A2-exon24-PR: TCTCCCTGCTCTGCTTTTCAGTCCT		
COL1A2-exon25-PR: TCCCTGAGACTGGACTGATT	396	54
COL1A2-exon26-PF: CCACAGACTAGGGATCTCAA	450	54
COL1A2-exon26-PR: GCTACTACATATTCATACCC		
COL1A2-exons27a28-PF: CGTGGGAACCCACAATGAGT	583	55
COL1A2-exons27a28-PR: CCAAATATCAACATGAGCAC		
COL1A2-exon29-PF: GAGCTGTAAATCACCATACCGTAC	446	63
COL1A2-exon29-PR: TGGCTCATTCTCTCCATCAGCAC		
COL1A2-exon30-PF: GCACTCATGTAGATACTGCC	529	55
COL1A2-exon30-PR: GGCTTTGAACATCAACACAC		
COL1A2-exon31-PF: CTAGTGGAGAGATTAGGAAC	405	56
COL1A2-exon31-PR: CCACTGGAATCGGATTGCTG		
COL1A2-exon32-PF: GCAGGCAAGAAGCCTGTCTA	452	55
COL1A2-exon32-PR: CCTCATGTATTACTCAACAC		
COL1A2-exon33-PF: GAATGGTAAGGAATCGAGACATTGC	65	65
COL1A2-exon33-PR: AATTTGGAAAATTCTCAATTCAACATAAAAAAAAAATCCAAGTACGAAG		
COL1A2-exon34-PF: CTCCTTCTGAGAGTGGCTTC	388	56
COL1A2-exon34-PR: CCTGCTGCTCTATCACAATA		
COL1A2-exons35a37-PF: GTCAGTTATCTCTTCCAAGG	629	56
COL1A2-exons35a37-PR: CCTGTTGCATAGCAGGCACT		
COL1A2-exon38-PF: GGTGGTAATATTGAAGAACA	401	52
COL1A2-exon38-PR: GCTGATAGCAACATACTACTG		
COL1A2-exon39-PF: GGTCTATTCTGCTCAGCATG	294	55
COL1A2-exon39-PR: ACTTCAGACCAGGAGAGTAA		
COL1A2-exon40-PF: CCAAATGGCCAGGGTATTAT	418	55
COL1A2-exon40-PR: GGCTCAACTGAGCTCTACTT		
COL1A2-exon41-PF: GCCAAGATGTAACTCACCG	484	54
COL1A2-exon41-PR: GCTGTGTCTTTATAGTGTGT		
COL1A2-exon42-PF: CCTTCTTCTTCAAACCTAGA	386	53
COL1A2-exon42-PR: CCATTCTTTGGCCTAAGCAA		
COL1A2-exons43a45-PF: GTGATGAAGACAGAGTAGCT	593	53
COL1A2-exons43a45-PR: CAGATGTTTTGGACTGATTC		
COL1A2-exon46-PF: GTGAGAGCCTAGCTAAACCA	362	56
COL1A2-exon46-PR: GCCAGAGAATGGGAAATGGA		
COL1A2-exons47a48-PF: GAGCCCCACTTTACATTTTC	544	53
COL1A2-exons47a48-PR: GAGGATATATTGAAATGGGG		
COL1A2-exon49-PF: CTGATGAGAACATGCTTCCG	660	54
COL1A2-exon49-PR: CATATTTAAGAGGAAGAGGG		
COL1A2-exon50-PF: CCCTCTTCTCTTAAATATG	492	51
COL1A2-exon50-PR: CCAATCAATCCATCTTCTAA		
COL1A2-exon51-PF: CCCTTTTCTTAAGCTTGGAT	497	52
COL1A2-exon51-PR: GTTAGTTCTCTCATTTCTTCT		
COL1A2-exon52.1-PF: GGGACAGACATCTTCAGAAT	664	52
COL1A2-exon52.1-PR: GGAAAGTGTTTTGAGGTAGT		
COL1A2-exon52.2-PF: CAACACTCTTACACCTGTTA	682	54
COL1A2-exon52.2-PR: GGTCTAATGGCTGGTAGAGA		

Para o gene *PLOD2* foram desenhados 17 pares de *primers* capazes de amplificar os 19 éxons do gene que possui 92055 pares de

bases. Os *primers* foram desenhados com base na sequência do gene disponível no banco de dados Genbank (número de acesso: NG_009251.1 em março de 2009) e o tamanho máximo dos fragmentos estabelecido foi de 834 bases. Na tabela 3 podem ser vistos as sequências dos *primers*, sua temperatura de anelamento e o tamanho do fragmento gerado durante a amplificação.

Tabela 3. Sequência dos *primers* para amplificação e seqüenciamento dos éxons do gene *PLOD2*, seguido do tamanho dos fragmentos amplificados e temperatura de anelamento.

Sequência dos primers	Fragmento amplificado (pb)	Temp. Anel.
PLOD2-exon1-PF: CCGACGACCTCACTCAGCTG	362	63
PLOD2-exon1-PF: AGGGCTGGTGGATGAATGAA		
PLOD2-exon2-PF: CGACAGCTCTTTGTTTAGTC	324	57
PLOD2-exon2-PR: GAGGATTACAGATTGTACTG		
PLOD2-exon3-PF: CCATGAAACATTAGAAGAGT	360	54
PLOD2-exon3-PR: GCCCAACCATATTTTAATAC		
PLOD2-exon4-PF: GTTCTGTGTAAATAGTTGGC	461	56
PLOD2-exon4-PR: CAACTCACATAATACATGGG		
PLOD2-exon5-PF: CATGGTGAGCTGTGAAATTC	371	57
PLOD2-exon5-PR: CAGTTTACCATTTGCCATAC		
PLOD2-exon6-PF: GAGTTGCAACTATCGCAGTT	360	59
PLOD2-exon6-PR: ACTGTCGACCTTAGTCACAG		
PLOD2-exons7-PF: GATGATACACACACATACAC	264	55
PLOD2-exons7-PR: TAGATGACATTCACATATC		
PLOD2-exon8-PF: GTGTGCACCTACAGATGATA	370	55
PLOD2-exon8-PR: CCCATTATCTATCATATAAAA		
PLOD2-exon9-PF: GGAGCAATTCAAATTTAGCA	372	57
PLOD2-exon9-PR: CCTCCACTGAACTTAACCCA		
PLOD2-exon10-PF: CCGTGTTTAATATGGTTATT	375	55
PLOD2-exon10-PR: GAGACACCCAAATTTGGCAT		
PLOD2-exons11-PF: GCTAGAGAACCATATTTTAC	283	54
PLOD2-exons11-PR: ACTACAGTATGTTACATC		
PLOD2-exon12-PF: CTACAGGTTTGTGAATGAG	384	56
PLOD2-exon12-PR: GGGTTCTCAAATTTCCATTA		
PLOD2-exon13-PF: GGCAGTGGTTTATCTCTCTAA	460	56
PLOD2-exon13-PR: GGCTAGTACTTACAAATTAG		
PLOD2-exon14-PF: GAGCTGGAGATGTTTCTTTG	345	56
PLOD2-exon14-PR: CCAAGCTAAATGCAAATAAG		
PLOD2-exon15-PF: GTTTTGTGTGGTGTCTGAAT	436	55
PLOD2-exon15-PR: GATGTGCATTTACCTTATG		
PLOD2-exon16-PF: GGCAAAGATTAGGCTATATA	318	52
PLOD2-exon16-PR: ACTTTCACATCTTCTGTGAA		
PLOD2-on17a19-PR: GCCACAACCTCAAAGACGTGT	834	60

Os éxons dos genes foram amplificados pela reação em cadeia da polimerase ou PCR utilizando os pares de *primers* já descritos nas respectivas tabelas 1, 2 e 3. As amplificações foram realizadas com um volume total de 25 µL contendo tampão 10X ((NH₄)₂SO₄ 2M, Tris-HCl 2M, MgCl₂ 1M e

Tween 20 a 1%), 1,25 mM de dNTP, 2,5µM para cada primer e 1U de Taq DNA Polimerase (Biotools). Os parâmetros de amplificação foram: 94°C por 6 minutos, 35 ciclos de 94°C por 1 minuto, temperatura de anelamento por 1 minuto e 72°C por 1 minuto. Por fim, uma extensão final a 72°C por 10 minutos.

Os fragmentos amplificados foram sequenciados em seqüenciador automático ABI PRISM™ 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Uma amostra de 1 a 2 µL do DNA amplificado foi utilizada na reação de seqüenciamento, composta por 2 µL de Big Dye Terminator v3.1 Cycle, 2 µL de 5X Sequencing Buffer, ambos da marca Applied Biosystems, 1 µL de primer e água em quantidade suficiente para completar 10 µL. Os parâmetros da reação de seqüenciamento foram: 95°C por 1 minuto, 25 ciclos de 95°C por 10 segundos, 50°C por 5 segundos e 60°C por 4 minutos.

Nos casos em que houve necessidade os fragmentos amplificados foram ligados ao vetor TOPO 2.1 (Invitrogen) em uma reação a temperatura ambiente por 10 minutos. Em seguida, 2 µL da ligação foram inseridos em bactéria competentes DH10β através de eletroporação, após a qual as bactérias foram semeadas em placas contendo meio ágar, ampicilina (100mg/mL) e X-gal (30 mg/mL). As placas foram mantidas em estufa a 37°C *overnight* e as colônias brancas foram utilizadas como amostras para reação de PCR com *primers* universais M13, nos dois sentidos. Os insertos amplificados foram utilizados para as reações de seqüenciamento, como já descrito anteriormente.

A montagem das sequências foi feita utilizando os softwares Phred (EWING; GREEN, 1998; EWING *et al.*, 1998), Phrap (GORDON; DESMARAI; GREEN, 2001) e Consed (GORDON; ABAJIAN; GREEN, 1998). O programa Phred é responsável pelo “*base-calling*”, isto é, por analisar os cromatogramas e verificar se a atribuição de bases foi feita corretamente. O programa Phrap é responsável pela montagem das sequências. O programa Consed é utilizado como visualizador e editor de sequências geradas pelo Phrap.

3.8 Síntese de cDNA

Para a síntese do cDNA foi utilizado o kit de transcrição reversa *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems). Dois microgramas de RNA total foram adicionados 5 µL de Random primers, 5µL de 10X First Strand Buffer, 2µL de DNTP 10 mM, 3 µL de Enzima *Multiscribe*, todos da marca Applied Biosystems. Foi adicionada água tratada com dietilpirocarbonato (DEPC) em quantidade suficiente para completar um volume final de 50 µL. Essa mistura foi incubada a 25°C por 10 minutos e a 37°C por duas horas. O armazenamento foi realizado a 4°C.

3.9 Experimentos de Microarranjos

Os experimentos de *microarranjos* têm revelado a expressão diferencial de diversos genes em diferentes tecidos ou sob diferentes condições. O perfil de expressão gênica dos pacientes portadores de Osteogênese Imperfeita e de controles sadios foi determinado com a utilização do *Whole Human Genome Microarray Kit* (Agilent). Neste experimento foram utilizadas as amostras T0, T2, T7, T12, T17 e T21 de um dos doadores normais (MON1 – Medula Óssea Normal 1) e de dois pacientes portadores de Osteogênese Imperfeita (MOOI-I – Medula Óssea Osteogênese Imperfeita I e MOOI-III - Medula Óssea Osteogênese Imperfeita III) dos tipos I e III, respectivamente.

Após o tratamento com DNase e purificação utilizando-se o kit Rneasy (Qiagen), a qualidade do RNA foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1,5%. O RNA foi quantificado por espectrofotometria e 1µg foi utilizado nos experimentos de microarranjos.

A síntese dos alvos e as hibridações foram realizadas com o kit *Agilent's Quick Amp Labeling* (Agilent), de acordo com as instruções do fabricante. O método utiliza uma T7 RNA Polimerase, que amplifica o material alvo e incorpora Cianina-3 de forma simultânea.

3.9.1 Preparação do cRNA

Inicialmente, 1 µg de RNA total foi incubado com *promoter primer* T7 por 10 minutos a 65 °C. Um conjunto de RNAs-mensageiros (Spike-mix) serviu de controle para a síntese do DNA complementar e para as reações de transcrição *in vitro*. Estes controles foram adicionados a amostra de RNA total juntamente com o *primer* T7. Cada passo dos procedimentos seguintes, incluindo a preparação do alvo e hibridação, pôde ser monitorado usando estes controles de RNA. Para a síntese da primeira fita do cDNA foram adicionados ao RNA total os RNAs controle, o primer T7, o tampão 10X, dNTPs, o inibidor de RNases e a enzima mM^{LV}-RT que foram incubados a 40°C por duas horas, a 65°C por 15 minutos e mantidos a -20°C *overnight*.

As reações de transcrição *in vitro* para a síntese de cRNA foram realizadas na presença de Tampão de Transcrição 4X, DTT 0,1mM, NTPs, inibidor de RNase, Pirofosfatase Inorgânica, T7 RNA Polimerase e Cianina-3. A mistura foi incubada a 40°C por duas horas, após as quais uma nova purificação com o kit Rneasy (Qiagen) foi realizada. Os cRNAs foram avaliados por espectrometria e eletroforese em gel de agarose 1,2%. Os experimentos só tiveram continuidade quando foram obtidas quantidades de cRNAs superiores a 1,65 µg e quando a ativação da cianina foi superior a 9.0 pmol/µg de cRNA.

3.9.2 Hibridação e detecção de *microarranjos*

Somente 1,65 µg de cRNA foram fragmentados por aquecimento a 60°C por 30 minutos em uma solução tampão apropriada. As reações de hibridação foram preparadas adicionando-se ao cRNA fragmentado um tampão responsável pelo bloqueio da reação de fragmentação. A mistura da reação foi injetada nas microcâmeras das lâminas de *microarranjos* para hibridação que foram mantidas a 65°C por 17 horas, em um agitador a 10 rpm.

Após a hibridação, os *microarranjos* foram submetidos a lavagens seriadas com tampões apropriados, finalizando com uma lavagem em

um tampão de estabilização, após a qual as lâminas foram secas.

A intensidade da fluorescência da cianina-3 nas lâminas de microarranjos foi detectada pelo scanner *GenePix 4000B* (Axon Instruments, Foster City, CA, USA) utilizando o software *GenePix Pro 6.0*. Os valores de fluorescência obtidos nesta análise foram normalizados pelo 75º percentil dos valores de todos os genes da plataforma e os resultados exportados para planilhas do software Microsoft Excel.

Para a determinação da intensidade do sinal de fluorescência dos diferentes spots da lâmina, as imagens obtidas foram analisadas com o programa *Agilent Feature Extraction* (version 9.5.3.1). Em suma, este software reconhece os spots presentes na imagem obtida da lâmina e quantifica a intensidade de fluorescência de cada um deles. Os valores de fluorescência obtidos são então normalizados e exportados para planilhas do software Microsoft Excel.

3.10 Análises de Bioinformática

Os dados gerados pela técnica de microarranjos foram analisados pelo software Genesis (Sturn, Quackenbush et al. 2002). O programa integra várias ferramentas para análise de dados de microarranjos como filtros, normalização, ferramentas de visualização, medidas de distância e algoritmos de clusterização.

3.11 Avaliação da diferenciação osteogênica por PCR em Tempo Real (qRT-PCR)

Para avaliar a diferenciação das células mesenquimais em osteoblastos em amostras de pacientes portadores de Osteogênese Imperfeita e de pacientes controle, foram realizadas reações de qRT-PCR para os genes *ALPL* (fosfatase alcalina), *MSX2* (homeobox *MSX2*), *VDR* (receptor da vitamina D), *COL1A1* (cadeia alfa 1 do colágeno tipo I), *SPARC* (osteonectina), *BGLAP* (osteocalcina) e *SPP1* (osteopontina). Esses genes são conhecidos como

marcadores específicos da diferenciação osteogênica e sua expressão pode ser bastante informativa no que diz respeito a eventuais diferenças na diferenciação celular de pacientes e indivíduos controle. A padronização dos *primers* utilizados, as condições de reação e análise dos dados obtidos foram realizadas da mesma forma que para os genes selecionados para validação da expressão diferencial a partir dos dados dos experimentos de microarranjos e que estão descritas na próxima sessão. Na tabela 4 podem ser encontrados os *primers* utilizados, suas respectivas sequências e o tamanho dos fragmentos amplificados.

Tabela 4. Sequência dos *primers* para avaliação da expressão dos genes relacionados à diferenciação osteoblástica e tamanhos dos fragmentos amplificados.

Sequência dos primers		Fragmento Amplificado (pb)
ALPL-RT-PF:	TGGAGCTCCAGAAGCTCAAC	120
ALPL-RT-PR:	AACCTGTCCATCTCCAGCCT	
MSX2-RT-PF:	TTACCACATCCCAGCTCCTC	111
MSX2-RT-PR:	CCTGGGTCTCTGTGAGGTTC	
VDR-RT-PF:	CCAACCCATCAGAAGGAGAA	114
VDR-RT-PR:	TATCCAAGGCTGAGGTGGAG	
COL1A1-RT-PF:	CCTGGATGCCATCAAAGTCT	116
COL1A1-RT-PR:	TCTTGTCTTGGGGTTCTTG	
SPARC-RT-PF:	CTGGGCTCTGCCTTAAACAC	113
SPARC-RT-PR:	GCCAAGACCCTGAAATGAAA	
BGLAP-RT-PF:	GACTGTGACGAGTTGGCTGA	119
BGLAP-RT-PR:	CTGGAGAGGAGCAGAACTGG	
SPP1-RT-PF:	CCACAGTAGACACATATGATG	129
SPP1-RT-PR:	CCATGTGTGAGGTGATGTCC	

3.12 Análise da expressão gênica por qRT-PCR

A análise da expressão dos genes selecionados a partir dos dados obtidos dos experimentos de microarranjos foi feita por PCR em Tempo Real. As reações foram preparadas em placas de 96 poços, utilizando o reagente SYBR-Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) e o equipamento 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems).

A determinação da intensidade da fluorescência na reação foi feita pelo cálculo do ΔRn ($\Delta Rn = Rn^+ - Rn^-$), onde Rn^+ é a intensidade de

emissão do SYBR-Green – intensidade de emissão do ROX em um dado momento da reação e Rn^- é a intensidade de emissão do SYBR-Green – intensidade de emissão do ROX antes da amplificação. O composto ROX é utilizado como controle interno passivo, pois a fluorescência que emite tem intensidade constante durante toda a reação, enquanto que a intensidade da fluorescência emitida pelo SYBR-Green aumenta à medida que este composto se liga às duplas fitas de DNA. Durante os ciclos iniciais da reação não há acúmulo de produtos de amplificação e os valores de ΔRn permanecem na linha de base (a fluorescência do ROX é maior que a emitida pelo SYBR-Green). Na fase logarítmica da reação ocorre o acúmulo dos produtos de amplificação e ΔRn ultrapassa a linha de base. Para a quantificação relativa, após a reação foi estabelecido um valor de ΔRn , que é uma linha de corte (*threshold*) para cada curva de amplificação de um dado par de primers, definido acima da fluorescência inespecífica. O número do ciclo em que a ΔRn da amostra cruza o *threshold* corresponde ao CT (*cycle threshold*) da amostra. O valor de CT é preditivo da quantidade de RNAm alvo presente na amostra.

Os *primers* utilizados nas reações de amplificação são mostrados na tabela 5. Na padronização das reações de PCR em Tempo Real, foram feitas diluições seriadas dos cDNAs e foi calculada a eficiência de amplificação para os genes normalizadores utilizados e para os genes-alvo. As reações foram preparadas em triplicatas em um volume final de 20 μ L. As condições da reação para todos os genes avaliados envolveram 10 minutos a 95°C para ativação da Polimerase e quarenta ciclos a 95°C por 15 segundos e a 60°C por 1 minuto. O máximo coeficiente de variação permitido entre as triplicatas foi de 1%. Nos casos em que esse valor foi superior o experimento foi repetido. Para o cálculo da eficiência dos primers foi utilizada a equação $E = 10^{(-1/\text{slope})}$, onde E corresponde a eficiência e *slope* corresponde ao coeficiente de angulação da curva. Para cada gene estudado foi realizada uma reação com diluições seriadas de amostra de cDNA (1/2 a 1/32) e os *primers* de interesse. Os valores de CT obtidos foram plotados em um gráfico para o cálculo do slope e da eficiência. Somente *primers* com eficiência de amplificação superior a 90% foram

utilizados.

A especificidade dos *primers* foi avaliada pela curva de dissociação dos produtos de PCR, que pode detectar amplificações inespecíficas, inclusive a formação de dímeros de *primers*. Para isso, após a amplificação as amostras foram submetidas a 95°C por 1 minuto, 60°C por 1 minuto e 95°C por 1 minuto. A formação de apenas um pico de fluorescência em uma determinada temperatura, característica observada para todos os *primers* utilizados, indica a amplificação de um produto específico.

A escolha dos normalizadores utilizados foi feita com o auxílio do programa BestKeeper, disponível no site <http://genequantification.com/bestkeeper.html>. Foram testados três potenciais genes normalizadores: *TUBA1C*, *GAPDH* e *HPRT*.

A quantificação relativa da expressão gênica foi realizada utilizando-se o modelo matemático desenvolvido por Pfaffl *et al.*, 2001. Neste modelo, a taxa de expressão relativa de um determinado gene alvo é calculada com base na eficiência de amplificação da reação e o CT de uma determinada amostra *versus* uma amostra de referência (ou amostras calibradora) e expressa em comparação a um gene endógeno ou normalizador. Usando este método, os dados são representados como diferenças (em vezes) na expressão gênica, que foi normalizada para um gene endógeno de referência e é relativa a um controle ou calibrador. Em nossos experimentos, o calibrador usado foi o valor da média da expressão dos genes nas células mesenquimais indiferenciadas (T0) das três amostras de doadores normais utilizadas. Para os diferentes períodos de diferenciação analisados, o valor indica a diferença em vezes na expressão gênica relativa à amostra indiferenciada.

Tabela 5. Sequência dos *primers* para avaliação da expressão dos genes selecionados a partir dos dados gerados pelos experimentos de microarranjos e tamanhos dos fragmentos amplificados.

	Sequência dos primers	Fragmento amplificado (pb)
ADM-RT-PF:	AGGACATGAAGGGTGCCTCT	106
ADM-RT-PR:	CCCTGGAAGTTGTTTCATGCT	
AGC1-RT-PF:	CCTGAACGACAGGACCATC	114
AGC1-RT-PR:	AGTCCTCTCCAGCGGCAAAA	
APOE-RT-PF:	CAGACACTGTCTGAGCAGGT	124
APOE-RT-PR:	GTTGTTCTCTCCAGTTCCGAT	
CAV1-RT-PF:	CCCTAAACACCTCAACGATG	120
CAV1-RT-PR:	GTACAGTGAAGGTGGTGAA	
COMP-RT-PF:	CGAAACGTGGGTTGGAAGGA	133
COMP-RT-PR:	GTCCAAGACCACGTTGCTGT	
CXCL12-RT-PF:	CCAGAGCCAACGTCAAGCAT	102
CXCL12-RT-PR:	GGTCAATGCACACTTGTCTG	
DPT-RT-PF:	CAGGTCATATGGTGAGGAA	120
DPT-RT-PR:	GGCACATTATGAACCTCCAC	
FMOD-RT-PF:	CCTACAACCAGCTGCAGAAG	127
FMOD-RT-PR:	GAGAAGTTCACGACGTCCAC	
LUM-RT-PF:	CTATTACCTGGAGGTCAATC	139
LUM-RT-PR:	ATCCGGTGGAAGACTGGTTT	
MFAP4-RT-PF:	CTCTTTGTGGCAGGCTTTGA	117
MFAP4-RT-PR:	AGCTGCGCAGTTCTGCACAA	
PTGDS-RT-PF:	GAGACCGACTACGACCAGTA	132
PTGDS-RT-PR:	GGCGGTGAATTTCTCCTTTA	
RECK-RT-PF:	GTGATCCTGATCATTCCCGT	110
RECK-RT-PR:	AAAGTCGGGCTGTGAGAGTT	
RGC32-RT-PF:	GGAACAGCTTCAGCTTCAGT	130
RGC32-RT-PR:	GCAATGAAGGCTTCTAGCTC	
SFRP1-RT-PF:	ACGAGTTGAAATCTGAGGCC	130
SFRP1-RT-PR:	TTCAGGGGCTTCTTCTTCTT	
TGFBR2-RT-PF:	GGACAACGTGTTGAGAGATC	100
TGFBR2-RT-PR:	CCAGCACTCAGTCAACGTCT	
ADA-RT-PF:	GCTCTATAAAGCCTATGGGA	119
ADA-RT-PR:	ATGTTGCTCAGCCCCACAGA	
OPG-RT-PF:	CCAGCTGCTGAAGTTATGGA	131
OPG-RT-PR:	GCTGCTCGAAGGTGAGGTTA	
Normalizadores		
GAPDH-SYBR-PF:	ACCCACTCCTCCACCTTTGA	101
GAPDH-SYBR-PR:	CTGTTGCTGTAGCCAAATTCGT	
HPRT-SYBR-PF:	GAACGTCTTGCTCGAGATGTGA	92
HPRT-SYBR-PR:	TCCAGCAGGTCAGCAAAGAAT	
TUBA1C-SYBR-PF:	TCAACACCTTCTTCAGTGAAACG	92
TUBA1C-SYBR-PR:	AGTGCCAGTGCGCAACTTCATC	

3.13 Análise da expressão das isoformas do gene *PLOD2* por RT-PCR

Com o objetivo de se avaliar a expressão do gene *PLOD2* na amostra MOOI5, uma região entre as posições do cDNA c1357 e c.1624/1668, que envolve a região do éxon 13A, foi amplificada para verificação da expressão das duas isoformas do gene em células indiferenciadas e durante a diferenciação osteogênica. Para isso foram utilizados os primers PF: GTAGGAGTATGGAATGTCCC e PR: CCTCCAGTCCACAGGATTT. Os fragmentos foram amplificados pela reação em cadeia da polimerase ou PCR e as amplificações foram realizadas com um volume total de 25 µL contendo tampão 10X ((NH₄)₂SO₄ 2M, Tris-HCl 2M, MgCl₂ 1M e Tween 20 a 1%), 1,25 mM de dNTP, 2,5µM para cada primer e 1U de Taq DNA Polimerase (Biotools). Os parâmetros de amplificação foram: 94°C por 6 minutos, 35 ciclos de 94°C por 1 minuto, 60°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto. Por fim, uma extensão final a 72°C por 10 minutos. Para verificação da qualidade da síntese de cDNA foram realizadas também reações para o gene da Beta-actina (mesmos parâmetros anteriores, com temperatura de anelamento de 68°C). Os fragmentos amplificados foram finalmente visualizados em gel de agarose 3% corado com brometo de etídeo e sob luz ultravioleta.

3.14 Análises da expressão do microRNA 29b (MiR-29b)

A determinação da expressão do miR-29b nas amostras de doadores normais e de pacientes com Osteogênese Imperfeita foi realizada ao longo de todos os tempos avaliados durante a diferenciação osteoblástica, da mesma forma que ocorreu para os outros genes selecionados.

Para essa avaliação, no entanto, foi utilizado o Sistema TaqMan® MicroRNA Assays (Applied Biosystems) que inclui duas etapas: uma etapa inicial de transcrição Reversa e um passo de análise da expressão gênica. Para isso, o RNA total (2,5 ng por reação) foi submetido à transcrição reversa com *primers* específicos. As reações foram realizadas com os reagentes do Kit

High-Capacity cDNA Archive Kit (PN 4322171, Applied Biosystems) e 1,9 U de inibidor de RNase (PNN8080119, Applied Biosystems) e incubadas por 30 minutos a 16 °C, 30 minutos a 42 °C, 5 minutos a 85 °C e então resfriadas a 4 °C. Para o passo de análise da expressão gênica, as amostras de cDNA foram diluídas (1:5) e 4,5 µL foram usados nas reações contendo *primers* e sonda para miR-29b, de acordo com as instruções do fabricante. As reações foram realizadas em triplicatas no equipamento 7500 Reais Time PCR System (Applied Biosystems) utilizando-se as seguintes condições: 95 °C por 10 minutos, seguidos de 40 ciclos a 95 °C por 15 segundos e a 60 °C por um minuto. A normalização da expressão do miR-29b foi feita com base na expressão de RNU6B, um RNA nucleolar, comumente utilizado neste tipo de análise. A análise da expressão relativa foi feita pela utilização da fórmula 2^{-DCt} .

4. RESULTADOS

4.1 Caracterização dos pacientes

Os resultados obtidos estão baseados em um estudo com 8 amostras de medula óssea. Três foram de doadores normais (controles sadios) e cinco de pacientes com Osteogênese Imperfeita. O grau da OI foi caracterizado com base nos dados clínicos de cada paciente (Tabela 6). A Crista ilíaca anterior (CIA) foi o local escolhido para punção da MO, no entanto, devido a dificuldades técnicas, a punção do paciente MOOI-I¹ foi realizada na crista ilíaca posterior (CIP). Aproximadamente 5 mL de aspirado medular foram coletados de cada paciente.

Tabela 6. Informações clínicas dos pacientes incluídos do estudo.

Dados Clínicos	MOOI-I ¹	MOOI-III ₂	MOOI-III ₃	MOOI-I ₄	MOOI-III ₅
Sexo	M	F	M	F	M
Idade (anos)	26	23	15	41	4
Antecedentes familiares	Não	Não	Não	Não	Não
Número de fraturas	+ de 30	+ de 30	+ de 30	- de 30	- de 30
Deformidades ósseas	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
Escleras azuladas	Sim	Sim	Sim	Sim	Não
Dentinogênese Imperfeita	Sim	Sim	Sim	Sim	Não
Perda auditiva	Não	Não	Sim	Sim	Não
Estado deambulatório	Sem auxílio	Não deambula	Não deambula	Sem auxílio	Não deambula

MOOI-I: medula óssea de paciente com osteogênese imperfeita do tipo I

MOOI-III: medula óssea de paciente com osteogênese imperfeita do tipo III

4.2 Isolamento e cultivo das CTMs

As CTMs foram isoladas e então cultivadas até a terceira passagem, quando foi iniciado o processo de diferenciação. A figura 7 mostra as CTMs dos pacientes portadores de Osteogênese Imperfeita nesta fase do cultivo.

Figura 7. CTMs indiferenciadas dos pacientes portadores de Osteogênese Imperfeita fotografadas em microscopia por contraste de fase. A. CTMs indiferenciadas do paciente MOOI-III (amostra 2), aumento de 40X. B. CTMs indiferenciadas do paciente MOOI-I (amostra 1), aumento de 40X. C. CTMs indiferenciadas do paciente MOOI-I (amostra 4), aumento de 100X.

4.3 Quantificação das Unidades Formadoras de Colônias Fibroblastóides (CFU-F)

O resultado da contagem das CFU-F encontra-se representada na tabela 7. Observa-se que o número de CFU-F na maioria das amostras de pacientes portadores de Osteogênese Imperfeita é inferior ao encontrado usualmente em amostras de medula óssea de indivíduos normais, porém, nenhum teste estatístico foi realizado. No entanto, esse resultado sugere que os pacientes portadores de OI possuam uma fração menor de células-tronco mesenquimais em suas medulas em comparação a indivíduos normais.

Tabela 7. Número de Unidades Formadoras de Colônias (CFU-F) observadas nos pacientes com Osteogênese Imperfeita.

Amostras ¹	Número de CFU-F ($\times 10^{-5}$)
MON	~ 9-10
MOOI-I (amostra 1)	1.30
MOOI-I (amostra 4)	1.00
MOOI-III (amostra 2)	3.00
MOOI-III (amostra 3)	8.00
MOOI-III (amostra 5)	2.15

MON: medula óssea normal

MOOI-I: medula óssea de paciente com osteogênese imperfeita tipo I.

MOOI-III: medula óssea de paciente com osteogênese imperfeita tipo III.

4.4 Diferenciação das CTMs

4.4.1 Diferenciação das CTMs em Osteoblastos e Adipócitos

Para avaliar o potencial de diferenciação das CTMs, alíquotas contendo 40.000 células/mL foram cultivadas em placas de 24 poços com lamínulas para a realização de estudos morfológicos. Quando a diferenciação foi iniciada, todo o meio de cultivo foi removido e substituído pelo meio de indução (para osteoblastos ou adipócitos) como já descrito para a diferenciação osteogênica ou somente meio α -MEM enriquecido com 7,5% de SBF como controle.

As diferenciações em adipócitos e osteoblastos foram nitidamente evidenciadas a partir do 14° e 21° dias, respectivamente, em todas as amostras. A figura 8 ilustra a diferenciação em adipócitos e osteoblastos.

Figura 8. Exemplos de CTMs diferenciadas em adipócitos e osteoblastos. A. CTMs não-induzidas, indiferenciadas. B e C. CTMs diferenciadas em adipócitos e coradas com a técnica de Sudan II, magnitude de X100 e X630, respectivamente. D. CTMs não induzidas e E e F. CTMs diferenciadas em osteoblastos corados pelo método de Von Kossa, magnitude de X100 e X630, respectivamente.

4.5 Imunofenotipagem das CTMs

A expressão antigênica das proteínas de superfície das CTMs foi avaliada por citometria de fluxo. A tabela 8 descreve o resultado da imunofenotipagem das CTMs de pacientes e mostra a porcentagem de células, dentre as totais, que expressam cada um dos antígenos avaliados. Os resultados encontrados demonstram que as células isoladas possuem características imunofenotípicas compatíveis com as das CTMs, tanto para os doadores normais quanto para os pacientes, isto é, expressão baixa ou ausente dos marcadores de células hematopoéticas (CD34, CD14, CD45 e CD31) e significativa, mas em diferentes níveis de intensidade, dos antígenos CD29, CD13, CD90, CD73 e CD105.

Tabela 8. Imunofenotipagem das CTMs dos pacientes na terceira passagem.

	CD45	CD14	CD34	CD31	CD29	CD13	CD90	CD73	CD105
MON ¹	0	0,08	0,01	0,13	63,51	84,62	93,56	62,24	80,07
MON ²	0,16	0,62	0	1,00	97,15	98,65	99,10	96,44	97,38
MON ³	0,20	0,69	0,49	1,08	96,28	98,83	97,17	95,45	97,35
MOOI-I ¹	0,18	1,07	0,16	0,33	94,8	98,56	99,07	95,99	96,24
MOOI-III ²	0,01		2,34	4,43	83,85	95,88	91,43	78,54	92,32
		1,43							
MOOI-III ³	1,74	3,36	0	0,38	93,32	96,36	97,33	94,24	94,51
MOOI-I ⁴	0,29	0,30	2,74	0,34	96,20	*	99,11	96,23	95,38
MOOI-III ⁵	0	0,23	0,12	0,10	96,33	94,31	97,99	92,65	91,44

MON: medula óssea normal

MOOI-I: medula óssea de paciente com osteogênese imperfeita tipo I.

MOOI-III: medula óssea de paciente com osteogênese imperfeita tipo III.

Os sobrescritos indicam o numero das amostras.

4.6 Sequenciamento da região codificadora dos genes *COL1A1* e *COL1A2*

Os exons dos genes *COL1A1* e *COL1A2* foram seqüenciados em cada amostra com *primers* específicos (tabelas 1 e 2). As seqüências (cromatogramas) foram analisadas no programa PolyPhred para identificar de forma segura as mutações primárias da OI de cada paciente. A figura 9 demonstra um exemplo da identificação de uma mutação em heterozigose de um dos pacientes.

Figura 9. Exemplo da visualização do alinhamento realizado pelo software *Polyphred* das seqüências geradas para o éxon 3 do gene *COL1A2*. A região em branco indica alta qualidade do seqüenciamento e a região em destaque indica a presença de uma possível mutação em um dos pacientes analisados.

As figuras 10 e 11 indicam a posição das mutações nos genes *COL1A1* e *COL1A2* encontradas nos pacientes, respectivamente. Foram identificadas mutações nos pacientes em pelo menos um dos genes. O gene *COL1A1* estava mutado nos pacientes MOOI-I¹ (c.3076C>T, Arg1026X), MOOI-III³ (c. 869G>A, Gly290Glu; 870 C>A) e MOOI-I⁴ (c.198_204dupCAAGGTG, Leu69Glu-fsX74), enquanto o gene *COL1A2* estava mutado no paciente MOOI-III² (c.2503G>A, Gly835Ser). Neste paciente foram encontradas duas mutações, sendo uma delas do tipo silenciosa. Estes os pacientes portavam mutações que afetavam a estrutura ou a quantidade da proteína formada, o que é condizente com os fenótipos observados em cada paciente. Finalmente, no paciente MOOI-III⁵ foram encontradas três mutações: duas mutações no gene *COL1A1* (c.3459T>C e c.3897C>T) e uma mutação no gene *COL1A2* (c.87T>C). Curiosamente, nenhuma das três mutações resulta em troca no aminoácido codificado pelo códon.

Na tentativa de encontrar uma causa para o fenótipo da OI no paciente MOOI-III⁵, o gene *PLOD2* também foi sequenciado. O gene *PLOD2* codifica uma enzima importante no processamento das moléculas de colágeno e mutações neste gene tem sido descritas em pacientes apresentando as mesmas características observadas no paciente MOOI-III⁵. Infelizmente, nenhuma mutação foi encontrada no gene *PLOD2*.

Figura 10. Esquema da estrutura do gene *COL1A1* mostrando a localização das mutações identificadas para cada um dos pacientes analisados.

Figura 11. Esquema da estrutura do gene *COL1A2* mostrando a localização das mutações identificadas para cada um dos pacientes analisados.

4.7 Análise da expressão dos marcadores específicos da osteogênese por PCR em Tempo Real

A expressão dos genes marcadores da diferenciação osteogênica *MSX2*, *VDR*, *ALPL*, *COL1A1*, *SPARC*, *BGLAP* e *SPP1* foi investigada por qRT-PCR. Para alguns dos genes testados (*BGLAP*, *COL1A1*, *SPARC* e *VDR*) observou-se uma menor expressão nas células dos pacientes portadores de OI em relação às amostras de doadores saudáveis, sugerindo um menor comprometimento das células mesenquimais destes pacientes com a diferenciação osteogênica. Para o gene *MSX2*, a diferença também existe, embora seja menos evidente. Curiosamente, a expressão destes genes na amostra do paciente MOOI-III⁵ acompanha a expressão observada nas amostras de células normais, levantando a segunda suspeita de que o componente genético envolvido nas manifestações clínicas deste paciente seja diferente do observado nos pacientes com OI. A figura 12 mostra os resultados de avaliação da expressão gênica obtidos por qRT-PCR e a tabela (Apêndice B) mostra os valores numéricos obtidos nessa análise.

Figura 12. Gráficos das análises da expressão dos genes marcadores diferenciação osteoblástica nas amostras de doadores normais e de pacientes portadores de Osteogênese Imperfeita.

4.8 Análise preliminar dos dados de microarranjos

Foi realizada uma análise não supervisionada para gerar um heatmap dos genes com padrões de expressão restrita a cada grupo de amostra. A análise da expressão diferencial entre as amostras controle e dos pacientes foi realizada com o software Genesis e revela padrões de expressão gênica que diferem entre amostras de pacientes e de controles (Figura 13).

Figura 13. Exemplo de visualização do Programa Genesis, mostrando genes diferencialmente expressos entre a amostra controle (MON1) e as amostras de pacientes com Osteogênese Imperfeita tipo I (MOOI-I¹) e tipo III (MOOI-III³).

Dezesseis genes com expressão diferencial foram selecionados para validação por qRT-PCR: *CAV1*, *RGC32*, *MFAP4*, *SFRP1*, *DPT*, *TGFB2*, *RECK*, *PTGDS*, *LUM*, *ADM*, *APOE*, *CXCL12*, *FMOD*, *COMP*, *AGC1* e *ADA*. A

descrição dos genes, informações e valores sobre a expressão obtidos nos experimentos de microarranjos estão disponíveis na tabela apêndice C. Os dados de expressão gênica foram confirmados também pelas análises descritas no item 4.9.2.1.

Os genes *CAV1*, *RGC32*, *MFAP4*, *SFRP1*, *DPT*, *TGFBR2*, *RECK*, *ADM* e *ADA* apresentaram expressão mais alta na amostra normal em comparação com as amostras dos pacientes. Já os genes *PTGDS*, *APOE*, *CXCL12* e *AGC1* apresentaram expressão maior nas amostras de pacientes ou expressão maior apenas na amostra de OI tipo III (*LUM*). Finalmente, os genes *FMOD* e *COMP* apresentaram expressão semelhante na amostra normal e na amostra de OI tipo III, porém expressão diminuída na amostra de OI tipo I.

4.9 Análise de expressão durante a osteogênese

A figura 14 descreve um fluxograma indicando a sequência das análises realizadas para selecionar genes cuja expressão é modulada em consequência ao defeito primário nos genes *COL1A1* e *COL1A2*.

Figura 14. Fluxograma das análises realizadas para a seleção de genes com expressão diferencial em controles normais e pacientes portadores de OI.

4.9.1 Análise não-supervisionada dos dados de microarranjos

4.9.1.1 Pré-processamento

Os dezoito microarranjos representando as seis condições de osteogênese *in vitro* das amostras MON1, MOOI-I¹ e MOOI-III³ (45.015 sondas cada microarranjos) foram inicialmente analisados pelo *software Agilent Feature Extraction* (AFE) e importados pela plataforma R (<http://cran.r-project.org>) para aplicar filtros de pré-processamento dos dados (Figura 14 ítem 2), bem como iniciar as análises estatísticas. Estas por sua vez foram realizadas utilizando os algoritmos disponíveis no projeto Bioconductor (<http://www.bioconductor.org/>) (Figura 14, itens 4 e 5). Na etapa de pré-processamento o pacote de funções R “Agi4x44PreProcess” foi utilizado na execução dos seguintes processos:

- Anotação gênica das sondas utilizando a função R “hgug4112.db”;
- Transformação logarítmica dos sinais ($\log_2$);
- Correção do sinal de *background* usando o algoritmo normexp (Silver, Ritchie et al. 2009);
- Normalização entre amostras utilizando o método *quantile*;
- Filtragem de sondas de acordo com as marcações geradas pelo *software* AFE, as quais identificam diferentes erros no sinal. Foram filtrados os dados de sondas: controles, com sinal não distinguível do sinal do *background*, com saturação no sinal, com sinal abaixo dos controles negativos, com sinal não uniforme, ou consideradas *outliers*;
- Retirar a redundância das sondas diferentes para o mesmo gene, fazendo a mediana do sinal entre elas;
- Eliminação dos genes mapeados no cromossomo Y.

4.9.1.2 Seleção dos genes com maior desvio padrão entre as amostras

Para identificar as vias gênicas que estão sendo moduladas durante a osteogênese nos pacientes com Osteogênese Imperfeita

dos tipos I e III, foram selecionados 100 genes com desvio padrão de expressão gênica igual ou maior que 1,44 entre os dezoito microarranjos (Figura 15). Este conjunto de genes foi usado para executar as análises descritas nos próximos itens.

Figura 15. Distribuição do nível de expressão gênica em todas amostras. A linha vertical tracejada indica o ponto de corte ($SD \geq 1,44$) para a seleção dos 100 genes.

4.9.1.3 Análise de agrupamento Hierárquico e consenso

Nos 100 genes pré-selecionados, foram aplicados algoritmos de agrupamento hierárquico simples (Figura 16) e de agrupamento consenso. Este segundo, foi executado com bootstrap de 1.000 replicatas (Wilkerson and Hayes 2010)(Figura 17). Os parâmetros usados nessas análises incluíram a distância euclidiana e o método de ligação média (Pairwise Average Linkage). Os resultados do agrupamento simples organizaram as amostras em quatro grupos principais: T0, Controle, OI-I e OI-III. Os grupos representam amostras de cada paciente, com exceção do grupo T0, que inclui amostras do tempo zero (antes da indução da osteogênese) do controle (MON1 T0) e dos dois pacientes (MOOI-I¹ T0 e MOOI-III³ T0).

Figura 16. Gráfico ilustrando o agrupamento hierárquico simples dos 100 genes pré-selecionados.

Figura 17. Gráfico ilustrando o agrupamento consenso dos 100 genes pré-selecionados.

O resultado da análise de agrupamento hierárquico consenso revelou o mesmo padrão do observado no agrupamento simples (T0, Controle, OI-I e OI-III)(Figuras 16 e 17). Na figura 17 o agrupamento hierárquico consenso demonstra que os grupos controle e T0 (sem indução) não apresentam identidade no padrão de expressão em relação aos grupos dos pacientes (OI-I e OI-III). Estes, por sua vez são similares, apesar de ter grupos gênicos com padrão de expressão específicos.

Para uma melhor visualização do padrão de expressão dos genes em relação aos grupos de amostras controle, a ordem dos grupos foi manualmente alterada para: Controle, T0, OI-I e OI-III (seguindo também a ordem do tempo de diferenciação)(Figura 18). Nesta ordem, podemos definir cinco grupos classificados pelas letras de A a E. Dois grupos gênicos chamaram atenção: um por apresentar um padrão de expressão elevado nas amostras controle e uma expressão diminuída nas amostras sem indução e nos pacientes (grupo C, Figura 18) e o outro grupo com padrão inverso, ou seja, apresentando expressão diminuída nas amostras controle e expressão elevada nas amostras sem indução e nos pacientes (Grupo D, Figura 18).

Figura 18. Gráfico ilustrando o agrupamento hierárquico simples dos 100 genes pré-selecionados com alteração na ordem dos grupos controle, sem indução (T0), OI-I e OI-III.

Um gráfico com a média da expressão dos genes de cada condição foi gerado para mostrar de forma categórica a expressão inversa entre os grupos C e D (Figura 19). Os genes presentes em cada grupo estão descritos nas tabelas 9 e 10.

Figura 19. Média dos valores de expressão dos genes classificados nos grupos C e D, indicando a relação de expressão inversa entre as amostras controle e de Osteogênese Imperfeita.

4.9.1.4 Assinatura molecular dos grupos C e D

Para avaliar a função dos genes presentes nos grupos C e D, foi usado o módulo MSigDB (*Molecular Signatures Database v3.0*) da plataforma GSEA (*Gene Set Enrichment Analysis*, <http://www.broadinstitute.org/gsea/>), que permite elencar grupos de genes que participam do mesmo processo biológico. Esta análise é importante para identificar as vias gênicas que estão sendo afetadas durante a osteogênese dos pacientes com OI.

Tabela 9. Lista dos genes presentes no grupo C mostrados na figura 19.

Gene	RefSeq ID	Descrição
ABLM2*	NM_001130083	actin binding LIM protein family, member 2
APOD*	NM_001647	apolipoprotein D
AQP1	NM_001185060	aquaporin 1 (Colton blood group)
ASPN*	NM_001193335	asporin
BDKRB1	NM_000710	bradykinin receptor B1
C4orf49	NM_032623	chromosome 4 open reading frame 49
CCRL1*	NM_016557	chemokine (C-C motif) receptor-like 1
CD177	NM_020406	CD177 molecule
CPE*	NM_001873	carboxypeptidase E
FAM107A	NM_001076778	family with sequence similarity 107, member A
GREM1*	NM_001191322	gremlin 1
GSTT1	NM_000853	glutathione S-transferase theta 1
H19	NR_002196	H19, imprinted maternally expressed transcript (non-protein coding)
IFI27	NM_001130080	interferon, alpha-inducible protein 27
LAMA2	NM_000426	laminin, alpha 2
LOC730755	NM_001165252	keratin associated protein 2-4-like
MME*	NM_000902	membrane metallo-endopeptidase
MMP1	NM_001145938	matrix metallopeptidase 1 (interstitial collagenase)
MYBPH	NM_004997	myosin binding protein H
MYH1*	NM_005963	myosin, heavy chain 1, skeletal muscle, adult
MYH2*	NM_001100112	myosin, heavy chain 2, skeletal muscle, adult
PAMR1	NM_001001991	peptidase domain containing associated with muscle regeneration 1
PI16	NM_153370	peptidase inhibitor 16
PRG4*	NM_001127708	proteoglycan 4
SCRG1	NM_007281	stimulator of chondrogenesis 1
XG	NM_001141919	Xg blood group

* genes que possuem o sítio TGGAAA para o fator de transcrição NFAT; os genes destacados em negrito estão envolvidos com a osteogênese.

Tabela 10. Lista dos genes presentes nos grupos D mostrados na figura 19.

Gene	RefSeq ID	Descrição
BATF		basic leucine zipper transcription factor, ATF-like
	NM_006399	
DDIT4L	NM_145244	DNA-damage-inducible transcript 4-like
FABP4	NM_001442	fatty acid binding protein 4, adipocyte
FNDC1	NM_032532	fibronectin type III domain containing 1
GPM6B	NM_001001994	glycoprotein M6B
HOPX	NM_001145459	HOP homeobox
LPL	NM_000237	lipoprotein lipase
MDK	NM_001012333	midkine (neurite growth-promoting factor 2)
NAPRT1		nicotinate phosphoribosyltransferase domain containing 1
	NM_145201	
NGEF	NM_001114090	neuronal guanine nucleotide exchange factor
PIP	NM_002652	prolactin-induced protein
PPARG		peroxisome proliferator-activated receptor gamma
	NM_005037	
PREX1	NM_020820	phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate-dependent Rac exchange factor 1
PTN	NM_002825	pleiotrophin
SAMD11	NM_152486	sterile alpha motif domain containing 11
VCAM1	NM_001078	vascular cell adhesion molecule 1

Os genes destacados em negrito estão envolvidos com a adipogênese.

O resultado da análise do grupo C apontou módulos gênicos ligados a câncer, e que estão hipoexpressos em células-tronco mesenquimais e no estroma do tecido adiposo (Figura 20). Um dado interessante neste grupo é a presença de 10 genes (Tabela 9) que possuem em seu promotor o sítio TGGAAA para o fator de transcrição NFAT. O NFAT, quando desfosforilado, vai para o núcleo ativar genes fundamentais para a osteogênese, como o *APOD* (Alexopoulos et al, 2008; Liu et al, 2006). A análise da expressão dos genes do grupo C durante a osteogênese *in vitro* dos controles e dos pacientes com OI, mostra uma redução da expressão nos pacientes, sugerindo assim que a osteogênese está sendo negligenciada.

O grupo D, que possui menos genes que o grupo C, chama a atenção por apresentar modulação positiva nos pacientes em relação ao controle (Tabela 10 e Figura 21). Outra observação importante nesse grupo é a presença de três genes (*FABP4*, *LPL* e *PPARγ*) que participam ativamente da

adipogênese (Liu et al, 2006). Os três genes estão nos módulos que contêm genes ativos na durante diferenciação de adipócitos (Figura 21). Uma conclusão simples sobre esses resultados é a evidência molecular de um desvio da diferenciação para a adipogênese, mesmo que a indução da diferenciação seja para osteogênese. Esse desvio pode ser ativado pelo PPAR γ que, quando expresso, conduz a diferenciação para a adipogênese (Liu et al, 2006).

Gene Set Name [# Genes (K)]	Description	# Genes in Overlap (k)	k/K	p value
module_88 [816]	Genes in module_88	9		5.57 e ⁻⁹
TGGAAA_V\$NFAT_Q4_01 [1438]	Genes with promoter regions [-2kb,2kb] around transcription start site containing the motif TGGAAA which matches annotation for NFAT NFATC	10		5.07 e ⁻⁸
module_55 [811]	Genes in module_55	8		1.12 e ⁻⁷
module_44 [319]	Genes in module_44	6		1.34 e ⁻⁷
module_6 [407]	Genes in module_6	6		5.61 e ⁻⁷
COLIN_PILOCYTIC_ASTROCYTOMA_VS_GLIOBLA BLASTOMA_UP [34]	Genes up-regulated in pilocytic astrocytoma compared to glioblastoma samples.	3		2.44 e ⁻⁶
module_100 [529]	Genes in module_100	6		2.56 e ⁻⁶
module_137 [531]	Genes in module_137	6		2.62 e ⁻⁶
module_66 [536]	Genes in module_66	6		2.77 e ⁻⁶
WU_SILENCED_BY_METHYLATION_IN_BLADDER_ ER_CANCER [44]	Genes silenced by DNA methylation in bladder cancer cell lines.	3		5.37 e ⁻⁶
module_2 [378]	Genes in module_2	5		9.45 e ⁻⁶
RICKMAN_HEAD_AND_NECK_CANCER_F [55]	Cluster f: genes identifying an intrinsic group in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC).	3		1.06 e ⁻⁵
RIGGI_EWING_SARCOMA_PROGENITOR_DN [187]	Genes down-regulated in mesenchymal stem cells (MSC) engineered to express EWS-FLI1 [Gene ID=2130, 2321] fusion protein.	4		1.27 e ⁻⁵
module_117 [706]	Genes in module_117	6		1.33 e ⁻⁵
module_60 [410]	Genes in module_60	5		1.4 e ⁻⁵
KEGG_VIRAL_MYOCARDITIS [73]	Viral myocarditis	3		2.49 e ⁻⁵
YAO_HOXA10_TARGETS_VIA_PROGESTERONE_UP [88]	Genes up-regulated in the uteri of ovariectomized mice 6 h after progesterone [PubChem=5994] injection: HOXA10 [Gene ID=3206] knockout vs wild type animals.	3		4.35 e ⁻⁵
module_11 [526]	Genes in module_11	5		4.6 e ⁻⁵
KANG_IMMORTALIZED_BY_TERT_DN [102]	Down-regulated genes in the signature of adipose stromal cells (ADSC) immortalized by forced expression of telomerase (TERT) [Gene ID=7015].	3		6.76 e ⁻⁵
SMID_BREAST_CANCER_LUMINAL_B_DN [599]	Genes down-regulated in the luminal B subtype of breast cancer.	5		8.51 e ⁻⁵

overlap matrix by gene and geneset	module_88	TGGAAA_V\$NFAT_Q4_01	module_55	module_44	module_6	COLIN_PILOCYTIC_ASTROCYTOMA_VS_GLIOBLA BLASTOMA_UP	module_100	module_137	module_66	WU_SILENCED_BY_METHYLATION_IN_BLADDER_CANCER	module_2	RICKMAN_HEAD_AND_NECK_CANCER_F	RIGGI_EWING_SARCOMA_PROGENITOR_DN	module_117	module_60	KEGG_VIRAL_MYOCARDITIS	YAO_HOXA10_TARGETS_VIA_PROGESTERONE_UP	module_11	KANG_IMMORTALIZED_BY_TERT_DN	SMID_BREAST_CANCER_LUMINAL_B_DN	Gene	Description	
APOD																						s	apolipoprotein D
MME																						s	membrane metallo-endopeptidase (neutral endopeptidase, enkephalinase)
MYH2																						s	myosin, heavy chain 2, skeletal muscle, adult
GREM1																						s	gremlin 1, cysteine knot superfamily, homolog (Xenopus laevis)
CPE																						s	carboxypeptidase E
IFI27																						s	interferon, alpha-inducible protein 27
AQP1																						s	aquaporin 1 (Colton blood group)
FAM107A																						s	family with sequence similarity 107, member A
GSTT1																						s	glutathione S-transferase theta 1
MYH1																						s	myosin, heavy chain 1, skeletal muscle, adult
PRG4																						s	proteoglycan 4
ASPN																						s	asporin (LRR class 1)
CCR1																						s	chemokine (C-C motif) receptor-like 1
ABLIM2																						s	actin binding LIM protein family, member 2
SCRGL1																						s	-
LAMA2																						s	laminin, alpha 2 (merosin, congenital muscular dystrophy)
BDKRB1																						s	bradykinin receptor B1
MYBPH																						s	myosin binding protein H
MMP1																						s	matrix metalloproteinase 1 (interstitial collagenase)
PI16																						s	peptidase inhibitor 16
H19																						s	H19, imprinted maternally expressed untranslated mRNA
CD177																						s	CD177 molecule
XG																						s	Xg blood group
LOC730755																						s	-

Figura 20. Classificação dos genes pertencentes ao grupo C quanto ao processo biológico.

Gene Set Name [# Genes (K)]	Description	# Genes in Overlap (k)	k/K	p value
module_385 [28]	Genes in module_385	3		3.03 e ⁻⁷
LEE_LIVER_CANCER_DENA_UP [59]	Genes up-regulated in hepatocellular carcinoma (HCC) induced by diethylnitrosamine (DENA) [PubChem=5921].	3		2.98 e ⁻⁶
URS_ADIPOCYTE_DIFFERENTIATION_UP [61]	Genes up-regulated in primary adipocytes compared to preadipocytes.	3		3.29 e ⁻⁶
KEGG_PPAR_SIGNALING_PATHWAY [69]	PPAR signaling pathway	3		4.78 e ⁻⁶
SMID_BREAST_CANCER_LUMINAL_A_UP [85]	Genes up-regulated in the luminal A subtype of breast cancer.	3		8.98 e ⁻⁶
NAKAYAMA_SOFT_TISSUE_TUMORS_PCA2_DN [86]	Top 100 probe sets contributing to the negative side of the 2nd principal component; associated with adipocytic differentiation.	3		9.3 e ⁻⁶
KAN_RESPONSE_TO_ARSENIC_TRIOXIDE [129]	Genes changed in U373-MG cells (malignant glioma) upon treatment with arsenic trioxide [PubChem=14888], a chemical that can cause autophagic cell death.	3		3.14 e ⁻⁵
HEPARIN_BINDING [23]	Genes annotated by the GO term GO:0008201. Interacting selectively with heparin, any member of a group of glycosaminoglycans found mainly as an intracellular component of mast cells and which consist predominantly of alternating alpha1-4-linked D-galactose and N-acetyl-D-glucosamine-6-sulfate residues.	2		5.55 e ⁻⁵
SMID_BREAST_CANCER_NORMAL_LIKE_UP [493]	Genes up-regulated in the normal-like subtype of breast cancer.	4		7.66 e ⁻⁵
V\$HNF4_01 [200]	Genes with promoter regions [-2kb,2kb] around transcription start site containing the motif NNNRGNCAAAGKTCANN which matches annotation for HNF4A: hepatocyte nuclear factor 4, alpha	3		1.15 e ⁻⁴

overlap matrix by gene and geneset	module_385	LEE_LIVER_CANCER_DENA_UP	URS_ADIPOCYTE_DIFFERENTIATION_UP	KEGG_PPAR_SIGNALING_PATHWAY	SMID_BREAST_CANCER_LUMINAL_A_UP	NAKAYAMA_SOFT_TISSUE_TUMORS_PCA2_DN	KAN_RESPONSE_TO_ARSENIC_TRIOXIDE	HEPARIN_BINDING	SMID_BREAST_CANCER_NORMAL_LIKE_UP	V\$HNF4_01	Entrez	Source	description
LPL													S lipoprotein lipase
PTN													S pleiotrophin (heparin binding growth factor 8, neurite growth-promoting factor 1)
MDK													S midkine (neurite growth-promoting factor 2)
FABP4													S fatty acid binding protein 4, adipocyte
VCAM1													S vascular cell adhesion molecule 1
PPARG													S peroxisome proliferative activated receptor, gamma
GPM6B													S glycoprotein M6B
NGEF													S neuronal guanine nucleotide exchange factor
DDIT4L													S DNA-damage-inducible transcript 4-like
PREX1													S -
PIP													S prolactin-induced protein
BATF													S basic leucine zipper transcription factor, ATF-like
FNDC1													S fibronectin type III domain containing 1
SAMD11													S sterile alpha motif domain containing 11
NAPRT1													S nicotinate phosphoribosyltransferase domain containing 1

Figura 21. Classificação dos genes pertencentes ao grupo D quanto ao processo biológico.

4.9.2 Análise supervisionada dos dados de microarranjos

4.9.2.1 Análise de expressão diferencial

Uma segunda abordagem foi realizada para aumentar a identificação de genes diferencialmente expressos entre os grupos definidos pela análise de agrupamento hierárquico. Nesta abordagem, foram analisados os dados de razão contra os valores de *p-value*. Na figura 22, gráficos do tipo “Vulcano” foram gerados para sinalizar os genes hiper e hipoexpressos nas comparações descritas na tabela 11.

Figura 22. Gráfico do tipo vulcano mostrando em cor vermelha os genes hiperexpressos e em cor verde os hipoexpressos. Os parâmetros usados foram: razão ≥ 2 do teste “t-Student” com significância estatística de *p-value* ≤ 0.05 .

A tabela 11 descreve o número de genes hiper e hipoexpressos revelados com base na razão e nos valores de p-value definidos anteriormente e representados nos gráficos do tipo “Vulcano” (Figura 22).

Tabela 11. Número de genes hiper e hipoexpressos

Comparações	Expressão Gênica Relativa	
	Hiperexpressos	Hipoexpressos
T0 vs OI-I	206	120
T0 vs OI-III	332	172
T0 vs Controle	316	173
Controle vs OI-I	189	251
Controle vs OI-III	253	235
OI-I vs OI-III	137	101

Figura 23. Perfil de expressão dos genes relacionados à diferenciação adipogênica pertencentes ao grupo D: A. *PPARG*, B. *LPL*, C. *FABP4* e D. *SPON1*.

Na tentativa de identificar outros genes que participam da diferenciação em adipócitos, foi realizada uma busca na lista de genes hiperexpressos das comparações Controle vs MOOI-I e MOOI-III (Tabela 11). Além dos genes *PPAR γ* , *FABP4* e *LPL*, outro gene (*SPON1*) foi identificado com expressão elevada nos pacientes (Figura 23). O gene *PPAR γ* apresentou expressão elevada e crescente nos dois pacientes em relação à amostra MON1 (Figura 23A). No caso do gene *FABP4*, a expressão aumenta durante toda osteogênese do paciente MOOI-III³, enquanto que no paciente com MOOI-I¹, a expressão é reduzida a partir do tempo 12 (T12) de diferenciação (Figura 23C). Diferentemente dos genes *PPAR γ* e *FABP4*, os genes *LPL* e *SPON1* possuem expressão aumentada e crescente apenas no paciente MOOI-III³ (Figura 23B e 23D). Esses resultados sugerem que a manifestação clínica menos grave do paciente MOOI-I¹ pode ser consequência da menor atividade dos genes envolvidos com a adipogênese.

4.10 Uso do PCR em Tempo Real para validação de um conjunto de genes selecionados pela análise de microarranjos

A análise da expressão dos genes selecionados a partir dos dados obtidos dos experimentos de microarranjos foi feita por PCR em Tempo Real. Cada um dos genes selecionados teve sua expressão analisada, confirmando ou não os valores de expressão gênica evidenciados nos experimentos de microarranjos. Além disso, as mesmas análises foram realizadas para o gene *OPG*, devido a sua potencial importância relacionada à regulação do balanço entre osteogênese e osteoclastogênese. Nove dos genes analisados apresentaram resultados que corroboraram os dados obtidos nos experimentos de microarranjos: *CAV1*, *RGC32*, *MFAP4*, *DPT*, *TGFBR2*, *RECK*, *ADM*, *ADA* e *OPG*. Além disso, os genes *SFRP1* e *APOE* também mostraram diferença na expressão entre as amostras, porém de forma menos evidente. Os gráficos da figura 24 mostram os resultados dessas análises e a tabela apêndice D indica quais os genes que tiveram sua expressão confirmada.

A expressão dos controles endógenos *GAPDH*, *HPRT* e *TUBA* foi analisada pelo software *BestKeeper* para escolher o normalizador mais adequado para a análise de expressão dos genes selecionados para validação. A tabela 12 mostra o resultado gerado pelo software apontando o gene *GAPDH* como o melhor normalizador, já que possui o menor desvio padrão entre as amostras analisadas.

Tabela 12. Análise Pair-wise de correlação e regressão do BestKeeper.

Índices (CP)	GAPDH	HPRT	TUBA
N	28	28	28
Geo. Mean	16,23	25,90	19,07
Ar. Mean	16,26	25,92	19,10
Min.	14,80	23,78	17,40
Max.	20,19	28,99	21,96
Std. Dev.	0,75	0,79	0,83
CV (%)	4,64	3,06	0,83

N: número de amostras; Geo. Mean: média geométrica; Ar. Mean: média aritmética; Min.: valor mínimo; Max.: valor máximo; Std. Dev.: desvio padrão; CV: coeficiente de variação.

Figura 24. Gráficos das análises da expressão dos genes selecionados ao longo da diferenciação osteoblástica nas amostras de doadores normais e de pacientes portadores de Osteogênese Imperfeita.

Figura 24. Gráficos das análises da expressão dos genes selecionados ao longo da diferenciação osteoblástica nas amostras de doadores normais e de pacientes portadores de Osteogênese Imperfeita (continuação).

Figura 24. Gráficos das análises da expressão dos genes selecionados ao longo da diferenciação osteoblástica nas amostras de doadores normais e de pacientes portadores de Osteogênese Imperfeita (continuação).

4.11 Análise da expressão das isoformas do gene *PLOD2* por RT-PCR

O gene *PLOD2* possui duas isoformas com expressão variável em diferentes tecidos. A expressão de ambas isoformas foi detectada: a primeira codifica uma proteína composta por 737 aminoácidos e a segunda, cuja expressão já foi descrita em fibroblastos humanos, codifica uma proteína composta por 758 aminoácidos. Destes, 21 são codificados por um exon adicional, denominado 13A.

Ambas as variantes, denominadas LH2b (+ exon 13A) e LH2a, foram amplificadas nas amostras das mesenquimais indiferenciadas e durante a diferenciação osteogênica de doadores normais e pacientes portadores de OI. Estes resultados correspondem à primeira evidência da expressão diferencial das isoformas durante um processo de diferenciação. No entanto, em pacientes portadores de Osteogênese Imperfeita clássica somente a expressão da isoforma LH2b foi detectada (Figura 25). A única exceção é observada na fase final da diferenciação (T12, T17 e T21), onde a expressão das duas isoformas é registrada (Figura 25).

Figura 25: RT-PCR das isoformas LH2a e LH2b do gene *PLOD2*. MOOI-I, paciente com OI do tipo I; MOOI-III, paciente com OI do tipo III; BS: Síndrome de Bruck; MON: medula óssea de controle sadio.

4.12 Análise da expressão do miR-29b

As evidências recentes do papel do miR-29b na modulação da expressão do gene *COL1A1* e a ausência de investigações relacionadas a esse tipo de regulação durante a osteogênese de pacientes com Osteogênese Imperfeita foram fatores determinantes para a inclusão desta análise no presente trabalho.

Curiosamente, a expressão do miR-29b e do gene *COL1A1* se mostraram reduzidas na Osteogênese Imperfeita dos tipos I e III, sugerindo que o miR-29b não possui o *COL1A1* como alvo durante a osteogênese. Novamente, os níveis de expressão observados para a amostra MOOI-III⁵ são semelhantes aos observados para amostras normais.

Figura 26. Gráficos das análises da expressão do miR-29b e do gene *COL1A1* ao longo da diferenciação osteoblástica nas amostras de doadores normais e de pacientes portadores de Osteogênese Imperfeita.

5. DISCUSSÃO

Os recentes estudos envolvendo as CTMs certamente possibilitaram diversos avanços na pesquisa e na área médica. Em particular, os estudos envolvendo expressão gênica de células indiferenciadas e em processos de diferenciação tem auxiliado na compreensão desses processos que são fundamentais para o aprofundamento das pesquisas experimentais e clínicas. Com o aumento do conhecimento, aumentam também as possibilidades de interferências bem-sucedidas relacionadas a uma determinada doença. No caso da Osteogênese Imperfeita, no entanto, não há estudos relacionados à expressão gênica ou mesmo envolvendo as CTMs desses pacientes que possam explicar, por exemplo, a heterogeneidade que é observada na doença. Embora alguns estudos clínicos envolvendo essas células já tenham sido desenvolvidos com sucesso, um maior investimento nas pesquisas relacionadas à doença aumentaria também a chance de sucesso no desenvolvimento de terapias.

Aparentemente, os pacientes portadores de Osteogênese Imperfeita possuem um menor número de CTMs na medula óssea, como sugerido pelo menor número de CFU-F observadas em quatro das cinco amostras coletadas. Embora essas diferenças possam ser observadas mesmo em amostras normais, não é comum um número de CFU-F tão inferior e a ocorrência na maioria das amostras coletadas de pacientes reforça essa observação. O número menor de CTMs existentes na medula dos pacientes, no entanto, aparentemente não interfere no isolamento e desenvolvimento das CTMs coletadas. Em todos os casos, as células mesenquimais isoladas das amostras de medula coletadas dos pacientes se desenvolveram bem e sem intercorrências. Foram realizadas todas as etapas necessárias a caracterização de células mesenquimais e características como morfologia, aderência, perfil imunofenotípico e potencial de diferenciação foram semelhantes ao observado para amostras de doadores normais.

A triagem de mutações nos genes *COL1A1* e *COL1A2* possibilitou a descrição de oito mutações, sendo quatro delas provavelmente responsáveis pela ocorrência doença e pelo fenótipo observado nos pacientes.

Os achados estão de acordo com dados da literatura que descrevem que a ocorrência de mutações do tipo *frameshift* ou que levam a geração de um “*stop códon*” (códon de terminação) prematuro corresponderiam a fenótipos menos agressivos da doença. Já as formas mais graves seriam causadas por mutações em que o aminoácido glicina é substituído por outro aminoácido, em geral de maior estrutura, levando a desestabilização da molécula do colágeno, que é rapidamente degradada. Vale ressaltar que nenhuma das mutações aqui descritas estava contemplada na literatura, sendo, portanto novas mutações, contribuindo para aumentar o conhecimento sobre a base molecular da Osteogênese Imperfeita. A descrição de novas mutações é muito importante para se estabelecer associações entre o tipo de mutação e a manifestação clínica da doença. Por exemplo, a localização da mutação no gene em relação à gravidade da doença, que ainda não está bem esclarecida, poderia facilitar a compreensão da grande heterogeneidade observada na doença. É nesse contexto que acontece a primeira peculiaridade relacionada a um dos pacientes incluídos na pesquisa, que é portador da Síndrome de Bruck.

5.1 Caracterização molecular da Síndrome de Bruck (SB)

A SB é uma desordem muito rara caracterizada por Osteogênese Imperfeita aliada a artrogriposis multiplex congênita. Nesta doença, a fragilidade óssea está associada à pterigia e a contraturas dos ligamentos. Em geral, as contraturas e deformidades são responsáveis pela baixa estatura, mas é comum a existência de dentinogênese e inteligência normais (Ha-Vinh, Alanay et al. 2004). Há pouquíssimos relatos de caso na literatura e a grande maioria deles não detectou anormalidades na síntese de colágeno tipo I e II, como encontradas nos indivíduos portadores de OI (Mokete, Robertson et al. 2005).

Em nosso trabalho, os resultados não foram diferentes e nenhuma mutação que pudesse explicar o fenótipo observado foi detectada nos

genes codificadores do colágeno. Foram encontradas apenas mutações silenciosas, que não provocam alterações na sequência de aminoácidos da proteína codificada e que, aparentemente, não seriam as causadoras da doença.

As recentes evidências de que a SB seria causada por mutações no gene *PLOD2* (*procollagen telopeptide lysine hydroxylase*), uma proteína diretamente envolvida no processamento pós-traducional do colágeno, nos levaram a investigar também a região codificadora deste gene. Há relatos na literatura que descrevem a associação de mutações nesse gene com a SB, originando a Síndrome de Bruck tipo II, mas as características clínicas e radiográficas associadas não foram descritas em detalhes. Em outro estudo, uma família mostrou evidências de ligação da doença ao cromossomo 17, descrita como SB tipo I (Bank, Robins et al. 1999). Em nosso trabalho, nenhuma mutação foi encontrada no gene *PLOD2*, tornando obscura a caracterização molecular da SB do paciente. É possível que esse paciente apresente alguma relação com os achados de Bank, Robins et al. (1999), porém também não se pode descartar a possível ocorrência de mutações em outros genes importantes para o processamento do colágeno, como o *CRTAP* e o *LEPRE1* (Baldrige, Schwarze et al. 2008). Seria interessante analisar também o padrão de expressão gênica global deste paciente durante a osteogênese em relação a uma amostra de medula óssea de controle sadio. A avaliação da dinâmica alterada de expressão de alguns genes no paciente com SB pode indicar quais vias gênicas são afetadas no paciente e, conseqüentemente, identificar um ou vários candidatos que possam explicar a base molecular do paciente portador de SB em nosso estudo.

5.2 Análise da expressão de genes que atuam na osteogênese

No que se refere à análise da expressão de genes relacionados ao fenótipo osteoblástico, ficou evidente a menor expressão de genes importantes como *MSX2*, *VDR*, *COL1A1*, *SPARC* e *BGLAP* de células mesenquimais indiferenciadas e durante o processo de diferenciação nas amostras provenientes dos pacientes portadores de OI. A menor expressão

destes genes sugere um menor comprometimento das células progenitoras desses pacientes com a linhagem osteoblástica.

5.3 Análise dos dados de microarranjos

Ainda em relação à expressão gênica, a análise dos dados obtidos nos experimentos de microarranjos indica a expressão diferencial de outros genes, com as mais variadas funções. Dos 16 genes selecionados e avaliados, 11 tiveram a expressão diferencial confirmada por PCR quantitativo em tempo real: *CAV1*, *C13orf15* (*RGC32*), *MFAP4*, *DPT*, *TGFBR2*, *SFRP1*, *APOE*, *RECK*, *ADM*, *OPG* e *ADA*. A seguir, será apresentada uma breve descrição dos genes supracitados na tentativa de relacionar sua expressão diminuída com a Osteogênese Imperfeita. Uma maior atenção será dada aos genes *CAV1*, *OPG* e *ADA*.

CAV1 (caveolin 1, caveolae protein, 22kDa): O gene *CAV1* codifica proteína responsável pela ligação de subunidades de integrina à tirosina quinase FYN, um passo inicial na via RAS, promovendo a progressão do ciclo celular. O gene possui duas isoformas, com expressões diferentes (Nohe, Keating et al. 2005). Além disso, esta proteína está envolvida na formação de estruturas chamadas balsas lipídicas, relacionadas à emissão de sinais intracelulares que controlam a homeostasia esquelética e camundongos *knockout* para este gene teriam ossos mais rígidos e menos maleáveis (Rubin, Schwartz et al. 2007). Além disso, teriam mais resposta dos osteoprogenitores em relação aos estímulos para diferenciação e proliferação celular descontrolada. Alguns trabalhos sugerem que a diferenciação osteoblástica seja regulada por sinais que são transmitidos por estruturas (caveolae) formadas essencialmente por esta proteína e que a quantidade desta proteína nas vesículas secretadas aumenta durante a diferenciação osteogênica (Sawada, Taketani et al. 2007), de forma que a supressão do gene diminuiria a calcificação.

C13orf15/RGC32 (chromosome 13 open reading frame 15): Acredita-se que o gene *RGC32* regule a progressão do ciclo celular. Esta

proteína é induzida por *p53* em resposta ao dano ao DNA ou por níveis de proteínas do sistema complemento que resultam na ativação do ciclo celular. Para determinar o mecanismo de regulação desta proteína, foram usados inibidores de moléculas que estimulam a via $TGF\beta$ e não houve bloqueio da expressão. Somente usando uma proteína Smad4 em que o domínio de ativação estava deletado é que se conseguiu a inibição completa de *RGC32*, sugerindo que esse gene seja regulado pela via Smad (Huang, Li et al. 2009). Nesse mesmo trabalho, os pesquisadores bloquearam e aumentaram a expressão deste gene para avaliar o impacto sobre proteínas da matriz extracelular. O bloqueio do gene diminuiu a expressão de colágeno e de fibronectina e a expressão do gene aumentou a expressão dos dois, indicando que este gene possui um papel importante na produção da matriz extracelular, porém o trabalho não foi realizado com osteoblastos, e sim com miofibroblastos convertidos a partir de células do túbulo renal.

MFAP4 (microfibrillar-associated protein 4): O gene *MFAP4* codifica uma proteína que possui sítios de ligação para colágeno e carboidratos. É também uma proteína de matriz extracelular envolvida na adesão celular e interações celulares (Lausen, Lynch et al. 1999).

DPT (dermatopontin): O gene *DPT* codifica uma proteína de matriz extracelular com possível papel na interação célula-matriz e na formação da matriz extracelular. Acredita-se que ela possa modificar o comportamento de $TGF\beta$ por meio de sua interação com outra proteína, a decorina. A expressão deste gene aumenta durante a diferenciação osteoblástica e este aumento seria induzido pela expressão de *VDR*. A transfecção de células mesenquimais com siRNA inibidores de *DPT* e *HRH1* diminuiu a atividade de mineralização destas células, demonstrando a relação deste gene com a formação óssea (Pochampally, Ylostalo et al. 2007).

TGFBR2 (transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa): O *TGFBR2* codifica uma proteína transmembrana que forma complexos com outras proteínas receptoras e se liga a $TGF\beta$. Esse complexo então fosforila proteínas que entram no núcleo e regulam a transcrição de uma

série de genes relacionados à proliferação celular. Mutações nesse gene têm sido associadas à Síndrome de Marfan, uma doença do tecido conjuntivo, em que os pacientes apresentam ossos alongados e problemas cardíacos além do desenvolvimento de muitos tipos de tumores (Kirmani, Tebben et al.).

SFRP1 (secreted frizzled-related protein 1): Sfrps são inibidores da via Wnt , embora algumas proteínas desta classe não o façam e possuam ainda funções desconhecidas. Muitas Sfrps encontram-se expressas no tecido esquelético e afetam diretamente o desenvolvimento ósseo. Há evidências de que a proteína codificada pelo gene *SFRP1* seja um regulador negativo da formação óssea em vertebrados e sua deleção diminuiria a apoptose de células osteoblásticas (Westendorf, Kahler et al. 2004).

APOE (apolipoprotein E): a proteína APOE é um componente estrutural das partículas lipoproteicas ricas em triglicerídeos. Embora sua expressão tenha sido observada em osteoblastos e alguns estudos tenham mostrado que este gene é importante para o risco de fraturas ósseas, outros trabalhos não confirmaram essa relação. Há evidências, porém, de que a deficiência na expressão deste gene aumente a redução da formação óssea que é induzida por uma dieta rica em gorduras, pelo estímulo da apoptose de células osteoblásticas (Hirasawa, Tanaka et al. 2007).

RECK (reversion-inducing-cysteine-rich protein with kazal motifs): O gene RECK codifica uma proteína extracelular cuja expressão é fortemente suprimida em muitos tumores e células transformadas. Em células normais, essa proteína ancorada a membrana celular, serve como um regulador negativo da matriz-metaloproteinase 9, uma enzima envolvida na invasão tumoral e metástase. Há evidências de que este gene está envolvido no remodelamento da matriz extracelular durante a diferenciação osteoblástica modulando a atividade de metaloproteinases de matriz (Zambuzzi, Yano et al. 2009).

ADM (adrenomedullin): A adrenomedulina, uma proteína codificada pelo gene ADM, parece ter sua menor expressão relacionada à fragilidade óssea observada em pacientes com osteoporose (Hopwood, Tsykin et

al. 2009).

TNFRSF11B/OPG (tumor necrosis factor receptor superfamily, member 11b): O osso é um órgão complexo e com múltiplas funções. Além de fornecer integridade estrutural ao corpo, é também o sítio da hematopoiese e depósito de cálcio. Já são conhecidas as relações íntimas entre o osso e o sistema imunológico e, para serem compreendidos em suas funções, ambos devem ser visualizados como um único sistema integrado. Um dos exemplos de interação entre esses dois sistemas é a regulação da atividade de osteoblastos e osteoclastos mediados por fatores solúveis do sistema imunológico como citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento (Lorenzo, Horowitz et al. 2008). O $TNF\alpha$, por exemplo, inibe a diferenciação dos osteoblastos, e IL-1 e IFN- γ são descritos como inibidores da síntese de colágeno (Onoe, Miyaura et al. 1996) (Lind, Deleuran et al. 1995). IL4 foi descrito como um estimulador da proliferação e inibidor da diferenciação osteoblástica, diminuindo a formação óssea (Ura, Morimoto et al. 2000).

A produção de citocinas inflamatórias pelas células do sistema imunológico e a subsequente indução da formação osteoclástica e reabsorção óssea mediada por *RANKL* tem sido associada a doenças humanas, como no caso da artrite reumatóide (Lorenzo, Horowitz et al. 2008).

A interação entre os produtos dos genes *RANK*, *RANKL* e *OPG* é determinante na regulação dos processos de formação e reabsorção óssea. As células precursoras osteoblásticas se proliferam e expressam *RANK* quando estimuladas. Nos casos em que a osteoclastogênese é estimulada, os osteoblastos expressam relativamente mais *RANKL* que *OPG*, facilitando a ligação de *RANKL* a *RANK*, que é sinal crítico para a diferenciação de osteoclastos maduros a partir de células precursoras. No caso da Osteogênese Imperfeita, a atividade osteoclástica seria afetada pela estrutura óssea fraca, causada pela quantidade diminuída de colágeno ou pela rápida degradação das moléculas instáveis, iniciando um ciclo de remodelamento ósseo na tentativa de formar uma matriz óssea mais forte. Esse aumento da atividade osteoclástica em detrimento do correto amadurecimento dos osteoblastos, já evidenciados em

modelos murino (Li, Jiang et al.); (Kalajzic, Terzic et al. 2002); (Uveges, Collin-Osdoby et al. 2008); (Zhang, Doty et al. 2007) e humano (Iwamoto, Takeda et al. 2002), por sua vez, levaria ao aumento da secreção de citocinas inflamatórias que regulam a função imunológica e que estariam envolvidas no remodelamento ósseo, promovendo um processo inflamatório no microambiente ósseo (Li, Jiang et al.); (Kon, Cho et al. 2001). Este aumento do recrutamento osteoclástico também pode ser sugerido pelas análises realizadas nesse trabalho, que evidenciam uma expressão reduzida dos níveis de RNA mensageiro do gene *OPG*, direcionando o sistema em favor do estímulo para produção osteoclástica.

Neste contexto, a expressão diminuída do gene *ADA* seria uma tentativa de conter esse processo inflamatório instalado. Níveis elevados de adenosina são produzidos por osteoprogenitores e outras células da medula óssea e seu efeito antiinflamatório sob condições de estresse celular já é estabelecido (Kuno, Seki et al. 2006).

ADA (Adenosina Deaminase): A *ADA* é uma enzima importante no metabolismo de purinas que catalisa a deaminação irreversível de adenosina em inosina. Assim, trabalhos mostram que o tratamento de células com inibidores da *ADA* potencializam o efeito antiinflamatório da adenosina (Kuno, Seki et al. 2006); (Antonioli, Fornai et al. 2007). Assim, a diminuição da expressão do gene *ADA* observada em nossos pacientes, seria um mecanismo protetor do osso contra a atividade osteoclástica gerada pelo aumento do processo de reparação óssea, na tentativa de coordenar uma resposta compensatória dos osteoblastos na síntese de matriz óssea e assim, restabelecer a homeostase óssea.

De uma forma geral, grande parte dos genes avaliados e que tiveram sua expressão diferencial validada estão relacionados à diminuição da diferenciação, secreção de componentes da matriz óssea e regulação da proliferação celular, ou seja, estão diretamente relacionados a fatores essenciais para a formação e desenvolvimento do ambiente ósseo. A diminuição da expressão destes genes nos pacientes, evidenciada pela primeira vez neste estudo, pode indicar um comprometimento da formação e mineralização da

matriz óssea com maior impacto que a diminuição da quantidade de colágeno.

5.4 Avaliação dos dados de microarranjos

O resultado da análise revelou a presença de genes que são críticos para a diferenciação de osteócitos (*APOD*, grupo C) e principalmente para diferenciação adipogênica (*LPL*, *FBP4* e *PPAR γ* , grupo D). Curiosamente, o gene *APOD*, que é um dos genes importantes para a diferenciação osteogênica, apresentou expressão diminuída nos pacientes. No caso dos genes *LPL* e *FBP4*, importantes durante toda adipogênese, observou-se uma expressão elevada nos pacientes. Esse resultado é indício forte da ocorrência de desvio para a adipogênese nos dois pacientes com OI avaliados, mesmo que o estímulo seja para diferenciação osteogênica. Esta observação é reforçada pela expressão também elevada do gene *PPAR γ* (grupo D) nas amostras de pacientes. Este gene, quando ativado, é o gatilho que dispara o início da adipogênese.

Análises mais refinadas dos dados gerados nos experimentos de *microarranjos* permitiram uma melhor observação das variações na expressão gênica entre amostras normais e de pacientes com OI. Foram observados conjuntos de genes diferencialmente expressos entre os grupos de amostras. Um exemplo que merece destaque é o de um conjunto de genes cuja expressão encontra-se aumentada nos pacientes com OI. Esse grupo engloba genes importantes para o processo de diferenciação adipogênica, como os genes *FABP4*, *LPL* e *PPAR γ* .

A ligação entre as vias de diferenciação adipogênica e osteogênica já foi descrita por alguns autores (Liu, Martina et al. 2007) e acredita-se que grande parte desta ligação envolve perfis de expressão de vários genes, principalmente fatores de transcrição. Um desses fatores, o *PPAR γ* , é descrito como o principal regulador da adipogênese e sua expressão em diversos tipos celulares pode levar a diferenciação em adipócitos (Takada, Kouzmenko et al. 2009). A transfecção de células fibroblásticas com *PPAR γ* e sua ativação mostraram-se suficientes para iniciar a adipogênese (Tontonoz, Hu et al. 1994).

Além disso, mioblastos sem potencial adipogênico puderam ser induzidos à transdiferenciação em adipócitos maduros pela expressão ectópica de dois fatores de transcrição adipogênicos: o *PPAR γ* e o *CCAAT/enhancer-binding protein-alpha*, sugerindo que uma mudança entre tipos celulares especializados possa ser controlada pela expressão de fatores de transcrição chave (Hu, Tontonoz et al. 1995). Além disso, um número considerável de trabalhos relata que o *PPAR γ* teria um efeito anti-osteoblastogênico, inibindo a osteogênese. Por exemplo, ligantes endógenos para o *PPAR γ* promoveram a adipogênese e inibiram a osteogênese em células mesenquimais isoladas de medula óssea. Também foram observados efeitos semelhantes *in vivo*, quando o tratamento de camundongos com rosiglitazone (Ali, Weinstein et al. 2005) resultou em adiposidade aumentada da medula óssea e densidade mineral óssea diminuída aparentemente devido a supressão de fatores de transcrição osteoblásticos como Runx2, Osx de Dlx5 (Ali, Weinstein et al. 2005); (Rzonca, Suva et al. 2004). Coletivamente, esses estudos sugerem que o *PPAR γ* seja um estimulador da adipogênese e um inibidor da osteogênese. Entretanto, os mecanismos de supressão da osteogênese pelo *PPAR γ* ainda não são conhecidos.

Uma das proteínas conhecidamente suprimidas pela ativação de *PPARG* é a osteocalcina (Lecka-Czernik, Gubrij et al. 1999); (Jackson and Demer 2000), codificada pelo gene *BGLAP*, cuja expressão reduzida foi observada nos pacientes portadores de OI e já discutida neste trabalho. Sua expressão é altamente restrita aos osteoblastos dos ossos e dos odontoblastos (McKee, Glimcher et al. 1992). O controle transcricional da expressão deste gene tem sido extensivamente estudado e atualmente acredita-se que haja dois tipos diferentes de regulação: uma hormonal, mediada pela vitamina D e uma tecido-específica (Demay, Roth et al. 1989), mediada pelo elemento responsivo a glicocorticóide (Morrison, Shine et al. 1989).

Relata-se ainda que o *PPAR γ* possua também uma nova função, na osteoclastogênese (Wan, Chong et al. 2007). Neste trabalho, a ativação de *PPARG* acelerou a diferenciação osteoclástica e a reabsorção óssea em camundongos de uma maneira dependente da dose da expressão de *PPARG*,

sugerindo uma ligação entre *PPARG* e *RANKL*.

Assim, nossos dados sugerem além da diminuição do comprometimento das células mesenquimais dos pacientes com OI com a linhagem osteogênica e do aumento da atividade ou do número de osteoclastos, um direcionamento da diferenciação das células mesenquimais em adipócitos, em detrimento à diferenciação osteogênica. É possível, portanto, que as mutações nos genes do colágeno, observadas em todos os pacientes, com exceção do paciente MOOI-III⁵ (Síndrome de Bruck), proporcionem o desencadeamento de uma série de alterações na expressão gênica que terminem provocando um desequilíbrio entre os três tipos celulares no microambiente ósseo. O aprofundamento deste tipo de estudo pode levar ao desenvolvimento de terapias alternativas que reduzam essa diferenciação adipogênica acentuada, aumentando o número de células que se diferenciam em osteoblastos, utilizando, por exemplo, a melatonina, que já foi testada em experimentos *in vitro* e mostrou inibição da adipogênese e aumento na osteogênese nas células estudadas (Zhang, Su et al.).

5.5 Regulação do COL1A1 pelo miR-29b

Outra observação importante é a de que a expressão de miR-29b e seu potencial alvo *COL1A1* está severamente reduzida nas amostras dos pacientes portadores de OI, sugerindo que a expressão de miR-29b não seja fundamental para a diferenciação osteogênica. Aparentemente, o mecanismo através do qual o miR-29b regula o acúmulo de colágeno durante a fase de mineralização é dependente da quantidade de RNA mensageiro do gene *COL1A1*. Assim, os baixos níveis observados nas amostras de pacientes não seriam suficientes para a indução deste microRNA. O padrão de expressão de microRNAs em células mesenquimais é distinto do observado em células pluripotentes e populações específicas de microRNAs são reguladas nas células mesenquimais durante a diferenciação em tipos celulares específicos. A compreensão de fatores regulatórios e de moléculas envolvidos na manutenção

do fenótipo indiferenciado das células mesenquimais ou que sejam fundamentais para os diversos processos de diferenciação permitiriam o desenvolvimento de melhores metodologias para a expansão destas células para fins terapêuticos.

É possível que sinais extracelulares contribuam para a regulação de microRNAs (Goff, Boucher et al. 2008) durante a diferenciação e uma das hipóteses que pode ser levantada é a de que a quantidade de colágeno secretada poderia ser um destes sinais extracelulares. Os dados obtidos na amostra do paciente portador de SB mostraram perfis de expressão de miR-29b e *COL1A1* semelhantes as amostras normais. Outros estudos descreveram a secreção normal de colágeno em três famílias portadoras de SB em que mutações nos genes *COL1A1* e *COL1A2* não foram encontradas (Breslau-Siderius, Engelbert et al. 1998). Os níveis aparentemente normais de miR-29b e *COL1A1* e a ausência de mutações patogênicas nos genes *COL1A1* e *COL1A2* são evidências de que a expressão de miR-29b pode estar associada ao nível de expressão de *COL1A1*.

5.6 Regulação das isoformas do gene *PLOD2*

Ainda em relação ao paciente portador de SB, a ausência de informações relacionadas à expressão do gene *PLOD2* motivou a análise da expressão deste gene por RT-PCR. Células indiferenciadas foram descritas como tendo baixa expressão deste gene, mas osteoblastos completamente diferenciados exibiram um nível significativamente elevado de RNA mensageiro de *PLOD2*, sugerindo uma associação entre a expressão de *PLOD2* e padrões de ligação ao colágeno tecido-específico, importantes no início da mineralização (Uzawa, Grzesik et al. 1999). A biosíntese do colágeno é um processo longo e complicado que envolve um grande número de modificações após a tradução. A hidroxilação de resíduos específicos de lisina é um fator crítico para a glicosilação e ligação das moléculas de colágeno e é realizada por enzimas, entre as quais a codificada pelo gene *PLOD2*. Esses padrões de hidroxilação aparentemente

podem variar de um tecido para outro e estudos mostram que a hidroxilação excessiva ocorre em doenças ósseas. Há estudos mostrando a expressão das duas isoformas de *PLOD2* em leucócitos de pacientes portadores de SB, mas não se tem notícia da expressão das duas isoformas de *PLOD2* em células mesenquimais indiferenciadas e durante a diferenciação de pacientes portadores de SB mostrada neste trabalho.

Todas as evidências descritas tanto no que se refere à comparação de amostras de pacientes portadores de OI em relação a amostras normais, quanto à comparação das amostras de OI com a amostra proveniente do paciente portador de SB sugerem que há muitos outros fatores envolvidos na alteração das características e mineralização ósseas observadas nos pacientes portadores da doença. Assim, muitos outros estudos serão necessários até que se compreendam melhor todos os mecanismos e alterações responsáveis pelo fenótipo tão variável característico da doença.

6. CONCLUSÕES

- As alterações genéticas nos pacientes portadores de Osteogênese Imperfeita vão além das mutações encontradas nos genes *COL1A1* e *COL1A2*;
- Existem alterações na expressão de genes relacionados à osteogênese, incluindo os genes específicos de osteoblastos, que apresentam expressão diminuída durante a diferenciação de CTMs de pacientes portadores de Osteogênese Imperfeita;
- Há evidências de que haja também nestes pacientes um recrutamento acentuado de osteoclastos, células que realizam a reabsorção óssea, indicado pela diminuição da expressão do gene *OPG*, decisivo para o controle deste processo;
- Há ainda evidências de que haja um aumento da diferenciação de CTMs em adipócitos em detrimento da diferenciação osteogênica, sugerido pelo aumento da expressão de fatores de transcrição importantes para o desencadeamento da diferenciação adipogênica;
- Aparentemente, todas essas alterações estão de alguma forma, relacionadas a mutações nos genes *COL1A1* e *COL1A2*, já que o paciente portador de Osteogênese Imperfeita e Síndrome de Bruck, que não teve mutações identificadas nesses genes, apresentou perfil de expressão gênica semelhante a amostras normais;
- Outros mecanismos de controle da expressão gênica também parecem estar alterados, como o demonstrado para o miR-29b;
- Estas alterações da expressão gênica podem estar relacionadas à heterogeneidade fenotípica encontrada nos pacientes;

7. REFERÊNCIAS

- Ali, A. A., R. S. Weinstein, et al. (2005). "Rosiglitazone causes bone loss in mice by suppressing osteoblast differentiation and bone formation." Endocrinology **146**(3): 1226-35.
- Antonioli, L., M. Fornai, et al. (2007). "Inhibition of adenosine deaminase attenuates inflammation in experimental colitis." J Pharmacol Exp Ther **322**(2): 435-42.
- Baldrige, D., U. Schwarze, et al. (2008). "CRTAP and LEPRE1 mutations in recessive osteogenesis imperfecta." Hum Mutat **29**(12): 1435-42.
- Bank, R. A., S. P. Robins, et al. (1999). "Defective collagen crosslinking in bone, but not in ligament or cartilage, in Bruck syndrome: indications for a bone-specific telopeptide lysyl hydroxylase on chromosome 17." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(3): 1054-8.
- Bobis, S., D. Jarocha, et al. (2006). "Mesenchymal stem cells: characteristics and clinical applications." Folia Histochem Cytobiol **44**(4): 215-30.
- Breslau-Siderius, E. J., R. H. Engelbert, et al. (1998). "Bruck syndrome: a rare combination of bone fragility and multiple congenital joint contractures." J Pediatr Orthop B **7**(1): 35-8.
- Campagnoli, C., I. A. Roberts, et al. (2001). "Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow." Blood **98**(8): 2396-402.
- Cheung, M. S. and F. H. Glorieux (2008). "Osteogenesis Imperfecta: update on presentation and management." Rev Endocr Metab Disord **9**(2): 153-60.
- Dazzi, F., R. Ramasamy, et al. (2006). "The role of mesenchymal stem cells in haemopoiesis." Blood Rev **20**(3): 161-71.
- de Jong, D. S., B. L. Vaes, et al. (2004). "Identification of novel regulators associated with early-phase osteoblast differentiation." J Bone Miner Res **19**(6): 947-58.
- Demay, M. B., D. A. Roth, et al. (1989). "Regions of the rat osteocalcin gene which mediate the effect of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on gene transcription." J Biol Chem **264**(4): 2279-82.
- Devine, S. M. and R. Hoffman (2000). "Role of mesenchymal stem cells in hematopoietic stem cell transplantation." Curr Opin Hematol **7**(6): 358-63.

- Doi, M., A. Nagano, et al. (2002). "Genome-wide screening by cDNA microarray of genes associated with matrix mineralization by human mesenchymal stem cells in vitro." Biochem Biophys Res Commun **290**(1): 381-90.
- Dominici, M., K. Le Blanc, et al. (2006). "Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement." Cytotherapy **8**(4): 315-7.
- Egusa, H., F. E. Schweizer, et al. (2005). "Neuronal differentiation of bone marrow-derived stromal stem cells involves suppression of discordant phenotypes through gene silencing." J Biol Chem **280**(25): 23691-7.
- Forlino, A. and J. C. Marini (2000). "Osteogenesis imperfecta: prospects for molecular therapeutics." Mol Genet Metab **71**(1-2): 225-32.
- Goff, L. A., S. Boucher, et al. (2008). "Differentiating human multipotent mesenchymal stromal cells regulate microRNAs: prediction of microRNA regulation by PDGF during osteogenesis." Exp Hematol **36**(10): 1354-1369.
- Gronthos, S., D. M. Franklin, et al. (2001). "Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells." J Cell Physiol **189**(1): 54-63.
- Ha-Vinh, R., Y. Alanay, et al. (2004). "Phenotypic and molecular characterization of Bruck syndrome (osteogenesis imperfecta with contractures of the large joints) caused by a recessive mutation in PLOD2." Am J Med Genet A **131**(2): 115-20.
- Hirasawa, H., S. Tanaka, et al. (2007). "ApoE gene deficiency enhances the reduction of bone formation induced by a high-fat diet through the stimulation of p53-mediated apoptosis in osteoblastic cells." J Bone Miner Res **22**(7): 1020-30.
- Hopwood, B., A. Tsykin, et al. (2009). "Gene expression profile of the bone microenvironment in human fragility fracture bone." Bone **44**(1): 87-101.
- Horwitz, E. M., P. L. Gordon, et al. (2002). "Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: Implications for cell therapy of bone." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(13): 8932-7.
- Horwitz, E. M., D. J. Prockop, et al. (1999). "Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta." Nat Med **5**(3): 309-13.
- Horwitz, E. M., D. J. Prockop, et al. (2001). "Clinical responses to bone marrow

transplantation in children with severe osteogenesis imperfecta." Blood **97**(5): 1227-31.

Hu, E., P. Tontonoz, et al. (1995). "Transdifferentiation of myoblasts by the adipogenic transcription factors PPAR gamma and C/EBP alpha." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(21): 9856-60.

Huang, J., L. Zhao, et al. "MicroRNA-204 regulates Runx2 protein expression and mesenchymal progenitor cell differentiation." Stem Cells **28**(2): 357-64.

Huang, W. Y., Z. G. Li, et al. (2009). "RGC-32 mediates transforming growth factor-beta-induced epithelial-mesenchymal transition in human renal proximal tubular cells." J Biol Chem **284**(14): 9426-32.

Igura, K., X. Zhang, et al. (2004). "Isolation and characterization of mesenchymal progenitor cells from chorionic villi of human placenta." Cytotherapy **6**(6): 543-53.

in 't Anker, P. S., W. A. Noort, et al. (2003). "Mesenchymal stem cells in human second-trimester bone marrow, liver, lung, and spleen exhibit a similar immunophenotype but a heterogeneous multilineage differentiation potential." Haematologica **88**(8): 845-52.

Iwamoto, J., T. Takeda, et al. (2002). "Increased bone resorption with decreased activity and increased recruitment of osteoblasts in osteogenesis imperfecta type I." J Bone Miner Metab **20**(3): 174-9.

Jackson, S. M. and L. L. Demer (2000). "Peroxisome proliferator-activated receptor activators modulate the osteoblastic maturation of MC3T3-E1 preosteoblasts." FEBS Lett **471**(1): 119-24.

Jiang, Y., B. N. Jahagirdar, et al. (2002). "Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow." Nature **418**(6893): 41-9.

Kalajzic, I., J. Terzic, et al. (2002). "Osteoblastic response to the defective matrix in the osteogenesis imperfecta murine (oim) mouse." Endocrinology **143**(5): 1594-601.

Kapinas, K., C. B. Kessler, et al. (2009). "miR-29 suppression of osteonectin in osteoblasts: regulation during differentiation and by canonical Wnt signaling." J Cell Biochem **108**(1): 216-24.

Kim, Y. J., S. W. Bae, et al. (2009). "miR-196a regulates proliferation and osteogenic differentiation in mesenchymal stem cells derived from human adipose tissue." J Bone Miner Res **24**(5): 816-25.

- Kirmani, S., P. J. Tebben, et al. "Germline TGF-beta receptor mutations and skeletal fragility: a report on two patients with Loeys-Dietz syndrome." Am J Med Genet A **152A**(4): 1016-9.
- Kon, T., T. J. Cho, et al. (2001). "Expression of osteoprotegerin, receptor activator of NF-kappaB ligand (osteoprotegerin ligand) and related proinflammatory cytokines during fracture healing." J Bone Miner Res **16**(6): 1004-14.
- Kulterer, B., G. Friedl, et al. (2007). "Gene expression profiling of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow during expansion and osteoblast differentiation." BMC Genomics **8**: 70.
- Kuno, M., N. Seki, et al. (2006). "Anti-inflammatory activity of non-nucleoside adenosine deaminase inhibitor FR234938." Eur J Pharmacol **534**(1-3): 241-9.
- Lausen, M., N. Lynch, et al. (1999). "Microfibril-associated protein 4 is present in lung washings and binds to the collagen region of lung surfactant protein D." J Biol Chem **274**(45): 32234-40.
- Lecka-Czernik, B., I. Gubrij, et al. (1999). "Inhibition of Osf2/Cbfa1 expression and terminal osteoblast differentiation by PPARgamma2." J Cell Biochem **74**(3): 357-71.
- Li, H., X. Jiang, et al. "Immature osteoblast lineage cells increase osteoclastogenesis in osteogenesis imperfecta murine." Am J Pathol **176**(5): 2405-13.
- Li, Z., M. Q. Hassan, et al. (2009). "Biological functions of miR-29b contribute to positive regulation of osteoblast differentiation." J Biol Chem **284**(23): 15676-84.
- Li, Z., M. Q. Hassan, et al. (2008). "A microRNA signature for a BMP2-induced osteoblast lineage commitment program." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(37): 13906-11.
- Lind, M., B. Deleuran, et al. (1995). "IL-4 and IL-13, but not IL-10, are chemotactic factors for human osteoblasts." Cytokine **7**(1): 78-82.
- Liu, T. M., M. Martina, et al. (2007). "Identification of common pathways mediating differentiation of bone marrow- and adipose tissue-derived human mesenchymal stem cells into three mesenchymal lineages." Stem Cells **25**(3): 750-60.
- Lorenzo, J., M. Horowitz, et al. (2008). "Osteoimmunology: interactions of the

bone and immune system." Endocr Rev **29**(4): 403-40.

Luo, Q., Q. Kang, et al. (2004). "Connective tissue growth factor (CTGF) is regulated by Wnt and bone morphogenetic proteins signaling in osteoblast differentiation of mesenchymal stem cells." J Biol Chem **279**(53): 55958-68.

Makino, S., K. Fukuda, et al. (1999). "Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro." J Clin Invest **103**(5): 697-705.

Marini, J. C., A. Forlino, et al. (2007). "Consortium for osteogenesis imperfecta mutations in the helical domain of type I collagen: regions rich in lethal mutations align with collagen binding sites for integrins and proteoglycans." Hum Mutat **28**(3): 209-21.

McKee, M. D., M. J. Glimcher, et al. (1992). "High-resolution immunolocalization of osteopontin and osteocalcin in bone and cartilage during endochondral ossification in the chicken tibia." Anat Rec **234**(4): 479-92.

Millington-Ward, S., H. P. McMahon, et al. (2005). "Emerging therapeutic approaches for osteogenesis imperfecta." Trends Mol Med **11**(6): 299-305.

Miura, M., S. Gronthos, et al. (2003). "SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(10): 5807-12.

Mokete, L., A. Robertson, et al. (2005). "Bruck syndrome: congenital joint contractures with bone fragility." J Orthop Sci **10**(6): 641-6.

Morrison, N. A., J. Shine, et al. (1989). "1,25-dihydroxyvitamin D-responsive element and glucocorticoid repression in the osteocalcin gene." Science **246**(4934): 1158-61.

Mrugala, D., N. Dossat, et al. (2009). "Gene expression profile of multipotent mesenchymal stromal cells: Identification of pathways common to TGFbeta3/BMP2-induced chondrogenesis." Cloning Stem Cells **11**(1): 61-76.

Nohe, A., E. Keating, et al. (2005). "Dynamics and interaction of caveolin-1 isoforms with BMP-receptors." J Cell Sci **118**(Pt 3): 643-50.

Onoe, Y., C. Miyaura, et al. (1996). "IL-13 and IL-4 inhibit bone resorption by suppressing cyclooxygenase-2-dependent prostaglandin synthesis in osteoblasts." J Immunol **156**(2): 758-64.

Pereira, R. F., K. W. Halford, et al. (1995). "Cultured adherent cells from marrow

can serve as long-lasting precursor cells for bone, cartilage, and lung in irradiated mice." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(11): 4857-61.

Phinney, D. G., G. Kopen, et al. (1999). "Plastic adherent stromal cells from the bone marrow of commonly used strains of inbred mice: variations in yield, growth, and differentiation." J Cell Biochem **72**(4): 570-85.

Pittenger, M. F., A. M. Mackay, et al. (1999). "Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells." Science **284**(5411): 143-7.

Pochampally, R. R., J. Ylostalo, et al. (2007). "Histamine receptor H1 and dermatopontin: new downstream targets of the vitamin D receptor." J Bone Miner Res **22**(9): 1338-49.

Qi, H., D. J. Aguiar, et al. (2003). "Identification of genes responsible for osteoblast differentiation from human mesodermal progenitor cells." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(6): 3305-10.

Roschger, P., N. Fratzl-Zelman, et al. (2008). "Evidence that abnormal high bone mineralization in growing children with osteogenesis imperfecta is not associated with specific collagen mutations." Calcif Tissue Int **82**(4): 263-70.

Rubin, J., Z. Schwartz, et al. (2007). "Caveolin-1 knockout mice have increased bone size and stiffness." J Bone Miner Res **22**(9): 1408-18.

Rzonca, S. O., L. J. Suva, et al. (2004). "Bone is a target for the antidiabetic compound rosiglitazone." Endocrinology **145**(1): 401-6.

Sakai, D., J. Mochida, et al. (2003). "Transplantation of mesenchymal stem cells embedded in Atelocollagen gel to the intervertebral disc: a potential therapeutic model for disc degeneration." Biomaterials **24**(20): 3531-41.

Sato, Y., H. Araki, et al. (2005). "Human mesenchymal stem cells xenografted directly to rat liver are differentiated into human hepatocytes without fusion." Blood **106**(2): 756-63.

Sawada, N., Y. Taketani, et al. (2007). "Caveolin-1 in extracellular matrix vesicles secreted from osteoblasts." Bone **41**(1): 52-8.

Schoolmeesters, A., T. Eklund, et al. (2009). "Functional profiling reveals critical role for miRNA in differentiation of human mesenchymal stem cells." PLoS One **4**(5): e5605.

Sillence, D. O., A. Senn, et al. (1979). "Genetic heterogeneity in osteogenesis imperfecta." J Med Genet **16**(2): 101-16.

- Silva, W. A., Jr., D. T. Covas, et al. (2003). "The profile of gene expression of human marrow mesenchymal stem cells." Stem Cells **21**(6): 661-9.
- Silver, J. D., M. E. Ritchie, et al. (2009). "Microarray background correction: maximum likelihood estimation for the normal-exponential convolution." Biostatistics **10**(2): 352-63.
- Sturn, A., J. Quackenbush, et al. (2002). "Genesis: cluster analysis of microarray data." Bioinformatics **18**(1): 207-8.
- Takada, I., A. P. Kouzmenko, et al. (2009). "Molecular switching of osteoblastogenesis versus adipogenesis: implications for targeted therapies." Expert Opin Ther Targets **13**(5): 593-603.
- Tontonoz, P., E. Hu, et al. (1994). "Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma 2, a lipid-activated transcription factor." Cell **79**(7): 1147-56.
- Tsai, M. S., J. L. Lee, et al. (2004). "Isolation of human multipotent mesenchymal stem cells from second-trimester amniotic fluid using a novel two-stage culture protocol." Hum Reprod **19**(6): 1450-6.
- Ura, K., I. Morimoto, et al. (2000). "Interleukin (IL)-4 and IL-13 inhibit the differentiation of murine osteoblastic MC3T3-E1 cells." Endocr J **47**(3): 293-302.
- Uveges, T. E., P. Collin-Osdoby, et al. (2008). "Cellular mechanism of decreased bone in Brl mouse model of OI: imbalance of decreased osteoblast function and increased osteoclasts and their precursors." J Bone Miner Res **23**(12): 1983-94.
- Uzawa, K., W. J. Grzesik, et al. (1999). "Differential expression of human lysyl hydroxylase genes, lysine hydroxylation, and cross-linking of type I collagen during osteoblastic differentiation in vitro." J Bone Miner Res **14**(8): 1272-80.
- Wakitani, S., T. Goto, et al. (1994). "Mesenchymal cell-based repair of large, full-thickness defects of articular cartilage." J Bone Joint Surg Am **76**(4): 579-92.
- Wan, Y., L. W. Chong, et al. (2007). "PPAR-gamma regulates osteoclastogenesis in mice." Nat Med **13**(12): 1496-503.
- Westendorf, J. J., R. A. Kahler, et al. (2004). "Wnt signaling in osteoblasts and bone diseases." Gene **341**: 19-39.
- Wilkerson, M. D. and D. N. Hayes "ConsensusClusterPlus: a class discovery tool

with confidence assessments and item tracking." Bioinformatics **26**(12): 1572-3.

Xu, W., X. Zhang, et al. (2004). "Mesenchymal stem cells from adult human bone marrow differentiate into a cardiomyocyte phenotype in vitro." Exp Biol Med (Maywood) **229**(7): 623-31.

Young, R. G., D. L. Butler, et al. (1998). "Use of mesenchymal stem cells in a collagen matrix for Achilles tendon repair." J Orthop Res **16**(4): 406-13.

Zambuzzi, W. F., C. L. Yano, et al. (2009). "Ascorbate-induced osteoblast differentiation recruits distinct MMP-inhibitors: RECK and TIMP-2." Mol Cell Biochem **322**(1-2): 143-50.

Zhang, H., S. B. Doty, et al. (2007). "Increased resorptive activity and accompanying morphological alterations in osteoclasts derived from the oim/oim mouse model of osteogenesis imperfecta." J Cell Biochem **102**(4): 1011-20.

Zhang, L., P. Su, et al. "Melatonin inhibits adipogenesis and enhances osteogenesis of human mesenchymal stem cells by suppressing PPARgamma expression and enhancing Runx2 expression." J Pineal Res **49**(4): 364-72.

Zvaifler, N. J., L. Marinova-Mutafchieva, et al. (2000). "Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals." Arthritis Res **2**(6): 477-88.

<http://www.le.ac.uk/ge/collagen/>

Apêndice B

Tabela Apêndice B. Genes relacionados à diferenciação osteogênica selecionados e respectivos valores de expressão obtidos nos experimentos de qRT-PCR.

Gene	Descrição		T0	T1	T2	T7	T12	T17	T21
MSX2	homeobox MSX2	MOOI-I ¹	0.1697	0.1222	0.3652	0.3748	0.0918	0.0621	0.1126
		MOOI-III ²	0.1620	0.1088	0.1991	0.2501	0.1293	0.1767	0.1734
		MOOI-III ³	0.0860	0.0885	0.0938	0.2522	0.0962	0.1169	0.1374
		MOOI-I ⁴	0.1537	0.2597	0.3207	0.3172	0.3367	0.2903	0.4173
		MOOI-III ⁵	4.3319	6.4587	5.7210	6.6628	9.0664	7.5743	17.707
		MON1	1.0000	0.4011	0.3996	0.5814	0.5392	1.0194	1.2350
		MON2	1.0000	4.1937	14.279	5.4488	8.1715	9.3284	82.341
		MON3	1.0000	0.9544	13.148	2.5581	7.8063	4.1468	1.4624
Gene	Descrição		T0	T1	T2	T7	T12	T17	T21
VDR	receptor da vitamina D	MOOI-I ¹	0.1431	0.1198	0.0785	0.0928	0.1395	0.1302	0.1336
		MOOI-III ²	0.0888	0.0624	0.1487	0.2649	0.1388	0.3107	0.4731
		MOOI-III ³	0.0407	0.0374	0.0538	0.0745	0.0779	0.1190	0.1424
		MOOI-I ⁴	0.1080	0.0981	0.1291	0.1282	0.1077	0.2144	0.2343
		MOOI-III ⁵	0.3079	0.2034	0.5425	1.6827	1.3354	1.2844	1.4457
		MON1	1.0000	0.7454	1.0229	2.4188	1.1318	2.4844	5.3556
		MON2	1.0000	0.3997	0.8875	1.0618	3.0747	1.9017	1.2800
		MON3	1.0000	0.7198	1.1277	1.1473	1.0658	3.4277	4.0396
Gene	Descrição		T0	T1	T2	T7	T12	T17	T21
ALPL	fosfatase alcalina	MOOI-I ¹	2.1696	5.2800	8.7062	18.946	15.661	9.8339	9.0290
		MOOI-III ²	1.1939	0.6800	1.4310	9.6718	4.1698	14.977	13.563
		MOOI-III ³	0.0873	0.1757	0.4734	2.8617	3.9162	5.6617	6.8681
		MOOI-I ⁴	1.3356	1.6821	2.0564	5.0913	7.4577	15.728	25.294
		MOOI-III ⁵	0.1473	0.1308	0.7218	16.008	10.235	8.2447	13.002
		MON1	1.0000	1.6212	1.9212	3.4041	3.5651	2.6467	2.3081
		MON2	1.0000	0.3416	1.0193	8.0643	90.854	53.667	51.225
		MON3	1.0000	17.186	18.286	159.87	84.529	263.21	469.25
Gene	Descrição		T0	T1	T2	T7	T12	T17	T21
COL1A1	cadeia alfa 1 do colágeno tipo I	MOOI-I ¹	0.2376	0.2593	0.4811	0.2343	0.0484	0.0151	0.0091
		MOOI-III ²	0.2904	0.2115	0.9650	0.3009	0.1998	0.1654	0.0939
		MOOI-III ³	0.1819	0.2652	0.3100	0.3814	0.1946	0.1258	0.0373
		MOOI-I ⁴	0.1622	0.3798	0.3043	0.2146	0.1686	0.0461	0.0319
		MOOI-III ⁵	0.4561	0.4010	0.7997	1.1391	0.9256	0.5284	0.8952
		MON1	1.0000	1.5565	1.3815	2.0570	1.2864	0.9989	1.0245
		MON2	1.0000	0.8720	0.8209	1.7452	2.1561	1.7573	0.8927
		MON3	1.0000	0.7011	1.0312	1.3461	0.6880	0.1602	0.0744
Gene	Descrição		T0	T1	T2	T7	T12	T17	T21
SPARC	osteonectina	MOOI-I ¹	0.1382	0.1819	0.1954	0.1799	0.0434	0.0288	0.0236
		MOOI-III ²	0.2449	0.2113	0.4476	0.3958	0.1517	0.1044	0.0702
		MOOI-III ³	0.0554	0.1033	0.1491	0.1769	0.1468	0.0602	0.0258
		MOOI-I ⁴	0.1861	0.3897	0.3130	0.2731	0.1910	0.0820	0.0581
		MOOI-III ⁵	0.5770	0.4762	1.4376	2.0791	2.3896	1.8088	1.9051
		MON1	1.0000	0.5816	0.3157	0.6426	0.5217	0.4223	0.5680
		MON2	1.0000	0.7435	2.6196	2.8820	4.8458	3.0462	2.0170
		MON3	1.0000	1.3593	1.6417	2.3774	1.7488	0.6542	0.4343

Gene	Descrição		T0	T1	T2	T7	T12	T17	T21
BGLAP	osteocalcina	MOOI-I ¹	0.1458	0.1335	0.1914	0.1654	0.0771	0.0548	0.0784
		MOOI-III ²	0.0633	0.0698	0.1329	0.0983	0.0475	0.0563	0.0801
		MOOI-III ³	0.1582	0.1101	0.1088	0.1439	0.0978	0.0550	0.0649
		MOOI-I ⁴	0.0672	0.0793	0.0994	0.0864	0.0569	0.0574	0.0789
		MOOI-III ⁵	1.4127	0.9875	2.0470	2.2113	3.0464	2.6184	3.1619
		MON1	1.0000	0.3272	0.4523	0.3673	0.1977	0.3792	0.7252
		MON2	1.0000	1.3993	2.8215	2.3510	2.5532	2.2071	6.5998
		MON3	1.0000	2.0156	3.1029	3.1345	3.0165	2.0298	1.6918
Gene	Descrição		T0	T1	T2	T7	T12	T17	T21
SPP1	osteopontina	MOOI-I ¹	0.0737	0.0826	0.3480	5.0198	1.6784	4.2180	0.8882
		MOOI-III ²	0.3242	0.1275	0.6576	1.0809	0.8939	4.8083	4.7127
		MOOI-III ³	0.3783	0.2050	0.0043	0.0064	0.0317	0.2388	1.0737
		MOOI-I ⁴	0.0781	0.9165	0.1747	0.8204	1.1378	1.7479	0.7767
		MOOI-III ⁵	0.5695	0.2613	0.6848	4.7132	14.937	24.830	21.170
		MON1	1.0000	1.8834	1.0220	1.8867	0.4195	0.2816	3.0536
		MON2	1.0000	0.4528	0.4399	0.8589	4.5027	2.9766	8.9295
		MON3	1.0000	4.2187	4.3885	23.646	68.965	236.68	292.77

Apêndice C

Tabela Apêndice C. Genes selecionados para validação e respectivos valores de expressão obtidos nos experimentos de microarranjos.

Símbolo	Descrição	Expressão	T0	T2	T7	T12	T17	T21
CAV1	Caveolin 1	MON1	65,41	27,33	57,74	45,70	50,39	33,59
		MOOI-I ¹	11,15	21,09	21,17	19,41	22,17	19,91
		MOOI-III ³	14,54	10,56	9,32	17,06	23,78	13,52
Símbolo	Descrição	Expressão	T0	T2	T7	T12	T17	T21
RGC32	Chromosome 13 open reading frame 15	MON1	0,411	90,29	71,63	87,92	89,59	112,7
		MOOI-I ¹	0,557	3,682	19,63	11,96	4,094	6,646
		MOOI-III ³	0,257	2,163	3,234	11,22	11,74	5,544
Símbolo	Descrição	Expressão	T0	T2	T7	T12	T17	T21
MFAP4	Microfibrillar-associated protein 4	MON1	6,876	38,04	38,97	63,80	64,22	96,53
		MOOI-I ¹	12,22	10,94	13,90	6,629	14,40	31,88
		MOOI-III ³	2,532	12,41	45,12	17,47	6,828	19,17
Símbolo	Descrição	Expressão	T0	T2	T7	T12	T17	T21
SFRP1	Secreted frizzled-related protein 1	MON1	36,27	38,73	39,66	38,26	49,33	50,06
		MOOI-I ¹	0,625	2,533	2,723	3,122	2,070	3,631
		MOOI-III ³	0,372	2,036	5,494	4,750	4,493	5,051
Símbolo	Descrição	Expressão	T0	T2	T7	T12	T17	T21
DPT	Dermatopontin	MON1	1,036	18,70	32,27	36,78	40,15	117,6
		MOOI-I ¹	0,187	0,413	1,254	1,415	0,781	1,194
		MOOI-III ³	0,042	0,626	2,952	3,073	1,531	1,157
Símbolo	Descrição	Expressão	T0	T2	T7	T12	T17	T21
TGFB2	Transforming growth factor, beta receptor II	MON1	19,47	32,38	38,80	31,66	35,04	50,17
		MOOI-I ¹	0,179	0,235	0,277	0,539	0,476	0,478
		MOOI-III ³	0,080	0,164	0,163	0,283	0,402	0,385
Símbolo	Descrição	Expressão	T0	T2	T7	T12	T17	T21
RECK	Reversion-inducing-cysteine-rich protein	MON1	12,88	51,47	54,29	36,06	29,33	34,33
		MOOI-I ¹	4,619	10,23	7,145	4,539	5,166	6,424
		MOOI-III ³	3,926	8,285	12,24	9,632	10,41	7,407
Símbolo	Descrição	Expressão	T0	T2	T7	T12	T17	T21
PTGDS	Prostaglandin D2 synthase 21kDa	MON1	0,746	9,982	6,602	7,031	7,252	17,19
		MOOI-I ¹	19,58	30,60	30,14	110,6	82,41	123,04
		MOOI-III ³	5,372	20,69	91,15	68,34	37,52	109,7
Símbolo	Descrição	Expressão	T0	T2	T7	T12	T17	T21
ADM	Adrenomedullin	MON1	94,41	211,5	241,58	195,96	264,7	278,3
		MOOI-I ¹	23,05	44,63	96,24	129,3	83,87	123,0
		MOOI-III ³	8,318	28,57	59,84	57,91	99,70	137,2
Símbolo	Descrição	Expressão	T0	T2	T7	T12	T17	T21
LUM	Lumican	MON1	1,887	6,208	4,648	5,684	3,356	15,77
		MOOI-I ¹	12,37	8,456	4,086	1,850	4,705	6,669
		MOOI-III ³	27,63	9,905	11,70	33,43	26,16	20,37

Símbolo	Descrição	Expressão	T0	T2	T7	T12	T17	T21
APOE	Apolipoprotein E	MON1	0,227	0,364	0,531	0,629	1,666	1,043
		MOOI-I ¹	5,298	4,754	3,784	22,44	10,78	25,47
		MOOI-III ³	5,823	5,069	30,66	13,77	11,16	53,81
Símbolo	Descrição	Expressão	T0	T2	T7	T12	T17	T21
CXCL12	Chemokine (C-X-C motif) ligand 12	MON1	11,84	4,996	2,267	3,027	1,673	1,557
		MOOI-I ¹	71,56	9,629	4,045	2,539	5,947	6,559
		MOOI-III ³	31,80	10,79	16,06	14,06	4,963	6,912
Símbolo	Descrição	Expressão	T0	T2	T7	T12	T17	T21
AGC1	Aggrecan	MON1	2,067	2,504	1,478	3,239	2,630	0,968
		MOOI-I ¹	64,21	145,3	66,92	39,87	4,556	3,318
		MOOI-III ³	19,59	19,86	8,246	10,33	14,14	1,694
Símbolo	Descrição	Expressão	T0	T2	T7	T12	T17	T21
COMP	Cartilage oligomeric matrix protein	MON1	45,21	207,1	183,0	238,9	281,1	124,1
		MOOI-I ¹	4,040	21,99	13,57	40,85	4,725	2,853
		MOOI-III ³	8,536	144,7	108,0	122,4	62,97	15,47
Símbolo	Descrição	Expressão	T0	T2	T7	T12	T17	T21
FMOD	Fibromodulin	MON1	3,032	58,38	47,17	58,55	79,76	93,98
		MOOI-I ¹	4,906	6,265	3,285	9,057	7,670	10,72
		MOOI-III ³	9,551	33,71	61,88	43,97	42,35	59,26
Símbolo	Descrição	Expressão	T0	T2	T7	T12	T17	T21
ADA	Adenosine Deaminase	MON1	15,579	10,292	12,034	12,039	21,940	27,683
		MOOI-I ¹	12,250	3,571	4,048	3,935	6,057	10,352
		MOOI-III ³	16,274	19,435	11,625	5,022	3,143	11,022

Apêndice D

Tabela Apêndice D. Genes selecionados e respectivos valores de expressão obtidos nos experimentos de PCR em Tempo Real.

Símbolo	Descrição	Expressão	T0	T1	T2	T7	T12	T17	T21
	Caveolin 1	MOOI-I ¹	0,2026	0,406	0,429	0,436	0,347	0,313	0,306
		MOOI-III ²	0,2856	0,253	0,771	0,418	0,271	0,417	0,240
		MOOI-III ³	0,1046	0,214	0,089	0,152	0,278	0,388	0,202
		MOOI-I ⁴	0,2866	0,642	0,608	0,340	0,489	0,466	0,302
		MOOI-III ⁵	0,6301	0,586	0,976	1,819	1,372	1,928	1,591
		MON1	1,0000	1,621	1,921	3,404	3,565	2,646	2,308
		MON2	1,0000	2,351	0,696	2,542	2,689	2,887	2,691
		MON3	1,0000	1,714	1,668	2,230	2,100	1,475	1,224
Símbolo	Descrição	Expressão	T0	T1	T2	T7	T12	T17	T21
RGC32	Chromosom e 13 open reading frame 15	MOOI-I ¹	1,473	27,88	15,04	74,76	15,68	16,44	14,69
		MOOI-III ²	1,007	4,679	8,715	10,41	12,84	22,87	12,81
		MOOI-III ³	0,347	8,548	3,060	7,376	31,61	34,42	12,00
		MOOI-I ⁴	0,136	36,10	8,970	11,07	29,67	41,83	24,37
		MOOI-III ⁵	0,752	31,95	60,89	303,3	336,4	379,5	372,1
		MON1	1,000	1087,	1227,	920,5	1065,	1030,	1548,
		MON2	1,000	67,12	24,49	152,3	454,3	385,1	384,8
		MON3	1,000	71,47	98,62	168,5	244,1	408,5	289,5
Símbolo	Descrição	Expressão	T0	T1	T2	T7	T12	T17	T21
MFAP4	Microfibrilla r-associated protein 4	MOOI-I ¹	0,7949	0,771	1,373	1,414	0,742	1,001	2,279
		MOOI-III ²	1,0055	0,583	1,607	3,232	0,521	1,721	5,649
		MOOI-III ³	0,0826	0,113	0,445	2,987	1,196	0,451	1,073
		MOOI-I ⁴	0,7626	1,487	1,281	1,230	0,598	0,510	1,648
		MOOI-III ⁵	0,2065	0,407	0,531	23,02	13,43	12,78	20,72
		MON1	1,0000	5,424	14,80	15,98	24,36	34,77	35,77
		MON2	1,0000	1,168	0,595	5,296	13,93	10,90	5,046
		MON3	1,0000	0,265	0,557	5,386	5,077	7,157	10,45
Símbolo	Descrição	Expressão	T0	T1	T2	T7	T12	T17	T21
SFRP1	Secreted frizzled-related protein 1	MOOI-I ¹	0,6168	1,619	4,325	3,408	4,566	2,520	3,761
		MOOI-III ²	0,1563	0,391	1,982	7,025	3,254	5,868	8,212
		MOOI-III ³	0,1637	0,588	1,199	5,715	4,078	4,259	4,341
		MOOI-I ⁴	0,0866	1,847	2,432	6,868	5,915	7,644	19,59
		MOOI-III ⁵	1,1500	1,665	1,424	4,838	4,797	4,865	8,008
		MON1	1,0000	35,41	47,36	66,08	55,52	50,51	83,11
		MON2	1,0000	1,812	0,717	10,22	34,01	34,63	24,68
		MON3	1,0000	1,453	2,924	16,57	12,68	15,97	15,27
Símbolo	Descrição	Expressão	T0	T1	T2	T7	T12	T17	T21
DPT	Dermatopo ntin	MOOI-I ¹	4,8694	8,899	26,83	66,91	43,81	44,05	40,71
		MOOI-III ²	1,0037	1,703	22,20	201,2	67,12	119,4	190,5
		MOOI-III ³	0,4062	1,339	10,66	91,73	95,18	63,87	34,13
		MOOI-I ⁴	1,7107	5,322	20,30	123,7	90,66	79,95	113,9
		MOOI-III ⁵	0,3737	0,891	0,294	7,780	20,88	52,33	104,5
		MON1	1,0000	65,23	453,4	552,2	795,1	1286,	2100,
		MON2	1,0000	1,175	1,303	316,0	1179,	1671,	1212,
		MON3	1,0000	0,491	1,760	108,2	246,7	412,9	270,3

Símbolo	Descrição	Expressão	T0	T1	T2	T7	T12	T17	T21
TGFB2	Transformin g growth factor, beta receptor II	MOOI-I ¹	0,1792	0,437	0,481	0,686	0,718	0,647	0,723
		MOOI-III ²	0,1598	0,278	0,624	1,247	0,537	0,845	0,945
		MOOI-III ³	0,0498	0,126	0,102	0,290	0,452	0,609	0,608
		MOOI-I ⁴	0,1417	0,580	0,539	1,239	0,948	0,939	1,076
		MOOI-III ⁵	0,6603	0,930	1,428	9,651	6,387	6,901	9,292
		MON1	1,0000	3,537	5,794	7,074	5,568	6,669	10,01
		MON2	1,0000	2,130	0,922	5,089	9,008	7,213	6,068
		MON3	1,0000	2,654	2,431	6,818	6,202	5,768	4,278
Símbolo	Descrição	Expressão	T0	T1	T2	T7	T12	T17	T21
RECK	Reversion- inducing- cysteine- rich protein with kazal motifs	MOOI-I ¹	0,0887	0,197	0,315	0,143	0,189	0,085	0,110
		MOOI-III ²	0,3831	0,161	0,573	0,490	0,143	0,254	0,183
		MOOI-III ³	0,0316	0,073	0,076	0,260	0,187	0,192	0,121
		MOOI-I ⁴	0,1543	0,291	0,314	0,297	0,168	0,173	0,161
		MOOI-III ⁵	0,5303	0,439	0,939	4,888	3,076	3,826	4,297
		MON1	1,0000	4,572	8,274	9,646	5,776	5,179	4,256
		MON2	1,0000	2,345	0,562	3,712	3,206	3,895	2,312
		MON3	1,0000	0,811	1,115	2,655	1,602	1,211	0,931
Símbolo	Descrição	Expressão	T0	T1	T2	T7	T12	T17	T21
PTGDS	Prostaglandi n D2 synthase 21kDa	MOOI-I ¹	2,9001	2,385	17,57	13,50	19,11	29,56	26,67
		MOOI-III ²	0,5542	0,537	3,868	31,49	18,12	28,43	70,71
		MOOI-III ³	0,6026	0,650	2,313	28,46	23,03	11,57	31,89
		MOOI-I ⁴	1,5276	4,513	9,959	44,73	48,70	55,76	137,0
		MOOI-III ⁵	0,2253	0,097	1,074	66,89	75,04	54,70	52,12
		MON1	1,0000	5,127	13,28	11,66	8,148	8,049	17,39
		MON2	1,0000	0,828	7,323	36,46	547,8	309,3	273,4
		MON3	1,0000	0,305	4,175	68,18	86,91	121,6	176,6
Símbolo	Descrição	Expressão	T0	T1	T2	T7	T12	T17	T21
ADM	Adrenomed ullin	MOOI-I ¹	0,2360	0,614	0,685	1,712	2,301	0,965	1,486
		MOOI-III ²	0,1895	0,283	1,080	1,719	1,350	2,080	1,948
		MOOI-III ³	0,0627	0,139	0,185	0,760	0,787	1,220	1,461
		MOOI-I ⁴	0,3169	0,439	1,012	1,579	1,237	2,301	3,050
		MOOI-III ⁵	0,5724	1,566	1,803	7,906	4,613	4,759	6,519
		MON1	1,0000	14,35	28,96	26,42	17,73	18,01	27,34
		MON2	1,0000	3,263	2,569	8,764	13,43	11,07	6,976
		MON3	1,0000	1,657	2,054	6,282	3,742	7,593	8,304
Símbolo	Descrição	Expressão	T0	T1	T2	T7	T12	T17	T21
LUM	Lumican	MOOI-I ¹	1,0108	1,146	1,270	0,271	0,391	0,391	1,158
		MOOI-III ²	3,8904	1,740	5,686	2,675	0,919	2,273	2,138
		MOOI-III ³	0,8845	1,120	0,441	0,837	2,266	1,828	1,186
		MOOI-I ⁴	2,3689	4,680	3,542	2,073	1,777	2,000	2,055
		MOOI-III ⁵	0,0287	0,019	0,339	2,139	0,881	0,757	0,720
		MON1	1,0000	1,279	1,243	0,653	0,990	0,562	1,999
		MON2	1,0000	2,320	0,910	5,271	2,792	6,021	1,990
		MON3	1,0000	1,391	2,195	2,976	2,124	3,833	3,163
Símbolo	Descrição	Expressão	T0	T1	T2	T7	T12	T17	T21
APOE	Apolipoprot ein E	MOOI-I ¹	0,5526	0,676	3,514	1,909	2,797	3,374	5,362
		MOOI-III ²	0,0191	0,011	0,049	0,933	0,251	0,322	1,011
		MOOI-III ³	0,4426	0,563	0,431	5,505	3,261	2,416	11,14
		MOOI-I ⁴	0,0700	0,582	0,197	0,408	0,385	0,613	3,325
		MOOI-III ⁵	3,3468	1,939	27,43	222,5	150,6	154,2	207,8
		MON1	1,0000	1,916	6,904	10,81	13,93	36,28	14,41
		MON2	1,0000	0,568	2,943	57,68	524,3	439,8	264,1
		MON3	1,0000	2,354	32,20	530,4	908,2	605,6	365,2

Símbolo	Descrição	Expressão	T0	T1	T2	T7	T12	T17	T21
CXCL12	Chemokine (C-X-C motif) ligand 12	MOOI-I ¹	1,4157	0,209	0,481	0,108	0,160	0,111	0,187
		MOOI-III ²	0,4674	0,097	0,273	0,333	0,121	0,253	0,329
		MOOI-III ³	0,3334	0,069	0,155	0,501	0,341	0,125	0,166
		MOOI-I ⁴	0,5956	0,210	0,195	0,143	0,070	0,182	0,259
		MOOI-III ⁵	0,6393	0,133	0,192	0,426	0,151	0,106	0,139
		MON1	1,0000	0,164	0,617	0,243	0,354	0,347	0,182
		MON2	1,0000	0,295	0,27	0,564	0,249	0,273	0,234
		MON3	1,0000	0,430	0,763	0,568	0,242	0,321	0,675
Símbolo	Descrição	Expressão	T0	T1	T2	T7	T12	T17	T21
AGC1	Aggrecan	MOOI-I ¹	1,498	2,228	5,643	2,126	0,839	0,121	0,085
		MOOI-III ²	0,080	0,031	0,175	0,084	0,137	0,097	0,021
		MOOI-III ³	0,216	0,299	0,199	0,164	0,244	0,423	0,027
		MOOI-I ⁴	0,046	0,100	0,111	0,265	0,324	0,128	0,041
		MOOI-III ⁵	0,198	0,348	1,361	1,452	5,683	3,722	4,516
		MON1	1,000	1,380	1,106	0,600	0,609	0,311	0,069
		MON2	1,000	2,900	1,782	4,912	3,598	2,891	4,833
		MON3	1,000	3,359	4,384	4,428	2,677	0,900	0,336
Símbolo	Descrição	Expressão	T0	T1	T2	T7	T12	T17	T21
COMP	Cartilage oligomeric matrix protein	MOOI-I ¹	0,1399	0,700	1,556	1,158	0,859	0,678	0,116
		MOOI-III ²	1,1675	1,492	4,672	8,713	7,165	7,675	8,561
		MOOI-III ³	0,0719	0,520	1,567	2,499	3,584	1,418	0,410
		MOOI-I ⁴	0,3563	1,641	2,019	4,361	2,959	2,204	1,118
		MOOI-III ⁵	0,0894	0,085	0,337	13,61	28,33	30,65	41,14
		MON1	1,0000	46,40	51,45	41,23	37,02	32,39	13,93
		MON2	1,0000	0,578	2,308	8,962	24,46	24,16	26,32
		MON3	1,0000	0,204	0,948	6,336	11,75	13,88	6,000
Símbolo	Descrição	Expressão	T0	T1	T2	T7	T12	T17	T21
FMOD	Fibromoduli n	MOOI-I ¹	0,9461	2,302	2,406	1,981	2,832	3,831	5,176
		MOOI-III ²	0,6201	0,552	2,406	12,30	7,289	9,693	14,41
		MOOI-III ³	2,0764	4,843	11,33	41,96	40,31	37,99	35,66
		MOOI-I ⁴	0,7885	2,343	4,857	13,47	10,52	11,32	22,87
		MOOI-III ⁵	0,0386	0,038	0,050	4,373	3,143	3,391	4,076
		MON1	1,0000	23,97	78,06	84,73	83,73	99,13	105,1
		MON2	1,0000	1,089	1,560	10,24	19,01	21,38	19,68
		MON3	1,0000	1,133	2,878	14,89	18,21	19,75	14,82
Símbolo	Descrição	Expressão	T0	T1	T2	T7	T12	T17	T21
ADA	Adenosine Deaminase	MOOI-I ¹	0,2084	0,119	0,277	0,195	0,149	0,148	0,240
		MOOI-III ²	0,3327	0,131	0,483	0,208	0,129	0,213	0,311
		MOOI-III ³	0,1445	0,088	0,183	0,235	0,143	0,077	0,219
		MOOI-I ⁴	0,1165	0,096	0,164	0,099	0,099	0,098	0,300
		MOOI-III ⁵	0,4452	0,530	1,087	1,269	1,020	0,647	0,690
		MON1	1,0000	3,420	2,715	3,257	2,513	3,236	2,733
		MON2	1,0000	0,355	1,535	1,255	1,470	1,478	1,298
		MON3	1,0000	0,379	1,011	1,008	0,640	0,995	1,284
Símbolo	Descrição	Expressão	T0	T1	T2	T7	T12	T17	T21
OPG	Osteoproteg erin	MOOI-I ¹	0,0415	0,085	0,119	0,212	0,341	0,364	0,280
		MOOI-III ²	0,1506	0,072	0,523	0,309	0,927	0,667	0,402
		MOOI-III ³	0,0255	0,039	0,023	0,061	0,339	1,088	0,215
		MOOI-I ⁴	0,3342	0,099	0,452	0,662	1,460	2,180	0,718
		MOOI-III ⁵	0,1098	0,106	0,961	1,209	4,586	6,358	4,391
		MON1	1,0000	0,474	0,266	1,492	0,472	0,823	3,728
		MON2	1,0000	0,737	3,234	3,870	5,507	6,123	10,23
		MON3	1,0000	0,826	1,308	2,500	5,511	5,581	7,111