Camila Camanzano Ornelas

Estudo funcional de células mesenquimais com
mutações patogênicas no *TCOF1*

Instituto de Biociências – Universidade de São Paulo

São Paulo

2009

Camila Camanzano Ornelas

Estudo funcional de células mesenquimais com
mutações patogênicas no *TCOF1*

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biociências da Universidade de São Paulo,
para a obtenção de Título de Mestre em
Ciências, na Área de Biologia/Genética.

Orientadora: Maria Rita Passos-Bueno

São Paulo

2009

Ornelas, Camila Camanzano

Estudo funcional de células mesenquimais com
mutações patogênicas no *TCOF1*

104 páginas

Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências da
Universidade de São Paulo. Departamento de Genética e
Biologia Evolutiva.

1. Síndrome de Treacher Collins 2. *TCOF1*

3. Fibroblastos e células-tronco mesenquimais

I. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências.
Departamento de Genética e Biologia Evolutiva.

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr.(a). Maria Rita Passos-Bueno

Orientadora

*A todos os pacientes que conheci
durante o atendimento genético.*

O sonho, que é completamente espontâneo, conserva, mesmo quando irrealizável, o perfil de nossa espiritualidade; nada sai mais diretamente e mais sinceramente do fundo de nossa alma que as aspirações irrefletidas e sem limites para os esplendores do destino. Nessas aspirações, muito mais que nas idéias coordenadas, refletidas, sensatas, pode encontrar-se o caráter de cada homem. Nossas quimeras são as que mais se assemelham a nós. Cada um sonha com o desconhecido e impossível segundo a própria natureza.

Victor Hugo em *Os miseráveis*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente e principalmente gostaria de agradecer à Dra. Maria Rita Passos-Bueno pela oportunidade e por ter sido uma orientadora em toda a acepção da palavra, pelos conselhos e ensinamentos.

À equipe da Dra. Vera Cardim, em especial ao Dr. Adriano de Lima e Silva e Dr. Rodrigo Dornelles, pela simpatia e auxílio na coleta de tecidos; assim como pela eficiência e simpatia do Dr. Cássio Eduardo Raposo do Amaral, da Sobrapar; e à equipe do Dr. Nivaldo Alonso, da Medicina da USP, que foram todos fundamentais para a obtenção dos tecidos utilizados neste trabalho.

À FAPESP e CNPq pelo apoio financeiro.

A todos meus colegas de laboratório, por todos os ensinamentos e apoio, sobretudo àqueles que são muito mais que colegas e para sempre serão meus amigos; em especial à Erika Yeh que me ensinou muitas técnicas e cujas ótimas idéias me ajudaram desde análise dos meus resultados até a cor de fundo da apresentação.

Aos meus queridos amigos da Biologia, que foram e sempre serão muito importantes em todas as fases da minha vida, mesmo que não mais se encontrem no Brasil.

Ao Gerson, que além de amigo da Biologia é também colega de trabalho, pelo apoio pessoal e profissional destes anos.

À minha família, sobretudo à minha mãe, que sempre apoiou todas as minhas decisões e é base de tudo que eu sou.

E, ao Douglas, por todo seu amor, carinho, ajuda, paciência; com quem espero dividir muitos outros momentos importantes da minha vida...

ÍNDICE

CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO	1
1.1. Aspectos clínicos da síndrome de Treacher Collins.....	2
1.2. O gene <i>TCOF1</i>	4
1.3. A Treacle na biogênese de ribossomos.....	5
1.4. Desenvolvimento craniofacial.....	8
1.5. Modelos animais.....	10
1.6. Células-tronco mesenquimais.....	14
1.7. Questões não respondidas.....	16
1.8. Objetivos.....	18
 CAPÍTULO 2: MATERIAL e MÉTODOS	 23
2.1. Pacientes e obtenção de tecidos.....	24
2.2. Considerações éticas.....	24
2.3. Estabelecimento das culturas de fibroblastos e células-tronco mesenquimais.....	25
2.4. Culturas celulares.....	26
2.5. Triagem de mutações no <i>TCOF1</i>	26
2.5.1. Extração de DNA das culturas celulares.....	26
2.5.2. Amplificação dos fragmentos de DNA.....	27
2.5.3. Seqüenciamento.....	28
2.5.4. Nomenclatura das mutações.....	28
2.6. Citometria de fluxo.....	29
2.7. Ensaios de proliferação celular.....	29
2.8. Diferenciação osteogênica.....	30
2.9. Extração de RNA das culturas de células.....	30
2.10. Expressão gênica.....	31
2.10.1. Síntese de cDNA.....	31
2.10.2. Análise de expressão por PCRq-RT.....	31
2.10.3. <i>Microarray</i>	34

CAPÍTULO 3: RESULTADOS	37
3.1. Estabelecimento das culturas celulares.....	38
3.2. Caracterização clínica e triagem de mutações dos pacientes.....	38
3.3. Citometria de fluxo.....	39
3.4. Níveis de <i>TCOF1</i> em células não embrionárias e expressão do alelo portador da mutação patogênica.....	40
3.4.1. Análise da expressão do <i>TCOF1</i>	40
3.4.2. Expressão do alelo portador da mutação patogênica.....	41
3.5. Análise de proliferação das células em cultura.....	41
3.6. Diferenciação osteogênica.....	42
3.7. Expressão genômica das culturas celulares.....	42
3.8. Validação dos dados de expressão por PCRq-RT.....	47
 CAPÍTULO 4: DISCUSSÃO	 61
4.1. Caracterização celular: imunofenótipo e mutações patogênicas.....	62
4.2. Análise da expressão dos níveis de <i>TCOF1</i> e do alelo mutado.....	64
4.3. Análise do potencial proliferativo e de diferenciação osteogênica.....	65
4.4. Expressão genômica das culturas celulares.....	66
 CAPÍTULO 5: CONCLUSÕES e CONSIDERAÇÕES FINAIS	 69
 RESUMO	 72
 <i>ABSTRACT</i>	 73
 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	 74
 ANEXOS	 i
I: Termos de consentimento.....	ii
II: Caracterização do imunofenótipo das culturas celulares.....	v

LISTA de ABREVIACÕES

A,C,T e G: Adenina, Citosina, Timina e Guanina;

APE 1: Endonuclease apurínica/apiridímic 1;

CEGH: Centro de Estudos do Genoma Humano;

cDNA: Ácido desoxirribonucleico complementar, do inglês *complementary DeoxyriboNucleic Acid*;

CT: Limiar do ciclo de amplificação da PCR em tempo real, do inglês *Cycle Treshold*;

DEPC: Dietilpirocarbonato;

dNTP: Desoxirribonucleotídeos trifosfatados;

DMEM: Meio de cultura modificado por Dulbecco, do inglês *Dulbecco's Modified Eagle's Médium*;

DMSO: Dimetilsulfóxido;

DNA: Ácido desoxirribonucleico, do inglês *DeoxyriboNucleic Acid*;

DTT: Ditiotreitól;

dUTP: Desoxiuridina trifosfato;

EDTA: Ácido etileno diamino tetracético;

EXO: Exonuclease I;

FITC: Fluorescina;

FN: Fator de normalização;

GDEs: Genes diferencialmente expressos;

kDa: Quilodaltons;

NMD: *Non-sense mediated mRNA decay*: degradação do RNAm mediada por códon de parada prematura;

pb: Pares de bases;

PBS: Tampão salino fosfato, do inglês *Phosphate Buffered Saline*;

PCR: Reação em cadeia da polimerase, do inglês *Polymerase Chain Reaction*;

PCRq-RT: Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real, do inglês *Real Time*;

PE: Ficoeritrina, do inglês *Phycoerythrin*;

pH: Potencial hidrogeniônico;

RMA: Método de normalização dos dados de *microarray*, do inglês *Robust Multi-array Average*;

RNA: Ácido ribonucleico, do inglês *RiboNucleic Acid*;

RNAm: Ácido ribonucleico mensageiro;

RNase H: Ribonuclease H;

SAP: Fosfatase alcalina de camarão, do inglês *Shrimp Alkaline Phosphatase*;

SDS: Dodecil sulfato de sódio, do inglês *Sodium Dodecyl Sulfate*;

snoRNPs: Rinonucleoproteínas nucleolares, do inglês *small nucleolar ribonucleoproteins*;

STC: Síndrome de Treacher Collins;

TBE: Tampão Tris/Borato/EDTA;

TdT: Transferase deoxinucleotídeo terminal;

UDG: Uracil DNA glicosilase;

USP: Universidade de São Paulo.

ÍNDICE de FIGURAS

Fig. 1.1. Perfis característicos de pacientes portadores da STC.....	19
Fig. 1.2. Localização nucleolar da Treacle.....	19
Fig. 1.3. Modelo de funcionamento da Treacle.....	20
Fig. 1.4. Estruturas faciais derivadas do primeiro e segundo arcos branquiais.....	20
Fig. 1.5. Padrões de expressão do <i>Tcofl</i> durante o desenvolvimento embrionário.....	21
Fig. 1.6. Aparência morfológica de diferentes linhagens de embriões <i>Tcofl</i> ^{+/-}	21
Fig. 1.7. Imunoistoquímica para p53 e apoptose de embriões <i>Tcofl</i> ^{+/-}	22
Fig. 1.8. Esqueletos craniofaciais de embriões <i>Tcofl</i> ^{+/-} <i>Trp53</i> e tratados com pifitrina.....	22
Fig. 2.1. Esquema do procedimento de <i>microarray</i>	36
Fig. 3.1. Perfis de dois pacientes portadores da STC incluídos na pesquisa.....	48
Fig. 3.2. Sequenciamento do DNA genômico e cDNA do paciente STC1.....	49
Fig. 3.3. Sequenciamento do DNA genômico e cDNA do paciente STC2.....	50
Fig. 3.4. Sequenciamento do DNA genômico e cDNA do paciente STC3.....	51
Fig. 3.5. Sequenciamento do DNA genômico e cDNA do paciente STC4.....	52
Fig. 3.6. Caracterização do imunofenótipo das culturas celulares de pacientes com STC.....	53
Fig. 3.7. Expressão normalizada do <i>TCOF1</i> em células de pacientes e controles.....	54
Fig. 3.8. Curvas de crescimento das culturas celulares.....	55
Fig. 3.9. Células coradas pelo método de <i>von Kossa</i> (controle psitivo e STC1).....	56
Fig. 3.10. Células coradas pelo método de <i>von Kossa</i> (STC3 e STC4).....	57
Fig. 3.11. Média da expressão do gene <i>CDH13</i> nas culturas celulares.....	58
Fig. 3.12. Média da expressão do gene <i>DAXX</i> nas culturas celulares.....	58
Fig. 3.13. Média da expressão do gene <i>SGCG</i> nas culturas celulares.....	59
Fig. 3.14. Média da expressão do gene <i>TLR4</i> nas culturas celulares.....	59
Fig. 3.15. Média da expressão do gene <i>ACTG2</i> nas culturas celulares.....	60
Fig. II.1. Caracterização do imunofenótipo por citometria de fluxo (STC1).....	vi
Fig. II.2. Caracterização do imunofenótipo por citometria de fluxo (STC2).....	vii
Fig. II.3. Caracterização do imunofenótipo por citometria de fluxo (STC3).....	viii
Fig. II.4. Caracterização do imunofenótipo por citometria de fluxo (STC4).....	ix
Fig. II.5. Caracterização do imunofenótipo por citometria de fluxo (controle 1).....	x
Fig. II.6. Caracterização do imunofenótipo por citometria de fluxo (controle 2).....	xi
Fig. II.7. Caracterização do imunofenótipo por citometria de fluxo (controle 3).....	xii
Fig. II.8. Caracterização do imunofenótipo por citometria de fluxo (controle 4).....	xiii

ÍNDICE de TABELAS

Tabela 2.1. <i>Primers</i> utilizados para a triagem de mutações e amplificação do cDNA.....	28
Tabela 2.2. <i>Primers</i> dos genes alvos e endógenos utilizados na PCRq-RT.....	33
Tabela 3.1. Porcentagem das populações celulares marcadas com antígenos.....	40
Tabela 3.2. Níveis de expressão relativa do <i>TCOF1</i> nas culturas celulares.....	41
Tabela 3.3. Quantidade de GDEs selecionada pelos algoritmos <i>Lima</i> e <i>RankProd</i>	43
Tabela 3.4. GDEs na comparação entre controles e afetados (fibroblastos).....	44
Tabela 3.5. GDEs na comparação entre controles e afetados (células-tronco).....	45
Tabela 3.6. GDEs na comparação entre controle e afetados (ambas culturas).....	46
Tabela 3.7. Expressão normalizada de diferentes genes de pacientes e controles.....	47

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

1.1. Aspectos clínicos da síndrome de Treacher Collins

A síndrome de Treacher Collins (STC, OMIM 154500), também conhecida como síndrome de Franceschetti-Zwahlen-Klein ou disostose mandibulofacial, é um distúrbio do desenvolvimento craniofacial, cuja incidência é estimada em 1:50.000 recém-nascidos (Dixon e Dixon, 2004a). Apesar de ter sido primeiramente descrita por Thompson em 1846, e, posteriormente por Barry em 1888, que relatou dois casos com malformações na pálpebra; foi o oftalmologista Edward Treacher Collins que, em 1900, publicou uma descrição mais detalhada das malformações dos ossos malares e da pálpebra, reconhecendo esses sinais como característicos de uma síndrome (Szlazak, 1953; Dixon, 1996). Em 1944 e 1949, Franceschetti e colaboradores realizaram um extenso trabalho de revisão literária dos casos descritos, formalizando um quadro completo das malformações clínicas atribuídas à síndrome, denominado-a de disostose mandibulofacial (Farrar, 1967).

Tais malformações são restritas à cabeça e pescoço, simétricas bilateralmente na grande maioria dos casos, variando a frequência com que se apresentam. Incluem-se dentre as características clínicas mais comumente observadas e suas respectivas frequências:

- ❖ Malformações da orelha externa (77%) e atresia dos canais auditivos externos (36%), incluindo fusão e/ou ausência completa ou parcial dos ossículos do ouvido médio, resultando em dificuldade auditiva ou surdez bilateral, que está presente em mais de 50% dos casos;
- ❖ Fendas palpebrais com inclinação antimongolóide (89%), geralmente com coloboma na pálpebra inferior (69%) e ausência de cílios mediais ao coloboma (53%);
- ❖ Hipoplasia dos ossos faciais, sobretudo da mandíbula (78%) e do complexo zigomático (81%); em casos mais graves o arco zigomático pode estar ausente;

- ❖ Palato alto e estreito, ocasionalmente fendido (28%);
- ❖ Penugem capilar atípica na face (28%) (revisado em Dixon *et al.*, 2007).

Na maioria dos pacientes portadores da STC, observa-se um conjunto dessas características (Fig. 1.1) que são muito variáveis tanto entre famílias diferentes quanto dentro de uma mesma família. Devido à grande variabilidade fenotípica, o diagnóstico clínico da doença é muitas vezes dificultado (Dixon *et al.*, 1994). Enquanto alguns casos de STC podem resultar em morte perinatal causada pelo colapso das vias respiratórias, outros indivíduos moderadamente afetados são diagnosticados retrospectivamente, apenas após o nascimento de uma criança gravemente afetada (Dixon *et al.*, 1994; Marres *et al.*, 1995; Dixon *et al.*, 2007). Além disso, mais de 60% dos pacientes não apresentam um histórico familiar da síndrome, e esses casos são possivelmente resultantes de novas mutações (Jones *et al.*, 1975). Acrescentado à grande variabilidade fenotípica, esses fatores complicam o aconselhamento genético, sobretudo de pais que tiveram uma criança afetada. Portanto, é muito importante se assegurar que nenhum dos pais possa ser, de fato, minimamente afetado.

O padrão de herança da síndrome é autossômico dominante com penetrância quase completa. Existem alguns poucos casos nos quais se cogitou a não-penetrância da doença, entretanto uma análise clínica mais detalhada, que inclui exames radiológicos, pode revelar a presença de pequenas malformações, caracterizando indivíduos pouco acometidos (Dixon *et al.*, 1994 e Marres *et al.*, 1995). Há apenas um caso de não penetrância comprovado, no qual um indivíduo, portador do alelo de risco e pai de uma criança gravemente afetada, não apresentou sinais clínicos e radiográficos da síndrome (Dixon *et al.*, 1994).

Apesar de o padrão de herança ser claro na maioria dos casos familiares, há relatos da ocorrência de afetados na prole de casamentos consangüíneos (Lowry *et al.*, 1985; Richieri-Costa *et al.*, 1993 e Splendore *et al.*, 2000). Essas observações levaram os autores a sugerir uma forma autossômica recessiva da síndrome (disostose mandibulofacial, tipo Treacher Collins, autossômica recessiva, OMIM 248390), embora não se possa descartar a possibilidade de não-penetrância ou mosaicismismo gonadal em um dos pais ou ainda heterogeneidade genética.

1.2. O gene *TCOF1*

O gene associado à síndrome, denominado *TCOF1* (*Treacher Collins-Franceschetti syndrome 1*), foi isolado por meio de clonagem posicional e está localizado no cromossomo 5q32-q33.1. O *TCOF1* foi originalmente descrito como tendo um um transcrito de 4233 pares de base, compreendendo 25 éxons que codificariam uma proteína com 1411 aminoácidos e massa teórica de 144 kDa (Dixon *et al.*, 1997a; Wise *et al.*, 1997). Em 2004, So e colaboradores descreveram dois novos éxons que sofrem *splicing* alternativo, denominados 6A e 16A, cuja inclusão resulta numa proteína prevista com 1488 aminoácidos e com 152 kDa de massa molecular. As variantes do *TCOF1* que contêm o éxon 6A são bastante comuns, enquanto que apenas a isoforma minoritária da proteína possui o éxon 16A (So *et al.*, 2004). Entretanto, não se conseguiu determinar se a expressão de alguns dos éxons é específica de algum tipo tecidual ou idade de desenvolvimento (Dixon e Dixon, 2004a).

Já foram identificadas mais de 120 mutações patogênicas associadas à STC, as quais estão distribuídas ao longo de todo gene (The Treacher Collins Collaborative Group, 1996; Gladwin *et al.*, 1996; Dixon *et al.*, 1997a; Edwards *et al.*, 1997; Wise *et al.*, 1997; Splendore *et al.*, 2000, 2002, 2005; Ellis *et al.*, 2002; Dixon e Dixon, 2004a; Teber *et al.*, 2004; Horiuchi *et al.*, 2005). A distribuição ubíqua das alterações no gene parece indicar que não há uma correlação genótipo-fenótipo na STC e que a variabilidade clínica não depende do tipo ou localização da mutação, nem mesmo do sexo do paciente ou ainda se o caso é esporádico ou familiar (Splendore *et al.*, 2000, 2005; Dixon e Dixon, 2004a). Algumas hipóteses para explicar a grande variabilidade clínica da síndrome foram sugeridas, como a influência do componente genético na penetrância e gravidade das malformações, já que linhagens diferentes de camundongos com haploinsuficiência da Treacle apresentaram quadros clínicos diversos (Dixon e Dixon, 2004b). Masotti e colaboradores (2005) também mostraram que a presença de polimorfismos na região promotora do alelo normal do *TCOF1* interferiria na ligação de fatores de transcrição, o que poderia alterar a expressão do gene, influenciando na manifestação do quadro clínico.

O tipo de mutação mais comum encontrada no *TCOF1* são pequenas deleções, de 1 a 41 pares de base, que alteram o quadro de leitura, detectadas em 67% dos pacientes. Em 13% dos casos ocorrem pequenas duplicações e mudanças de nucleotídeo, que resultam em códon de parada prematuro, mudança de aminoácido e

alteração de sítio de *splicing*, somando 19% das mutações patogênicas no gene (Splendore *et al.*, 2005). Apesar de a maioria das mutações serem específicas de cada família, uma deleção de 5 pares de base no éxon 24 (c.4366_c.4370 delGAAAA) parece ser recorrente, ocorrendo em 17% dos casos (Splendore *et al.*, 2005).

O resultado da grande maioria dessas mutações é a introdução de um códon de parada prematura na proteína, sugerindo que a haploinsuficiência seja o mecanismo responsável pela STC (Gladwin *et al.*, 1996; Edwards *et al.*, 1997; Wise *et al.*, 1997).

1.3. A Treacle na biogênese de ribossomos

O gene *TCOF1* codifica uma fosfoproteína nucleolar de baixa complexidade denominada Treacle, a qual possui mais de 60% dos seus resíduos de aminoácidos representado por resíduos de alanina (14,7%), serina (13,6%), lisina (11,1%), prolina (9,1%) e ácido glutâmico (9,1%) (Dixon *et al.*, 1997a; Wise *et al.*, 1997).

Análises de bioinformática indicam que a Treacle apresenta três domínios: domínios únicos amino e carboxi terminais; e um domínio central repetitivo, que consiste de agrupamentos de resíduos de aminoácidos ácidos separados por aminoácidos básicos, na sua maioria, resíduos de lisina, alanina e prolina (Dixon *et al.*, 1997a; Wise *et al.*, 1997). Dentro das unidades de repetição, os grupos de aminoácidos ácidos contêm potenciais locais para a fosforilação pela caseína quinase II (S/T-X-X-D/E), sugerindo que esta seja uma modificação pós-traducional importante para a função da proteína (Dixon *et al.*, 1997a; Wise *et al.*, 1997; Marsh *et al.*, 1998).

A região carboxi-terminal da Treacle é extremamente rica em lisina e apresenta sinais de localização nuclear (SLN), seqüências essenciais para transportar as proteínas para o núcleo. Seqüências que são alvos para o transporte nuclear são geralmente curtas, com no máximo 12 aminoácidos, e contêm uma alta proporção de aminoácidos carregados positivamente (Dingwall e Laskey, 1991). Na região carboxi-terminal da Treacle são encontrados os consensos K-K/R-X-R/R que estão localizados nos aminoácidos 1285-1289 (KKKKK), 1314-1317 (KRDK), 1325-1328 (KKGK), 1362-1265 (KKEK), 1370-1375 (KRKKDK), 1377-1380 (KKEK), 1382-1385 (KKAK) e 1398-1405 (KKKKKKKK) (Dixon *et al.*, 1997a; Wise *et al.*, 1997; Marsh *et al.*, 1998). Marsh e colaboradores (1998) mostraram que os SLN são realmente funcionais, já que construções da Treacle que não continham os sinais da região carboxi-terminal

resultaram em proteínas incapazes de se localizar no núcleo, mantendo-se dispersas no citoplasma celular.

Pesquisas em banco de dados não revelaram nenhuma forte homologia com diferentes polipeptídios, sugerindo que a Treacle não pertença a nenhuma família protéica; embora haja uma fraca similaridade com outras classes de fosfoproteínas nucleolares encontradas em *Xenopus* e rato, devido à região de baixa complexidade presente nessas proteínas (Meier e Blobel, 1992; Cairns e McStay, 1995). A possível localização nucleolar da Treacle foi então confirmada realizando-se um ensaio repórter com uma proteína verde fluorescente (GFP), o qual demonstrou que a Treacle se localiza no componente denso fibrilar do nucléolo (Fig. 1.2) (Marsh *et al.*, 1998; Winokur *et al.*, 1998; Isaac *et al.*, 2000).

Confirmou-se também que os sinais de fosforilação presentes no domínio repetitivo da Treacle são funcionais, já que a migração da proteína se mostra anormalmente alta em géis de SDS-PAGE e, ao ser tratada com fosfatase, a mobilidade no gel reduz cerca de 40 kDa, indicando um alto grau de fosforilação (Isaac *et al.*, 2000). Além disso, ao se realizar uma co-imunoprecipitação, constatou-se que a Treacle interage com a caseína quinase II que, possivelmente, é a enzima responsável pelas suas modificações pós-traducionais.

A localização nucleolar da Treacle é um indício de que a proteína teria alguma função no processamento do pré-RNA ribossômico, já que é na região limítrofe do componente denso fibrilar do nucléolo que ocorre a transcrição dos agrupamentos repetitivos de DNA ribossomal, além de ocorrerem as modificações iniciais, como a metilação, dos transcritos de pré-RNA ribossômico (revisado em Boisvert *et al.*, 2007).

Realmente, Valdez e colaboradores (2004) mostraram que a Treacle, durante a interfase celular, está co-localizada com proteínas do processamento do pré-RNA ribossômico, como Guα, C23 e B23; enquanto que durante a mitose, a proteína se localiza na região organizadora nucleolar, onde estão os genes do DNA ribossômico e toda sua maquinaria de transcrição, incluindo a RNA polimerase I; sugerindo que a Treacle integraria o complexo de transcrição.

Essa hipótese foi embasada ao se confirmar a interação da Treacle com o UBF (*upstream binding factor*), um fator de transcrição do RNA ribossômico, que atua em conjunto com a RNA polimerase I. Análises de duplo-híbrido e ensaios de co-

imunoprecipitação na presença de RNase e DNase atestaram a interação proteína-proteína, não mediada por RNA ou DNA, entre a Treacle e o UBF (Valdez *et al.*, 2004).

Outro papel da Treacle na biogênese de ribossomos foi evidenciado por Hayano e colaboradores (2003), que mostraram sua interação com o complexo de ribonucleoproteínas pré-ribossômicas (pré-RNPs) associado à Nop56p. Proteínas que se associam a pequenas moléculas de RNA não codificantes, constituem as ribonucleoproteínas (RNP), que exercem diversas funções celulares como, por exemplo, a modificação local-específica de RNAs, a metilação do DNA, a síntese do DNA telomérico; entre outras. Dentre as ribonucleoproteínas nucleolares (snoRNPs, sigla para *small nucleolar ribonucleoproteins*), cuja função é a modificação do pré-RNA ribossômico e se localizam no nucléolo, há duas famílias: a família de RNA C/D e RNA H/ACA. As duas classes de RNAs direcionam diferentes modificações nos nucleotídeos: os RNAs H/ACA guiam a conversão de uridina à pseudouridina, enquanto que os RNAs C/D direcionam a 2'-O-metilação. Ambos os processos funcionam em paralelo e alteram o pré-RNA ribossômico em regiões essenciais da molécula, exercendo papel fundamental na maturação e função do ribossomo (revisado em Matera *et al.*, 2007). A Nop56p é uma proteína integrante do complexo snoRNP C/D e sua ligação com a Treacle é feita por meio da interação proteína-proteína, independente da integridade do RNA, assim como ocorre com a interação entre a Treacle e o UBF (Hayano *et al.*, 2003; Gonzales *et al.*, 2005). Dessa forma, há forte indício de que a Treacle participe da metilação do pré-RNA ribossômico mediante interação física com a Nop56p. Apesar da Treacle se co-localizar com o UBF durante toda a mitose, ela se co-localiza com a Nop56p e a fibrilarina, uma metiltransferase que interage com o complexo snoRNP C/D, durante a telófase, quando se inicia a transcrição dos genes de DNA ribossômicos e a metilação do pré-RNA ribossômico.

Portanto, esses estudos mostraram a importância da Treacle na biogênese de ribossomos, sintetizada em um modelo que abrange suas funções (Fig. 1.3), no qual a Treacle se ligaria a regiões do DNA ribossômico durante estágios iniciais da mitose, impedindo o avanço da RNA polimerase I, cessando a transcrição. Modificações pós-traducionais e/ou a interação da Treacle com o UBF durante o final da telófase, resultaria na dissociação da Treacle do DNA ribossômico, permitindo com que a RNA polimerase iniciasse a transcrição. É também possível que modificações na Treacle permitam com que ela se ligue na região promotora do DNA ribossômico e recrute mais

UBF, estimulando a transcrição. Durante ativação da RNA polimerase I, a Treacle recrutaria o complexo de snoRNP C/D por meio de sua interação com a Nop56p. Não se sabe se a mesma molécula de Treacle que se liga ao UBF poderia também interagir com a Nop56p, entretanto, como a interação da Treacle com as duas proteínas é mediada por sua região carboxi-terminal, provavelmente a molécula que se associa com a maquinaria da RNA polimerase I é diferente daquela que faz parte do complexo de metilação. Ainda também não se definiu qual é a função molecular precisa da Treacle na reação de metilação, entretanto, acredita-se, que ela proveria uma base ou estrutura para atuação do complexo protéico que metila o pré-RNA ribossômico (Gonzales *et al.*, 2005). Não é incomum proteínas nucleolares exercerem mais de uma função; por exemplo, a disquerina participa da modificação pós-transcricional do pré-RNA ribossômico e é também integrante do complexo da telomerase, sendo importante na biogênese de RNA ribossômico e na manutenção dos telômeros (Ruggero *et al.*, 2003).

Assim sendo, a haploinsuficiência da Treacle não somente afeta a transcrição dos genes de DNA ribossômicos, mas também altera a produção de RNAs ribossômicos maduros. Tais fatores combinados podem interferir de maneira significativa na proliferação e diferenciação celulares, já que se estima que mais de 95% da transcrição e metabolismo de uma célula em proliferação sejam destinados à biogênese de ribossomos. De fato, a diminuição da expressão do *TCOF1*, utilizando pequenos RNAs de interferência (RNAi) inibiu a transcrição do DNA ribossômico e o crescimento celular (Valdez *et al.*, 2004), análogo ao que ocorreu em camundongos com mutações no *Tcofl*, que apresentaram malformações craniofacial e atraso de crescimento (Dixon e Dixon, 2004b).

1.4. Desenvolvimento craniofacial

As estruturas craniofaciais afetadas na STC são derivadas do primeiro e segundo arcos branquiais, que são estruturas simétricas bilateralmente e se formam durante as quatro primeiras semanas do desenvolvimento humano. O mesênquima dos arcos é formado pelas células da crista neural cefálica (Jones *et al.*, 1999).

A crista neural é uma população celular transiente, que se desprende da neuroectoderme, localizada entre o tubo neural e as margens livres da dobra neural, de onde elas migram extensivamente durante a neurulação. Durante esse período, elas

perdem a adesão célula-célula e sofrem rearranjos no citoesqueleto, que levam a mudanças morfológicas, possibilitando a delaminação e emigração do neuroepitélio (revisado em Sauka-Splenger e Bronner-Fraser, 2008).

O destino das células crista neural é determinado pelo local para onde elas migram e se estabelecem; por isso, existem grupos de células da crista neural do tronco, que originam melanócitos e gânglios; células da crista neural vagal e sacral, que formam gânglios entéricos; células da crista neural cardíaca, que originam o tecido conjuntivo dos grandes vasos; e, por fim, as células da crista neural cefálica, que apresentam um repertório de diferenciação mais vasto que os demais grupos e são capazes de originar cartilagem, osso, melanócitos, neurônios craniais, células da glia e tecido conjuntivo da face, além de constituírem os arcos branquiais e formarem as células do timo, os odontoblastos e primórdios dentais (Gilbert, 2006).

As células da crista neural cefálica migram da porção anterior, média e posterior do encéfalo em correntes migratórias distintas. As células que migram do mesencéfalo anterior e posterior povoam a proeminência frontonasal e irão constituir todos os ossos do crânio, com exceção do parietal. As células da região posterior do encéfalo, que está segmentado em estruturas denominadas rombômeros, migram para os arcos branquiais (Fig. 1.4). O primeiro arco branquial origina os ossos da face; o martelo e a bigorna, dois ossículos do ouvido médio. O segundo arco branquial origina a cartilagem hióide do pescoço, o estribo e o nervo facial (revisado em Santagati e Rijli, 2003).

Problemas na formação, proliferação, migração e/ou diferenciação das células da crista neural são considerados causativos de muitas malformações craniofaciais, que representam um terço de todos os defeitos congênitos. Algumas síndromes, inclusive, por serem oriundas de malformações nas estruturas derivadas de primeiro e segundo arcos branquiais, resultam numa estrutura facial similar à STC. Dentre aquelas que podem ser consideradas para o diagnóstico diferencial da STC, estão as síndromes de Nager e Miller e o espectro oculoauriculovertebral (OAV).

As características faciais da síndrome de Nager são bastante similares à STC, sobretudo na região dos olhos, os quais apresentam inclinação antimongolóide e escassez de cílios. Contudo, a mandíbula é geralmente mais hipoplásica que na STC e a presença de coloboma é rara. A característica mais distinguível é o comprometimento de membros, com dedos hipoplásicos, aplásicos ou duplicados e o rádio e a ulna que podem estar fundidos (Dixon e Dixon, 2004a). Casos da síndrome de Nager são

geralmente esporádicos, apesar de já terem sido reportados casos de irmão afetados (Chemke *et al.*, 1988).

As características da síndrome de Miller também são semelhantes às da STC; entretanto, assim como na síndrome de Nager, há comprometimento de membros, com ausência ou desenvolvimento incompleto do quinto dígito dos quatro membros; podendo também ocorrer encurtamento do rádio e da ulna. O aparecimento de fissura labial, associada ou não à fissura de palato, é mais comum que na STC e alguns pacientes podem apresentar problemas cardíacos congênitos. O padrão de herança da síndrome de Miller não está bem definido, já que foram descritas formas autossômica dominante com expressividade variável e autossômica recessiva (Gorlin *et al.*, 1990).

O espectro OAV é uma condição complexa e heterogênea que inclui a microssomia hemifacial e a síndrome de Goldenhar, que afetam primariamente o desenvolvimento da orelha, boca e mandíbula. A gravidade das malformações é bastante variável e geralmente afeta apenas um lado da face. O acometimento bilateral já foi descrito, entretanto, em tais casos, um dos lados apresenta maior severidade que o outro. Na síndrome de Goldenhar são descritas malformações vertebrais e lipodermóides epibulbares. A maioria dos casos de espectro AOV é isolada, embora de 1 a 2% dos casos tenham um histórico da doença na família (Dixon e Dixon, 2004a).

1.5. Modelos animais

Quando ainda pouco se sabia sobre a patogênese da síndrome de Treacher Collins, Poswillo (1975) foi quem primeiro produziu uma fenocópia da síndrome ao administrar doses teratogênicas de vitamina A durante fases iniciais do desenvolvimento de ratos. Tais doses pareceram causar uma morte celular localizada na população de células da crista neural cefálica, antes ou durante sua migração a partir da dobra neural. Então, admitiu-se que a destruição das células da crista neural não interferiria na morfogênese, a qual ocorria normalmente, mas poderiam resultar numa falta de tecido disponível para formar as estruturas derivadas do primeiro e segundo arcos branquiais que apareciam comprometidas na fenocópia. Um estudo posterior, realizado por Sulik e colaboradores (1987), sugeriu que a STC era resultante da morte celular nos placóides ectodérmicos. Fenocópias da STC e da síndrome de Nager ou Miller foram produzidas em camundongos, ao se expor as gestantes ao ácido 13-*cis*-retinóico, um análogo da

vitamina A, nos dias 9 e 9,5 pós-fertilização. Demonstrou-se com este experimento, que as malformações de membros e faciais apresentadas pelos camundongos eram resultantes da morte celular nos processos mandibular e maxilar do primeiro arco branquial e também na extremidade ectodérmica do broto do membro. Sulik e colaboradores (1987) supuseram que a morte celular não era consequência de anormalidades nas células da crista neural, mas sim resultado de danos nos placóides ectodérmicos, que prejudicariam a migração celular posterior.

Esses estudos foram muito relevantes na compreensão dos mecanismos celulares que podem estar alterados durante o desenvolvimento facial. Entretanto, assim que se estabeleceu que a STC é causada por mutações patogênicas no *TCOF1*, passou-se a investigar sua contribuição no desenvolvimento craniofacial e porque mutações num gene que codifica uma fosfoproteína nucleolar, cuja função na biogênese de ribossomos parece ser tão determinante, resultam em malformações restritas à estrutura da cabeça e pescoço.

Dessa forma, em 1997, isolou-se o gene *Tcofl* de murídeos. Os genes de camundongos e humanos apresentam 65,9% de identidade ao nível de nucleotídeos e 71,6% de identidade ao nível protéico. A região 3' não traduzida também mostra 62,8% de identidade, valor relativamente alto que pode indicar importante papel na manutenção da função ou estabilização da proteína (Dixon *et al.*, 1997b; Paznekas *et al.*, 1997).

Análises de expressão em embriões de camundongos revelaram picos de expressão do *Tcofl* no neuroepitélio da borda da placa neural, antes da sua fusão, no início da especificação das células da crista neural; durante o desenvolvimento do processo frontonasal e nos arcos branquiais (Fig. 1.5) (Dixon *et al.*, 1997b; Dixon *et al.*, 2006). O pico de expressão é sobretudo detectado nos dias 8, 9 e 10 de gestação, diminuindo assim que o desenvolvimento embrionário progride, reduzido-se a níveis basais a partir do décimo primeiro dia de gestação (Dixon *et al.*, 1997b). Esses dados sugerem que altos níveis de expressão do *Tcofl* são requeridos durante o desenvolvimento craniofacial nos momentos críticos da morfogênese.

Em 2000, Dixon e colaboradores, com o intuito de investigar o papel da Treacle *in vivo*, geraram camundongos com perda de função de um dos alelos do *Tcofl*. Para isso, foi substituído o primeiro éxon do gene por um cassete com resistência à neomicina, originando camundongos machos quiméricos, os quais foram cruzados com

fêmeas C57BL/6, resultando numa prole heterozigota. Os camundongos *TcofI*^{+/-} apresentaram muitas características reminiscentes da STC, incluindo malformações da maxila e mandíbula, além de outras malformações não observadas na síndrome, como atraso do desenvolvimento, acrania, exencefalia e anoftalmia; sugerindo que o efeito da ablação de um dos alelos do *TcofI* seja mais drástico que em humanos. Tal é a gravidade do quadro, que os animais morrem 24 horas após o nascimento, devido a complicações respiratórias.

A influência do componente genético na determinação do fenótipo da STC foi investigada em diferentes linhagens de camundongos. A penetrância e severidade das malformações faciais variaram bastante, de moderadamente anormal até extremamente grave, indicando que o camundongo heterozigoto exibe um fenótipo dependente da linhagem (Fig. 1.6). Camundongos CBA/CA *TcofI*^{+/-} são mais afetados que C57BL/6, apresentando atraso de desenvolvimento, exencefalia e malformações craniofaciais importantes, como crescimento excessivo de cartilagem no complexo nasal, micrognatia e microftalmia. Camundongos C3H *TcofI*^{+/-} são menos afetados, mas ainda assim apresentam exencefalia e malformações faciais. Camundongos DBA/1 são moderadamente afetados, apesar de muitos exibirem micrognatia, microftalmia e desenvolvimento anormal do encéfalo (Dixon e Dixon, 2004b).

Ao se cruzar camundongos quiméricos DBA para o *TcofI*^{+/-} com outra linhagem de fêmeas (C57BL/6), conseguiu-se produzir um animal cujas malformações são similares às aquelas associadas à STC em humanos. Esses camundongos exibem uma cabeça pequena, diminuída ântero-posteriormente, resultando num crânio côncavo. Eles também apresentam malformações dos ossos nasal e frontal, da pré-maxila, maxila e palato. Análises histológicas mostraram que as lâminas palatinas não se fundiram e indicam que a passagem nasal está rudemente formada, com nenhuma evidência de septo nasal ou concha (Dixon e Dixon, 2004b; Dixon *et al.*, 2006).

Para estabelecer se problemas na migração das células da crista neural cefálica são os responsáveis por essas malformações, como originalmente proposto por Poswillo (1975), foram realizados experimentos que traçaram o destino dessas células, os quais indicaram que a migração das células da crista neural cefálica não estava alterada nos camundongos *TcofI*^{+/-} (Dixon e Dixon, 2004b; Dixon *et al.*, 2006).

No entanto, esses camundongos apresentavam um número muito reduzido de células da crista neural cefálica. Para quantificar essa redução, foram realizadas análises

de citometria de fluxo de células da crista neural marcadas com GFP, que indicaram uma diminuição de 25% na quantidade de células migratórias, quando comparada aos animais selvagens (Dixon *et al.*, 2006).

O número de células apoptóticas era também muito elevado no neuroepitélio da borda da placa neural e tubo neural no oitavo e nono dias do desenvolvimento dos embriões (E8 e E9) *Tcof1*^{+/-}, assim como havia uma drástica redução na quantidade de células proliferativas. Além disso, marcações com anticorpo para a subunidade 28S do RNA mostraram uma redução da imunoreatividade no neuroepitélio e mesênquima craniofacial derivado da crista neural em E8,75-E9 dos *Tcof1*^{+/-} (Dixon *et al.*, 2006). Tais fatos levaram à suposição de que a Treacle poderia interferir no controle do ciclo celular, por meio de seu papel na biogênese de ribossomos.

Em 2008, Jones e colaboradores realizaram uma análise de expressão genômica de embriões *Tcof1*^{+/-} e encontraram cinco genes que estavam com a expressão aumentada em relação ao controle: *Ccng1*, *Trp53inp1*, *Pmaip1*, *Perp* e *Wig1*. Todos esses genes estão relacionados ao controle e parada do ciclo celular; e pertencem a famílias gênicas cuja transcrição é ativada pela p53. A p53, cujo gene em murídeos é designado por *Trp53*, é uma proteína essencial para o crescimento celular normal, que tem sua atividade estritamente regulada: com uma meia-vida curta, de 20 a 30 minutos, a proteína é continuamente degradada. Mediante estresse celular, que pode incluir dano ao DNA, hipóxia e sinais proliferativos aberrantes, tais como a ativação de oncogenes, a p53 é estabilizada e se liga ao DNA como um tetrâmero, o que resulta na ativação de genes de regulação que estão envolvidos em processos celulares preponderantes, como o reparo de DNA, parada do ciclo celular, senescência e apoptose (Vasquez *et al.*, 2008).

A análise do neuroepitélio dos embriões *Tcof1*^{+/-} indicou um aumento de 1,8 vezes na quantidade de p53 quando comparada ao selvagem, estabelecendo uma correlação direta entre a estabilização da p53, a ativação da transcrição dos genes regulados pela p53 e a indução da apoptose neuroepitelial no embriões *Tcof1*^{+/-} (Fig. 1.7). A morte celular massiva, por sua vez, explica a depleção no número de células da crista neural observada na STC (Jones *et al.*, 2008).

A inibição farmacológica da p53, com pifitrina- α um inibidor químico da apoptose e transcrição ativada pela p53, reduziu substancialmente a morte celular no neuroepitélio dos embriões *Tcof1*^{+/-}. O crânio se tornou menos côncavo e o padrão dos

ossos nasal, frontal, pré-maxilar e maxila se assemelharam muito ao do camundongo selvagem (Fig. 1.8) (Jones *et al.*, 2008).

A reversão do fenótipo dos animais *Tcof1*^{+/-} também foi realizada utilizando-se camundongos mutantes para a p53. Na progênie do intercruzamento de camundongos *Tcof1*^{+/-} e *Trp53*^{+/-}, o nível de apoptose celular dos embriões *Tcof1*^{+/-}*Trp53*^{+/-} estava muito diminuído quando comparado aos embriões *Tcof1*^{+/-}*Trp53*^{+/+}, indicando que a perda de um dos alelos do gene da p53 já resulta em importante redução da morte celular no neuroepitélio. A perda de dois alelos da p53 reduz os índices de apoptose do embrião a níveis equivalentes aos animais selvagens. Além disso, a perda genética da p53 preveniu o aparecimento das malformações cranioesqueléticas nos camundongos *Tcof1*^{+/-} de uma maneira dose-dependente: 50% dos animais *Tcof1*^{+/-}*Trp53*^{+/-} e 100% dos *Tcof1*^{+/-}*Trp53*^{-/-} exibiram um fenótipo craniofacial que era indistinguível do selvagem, sem evidência de hipoplasia frontonasal, fissura palatina, microftalmia ou concavidade craniana (Jones *et al.*, 2008).

Dessa forma, o ponto de checagem da p53 deve atuar como um mecanismo de controle que monitora a produção de ribossomos no nucléolo e ativa uma resposta inibitória quando confrontado com estresse nucleolar e problemas na biogênese de ribossomos. Portanto, a haploinsuficiência da Treacle leva à estabilização nuclear da p53 e conseqüente ativação de genes relacionadas à parada do ciclo celular e ao desencadeamento da apoptose (Jones *et al.*, 2008). Assim, a depleção no número de células da crista neural cefálica que migram para constituir o mesênquima dos arcos branquiais resulta nas malformações craniofaciais características da STC.

1.6. Células-tronco mesenquimais

Células-tronco mesenquimais, que também podem ser definidas como células estromáticas mesenquimais multipotentes, são uma população de células heterogêneas que se prolifera *in vitro* como células aderentes, apresentando morfologia fibroblastóide (Horwitz *et al.*, 2005).

Essas células estão presentes em vários tecidos adultos e constituem populações de células pluripotentes capazes de se auto-renovar, pois suas células filhas são indiferenciadas e se replicam por muitas gerações sem perder as características originais (Mao *et al.*, 2006). *In vitro*, na presença de fatores de crescimento adequados, elas

podem se diferenciar em osso, tendão, músculo, tecido adiposo, cartilagem e outros tipos de tecido conjuntivo (Caplan, 2005). Além de seus derivativos naturais mesenquimais, elas têm o potencial de originar outros tipos celulares, como hepatócitos, células cardíacas, renais e neurais (Alhadalaq e Mao, 2004).

Fenotipicamente, as células-tronco mesenquimais expressam uma série de marcadores de membrana celular, nenhum dos quais é específico, como CD105 (também conhecido como endoglina), CD44, CD90 e CD73 (ecto-5'-nucleotidase); não expressando marcadores hematopoiéticos, como CD45 e CD34. Observa-se também um nível de expressão variável desses marcadores, dependente da espécie de origem celular, da fonte do tecido e condições de cultura (Ucelli *et al.*, 2008).

As células-tronco mesenquimais já conseguiram ser isoladas de diversos tecidos, como medula óssea, pele, tecido neural, retina, músculo esquelético, epitélio dentário e periósteo (Williams *et al.*, 1999; Erices *et al.*, 2000; Shi *et al.*, 2001; Gronthos *et al.*, 2002; Miura *et al.*, 2003; De Bari *et al.*, 2006). A facilidade de obtenção e cultura, assim como seu potencial, faz dessas células uma ferramenta terapêutica útil para diferentes aplicações clínicas (Minguell *et al.*, 2001).

Portanto, as células-tronco mesenquimais têm sido utilizadas para reconstituir tecidos ao serem cultivadas em uma matriz específica e implantadas no local da injúria (Caplan, 2007). O desenvolvimento de tecidos biológicos a partir de células-tronco já possibilitou a regeneração e a reconstrução de estruturas anatômicas complexas como o côndilo mandibular e a restauração de estruturas periodontais *in vivo* (Mao *et al.*, 2006). As células-tronco mesenquimais provenientes da medula óssea também já foram utilizadas no tratamento de fraturas ósseas, anemia severa, osteogênese imperfeita e na produção de tecido adiposo para a reposição e reconstrução de tecido mole (Fang *et al.*, 2006).

Pouco ainda se sabe a respeito dos mecanismos moleculares regulatórios das células-tronco mesenquimais, entretanto parece que alguns genes importantes na regulação da plasticidade das células-tronco embrionárias também poderiam atuar nas mesenquimais (Greco *et al.*, 2007), indicando que essas células possam apresentar um perfil de expressão mais próximo daquele encontrado durante o desenvolvimento.

1.7. Questões não respondidas

Os estudos em modelos animais demonstraram que o nível de Treacle é crítico durante o desenvolvimento embrionário. Entretanto, poucos estudos foram realizados com células adultas e quase nada se esclareceu a respeito da importância da expressão do *TCOF1* na vida pós-natal.

Issac e colaboradores (2000), em um estudo com fibroblastos e linfócitos humanos, demonstraram que a quantidade total da Treacle nessas células varia menos que duas vezes, independentemente delas serem originárias de pacientes com STC ou indivíduos normais. Sugeriu-se que haveria um mecanismo de compensação de dose, no qual o alelo normal manteria os mesmos níveis de expressão selvagem. Tal fato explicaria que a haploinsuficiência da Treacle e os efeitos adversos de seu truncamento ocorrem especificamente nos arcos branquiais e exclusivamente durante o desenvolvimento.

Entretanto, análises da expressão do *TCOF1* em linfócitos humanos constataram uma redução de 18% nos níveis de expressão gênica dos pacientes em relação a controles (Masotti, 2007). Dessa forma, menores níveis de expressão nas células adultas de pacientes com STC podem implicar numa deficiência de Treacle que poderia resultar em disfunções não necessariamente associadas ao desenvolvimento craniofacial.

O mesmo estudo de expressão do *TCOF1* revelou não haver correlação entre o nível de expressão do gene em linfócitos adultos e a gravidade das malformações da STC (Masotti, 2007). É possível que a deficiência de *TCOF1* em linfócitos não corresponda ao que acontece no período do desenvolvimento embrionário. Apesar de não existir nenhuma garantia que o perfil de transcrição de linfócitos seja equivalente aos níveis de expressão embrionários, pode-se especular se o modelo celular utilizado seria o mais adequado. Assim sendo, é importante estudar outros tecidos oriundos de pacientes com STC para avaliar aquele que seria ideal na análise do efeito funcional destas mutações em humanos. Talvez a análise do perfil de expressão de células adultas provenientes dos tecidos comprometidos na STC se aproximasse mais dos níveis encontrados no estágio embrionário; além de eventualmente auxiliar na elucidação da importância do gene na vida adulta.

Outra questão igualmente importante na STC diz respeito às correções cirúrgicas dos pacientes. A distração óssea, técnica que permite a indução *in situ* da

neosteogênese, é um método bastante utilizado para alongação mandibular, sobretudo por ser considerado um procedimento seguro com baixo índice de complicação (McCarthy e Hopper, 2002). No entanto, os resultados finais obtidos em pacientes portadores da STC nunca são muito satisfatórios, já que em muitos casos a estrutura esquelética mandibular retornou à forma anterior à distração (Karp *et al.*, 1992; Stelnicki *et al.*, 2002; Gürsoy *et al.*, 2008). Como a estimulação mecânica induz respostas biológicas de regeneração esquelética que é acompanhada por uma cascata de processos, incluindo a diferenciação de tecido pluripotente (Choi *et al.*, 2002), a distração óssea compartilha muitas características com a formação embriológica das estruturas craniofaciais. Assim, pode-se especular se a haploinsuficiência da *Treacle* não estaria limitando o alongamento do osso mandibular nos portadores de STC, como ocorre durante o desenvolvimento embrionário.

Dessa forma, um melhor entendimento do efeito mutacional no *TCOF1* no funcionamento de células não embrionárias poderá auxiliar no delineamento das funções do gene fase adulta, e estes resultados conseqüentemente poderão contribuir para melhorias no tratamento cirúrgico dos pacientes portadores da síndrome.

1.8. Objetivos

Verificar se haploinsuficiência de *TCOF1* em células não embrionárias derivadas de pacientes com STC levam a alterações funcionais.

Os objetivos específicos são:

1. Estabelecer culturas de células-tronco mesenquimais e fibroblastos oriundos de periósteo facial de indivíduos portadores da STC e controles normais; caracterizando as culturas celulares em relação ao imunofenótipo;
2. Verificar os níveis de *TCOF1* e a expressão do alelo portador da mutação patogênica em fibroblastos e células-tronco mesenquimais;
3. Analisar a capacidade proliferativa *in vitro* das células derivadas de pacientes portadores da STC;
4. Avaliar se as células com mutações patogênicas no *TCOF1* apresentam capacidade de diferenciação osteogênica semelhante aos controles e se há alteração da expressão do alelo mutado durante a diferenciação osteogênica;
5. Avaliar a expressão genômica nas culturas celulares e identificar proteínas que estão funcionalmente relacionadas ao *TCOF1*.

Fig. 1.1. Fácies típicos de pacientes portadores da síndrome de Treacher Collins.

Fig. 1.2. Construções da Treacle fusionada a GFP tranfectadas em células *Cos-1* evidenciando a localização da proteína no nucléolo. (A) Núcleos corados em azul com DAPI e nucléolos evidenciados com anticorpo anti-B23 em vermelho. (B) As mesmas células mostrando a localização nucleolar do construto fusionado a GFP contendo a proteína completa Treacle. (C) Visualização do construto da Treacle no nucléolo utilizando filtro duplo, com o qual se observa tanto a coloração do núcleo com DAPI quanto a proteína florescente GFP (modificado de Winokur *et al.*, 1998).

Fig. 1.3. Modelo de funcionamento da Treacle proposto por Gonzales e colaboradores (2005). Durante estágios iniciais da mitose, a Treacle se ligaria a regiões do DNA ribossômico impedindo o avanço da RNA polimerase I, cessando a transcrição. Modificações pós-traducionais e/ou a interação da Treacle com o UBF durante o final da telófase, resultaria na dissociação da Treacle do DNA ribossômico, permitindo com que a RNA polimerase iniciasse a transcrição. A Treacle também poderia se ligar na região promotora do DNA ribossômico e recrutar mais moléculas de UBF, estimulando a transcrição (modificado de Gonzales *et al.*, 2005).

Fig. 1.4. Estruturas faciais derivadas das células da crista neural cefálica. (A) Embrião evidenciando as correntes migratórias de células da crista neural que partem dos rombômeros e constituem os arcos branquiais (AB). (B) Estruturas da cabeça (em azul) e pescoço derivadas das células da crista neural cefálica que constituem os arcos branquiais (modificado de Carlson, 2004; e Santagati e Rijli, 2003).

Fig. 1.5. Hibridação *in situ* com sonda anti-senso mostrando padrões de expressão do *Tcofl*. (A) Em 8,5 dias pós-fertilização, coloração é evidente durante todo desenvolvimento cranial. Uma área de forte marcação é vista na região rostral de fusão do tubo neural. (B) Hibridação *in situ* do *Tcofl* de corte de embrião de camundongo selvagem no estágio 9,5 mostrando forte expressão do gene no mesênquima da maxila (**mx**) e mandíbula (**md**) do primeiro arco branquial. (C) No estágio 9,5, o embrião mostra uma forte marcação da expressão do *Tcofl* sobretudo nos primeiro e segundo arcos branquiais (setas) (modificado de Dixon *et al.*, 1997b; e Dixon *et al.*, 2006).

Fig. 1.6. Aparência morfológica de embriões selvagem (A) e heterozigotos *Tcofl*^{+/-} (B a F) provenientes de diferentes linhagens no dia embrionário 14,5. Os camundongos heterozigotos exibiram fenótipos dependentes da linhagem, já que a penetrância e severidade das malformações faciais variaram bastante, de moderadamente anormal até extremamente grave (modificado de Dixon e Dixon, 2004).

Fig. 1.7. (I) Imunoistoquímica para p53 de embriões *Tcof1*^{+/+} (a-c) e *Tcof1*^{+/-} (d-f) em E8,5, mostrando aumento quantidade de p53 nuclear nos embriões heterozigotos. (II) Hibridação *in situ* para o gene *Ccng1* (A e B), revelando aumento da expressão do gene no embrião heterozigoto (B). De (D) a (F), ensaio para apoptose pela coloração esverdeada do TUNEL, mostrando que os embriões das camundongos fêmeas que receberam pifitrina durante a gestação (F) apresentaram número de células em apoptose bastante próximo do controle selvagem (E) (modificado de Jones *et al.*, 2008).

Fig. 1.8. Esqueletos craniofaciais de embriões de camundongos no estágio E17,5 corados para osso (*alizarin red*) e cartilagem (*alcian blue*). Administração de pifitrina 12 dias *in utero* resultou em embrião com melhora substancial das malformações ósseas (C) quando comparado ao heterozigoto (B). Embrião *Tcof1*^{+/-}*Trp53*^{+/-} (D) mostrou esqueleto craniofacial completamente normal, indistinguível do embrião selvagem (A).

MATERIAL e MÉTODOS

MATERIAL e MÉTODOS

2.1. Pacientes e obtenção de tecidos

Os pacientes foram averiguados no Centro de Estudos do Genoma Humano (CEGH), da Cidade Universitária, no Departamento de Cirurgia Plástica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP (Dr. Nivaldo Alonso), no Departamento de Cirurgia Plástica da Sobrapar – Campinas (equipe do Dr. Cassio Eduardo Raposo do Amaral) e no Departamento de Cirurgia Plástica do Hospital Beneficência Portuguesa (equipe da Dra. Vera Cardim).

O principal critério para coleta de tecido foram as características clínicas dos pacientes, cujo diagnóstico clínico não seria dúvida, apresentando sinais típicos da síndrome de Treacher Collins (STC).

Para a seleção dos indivíduos considerados como controles, foram selecionadas pessoas submetidas a intervenções cirúrgicas não relacionadas a malformações ósseas, cuja causa, em sua grande maioria, foram acidentes automobilísticos e correções estéticas.

Os fibroblastos e células-tronco mesenquimais foram obtidos a partir de perióstio da face dos pacientes clinicamente diagnosticados como portadores da STC e indivíduos normais. O tecido foi coletado durante intervenções cirúrgicas nas quais ele seria normalmente removido e descartado.

2.2. Considerações éticas

Os pacientes que foram atendidos pelo CEGH passaram por uma consulta por equipe multidisciplinar constituída por geneticistas clínicos, biólogos e aconselhadores genéticos. As dúvidas dos familiares dos consulentes foram esclarecidas e informações adicionais sobre a pesquisa foram oferecidas durante a consulta. Os responsáveis pelos pacientes são informados sobre os testes genéticos disponíveis, a capacidade diagnóstica dos mesmos e a finalidade da consulta. A coleta do tecido removido durante a cirurgia,

que seria normalmente descartado, aconteceu somente após o consentimento do responsável. A divulgação científica e publicação dos dados dos pacientes, incluindo fotos, foram realizadas somente após autorização do responsável. Todos os pacientes que foram submetidos à triagem de mutações do *TCOF1* receberam um relatório escrito com o diagnóstico molecular.

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Instituto de Biociências da USP (Protocolo 067/2007). Todos os pacientes assinaram o termo de consentimento permitindo a participação nesta pesquisa (ANEXO I).

2.3. Estabelecimento das culturas de fibroblastos e células-tronco mesenquimais

A obtenção de células de tecido e a manutenção das culturas seguiram protocolos definidos em nosso laboratório (Bueno *et al.*, 2008).

Após a remoção cirúrgica, o periósteo foi acondicionado em meio de cultura contendo DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium*) (*GIBCO*) e 4% de antibiótico penicilina/estreptomicina (100 unidades/mL) (*GIBCO*) até ser transportado para o laboratório.

No laboratório, em ambiente estéril, o tecido foi lavado com PBS (*phosphate buffered saline* – *Sigma*) 0,01 M pH 7,4 suplementado com 4% de antibiótico para remover possíveis contaminações e células sanguíneas. Para obtenção de fibroblastos, o tecido é então cortado com bisturi em fragmentos de cerca de 1-4 mm² e acondicionados em garrafas de cultura de células (25 cm²) contendo apenas soro fetal bovino durante uma semana. Após este período, o soro fetal é substituído por meio de crescimento: DMEM (*GIBCO*) com 10% de soro fetal bovino (*GIBCO*) e 1% de antibiótico (penicilina/estreptomicina, 100 unidades/mL).

Para se obter as células-tronco mesenquimais, após a fragmentação do tecido, os fragmentos são digeridos em solução de tripsina-EDTA (0,25% de tripsina (*GIBCO*), 1 mM EDTA (*Invitrogen*)) durante 15 minutos a 37 °C e colocados em garrafas contendo meio de crescimento.

Dessa forma, foram designadas como cultura de células-tronco mesenquimais (STC3, STC4, controle 3 e controle 4) aquelas provenientes de tecidos submetidos à

digestão enzimática; enquanto que se denominou de fibroblastos (STC1, STC2, controles 1 e 2), às células advindas de tecidos diretamente acondicionados em soro fetal bovino.

As culturas foram todas mantidas em estufa a 37 °C em atmosfera umedecida com 5% de CO₂. Os tecidos foram conservados nestas condições por até um mês, aguardando-se o desprendimento das células.

2.4. Culturas celulares

As culturas celulares foram mantidas em meio de crescimento, trocado a cada dois ou três dias, em estufa a 37 °C em atmosfera umedecida com 5% de CO₂. A cada 5-10 dias, quando as células atingem uma confluência de cerca de 80% da área de crescimento, elas são lavadas em PBS e dissociadas numa solução de tripsina-EDTA (0,25% de tripsina, EDTA 1 mM) e replaqueadas em garrafas de cultura de 25 cm².

Para o congelamento, as células foram ressuspensas em meio contendo 80% de soro fetal bovino, 10% de DMEM e 10% de dimetilsulfóxido (DMSO – LGC); em uma concentração de $5,0 \times 10^5$ células por mL acondicionadas em tubos próprios para o congelamento. A temperatura foi então diminuída gradualmente, numa taxa de 1 °C por minuto, até alcançar a temperatura final de -70 °C, na qual elas foram mantidas durante 24 horas. Após este período, os tubos foram transferidos para o nitrogênio líquido. Durante o descongelamento, os tubos foram colocados em banho-maria a 37 °C por dois minutos e as células foram ressuspensas numa diluição de 10:1 em meio de crescimento, replaqueadas e colocadas em cultura.

2.5. Triagem de mutações no *TCOF1*

2.5.1. Extração de DNA das culturas celulares

Para verificar se os pacientes diagnosticados clinicamente como portadores da STC apresentavam mutação patogênica na região codificadora do *TCOF1*, foi isolado DNA das células em cultura. Para tanto, o precipitado celular foi digerido com proteinase K durante 16 horas e o DNA foi isolado por fenol-clorofórmio.

Também foi utilizado o *kit NucleoSpin® Tissue (Macherey-Nagel)* para extração do DNA celular, segundo especificações do fabricante. A lise celular se dá por incubação da amostra numa solução de proteinase K e SDS (dodecil sulfato de sódio). Condições apropriadas para a ligação do DNA na coluna de sílica são criadas por meio da adição de sais caotrópicos e etanol. Possíveis contaminações são removidas pela lavagem subsequente com dois tampões diferentes. O DNA genômico purificado é, então, finalmente eluído em tampão levemente alcalino.

2.5.2. Amplificação dos fragmentos de DNA

O DNA genômico e cDNA dos pacientes foi amplificado pela reação em cadeia da polimerase (sigla em inglês PCR, *polymerase chain reaction*) nas seguintes condições: 5 minutos de desnaturação do DNA a 95 °C; 35 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 40 segundos na temperatura de hibridação (em inglês *annealing*, temperatura especificamente calculada para cada par de *primers*) e 40 segundos a 72 °C; seguidos de uma etapa de extensão de 10 minutos a 72 °C. Para cada 15 µL de reação foram utilizados: 150 ng de DNA genômico ou 30 ng de cDNA, tampão 1x, 1 unidade de Taq DNA Polimerase (*GE Healthcare*), 200 µM de dNTPs (*GE Healthcare*) e 0,5 µM de cada *primer*. A amplificação do DNA foi verificada em gel de agarose 1,5% (*Invitrogen*) submetido à eletroforese horizontal, corado com brometo de etídeo (0,5 µg/mL) e visualizado sob luz ultravioleta.

Os *primers* (oligonucleotídeos iniciadores) utilizados para a amplificação dos éxons do gene *TCOF1* foram publicados por Gladwin e colaboradores (1996), Treacher Collins Collaborative Group (1996), Edwards e colaboradores (1997), Wise e colaboradores (1997). As seqüências desses *primers*, assim como a metodologia de triagem de mutações no *TCOF1*, estão descritas em Splendore (2002). Apenas para os éxons 7, 17 e 20 foram sintetizados novos oligonucleotídeos iniciadores utilizando-se o programa *Primer3* (<http://frodo.wi.mit.edu/>), assim como para a amplificação cDNA do alelo mutado dos quatro pacientes portadores da STC, descritos na Tabela 2.1.

Tabela 2.1. *Primers* utilizados para a triagem de mutações nas junções íntrons-éxons dos éxons 7, 17 e 20 do gene *TCOF1* e para a amplificação do cDNA do alelo mutado dos quatro pacientes portadores da STC

Nome	Tamanho	Annealing	Direto (5'-3')	Reverso (5'-3')
Éxon 7	367 pb	55 °C	CTCTGGACTTTATCCTAAAGGCATC	AGAGTGGGAGAACAAGTCCTGAG
Éxon 17	381 pb	55 °C	TTGCCTTGTAACAACTCCCTAAC	CAACACCTTGCTATGTGACTCAG
Éxon 20	359 pb	55 °C	TTCCTGGCCCTACTGAAGTG	CACACAACACCCTCTTCCTG
Éxon 5 RT	470 pb	57 °C	AACAAACCTCAGAGCTTGGTCG	TCCACGTCTGTCTCATCACTGG
23CF/4RcDNA	250 pb	55 °C	GAGAGACAAAGCAAGTGGTG	CTGGGACGGTGACTCAGAAAT

2.5.3. Seqüenciamento

Para o seqüenciamento, os produtos de PCR (8 µL), foram purificados por meio da adição de 10 unidades da enzima Exonuclease I (EXO, *USB*) e 5 unidades da enzima Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP, *GE Healthcare*), seguido de incubação a 37 °C por 1 hora e inativação das enzimas a 80 °C por 15 minutos. O produto de PCR purificado foi quantificado por meio de eletroforese em gel de agarose 1,5% com utilização do marcador de peso molecular *Low DNA MassTM Ladder* (*Invitrogen*). O seqüenciamento foi realizado com 30 a 100 ng de produto de PCR purificado, em ambas as direções segundo o protocolo do kit *BigDyeTM Terminator Cycle Sequencing* (*GE Healthcare*). A reação foi iniciada com uma etapa de desnaturação a 96 °C, seguida de 30 ciclos de desnaturação a 96 °C por 10 segundos, temperatura de *annealing* por 5 segundos e extensão a 60 °C por 4 minutos. A precipitação dos produtos foi realizada com isopropanol 65% e etanol. Os produtos foram analisados no seqüenciador automático *ABI PrismTM Genetic Analyzer* (*GE Healthcare*).

2.5.4. Nomenclatura das mutações

Todas as mutações descritas neste trabalho foram nomeadas de acordo com a isoforma mais abundante do gene *TCOF1* (AY460334) (Splendore *et al.*, 2005).

2.6. Citometria de fluxo

Com o intuito de caracterizar os fibroblastos e as células-tronco mesenquimais com relação ao imunofenótipo, foram realizados experimentos de citometria de fluxo. Neste procedimento as células são alinhadas em um microcapilar e analisadas uma a uma por um feixe de laser capaz de detectar a fluorescência emitida pelas células. Os sinais gerados são interpretados por um sistema computacional que os transforma em dados para posterior análise.

As células foram ressuspensas em PBS e incubadas a 4 °C por 30 minutos. Foram utilizados os seguintes anticorpos monoclonais fluorescentes anti-humanos para os seguintes antígenos: CD29 e CD117 conjugados à cianina (PE-Cy5), cuja emitância é na faixa de comprimento de onda do vermelho; CD44, CD45 e HLA-ABC conjugados à fluorescina (FITC), com emitância na faixa do verde; e CD31, CD73, CD90 e HLA-DR conjugados à ficoeritrina (PE), cuja emitância é na faixa do amarelo; todos da *Becton Dickinson (BD)*. Também foram utilizados os anticorpos CD105, SH3 e STRO-1 (*BD*) não conjugados a moléculas fluorescentes, que foram incubados com um anticorpo secundário da *Guava Express* anti-camundongo com ficoeritrina (PE).

Foram utilizadas $4,0 \times 10^5$ células para cada marcador. Depois de lavados com PBS, os anticorpos primários não-conjugados foram incubados com anticorpo secundário conjugado a ficoeritrina (PE). A porcentagem de células foi calculada a partir da aquisição de 5.000 eventos celulares. Para a delimitação das células positivamente marcadas, foram feitos controles não marcados para os três comprimentos de onda dos anticorpos primários e secundário fluorescentes: vermelho, verde e amarelo. Todos os gráficos gerados foram analisados pelo *software Guava ExpressPlus (Guava Technologies)*.

2.7. Ensaios de proliferação celular

Para a confecção das curvas de crescimento, as células foram contadas em hemocítmetro e plaqueadas na concentração de 15.000 células por poço, em placa de 12 poços; realizando-se triplicatas para todas as amostras. Aguardaram-se 24 horas para total adesão celular. Após este período, o meio de crescimento foi retirado, a placa foi lavada com PBS e adicionou-se meio de careciamento, o qual não contém soro fetal bovino, com o intuito de parar as divisões celulares para que todas as células se

encontrassem no mesmo estágio do ciclo celular no momento de inclusão do soro e início da contagem, ou seja, com a finalidade de sincronizar o ciclo celular das células. As células foram carenciadas, portanto, durante 40 horas; tempo necessário para que o número celular não aumentasse, indicando a paralisação das divisões celulares, determinado por um teste prévio. Em seguida, o meio de carencimento foi substituído pelo de crescimento e a cada 24 horas as células eram dissociadas com uma solução de tripsina-EDTA (150 µL), ressuspensas em meio de crescimento (150 µL) e contadas pelo citômetro de fluxo *Guava EasyCyte Flow Cytometer* (*Guava Technologies*), utilizando o software *Guava ExpressPlus 2.0* (*Guava Technologies*).

2.8. Diferenciação osteogênica

Foram submetidas à diferenciação osteogênica duas culturas celulares de células-tronco mesenquimais e uma cultura de fibroblastos provenientes de pacientes portadores da STC. As células foram cultivadas em placas de 12 poços em uma concentração de 5000 células por cm² de área. Ao meio de cultura de crescimento foram adicionados 10⁻⁷ M de dexametasona (*Sigma*), 50 µM de ácido ascórbico 2-fosfato (*Sigma*) e 10 mM de β-glicerolfosfato (*Sigma*). As células foram incubadas com o meio de diferenciação por 21 dias, o qual foi trocado a cada 3-4 dias. Com o intuito de detectar os depósitos de cálcio, as células foram submetidas no 21º dia de diferenciação à coloração de *von Kossa*, na qual as células são tratadas com uma solução de nitrato de prata 1% e fixadas em etanol. A prata irá substituir os cátions de cálcio da matriz mineralizada das células diferenciadas, o qual é reduzido por luz ultravioleta, resultando em depósitos em tons marrom.

2.9. Extração de RNA das culturas de células

Foi extraído RNA tanto das células mantidas em meio de crescimento quanto das células submetidas à diferenciação óssea. As células dos controles e pacientes contidas nas garrafas de cultura celular foram lisadas e o RNA total foi extraído de acordo com a técnica de extração de RNA isolado a partir de linfócitos com o uso de *TRIzolTM* (*Invitrogen*), adaptado para a extração de RNA de células em cultura. O RNA total foi diluído em água tratada com DEPC (dietilpirocarbonato) e purificado utilizando-se o *RNeasy kit* (*QIAGEN*), conforme especificações do fabricante. Nesta

purificação, etanol foi adicionado às amostras, com o intuito de assegurar as condições ideais de ligação do RNA à coluna de sílica. Em seguida, a amostra foi aplicada na coluna *RNeasy Mini spin*, na qual o RNA total se liga à membrana e os possíveis contaminantes são eficientemente lavados. O RNA foi, então, eluído em 30-100 µL de água sem RNases.

A qualidade do RNA foi verificada por meio de eletroforese em gel de agarose (1,2% de agarose, 2% de brometo de etídeo diluídos em tampão TBE), após desnaturação a 60 °C e visualizados com o uso de luz ultravioleta, fotografados e quantificados pelo espectrofotômetro *NanoDrop ND 1000* (espectrofotômetro da *Peqlab Biotechnologie*).

2.10. Expressão gênica

2.10.1. Síntese de cDNA

A síntese de cDNA das culturas celulares de pacientes e controles foi realizada com a enzima transcriptase reversa *SuperScript II* (*Invitrogen*). A 3 µg de RNA é adicionado 0,5 µg oligo(dT) (*Invitrogen*), 1 mM de dNTP (*Invitrogen*) e o volume é acertado para 10 µL. Essa mistura é aquecida a 65 °C por 5 minutos e, em seguida, rapidamente resfriada em gelo. À essa reação, é então adicionado o tampão da enzima *SuperScript II* 1x (*Invitrogen*), 5 mM de MgCl₂, 10 mM de DTT, 1 unidade de *SuperScript II* (*Invitrogen*) e 1 unidade de RNase OUT (*Invitrogen*). A mistura é mantida a 50 °C por 60 minutos e inativada a 70 °C por 15 minutos. Após isso, acrescenta-se 1 unidade de RNase H (*Invitrogen*), mantendo-se a mistura a 37 °C por 10 minutos.

2.10.2. Análise de expressão por PCR quantitativo em tempo real (PCRq-RT)

A metodologia utilizada para a análise da expressão gênica por PCRq-RT foi o *SYBR Green* (*Applied Biosystems*). O SYBR Green é uma molécula intercalante que, quando se liga a nucleotídeos de fita dupla emite uma fluorescência. Como ele é adicionado a PCR, à medida que novas moléculas são sintetizadas com o passar dos

ciclos da reação, a fluorescência aumenta. O aparelho *ABI Prism 7500 Sequence Detection System (Applied Biosystems)* detecta a fluorescência crescente: quanto mais tardio o ciclo que a fluorescência é detectada, menor a expressão do gene. O valor quantitativo de expressão, denominado CT (*Cycle Threshold*) é obtido durante a reação e corresponde ao valor máximo da taxa de amplificação. Esse parâmetro é analisado pelo programa do aparelho.

As reações foram feitas em placas de 96 poços (*MicroAmp Optical, Applied Biosystems*) em triplicata, cada uma com volume final de 25 µL, contendo 12,5 µL de *SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems)*, 200 a 800 nM de cada *primer* e de 0,3 a 60 ng de cDNA. As concentrações dos *primers* foram padronizadas considerando-se dois fatores: utilização das menores concentrações a fim de evitar dímeros de *primers* e obtenção dos menores valores de CT possíveis. A quantidade de cDNA é definida como aquela suficiente para obtenção do menor CT.

Quanto à ciclagem foi utilizado o padrão recomendado: 50 °C por 2 minutos, 95 °C por 10 minutos, 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos e 60 °C por 1 minuto.

As seqüências dos *primers* de cada transcrito de interesse foram desenhadas utilizando o programa *PrimerExpress v. 2.0 (Applied Biosystems)* e estão descritas na Tabela 2.2. É importante ressaltar que todos os *primers* foram desenhados para amplificar regiões de junções de éxons, com o intuito de evitar a amplificação de DNA genômico. Os oligonucleotídeos iniciadores dos genes *TLR4*, *CDH13* e *ACTG2* foram publicados por Kanczkowski e colaboradores (2008); Jin e colaboradores (2008); e Untergasser e colaboradores (2004); respectivamente. Todos os *primers* foram testados por meio da análise da curva de dissociação, realizada após a reação de PCRq-RT, para verificar a formação de dímeros de *primers* ou a amplificação de produtos inespecíficos, o que interfere na quantificação real do transcrito alvo. Nesta reação, a temperatura se eleva gradualmente de 60 °C para 95 °C a 0,2 °C por segundo, durante 20 minutos. Todos os *primers* desenhados não apresentaram a formação de dímeros, nem tampouco a amplificação de produtos inespecíficos.

Tabela 2.2. Sequência dos *primers* dos genes alvos e endógenos utilizados para análise de expressão por PCR quantitativo em tempo real.

Gene	Primer F (5'-3')	Primer R (5'-3')	Concentração final	Eficiência de amplificação
<i>TCOF1</i>	GCCCCTGGAAAAGTTGTCAC	GGTTTCTCACTGGTGGCTTCAC	200 nM	1,92
<i>HPRT1</i>	TGACACTGGCAAAACAATGC	GGTCCTTTTCACCAGCAAGCT	600 nM	1,99
<i>HMBS</i>	GGCAATGCGGCTGCAA	GGGTACCCACGCGAATCAC	200 nM	2,03
<i>SDHA</i>	TGGGAACAAGAGGGCATCTG	CCACCACTGCATCAAATTCA	600 nM	1,97
<i>GAPDH</i>	TGCACCACCAACTGCTTAGC	GGCATGGACTGTGGTCATGA	400 nM	2,22
<i>CDH13</i>	ATGTTGGCAAGGTAGTCGATAGTG	ACGCTCCCTGTGTTCTCATTG	400 nM	1,78
<i>DAXX</i>	AGACGGTTTCTGAGAGCAGGAA	CAGCTGCTTCATCTTCGTCATC	600 nM	1,74
<i>SGCG</i>	AACCTGTAGGATGGTGCGTGA	AGCGCTTTCTCCAGCCATAAAT	600 nM	1,62
<i>TLR4</i>	TGAATTTCTACAAAATCCCCGACAA	AGAGGTGGCTTAGGCTCTGATATGC	600 nM	1,85
<i>ACTG2</i>	AGAAGAGCTATGAGCTGCCA	GCTGTGATCTCCTTCTGCAT	600 nM	1,82

Os transcritos alvos selecionados foram quantificados em uma amostra de RNA utilizando-se quantidades iniciais conhecidas deste (60, 30, 6, 3 e 0,3 ng). Este procedimento é necessário para avaliar se existe uma amplificação proporcional à quantidade inicial do transcrito na amostra. Dessa forma, foi construído um gráfico com os CTs em função da quantidade logarítmica das amostras, que resultou em curvas-padrão lineares para todos os transcritos, cujo valor médio da correlação linear foi de 0,9947, mostrando uma amplificação proporcional desses transcritos.

O coeficiente da reta foi utilizado para calcular o valor de eficiência de cada par de *primers*, segundo a fórmula: $E = 10^{-1/\text{coeficiente da reta}}$. Se a eficiência for igual a 2, significa que há uma amplificação de 100% da quantidade inicial de cDNA a cada ciclo do PCR.

As quantificações dos transcritos alvos não podem ser utilizadas para as análises estatísticas no seu valor absoluto, devendo ser este valor comparado à quantificação de um gene envolvido em funções básicas necessárias para a manutenção da célula, os chamados *housekeeping genes*, os quais são tidos como os controles endógenos. Sendo assim, foram utilizados como controles endógenos os genes do complexo da succinato-

desidrogenase subunidade A (*SDHA*), o gene da hipoxantina-guanina-fosforribosiltransferase (*HPRT1*), o gene da gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase (*GAPDH*) e o gene da sintase do hidroximetilbilano (*HMBS*); quantificando-se a expressão destes genes em todas as amostras.

O programa *geNorm* v. 3.4 (www.medgen.ugent.be/genorm/), utilizando os valores de quantificação destes quatro genes, foi utilizado para determinar os genes de referência mais estáveis e calcular um fator de normalização para cada uma das amostras (FN). Os princípios das análises e cálculos feitos programa *geNorm* estão descritos em Vandesompele e colaboradores (2002).

Os valores de quantificação normalizados de cada amostra foram obtidos da seguinte maneira:

- **Cálculo do ΔCT** : este valor é obtido subtraindo-se o valor de CT obtido para a amostra do valor do CT de uma amostra referência;
- **Cálculo do $\Delta\Delta CT$** : é o valor resultante da eficiência de cada par de *primers* que amplifica o transcrito em questão, elevado ao valor do ΔCT da amostra;
- **Valor normalizado final**: obtido através da divisão do valor de $\Delta\Delta CT$ pelo valor do fator de normalização gerado pelo programa *geNorm*.

Para a amostra referência, foi sintetizado cDNA a partir de um *pool* de RNAs de seis dos indivíduos analisados.

Aplicou-se o teste *t* bilateral não pareado com correção de Welch para verificar a existência de uma diferença significativa nos níveis de expressão do gene alvo entre pacientes e controles.

2.10.3. Microarray

As análises da expressão das culturas celulares provenientes de pacientes e controles foram realizadas por *microarray* com a lâmina *Human Gene 1.0 ST* (Affymetrix). O *GeneChip® Whole Transcript Sense Target Labeling* (Affymetrix) é designado para gerar DNAs senso amplificados e marcados com biotina, resultantes da expressão de todo o genoma, sem nenhum tipo de viés. O procedimento de todo o experimento encontra-se melhor detalhado na Fig. 2.1.

A partir de 100 ng do RNA total, o cDNA dupla fita é sintetizado com hexâmeros randômicos contendo uma cauda de T7, que age como uma seqüência promotora. O cDNA dupla-fita é subseqüentemente utilizado como molde e amplificado pela polimerase T7 RNA (*Affymetrix*), produzindo muitas cópias de cRNA anti-senso. No segundo ciclo de síntese do cDNA, hexâmeros randômicos são utilizados como oligonucleotídeos iniciadores para a transcrição reversa do cRNA, resultando em DNA simples-fita senso. Durante o segundo ciclo da transcrição reversa é também adicionado dUTP à reação. O DNA simples-fita é, então, tratado com uma combinação de DNA uracil glicosilase (UDG) e endonuclease apurínica/apiridímica 1 (APE 1), as quais reconhecem especificamente os resíduos de dUTP e quebram a fita de DNA. Em seguida, o DNA é marcado pela transferase deoxinucleotídeo terminal (TdT) com *DNA Labeling Reagent* (*Affymetrix*), que é covalentemente ligado à biotina.

Este cDNA é hibridado por 17 horas à lâmina *Human Gene 1.0 ST* com o auxílio de um forno de hibridação a 45 °C a 60 rpm. O processo de marcação por *Streptavidina* e de lavagem da lâmina ocorre na estação fluídica (*GeneChip® Fluidics Station 450*), comandada por um computador. Por fim, as lâminas são escaneadas pelo *GeneChip® Scanner 3000 7G System* e um relatório de controle de qualidade é gerado pelo *Affymetrix® Expression Console™ Software*.

A análise foi realizada com o auxílio da bioinformata Ma. Daniele Yumi Sanaga. Os dados foram normalizados com o método RMA (*Robust Multi-array Average*) do pacote *Affy* do projeto *Bioconductor* (Gentleman *et al.*, 2004; Gautier *et al.*, 2004). Para a seleção dos genes diferencialmente expressos (GDEs) foram utilizados dois algoritmos, o *Limma* (Smyth, 2004) e o *RankProd* (Hong *et al.*, 2006), ambos também disponibilizados no *Bioconductor* do programa R.

Em seguida foram adicionadas a cada arquivo de normalização as informações de anotação disponibilizadas pela ferramenta *NETAFFX* da *Affymetrix* (<http://www.affymetrix.com/>). Com estas informações de anotação, foi possível retirar as *probes* controles. Com a retirada dos controles, o total de genes passou de 32321 para 28231 genes.

A bioinformata Ma. Daniele Yumi Sanaga desenvolveu um macro em *Visual Basic* no *Microsoft Excel* para a identificação dos GDEs comuns aos métodos *Limma* e *RankProd*, que foram utilizados nos passos posteriores da análise.

Fig. 2.1. Esquema do procedimento de *microarray* utilizando a lâmina *Human Gene 1.0 ST* (Affymetrix) (modificado de *GeneChip® whole transcript (WT) sense target labeling assay manual, version 4*).

RESULTADOS

RESULTADOS

3.1. Estabelecimento das culturas celulares

Foram estabelecidas culturas de células oriundas de periósteo facial de quatro pacientes clinicamente diagnosticados como portadores da síndrome de Treacher Collins (STC). Essas culturas foram denominadas: STC1 (paciente F2334-1); STC2, (paciente F2441-1); STC3 (paciente F2625-1) e STC4 (paciente F3161-1). Estabeleceram-se também culturas de células a partir de tecidos de indivíduos não portadores da STC e, portanto, considerados como controles, designados de controles 1, 2, 3 e 4 (registros F1693, F3046, F2626 e F3383, respectivamente).

Conforme o protocolo utilizado para estabelecimento da cultura celular primária (seção 2.3 de Material e Métodos), as culturas STC1, STC2, controles 1 e 2 foram consideradas como fibroblastos enquanto as STC3, STC4, controles 3 e 4 foram consideradas como células-tronco mesenquimais. Todas as populações de células estabelecidas mostraram uma morfologia homogênea, isto é, as células eram fusiformes e alongadas, tipicamente fibroblastóides.

3.2. Caracterização clínica e triagem de mutações dos pacientes

Todos os pacientes, dos quais se obtiveram os tecidos para a cultura celular, apresentavam características típicas da STC, isto é, fendas palpebrais com inclinação anti-mongolóide; hipoplasia do arco zigomático e da mandíbula e coloboma na pálpebra inferior (Fig. 3.1). Realizou-se a triagem de mutações de seus 28 éxons, que ao todo compreendem 29 diferentes amplicons, em amostras de DNA de cada um dos pacientes em estudo.

Encontrou-se uma inserção de quatro pares de bases no éxon 3 do *TCOF1* na posição c.218_222insAACC na amostra de DNA do paciente STC1 (Fig. 3.2). Esta mutação resulta na formação de um códon de parada prematura na trinca seguinte à inserção.

Em outro paciente (STC2) foi encontrada uma duplicação de um par de bases no éxon 24 na posição c.4344dupA (Fig. 3.3), que leva à formação de um códon de parada prematura na posição c.4407.

No paciente STC3 foi encontrada uma deleção de um par de bases no éxon 5, posição c.431delC (Fig. 3.4), que altera o quadro de leitura, provavelmente levando à alteração de *splicing* e criando um possível códon de parada prematura na posição intrônica original g.11255.

O paciente STC4 possui uma mutação no éxon 23 na posição c.4218dupG (Fig. 3.5) que resulta na formação de um códon de parada prematura em c.4284.

3.3. Citometria de fluxo

Realizamos experimentos de citometria de fluxo com diversos marcadores com o intuito de caracterizarmos as culturas celulares em relação ao seu imunofenótipo. As células-tronco mesenquimais dos pacientes STC3 e STC4 e do controle 3, assim como os fibroblastos das amostras STC1, SCT2, e controle 1, mostraram marcação positiva de mais de 95% para os antígenos CD29, CD44, CD73(SH4), CD90, CD105(SH2) e HLA-ABC (Tabela 3.1). Além disso, não apresentaram marcação para os antígenos CD31, CD45, CD117, STRO-1, HLA-DR (Fig. 3.6, Tabela 3.1, ANEXO II).

Os fibroblastos das amostras STC1, SCT2, e controle 1 apresentaram marcadores típicos de células-tronco mesenquimais com marcação positiva para mais de 95% da população celular (Fig. 3.6, Tabela 3.1, ANEXO II), sendo inexistentes os antígenos de origem hematopoiética, endotelial e leucocitária (ANEXO II).

Por outro lado, os fibroblastos e as células-tronco mesenquimais de dois controles (controle 2 e 4) apresentaram menor porcentagem de células marcadas positivamente (<90%) para os antígenos de células-tronco mesenquimais, como CD73(SH4) e CD105(SH2) (Tabela 3.1, ANEXO II). Portanto, estes resultados indicam que estas populações celulares são mais heterogêneas. A representação gráfica dos resultados dos marcadores do controle 2, por exemplo, evidencia que esta cultura é composta de duas populações celulares distintas, já que em todos os marcadores nos quais há uma população marcada, encontra-se outro pico com um número menor de células de uma população diversa que não apresenta o antígeno (ANEXO II).

Tabela 3.1. Porcentagem das populações celulares que são positivamente marcadas para os antígenos característicos de células-tronco mesenquimais.

	CD29	CD44	CD73(SH4)	CD105(SH2)/SH3	HLA-ABC
STC1 (fibroblastos)	99,62%	98,26%	99,63%	99,14%	98,72%
STC2 (fibroblastos)	98,38%	72,40%	99,08%	98,34%	97,20%
STC3 (células-tronco)	97,62%	97,34%	98,34%	95,26%	96,80%
STC4 (células-tronco)	99,68	99,74%	97,68%	97,80%	99,52%
controle 1 (fibroblastos)	98,78%	97,30%	97,94%	97,94%	95,60%
controle 2 (fibroblastos)	90,68%	84,56%	82,88%	84,32%	71,48%
controle 3 (células-tronco)	98,98%	98,08%	97,34%	98,68%	97,86%
controle 4 (células-tronco)	81,10%	62,50%	88,88%	82,80%/84,67%	86,67%

3.4. Níveis de *TCOF1* em células não embrionárias e expressão do alelo portador da mutação patogênica

3.4.1. Análise da expressão do *TCOF1*

Não se observou diferença estatisticamente significativa nos níveis de expressão do gene *TCOF1* entre células-tronco mesenquimais *versus* fibroblastos do grupo controle ($p=0,3122$) ou do grupo dos pacientes ($p=0,4083$). Dado a semelhança dos níveis de expressão entre estes dois tipos celulares estudados e considerando-se o pequeno número amostral, reunimos os dados de expressão do *TCOF1* em células-tronco mesenquimais e fibroblastos, de forma que se passou a ter apenas dois grupos para as análises subseqüentes: um de pacientes e outro de controles.

Ao se comparar o grupo dos pacientes ($0,9687 \pm 0,2244$) com o controle ($1,4139 \pm 0,2207$), observa-se que os níveis de expressão do *TCOF1* são significativamente diferentes entre os dois grupos ($p=0,0213$, teste t bilateral não pareado com correção de Welch; Fig. 3.7; Tabela 3.2). Os pacientes apresentaram uma redução de aproximadamente 31% no nível de transcrição do *TCOF1*.

Tabela 3.2. Níveis de expressão relativa do *TCOF1* em células-tronco mesenquimais e fibroblastos de pacientes e controles.

Amostra	$\Delta\Delta CT$	FN	Expressão Normalizada	Média	Desvio Padrão
Pacientes				0,97	0,22
STC1 - fibroblastos	1,16	1,16	0,99		
STC2 - fibroblastos	0,77	1,08	0,71		
STC3 - células-tronco	0,64	0,70	0,91		
STC4 - células-tronco	0,85	0,68	1,25		
Controles				1,41	0,22
1 - fibroblastos	2,32	1,28	1,81		
2 - fibroblastos	1,22	0,90	1,36		
3 - células-tronco	1,18	1,05	1,13		
4 - células-tronco	1,58	1,12	1,41		
F1694 - fibroblastos	1,34	0,97	1,38		
F3561 - células-tronco	1,78	1,28	1,39		

3.4.2. Expressão do alelo portador da mutação patogênica

Com o intuito de avaliarmos se há expressão dos dois alelos do gene *TCOF1* nas células dos pacientes com STC, realizamos o seqüenciamento da região do cDNA que contém a mutação de cada um dos quatro pacientes.

O seqüenciamento do cDNA do paciente STC1 mostrou a presença de dois picos no eletroferograma, cuja relação entre as áreas parece ser muito próxima do seqüenciamento do DNA genômico (Fig. 3.2).

Nos pacientes STC2, STC3 e STC4, o seqüenciamento do cDNA mostrou que a relação dos picos no eletroferograma é diferente do seqüenciamento do DNA genômico, sugerindo que há uma maior proporção do transcrito com o alelo selvagem do que daquele portador da mutação patogênica (Figs. 3.3 a 3.5).

3.5. Análise de proliferação das células em cultura

Estabelecemos curvas de crescimento de cada uma das culturas celulares por um período de 96 horas. Observou-se que o crescimento celular das culturas de fibroblastos

STC1 e STC2 apresentam taxas de proliferação semelhante aos controles, assim como a cultura de células-tronco mesenquimais STC4 (Fig. 3.8). Somente a população celular derivada de STC3 apresentou uma taxa de proliferação menor que as outras duas culturas de células-tronco mesenquimais (Fig. 3.8).

3.6. Diferenciação osteogênica

Duas culturas de células-tronco mesenquimais (STC3 e STC4) e uma das culturas de fibroblastos (STC1) foram submetidas ao protocolo de diferenciação osteogênica. Observou-se a formação de depósitos de cálcio pelo método de reação de *von Kossa* nas culturas submetidas à diferenciação, semelhante à deposição observada em uma cultura de células-tronco mesenquimais provenientes de cordão umbilical utilizada como controle positivo, cuja diferenciação osteogênica já estava estabelecida (Figs. 3.9 e 3.10). Observa-se que a deposição da matriz calcária é evidente apenas nas culturas induzidas à diferenciação osteogênica, enquanto que nas culturas não induzidas e também coradas pelo método de *von Kossa* não há sinal de deposição de prata (Figs. 3.9 e 3.10).

Extraímos o RNA de uma cultura de células-tronco mesenquimais (STC3) e outra cultura de fibroblastos (STC1), ambas derivadas de pacientes com STC, no 21º de diferenciação para verificar se a expressão do alelo portador da mutação patogênica no gene *TCOF1* sofreria alguma alteração após a indução osteogênica. O seqüenciamento do cDNA da diferenciação mostrou-se muito semelhante ao seqüenciamento do cDNA das células não diferenciadas (Figs. 3.2 e 3.4), indicando que possivelmente não há alteração da expressão do alelo mutado durante a diferenciação osteogênica.

3.7. Expressão genômica das culturas celulares

Realizou-se a análise da expressão genômica por meio de *microarray* das quatro culturas celulares oriundas de pacientes com STC (fibroblastos: STC1 e STC2; células-tronco mesenquimais: STC3 e STC4) e de quatro culturas celulares controles (fibroblastos: controle 1 e 2; células-tronco mesenquimais: controles 3 e 4) utilizando a lâmina *Human Gene 1.0 ST (Affymetrix)*.

Para a seleção dos genes diferencialmente expressos (GDEs) foram utilizadas duas abordagens estatísticas distintas implementadas pelos pacotes *Limma* (Smyth, 2005) e *RankProd* (Hong *et al.*, 2006). O *RankProd* é um método estatístico não-paramétrico, desenvolvido originalmente do método *rank product* (Hong *et al.*, 2006). Já o *Limma* emprega uma combinação de modelo linear com o método de *Bayes* empírico (Smyth, 2005). Os dois métodos são indicados para o processamento de um pequeno número de amostras.

Foram realizadas três comparações distintas (Tabela 3.3):

- ❖ Fibroblastos com mutações patogênicas no *TCOF1* (STC1 e STC2) *versus* controles de fibroblastos (controles 1 e 2); dos quais foram encontrados 37 genes diferencialmente expressos (Tabela 3.4);
- ❖ Células-tronco mesenquimais com mutações patogênicas no *TCOF1* (STC3 e STC4) *versus* controles de células-tronco mesenquimais (controles 3 e 4), que revelou 23 genes diferencialmente expressos (Tabela 3.5);
- ❖ Células com mutações patogênicas no *TCOF1* (fibroblastos: STC1 e STC2; e células-tronco mesenquimais: STC3 e STC4) *versus* controles (fibroblastos: controles 1 e 2; células-tronco mesenquimais: controles 3 e 4), cuja análise resultou em 31 genes diferencialmente expressos (Tabela 3.6).

Tabela 3.3. Quantidade de GDEs selecionada pelos algoritmos *Limma* e *RankProd* a partir das análises de expressão dos *microarrays*

	<i>Limma</i> <i>p</i> <0,05	<i>RankProd</i> <i>p</i> <0,05	GDEs comuns ao <i>Limma</i> e <i>RankProd</i>
Controles x afetados (fibroblastos)	967	37	37
Controles x afetados (células-tronco mesenquimais)	966	23	23
Controles x afetados (fibroblastos e células-tronco mesenquimais)	682	54	31

Tabela 3.4. GDEs na comparação entre controles e afetados (fibroblastos)

Símbolo do gene	Descrição do gene	nº de acesso	valor de p	x-vezes de aumento ou diminuição da regulação
<i>LPPR4</i>	gene relacionado à plasticidade 1	NM_014839	0,000391	17,75825
<i>PALMD</i>	Palmadelfina	AF262379	0,000222	9,770415
<i>PLA2G2A</i>	fosfolipase A2, grupo IIA (plaquetas, fluido sinovial)	NM_000300	0,063298	-5,95775
<i>FLG</i>	Filagrina	NM_002016	0,000231	-7,20922
<i>CHI3L1</i>	quitinase 3-like 1 (glicoproteína-39 de cartilagem)	NM_001276	0,000291	-4,59986
<i>AKR1C2</i>	família da aldo-ceto redutase 1, membro C2	NM_205845	1,7E-05	-6,1945
<i>OLFML1</i>	olfactomedina-like 1	NM_198474	0,001532	-5,67497
<i>PDGFD</i>	fator de crescimento derivado de plaquetas D	NM_025208	0,002759	-9,0068
<i>CDON</i>	homólogo a <i>Cdon</i> (camundongo)	NM_016952	0,017596	-5,36503
<i>TRHDE</i>	enzima que degrada o hormônio liberado por tirotropina	NM_013381	2,64E-05	8,364757
<i>PLXNC1</i>	plexina C1	NM_005761	0,001418	-5,90382
<i>GPR133</i>	receptor 133 acoplado à proteína G	NM_198827	0,018415	-4,93588
<i>SGCG</i>	γ-sarcoglicana (glicoproteína associada à distrofina 35 kDa)	NM_000231	0,009082	-5,90605
<i>C13orf31</i>	quadro de leitura aberto 31, cromossomo 13	BC035749	0,028157	-4,88042
<i>CDH13</i>	caderina13, caderina-H (<i>heart</i>)	NM_001257	0,010722	-5,91362
<i>CCDC144A</i>	144A com domínio <i>coiled-coil</i>	NM_014695	0,013561	-5,07231
<i>MYO1D</i>	miosina ID	NM_015194	0,003094	-5,88573
<i>ARHGAP28</i>	proteína 28 ativada por Rho GTPase	NM_001010000	0,001723	-5,36411
<i>C3</i>	componente do complemento C3	NM_000064	9,81E-05	-11,4925
<i>QPCT</i>	ciclotransferase glutamyl-peptídeo (glutamyl ciclase)	NM_012413	0,002563	-4,58767
<i>TNFAIP6</i>	proteína 6 α-induzida, fator de necrose tumoral	NM_007115	2,91E-05	-6,86527
<i>SCN3A</i>	canal de sódio, voltagem dependente, tipo III, subunidade alfa	NM_006922	0,002627	16,34282
<i>SCN9A</i>	canal de sódio, voltagem dependente, tipo IX, subunidade α	NM_002977	0,006079	6,536278
<i>ZIC1</i>	membro 1 da família Zic (homólogo a <i>odd-paired</i> , <i>Drosophila</i>)	NM_003412	0,004807	-6,1487
<i>MME</i>	metalo-endoropeptidase de membrana	NM_007288	0,00021	-8,14744
<i>ARHGEF3</i>	fator de troca do nucleotídeo guanina Rho 3	AF433662	0,000126	-4,2658
<i>SFRP2</i>	proteína relacionada ao <i>frizzled</i> secretada 2	NM_003013	0,002583	-8,27508
<i>TFPI2</i>	inibidor da via de fator tecidual 2	NM_006528	0,024266	12,07076
<i>RELN</i>	Reelina	NM_005045	0,011964	33,1905
<i>PENK</i>	Proencefalina	NM_006211	0,034285	10,2813
<i>ENPP2</i>	ectonucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterase 2 (autotaxina)	NM_006209	0,000253	-4,24671
<i>MXRA5</i>	associada ao remodelamento de matriz 5	NM_015419	0,001463	-6,1312
<i>GPC4</i>	glipicano 4	NM_001448	0,000658	-5,23483
<i>CFB</i>	fator B do complemento	NM_001710	0,000168	-7,82919
<i>HLA-DPB1</i>	complexo de histocompatibilidade majoritário, classe II, beta DP	NM_002121	1,94E-05	5,941312
<i>CFB</i>	fator B do complemento	AF349679	0,00013	-5,00932
---	fator induzido por TGFβ (família <i>homeobox</i> TALE)	NM_173211.1	0,002946	-4,55639

Tabela 3.5. GDEs na comparação entre controles e afetados (células-tronco mesenquimais)

Símbolo do gene	Descrição do gene	n° de acesso	valor de p	x-vezes de aumento ou diminuição da regulação
<i>RGS4</i>	regulador da proteína G sinalizador 4	NM_001102445	0,000877	-6,54618
<i>F3</i>	fator de coagulação III (tromboplastina)	NM_001993	0,007403	-7,56512
<i>ANK3</i>	anquirina 3, nódulo de Ranvier (anquirina G)	NM_020987	1,27E-05	-8,15039
<i>ANKRD1</i>	domínio repetitivo da anquirina 1 (músculo cardíaco)	NM_014391	0,001458	-13,2272
<i>PDGFD</i>	fator de crescimento derivado de plaquetas D	NM_025208	0,00544	5,404495
<i>MGP</i>	proteína Gla de matriz	NM_000900	0,047689	-7,90648
<i>TMTC1</i>	contendo tetracopectidase e tansmembrana 1	NM_175861	0,008377	5,375312
<i>KRT18P27</i>	queratina 27/pseudogene 27	XR_016173	9,48E-03	-7,77242
<i>FGF7</i>	fator de crescimento de fibroblasto 7 (fator de crescimento de queratinócito)	NM_002009	0,001976	4,926283
<i>ACTG2</i>	actina, γ 2, músculo liso, entérico	NM_001615	0,000147	-12,911
<i>SCN3A</i>	canal de sódio, voltagem dependente, tipo III, subunidade a	NM_006922	0,006492	-6,71578
<i>HSPC072</i>	proteína HSPC072	XR_017985	0,004435	7,56101
<i>MME</i>	metalo-endopeptidase de membrana	NM_007288	0,001779	7,423341
<i>OXTR</i>	receptor de ocitocina	AY389507 /// NM_000916 /// ENST00000316793	0,001147	-7,15125
<i>SFRP2</i>	proteína relacionada ao <i>frizzled</i> secretada 2	NM_003013	0,003658	11,18592
<i>RGS7BP</i>	proteína ligante 7, sinalizadora da regulação da proteína G	NM_001029875	0,018022	-9,71678
<i>DAXX</i>	proteína associada a morte 6	NM_001350	0,001097	4,80833
<i>SFRP4</i>	proteína relacionada ao <i>frizzled</i> secretada 4	NM_003014	0,021068	5,925566
<i>ENPP2</i>	ectonucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterase 2 (autotaxina)	NM_006209	0,0308	6,843621
<i>LOC442405</i>	similar à citoqueratina 18 tipo I	XR_017318	0,013451	-6,87497
<i>KGFLP1</i>	proteína semelhante ao fator de crescimento de queratinócito 1	NR_003674	0,003357	4,824935
<i>CNTNAP3B</i>	proteína-like 3B associada a contactina	BX538190	0,00022	-6,23833
<i>TNC</i>	tenascina C (<i>hexabrachion</i>)	NM_002160	0,010575	8,515775

Tabela 3.6. GDEs na comparação entre controle e afetados (fibroblastos e células-tronco mesenquimais)

Símbolo do gene	Descrição do gene	nº de acesso	valor de p	x-vezes de aumento ou diminuição da regulação
PALMD	Palmadelfina	AF262379	0,017336	3,568198
F3	fator de coagulação III (tromboplastina)	NM_001993	0,008864	-3,31241
FLG	Filagrina	NM_002016	0,001393	-4,32267
---	---	---	0,020016	-2,64207
LOC642521	similar à proteína ligante ao DNA nuclear	XM_926017	0,047392	2,776718
---	---	ENST00000387663	0,00714	-2,75194
KRT18	queratina 18	NM_199187	0,002578	-2,92978
CMKLR1	receptor semelhante à quemocina 1	NM_004072	0,024436	-2,23774
SGCG	γ-sarcoglicana (glicoproteína associada à distrofina 35 kDa)	NM_000231	0,006511	-3,91065
KRT18P27	queratina 27/pseudogene 27	XR_016173	0,001567	-5,54447
SNORD114-6	RNA nucleolar, box C/D 114-6	NR_003198	0,006605	2,277112
SEMA6D	semaforina 6D, domínio transmembrana e citoplasmático	NM_153618	0,010487	2,512989
CDH13	caderina13, caderina-H (<i>heart</i>)	NM_001257	0,018631	-4,968
CCDC144A	144A com domínio <i>coil</i> -de- <i>coil</i>	NM_014695	0,001877	-3,97146
TBC1D3C	membro 3C, família do domínio TBC1	NM_001001418	0,011847	2,377942
---	---	hsa-mir-520b ///	0,000822	2,534263
---	---	hsa-mir-519a-2		
C3	componente do complemento C3	NM_000064	0,037857	-3,04649
QPCT	ciclotransferase glutamyl-peptídeo (glutamyl ciclase)	NM_012413	0,008116	-2,4433
PLCB4	fosfolipase C, β4	NM_000933	0,010942	2,408147
NLGN1	neuroglina 1	NM_014932	0,003013	2,870214
CDH6	caderina 6, tipo 2, K-caderina (rim fetal)	NM_004932	0,036785	2,500991
SEMA3A	semaforina 3A, domínio imunoglobulina, secretada	NM_006080	0,007297	4,247192
PENK	Proencefalina	NM_006211	0,026807	3,991076
TOX	grupo box associado à alta seletividade dos timócitos	NM_014729	0,001968	2,456726
TEK	tirosina quinase, endotelial	NM_000459	0,001272	-2,81493
LOC442405	similar à citoqueratina 18 tipo I	XR_017318	0,004473	-4,73146
TLR4	receptor 4 toll-like	NM_138554	0,00446	-2,46474
KRT18P20	queratina 18 pseudogene 20	XR_016525	0,002051	-4,06654
KLHL13	<i>kelch-like</i> 13 (<i>Drosophila</i>)	NM_033495	0,02383	2,479597
HLA-DPB1	complexo de histocompatibilidade majoritário, classe II, beta DP	NM_002121	0,01944	2,486589
---	fator induzido por TGFβ (família homeobox TALE)	NM_173211.1	0,03782	-2,85185

Na análise do experimento de *microarray* também não se observou diferença de expressão entre pacientes e controles para os genes *TCOF1*, *CCNG1*, *TP53INP1*, *PERP*, *PMAIP1*, *WIG1(ZMAT3)*, *UBF* e *NOP56* (Tabela 3.7).

Tabela 3.7. Expressão normalizada (RMA) de diferentes genes de pacientes e controles

Expressão normalizada Gene	STC1	STC2	STC3	STC4	Controle 1	Controle 2	Controle 3	Controle 4
<i>TCOF1</i>	6,24	6,37	6,17	6,49	6,69	6,79	6,73	6,63
<i>CCNG1</i>	8,21	8,58	8,58	8,60	8,45	8,19	8,99	8,43
<i>TP53INP1</i>	7,44	7,98	7,53	7,62	7,39	7,15	7,95	7,72
<i>PERP</i>	8,85	8,94	8,58	7,32	8,65	7,38	8,54	8,59
<i>PMAIP1</i>	5,04	5,64	4,84	5,39	4,89	5,34	5,19	5,26
<i>WIG1(ZMAT3)</i>	8,55	9,42	8,25	8,76	8,68	8,11	9,19	8,58
<i>UBF</i>	8,67	8,59	8,74	8,39	8,87	8,48	8,69	8,11
<i>NOP56</i>	6,75	6,68	6,59	6,53	6,71	6,39	6,86	6,23

3.8. Validação dos dados de expressão por PCRq-RT

Realizamos PCRs quantitativos em tempo real (PCRq-RT) para confirmar a expressão diferencial dos genes identificados nas análises de *microarray*. Para tanto, avaliou-se a expressão de cinco genes: *CDH13*, *DAXX*, *SGCG*, *TLR4* e *ACTG2*.

CDH13, *SGCG* e *TLR4* apresentaram expressão diferencial na comparação das células com mutações patogênicas no *TCOF1* (fibroblastos: STC1 e STC2; e células-tronco mesenquimais: STC3 e STC4) *versus* controles (fibroblastos: controles 1 e 2; células-tronco mesenquimais: controles 3 e 4). Já os genes *DAXX* e *ACTG2* estavam diferencialmente expressos na comparação das células-tronco mesenquimais com mutações patogênicas no *TCOF1* (STC3 e STC4) *versus* controles de células-tronco mesenquimais (controles 3 e 4).

Para todos os genes analisados, quando a expressão no experimento de *microarray* aparecia aumentada nos pacientes, o mesmo se mostrou no PCRq-RT; sendo que o inverso também é verdadeiro: quando a expressão estava diminuída no *microarray*, os níveis de expressão também se apresentaram reduzidos no PCRq-RT; corroborando os resultados obtidos nos *microarrays* (Figs. 3.11 a 3.15).

Fig. 3.1. Perfis de dois pacientes portadores da síndrome de Treacher Collins incluídos nesta pesquisa.

Fig. 3.2. Sequenciamento da fita 3'-5' do alelo portador da mutação patogênica no *TCOF1* do DNA genômico (A) e do cDNA dos fibroblastos mantidos em meio de crescimento (B) e submetidos à diferenciação óssea (C) da cultura celular STC1, com destaque para o local em que houve a inserção de quatro pares de bases no éxon 3 na posição c.218_222insAACC, que altera o quadro de leitura.

Fig. 3.3. Sequenciamento da fita 3'-5' do DNA genômico (**A**) e sequenciamento da fita 5'-3' do cDNA (**B**) do alelo portador da mutação patogênica no *TCOF1* da cultura celular STC2 com destaque para o local em que houve a inserção de um par de bases no éxon 24 na posição c.4344dupA. Como a inserção de um resíduo de adenina ocorreu no início do éxon, no sequenciamento do DNA genômico em (**A**), observa-se a sequência de parte do íntron.

Fig. 3.4. Sequenciamento da fita 5'-3' do alelo portador da mutação patogênica no *TCOF1* do DNA genômico (**A**) e do cDNA das células-tronco mesenquimais mantidas em meio de crescimento (**B**) e submetidas à diferenciação óssea (**C**) da cultura celular STC3, com destaque para o local em que houve a deleção de um par de bases no éxon 5 na posição c.431delC, que altera o quadro de leitura.

Fig. 3.5. Sequenciamento da fita 3'-5' do DNA genômico (**A**) e do cDNA (**B**) do alelo portador da mutação patogênica no *TCOF1* da cultura celular STC4, com destaque para o local em que houve a inserção de um par de bases no éxon 23 na posição c.4218dupG, que altera o quadro de leitura.

Fig. 3.6. Resultados da caracterização do imunofenótipo por citometria de fluxo para as culturas celulares de pacientes com STC. Os gráficos são o resultado do número de células em função da fluorescência dos anticorpos de diferentes marcadores (CD31, CD73(SH4), CD105(SH2) e CD90). Os controles não marcados, identificados como *sem marcar* foram utilizados como parâmetros para a definição da população celular que apresentava o antígeno, destacada em vermelho, cuja porcentagem em relação ao total de células está indicada no gráfico. (A) STC1; (B) STC2; (C) STC3 e (D) STC4. **Verde:** células não marcadas; **Vermelho:** células marcadas.

Fig. 3.7. Média da expressão normalizada do *TCOF1* em células-tronco mesenquimais e fibroblastos de controles ($1,4139 \pm 0,2207$) e pacientes ($0,9687 \pm 0,2244$) cuja diferença é estatisticamente significativa ($p=0,0213$, teste t bilateral não pareado com correção de Welch).

Fig. 3.8. Curvas de crescimento construídas a partir da contagem direta por citometria de fluxo em função do tempo, nas quais foram analisadas quatro culturas de fibroblastos, duas provenientes de pacientes (STC1 e STC2) e duas de controle; e três culturas de células-tronco mesenquimais, duas de pacientes (STC3 e STC4) e uma de controle.

Fig. 3.9. Células coradas pelo método de coloração de *von Kossa* (aumento de 20x). Em (A) e (B) células-tronco mesenquimais provenientes de tecido de cordão umbilical utilizadas como controle positivo. Em (C) e (D) fibroblastos provenientes do paciente STC1. Em (B) e (D) nota-se a deposição de matriz calcária corada em marrom nas células submetidas à diferenciação óssea. Em (A) e (C), células mantidas em meio de crescimento (controle negativo da diferenciação óssea).

Fig. 3.10. Células-tronco mesenquimais provenientes de periósteo facial dos pacientes STC3 (A e B) e STC4 (C e D) coradas pelo método de coloração de *von Kossa* (aumento de 20x). Em (B) e (D) nota-se a deposição de matriz calcária corada em marrom nas células submetidas à diferenciação óssea. Em (A) e (C), células mantidas em meio de crescimento (controle negativo da diferenciação óssea).

Fig. 3.11. Média da expressão do gene *CDH13* nas células de controles e pacientes (fibroblastos e células-tronco mesenquimais), cuja normalização no experimento de *microarray* foi feita pelo método RMA (A) e no experimento de PCRq-RT foi obtida pelo $\Delta\Delta\text{CT}/\text{FN}$ (B).

Fig. 3.12. Média da expressão do gene *DAXX* nas células de controles e pacientes (células-tronco mesenquimais), cuja normalização no experimento de *microarray* foi feita pelo método RMA (A) e no experimento de PCRq-RT foi obtida pelo $\Delta\Delta\text{CT}/\text{FN}$ (B).

Fig. 3.13. Média da expressão do gene *SGC7* nas células de controles e pacientes (fibroblastos e células-tronco mesenquimais), cuja normalização no experimento de *microarray* foi feita pelo método RMA (A) e no experimento de PCRq-RT foi obtida pelo $\Delta\Delta\text{CT}/\text{FN}$ (B).

Fig. 3.14. Média da expressão do gene *TLR4* nas células de controles e pacientes (fibroblastos e células-tronco mesenquimais), cuja normalização no experimento de *microarray* foi feita pelo método RMA (A) e no experimento de PCRq-RT foi obtida pelo $\Delta\Delta\text{CT}/\text{FN}$ (B).

Fig. 3.15. Média da expressão do gene *ACTG2* nas células de controles e pacientes (células-tronco mesenquimais), cuja normalização no experimento de *microarray* foi feita pelo método RMA (A) e no experimento de PCRq-RT foi obtida pelo $\Delta\Delta\text{CT}/\text{FN}$ (B).

DISCUSSÃO

DISCUSSÃO

4.1. Caracterização celular: imunofenótipo e mutações patogênicas

Estabelecemos culturas celulares oriundas de periósteo facial de quatro pacientes portadores da síndrome de Treacher Collins, doença extremamente rara, cuja obtenção de tecido a partir de cirurgias corretivas é bastante difícil.

A triagem de mutações das células desses pacientes resultou na confirmação dos diagnósticos clínicos aos serem encontradas mutações patogênicas no *TCOF1*. Duas das mutações, encontradas nos pacientes STC3 e STC4 (Figs. 3.4 e 3.5), já haviam sido descritas (Splendore *et al.*, 2000, 2002 e 2005; Teber *et al.*, 2004) e constam na base de dados do *TCOF1* (www.genoma.ib.usp.br/TCOF1_database). A inserção de um resíduo de guanina no éxon 23 do paciente STC4 já havia sido encontrada em cinco pacientes brasileiros não aparentados (Splendore *et al.*, 2005), podendo ser uma mutação recorrente na nossa população.

As duas mutações não descritas estão na categoria de pequenas inserções, o segundo tipo de mutação mais comum no *TCOF1* (Splendore *et al.*, 2005), que provavelmente é consequência do deslizamento da polimerase durante a replicação do DNA que resulta em cópia duplicada do nucleotídeo. No paciente STC1, a inserção de quatro pares de bases no éxon 3 (Fig. 3.2) leva à criação de um códon de parada prematura e, portanto, à deficiência de proteína. O paciente é o único afetado na família e esta mutação não foi encontrada nos pais e irmão, caracterizando uma mutação *de novo*. Levando-se em conta a natureza da mutação e o fato dela ser *de novo*, consideramos esta mutação como patogênica.

No paciente STC2, como a duplicação de resíduo de adenina localiza-se no éxon 24 (Fig. 3.3) região que contém sinais de localização nuclear (SLN) essenciais para o reconhecimento e transporte das proteínas para o núcleo (Dingwall e Laskey, 1991), a síndrome de Treacher Collins, nesse paciente, poderia ser resultante da alteração desses SLN, que acarretariam na localização inadequada da Treacle. Entretanto, a análise do sequenciamento do cDNA demonstrou que isso provavelmente não ocorre, pois praticamente não se observa a expressão do alelo mutado (Fig. 3.3), que deve ser

majoritariamente degradado pelo mecanismo de *non-sense mediated mRNA decay* (NMD).

Dessa forma, como as mutações analisadas nas células dos pacientes com STC alteram a fase de leitura e prevêm a formação de um códon de parada prematura, pode-se concluir que essas mutações são patogênicas no gene *TCOF1* e responsáveis pelo quadro clínico destes pacientes.

Com relação às culturas celulares estabelecidas, as células-tronco mesenquimais apresentaram uma morfologia fusiforme, muito semelhante a dos fibroblastos, não sendo possível a diferenciação destes dois tipos de cultura celular pela morfologia. De fato, isto é o que tem sido observado por vários autores (Pittenger *et al.*, 1999; Sudo *et al.*, 2007; Bueno *et al.*, 2008).

A maioria das culturas celulares estabelecidas (STC1, STC2, STC3, STC4, controles 1 e 3) apresentou marcação positiva em mais de 95% das células para os antígenos de superfície característicos de células-tronco mesenquimais, como SH2 (CD105), SH3, SH4 (CD73); como já havia sido reportado em outro estudo com células-tronco mesenquimais oriundas de periósteo (De Bari *et al.*, 2006).

As culturas de fibroblastos também apresentaram marcação positiva para os anticorpos típicos de células-tronco mesenquimais (Tabela 3.1, ANEXO II), não sendo possível distinguir os dois tipos celulares apenas pela caracterização dos marcadores de membrana celular, como já havia sido descrito para células provenientes de cultura primária de diferentes tecidos. Sudo e colaboradores (2007) analisaram 25 populações diferentes de fibroblastos derivadas de diversos tecidos como pulmão, pele, cordão umbilical e membrana amniótica; e constataram que a maioria das populações denominadas de fibroblastos se diferenciava em pelo menos dois tecidos, além de expressarem os mesmos antígenos de superfície de células-tronco mesenquimais, não apresentando marcadores hematopoiéticos e endoteliais. Dessa forma, é possível que muitas culturas primárias não contenham somente fibroblastos, possuindo também na sua população precursores mesenquimais (Sudo *et al.*, 2007).

Algumas culturas primárias podem, então, possuir populações celulares heterogêneas, como possivelmente é o caso das culturas celulares dos controles 2 e 4, as quais apresentaram células marcadas positivamente para os antígenos típicos de células-tronco mesenquimais menor que as demais culturas (Tabela 3.1, ANEXO II).

De uma maneira geral, o procedimento de extração celular a partir do periósteo facial se mostrou bastante satisfatório, já que a caracterização do imunofenótipo celular por citometria de fluxo indicou que todas as culturas celulares provenientes de pacientes com STC são constituídas principalmente por células de origem mesenquimal (Fig. 3.6).

4.2. Análise da expressão dos níveis de *TCOF1* e do alelo mutado

Detectou-se uma diferença estatisticamente significativa ($p=0,0213$) nos níveis de transcrição do *TCOF1* nas células de pacientes quando comparadas com as de controles (Fig. 3.7). Os níveis de *TCOF1* na presença de uma mutação nula apresentaram redução da expressão gênica de aproximadamente 31% quando comparados aos das células controles (Tabela 3.2). Tal redução é compatível com a redução do nível de expressão do alelo portador da mutação patogênica no *TCOF1* que se observou na análise do seqüenciamento dos transcritos celulares dos pacientes STC2, STC3 e STC4 (Figs. 3.3 a 3.5). Nesses casos, a degradação do transcrito mutado deve ser regulada pelo mecanismo de NMD. Quanto ao seqüenciamento do cDNA das células da cultura STC4, mostrou-se que há predominância do alelo selvagem, apesar de a degradação do alelo portador da mutação patogênica não ser tão efetiva como nos casos dos pacientes STC2 e STC3; entretanto, é condizente com o fato de 5 a 25% dos RNAs mensageiros contendo um códon de parada prematura geralmente escaparem da degradação pelo mecanismo de NMD (Kuzmiak e Maquat, 2006).

A razão entre os dois tipos de transcritos observado no seqüenciamento do cDNA da cultura STC1 se mostrou muito similar ao seqüenciamento do DNA genômico (Fig. 3.2), sugerindo que os dois alelos apresentam níveis de transcrição semelhantes, diferentemente do que foi observado nos demais pacientes. Este resultado não é o esperado, uma vez que a mutação presente nestas células prevê um códon de parada prematura e este transcrito estaria sujeito à degradação pelo mecanismo de NMD. Considerando-se que a expressão dos níveis de *TCOF1* nesse indivíduo também está reduzida (Tabela 3.2), há a possibilidade de um viés de transcrição que resultaria numa expressão alélica diferencial, ou seja, o alelo selvagem apresenta níveis mais baixos de transcrição, comparável ao do alelo portador da mutação patogênica. De fato, expressão alélica diferencial para o *TCOF1* foi observada por Masotti (2007) em transcritos de linfócitos de indivíduos normais e de afetados pela síndrome. Ademais, a expressão alélica diferencial foi descrita há relativamente pouco tempo e estudos

recentes sugerem que este mecanismo de expressão gênica seja relativamente comum em genes autossômicos não imprintados (Yan *et al.*, 2002; Lo *et al.*, 2003; Palacios *et al.*, 2009).

Tal redução dos níveis de *TCOF1* em pacientes portadores da STC é condizente com a observação de uma redução de 18% nos níveis de transcritos constatada em linfócitos de 30 pacientes com STC comparados a 20 controles (Masotti, 2007). Menores níveis de expressão do *TCOF1* estão também de acordo com a teoria de que a haploinsuficiência seja o mecanismo responsável pela STC (Gladwin *et al.*, 1996; Edwards *et al.*, 1997; Wise *et al.*, 1997).

Por outro lado, um único estudo que analisou a expressão do *TCOF1* em células não embrionárias, realizado com fibroblastos de quatro pacientes, mostrou que a quantidade total da Treacle nessas células varia menos que duas vezes, independentemente delas serem originárias de pacientes com STC ou indivíduos normais, o que seria explicado, segundo os autores, por um mecanismo de compensação de dose (Isaac *et al.*, 2000). Entretanto, apesar de não descartarmos a possibilidade de que modificações pós-traducionais manteriam os níveis de Treacle de afetados equivalentes ao de indivíduos normais, é provável que os métodos utilizados por Isaac e colaboradores (2000) para detectar a proteína, como a quantificação indireta por imunofluorescência e a quantificação da reatividade do anticorpo por *Western blot*, não sejam passíveis de mensurar diferenças da ordem de 20% ou 30%.

Dessa forma, nossos resultados confirmam a haploinsuficiência da Treacle em células-tronco mesenquimais e fibroblastos, demonstrando pela primeira vez que há redução significativa dos transcritos portadores da mutação. Portanto, apesar do *TCOF1* apresentar um pico de expressão durante a embriogênese, o efeito de mutações patogênicas neste gene pode ser percebido também em células não embrionárias.

4.3. Análise do potencial proliferativo e de diferenciação osteogênica

A construção das curvas de crescimento demonstrou que não há diferença nas taxas proliferativas das culturas celulares de pacientes com mutações patogênicas no *TCOF1* em relação aos controles (Fig. 3.8). Apenas a população celular derivada de STC3 apresentou uma taxa de proliferação menor que as outras culturas mesenquimais. Tal discrepância pode ser devida a uma susceptibilidade própria da cultura aos processos de congelamento e descongelamento, já que mesmo em passagem baixa,

essas células apresentavam uma morfologia diversa, com células um pouco menos alongadas e de formato um pouco mais estrelado, assemelhando-se a células senescentes. Além disso, como já discutido em item precedente, muitas culturas celulares são heterogêneas, sendo compostas de diferentes percussores mesenquimais (Sudo *et al.*, 2007). Portanto, é esperado que as culturas apresentem características que podem diferir um pouco entre si. Entretanto, analisando-se de uma maneira geral, nenhuma das culturas oriundas de pacientes mostrou uma taxa de crescimento inferior aos controles.

Com relação ao potencial osteogênico, observou-se que menores níveis de *TCOF1* também não interferem aparentemente na diferenciação celular, já que as duas culturas de células-tronco mesenquimais STC3 e STC4 formaram depósitos de cálcio na matriz semelhantes ao controle positivo (Fig. 3.10), assim como a cultura de fibroblastos STC1 (Fig. 3.9). O potencial osteogênico de fibroblastos já foi descrito por outros autores (Sudo *et al.*, 2007; Fanganiello *et al.*, 2007), contudo, este efeito deve estar possivelmente relacionado a uma porcentagem de células-tronco mesenquimais presentes nesta população celular.

4.4. Expressão genômica das culturas celulares

O experimento de *microarray* identificou uma série de genes diferencialmente expressos nas três comparações realizadas (Tabelas 3.4 a 3.6), os quais foram validados por PCRq-RT (Figs. 3.11 a 3.15). Portanto, apesar de ainda não termos identificado um fenótipo celular, a deficiência de *TCOF1* resulta na alteração da expressão gênica celular.

O gene *TCOF1* não constou entre os genes diferencialmente expressos na análise dos *microarrays*. (Tabela 3.7). Entretanto, como identificamos uma redução de cerca de 31% nos níveis de expressão do *TCOF1* nas células com mutações patogênicas a partir do experimento de PCRq-RT, poder-se-ia especular se o experimento de *microarray* consegue detectar pequenas diferenças. Todos os experimentos de validação utilizando a técnica de PCRq-RT, apesar de mostrarem sempre mesma tendência de aumento ou diminuição da expressão gênica conforme as lâminas de expressão, revelaram maiores diferenças nos níveis de transcritos dos genes analisados em relação aos *microarrays* (Figs. 3.11 a 3.15). Comparações entre técnicas de

expressão gênica que utilizam plataformas de hibridação e PCRs quantitativos mostraram que, apesar da alta correlação na lista de genes diferencialmente expressos, há variações nos graus de compressão do sinal para análise entre os diferentes métodos, o que resulta numa concordância não ideal (abaixo de 1,0) nas porcentagens de aumento ou diminuição da expressão gênica (Canales *et al.*, 2006; MAQC Consortium, 2006; Arikawa *et al.*, 2008); o que poderia explicar as maiores diferenças observadas na quantificação da expressão gênica por PCR em tempo real quando comparadas ao dados de *microarray*.

Pouco foi revelado a respeito dos genes diferencialmente expressos dos embriões *Tcof1^{+/-}* (Jones *et al.*, 2008), entretanto cinco dos genes cuja expressão está aumentada nestes embriões não apareceram alterados nos fibroblastos ou células-tronco mesenquimais oriundas de pacientes com STC (Tabela 3.7). Esses genes são todos regulados pela via da p53 e são responsáveis pela parada do ciclo celular, resultando na redução da proliferação e desencadeamento da apoptose. Dentre eles, está o gene *Ccng*, o qual codifica uma ciclina responsável pela parada do ciclo celular na fase G1, cuja expressão está aumentada nos embriões dos camundongos *Tcof1^{+/-}*, levando à redução da proliferação das células neuroepiteliais desses animais (Jones *et al.*, 2008). Como a proliferação celular das células com mutações patogênicas no *TCOF1* não está alterada, era de se esperar que a expressão desse gene não diferisse da expressão das células controles.

Tampouco foi observada alteração nos três tipos de comparações realizadas (Tabela 3.7) na expressão de genes que codificam proteínas que interagem fisicamente com a Treacle, como a Nop56, que faz parte do complexo de metilação do pré-RNA ribossômico; e o UBF, que participa do complexo de transcrição do DNA ribossômico juntamente com a RNA polimerase I.

Dentre os genes diferencialmente expressos na comparação entre células-tronco mesenquimais de pacientes com STC e controles, um deles merece maior destaque. O gene *DAXX*, cuja expressão estava aumentada nas células-tronco mesenquimais com mutações patogênicas no *TCOF1*, codifica a proteína associada ao domínio da morte 6, também denominada Daxx, que é um dos cofatores que modulam as funções da p53. A Daxx foi originalmente identificada como uma proteína que se liga especificamente ao domínio da morte citoplasmático do receptor transmembrana FAS, também conhecido como CD95, potencializando a apoptose induzida por FAS (Yang *et al.*, 1997). Uma

grande proporção da Daxx é nuclear, contudo ela também pode estar associada aos corpos nucleares pró-mielocíticos leucêmicos e outros domínios subnucleares (Salomoni e Khelifi, 2006). A Daxx também pode se direcionar para o nucléolo por meio de sua interação com a proteína nucleolar MSP58 (proteína microesférica de 58 kDa) (Lin *et al.*, 2002).

Muitos estudos mostram que a Daxx está envolvida com apoptose celular; entretanto, se ela atua como uma molécula pró ou antiapoptótica ainda não está bem definido. Deleções do gene *Daxx* em camundongos resultaram em graves malformações, que levam à morte pré-natal do animal, consequência da extensiva apoptose nos dias 7,5 e 8,5 do desenvolvimento embrionário (Michaelson *et al.*, 1999). Outros estudos que extinguiram a expressão de *DAXX* por meio de RNA de interferência, resultaram em aumento da apoptose em diferentes tipos celulares (Michaelson e Leder, 2003), também implicando na atuação da Daxx como preventiva contra apoptose.

No entanto, estudos de superexpressão sugerem que a Daxx além de induzir a apoptose por meio da interação com o receptor FAS (Yang *et al.*, 1997), também atua em vias não relacionadas ao FAS, como na apoptose mediada por TGF β (Perlman *et al.*, 2001). Ademais, a Daxx humana parece modular a atividade transcripcional da p53, ao exercer função de repressor ou estimulante dependente do promotor do gene, reprimindo genes que são induzidos pela p53 e resultam na parada do ciclo celular, como o gene que codifica para a p21; e estimulando ou não afetando a transcrição de genes relacionados à apoptose, como *BAX*, *PIG3* e *AIPI* (Gostissa *et al.*, 2004). Portanto, a Daxx pode ser vista como um fator que influencia o equilíbrio entre os transcritos gênicos que induzem a parada do ciclo celular e aqueles apoptóticos; exercendo função dual com respeito à apoptose, dependente do contexto celular.

Dessa forma, a expressão aumentada do gene *DAXX* nas células com mutações patogênicas no *TCOF1* poderia modular as funções da p53, inibindo a transcrição de genes de parada do ciclo celular e apoptóticos; resultando em taxas proliferativas e de apoptose semelhantes aos controles. Uma investigação mais acurada do papel dessa proteína nas células oriundas de pacientes com STC seria muito importante para elucidar sua importância e também a função do *TCOF1* nas células adultas.

CONCLUSÕES e CONSIDERAÇÕES FINAIS

CONCLUSÕES e CONSIDERAÇÕES FINAIS

❖ É possível obter populações celulares com mais de 95% de marcação positiva para antígenos que caracterizam células de origem mesenquimal a partir de periósteo da face de indivíduos portadores da STC e controles normais;

❖ As células-tronco mesenquimais e fibroblastos provenientes de pacientes com STC apresentaram redução da expressão de *TCOF1* de aproximadamente 31% quando comparados aos controles. Estes resultados corroboram o modelo de haploinsuficiência da Treacle para explicar o fenótipo da síndrome de Treacher Collins. Contudo, o efeito funcional desta deficiência em células não embrionárias é ainda desconhecido;

❖ Os transcritos portadores de mutação patogênica no *TCOF1* são menos abundantes do que os transcritos selvagens por indivíduo, sugerindo que a presença da mutação resulte na degradação deste transcrito pelo mecanismo de *non-sense mediated mRNA decay* (NMD);

❖ A taxa de crescimento e o potencial de diferenciação osteogênica das culturas de células mesenquimais com mutações patogênicas no *TCOF1* são semelhantes aos controles normais, indicando que os menores níveis de transcritos do gene não interferem na capacidade proliferativa celular, nem tampouco na diferenciação óssea *in vitro* destas células. Esses resultados podem trazer perspectivas de auxílio no tratamento dos pacientes portadores da STC, já que a terapia celular aliada às intervenções cirúrgicas poderia contribuir para melhorias no tratamento desses pacientes;

❖ Apesar de ainda não termos identificado um fenótipo celular, a deficiência de *TCOF1* em células não embrionárias resulta na alteração da expressão gênica, já que a análise da expressão genômica das culturas celulares identificou uma série de genes diferencialmente expressos;

❖ Genes de parada do ciclo celular e apoptose com expressão aumentada em células embrionárias de camundongo *Tcof1^{+/-}* não apresentaram expressão aumentada nas células humanas com mutações patogênicas no *TCOF1*, sugerindo que a via da p53 não está ativa nestas células não embrionárias;

❖ Dentre os genes diferencialmente expressos, o aumento dos transcritos de *DAXX* nas células-tronco mesenquimais com mutações patogênicas no *TCOF1* poderia modular as funções da p53 nessas células, constituindo um bom alvo de investigações futuras para a elucidação da função do *TCOF1* em células não embrionárias;

❖ Os resultados obtidos sugerem que deficiência de *TCOF1* em células mesenquimais leva à ativação de outras vias de sinalização, cujo efeito funcional é ainda desconhecido. Quais seriam as funções e em quais vias celulares o *TCOF1* agiria, são questões a serem elucidadas a respeito do papel do gene na fase adulta.

RESUMO

Neste trabalho tentamos traçar quais seriam os efeitos funcionais e de expressão gênica de mutações patogênicas no gene *TCOF1* em células não embrionárias. A partir do estabelecimento de culturas celulares oriundas de periósteo facial de quatro pacientes portadores da síndrome de Treacher Collins (STC), obtivemos populações celulares com mais de 95% de marcação positiva para antígenos que caracterizam células de origem mesenquimal.

Demonstramos que as células-tronco mesenquimais e fibroblastos provenientes de pacientes com STC apresentaram redução da expressão de *TCOF1* de aproximadamente 31% quando comparados aos controles. Tal redução se mostrou compatível com a diminuição da expressão dos transcritos portadores de mutação patogênica observada no sequenciamento do cDNA dos pacientes. Portanto, estes resultados sugerem que há degradação do transcrito mutado, que muito possivelmente deve ser regulada pelo mecanismo de *non-sense mediated mRNA decay* (NMD) e corroboram o modelo de haploinsuficiência da Treacle.

Como o pico de expressão do gene *Tcof1* é detectado durante o estágio embrionário de formação das células da crista neural e embriões de camundongos *Tcof1*^{+/-} apresentam redução da proliferação das células neuroepiteliais, testamos se haveria alteração da capacidade proliferativa de células mesenquimais adultas com mutações no *TCOF1*. A análise das taxas de crescimento das culturas celulares provenientes de pacientes com STC se mostrou semelhante aos controles normais, indicando que menores níveis de transcritos do gene não interferem na capacidade proliferativa celular. Além disso, avaliamos o potencial de diferenciação óssea *in vitro*, mostrando que menores níveis de *TCOF1* também não parecem influenciar a capacidade de diferenciação celular.

Apesar de ainda não termos identificado um fenótipo celular, a deficiência de *TCOF1* em células não embrionárias resulta na alteração da expressão gênica, já que a análise da expressão genômica das culturas celulares identificou uma série de genes diferencialmente expressos. Ademais, genes de parada do ciclo celular e apoptose com expressão aumentada em células embrionárias de camundongo *Tcof1*^{+/-} não apresentaram expressão aumentada nas células humanas com mutações patogênicas no *TCOF1*, sugerindo que a via da p53 não está ativa nestas células não embrionárias. Dentre os genes diferencialmente expressos encontrados, o aumento dos transcritos de *DAXX* nas células-tronco mesenquimais com mutações patogênicas no *TCOF1* poderia modular as funções da p53 nessas células, constituindo um bom alvo de investigações futuras para a elucidação da função do *TCOF1* em células não embrionárias.

Os resultados obtidos sugerem que deficiência de *TCOF1* em células mesenquimais leva à ativação de outras vias de sinalização, cujo efeito funcional é ainda desconhecido. Quais seriam as funções e em quais vias celulares o *TCOF1* agiria, são questões a serem elucidadas a respeito do papel do gene na fase adulta.

ABSTRACT

In this work we tried to outline the effects of functional and gene expression of pathogenic mutations in the gene *TCOF1* in non-embryonic cells. From the establishment of facial periosteum derived cell culture of four patients with Treacher Collins syndrome (TCS), we obtained cell populations that are more than 95% positive for mesenchymal origin characteristic antigens. We demonstrated that mesenchymal stem cells and fibroblasts from patients with TCS showed reduction of approximately 31% in the *TCOF1* expression when compared to controls. This reduction was consistent with the decrease in the expression of transcripts carrying the pathogenic mutations observed when sequencing the cDNA of the patients. Therefore, these results suggest that degradation of the mutated transcript occurs and it may possibly be governed by the mechanism of non-sense mediated mRNA decay (NMD), thus corroborating the Treacle haploinsufficiency model.

As the peak of *TCOF1* gene expression is detected during the embryonic stage of the formation of neural crest cells and *Tcof1*^{+/-} mice embryos had shown reduction of neuroepithelium cells proliferation rate, we tested if there is a change in proliferative capacity of adult mesenchymal cells with mutations in *TCOF1*. The analysis of the growth rate of TCS patients' cells was similar to normal controls, indicating that lower levels of transcripts of the gene does not interfere with cellular proliferative capacity. Furthermore, we evaluated the bone differentiation potential of these cells *in vitro*, showing that lower levels of *TCOF1* also seem does not influence cell differentiation ability.

Although a cellular phenotype has not yet been identified, deficiency of *TCOF1* in non-embryonic cells results in gene expression change, since genomic analysis of the expression of cell cultures identified a number of differentially expressed genes. Furthermore, arresting cell cycle and apoptosis related genes with increased expression in embryonic cells of *Tcof1*^{+/-} mice showed no increased expression in human cells with pathogenic mutations in *TCOF1* suggesting that the p53 pathway is not active in these non-embryonic cells. Among the differentially expressed genes found, the increase of *DAXX* transcripts in mesenchymal stem cells with pathogenic mutations in *TCOF1* could modulate the function of p53 in these cells, providing a good target for future investigations to elucidate the function of *TCOF1* in non-embryonic cells.

The results suggest that deficiency of *TCOF1* in mesenchymal cells leads to activation of other signaling pathways, whose functional effects are still unknown. The functions and cellular pathways in which the *TCOF1* act, are issues yet to be elucidated concerning the role of the gene during adulthood.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Alhadlaq A, Mao JJ. Mesenchymal stem cells: isolation and therapeutics. *Stem Cells Dev.* Aug;13(4): 436-48. 2004.
2. Arikawa E, Sun Y, Wang J, Zhou Q, Ning B, Dial SL, Guo L, Yang J. Cross-platform comparison of SYBR Green real-time PCR with TaqMan PCR, microarrays and other gene expression measurement technologies evaluated in the MicroArray Quality Control (MAQC) study. *BMC Genomics.* Jul 11; 9: 328. 2008.
3. Boisvert FM, Koningsbruggen S van, Navascués J, Lamond AI. The multifunctional nucleolus. *Nat. Rev.* 8: 574-585. 2007.
4. Bueno DF, Kerkis I, Costa AM, Martins MT, Kobayashi GS, Zucconi E, Fanganiello RD, Salles FT, Almeida AB, do Amaral CE, Alonso N, Passos-Bueno MR. New Source of Muscle-Derived Stem Cells with Potential for Alveolar Bone Reconstruction in Cleft Lip and/or Palate Patients. *Tissue Eng Part A.* Set 24. 2008.
5. Cairns C, McStay B. Identification and cDNA cloning of a *Xenopus* nucleolar phosphoprotein, xNopp180, that is the homolog of the rat nucleolar protein Nopp140. *J Cell Sci* 108: 3339–47. 1995.
6. Canales RD, Luo Y, Willey JC, Austermiller B, Barbacioru CC, Boysen C, Hunkapiller K, Jensen RV, Knight CR, Lee KY, Ma Y, Maqsoodi B, Papallo A, Peters EH, Poulter K, Ruppel PL, Samaha RR, Shi L, Yang W, Zhang L, Goodsaid FM. Evaluation of DNA microarray results with quantitative gene expression platforms. *Nat Biotechnol.* Set; 24(9): 1115-22. 2006.
7. Caplan, AI. Review: mesenchymal stem cells: cell-based reconstructive therapy in orthopedics. *Tissue Eng* 11(7-8): 1198-211. 2005.
8. Caplan, AI. Adult Mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. *J Cell Physiol.* Nov; 213(2): 341-7. 2007.
9. Chemke J, Mogilner BM, Ben-Itzhak I, Zurkowski L, Ophir D. Autosomal recessive inheritance of Nager acrofacial dysostosis. *J Med Genet.* Abr; 25(4): 230-2. 1988.
10. Choi IH, Chung CY, Cho TJ, Yoo WJ. Angiogenesis and mineralization during distraction osteogenesis. *J Korean Med Sci* Ago; 17(4): 435-47. 2002.
11. De Bari C, Dell'Accio F, Vanlauwe J, Eyckmans J, Khan IM, Archer CW, Jones EA, McGonagle D, Mitsiadis TA, Pitzalis C, Luyten FP. Mesenchymal multipotency of adult human periosteal cells demonstrated by single-cell lineage analysis. *Arthritis Rheum.* Abr; 54(4): 1209-21. 2006.
12. Dingwall C, Laskey RA. Nuclear targeting sequences--a consensus? *Trends Biochem Sci.* Dez; 16(12): 478-81. 1991.
13. Dixon MJ, Marres HAM, Edwards SJ, Dixon J, Cremers CWRJ. Treacher Collins syndrome: correlation between clinical and genetic linkage studies. *Clin Dysmorph* 3:96–103. 1994.
14. Dixon MJ. Treacher Collins syndrome. *Hum Mol Genet* 5: 1391–97. 1996.
15. Dixon J, Edwards SJ, Anderson I, Brass A, Scambler PJ, Dixon MJ. Identification of the complete coding sequence and genomic organization of the Treacher Collins syndrome gene. *Genome Res* 7: 223–34. 1997a.

16. Dixon J, Hovanes K, Shiang R, Dixon MJ. Sequence analysis, identification of evolutionary conserved motifs and expression analysis of murine *TCOF1* provide further evidence for a potential function for the gene and its human homologue, *TCOF1*. *Hum Mol Genet* 6: 727–37. 1997b.
17. Dixon J, Brakebusch C, Fässler R, Dixon MJ. Increased levels of apoptosis in the prefusion neural folds underlie the craniofacial disorder, Treacher Collins syndrome. *Hum Mol Genet* 10:1473–80. 2000.
18. Dixon J, Dixon MJ. *TCOF1* (Treacle) and the Treacher Collins Syndrome. In: Epstein, C. J., Ericson, R. P., Wynshaw-Boris, A. *Inborn Errors of Development: the molecular basis of clinical disorders of morphogenesis*. New York: Oxford University Press, 1027-1037. 2004a.
19. Dixon J, Dixon MJ. Genetic background has a major effect on the penetrance and severity of craniofacial defects in mice heterozygous for the gene encoding the nucleolar protein Treacle. *Dev Dyn* 229(4): 907-14. 2004b.
20. Dixon J, Jones NC, Sandell LL, Jayasinghe SM, Crane J, Rey JP, Dixon MJ, Trainor PA. *Tcofl1*/Treacle is required for neural crest cell formation and proliferation deficiencies that cause craniofacial anomalies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 13403–8. 2006.
21. Dixon J, Trainor P, Dixon MJ. Treacher Collins syndrome. *Orthod Craniofac Res* 10, 88–95. 2007.
22. Edwards SJ, Gladwin AJ, Dixon MJ.. The mutational spectrum in Treacher Collins syndrome reveals a predominance of mutations that create a premature-termination codon. *Am J Hum Genet* 60(3): 515-24. 1997.
23. Ellis PE, Dawson M, Dixon MJ. Mutation testing in Treacher Collins Syndrome. *J Orthod. Dez*; 29(4): 293-7. 2002.
24. Erices A, Conget P, Minguell JJ. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *Br J Haematol* 109(1): 235-42. 2000.
25. Fang D, Seo BM, Liu Y, Sonoyama W, Yamaza T, Zhang C, Wang S, Shi S. Transplantation of Mesenchymal Stem Cells is an Optimal Approach for Plastic Surgery. *Stem Cells*. 2006.
26. Fanganiello RD, Sertié AL, Reis EM, Yeh E, Oliveira NA, Bueno DF, Kerkis I, Alonso N, Cavalheiro S, Matsushita H, Freitas R, Verjovski-Almeida S, Passos-Bueno MR. Apert p.Ser252Trp mutation in FGFR2 alters osteogenic potential and gene expression of cranial periosteal cells. *Mol Med. Jul-Ago*; 13(7-8): 422-42. 2007.
27. Farrar JE. Mandibulofacial dysostosis, a familial study. *Brit.IJ. Ophthal.* 51, 132. 1967.
28. Gautier L, Møller M, Friis-Hansen L, Knudsen S. Alternative mapping of probes to genes for Affymetrix chips. *BMC Bioinformatics. Ago* 14; 5: 111. 2004.
29. Gentleman RC, Carey VJ, Bates DM, Bolstad B, Dettling M, Dudoit S, Ellis B, Gautier L, Ge Y, Gentry J, Hornik K, Hothorn T, Huber W, Iacus S, Irizarry R, Leisch F, Li C, Maechler M, Rossini AJ, Sawitzki G, Smith C, Smyth G, Tierney L, Yang JY, Zhang J. Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biol.* 5(10): R80. 2004.
30. Gilbert SF. *Developmental biology*. Sinauer Associates 8th edition. 14: 443-450. 2006.

31. Gladwin AJ, Dixon J, Loftus SK, Edwards S, Wasmuth JJ, Hennekam RC, Dixon MJ. Treacher Collins syndrome may result from insertions, deletions or splicing mutations, which introduce a termination codon into the gene. *Hum Mol Genet. Out*; 5(10):1533-8. 1996.
32. Gonzales B, Yang H, Henning D, Valdez BC. Cloning and functional characterization of the *Xenopus* orthologue of the Treacher Collins syndrome (*TCOF1*) gene product. *Gene. Out* 10; 359: 73-80. 2005.
33. Gorlin RJ, Cohen MM, Levin SS. 1990. Syndromes of the head and neck. 3rd Ed. New York: Oxford University Press.
34. Gostissa M, Morelli M, Mantovani F, Guida E, Piazza S, Collavin L, Brancolini C, Schneider C, Del Sal G. The transcriptional repressor hDaxx potentiates p53-dependent apoptosis. *J Biol Chem. Nov* 12; 279(46): 48013-23. 2004.
35. Gronthos S, Brahimi J, Li W, Fisher LW, Cherman N, Boyde A, DenBesten P, Robey PG, Shi S. Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *J Dent Res* 81(8): 531-5. 2002.
36. Greco SJ, Liu K, Rameshwar P. Functional similarities among genes regulated by *OCT4* in human mesenchymal and embryonic stem cells. *Stem Cells. Dez*; 25(12): 3143-54. 2007.
37. Gürsoy S, Hukki J, Hurmerinta K. Five year follow-up of mandibular distraction osteogenesis on the dentofacial structures of syndromic children. *Orthod Craniofac Res* 11:57–64. 2008.
38. Hayano T, Yanagida M, Yamauchi Y, Sinkawa T, Isobe T, Takahashi N. Proteomic analysis of human NOP56p-associated pre-ribosomal ribonucleoprotein complexes: possible link between Nop56p and the nucleolar protein treacle responsible for Treacher Collins syndrome. *J. Biol. Chem.*, 278, 34309–34319. 2003.
39. Hong F, Breitling R, McEntee CW, Wittner BS, Nemhauser JL, Chory J RankProd: a bioconductor package for detecting differentially expressed genes in meta-analysis. *Bioinformatics. Nov* 15; 22(22): 2825-7. 2006.
40. Horiuchi K, Ariga T, Fujioka H, Kawashima K, Yamamoto Y, Igawa H, Sugihara T, Sakiyama Y. Mutational analysis of the *TCOF1* gene in 11 Japanese patients with Treacher Collins Syndrome and mechanism of mutagenesis. *Am J Med Genet A. Maio* 1;134(4):363-7. 2005.
41. Horwitz EM, Le Blanc K, Dominici M, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Deans RJ, Krause DS, Keating A; the International Society for Cellular Therapy. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy. 7*(5): 393-5. 2005.
42. Isaac C, Marsh KL, Paznekas WA, Dixon J, Dixon MJ, Jabs EW, Meier UT. Characterization of the nucleolar gene product, treacle, in Treacher Collins syndrome. *Mol Biol Cell* 11(9): 3061-71. 2000.
43. Jin Z, Cheng Y, Olaru A, Kan T, Yang J, Paun B, Ito T, Hamilton JP, David S, Agarwal R, Selaru FM, Sato F, Abraham JM, Beer DG, Mori Y, Shimada Y, Meltzer SJ. Promoter hypermethylation of *CDH13* is a common, early event in human esophageal adenocarcinogenesis and correlates with clinical risk factors. *Int J Cancer. Nov* 15; 123(10): 2331-6. 2008.
44. Jones KL, Smith DW, Harvey MA, Hall BD, Quan L. Older paternal age and fresh gene mutation: data on additional disorders. *J Pediatr* 86(1): 84-8. 1975.

45. Jones NC, Farlie PG, Minichiello J, Newgreen DF. Detection of an appropriate kinase activity in branchial arches I and II that coincides with peak expression of the Treacher Collins syndrome gene product, treacle. *Hum Mol Genet* 8(12): 2239-45. 1999.
46. Jones NC, Lynn ML, Gaudenz K, Sakai D, Aoto K, Rey JP, Glynn EF, Ellington L, Du C, Dixon J, Dixon MJ, Trainor PA. Prevention of the neurocristopathy Treacher Collins syndrome through inhibition of p53 function. *Nat Med*. 2008 Feb; 14(2):125-33. 2008.
47. Karp NS, McCarthy JG, Schreiber JS, Sissons HA, Thorne CH. Membranous bone lengthening: a serial histological study. *Ann Plast Surg*. Jul; 29(1): 2-7. 1992.
48. Kanczkowski W, Ziegler CG, Zacharowski K, Bornstein SR. Toll-like receptors in endocrine disease and diabetes. *Neuroimmunomodulation*; 15(1): 54-60. 2008.
49. Kuzmiak HA, Maquat LE Applying nonsense-mediated mRNA decay research to the clinic: progress and challenges. *Trends Mol Med*. Jul; 12(7): 306-16. 2006.
50. Lin DY, Shih HM. Essential role of the 58-kDa microspherule protein in the modulation of Daxx-dependent transcriptional repression as revealed by nucleolar sequestration. *J Biol Chem*. Jul 12; 277(28): 25446-56. 2002.
51. Lo HS, Wang Z, Hu Y, Yang HH, Gere S, Buetow KH, Lee MP. Allelic variation in gene expression is common in the human genome. *Genome Res*. Ago; 13(8): 1855-62. 2003.
52. Lowry RB, Morgan K, Holmes TM, Metcalf PJ, Stauffer GF. Mandibulofacial dysostosis in Hutterite sibs: A possible recessive trait. *Am J Med Genet* 22:501–512. 1985.
53. Mao JJ, Giannobile WV, Helms JA, Hollister SJ, Krebsbach PH, Longaker MT, Shi S. Craniofacial tissue engineering by stem cells. *J Dent Res* 85(11): 966-79. 2006.
54. MAQC Consortium. The MicroArray Quality Control (MAQC) project shows inter- and intraplatform reproducibility of gene expression measurements. *Nat Biotechnol*. Set; 24(9): 1151-61. 2006.
55. Marres HA, Cremers CW, Dixon MJ, Huygen PL, Joosten FB. The Treacher Collins syndrome. A clinical, radiological, and genetic linkage study on two pedigrees. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 121: 509–514. 1995.
56. Marsh KL, Dixon J, Dixon MJ. Mutations in the Treacher Collins syndrome gene lead to mislocalization of the nucleolar protein treacle. *Hum Mol Genet*. Oct;7(11):1795-800.1998.
57. Masotti C, Armelin-Correa LM, Splendore A, Lin CJ, Barbosa A, Sogayar MC, Passos-Bueno MR. A functional SNP in the promoter region of TCOF1 is associated with reduced gene expression and YY1 DNA-protein interaction. *Gene* 359: 44-52. 2005.
58. Masotti, CL. Estudos de mecanismos regulatórios e mapeamento de genes associados a malformações craniofaciais [tese (Doutorado em Genética Humana)]. São Paulo (Brasil): Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo. 2007.
59. Matera AG, Terns RM, Terns MP. Non-coding RNAs: lessons from the small nuclear and small nucleolar RNAs. *Nat Rev Mol Cell Biol*. Mar; 8(3): 209-20. 2007.
60. McCarthy JG, Hopper RA. Distraction osteogenesis of zygomatic bone grafts in a patient with Treacher Collins syndrome: a case report. *J Craniofac Surg*. Mar; 13(2): 279-83. 2002.
61. Meier UT, Blobel G. Nopp140 shuttles on tracks between nucleolus and cytoplasm. *Cell* 70: 127–38. 1992.

62. Michaelson JS, Bader D, Kuo F, Kozak C, Leder P. Loss of Daxx, a promiscuously interacting protein, results in extensive apoptosis in early mouse development. *Genes Dev.* Aug 1;13(15):1918-23. 1999.
63. Michaelson JS, Leder P. RNAi reveals anti-apoptotic and transcriptionally repressive activities of DAXX. *J Cell Sci.* Jan 15; 116(Pt 2): 345-52. 2003.
64. Minguell JJ, Erices A, Conget P. Mesenchymal stem cells. *Exp Biol Med (Maywood)* 226(6): 507-20. 2001.
65. Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Robey PG, Shi S. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(10): 5807-12. 2003.
66. Palacios R, Gazave E, Goñi J, Piedrafita G, Fernando O, Navarro A, Villoslada P. Allele-specific gene expression is widespread across the genome and biological processes. *PLoS ONE*; 4(1): e4150. 2009.
67. Paznekas WA, Zhang N, Gridley T, Jabs EW. Mouse *TCOF1* is expressed widely, has motifs conserved in nucleolar phosphoproteins, and maps to chromosome 18. *Biochem Biophys Res Commun.* Set 8; 238(1): 1-6. 1997.
68. Perlman R, Schiemann WP, Brooks MW, Lodish HF, Weinberg RA. TGF-beta-induced apoptosis is mediated by the adapter protein Daxx that facilitates JNK activation. *Nat Cell Biol.* Ago; 3(8): 708-14. 2001.
69. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science.* Abr 2; 284(5411): 143-7. 1999.
70. Poswillo D. The pathogenesis of Treacher Collins syndrome (mandibulofacial dysostosis). *Br J Oral Surg* 13: 1–26. 1975.
71. Richieri-Costa A, Bortolozo MA, Lauris JR, Lauris RC, Guion-Almeida ML, Marques D, Moreti D. Mandibulofacial dysostosis: Report on two Brazilian families suggesting autosomal recessive inheritance. *Am J Med Genet* 46: 659–664. 1993.
72. Ruggero D, Grisendi S, Piazza F, Rego E, Mari F, Rao PH, Cordon-Cardo C, Pandolfi PP. Dyskeratosis congenita and cancer in mice deficient in ribosomal RNA modification. *Science*, 299, 259–262. 2003.
73. Salomoni P, Khelifi AF. Daxx: death or survival protein? *Trends Cell Biol.* Fev; 16(2): 97-104. 2006.
74. Santagati F, Rijli FM. Cranial neural crest and the building of the vertebrate head. *Nat Rev* 4: 806-818. 2003.
75. Sauka-Spengler T, Bronner-Fraser M. A gene regulatory network orchestrates neural crest formation. *Nat Rev* 9: 557-568. 2008.
76. Shi S, Robey PG, Gronthos S. Comparison of human dental pulp and bone marrow stromal stem cells by cDNA microarray analysis. *Bone* 29(6): 532-9. 2001.
77. Smyth GK. Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Stat Appl Genet Mol Biol.* 3: Article3. 2004.

78. So R, Gonzales B, Henning D, Dixon J, Dixon MJ, Valdez BC. Another face of the Treacher Collins Syndrome (*TCOF1*) gene: identification of additional exons. *Gene*; 328: 49–57. 2004.
79. Splendore A, Silva EO, Alonso LG, Richieri-Costa A, Alonso N, Rosa A, Carakushanky G, Cavalcanti DP, Brunoni D, Passos-Bueno MR. High mutation detection rate in *TCOF1* among Treacher Collins syndrome patients reveals clustering of mutations and 16 novel pathogenic changes. *Hum Mutat* 16(4): 315-22. 2000.
80. Splendore A, Jabs EW, Passos-Bueno MR. Screening of *TCOF1* in patients from different populations: confirmation of mutational hot spots and identification of a novel missense mutation that suggests an important functional domain in the protein treacle. *J Med Genet*. Jul; 39(7): 493-5. 2002.
81. Splendore, A. Estudo molecular do gene *TCOF1* em pacientes portadores da síndrome de Treacher Collins [tese (Doutorado em Genética Humana)]. São Paulo (Brasil): Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo. 2002.
82. Splendore A, Fanganiello RD, Masotti C, Morganti LS, Passos-Bueno MR. *TCOF1* mutation databased: novel mutation in the alternatively spliced exon 6A and update in mutation nomenclature. *Hum Mutat* 25(5): 429-34. 2005.
83. Stelnicki EJ, Lin WY, Lee C, Grayson BH, McCarthy JG. Long-term outcome study of bilateral mandibular distraction: a comparison of Treacher Collins and Nager syndromes to other types of micrognathia. *Plast Reconstr Surg*. Maio; 109(6): 1819-25. 2002.
84. Sudo K, Kanno M, Miharada K, Ogawa S, Hiroyama T, Saijo K, Nakamura Y. Mesenchymal progenitors able to differentiate into osteogenic, chondrogenic, and/or adipogenic cells in vitro are present in most primary fibroblast-like cell populations. *Stem Cells*. Jul;25(7):1610-7. 2007.
85. Sulik KK, Johnston MC, Smiley SJ, Speight HS, Jarvis BE. Mandibulofacial dysostosis (Treacher Collins syndrome): a new proposal for its pathogenesis. *Am J Med Genet*. Jun; 27(2): 359-72. 1987.
86. Szlazak J. Treacher Collins syndrome. *Can Med Assoc J*. Set; 69(3): 274-6. 1953.
87. Teber OA, Gillesen-Kaesbach G, Fischer S, Böhringer S, Albrecht B, Albert A, Arslan-Kirchner M, Haan E, Hagedorn-Greiwe M, Hammans C, Henn W, Hinkel GK, König R, Kunstmann E, Kunze J, Neumann LM, Prott EC, Rauch A, Rott HD, Seidel H, Spranger S, Sprengel M, Zoll B, Lohmann DR, Wiczorek D. Genotyping in 46 patients with tentative diagnosis of Treacher Collins syndrome revealed unexpected phenotypic variation. *Eur J Hum Genet*. Nov; 12(11): 879-90. 2004.
88. The Treacher Collins Syndrome Collaborative Group. Positional cloning of a gene involved in the pathogenesis of Treacher Collins syndrome. *Nature Genet* 12: 130–36. 1996.
89. Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nat Rev Immunol*. Set; 8(9): 726-36. 2008.
90. Untergasser G, Gander R, Lilg C, Lepperdinger G, Plas E, Berger P. Profiling molecular targets of TGF-beta1 in prostate fibroblast-to-myofibroblast transdifferentiation. *Mech Ageing Dev*. Jan; 126(1): 59-69. 2005.
91. Valdez, B.C., Henning, D., So, R.B., Dixon, J. and Dixon, M.J. The Treacher Collins syndrome (*TCOF1*) gene product is involved in ribosomal DNA gene transcription by interacting with upstream binding factor. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 101, 10709–10714. 2004.

92. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* Jun 18;3(7). 2002.
93. Vazquez A, Bond AE, Levine AJ, Bond GL. The genetics of the p53 pathway, apoptosis and cancer therapy. *Nat Rev*, 7: 979-987. 2008.
94. Winokur ST, Shiang R. The Treacher Collins syndrome (*TCOF1*) gene product, treacle, is targeted to the nucleolus by signals in its C-terminus. *Hum Mol Genet* 7: 1947-52. 1998.
95. Williams JT, Southerland SS, Souza J, Calcutt AF, Cartledge RG. Cells isolated from adult human skeletal muscle capable of differentiating into multiple mesodermal phenotypes. *Am Surg* 65(1): 22-6. 1999.
96. Wise CA, Chiang LC, Paznekas WA, Sharma M, Musy MM, Ashley JA, Lovett M, Jabs EW. *TCOF1* gene encodes a putative nucleolar phosphoprotein that exhibits mutations in Treacher Collins Syndrome throughout its coding region. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Apr 1; 94(7): 3110-5. 1997.
97. Yan H, Yuan W, Velculescu VE, Vogelstein B, Kinzler KW. Allelic variation in human gene expression. *Science.* Ago 16; 297(5584): 1143. 2002.
98. Yang X, Khosravi-Far R, Chang HY, Baltimore D. Daxx, a novel Fas-binding protein that activates JNK and apoptosis. *Cell.* Jun 27; 89(7): 1067-76. 1997.

ANEXOS

ANEXO I

TERMOS DE CONSENTIMENTO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
(menores de 18 anos)

ESTUDO: Estudo funcional de células-tronco mesenquimais com mutações patogênicas no TCOF1

Seu filho(a) está sendo convidado(a) a participar do projeto de pesquisa acima citado. O documento abaixo contém todas as informações necessárias sobre a pesquisa que estamos fazendo. Sua colaboração neste estudo será de muita importância para nós.

Nome data de
nasc. ____/____/____ Endereço.....n.º.....
Bairro.....Complemento.....Cidade.....UF....
.....CEP.....Tel(.....).....

Eu.....RG.....
abaixo assinado(a), concordo de livre e espontânea vontade que meu(minha) filho(a)
..... nascido(a) em
____/____/____, seja voluntário(a) do estudo *Estudo funcional de células-tronco mesenquimais com
mutações patogênicas no TCOF1*, esclareço que obtive todas informações necessárias e fui esclarecido(a)
de todas as dúvidas apresentadas.

Estou ciente que:

- I) O(a) menor acima citado tem necessidade da realização de tratamento cirúrgico estabelecido pelo cirurgião plástico e equipe e que durante o protocolo serão descartados pequenos. Portanto, autorizo a utilização deste fragmento para pesquisa, o qual poderá contribuir para um melhor tratamento da síndrome de Treacher Collins no futuro;
- II) Serão coletados de 5 a 10 mL de sangue periférico, se necessário para a realização de diagnóstico molecular, o que confere risco mínimo à saúde;
- III) Essa(s) coleta(s) será(ão) feita(s) apenas para este estudo e em nada influenciará no tratamento de meu (minha) filho(a); não vai curá-lo (a); não causará nenhum problema;
- IV) Tenho a liberdade de desistir ou interromper a colaboração neste estudo no momento em que desejar, sem necessidade de qualquer explicação. A desistência não causará nenhum prejuízo a mim, nem ao(a) meu (minha) filho(a), não interferindo de forma alguma no seu tratamento;
- V) Os resultados obtidos durante este ensaio serão mantidos em sigilo, mas concordo que sejam divulgados em publicações científicas, desde que nem o meu nome nem o de meu(minha) filho(a) sejam mencionados;
- VI) Caso eu desejar, poderei tomar conhecimento dos resultados ao final desta pesquisa:
() Desejo conhecer os resultados desta pesquisa.
() Não desejo conhecer os resultados desta pesquisa.
- VII) Caso sejam tiradas fotografias,
() concordo que sejam incluídas em publicações científicas, se necessário
() concordo que sejam apresentadas em aulas para profissionais da saúde
() não concordo que sejam incluídas em nenhum tipo de publicação ou apresentação.
- VII) Concordo que as linhagens celulares estabelecidas sejam armazenadas no Instituto de Biociências, USP, sob a guarda da Prof.^a Dra. Maria Rita Passos Bueno e que sejam utilizadas em futuras pesquisas para um melhor compreensão desta doença.

São Paulo, _____ de _____ de _____

Responsável _____

Responsáveis pelo Projeto:

Mestranda Camila Camanzano Ornelas tel.: (11) 3091-9910

Orientadora: Prof.^a Dra Maria Rita Passos Bueno tel: (11) 3091-9910

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
(maiores de 18 anos)

ESTUDO: Estudo funcional de células-tronco mesenquimais com mutações patogênicas no TCOF1

Você está sendo convidado(a) a participar do projeto de pesquisa acima citado. O documento abaixo contém todas as informações necessárias sobre a pesquisa que estamos fazendo. Sua colaboração neste estudo será de muita importância para nós.

Nome data de
nasc. ____/____/____ Endereço.....nº.....
Bairro.....Complemento.....Cidade.....UF.....
.....CEP.....Tel(.....).....

Eu, RG.....
abaixo assinado(a), concordo de livre e espontânea vontade em ser voluntário(a) do estudo *Estudo funcional de células-tronco mesenquimais com mutações patogênicas no TCOF1* e esclareço que obtive todas as informações necessárias e fui esclarecido(a) de todas as dúvidas apresentadas.

Estou ciente que:

- VIII) Tenho a necessidade da realização de tratamento cirúrgico estabelecido pelo cirurgião plástico e equipe e que durante o protocolo serão descartados pequenos fragmentos de tecido que recobre osso facial. Portanto, autorizo a utilização deste fragmento para pesquisa, a qual poderá contribuir para um melhor tratamento da Síndrome de Treacher Collins no futuro;
- IX) Serão coletados de 5 a 10 mL de sangue periférico, se necessário para a realização de diagnóstico molecular, o que confere risco mínimo à saúde;
- X) Essa(s) coleta(s) será(ão) feita(s) apenas para este estudo e em nada influenciará meu tratamento; não vai me curar; não vai me causar nenhum problema
- XI) Tenho a liberdade de desistir ou interromper a colaboração neste estudo no momento em que desejar, sem necessidade de qualquer explicação. A desistência não me causará nenhum prejuízo a mim, nem interferirá de forma alguma no meu tratamento;
- XII) Os resultados obtidos durante este ensaio serão mantidos em sigilo, mas concordo que sejam divulgados em publicações científicas, desde que meu nome não seja mencionado;
- XIII) Caso eu desejar, poderei tomar conhecimento dos resultados ao final desta pesquisa:
() Desejo conhecer os resultados desta pesquisa.
() Não desejo conhecer os resultados desta pesquisa.
- XIV) Caso sejam tiradas fotografias,
() concordo que sejam incluídas em publicações científicas, se necessário
() concordo que sejam apresentadas em aulas para profissionais da saúde
() não concordo que sejam incluídas em nenhum tipo de publicação ou apresentação.
- VII) Concordo que as linhagens celulares estabelecidas sejam armazenadas no Instituto de Biociências, USP, sob a guarda da Prof.^a Dra. Maria Rita Passos Bueno e que sejam utilizadas em futuras pesquisas para uma melhor compreensão desta doença.

São Paulo, ____ de _____ de ____

Responsável _____

Responsáveis pelo Projeto:

Mestranda Camila Camanzano Ornelas tel.: (11) 3091-9910

Orientadora: Prof.^o Dra Maria Rita Passos Bueno tel: (11) 3091-9910

ANEXO II

CARACTERIZAÇÃO DO IMUNOFENÓTIPO DAS CULTURAS CELULARES

STC1 – fibroblastos

Fig. II.1. Resultados da caracterização do imunofenótipo por citometria de fluxo dos fibroblastos de **STC1**. Os gráficos são o resultado do número de células em função da fluorescência dos anticorpos de diferentes marcadores (**CD29**, **CD117**, **CD44**, **CD45**, **HLA-ABC**, **CD31**, **CD73(SH4)**, **CD105(SH2)**, **STRO-1**, **HLA-DR**). Os controles não marcados, identificados como *sem marcar* foram utilizados como parâmetros para a definição da população celular que apresentava o antígeno, destacada em vermelho, cuja porcentagem em relação ao total de células está indicada no gráfico. **Verde: células não marcadas; Vermelho: células marcadas.**

STC2 – fibroblastos

Fig. II.2. Resultados da caracterização do imunofenótipo por citometria de fluxo dos fibroblastos de **STC2**. Os gráficos são o resultado do número de células em função da fluorescência dos anticorpos de diferentes marcadores (**CD29**, **CD117**, **CD44**, **CD45**, **HLA-ABC**, **CD31**, **CD73(SH4)**, **CD105(SH2)**, **STRO-1**, **HLA-DR**). Os controles não marcados, identificados como *sem marcar* foram utilizados como parâmetros para a definição da população celular que apresentava o antígeno, destacada em vermelho, cuja porcentagem em relação ao total de células está indicada no gráfico. **Verde: células não marcadas; Vermelho: células marcadas.**

STC3 – células-tronco mesenquimais

Fig. II.3. Resultados da caracterização do imunofenótipo por citometria de fluxo das células-tronco mesenquimais de STC3. Os gráficos são o resultado do número de células em função da fluorescência dos anticorpos de diferentes marcadores (CD29, CD117, CD44, CD45, HLA-ABC, CD31, CD73(SH4), CD90, CD105(SH2), SH3, STRO-1, HLA-DR). Os controles não marcados, identificados como *sem marcar* foram utilizados como parâmetros para a definição da população celular que apresentava o antígeno, destacada em vermelho, cuja porcentagem em relação ao total de células está indicada no gráfico. **Verde:** células não marcadas; **Vermelho:** células marcadas.

STC4 – células-tronco mesenquimais

Fig. II.4. Resultados da caracterização do imunofenótipo por citometria de fluxo das células-tronco mesenquimais de STC4. Os gráficos são o resultado do número de células em função da fluorescência dos anticorpos de diferentes marcadores (CD29, CD117, CD44, CD45, HLA-ABC, CD31, CD73(SH4), CD90, CD105(SH2), SH3, STRO-1, HLA-DR). Os controles não marcados, identificados como *sem marcar* foram utilizados como parâmetros para a definição da população celular que apresentava o antígeno, destacada em vermelho, cuja porcentagem em relação ao total de células está indicada no gráfico. **Verde:** células não marcadas; **Vermelho:** células marcadas.

Controle 1 – fibroblastos

Fig. II.5. Resultados da caracterização do imunofenótipo por citometria de fluxo dos fibroblastos de **controle 1**. Os gráficos são o resultado do número de células em função da fluorescência dos anticorpos de diferentes marcadores (CD29, CD117, CD44, CD45, HLA-ABC, CD31, CD73(SH4), CD90, SH3, STRO-1, HLA-DR). Os controles não marcados, identificados como *sem marcar* foram utilizados como parâmetros para a definição da população celular que apresentava o antígeno, destacada em vermelho, cuja porcentagem em relação ao total de células está indicada no gráfico. **Verde: células não marcadas; Vermelho: células marcadas.**

Controle 2 – fibroblastos

Fig. II.6. Resultados da caracterização do imunofenótipo por citometria de fluxo dos fibroblastos do **controle 2**. Os gráficos são o resultado do número de células em função da fluorescência dos anticorpos de diferentes marcadores (**CD29, CD117, CD44, CD45, HLA-ABC, CD31, CD73(SH4), CD105(SH2), STRO-1, HLA-DR**). Os controles não marcados, identificados como *sem marcar* foram utilizados como parâmetros para a definição da população celular que apresentava o antígeno, destacada em vermelho, cuja porcentagem em relação ao total de células está indicada no gráfico. **Verde: células não marcadas; Vermelho: células marcadas.**

Controle 3 – células-tronco mesenquimais

Fig. II.7. Resultados da caracterização do imunofenótipo por citometria de fluxo das células-tronco mesenquimais do **controle 3**. Os gráficos são o resultado do número de células em função da fluorescência dos anticorpos de diferentes marcadores (**CD29, CD117, CD44, CD45, HLA-ABC, CD31, CD73(SH4), CD90, SH3, STRO-1, HLA-DR**). Os controles não marcados, identificados como *sem marcar* foram utilizados como parâmetros para a definição da população celular que apresentava o antígeno, destacada em vermelho, cuja porcentagem em relação ao total de células está indicada no gráfico. **Verde: células não marcadas; Vermelho: células marcadas.**

Controle 4 – células-tronco mesenquimais

Fig. II.8. Resultados da caracterização do imunofenótipo por citometria de fluxo das células-tronco mesenquimais do **controle 4**. Os gráficos são o resultado do número de células em função da fluorescência dos anticorpos de diferentes marcadores (**CD29, CD117, CD44, CD45, HLA-ABC, CD73(SH4), CD90, CD105, SH3, HLA-DR**). Os controles não marcados, identificados como *sem marcar* foram utilizados como parâmetros para a definição da população celular que apresentava o antígeno, destacada em vermelho, cuja porcentagem em relação ao total de células está indicada no gráfico. **Verde: células não marcadas; Vermelho: células marcadas.**