Estela Mitie Cruvinel

**Estudo de expressão do gene *UBE3A* em
neurônios derivados de células-tronco da polpa
dentária de pacientes com a síndrome de
Angelman**

São Paulo

2011

Estela Mitie Cruvinel

**Estudo de expressão do gene *UBE3A* em
neurônios derivados de células-tronco da polpa
dentária de pacientes com a síndrome de
Angelman**

Dissertação apresentada ao
Instituto de Biociências da
Universidade de São Paulo, para
obtenção do título de Mestre em
Ciências, na área de Genética e
Biologia Evolutiva

Orientadora: Profa. Dra. Célia
Prizskulnik Koiffmann

São Paulo

2011

Cruvinel, Estela Mitie

Estudo de expressão do gene *UBE3A* em neurônios derivados de células-tronco da polpa dentária de pacientes com a síndrome de Angelman

Dissertação de Mestrado – Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, Departamento de Genética e Biologia Evolutiva

- 1- Síndrome de Angelman
- 2- Células-tronco da polpa de dente
- 3- *UBE3A*
- 4- Diferenciação neurogênica
- 5- *Imprinting* genômico

Comissão Julgadora:

.....

.....

.....

Agradecimentos:

À minha orientadora, Dra. Célia P. Koiffmann, pela oportunidade, pela confiança e pela ajuda durante e antes do mestrado.

Aos meus amigos que frequentam ou frequentaram o laboratório da Prof^a. Célia Koiffmann pela companhia durante todos esses anos. À Monica e Rose, que desde minha chegada ao laboratório me receberam com muita boa vontade, bom humor e sabedoria. À Claudia pelo carinho, pelas risadas e por me ensinar e acompanhar nos estudos com FISH. À Ilana, Carla e Cris pela amizade e pelos ensinamentos. Às meninas mais novas: Lu, Mauren e Amanda pela ajuda na citogenética e pela alegria. À Laura e André, pela companhia em congresso, em festas e no laboratório. À Lucilene por resolver alguns problemas burocráticos e pelo intermédio com os pais dos pacientes e voluntários para a doação de dentes. E à Maria por arrumar o laboratório.

Ao Prof^o Antonio C. Cassola pela ajuda com os experimentos de eletrofisiologia, pelo auxílio nas análises, pela colaboração e pela paciência. Ao aluno dele, Daniel, pela ajuda e pelo tempo dedicado aos experimentos de avaliação dos níveis de cálcio ao adicionar neurotransmissores.

A Prof^a Mayana Zatz e prof^a Maria Rita P. Bueno pelo auxílio e pela disponibilização de alunos, espaço físico e equipamentos para o desenvolvimento dessa dissertação.

Aos alunos de pós e às pós-doc do “lab. células-tronco”: Marcos, Tati, Nati, Carmão e Helô pela ajuda, por dividir o espaço tão apertadinho e pelos materiais que utilizei. Às ICs: Mayra, Ju, Amanda e Gabi pela companhia e

pelas dicas. E a todos outros alunos da Prof^a Mayana Zatz pelo ótimo convívio e pela companhia em especial à Inês que me acompanhou por um bom tempo e ao Miguel que me ajudou com os anticorpos.

Às minhas queridas e fundamentais amigas: Mari e Camila pelo auxílio, pelo tempo, por tudo! Mari, sem você não sei o que seria do meu mestrado.

Ao Cleber A. Trujillo, aluno do Prof. Henning Ulrich, pela colaboração com os experimentos de avaliação da resposta aos neurotransmissores.

Aos alunos da Prof^a Maria Rita P. Bueno, em especial ao Gerson, à Meire, à Simone, à Larissa, à Karina e à Dani por me ensinarem a cultivar as células-tronco da polpa do dente, por dividirem a sala de cultura comigo, pela ajuda e por me auxiliar na citometria de fluxo.

À Prof^a Luciana Haddad pelas dicas, pela atenção durante a disciplina e pelo empréstimo de reagentes.

Ao Prof^o Keith pelos conselhos durante minha qualificação e pelas dicas na redação final da dissertação.

Aos meus amigos e familiares, que tanto amo, pelo apoio e eu sei que sempre posso contar sempre com vocês.

Ao meu querido Rafael por ouvir minhas reclamações quando os experimentos não iam como esperado, pelos conselhos e pelo carinho.

Ao CNPq e à FAPESP pelo apoio financeiro.

Por último, mas mais importante, à minha mãe que sempre me ajuda e me apóia, muito obrigada por tudo!

ÍNDICE

1.1 - Resumo	5
1.2 - Abstract	7
2 - Introdução	9
2.1 - Síndrome de Angelman	9
2.2 - GENE <i>UBE3A</i>	14
2.3 - Células-tronco	23
2.4 - Células-tronco da polpa dentária	27
3 - Objetivos	34
4 - Materias e métodos	35
4.1 - Pacientes e considerações éticas	35
4.2 - Isolamento das células-tronco da polpa do dente	35
4.3 - Estabelecimento das linhagens celulares	36
4.4 - Congelamento das células	37
4.5 - Citometria de fluxo	37
4.6 - Diferenciação condrogênica	38
4.7 - Diferenciação adipogênica	38

4.8 - Diferenciação osteogênica	39
4.9 - Diferenciação neurogênica	39
4.9.1- Diferenciação neurogênica (protocolo de Arthur e colaboradores, 2008)	39
4.9.2- Diferenciação neurogênica (protocolo de Király e colaboradores, 2009)	40
4.10 - Imunocitoquímica	41
4.11 - Extração de RNA e preparação de cDNA	41
4.12 - RT-PCR	42
4.13 -Avaliação da expressão de receptores para ATP, glutamato e NMDA	43
4.14 -Avaliação da expressão de receptores metabotrópicos ou ionotrópicos para glutamato e para acetilcolina	43
4.15 - Avaliação da expressão de canais para Na ⁺ dependentes de voltagem (Na _v) pela técnica de “patch clamp”, configuração “whole- cell”	44
4.16 - PCR em tempo real	46
4.17 - Hibridação <i>in situ</i> fluorescente (FISH)	47
5 - Resultados	50
5.1 - Caracterização das células-tronco da polpa do dente	50

5.2 - Diferenciação neurogênica	55
5.2.1 - Protocolo de Arthur <i>et al.</i>, 2008	55
5.2.2 – Protocolo de Király <i>et al.</i>, 2009	62
5.3 - Diferenciação neurogênica de células de pacientes com Síndrome de Angelman	64
5.4 - Análises da expressão do gene <i>UBE3A</i>	73
6 - Discussão	79
7 - Conclusão	90
8 – Referência bibliográfica	93

ABREVIACÕES

AS – síndrome de Angelman

PWS – síndrome de Prader-Willi

DPSCs – células-tronco da polpa do dente (dente permanente)

SHEDs – células-tronco da polpa do dente (dente de leite)

NC – células de controles normais

DIF – células induzidas à diferenciação neurogênica

ND – células não induzidas à diferenciação

MAP2 – proteína associada aos microtúbulos

TUJ1 – β -tubulina III

NeuN – proteína nuclear específica de neurônios

NF200 – anticorpo que se liga aos NF-L, NF-M e NF-H

NF-L – neurofilamento de baixo peso molecular

NF-M- neurofilamento de médio peso molecular

NF-H – neurofilamento de alto peso molecular

ICR – região de controle do *imprinting*

snoRNA – pequeno RNA nucleolar (small nucleolar RNA)

1.1- RESUMO

Síndrome de Angelman (AS - MIM 105830) é causada pela ausência de função do gene *UBE3A* que codifica uma proteína ubiquitina - ligase (E6-AP). Esse gene é expresso bialelicamente em vários tecidos exceto no cérebro, onde a expressão é preferencialmente materna. O RNA anti-senso de *UBE3A* é considerado o regulador dessa expressão diferencial entre os alelos, e faz parte de um transcrito grande que só o alelo paterno é expresso devido ao *imprinting* genômico; no cérebro, esse transcrito se entende até a região anti-senso de *UBE3A*, mas nos demais tecidos o transcrito é menor e não engloba a região anti-senso. Este trabalho visa obter um modelo para estudo da AS. Células-tronco da polpa do dente (SHEDs) de pacientes com deleção do segmento 15q11-q13 ou mutação no gene *UBE3A* foram caracterizadas e submetidas à diferenciação neuronal. A diferenciação foi analisada através do estudo de RNA e proteínas para marcadores neuronais e, também, por testes funcionais. As SHEDs são células-tronco mesenquimais e constituem uma população heterogênea. Essas células ou algumas dessas células já expressam algumas proteínas neuronais ou de células excitáveis como nestina, β -tubulina III, MAP2 e proteína de canais dependentes de voltagem de sódio e potássio. Um ponto interessante é que as SHEDs apresentam baixa expressão do *UBE3A* anti-senso e a expressão do *UBE3A* nas células de pacientes é menor que 50% da expressão encontrada nas células de controles, que pode indicar a ocorrência de expressão preferencial materna desse gene em outros tipos celulares além de neurônios maduros. Quando induzidas à diferenciação neurogênica, a maioria das linhagens controles apresentou aumento da

expressão de MAP2 e, principalmente, β -tubulina III; e a maioria das linhagens de pacientes com AS não apresentou aumento notável na expressão dessas proteínas, exceto uma linhagem de paciente que aumentou a expressão de β -tubulina III. As células induzidas à diferenciação apresentaram aumento estatisticamente significativo da condutância de sódio através de canais de sódio dependentes de voltagem. Com a análise de expressão de *UBE3A* e do *UBE3A* anti-senso é possível afirmar que a expressão deles não alterou com a diferenciação neuronal. Assim, é possível concluir que as células-tronco da polpa do dente, com o protocolo de diferenciação neurogênica, progrediram na via de diferenciação, mas a maioria das células não atingiu o estágio de maturação necessário para que ocorresse o *imprinting* do *UBE3A* ou a via de diferenciação não ia em direção a neurônios que apresentam *imprinting* do *UBE3A*.

1.2- ABSTRACT

Angelman syndrome (AS - MIN 105830) is caused by the loss of function of the maternal *UBE3A* gene, which encodes an ubiquitin protein ligase (E6-AP). *UBE3A* displays biallelic expression in most of tissues, but maternal predominant expression is observed in the brain. A RNA antisense that is paternally expressed in some regions in the brain is considered to be responsible for this tissue-specific imprinting; *UBE3A* antisense is part of a large transcript that starts at *SNURF-SNRPN* gene and is paternally expressed, and in the brain this transcript includes *UBE3A* antisense region however in other tissues this region is not included. The aim of the present study is to develop a new model for studying AS. Dental pulp stem cells (SHEDs) were characterized and differentiated by an already described protocol. SHEDs intrinsically express some neuronal proteins as nestin, β -tubulin III, MAP2 and voltage-gated sodium channels and potassium channels. Interestingly, SHEDs also present a low expression of *UBE3A* antisense, and *UBE3A* expression in cells from patients with AS is lower than 50% of the cells from normal control, so it is possible that preferential maternal expression of this gene might occur in some cells beyond mature neurons. After the neuronal differentiation, most control lineages and one lineage of AS patients had an increase of MAP2 and β -tubulin III expression. Two control lineages and most lineages from AS patients did not have a notable increase of expression of these proteins. Neuronal differentiated cells displayed an increase in conductance through voltage-gated sodium channels. Analysis of *UBE3A* and *UBE3A* antisense expression in SHEDs and cells induced to differentiate into neurons indicated no changes in their

expression. Thus, after neuronal differentiation induction, dental pulp stem cells progressed through neuronal differentiation pathway. However, most cells did not reach the stage which *UBE3A* imprinting occurs or the neuronal differentiation is resulting in a cell that do not present *UBE3A* imprinting.

2- INTRODUÇÃO

2.1- SÍNDROME DE ANGELMAN

A síndrome de Angelman (AS) foi descrita pelo pediatra Harry Angelman em 1965; todos os pacientes com esta síndrome apresentam atraso grave do desenvolvimento, falha no desenvolvimento da fala, distúrbio de movimento (andar atáxico e movimento trêmulo dos membros) e comportamento característico (crise de risos facilmente motivada). Além disso, algumas outras características são recorrentes como: microcefalia, epilepsia, padrão anormal no eletroencefalograma, língua protrusa, hipotonia, atração por água, e obesidade a partir da adolescência (Varela *et al.*, 2004; Williams *et al.*, 2006; Williams, 2010).

A síndrome de Angelman (AS) é um distúrbio neurocomportamental resultante da perda da expressão do gene *UBE3A* de origem materna que se localiza no cromossomo 15 humano (Nicholls *et al.*, 1993). O gene *UBE3A* está inserido na região 15q11-q13 que tem vários genes que apresentam *imprinting* genômico.

O *imprinting* genômico é a expressão diferencial dos alelos dependendo de sua origem parental, podendo ser um fenômeno tecido específico ou estágio específico; o *imprinting* é importante para regulação da expressão gênica, e influencia no crescimento, desenvolvimento e viabilidade; assim, anormalidade no *imprinting* pode desencadear algumas doenças como: AS e síndrome de Prader-Willi (Butler, 2009; Chamberlain e Lalande, 2010).

A região 15q11-q13 apresenta pelo menos 15 transcritos imprintados: 13 deles expressos, preferencialmente, a partir do cromossomo paterno: *MKRN3*, *MAGEL2*, *NDN*, *SNURF-SNRPN*, *IPW*, *PAR-1*, e vários são snoRNAs (*small nucleolar RNAs*), como *HBII-13*, *HBII-85*, *HBII-52*, *HBII-436*, *HBII-437*, *HBII-438A* e *HBII-438B*; e somente 2 de expressão, preferencialmente, materna: *UBE3A* e *ATP10A* (fig. 1) (Nicholls *et al.*, 1998; Runte *et al.*, 2001). A AS é decorrente da ausência de expressão do alelo materno do gene *UBE3A*, enquanto que a ausência da expressão de genes expressos preferencialmente a partir do cromossomo paterno causa a síndrome de Prader-Willi (PWS) (Chamberlain e Lalande, 2010).

Figura 1: Esquema da expressão de genes da região 15q11-q13 (modificado de Horsthemke e Wagstaff, 2008). Essa região apresenta vários genes com expressão preferencial ou exclusiva paterna, enquanto que a expressão materna é preferencial em somente 2 genes. Essa figura mostra parte do cromossomo de origem paterna (PAT) e do cromossomo de origem materna

(MAT) e os vários genes contidos na região representados por caixas ou traços. As setas mais grossas indicam alta expressão do alelo, enquanto que as setas mais finas indicam uma menor expressão do alelo. Na figura, cen indica o centrômero e tel indica o telômero.

A PWS é uma doença com quadro clínico distinto da AS. O quadro clínico de pacientes com PWS varia com a idade; primeiramente, apresentam diminuição dos movimentos fetais, e quando recém-nascidos, ocorre hipotonia, ausência de sucção, com dificuldade de ganho de peso e baixa estatura; posteriormente inicia uma fase de hiperfagia e obesidade. Outras características são: atraso no desenvolvimento neuropsicomotor, retardo mental moderado a grave, hipogonadismo, face característica (olhos amendoados, fronte estreita, lábio superior fino com cantos voltados para baixo), mãos e pés pequenos, comportamento obsessivo-compulsivo, distúrbio no sono e aumento do risco de doenças com espectro autista (Holm *et al.*, 1993; Varela *et al.*, 2005; Hogart *et al.*, 2008).

Diferentes mecanismos genéticos causam AS ou PWS: deleção do segmento 15q11-q13 em 70-75% dos casos de AS e 70% de PWS (Knoll *et al.*, 1989), dissomia uniparental paterna do cromossomo 15 em 2-3% na AS (Magenis *et al.*, 1990) e dissomia uniparental materna em 25% na PWS (Mascari *et al.*, 1992), defeito no centro de controle de *imprinting* corresponde a 5% e 2%, para AS e PWS, respectivamente (Buiting *et al.*, 1995), e no caso da AS pode ocorrer mutação de um único gene, *UBE3A*, cuja frequência é de 8% dos casos (Kishino *et al.*, 1997).

A maioria dos casos é decorrente de deleção, isso porque o segmento 15q11-q13 apresenta grande instabilidade meiótica, originando muitos rearranjos cromossômicos devido à presença de “duplicons” (LCR - “*low copy*

repeat sequences”), pois a grande homologia entre essas sequências facilita o desalinhamento e recombinação desigual durante a meiose (Ji *et al.*, 2000), podendo resultar em doenças genômicas como AS e PWS.

Alguns pontos de quebra, que são sítios de quebra cromossômica, são conhecidos próximos da região PWS/AS; perto deles ou neles foram identificadas seqüências repetidas duplicadas derivadas do gene *HERC2* (Amos-Landgraf *et al.*, 1999). A origem dessas repetições, que correspondem aos primeiros 79 exons do gene *HERC2*, é de rearranjos internos ocorridos durante a evolução dos primatas (Ji *et al.*, 1999).

Na PWS, ao contrário da AS, não existe relato de mutação em um único gene ocasionando todo quadro clínico da doença. Entretanto, Sahoo e colaboradores descreveram um caso de translocação equilibrada que causou uma microdeleção de todo grupo de repetições dos snoRNAs HBII-85 e HBII-438A, e de parte do HBII-52 que fez com que o portador da translocação apresentasse: hipotonia neonatal, dificuldades de sucção, ganho de peso excessivo após 18 meses, hiperfagia, hipogonadismo, atraso no desenvolvimento. Foi proposto que o HBII-85 é o principal responsável por este quadro, pois já foram descritos casos com deleção de todo o grupo de snoRNAs do HBII-52 que não apresentam quadro típico de PWS e HBII-85 é altamente expresso no cérebro (Runte *et al.*, 2004). Camundongos com deleção no MBII-85 apresentaram dificuldade de sucção, mas o adulto era viável sem apresentar obesidade, o que pode indicar que HBII-85 não é o gene principal para causar obesidade ou essa diferença pode refletir diferenças entre espécies (Peters, 2008).

O segmento 15q11-q13 tem uma região responsável pela determinação do padrão do *imprinting*, a região de controle do *imprinting* (ICR). O cromossomo materno apresenta a PWS-ICR hipermetilada, e a AS-ICR, que se localiza a 35kb da PWS-ICR, ativa. Quando a AS-ICR está ativa, ela induz a metilação da PWS-ICR. Além da metilação de ilhas CpG, ocorre metilação das histonas H3K9 e H4K20 na PWS-ICR do alelo materno. No cromossomo paterno, a região AS-ICR está inativa, assim a região PWS-ICR está desmetilada, o que ativa bidirecionalmente genes dessa região; além disso, PWS-ICR apresenta outras marcas epigenéticas, como sítios de hipersensibilidade a DNase I e histonas H3 e H4 acetiladas (fig. 2) (Perk *et al.*, 2002; Lewis *et al.*, 2006; Hogart *et al.*, 2008).

FIGURA 2: Esquema da região imprintada 15q11-q13 e das marcas epigenéticas (modificado de Hogart *et al.*, 2008). Além da expressão diferencial dos genes, o esquema indica as marcas epigenéticas que são importantes para determinação do *imprinting* da região. PAT é parte do

cromossomo paterno, MAT é parte do cromossomo materno, caixas e traços representam vários genes contidos na região, na região PWS/AS IC representa a região AS-ICR e PWS-ICR, cen indica o centrômero e tel indica o telômero.

2.2- GENE *UBE3A*

A ausência da expressão materna do gene *UBE3A* é a principal responsável pelo quadro clínico da AS, pois foram relatados pacientes com quadro clínico contendo as principais características da síndrome e com mutação no gene *UBE3A* (Kishino *et al.*, 1997).

A região 15q11-q13 possui vários genes que têm a expressão controlada pela metilação. Entretanto, um processo diferente controla o *imprinting* do *UBE3A*, pois ele não apresenta um promotor de metilação de origem parental específica nem modificações epigenéticas de origem parental específica (Horsthemke e Wagstaff, 2008).

O RNA anti-senso deste gene é considerado o responsável pela inibição da expressão do alelo paterno. Em células que apresentam expressão diferencial de *UBE3A* entre alelos dependendo da origem parental é observado que o *UBE3A* é transcrito do alelo materno e *UBE3A* anti-senso é expresso do alelo paterno (Rougeulle *et al.*, 1998; Yamasaki *et al.*, 2003; Roloff e Nuber, 2005; Johnstone *et al.*, 2006).

O *imprinting* de *UBE3A* foi, inicialmente, observado pelos estudos com células de Purkinje, neurônios do hipocampo e células mitrales do bulbo olfatório de camundongos; esses tipos celulares apresentaram expressão exclusiva ou

predominantemente materna (Albrecht *et al.*, 1997). Além disso, foi observado num estudo com tecidos fetais que a expressão é predominantemente materna no sistema nervoso, mas nos demais tecidos fetais (coração e rim) a expressão é bialélica, como ocorre em linfócitos e fibroblastos (Vu e Hoffman, 1997).

Posteriormente, foi verificado que neurônios da região cortical expressam *Ube3a* materno e um transcrito *Ube3a* anti-senso paterno, enquanto as células precursoras neuronais e da glia apresentam expressão do *Ube3a* bialélica, sem a presença do anti-senso (Yamasaki *et al.*, 2003).

Entretanto, Herzing *et al.* (2002), através de RNA-FISH, indicaram que o *UBE3A* apresenta expressão bialélica, porém a maioria dos transcritos é de origem materna nos fibroblastos, linfoblastos e precursores neurais. Contraditoriamente, Runte e colaboradores (2004), afirmaram que o *UBE3A* apresenta expressão bialélica nos linfócitos, e caso o *UBE3A* tenha expressão preferencialmente materna nos linfócitos, o seu efeito é bem pequeno, pois a expressão do *UBE3A* anti-senso é muito baixa em células sanguíneas. Recentemente, foi mostrado que a expressão do *Ube3a* é bialélica no coração, no fígado e no rim, mas a expressão em animais modelo da AS é menor que 50% da expressão encontrada em animais controles, indicando uma expressão preferencial do alelo materno; mas não é conhecido se a menor expressão do *Ube3a* em tecidos periférico é responsável por alguma característica do quadro clínico da AS e se a expressão preferencial do alelo materno é controlada pelo mesmo mecanismo que ocorre no cérebro (Gustin *et al.*, 2010).

O transcrito anti-senso *UBE3A* se inicia no centro de *imprinting* e faz parte do extenso transcrito *SNURF-SNRPN* senso-*UBE3A* anti-senso que tem

mais de 460kb com mais que 146 exons e apresenta vários *small nucleolar RNAs* (snoRNAs – *HBII-436*, *HBII-13*, *HBII-438A/B*, *HBII-85* e *HBII-52*) (fig. 3). Esses snoRNAs apresentam expressão predominante ou exclusivamente paterna no cérebro (Runte *et al.*, 2001; Runte *et al.*, 2004).

Figura 3: Esquema do transcritor que engloba a região *UBE3A* anti-senso (modificado de Horsthemke e Buiting, 2006). O transcritor da região *UBE3A* anti-senso começa na região do centro de *imprinting* e se estende até o *UBE3A*; na região intrônica desse transcritor estão as sequências para vários snoRNAs. Na figura, IC indica o centro de *imprinting*, cen é o lado do centrômero e tel é o lado do telômero.

O transcritor que se inicia no *SNURF-SNRPN* é expresso somente do alelo paterno e sofre *splicing* alternativo tecido-específico. No cérebro o transcritor é maior do que em outros tecidos pesquisados; esse transcritor maior contém os exons 58 até o 149, que é uma região que inclui o *UBE3A* anti-

senso e o snoRNA *HBII-52*. Nos demais tecidos, o transcrito é menor e não inclui a região *UBE3A* anti-senso; assim, o *UBE3A* apresenta expressão bialélica (Runte *et al.*, 2004).

O transcrito *SNURF-SNRPN* que inclui a região *UBE3A* anti-senso é muito grande e com estudos pela técnica de FISH (hibridação *in situ* fluorescente) com sondas que encobrem este transcrito no núcleo de neurônios é possível averiguar que uma cromatina está condensada (sondas sobrepostas) e a outra, descondensada (uma sonda ao lado da outra); e nas células da glia as sondas estavam sobrepostas nos dois alelos. Isso indica que um dos alelos é transcrito, enquanto que o outro está inativo nos neurônios, enquanto que nas células da glia o transcrito grande não é expresso. Além disso, foi observado aumento da área nucleolar nos neurônios, que foi explicado pela presença das sequências de snoRNAs, como *HBII-85* e *HBII-52*, no transcrito grande (Leung *et al.*, 2009).

O transcrito anti-senso é considerado responsável pela inibição do *UBE3A* paterno no cérebro, onde inicialmente foi relatado o *imprinting* nas células de Purkinje, no hipocampo e no bulbo olfativo; mas recentemente, através da análise de várias regiões do cérebro de camundongos modelo para AS, foi apontado que o *imprinting* do *Ube3A* ocorre em várias regiões do cérebro (Gustin *et al.*, 2010). Além disso, embora Yamasaki e colaboradores em 2003 indicassem que a expressão de *Ube3a* é bialélica e em neurônios maduros é preferencialmente materna, não é conhecido o momento da neurogênese no qual ocorre o *imprinting*.

A proteína codificada pelo *UBE3A*, a E6-AP (proteína associada ao E6), é uma enzima ubiquitina-ligase envolvida na degradação protéica. Essa ubiquitina-ligase é capaz de receber a ubiquitina da proteína E2 (enzima ubiquitina-conjugase) através de ligação tioéster que ocorre porque essa enzima possui resíduos de cisteína na região C-terminal, no domínio HECT. A E6-AP transfere a ubiquitina para a proteína-alvo, que é reconhecida através de sequências na região NH₂-terminal da E6-AP (Huibregtse *et al.*, 1995; Glickman and Ciechanover, 2002).

Resumidamente, a via de ubiquitinação envolve, primeiramente, a ativação da ubiquitina pela E1 (enzima ubiquitina-ativadora), que passa o sinal para E2 (enzima ubiquitina-conjugadora), depois a E3 (enzima ubiquitina-ligase) identifica e se liga a proteína-alvo e E3 se liga a E2, assim o sinal de ubiquitinação passa de E2 para E3 e de E3 é transferido para proteína-alvo; dessa maneira, a proteína-alvo recebe uma cadeia de poliubiquitina que é reconhecida pelo proteassoma causando a degradação protéica. Logo, E6-AP identifica a proteína-alvo e tem atividade enzimática (Scheffner *et al.*, 1995; Glickman e Ciechanover, 2002).

Um exemplo desse processo de ubiquitinação envolvendo a E6-AP ocorre na presença de E6, que é uma oncoproteína do gene viral do HPV de alto risco, pois a E6-AP se liga ao E6 e causa a ubiquitinação do supressor de tumor p53. O nome E6-AP (proteína associada à E6) é devido à participação nessa via de ubiquitinação. Recentemente, foi observado que E6-AP na ausência da oncoproteína E6, também, participa da degradação do p53 (Mishra e Jana, 2008).

Na ausência do E6-AP, que é o caso de pacientes com AS, o acúmulo de proteína(s) gera o quadro clínico da síndrome (Matentzoglou e Scheffner, 2008; Lalande e Calciano, 2007). Em todos os pacientes com mutação pontual no gene *UBE3A*, a mutação ocorre no domínio HECT, afetando na atividade de ubiquitina-ligase (Mishra e Jana, 2008). O resíduo de cisteína, que na proteína E6-AP se localiza no domínio HECT e é essencial para formação da ligação tioéster, foi mapeado em regiões altamente conservadas em várias proteínas, indicando que essas proteínas possam ser alvo para via de ubiquitinação (Scheffner *et al.*, 1995; Huibregtse *et al.*, 1995; Glickman e Ciechanover, 2002).

Modelos animais são importantes ferramentas para o estudo de vias afetadas devido a não expressão do *Ube3a* materno; camundongos com mutação no *Ube3a* materno apresentam anormalidades motoras e comportamentais como andar atáxico, epilepsia, eletroencefalograma anormal e déficit de aprendizado. Um grupo mostrou que esse modelo apresenta defeito na potencialização longo termo no hipocampo. Esses defeitos neurológicos foram relacionados com a sinalização pós-sináptica da cálcio/calmodulina quinase do tipo 2 (CaMKII), pois os mutantes apresentavam maiores concentrações de CaMKII autofosforilado, e como essa autofosforilação prolongada ocorre cronicamente, ocasiona diminuição na atividade basal da CaMKII. Este aumento de CaMKII fosforilada pode ser devido à menor atividade de duas CaMKII fosfatase, PP1 e PP2A, observada nos mutantes, mas não foram encontradas proteína alvo do *Ube3a* que estavam com expressão acima do que em animais controles (Weeber *et al.*, 2003; Lalande e Calciano, 2007).

Como mutantes para *Ube3a* apresentam atividade da CaMKII reduzida devido a presença de CaMKII fosforilado cronicamente, foi realizado um experimento com duplos mutantes (AS/CaMKII-305/6^{+/-}), que são mutantes do *Ube3a* materno e mutantes para CaMKII-Thr^{305/306}, que inibem a fosforilação da CaMKII no aminoácido treonina 305. O quadro clínico dos camundongos era significativamente melhor em relação aos problemas motores e de aprendizado do que os mutantes somente para *Ube3a* materno. Assim, concluíram que o excesso de CaMKII-Thr³⁰⁵ fosforilado, está relacionado aos principais efeitos da AS (van Woerden *et al.*, 2007).

Neurônios de camundongos modelo para AS apresentam maturação e arborização dendrítica normal, porém neurogênese adulta afetada, pois as células demoram mais para expressar marcadores maduros como NeuN (proteína expressa em neurônios pós-mitóticos) e, além disso, essas células apresentam plasticidade sináptica alterada com diminuição do número e tamanho das espinhas dendríticas. Essas anormalidades, também, são encontradas em casos de inibição da atividade da CaMKII; portanto, a mutação de *Ube3a* diminui a atividade da CaMKII que, consequentemente, causa problemas na funcionalidade e na plasticidade estrutural sináptica (Dindot *et al.*, 2008; Mardirossian *et al.*, 2009). Yashiro e colaboradores (2009) confirmaram que mutantes *Ube3a*^{m-/p+} apresentam defeitos na maturação de conexões sinápticas dependentes de experiência, isso é decorrentes da baixa plasticidade sináptica, que pode explicar o déficit de aprendizado observado nos pacientes com AS.

As efrinas e os receptores de efrinas (Eph) desempenham importante papel no desenvolvimento das sinapses, e foi descrita uma RhoA GEF (fator de troca de guanina) efexina5 (E5) que inicialmente restringe o desenvolvimento de sinapses dependentes de EphB. Quando ocorre a ligação de EphB com a efrinaB, ocorre a fosforilação e degradação de E5 permitindo o desenvolvimento da sinapse. A degradação de E5 depende da atividade da proteína E6-AP. Em camundongos modelos da AS, ocorre o aumento de E5 e, mesmo com tratamento com efrinaB, não ocorre a degradação de E5, o que explica os defeitos no desenvolvimento e, consequentemente, na função das sinapses (Marolis *et al.*, 2010; Scheiffele e Beg, 2010).

Além disso, verificaram que a sinalização de neurotransmissores regula a transcrição do *Ube3a*. Após um estímulo de neurotransmissor ocorre o aumento de expressão do *Ube3a*, principalmente, após a sinalização por neurotransmissores glutamatérgicos. Outra proteína de sinapse que se liga no domínio de ligação da E6-AP, além da E5, é a proteína Arc e já foi mostrado que os níveis de Arc são maiores em camundongos com mutação no *Ube3a* materno (Mardirossian *et al.*, 2009; Greer *et al.*, 2010). Arc regula o tráfego do receptor do neurotransmissor glutamatérgico alfa-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxalone-propionato (AMPA) nas sinapses, Arc internaliza o receptor AMPA. E6-AP degrada a proteína Arc pela via de ubiquitinação, prevenindo a internalização do receptor AMPA. Logo, na ausência de E6-AP, a proteína Arc não é degradada, e o número de receptores AMPA diminui nas sinapses, e isso pode contribuir para a disfunção cognitiva encontrada nos pacientes com AS (Greer *et al.*, 2010; Tai e Schuman, 2010; Scheiffele e Beg, 2010).

Como vários estudos mostraram que a ausência de expressão do *UBE3A* afeta a atividade sináptica, diminui a plasticidade sináptica dependente de experiência e, assim, afeta a capacidade de memória e aprendizado, um estudo demonstrou que a expressão do *UBE3A* decai conforme a idade em neurônios do córtex auditivo e frontal. Isso demonstra uma alteração importante na função e plasticidade cortical decorrente da idade (Williams *et al.*, 2010).

Além da atividade enzimática de ubiquitina ligase, a E6-AP apresenta atividade de coativador de receptores hormonais nucleares, como o receptor de progesterona e estrógeno; essa atividade de coativador de receptores hormonais não está ligada aos fenótipos da AS, pois mutantes pontuais do *UBE3A* com AS apresentam essa função normalmente; assim, o quadro clínico da AS é decorrente da falta da atividade de ligase de ubiquitina da E6-AP (Nawaz, *et al.*, 1999).

Posteriormente, foi verificado que E6-AP é responsável pela degradação de receptores de estrógeno via ubiquitina. A calmodulina, na presença de cálcio, é capaz de regular essa degradação, pois ela e a E6-AP competem entre si para se ligarem ao receptor de estrógeno e, quando o receptor está ligado a calmodulina, a E6-AP não é capaz de sinalizar a ubiquitinação (Li *et al.*, 2006).

Dindot e colaboradores (2008) observaram que a proteína E6-AP, transcrita pelo gene *UBE3A*, está distribuída na célula, tanto no citoplasma como no núcleo, corroborando as funções até então conhecidas dessa proteína, de enzima de ligase de ubiquitina e de coativador de receptores hormonais.

2.3- Células-tronco

As células-tronco são células precursoras que possuem a capacidade de auto-renovação e de diferenciação, podendo dar origem a uma variedade de tipos teciduais (Watt e Hogan, 2000). De acordo com o seu potencial de gerar um ou mais tipos de células diferenciadas, as células-tronco podem ser classificadas em:

a. Totipotentes: podem gerar todos os tecidos do corpo além dos anexos embrionários. As células totipotentes são encontradas nos zigotos e/ou embriões com até 16 a 32 células;

b. Pluripotentes: podem gerar todos os tipos celulares provenientes dos 3 folhetos embrionários e, além disso, apresentam a capacidade de se diferenciar em células germinativas. As células pluripotentes constituem a massa celular interna do blastocisto e são chamadas de células-tronco embrionárias.

c. Multipotentes: podem gerar vários tipos celulares, e podem ser encontradas em vários tecidos do organismo adulto;

d. Oligopotentes: podem gerar poucos tipos celulares;

e. Unipotentes: produzem somente um único tipo celular maduro (Smith, 2006).

As células-tronco também podem ser classificadas conforme sua origem, sendo que são utilizadas em pesquisa as células-tronco embrionárias e as células-tronco adultas.

Além dos tipos celulares supracitados, recentemente, foram descritas as células pluripotentes induzidas (iPS). As iPS são obtidas através de transdução retroviral em células somáticas dos seguintes fatores de transcrição: Oct3/4, Sox2, c-Myc e Klf4, essas células expressam de proteínas de células pluripotentes como Fbx5 e Nanog, formam corpos embrióides e são capazes de formarem teratomas em camundongos imunossuprimidos (Takahashi e Yamanaka, 2006; Okita *et al.*, 2007; Takahashi *et al.*, 2007). Sendo assim, por meio de reprogramação epigenética foi possível obter células com características semelhantes às células-tronco embrionárias.

Nos anos seguintes a essa descoberta, muitos outros estudos foram feitos com as iPS, utilizando outra combinação de fatores, como: Oct4, Sox2, Nanog e Lin28 (Yu *et al.*, 2007). Visto que a transdução retroviral apresenta alguns riscos, como a inserção dos genes em locais importantes que podem causar mutações ou a reativação dos genes transduzidos, especialmente os oncogenes como c-Myc, outros métodos estão sendo desenvolvidos para induzir a pluripotência, como a utilização de adenovírus ou a indução por proteínas. Entretanto, quanto mais seguro o método de indução da pluripotência menor a taxa de sucesso (Sommer e Mostoslavsky, 2010).

As iPS são consideradas promissoras para o estudo de doenças que afetam o sistema nervoso (Abeliovich e Doege, 2009; Chamberlain, 2008). Recentemente, foram obtidas células iPS de pacientes com AS e PWS. A transdução retroviral dos seguintes fatores: OCT4, SOX2, KLF4, c-MYC e LIN28 foi feita em fibroblastos de pacientes. As iPS foram diferenciadas em neurônios e a expressão do *UBE3A* foi muito mais baixa nos neurônios obtidos

a partir de células de pacientes com AS, mostrando assim que essas células apresentavam o *UBE3A* imprintado (Chamberlain *et al.*, 2010).

Entre as células-tronco até o presente momento descritas, as células-tronco adultas são as mais utilizadas em pesquisa. Elas são encontradas em vários tecidos e possuem uma capacidade de diferenciação mais restrita. Entretanto, muitos trabalhos têm apontado para uma inesperada capacidade de diferenciação, como células-tronco neuronais originando precursores hematopoiéticos ou células-tronco hematopoiéticas originando células do fígado (Bjornson *et al.*, 1999; Petersen *et al.*, 1999).

As células-tronco mesenquimais, que fazem parte do grupo de células-tronco adultas, são consideradas boas para protocolos de medicina regenerativa, pois essas células apresentam facilidade de isolamento e cultivo, alto potencial de renovação, alto espectro de diferenciação e facilidade técnica e ética de obtenção (Kassem, 2004). No ser humano, a medula óssea é a sua principal fonte. Entretanto, as células-tronco mesenquimais têm sido isoladas de diversos órgãos e tecidos, tais como o tecido adiposo (Zuk *et al.*, 2001), o endotélio e subendotélio da veia umbilical (Covas *et al.*, 2003), o sangue de cordão umbilical e placentário (Lee *et al.*, 2004; Yu *et al.*, 2004), a vilosidade coriônica da placenta (Igura *et al.*, 2004), a polpa dentária (Gronthos *et al.*, 2000 e 2002), o sangue menstrual (Meng *et al.*, 2007; Patel *et al.*, 2008), músculo orbicular do lábio (Bueno *et al.*, 2008), dentre outros. Diante da dificuldade da punção da medula, que é feita por cirurgia e requer o uso de anestesia geral, essas últimas fontes têm sido utilizadas como uma alternativa acessível no isolamento dessas células.

Embora as células-tronco mesenquimais tenham despertado grande interesse devido ao seu possível potencial de envolvimento no processo de reparo tissular, suas funções não estão restritas à reposição celular. As citocinas e fatores de crescimento liberados por elas apresentam efeitos tróficos, tais como modulação do sistema imune, inibição da fibrose e apoptose, aumento da angiogênese, estímulo para divisão celular e diferenciação (Caplan *et al.*, 2006). Recentemente foi demonstrado que células-tronco mesenquimais produzem fatores neurotróficos que são importantes para sobrevivência e funcionalidade dos neurônios (Jiang *et al.*, 2009). Esses fatores têm se mostrado eficientes para a melhora do quadro clínico de pacientes com doenças neurodegenerativas, como Huntington e Parkinson (Sadan *et al.*, 2009).

Além disso, essas células quando induzidas à neurogênese através de meio de cultura de diferenciação, modificam a morfologia e alteram a expressão de neurotrofinas (Jiang *et al.*, 2009; Sadan *et al.*, 2009). Jiang e colaboradores (2009) enfatizaram a importância de se usar células em baixa passagem para melhorar a diferenciação.

As células-tronco mesenquimais, além da importância terapêutica, são ferramentas valiosas para o estudo de doenças genéticas, fornecem a possibilidade de obter células-tronco de pacientes com doenças, como a síndrome de Angelman e de Prader-Willi, que são doenças raras e a maioria dos pacientes são casos *de novo*. E essas células podem ser importantes para melhor compreensão de mecanismos envolvidos na patologia.

2.4- Células-tronco da polpa dentária

Durante o desenvolvimento do dente, ocorre um espessamento do epitélio oral e esse espessamento continua e o epitélio invagina no mesênquima derivado de células da crista neural. Esse mesênquima condensa até formar um broto e o epitélio continua invaginando até formar uma capa envolta do mesênquima condensado. Depois, começa a fase de sino, quando o epitélio está todo em volta do mesênquima condensado e formará o esmalte e o mesênquima irá se diferenciar em dentina e na região mais interna terá a polpa (fig. 4) (Tucker e Sharpe, 2004)

Figura 4: Representação dos estágios de desenvolvimento do dente (modificado de Tucker e Sharpe, 2004). Inicialmente, ocorre o estágio de espessamento do epitélio oral. No estágio de broto, o epitélio oral invagina no mesênquima iniciando o condensamento do mesênquima. No próximo estágio, o mesênquima está condensado e o epitélio continua invaginando encapando o mesênquima. No estágio de sino, inicia a diferenciação das células do epitélio em esmalte e a interação entre epitélio-mesênquima sinaliza para diferenciação das células do mesênquima

condensadas a se diferenciar em dentina e na região mais interna se conserva a polpa. Por último, ocorre a erupção do dente.

A presença de células-tronco na polpa do dente foi descrita por Gronthos e colaboradores em 2000 e 2002; esses autores demonstraram que células-tronco da polpa do terceiro molar (DPSC) são capazes de se auto-renovar após transplante *in vivo*, se proliferam *in vivo* e *in vitro* e, após indução com meio para adipogênese ou neurogênese, são obtidas células Oil Red O-positivas ou células que expressam nestina (filamento intermediário expresso em células precursoras neuroectodermas) e GFAP (*glial fibrillary acidic protein* - filamento intermediário expresso, principalmente, em células da glia), respectivamente.

As DPSCs em comparação com as células-tronco do estroma da medula óssea apresentam expressão semelhante aos genes relacionados ao desenvolvimento e função de osteoblastos e odontoblastos. Entretanto, as DPSCs apresentam maior capacidade proliferativa do que as células da medula; isso pode ser devido à maior expressão de IGF-2 (aumenta no nível de ciclina D1 e diminui o tempo do ciclo celular) e cdk6 (promove progressão das células no estágio G1 para iniciar a síntese de DNA) (Gronthos *et al.*, 2000; Shi *et al.*, 2001).

Os dentes decíduos humanos, também, apresentam células-tronco (SHEDs - *stem cells from human exfoliated deciduous teeth*) que podem ser isoladas, expandidas *ex vivo* e são capazes de se diferenciar em células neurais e adipócitos. Além disso, as SHEDs apresentam uma capacidade

proliferativa maior que as DPSCs (Miura *et al.*, 2003; Govindasamy *et al.*, 2010).

Células-tronco da polpa do dente expressam fatores de transcrição específicos de células pluripotentes, como OCT4 e NANOG, e essa expressão é maior nos dentes decíduos em relação aos permanentes; logo, as SHEDs estão em um estágio mais primitivo que as DPSCs (Kerkis *et al.*, 2006). Em contraposição, as DPSCs apresentam uma expressão maior de marcadores neuroectodermais, como PAX6, nestina e GBX2; e essas células, quando submetidas ao protocolo de diferenciação neuronal, apresentam maior taxa de diferenciação do que as SHEDs (Govindasamy *et al.*, 2010).

Com o protocolo de diferenciação neuronal as SHEDs expressam várias proteínas neurais: nestina (NES), β III-tubulina (TUJ1 – classe de microtúbulos específicos de neurônios), ácido glutâmico decarboxilase 1 (GAD), proteína fibrilar glial ácida (GFAP), neurofilamento médio (NF-M), 2',3'-nucleotídeo cíclico 3'-fosfodiesterase (CNPase) e NeuN (proteína nuclear específica de neurônios). A expressão de TUJ1, GAD e NeuN aumenta com 4 semanas de indução da diferenciação e dos outros marcadores continua igual. E a morfologia das células altera, surgindo processos multicitoplasmáticos que expressam MAP2 e MAPT (proteínas associadas ao microtúbulos). Foram realizados estudos *in vivo* e verificado que as células sobreviveram por mais de 10 dias no hipocampo de camundongo e continuaram a expressar marcadores neurais (Miura *et al.*, 2003).

Na polpa do dente foram detectados fatores neurotróficos: GDNF (fator neurotrófico derivado de células gliais), BDNF (fator neurotrófico derivado do

cérebro), NGF (fator de crescimento neuronal), VEGF (fator de crescimento do endotélio vascular), FGF (fator de crescimento de fibroblastos) e CNTF (fator neurotrófico ciliar). Se as DPSCs são injetadas no sistema nervoso central, estes fatores neurotróficos ocasionam uma modulação do microambiente e promovem a sobrevivência de neurônios (motores, sensitivos e dopaminérgicos), estimulam a proliferação celular, estimulam a maturação de neurônios e células gliais, e recrutam células já maduras (Nosrat *et al.*, 2001; 2004; Huang *et al.*, 2008).

Além disso, Nosrat *et al.* (2004) verificaram que células da polpa do dente que apresentavam morfologia de fibroblastos em cultura se diferenciaram em células com características de neurônios. E, Arthur e colaboradores (2009) verificaram que através de xeno-transplantes, as DPSCs são capazes de guiar o axônio do gânglio trigeminal, indicando que essas células causam plasticidade neuronal.

Embora muitos trabalhos tenham sido publicados mostrando a diferenciação neuronal bem sucedida, é importante analisar a funcionalidade dessas células, pois muitos desses trabalhos já foram criticados por utilizarem reagentes tóxicos que podem causar sofrimento celular, gerando células com morfologia e expressão protéica semelhante aos dos neurônios (Lu *et al.*, 2004).

O primeiro trabalho a mostrar funcionalidade dos neurônios diferenciados a partir de DPSCs e SHEDs *in vitro* foi publicado em 2008; nesse trabalho foi realizada a observação da morfologia, da expressão tanto de RNA quanto de proteínas de marcadores relacionados com neurogênese (nestina,

β III-tubulina, neurofilamento médio, neurofilamento de cadeia pesada) e a eletrofisiologia, com a qual foram observados canais de sódio dependente de voltagem (Arthur *et al.*, 2008).

Outro protocolo de diferenciação foi descrito por Király e colaboradores (2009), com o qual as células apresentaram morfologia neuronal. Após indução da diferenciação, as células passaram a expressar menos nestina e vimentina (proteínas de filamento intermediário expressa durante o desenvolvimento, mas com expressão menor em células maduras); e, opostamente, expressaram mais neurogenina-2, N-tubulina, enolase específica de neurônio e GFAP. Em relação à eletrofisiologia, foram encontradas células com canais de sódio e de potássio dependentes de voltagem.

Em 2011, Király e colaboradores mostraram que essas células induzidas à diferenciação *in vitro*, pelo mesmo protocolo publicado pelo grupo em 2009, quando injetadas no cérebro de ratos sem ou com lesão, se incorporam ao tecido, sendo que a maioria das células foi encontrada na zona progenitora, como a zona subventricular, e uma menor proporção de células foram encontradas no córtex. As células passaram a expressar mais N-tubulina, NF-M, NeuN e GFAP. A expressão dessas substâncias foi maior no experimento no qual as células foram injetadas no rato com lesão cortical e, também, apresentaram canais sódio e potássio dependentes de voltagem com significativo aumento das correntes nas células que estavam na região cortical, indicando maior estágio de maturação dessas células.

Ryu e colaboradores (2009) obtiveram células que expressavam MAP2 (proteína associada à microtúbulos 2) e NeuN (proteína nuclear específica de

neurônio) após indução com meio de diferenciação neuronal, mas essas células não apresentavam neuritos, indicando que existem neurônios imaturos que expressam essas proteínas, que são ditas de neurônios maduros. Adicionalmente, o estudo mostrou que a biossíntese de gangliosídeos é importante para a diferenciação neuronal.

Estudos feitos com a polpa de dente de roedores indicaram que o uso da tripsina é a melhor forma de dissociar as células da polpa e que a população de células de polpa é heterogênea (Patel *et al.*, 2009). Além disso, essas células em meio com bFGF (fator de crescimento de fibroblasto básico) formaram neuro-esferas, que em substrato adesivo, deram origem a células com neuritos que expressavam neuromarcadores (β III-tubulina e MAP2).

As células da polpa de dente humano, também, são heterogêneas; a maioria é CD34 e STRO-1 negativas, mas há uma pequena população de células CD34 (glicoproteína transmembrânica expressa em células hematopoiéticas e células tronco endoteliais) e STRO-1 (antígeno de superfície expresso em precursores de células do estroma da medula óssea) positivas (Gronthos *et al.*, 2002; D'Aquino *et al.*, 2008).

Stevens e colaboradores (2008) encontraram uma maioria das células expressando STRO-1 e, também, averiguaram que as células negativas para CD34 se diferenciam com maior eficácia em adipócito e em células semelhantes aos melanócitos derivados da crista neural.

Através dos equipamentos que realizam seleção das células, Yang e colaboradores (2007) mostraram que células STRO-1 positivas apresentam

maior capacidade de diferenciação em células neuronais, adipócitos, miócitos e condrócitos *in vitro* do que células não selecionadas.

Outras fontes de células-tronco foram descritas a partir do dente: as células-tronco da papila apical de dentes permanentes que expressam CD24, diferentemente das DPSCs (Sonoyama *et al*, 2006, 2008). Além disso, foram descritas as células-tronco do ligamento peridontal e células precursoras do folículo dental (Huang *et al.*, 2009).

3 – OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho é induzir a diferenciação neuronal de células-tronco da polpa de dente de pacientes com a síndrome de Angelman.

Objetivos específicos:

- Isolar e caracterizar as células-tronco da polpa do dente de pacientes com AS e controles normais.
- Testar a eficiência de protocolos de diferenciação neuronal de células-tronco mesenquimais obtidas da polpa dentária de controles normais.
- Comparar células-tronco da polpa do dente induzidas à diferenciação com as não induzidas de controles normais.
- Efetuar a diferenciação neuronal das células-tronco da polpa do dente de pacientes com síndrome de Angelman.
- Comparar as células induzidas à diferenciação de controles e de pacientes.
- Analisar a expressão do gene *UBE3A*.

4- MATERIAIS E MÉTODOS

4.1-Pacientes e considerações éticas

A amostra é formada por células-tronco provenientes da polpa de dentes decíduos de pacientes com AS e PWS e de crianças normais. Temos linhagens de células-tronco da polpa de dentes decíduos de 5 pacientes com AS (AS1, AS2, AS3 e AS4 são linhagens de pacientes com deleção do segmento 15q11-q13; e a linhagem AS5 é de um paciente com mutação no gene *UBE3A*; além disso, foi utilizada uma linhagens de paciente com síndrome de Prader-Willi decorrente de deleção do segmento 15q11-q13. A presente pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (número do processo: 055-06).

4.2- Isolamento das células-tronco da polpa do dente

Para obtenção das culturas primárias, imediatamente após a queda ou extração do dente, eles foram mantidos no meio DMEM/F:12 (*Dulbeco's Modified Eagle Medium/ Ham's F12*, Invitrogen) e 4% de antibiótico (400 units/ml penicilina e 400µg/ml estreptomicina, Invitrogen).

Os dentes foram lavados três vezes em solução de PBS (0,01M *phosphate-buffered saline*, pH=7,4) com 4% de antibiótico; após isso, as polpas

foram retiradas dos dentes com o uso de limas, e as polpas foram lavadas três vezes com solução de PBS para remover possíveis contaminações e células sanguíneas. A seguir as polpas foram digeridas em solução de tripsina 0,25% (Invitrogen) por 20 minutos a 37°C, transferidas para placa de Petri de 35mm com o meio de cultura de manutenção que será descrito a seguir. Após a polpa aderir à placa e quando células foram observadas aderidas à placa as linhagens primárias foram consideradas como estabelecidas; quando as células alcançaram confluência de 90%, a cultura foi tratada com solução de tripsina, e as células foram plaqueadas em garrafas de 25cm² com 5ml de meio de cultura e mantidas na estufa a 37°C, com 5% de CO₂ e alta umidade. Quando as células atingiram confluência de 80% foram congeladas.

4.3- Estabelecimento das linhagens celulares

O estabelecimento das linhagens celulares foi feito em garrafas plásticas incubadas na estufa a 37°C; o meio de manutenção utilizado foi meio DMEM/F12 (Invitrogen) suplementado com 15% de soro fetal bovino (Hyclone), 1% de antibiótico (100 units/ml penicilina e 100µg/ml estreptomicina, Invitrogen) e 1% de aminoácidos não essenciais (Invitrogen).

As células foram mantidas em confluência de até 80% e a troca do meio foi realizada a cada 3 dias. Quando as células apresentaram 80% de confluência o meio foi retirado, a garrafa foi lavada com PBS e depois foi colocada tripsina por 5 minutos, novo meio de cultura foi adicionado e a seguir transferido para um tubo *falcon* que foi centrifugado por 5 minutos a 1400 rpm;

após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado, o *pellet* foi ressuspendido com o meio de cultura de manutenção e a solução do *falcon* foi dividida em 2 garrafas.

Quando as linhagens celulares foram expandiram até a passagem 5, as células foram caracterizadas pela citometria de fluxo e induzidas a diversas diferenciações.

4.4- Congelamento das células

Para o congelamento, foi utilizado um meio específico: 10% de meio DMEM/F12, 80% de soro fetal bovino e 10% de DMSO (*dimethylsulfoxide*, Sigma) e 5×10^5 células/ml foram colocadas em criotubos. A temperatura foi diminuída gradativamente até -70°C ; após 24 horas nesta temperatura, os tubos foram transferidos para o nitrogênio líquido.

4.5- Citometria de fluxo

A citometria de fluxo (EasyCyte; Guava Technologies) foi feita em todas as linhagens de células utilizadas no estudo, pois faz parte do processo de caracterização das células. Foram utilizados vários anticorpos, podendo ser conjugados como CD13-PE, CD73-PE, CD29-PE, CD44-FITC, CD45-FITC, CD31-PE, CD34-PerCP, CD117-PE, HLA-ABC-FITC e HLA-DC-PE (Becton Dickinson), e também foi utilizado o anticorpo não conjugado SH3. O anticorpo

secundário utilizado foi o Cy3. Os dados foram analisados com o uso do software Guava ExpressPlus (Guava Technologies).

4.6- Diferenciação Condrogênica

As células foram plaqueadas em placas de petri com 12 poços e quando as células atingiram confluência de pelo menos 80% foi adicionado o meio de diferenciação: DMEM-Low Glycose (Invitrogen) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Hyclone), 50µg/ml de ácido ascórbico 2-fosfato (Sigma), 10 ng/ml TGF-β e 6,25µg/ml insulina (Sigma). As células foram cultivadas na estufa (37°C, 5% de CO₂ e alta umidade). O meio foi trocado a cada 3 dias, e no 21º dia as células foram fixadas com 4% de paraformaldeído e, depois, coradas com azul de toluidina (marcador específico de tecido cartilaginoso).

4.7- Diferenciação Adipogênica

Para realizar a diferenciação adipogênica, as células foram plaqueadas em placas de petri com 12 poços. Quando as células atingiram confluência de 80%, foi adicionado o meio de diferenciação adipogênica: DMEM-High Glycose (Invitrogen) suplementado com 10% de soro fetal bovino, 1µM dexametasona, 100µM indometacina (Sigma), 500µM de 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX, Sigma) e 10µg/ml insulina (Sigma).

O meio foi trocado a cada 3 dias e foi mantido por 14 dias. A diferenciação foi verificada através da coloração com Oil Red; para isso as

células foram fixadas com 4% de paraformaldeído por 30 minutos, depois lavadas e coradas com solução de 0,16% de Oil Red O (Sigma) por 20 minutos que marca os depósitos de gordura.

4.8- Diferenciação Osteogênica

Para realização da diferenciação osteogênica, as células foram plaqueadas em placa de petri com 12 poços e quando as células atingiram 80% de confluência, foi adicionado o meio de diferenciação: DMEM-Low Glycose com 10^{-7} M dexametasona e 50 μ M de ácido ascórbico 2-fosfato e após 10 dias com esse meio foi adicionado a ele 2 μ M de β -glicerolfosfato (Sigma) e foi mantido com esse meio até a diferenciação completar 21 dias. A troca do meio foi feita a cada 3 dias.

Após o 21º dia, a diferenciação foi confirmada pela coloração de Von Kossa que identifica a deposição de nódulos de cálcio; neste processo as células foram tratadas com 1% de nitrato de prata (Sigma) por 45 minutos sob a luz UV, depois foram tratadas com 3% de tiosulfato de sódio (Sigma) por 15 minutos, e por último foram contra-coradas com van Gieson.

4.9.1- Diferenciação Neurogênica (protocolo de Arthur e colaboradores, 2008)

O primeiro protocolo de diferenciação neuronal utilizado foi descrito por Agnes Arthur e colaboradores (2008), no qual as células foram cultivadas na

concentração de 10^4 células/cm². Antes da adição das células, as lâminas, as placas ou garrafas foram tratadas com poli-ornitina (10µg/ml) *overnight* na temperatura ambiente, depois com laminina (5µg/ml) *overnight* na estufa (37°C e alta umidade); 3 dias após o plaqueamento das células, foi introduzido o meio de diferenciação: durante 7 dias em meio Neurobasal A (Invitrogen) com 100U/ml penicilina, 100µg/ml estreptomicina, 1x suplemento B27, 20ng/ml EGF (PeproTech) e 40ng/ml FGF. Mais 7 dias em meio DMEM/F:12 suplementado com insulina-transferina-sodio-selenite (ITS, Sigma), 100U/ml estreptomicina, 100µg/ml penicilina e 40ng/ml FGF por 7 dias. Por último, foi deixado por 7 dias em meio DMEM/F12 suplementado com ITS, 100U/ml estreptomicina, 10µg/ml penicilina, 40ng/ml FGF e 0,5µM ácido retinóico.

4.9.2- Diferenciação Neurogênica (protocolo de Király e colaboradores, 2009)

O segundo protocolo foi adaptado do utilizado por Király *et al.* (2009). As células foram plaqueadas até passagem 4 na concentração de 3.10^4 células/cm² em placas ou garrafas tratadas com poli-lisina na concentração de 10µg/ml por 30 minutos. As células foram mantidas no meio de cultura de manutenção por 24 horas, depois foi colocado o meio DMEM/F:12 com 10µM 5-azactidina, 5% soro fetal bovino e 10ng/ml bFGF por 48 horas. Depois foi colocado um meio com DMEM/F:12 suplementado com 250µM IBMX, 50µM forskolina, 200nM TPA, 1mM dbcAMP, 10ng/ml bFGF, 10ng/ml NGF, 30 ng/ml NT-3 e 1% ITS por 3 dias. E por último foi mantido de 3 a 7 dias no meio

Neurobasal A suplementado com 1 mM dbcAMP, 1% N2, 1% B27 e 30 ng/ml NT-3.

4.10- Imunocitoquímica

A imunocitoquímica foi realizada em células que passaram pelo protocolo de diferenciação neuronal. Primeiramente, as células foram fixadas com 4% de paraformaldeído por 15 minutos em temperatura ambiente, depois foram lavadas com PBS 1x e 100mM glicina por 10 minutos. A cultura foi bloqueada por 1 hora com IBB (tampão bloqueador de imunofluorescência que contém PBS com 5% soro albumina bovino, 10% soro fetal bovino, 0,1% Triton X-100). Depois foi incubada com IBB e anticorpo primário anti-TUJ1 (1:500), anti-MAP2 (1:500), anti-NF200 (1:400), anti-nestina (1:200), anti-NeuN (1:2000) *overnight*. Os anticorpos secundários usados foram Cy3 anti-IgG de camundongo ou de coelho por 1 hora e os núcleos foram corados com DAPI por 1 minuto.

4.11- Extração de RNA e preparação de cDNA

A extração de RNA foi feita em células que sofreram diferenciação adipogênica e neurogênica e em células não diferenciadas. O RNA foi extraído com o uso de TRIZOL TM (Invitrogen) e tratado com DNase (Invitrogen). Para verificar a integridade do RNA foi realizada uma eletroforese em gel de agarose 1,2% a 100V por 60 minutos e a concentração de RNA foi medida no Nanodrop. O cDNA foi obtido com SuperScript III (Invitrogen).

4.12- RT-PCR

RT-PCR foi feita para verificar a diferenciação neuronal através de expressão gênica; os *primers* utilizados na reação de amplificação do cDNA foram para os transcritos que originam: nestina (*NES*: F- CAGGAGAAACAGGGCCTACA e R- AAGCTGAGGGAAGTCTTGGA), proteína associada ao microtúbulo 2 (*MAP2*: F- GGAGGTGTCTGCAAGGATAGTT e R- CTGTTCTGAGGCAGGTGATG), proteína nuclear específica de neurônios (*NeuN*: F- GACCCTGTACACACCAGCAC e R- GGAAGGGGATGTTGGAGAC) e proteína fibrilar glial ácida (*GFAP*: F- AAGAGATCCGCACGCAGTAT e R- AGGTCAAGGACTGCAACTGG). O gene *housekeeping* é o *GAPDH* (F- CCATCTTCCAGGAGCGAGAT e R- TTCTCCATGGTGGTGAAGAC). Todos os *primers* foram desenhados em exons diferentes para distinguir de possível contaminação por DNA genômico.

Além disso, a expressão do *SNURF-SNRPN* (F- TTCCACATGGATCTCATCACA e R- TTCTTCCTCTGTGCTCACCA) na região que é encontrada somente no transcrito grande que engloba a região anti-senso do *UBE3A* foi verificada pela RT-PCR.

RT-PCR também foi realizada para confirmar a diferenciação adipogênica; foi utilizado um par de *primers* para *FABP4* (proteína de ligação a ácidos graxos tipo 4, F- TGCAGCTTCCTTCTCACCTT e R- CATCCCCATTCACTGATG) .

As reações de PCR começam com uma desnaturação inicial a 94 °C por 2 minutos, a seguir 32 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 segundos,

hibridação dos oligonucleotídeos a 60°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto, e uma extensão final a 72 °C por 7 minutos.

4.13- Avaliação da expressão de receptores para ATP, glutamato e NMDA

Esse experimento foi realizado com Cleber A. Trujillo, aluno de doutorado do professor Henning Ulrich (IQ-USP).

Primeiramente, as placas de Petri de 35mm foram lavadas 3x com PBS1x e depois as células foram carregadas em meio DMEM com 5µM fluo-3AM e 0,1% de ácido plurônico por uma hora. Depois foi feita a lavagem com PBS1x por 3 vezes. O fluoróforo foi excitado com ondas de 488nm e detectado por onda de 515-530nm. Foi feita uma sequência de fotos a cada segundo; primeiramente, as células foram fotografadas sem a adição do neurotransmissor, depois foi adicionado o neurotransmissor (NMDA, glutamato ou ATP), depois foi adicionado o ionóforo e por último foi adicionado o EGTA (ácido tetra acético do glicol de etileno).

4.14 – Avaliação da expressão de receptores metabotrópicos ou ionotrópicos para glutamato e para acetilcolina.

Essa avaliação foi realizada em sistema com perfusão em colaboração do aluno Daniel R. Batista, doutorando do Prof. Antônio Carlos Cassola (ICB-USP).

A eventual expressão destes receptores foi investigada estimulando-se as concentrações intracelulares do Ca^{2+} e modificações dela induzidas por neurotransmissores, adicionados à solução extracelular. As concentrações do cátion foram medidas em séries temporais de imagens pelo indicador fluorescente Fluo-4. As imagens foram obtidas com um microscópio de varredura a laser (LSM-510, Zeiss) operando com o “pinhole” em aberturas que correspondiam a cortes ópticos de espessura superior à altura das células. Nestas condições, as imagens confocais correspondiam a imagens de fluorescência “wide-field”. Eventualmente investigou-se a expressão, na membrana celular plasmática, de canais para Ca^{2+} dependentes de voltagem. A ativação destes canais dava-se por pulsos de solução de KCl na solução extracelular. Estas soluções, ao provocar a despolarização da membrana, ativam os canais para o íon. Para o teste foram usados os seguintes neurotransmissores: glutamato 1mM, KCl 1mM e acetilcolina 60mM.

4.15 – Avaliação da expressão de canais para Na^+ dependentes de voltagem (Na_v) pela técnica de “patch clamp”, configuração “whole-cell”

Os experimentos de análise da expressão de canais de sódios dependentes de voltagem foram realizados em colaboração com o Prof^o Antônio Carlos Cassola do departamento de fisiologia do ICB-USP.

Canais dependentes de voltagem, isto é, aqueles cuja probabilidade de abertura aumenta com a despolarização da membrana, estão associados ao fenômeno do potencial de ação, apanágio das células excitáveis. A expressão

de canais para Na^+ dependentes de voltagem foi investigada em experimentos de fixação de voltagem, em pulsos despolarizantes, aplicando-se às células isoladas a técnica de “patch clamp” e medindo-se correntes macroscópicas, na configuração “whole-cell” da técnica. Utilizaram-se microeletrodos com resistências da ordem de 2 MW com as soluções utilizadas nos experimentos. O amplificador era da Axon Instruments, Axopatch 200B. Os protocolos de controle de voltagem, a aquisição em forma digital dos dados e a análise eram realizados por programas da suite pClamp, também da Axon Instruments. A solução extracelular continha (mM): 132 NaCl, 1,2 MgCl_2 , 1,8 CaCl_2 , 4 KCl, 10 HEPES e 5 glicose, o pH 7,4 mantido com NaOH. A solução intracelular era composta de (mM): 20 KCl, 140 KF, 4 MgCl_2 , 5 EGTA e 10 de HEPES. Após a entrada em “whole-cell” procedia-se o cancelamento da capacitância da membrana celular. O valor da capacitância era anotado e usado como índice da superfície das células. As correntes dependentes de voltagem eram ativadas por pulsos despolarizantes, de magnitude crescente. As correntes por condutância de “leak”, isto é, por canais não dependentes de voltagem eram estimadas pelo protocolo P/N e subtraídas das correntes totais. Três padrões de correntes foram apresentados pelas células: a) nenhuma corrente ativada por despolarização, e b) correntes para dentro de ativação rápida e correntes tardias para fora, e c) correntes para dentro de ativação rápida ou correntes tardias para fora. Nesses últimos padrões, as correntes para dentro eram correntes de sódio.

Em outros experimentos substituiu-se o KF por CsF na solução da pipeta. Como o cério bloqueia as correntes de potássio, as correntes ativadas

por despolarização remanescentes são exclusivamente correntes de sódio. Nestes casos construíam-se relações I-V a partir das séries temporais de pulsos. A relação I-V característica dos canais para sódio era adequadamente descrita por uma combinação das equações de Ohm e de Boltzmann.

$$I_{Na^+} = (V_m - V_r) \times \left(\frac{G_{m\acute{a}x}}{1 + e^{\frac{(V_{0.5} - V_m)}{k}}} \right)$$

Nesta equação V_m é o potencial de membrana, variável independente, V_r é o potencial de reversão, característico para cada íon, $G_{m\acute{a}x}$ é a máxima condutância de membrana, dependente apenas do número de canais expressos na membrana e $V_{0.5}$ é o valor do potencial de membrana no qual a condutância é de 50% de $G_{m\acute{a}x}$.

As correntes foram divididas pela capacitância de membrana, como esta depende linearmente da área de membrana, podiam-se comparar as condutâncias máximas a sódio em diferentes lotes de células, em diferentes condições experimentais. Desta forma, por exemplo, comparam-se células antes e após a indução da diferenciação.

O teste estatístico utilizado foi teste T. O nível crítico de significância estatística dos testes foi pré-estabelecido em $\alpha = 0,05$.

4.16- PCR em tempo real

Células submetidas à diferenciação neurogênica e células controle tiveram a expressão do *UBE3A* comparada quantitativamente através do PCR quantitativo em tempo real. Os *primers* utilizados para amplificar o transcrito do *UBE3A* são: *forward* – CAGGAAGCTAATGGGGAAAA e *reverse* –

CCACATTCCCTTCATACTCCA. O corante utilizado foi o *Sybr Green*. E o aparelho utilizado foi o *Applied Biosystems 7500 Real Time PCR System* e *Applied Biosystems 7500fast Real Time PCR*. A expressão foi comparada com a expressão do gene *housekeeping GAPDH*, através dos *primers*: *forward* – CCATCTTCCAGGAGCGAGAT e *reverse* – TTCTCCATGGTGGTGAAGAC.

O teste estatístico utilizado foi ANOVA. O nível crítico de significância estatística dos testes foi pré-estabelecido em $\alpha = 0,05$.

4.17- Hibridação *in situ* fluorescente (FISH)

As preparações das lâminas foram feitas a partir de garrafas com 25 cm², sendo as células soltas das garrafas com o uso de tripsina 0,25% (Invitrogen); as células foram centrifugadas por 5min a 1.400 rpm em temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e foi adicionado 5ml de meio hipotônico (0,075M de cloreto de potássio) a 37°C por 30min. O material foi centrifugado por 5min a 1500 rpm, o sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuspensionado em fixador de Carnoy (3 metanol : 1 ácido acético glacial). Após uma nova centrifugação a 1500 rpm por 5 min, o sedimento foi ressuspensionado novamente em fixador de Carnoy. Isso foi repetido 2 vezes. Sendo que antes da última centrifugação foi adicionado Cytoclear (ProCell Reagents - 5 µl/ml de fixador) por 5 min a temperatura ambiente, O Cytoclear é uma mistura de detergentes que dissolve e remove o citoplasma persistente durante o estágio de fixação. Após a última centrifugação, foi adicionado 500 µl de fixador para ressuspender o pellet e o material foi pingado na lâmina.

As sondas utilizadas são segmentos cromossômicos clonados em cromossomos artificiais de bactérias (BAC), mapeados em regiões que fazem parte do gene *SNURF-SNRPN* ou de regiões próximas (tabela 1). Os BACs foram adquiridos do *BACPAC Resource Center (CHORI)*.

As linhagens bacterianas foram plaqueadas em meio de cultura LB-água com o antibiótico clorafenicol. Após crescimento por um dia em estufa a 37°C, as colônias foram amplificadas em meio LB, em agitador com temperatura constante de 37°C *overnight*. A extração de DNA foi realizada segundo o protocolo fornecido pelo *CHORI*.

TABELA 1: Tabela com informações dos BACs utilizado para a hibridação *in situ* fluorescente (tabela modificada de Leung e colaboradores, 2009).

Clone #	Genes	Localização	Tamanho (kb)	Marcação
RP11-373J1	<i>NDN, MAGEL2</i>	15q11.2	199	biotina
RP11-125E1	<i>SNRPN</i>	15q11.2	175	digoxigenina
RP11-186C7	<i>SNRPN, IPW e HBII-85</i>	15q11.2	170	digoxigenina
RP11-171C8	<i>HBII-52</i>	15q11.2	161	digoxigenina
RP11-1081A4	<i>UBE3A</i>	15q11.2 - 15q12	171	digoxigenina
RP11-339C21	<i>ATP10A</i>	15q12	168	biotina

As sondas foram marcadas por *nick translation* com biotina ou digoxigenina (tabela 1) pela incorporação dos nucleotídeos Bio-16-dUTP ou Dig-11-dUTP, utilizando-se os *Kits Biotin-Nick Translation Mix* ou *Dig-Nick Translation Mix* (Roche), respectivamente, conforme instruções do fabricante. As sondas foram submetidas à supressão de seqüências repetitivas pela adição de DNA humano *COT-1* (Invitrogen). As sondas foram ressuspendidas em cerca de 20 µl de meio de hibridação, que consiste de formamida 50% e dextran sulfato a 10%, em 2xSSC e desnaturadas a 100°C por 10 minutos.

Para a desnaturação dos cromossomos, utilizou-se formamida 70% em 2xSSC por 2 minutos a 70°C – 75°C. As sondas foram aplicadas sobre a lâmina, que foi coberta com lamínula e mantida em câmara úmida em estufa a 37°C *overnight*. Seguiram-se dois banhos de 50% formamida em 2xSSC, de um minuto, um banho de 2xSSC a 37°C, de cerca de 3 minutos, e um banho de 5 minutos de PBT (PBS acrescido de 0,1% Tween 20 e 0,15% BSA-Sigma) à temperatura ambiente. Para a imunocoloração, no caso de sonda marcada com biotina, utilizou-se avidina conjugada a FITC (1:50 em PBT). Para as sondas marcadas com digoxigenina, utilizou-se a anti-digoxigenina conjugada a rodamina (1:100 em PBT). A incubação foi realizada em câmara úmida, no escuro, em estufa a 37°C por 45 minutos. Após dois banhos de PBT de 5 minutos cada à temperatura ambiente, as lâminas foram coradas com o corante DAPI (Sigma; 0,8 ng/μl). A análise foi realizada em microscópio de fluorescência Axiophot 2 motorizado (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha). As imagens foram capturadas com o auxílio de uma câmera de alta resolução e do programa ISIS Metasystem.

5-RESULTADOS

5.1- Caracterização das células-tronco da polpa do dente

No total temos 5 linhagens de células-tronco da polpa de dente (SHEDs) de pacientes com AS, sendo 4 deles com deleção no segmento 15q11-q13 e um dos pacientes com mutação no *UBE3A* 3085dup32 (localizado no exon 16). E 6 linhagens controles (CN) e 1 de paciente com a síndrome de Prader-Willi.

Todas as linhagens estabelecidas foram caracterizadas antes de serem utilizadas para os demais experimentos. Um passo importante para a caracterização é a citometria de fluxo. Os resultados são comparados com os do controle, que mostram o padrão da curva sem nenhuma marcação (curvas cinza na figura 4). Quando as células expressam a proteína alvo do anticorpo é observado um deslocamento da curva para a direita, caso contrário o padrão da curva será semelhante ao do controle.

O painel de citometria de uma linhagem controle mostra que a maioria das células, mais de 90% delas, expressa marcadores de células de origem mesenquimal: CD13, CD73, CD29, SH3, CD44 e HLA ABC e são negativas para marcadores de células hematopoiéticas e endoteliais: CD45, CD34, CD117, CD34 e CD31 e HLA DR (fig. 5). Esse padrão foi seguido pela maioria das linhagens utilizadas neste trabalho (tabela 2).

FIGURA 5: Pannel da citometria de fluxo de uma linhagem de células-tronco de polpa de dente. Em cada medição são verificadas as intensidades de fluorescência de 5.000 eventos (o número de eventos é aproximadamente o número de células). Em preto são as curvas das células para cada marcador indicado acima dos gráficos, em cinza são as curvas das células não marcadas. Ou seja, as células não marcadas com anticorpo emitem uma baixa fluorescência (curva cinza), e quando é adicionado o anticorpo e as células expressam a glicoproteína alvo do anticorpo é observado um aumento da fluorescência; assim ocorre um deslocamento da curva (preta) para direita indicando esse aumento. Quando as células não expressam a glicoproteína alvo do anticorpo, a curva preta sobrepõe a cinza indicando que não houve aumento da fluorescência.

TABELA 2: Tabela detalhada da porcentagem de células de todas as linhagens estudadas que expressam os marcadores analisados através da citometria de fluxo. NC1, NC2, NC3, NC4, NC5 e NC6 são linhagens controles. AS1, AS2, AS3, AS4 e AS5 são linhagens de pacientes com a síndrome de Angelman. “–” indica que a glicoproteína não foi analisada.

	Porcentagem de células positivas para o marcador analisado (%)										
marcador	NC1	NC2	NC3	NC4	NC5	NC6	AS1	AS2	AS3	AS4	AS5
CD 13	98	99,6	95,8	97,8	99,9	95,8	98,5	99,9	99,6	99,9	94,3
CD 73	97	90,5	94	97	99,8	94,6	95,1	99,9	94,9	-	80
CD 29	99,9	99,6	91,8	95,8	99,7	83,0	91	99,9	99,2	100	99,9
CD 90	99,6	94,9	90,8	99,6	100	-	99,6	99,9	-	-	99,9
Sh 3	85,4	96,1	90,1	92,4	97	88,9	92,4	99,7	93,22	99,7	93,9
CD 44	98	99,4	94,5	95,7	99,6	93,9	95,7	99,7	99,8	-	97,5
CD 45	2,6	0,9	1,4	1	1,4	0,5	0,8	2,8	0,6	1,1	0,2
CD 34	2,8	0,3	2,1	8,7	4,9	26,1	6,7	7,16	1,2	0,4	0,2
CD 117	1,8	1,3	2,3	12,2	9,5	1,8	4,5	2,8	3,3	2,4	1
CD 31	3,8	1,1	0,6	2,8	3,3	0,2	1,6	2,5	0,2	0,7	0,8
HLA ABC	96	90,1	92,6	92,2	99,6	98,0	89,8	94	91,2	95,3	90,8
HLA DR	2,8	2	1	2,6	3,6	0,3	0,4	1,3	0,2	0,24	2

Para caracterização das células, além da citometria de fluxo, as SHEDs foram submetidas a protocolos de diferenciação a adipócitos, condrócitos e osteócitos para verificar a multipotência. A diferenciação em osteócito foi confirmada através da coloração de Von Kossa, que marca de vermelho o núcleo, o citoplasma fica rosado e, a marcação determinante da diferenciação, é do depósito de cálcio que fica preto (fig. 6a). A diferenciação condrogênica foi verificada através da coloração de azul de toluidina, que cora os núcleos em azul escuro e o citoplasma, também, é corado em azul em uma tonalidade próxima ao do núcleo (fig. 6b).

As SHEDs submetidas à diferenciação adipogênica foram coradas com Oil Red-O, e foram verificadas algumas células com marcação positiva, ou seja, algumas células apresentaram depósitos de gordura corados de vermelho

(fig. 6c). Entretanto, embora as células induzidas à diferenciação apresentassem a marcação esperada, em algumas linhagens, as SHEDs não induzidas à diferenciação apresentaram depósitos de gordura. Assim, foi feita a RT-PCR para verificar a expressão do gene *FABP4* (proteína ligante de ácidos graxos tipo 4); esse gene codifica uma proteína citoplasmática de adipócitos que se liga aos ácidos graxos de cadeia longa. Através da RT-PCR foi verificado que as SHEDs induzidas à diferenciação expressam *FABP4*, enquanto que as células não induzidas à diferenciação não expressam (fig. 7).

FIGURA 6: Células após o cultivo em meio de diferenciação adipogênica, condrogênica e osteogênica. A) Diferenciação osteogênica confirmada pela coloração de Von Kossa, pontos pretos são os depósitos de cálcio (seta vermelha) (aumento de 20x). B) Diferenciação condrogênica demonstrada pela coloração com azul de toluidina (aumento de 20x). C) Diferenciação adipogênica confirmada pela coloração Oil Red O, que cora os depósitos de ácido graxos (seta vermelha) (aumento de 40x). D) Células não induzidas à diferenciação após protocolo de coloração de Von Kossa, não são encontrados os depósitos de cálcio (aumento de 20x). E) Coloração de azul de toluidina em células não induzidas à diferenciação

condrogência, foi observada somente a coloração nos núcleos, o citoplasma não é corado (aumento de 20x). F) Coloração de Oil Red O em células não induzidas à diferenciação, não foram visualizados os depósitos de lipídio como nas células induzidas à diferenciação (aumento de 40x).

FIGURA 7: RT-PCR com primers para *FABP4*. A expressão de *FABP4* é verificada nas células induzidas à diferenciação e está ausente nas células não induzidas à diferenciação tanto de indivíduos controles (NC) como de pacientes com a síndrome de Angelman (AS).

5.2- Diferenciação neurogênica

5.2.1- Protocolo de Arthur *et al.*, 2008

O protocolo de diferenciação descrito por Arthur e colaboradores tem duração de 3 semanas em meio de indução de diferenciação. Após esse tempo, as células foram analisadas por RT-PCR para verificar a expressão de

alguns transcritos comuns em células neuronais. Através dessa análise foi possível verificar que as SHEDs expressam nestina e *MAP2* constitutivamente e a expressão persiste nas células após a indução da diferenciação. A expressão *GFAP* e *NeuN* é bem baixa em algumas linhagens, pois é possível ver uma banda bem fraca tanto nas células induzidas à diferenciação quanto nas não induzidas à diferenciação de algumas linhagens, porém quando comparadas com o controle positivo (cDNA de hipocampo humano) a expressão é, praticamente, nula (fig. 8) .

FIGURA 8: RT-PCR para verificar a presença de transcritos comuns em células neuronais: *Nes* (nestina), *MAP2* e *NeuN* e, também, foi utilizado um par de *primers* para *GFAP*. Todas as células induzidas à diferenciação e não induzidas à diferenciação expressam nestina e *MAP2*. A expressão de *NeuN* é bem baixa em algumas linhagens. E essas células expressam bem pouco *GFAP*. O *GAPDH* é um gene *housekeeping*, assim, todas as amostras expressam.

A expressão protéica de *MAP2*, nestina, β -tubulinaIII e NF200 (neurofilamento de baixo, médio e alto peso molecular) foi avaliada pela imunocitoquímica. As SHEDs não induzidas à diferenciação expressam

intrinsecamente nestina, MAP2 e β -tubulinaIII; entretanto, na maioria das linhagens controles foi observado aumento da expressão de nestina, MAP2 e β -tubulinaIII quando submetida ao protocolo de diferenciação neurogênica. E em relação ao NF200, se presente nas SHEDs não induzidas à diferenciação, poucas eram as células que expressavam essas proteínas; nas SHEDs induzidas à diferenciação, um maior número de células apresentou marcação positiva para o anticorpo NF200 (fig. 9).

O resultado na imunocitoquímica variou entre as linhagens. Em relação à expressão protéica de MAP2 e β -tubulinaIII, 4 de 6 linhagens controles avaliadas apresentaram aumento na expressão, mas a linhagem NC3 apresentou um aumento bem sutil de expressão dessas proteínas, enquanto que a linhagem NC6 não apresentou diferença na expressão das células induzidas à diferenciação em relação às não induzidas à diferenciação. A expressão da nestina é bem variável entre as linhagens não induzidas à diferenciação e, após a diferenciação, a expressão continua variável.

Além de expressão gênica e protéica, foi analisada a resposta das células a neurotransmissores. Foi possível verificar que as células induzidas à diferenciação, ao contrário das SHEDs não induzidas à diferenciação, permitiram a entrada de cálcio nas células quando estimuladas com neurotransmissores de glutamato, NMDA e ATP. Além disso, foi observado que as células apresentaram resposta heterogênea: não são todas as células que sofreram aumento do cálcio citosólico quando o neurotransmissor foi adicionado ao meio extracelular (fig. 10).

FIGURA 9: Imunocitoquímica das SHEDs de uma linhagem controle não diferenciada (NC ND) e diferenciada (NC DIF). É observado sutil aumento na expressão de MAP2 e nestina; um aumento mais brusco é notado em relação ao TUJ1 (β -tubulinaIII). O NF200 (NF-L, NF-M e NF-H) é expresso em células induzidas à diferenciação e essa expressão não é observada nas células não induzidas à diferenciação. Barra da escala é de 50 μ m.

FIGURA 10: Análise da resposta a neurotransmissores com o uso de microscopia confocal. Foram células em meio com cálcio e carregadas com fluo-3AM, que entra na célula e ao entrar adquire a capacidade de emitir fluorescência quando se liga ao cálcio. Depois é colocado o neurotransmissor (ATP, NMDA ou glutamato). A seguir é adicionado o ionóforo, que faz com que entre cálcio na célula através de ruptura na membrana, para saber o número de células no campo. Por último é adicionado o EGTA que seqüestra o cálcio, para saber qual é a medida zero de cálcio. As células não induzidas à diferenciação apresentaram influxo de cálcio quase nulo quando foram adicionados os neurotransmissores e as induzidas à diferenciação apresentaram aumento de cálcio no citosol em resposta aos neurotransmissores.

As células foram avaliadas em relação à resposta aos neurotransmissores em sistema de perfusão que permite que uma mesma população de células seja avaliada para diversos neurotransmissores. Numa população de 137 células, 11% apresentaram influxo de cálcio quando adicionado ao meio glutamato, 20% das células apresentaram influxo ao

adicionar acetilcolina e 27% das células responderam com influxo de cálcio quando adicionado meio com KCl (fig. 11).

FIGURA 11: Porcentagem de células que apresentaram aumento do cálcio no citosol quando adicionado neurotransmissores ao meio, os seguintes neurotransmissores foram testados: glutamato (E), KCl e acetilcolina (ACh). O número total de células analisadas foram 137.

Além disso, foram analisados canais de sódio dependentes de voltagem. Foi verificado que na membrana das SHEDs induzidas à diferenciação e não induzidas à diferenciação existem canais de sódio e potássio dependentes de voltagem, típico de células excitáveis, que são fundamentais para o disparo do potencial de ação (fig. 12 a e b).

Em algumas células (6 em 24 células induzidas à diferenciação e 5 em 20 células não induzidas à diferenciação), foi possível verificar que rapidamente foram ativados os canais de sódio, pelos quais passaram corrente para dentro das células, e foram registrados deslocamentos negativos. Depois,

como os canais para sódio dependentes de voltagem se inativaram rapidamente, e os canais de potássio se ativaram tardiamente, as correntes de potássio para fora apareceram como deflexões positivas. Entre as células induzidas à diferenciação, nove delas apresentaram correntes de sódio, mas sem ou com correntes bem baixas de potássio; algumas células (8 em 24) induzidas à diferenciação só apresentaram correntes tardias de potássio e 5 células não apresentaram mudança na corrente com os pulsos de voltagem. Em relação às células não induzidas à diferenciação, 7 apresentaram correntes de sódio e correntes baixas ou nulas de potássio, 4 células somente apresentaram correntes de potássio e 4 células não apresentaram correntes (tabela 3).

TABELA 3: Tabela com o número de células que apresentaram correntes de sódio e/ou potássio analisadas pela técnica de “patch clamp”, configuração “whole cell”. NC DIF são as linhagens controles induzidas à diferenciação e NC ND são as linhagens controles não induzidas à diferenciação.

grupo	tipo de correntes			sem corrente
	Na ⁺ e K ⁺	Na ⁺	K ⁺	
NCDIF	6	9	8	5
NC ND	7	5	4	4

As correntes de sódio foram analisadas isoladamente (fig. 12c) e foi calculada a condutância máxima dos canais de sódio. As células induzidas à diferenciação apresentaram média da condutância máxima relativa à capacitância de $673,73 \pm 299,22$ pS/pf (n=9) e a média da condutância máxima relativa à capacitância nas células não induzidas à diferenciação é de $372,42 \pm 213,53$ pS/pf (n=7). Essa diferença é estatisticamente significativa ($p= 0,0253$).

FIGURA 12: Correntes de Na^+ por canais dependentes de voltagem em pulsos despolarizantes, partindo-se de valores negativos de potencial. Nas condições dos experimentos, correntes de Na^+ e de K^+ se sobrepuseram, assim a análise detalhada dos canais de Na^+ foi realizada em células que apresentaram expressão de, somente, canais de sódio dependentes de voltagem. A) Correntes de Na^+ em células de controles induzidas à diferenciação e em B) correntes em células-tronco de controle. Em C estão as relações I-V para os valores de pico das correntes. NC ND é a linhagem controle não diferenciada e NC DIF é a linhagem controle diferenciada.

5.2.2- Protocolo de Király *et al.*, 2009

Ao término do segundo protocolo testado, as células mostraram uma morfologia semelhante aos dos neurônios (fig. 13). Entretanto, durante o processo de diferenciação mais de 30% das células morreram. Essa morte foi observada com a introdução do segundo meio de diferenciação (fig. 13d).

FIGURA 13: Imagens dos passos da diferenciação neuronal. A) SHEDs antes da indução da diferenciação (objetiva de 20x). B) Células sem meio de diferenciação na placa tratada com poli-lisina (objetiva de 20x). C) Células no primeiro meio de diferenciação no qual ficam 2 dias (objetiva de 20x). D) Células após segundo meio de diferenciação (objetiva de 40x). E) Células após 3 dias no último meio de diferenciação (objetiva de 20x). F) Células após 7 dias no último meio, é possível observar vários prolongamentos citoplasmáticos (objetiva de 40x).

A linhagem diferenciada continuou com a expressão gênica de nestina (fig. 14A), pois as SHEDs não induzidas à diferenciação, como já mostrado, expressam nestina. Além disso, a expressão do gene *MAP2* foi observada nas

células não induzidas à diferenciação, mas não nas induzidas à diferenciação (fig. 14B).

FIGURA 14: RT-PCR de células induzidas à diferenciação neuronal através do protocolo de Király e colaboradores (2009). A) Mostra a expressão gênica de nestina em células induzidas à diferenciação (NC DIF) e não induzidas à diferenciação (NC ND). B) Reação mostra a expressão de *MAP2* em células não induzidas à diferenciação de controles normais (NC ND) e essa expressão não ocorre nas células induzidas à diferenciação (NC DIF).

5.3- Diferenciação neurogênica de células de pacientes com Síndrome de Angelman

O protocolo de diferenciação neurogênica descrito por Arthur e colaboradores (2008) foi realizado em SHEDs obtidas a partir de dentes de pacientes. Através da RT-PCR, foi possível verificar que as células de pacientes também expressam nestina constitutivamente. Após a diferenciação neuronal, a expressão de nestina persiste. A expressão de *MAP2* ocorre nas

células induzidas à diferenciação, sendo que em uma linhagem (AS1) a expressão de *MAP2* é baixa nas SHEDs induzidas à diferenciação, mas as células não induzidas à diferenciação não expressam *MAP2*; a linhagem AS3 apresenta expressão baixa de *MAP2* nas células não induzidas e induzidas à diferenciação; nas demais linhagens, a expressão de *MAP2* foi semelhante a do controle (fig. 15). As células de pacientes, como as dos controles, apresentaram expressão quase nula de *GFAP* e *NeuN*.

FIGURA 15: RT-PCR com *primers* para nestina e *MAP2*. O resultado é semelhante ao visto nas linhagens controles (NC) exceto em relação ao *MAP2* na linhagem do paciente AS1 cuja expressão de *MAP2* é bem baixa nas células induzidas à diferenciação (AS1 NI-SHED) e nula nas células não induzidas à diferenciação (AS1 SHED). AS1, AS2, AS3, AS4 e AS5 são as linhagens de pacientes e NC é uma linhagem controle. DIF são as células induzidas à diferenciação neuronal e ND são as células não induzidas à diferenciação. *GAPDH* é o gene *housekeeping*.

Através da imunocitoquímica foi possível analisar a expressão da nestina nas células dos pacientes. E corroborando o encontrado na RT-PCR, as SHEDs de pacientes expressam constitutivamente nestina, entretanto, a expressão protéica de nestina varia entre as linhagens. Com a indução da diferenciação neurogênica, as células continuam expressando nestina (fig. 16).

FIGURA 16: Imunocitoquímica para nestina, um marcador de células precursoras neuronais. A expressão é variável entre as linhagens induzidas à diferenciação e não induzidas à diferenciação. ND são as linhagens não induzidas à diferenciação, DIF são as linhagens induzidas à diferenciação neurogênica. NC é uma linhagem controle e AS1, AS2 e AS3 são linhagens de pacientes. Barra da escala de 50 µm.

A expressão de β -tubulina III (TUJ1) aumentou em 67% das linhagens controles induzidas à diferenciação e nas linhagens de pacientes somente uma linhagem (AS2) apresentou aumento da expressão dessa proteína. Nas demais linhagens, a expressão se manteve muito semelhante a das SHEDs não induzidas à diferenciação, sendo que nas linhagens AS3 e AS5 a expressão protéica de β -tubulina III é mais alta do que nas outras linhagens de pacientes não induzidas à diferenciação (fig. 17).

O padrão de expressão de outros filamentos intermediários foi analisado através da marcação observada pela imunocitoquímica utilizando o anticorpo NF200, que se liga a três tipos de neurofilamentos (NF-L, NF-M e NF-H). A expressão desses neurofilamentos foi semelhante entre as células induzidas à diferenciação de pacientes e de controles: algumas células com marcação positiva, mas a grande maioria não apresentando marcação (fig. 18).

Quando as linhagens de SHEDs de controles foram induzidas à diferenciação neurogênica, 67% delas apresentaram aumento da expressão de MAP2, nas demais linhagens, uma apresentou um aumento sutil da expressão de MAP2 e outra não apresentou aumento. Nas linhagens de pacientes as células induzidas à diferenciação apresentaram expressão semelhante de MAP2 das SHEDs não induzidas à diferenciação (fig. 19).

FIGURA 17: Imunocitoquímica marcando β -tubulina III, uma classe de tubulina específica de neurônios.

Somente a linhagem AS2 apresentou aumento na expressão de β -tubulina III como a maioria (4/6) das

linhagens controles. ND são as linhagens não induzidas à diferenciação, DIF são as linhagens induzidas à diferenciação neurogênica. NC é uma linhagem controle e AS1, AS2, AS3, AS4 e AS5 são linhagens de pacientes. Barra da escala de 50 μ m.

FIGURA 18: Imunocitoquímica que identifica os neurofilamentos NF-L, NF-M e NF-H. Não houve diferença na resposta entre as SHEDs de pacientes com AS e as SHEDs de controle. Somente algumas células marcam para esse anticorpo, sendo que elas são mais facilmente encontradas nas linhagens induzidas à diferenciação devido a uma marcação mais forte e ao maior número de células marcadas. ND são as linhagens não induzidas à diferenciação, DIF são as células induzidas à diferenciação neurogênica. NC5 e NC6 são linhagens controles, e AS1 e AS4 são linhagens de pacientes com a síndrome de Angelman. Barra da escala de 50 μ m.

FIGURA 19: Imunocitoquímica com marcação para MAP2, uma proteína específica de neurônios maduros. Na maioria das linhagens controles houve aumento da expressão de MAP2. Entretanto, nas linhagens de pacientes a expressão de MAP2 é fraca nas células não induzidas à diferenciação e induzidas à diferenciação. ND são as linhagens não induzidas à diferenciação, DIF são as linhagens induzidas à diferenciação neurogênica. NC é uma linhagem controle e AS1, AS2, AS3, AS4 e AS5 são linhagens de pacientes. Barra da escala de 50 μm .

Além das análises de RNAs e proteínas, foi analisada a presença de canais de sódio dependentes de voltagem nas células induzidas e não induzidas à diferenciação de pacientes. Nessas células foram encontrados canais de sódio e de potássio dependentes como nas linhagens controles (fig. 12 e 20). Nas células de pacientes induzidas à diferenciação, em 7 de 16 análises, foram registrados que os pulsos de voltagem ativaram canais de sódio que permitem a entrada de corrente nas células e apresentam rápida inativação, e depois, as correntes tardias de potássio apareceram como deflexões positivas. Em 7 células foram observadas correntes de sódio, mas sem ou com correntes baixas de potássio. E em 2 análises não foram encontrados canais de sódio nem de potássio dependentes de voltagem (tabela 4).

TABELA 4: Tabela com o número de células que apresentaram correntes de sódio e/ou potássio analisada pela técnica de “patch clamp”, configuração “whole cell”. CN DIF são as linhagens controles induzidas à diferenciação e AS DIF são as linhagens de pacientes com AS induzidas à diferenciação.

grupo	tipo de correntes			sem corrente
	Na^+ e K^+	Na^+	K^+	
CN DIF	6	9	8	5
AS DIF	7	7	0	2

FIGURA 20: Correntes de Na^+ por canais dependentes de voltagem em pulsos despolarizantes, partindo-se de valores negativos de potencial. As células que produziram os resultados mostrados expressam exclusivamente correntes para Na^+ (correntes negativas nos painéis A e B). Para a comparação de resultados de diferentes células, os valores de corrente foram divididos pelo valor da capacitância que depende da superfície das células. A) correntes de Na^+ em células da linhagem controle induzidas à diferenciação. B) correntes de Na^+ em células de pacientes induzidas à diferenciação. C) Relação corrente-voltagem (I-V) para os valores de pico das correntes de Na^+ . A curva superposta aos pontos foi gerada pela equação Ohm-Boltzman, da qual se deriva os valores da condutância máxima. CONT DIF é uma linhagem controle não diferenciada e AS DIF é uma linhagem de paciente induzida à diferenciação neurogênica.

A média dos valores de condutância máxima a sódio nas SHEDs induzidas à diferenciação neuronal de pacientes é de $601,19 \pm 175,13$ pS/pf (n=6). Nas células oriunda de controles induzidas à diferenciação, o valor é de

673,73 $\pm$ 299,22 pS/pf (n=9). Não há diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos ($P \geq 0,05$).

5.4- Análises da expressão do gene *UBE3A*

Foram desenhados *primers* para *UBE3A* e para o grande transcrito *SNURF-SNRPN* próximo à região do *UBE3A* anti-senso para a PCR em tempo real. Entretanto, a expressão do *SNURF-SNRPN* é bem baixa, pois no RT-PCR foi possível verificar a presença de uma banda fraca tanto em células induzidas à diferenciação como nas não induzidas à diferenciação (fig. 21), mas não foi possível analisar a expressão desse gene pela PCR em tempo real.

FIGURA 21: RT-PCR com *primers* para o gene *SNURF-SNRPN*; os *primers* amplificam uma região próxima do *UBE3A* anti-senso. A expressão encontrada desse gene é baixa. Isso pode ser comparado com a alta expressão no controle positivo que é cDNA de cérebro humano. O *GAPDH* é um gene *housekeeping*. AS2 e AS3 são linhagens de pacientes. NC3, NC4 e NC5 são linhagens controles. DIF são as células que foram induzidas à diferenciação e ND são as linhagens não induzidas à diferenciação.

Através da análise pela PCR em tempo real da expressão do gene *UBE3A* nas células de pacientes com AS, foi possível verificar que a expressão

desse gene é bem menor do que nos indivíduos controle. Como nas células de pacientes com deleção há somente o alelo paterno do gene *UBE3A*, já é esperada uma queda na expressão desse gene, o que de fato ocorreu, pois foi encontrada uma expressão média de 18% da ocorrida nas células de controles; esse valor indica que a expressão do *UBE3A* nas SHEDs é estatisticamente diferente no grupo de pacientes com AS em relação ao grupo controle ($P = 0,0454$). Nas células do paciente com mutação no *UBE3A*, o padrão de expressão foi semelhante ao dos outros pacientes, por isso todas as linhagens de pacientes foram analisadas em conjunto. O mesmo foi encontrado nas células induzidas à diferenciação: as linhagens dos pacientes com AS apresentaram uma expressão menor de *UBE3A* em relação às linhagens controles e essa diferença é estatisticamente significativa ($P = 0,0045$) (fig. 22).

Além disso, foi analisada a expressão do *UBE3A* em uma linhagem de células-tronco de pacientes com a síndrome de Prader-Willi por deleção do segmento 15q11-q13: as células não induzidas à diferenciação apresentaram uma expressão baixa, 25% da expressão média das linhagens de células controles, e as células induzidas à diferenciação expressaram 50% da expressão média das linhagens controles induzidas à diferenciação.

Nas células induzidas à diferenciação de pacientes com AS, PWS e controles ocorreu aumento na expressão do *UBE3A* em relação às células não induzidas à diferenciação. Entretanto, a diferença de expressão do *UBE3A* entre células não induzidas e induzidas à diferenciação não é estatisticamente significativa.

FIGURA 22: Gráfico dos resultados obtidos na PCR em tempo real. A expressão nas células não induzidas à diferenciação é menor que nas células induzidas à diferenciação. As células de pacientes com AS apresentam uma expressão baixa do *UBE3A*, menor que 20% da encontrada nas células controles. O valor de AS corresponde à média dos valores das linhagens de pacientes: AS1, AS2, AS3, AS4 e AS5. NC é a média de 5 linhagens controles, DIF são as linhagens induzidas à diferenciação e ND são as linhagens não induzidas. PWS é uma linhagem de paciente com síndrome de Prader-Willi.

Para verificar a quantidade de células que expressam a região *UBE3A* anti-senso foi realizada a análise por FISH, baseada no trabalho de Leung e colaboradores (2009). Eles relataram que o uso de sondas que encobrem a região que origina o grande transcrito *SNURF-SNRPN*, que inclui a região *UBE3A* anti-senso nos núcleos de neurônios, as sondas ficam sobrepostas no alelo materno e as sondas ficam separadas, como um colar, no alelo paterno; e nos núcleos de outros tipos celulares, as sondas se encontravam todas sobrepostas, indicando a condensação dessa região e, conseqüentemente, a não expressão desse segmento. Assim, foi feita essa técnica nos núcleos das células induzidas e não induzidas à diferenciação para verificar a porcentagem

de células que apresentavam essa região descondensada e logo expressavam esse grande transcrito. Um número muito baixo de células apresentou no núcleo as sondas formando um colar; assim, um baixo número de células expressa o transcrito *SNURF-SNRPN* incluindo a região *UBE3A* anti-senso. E não foi encontrada diferença entre as células induzidas à diferenciação e não induzidas (tabela 5 e fig. 23 e 24).

TABELA 1: O número de sondas sobrepostas ou de sondas separadas, formando uma estrutura semelhante a um colar, encontrado em cada linhagem diferenciada (DIF) ou não diferenciada (ND). E apresenta a porcentagem núcleos com sondas separadas. CN1, CN2, CN3, CN4 e CN5 são linhagens controles. AS2, AS3 e AS4 são linhagens de pacientes.

AMOSTRA	n° de sondas sobrepostas				colar	quantidade de células com colar (%)
	0	1	2	3 ou +		
CN1 DIF	9	20	56	11	4	4,00
CN1 ND	3	15	77	14	1	0,63
CN2 DIF	10	32	50	6	2	2,00
CN2 ND	6	30	60	4	2	1,96
CN3 DIF	5	18	62	16	1	0,98
CN3 ND	5	19	78	1	0	0,00
CN4 DIF	4	17	69	9	1	1,00
CN4 ND	4	21	70	4	2	1,98
CN5 DIF	10	19	61	9	1	1,00
CN5 ND	1	13	80	5	2	1,98
AS2 DIF	16	77	5	2	2	1,96
AS2 ND	11	77	10	2	2	1,96
AS3 DIF	17	75	7	1	0	0,00
AS3 ND	20	88	4	3	1	0,86
AS4 DIF	3	13	74	13	1	0,96
AS4 ND	6	21	70	3	2	1,96

FIGURA 23: Imagens da técnica de FISH (hibridação *in situ* fluorescente). A) Sondas hibridando em cromossomos de linhagens controles: é possível verificar que as sonda se sobrepõem. E ocorre a hibridação em dois cromossomos. B) Sondas hibridando em um único cromossomo em uma linhagem de paciente com deleção do segmento 15q11-q13, mostrando que as sondas são para essa região, por isso que só ocorre a hibridação em um cromossomo. C) Núcleo de uma linhagem controle, as sondas vermelhas se sobrepõem em dois lugares (nos 2 cromossomos). D) Núcleo de uma linhagem controle. É possível ver que as sondas visualizadas em vermelho não estão sobrepostas em um dos cromossomos, formando uma estrutura parecida com colar (seta vermelha).

FIGURA 24: Imagens da técnica de FISH (hibridação *in situ* fluorescente). A) Núcleo de paciente com deleção do segmento 15q11-q13, as sondas visualizadas em vermelho estão todas sobrepostas. B) Núcleos de pacientes com deleção no segmento 15q11-q13, o núcleo indicado pela seta vermelha apresenta as sondas não sobrepostas, formando um colar. C) Núcleo do paciente com mutação no gene *UBE3A*, como nos núcleos das linhagens controles, é possível verificar marcação nos dois cromossomos. As sondas estão sobrepostas. D) Núcleo do paciente com mutação no gene *UBE3A*, sendo que em um dos cromossomos as sondas não estão sobrepostas e formam um colar. Barra de escala de 25 µm.

6- DISCUSSÃO

A citometria de fluxo analisa as glicoproteínas presentes na membrana das células, e a maioria das linhagens estabelecidas mostraram que são de origem mesenquimal, pois apresentaram marcação positiva para CD13, CD73, CD29, CD90, SH3, CD44 e HLA ABC, marcação negativa para as glicoproteínas CD45 e HLA DR, que são expressas em células hematopoiéticas, para CD31 que é expressa em células de origem endotelial, CD34 e CD117 expressos em células de origem hematopoiética e endotelial.

Entretanto, uma das linhagens controle apresentou alta porcentagem (~26%) de células CD34-positivas. Alguns autores já haviam relatado a presença de células CD34-positiva nas células da polpa de dente, porém em menor porcentagem; Stevens e colaboradores (2008) compararam as células CD34-negativas com as positivas na polpa de dente e verificaram que as CD34-negativas apresentam maior propriedade proliferativa, co-expressam maior número de glicoproteínas de células mesenquimais (por exemplo, CD90 e CD29) e apresentam maior capacidade de se diferenciar em adipócitos e melanócitos do que as células CD34-positivas. Essa linhagem com alta porcentagem de células CD34-positivas foi excluída da maioria das análises.

Outros estudos mostraram a heterogeneidade presente nas SHEDs, sendo descrita a presença em baixa porcentagem de células positivas para STRO-1 (antígeno encontrado em células precursoras do estroma da medula óssea) e CD146 (antígeno presente em células endoteliais) encontradas,

principalmente, em regiões próximas aos vasos sanguíneos (Miura *et al.*, 2003; Waddington *et al.*, 2008; Patel *et al.*, 2008). Além disso, foram descritas células positivas para Oct-4, Nanog e outros marcadores de células-tronco embrionárias entre células isoladas da polpa de dente (Kerkis *et al.*, 2006).

O uso da citometria de fluxo indica que a origem das SHEDs é mesenquimal. Entretanto, para confirmar que essas células são células-tronco, foi necessário verificar a capacidade de diferenciação em múltiplas linhagens celulares. A diferenciação osteogênica foi confirmada pela coloração de Von Kossa, que permitiu a visualização de depósitos de cálcio e, a diferenciação condrogênica foi confirmada pela coloração de azul de toluidina, que mostrou o citoplasma basófilo.

Após a diferenciação adipogênica, foi possível visualizar a presença de depósitos de gordura com a coloração com Oil Red-O. Entretanto, nas células não induzidas à diferenciação foi possível visualizar esses depósitos de gordura em menor quantidade em relação às células induzidas à diferenciação, mas as SHEDs só expressam *FABP4*, que é uma proteína específica de adipócitos, quando submetidas ao protocolo de diferenciação adipogênica. Então, é possível que algumas SHEDs se diferenciem em adipócitos sem a necessidade de um meio indutor, mas quando induzidas, esta diferenciação é mais consistente: maior número de células se diferencia e essas células expressam proteínas específicas de adipócitos.

Em relação à diferenciação neuronal, como sabemos que as SHEDs expressam constitutivamente algumas proteínas presentes na neurogênese, mostramos que nas linhagens utilizadas no estudo ocorre a expressão gênica e

protéica de MAP2, que é uma proteína associada aos microtúbulos expressa em neurônios maduros, e nestina, que é uma proteína de filamento intermediário que é expressa, por exemplo, em precursores neuronais. Além disso, foi mostrada a expressão protéica de β -tubulina III, proteína encontrada em neurônios imaturos que auxilia na estabilidade dos microtúbulos e no transporte axonal, e de proteínas de canais de sódio e potássio dependentes de voltagem. Essas características das SHEDs podem indicar um potencial intrínseco de diferenciação neuronal. Isso pode ser devido à origem dessas células, pois elas são células mesenquimais de origem da crista neural. As células da crista neural contribuem para formação de alguns tipos celulares do sistema nervoso como neurônios e células da glia; mas essas células também auxiliam a formação de estruturas não nervosas como osso, células pigmentares e cartilagem.

Além da expressão de proteínas de células neuronais, as SHEDs apresentaram baixa expressão gênica de *GFAP*, proteína de filamento intermediário expressa em astrócitos. Entretanto, a expressão de *GFAP* foi menor do que a expressão de proteínas neuronais, provavelmente porque as SHEDs possuem um maior potencial intrínseco de diferenciação neuronal do que o potencial de diferenciação em células da glia.

Com o protocolo de diferenciação neuronal de Agnes Arthur e colaboradores (2008), algumas células passaram a expressar NF200 (proteínas de neurofilamento) e a maioria das linhagens controles (67%) apresentou aumento da expressão de proteínas específicas de neurônio em estágio intermediário e final de diferenciação que são β -tubulina III e MAP2,

respectivamente. Assim, as células, após a indução da diferenciação, aumentaram a expressão de proteínas neuronais; entretanto, como a expressão de β -tubulina III foi mais intensa que a de MAP2 e as células induzidas à diferenciação não expressaram NeuN, pode ser que a diferenciação não atingiu um estágio de neurônio totalmente maduro, neurônio pós-mitótico, e que a população de células de cada linhagem responda de forma heterogênea, isto é, as células atingiram diferentes estágios de diferenciação, havendo desde células que não iniciaram a diferenciação até células maduras. Além disso, a expressão de nestina persistiu após a diferenciação, corroborando com a hipótese de que não são todas as células que se diferenciaram e/ou a diferenciação neuronal não foi completa.

Além disso, entre as células que expressaram canais de sódio dependente de voltagem, houve um aumento da capacitância máxima de sódio após a indução da diferenciação neurogênica. Entretanto, diferentes respostas das células foram observadas, sendo que algumas apresentaram influxo de sódio e efluxo de potássio, outras só apresentaram um desses dois tipos de correntes e ainda células que não apresentaram correntes de sódio nem potássio com as mudanças de voltagem.

Algumas células induzidas à diferenciação neurogênica apresentaram aumento da concentração de cálcio no citosol quando estimuladas por alguns neurotransmissores como acetilcolina, glutamato, NMDA e ATP, enquanto que as células não induzidas à diferenciação não apresentaram o mesmo aumento da concentração de cálcio no citosol. A resposta ao ATP é menos importante para validação da diferenciação porque um conjunto muito grande de células

apresenta receptores para essa molécula. Glutamato e acetilcolina ativam receptores de dois tipos: ionotrópico e metabotrópico. Receptores metabotrópicos para glutamato e para acetilcolina são receptores acoplados a proteína G que, estimulados, promovem aumento dos níveis de Ca^{2+} livre no citosol, por uma cascata que envolve o IP_3 (trifosfato de inositol). Os receptores ionotrópicos são expressos em neurônios e estão na própria proteína do canal, e quando o agonista se liga a ele, aumenta a chance de passagem de íons por esses canais; o nome desses receptores (baseado no nome do agonista) são receptores de NMDA (*N*-methyl-d-aspartate), receptores de AMPA (α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid) e receptores de KA (kainate).

Assim, a resposta ao NMDA foi a mais importante para evidenciar a diferenciação das células em neurônios, pois os receptores de NMDA são exclusivos de células nervosas. O NMDA é importante para a plasticidade sináptica, pois quando o agonista se liga ao receptor, ocorre influxo de cálcio na membrana pós-sináptica, levando a ativação de enzimas como a quinase II dependente de cálcio e calmodulina (CaMKII) que já se mostrou importante para potencialização longo termo, e, conseqüentemente, para memória (Siegel *et al.*, 2005).

Pelos experimentos de medição de cálcio citosólico, podemos observar mais uma vez que a população de células induzida à diferenciação é heterogênea, pois somente uma parte das células apresentou aumento de níveis de cálcio citosólico quando foi adicionado o neurotransmissor (glutamato, NMDA, KCl, acetilcolina e ATP). Isso corrobora com os demais dados que indicam heterogeneidade das células induzidas à diferenciação: não são todas

as células que expressaram MAP2 e β -tubulina III na imunocitoquímica, poucas células expressam algumas das proteínas de neurofilamento: NF-L, NF-M e NF-H (NF-200) e diferentes respostas foram observadas no experimento de “patch clamp”.

Assim, com o primeiro protocolo de diferenciação neurogênica, as SHEDs passaram a expressar mais proteínas neuronais e apresentaram novas características de neurônios indicando que essas células avançaram no processo de diferenciação neurogênica. Entretanto, pode ser que as células não atingiram o estágio final de diferenciação ou somente poucas células se diferenciaram até o estágio maduro.

O protocolo de Király e colaboradores foi testado para diferenciação neuronal. Após o término do protocolo, as células tiveram uma modificação nítida na morfologia, originando células com muitos processos citoplasmáticos. Entretanto, observamos que esse protocolo causa muita morte celular, sendo que, aproximadamente, 30% das células morreram durante o processo.

Através da RT-PCR, a expressão de nestina foi observada em células induzidas e não induzidas à diferenciação neurogênica. Além disso, a RT-PCR indicou que a linhagem não induzida expressava *MAP2*, porém esta expressão estava ausente nas células que foram submetidas ao protocolo de diferenciação neurogênica. Esse resultado é conflitante, pois, como MAP2 é uma proteína presente em neurônios maduros, era esperada a sua expressão nas células induzidas à diferenciação neuronal.

O primeiro trabalho que demonstrou a diferenciação neuronal de células-tronco mesenquimais foi de Woodbory e colaboradores (2000). Esse trabalho e alguns outros trabalhos que também utilizaram substâncias tóxicas como DMSO (Dimetilsulfóxido) ou β -mercaptoetanol para a indução da diferenciação foram duramente criticados, pois os resultados foram considerados artefato de técnica, sendo que a mudança morfológica seria em decorrência de morte celular; além da mudança morfológica, nesses trabalhos também foi observada a expressão de algumas proteínas como NeuN através de imunocitoquímica, mas esses resultados não foram confirmados pela RT-PCR (Lu *et al.*, 2004). Assim, como o segundo protocolo não apresentou resultados positivos em relação à diferenciação neurogênica e causou alta morte celular, ele não foi testado em várias linhagens controles e de pacientes.

As SHEDs de pacientes, como as de controles, apresentaram expressão constitutiva de algumas proteínas neuronais, como nestina, β -tubulina III e MAP2. A expressão gênica de nestina foi semelhante entre as células não induzidas à diferenciação de pacientes com AS e as de controles. Entretanto, a expressão de MAP2 foi menor em duas linhagens de pacientes, sendo que em uma das linhagens a expressão parece nula. Além disso, as SHEDs de pacientes também expressaram proteínas de canais de sódio e potássio dependentes de voltagem.

As células dos pacientes também foram induzidas à diferenciação pelo protocolo descrito por Arthur e colaboradores (2008). Enquanto que a maioria das SHEDs de controles (4/6) apresentou um aumento da expressão protéica de MAP2 e, principalmente, de β -tubulina III quando induzidas à diferenciação,

esse aumento não foi verificado nas linhagens de pacientes, exceto a linhagem AS2 que apresentou aumento da expressão de β -tubulina III. Isso mostra a heterogeneidade na resposta ao protocolo de diferenciação entre as linhagens. Essa heterogeneidade dificulta a comparação entre os dois grupos (pacientes x controles), mas houve uma melhor resposta ao protocolo de diferenciação nas células controles do que nas de pacientes com a síndrome de Angelman. Para confirmar essa diferença na resposta entre o grupo de células controle e de pacientes seria interessante fazer mais análises quantitativas como PCR em tempo real para os marcadores de neurogênese. Mardirossian e colaboradores em 2009 relataram que em camundongos modelo para AS (sem a expressão do *Ube3a* materno) a neurogênese adulta no hipocampo estava comprometida; embora as células apresentassem proliferação normal de células precursoras e migração, a maturação dos neurônios adultos em camundongos modelo estaria atrasada em relação aos animais controles. Logo, pode ser que a neurogênese dessas células de pacientes com AS também esteja comprometida e apresente menor sucesso de diferenciação.

Não houve diferença na expressão protéica de neurofilamentos e nestina nas células induzidas à diferenciação de pacientes e de controles, pois a expressão de nestina foi variável e presente nos dois grupos, e a expressão de neurofilamentos foi encontrada em poucas células, sendo que as células induzidas à diferenciação tiveram maior número de células que expressam essas proteínas.

Não foi encontrada diferença na condutância de sódio entre o grupo de células de pacientes com AS e células controles induzidas à diferenciação.

Além disso, as células de pacientes, também, apresentaram respostas heterogêneas nos experimentos de “patch clamp”, sendo que algumas células expressaram correntes de sódio e de potássio dependentes de voltagem, outras apresentaram somente um dos tipos de correntes e houve linhagens que não expressaram canais de sódio nem de potássio dependentes de voltagem.

A expressão do *UBE3A* anti-senso analisada pela RT-PCR mostrou que na população de células induzidas à diferenciação e não induzidas de controles e pacientes com AS ocorre uma baixa expressão do *UBE3A* anti-senso. Através da hibridação *in situ* fluorescente com sondas que encobrem a região do gene *SNURF-SNRPN* até a região do *UBE3A* anti-senso, foi possível verificar que uma baixa proporção de células expressavam o grande transcrito expresso dessa região. Assim, as SHEDs induzidas e não induzidas à diferenciação neurogênica apresentavam uma pequena quantidade de células que expressavam *UBE3A* anti-senso. Além disso, não foi encontrado aumento da expressão do *UBE3A* anti-senso nas células induzidas à diferenciação em relação às células não induzidas.

As SHEDs ou a maioria das SHEDs expressavam *UBE3A* e a expressão era bialélica, porém as células de pacientes com AS apresentavam 18% da expressão do gene *UBE3A* em relação à expressão em células controles, mas a linhagem de PWS, que apresenta deleção do segmento 15q11-q13 paterno, também, apresentou uma expressão baixa de 25%. Logo, a expressão do *UBE3A*, como esperado, é maior em células de controles do que em células de pacientes, pois os pacientes apresentam somente um alelo funcional; e como

descrito por Gustin e colaboradores (2010), outros tecidos além de neurônios apresentam expressão bialélica, mas com maior expressão do alelo materno. Entretanto, é importante avaliar se o mecanismo epigenético que leva a maior expressão do alelo materno é o mesmo encontrado nos neurônios maduros: expressão de um RNA anti-senso ou seria outro mecanismo. Além disso, não se sabe se a tendência de maior expressão do alelo materno é devido à inibição total de expressão do alelo paterno de algumas células na grande população de células analisadas ou se o mecanismo não é de total inibição de expressão do alelo paterno, ou seja, as células apresentam um mecanismo de seleção de expressão do alelo materno, mas o alelo paterno não é totalmente ausente.

A expressão do *UBE3A* em células de controles e de pacientes induzidas à diferenciação neuronal apresentou um aumento não significativo estatisticamente. Isso indica que a indução da diferenciação não gerou uma maioria de células que apresentaram *imprinting* do *UBE3A*. Isso pode ser devido à diferenciação neuronal não ter gerado neurônios pós-mitóticos, pois a expressão do *Ube3a* exclusiva ou preferencial materna foi descrita somente em neurônios maduros em camundongos (Yamasaki *et al.*, 2003). Assim, como a população de células induzidas à diferenciação é uma população heterogênea e a maioria não deve ter alcançado o estágio final da diferenciação neurogênica, e se em humanos a expressão de *UBE3A* anti-senso só ocorre em neurônios maduros como ocorre em camundongo, a expressão do alelo paterno encontrada nas células de pacientes com AS induzidas à diferenciação pode ser explicada. Outra hipótese para expressão do alelo paterno nas células

induzidas à diferenciação neurogênica é que embora seja descrito a expressão preferencial ou exclusiva do alelo materno em todo cérebro de camundongo (Gustin et al., 2010), é possível que haja diferença entre humanos e camundongos, e o *imprinting* do *UBE3A* em humanos só ocorra em alguns tipos neuronais e as células foram induzidas a diferenciar em um tipo neuronal que não apresenta a expressão preferencial materna do gene *UBE3A*.

7 – CONCLUSÃO

As células-tronco da polpa de dente de pacientes com AS e controles expressaram glicoproteínas de células de origem mesenquimal e mostraram capacidade de diferenciação osteogênica, condrogênica e adipogênica. Algumas células apresentaram características de células envolvidas na neurogênese, como a expressão de proteínas MAP2, β -tubulina III, canais de cálcio e potássio dependentes de voltagem.

Após a indução da neurogênese, as células avançaram no processo de diferenciação neurogênica: aumentaram a expressão de algumas proteínas específicas de neurônios como MAP2, proteínas de neurofilamento (NF-H, NF-M e NF-L) e, principalmente, β -tubulina III; algumas células apresentaram aumento na condutância de sódio através de canais de sódio dependentes de voltagem e passaram a expressar receptores de neurotransmissores como glutamato e NMDA, sendo que a resposta ao NMDA é importante devido a sua presença exclusiva no sistema nervoso.

As células de pacientes com AS também foram induzidas à diferenciação neurogênica, e a resposta ao protocolo de diferenciação foi melhor nas células controles do que nas células de pacientes, sendo que o aumento de expressão protéica de MAP2 e β -tubulina III foi mais frequente em células controles. Essa diferença de resposta deve ser mais explorada e para melhor analisar essa diferença de resposta ao protocolo de diferenciação entre

células de paciente e de controle seria adequado realizar mais comparações quantitativas.

As SHEDs de pacientes e controles expressam, mesmo que em baixa quantidade, o *UBE3A* anti-senso, indicando que células não nervosas também expressam o *UBE3A* anti-senso.

As análises de expressão de *UBE3A* e *UBE3A* anti-senso não revelaram diferenças entre os grupos de células induzidas e não induzidas à diferenciação neurogênica. Assim, embora as células tenham progredido no processo de diferenciação neuronal, a maioria não deve ter atingido o estágio de maturação necessário para que ocorresse a expressão do RNA anti-senso que regula o *imprinting* tecido-específico do gene *UBE3A*, ou pode ser que o *imprinting* não ocorra em todos os tipos de neurônios.

As SHEDs formam uma população de células heterogêneas e, após a indução da diferenciação, diferentes respostas são obtidas ao protocolo entre células de uma mesma população, sendo que a expressão de marcadores da neurogênese: MAP2, β -tubulina III, nestina, NF-L, NF-M e NF-H diferem entre as células e as respostas aos impulsos de voltagem e aos neurotransmissores também são heterogêneas. Essa heterogeneidade dificulta a comparação entre os grupos (controle x pacientes e células induzidas à diferenciação x não induzidas à diferenciação) e, também, caso haja poucas células induzidas à diferenciação que alcançaram o estágio maduro, os resultados da PCR em tempo real indicando o *imprinting* do *UBE3A* não será percebido, pois há uma maioria de células com expressão bialélica desse gene.

Assim, a diferenciação neuronal de células-tronco da polpa do dente pelo protocolo descrito por Arthur e colaboradores (2008) não fornece um bom modelo para o estudo da expressão do *UBE3A* e do *UBE3A* anti-senso. Mas esse tipo de diferenciação pode ser útil para estudos que tenham interesse em células nos estágios iniciais de diferenciação ou que queiram explorar mais a eletrofisiologia e os receptores das SHEDs e das células induzidas à diferenciação. Além disso, as linhagens estabelecidas de pacientes fornecem uma importante ferramenta para estudos futuros, por exemplo, são materiais possíveis de serem utilizados para reprogramação epigenética gerando as iPS.

9 – Referências bibliográficas

Abeliovich A, Doege CA. Reprogramming therapeutics: iPS cell prospects for neurodegenerative disease. *Neuron*. **61**, 337-339 (2009)

Albrecht U, Sutcliffe JS, Cattanach BM, Beechey CV, Armstrong D, Eichele G, Beaud *et al*. Imprinted expression of the murine Angelman syndrome gene, UBE3A, in hippocampal and Purkinje neurons. *Nat Genet* **17**, 75-78 (1997)

Amos-Landgraf JM, Ji Y, Gottlieb W, Depinet T, Wandstrat AE, Cassidy SB, Driscoll DJ, Rogan PK, Schwartz S, Nicholls RD. Chromosome breakage in the Prader-Willi and Angelman syndromes involves recombination between large, transcribed repeats at proximal and distal breakpoints. *Am J Hum Genet* **65**: 370-386, 1999.

Angelman H. "Puppet" children: a report on three cases. *Develop Med Child Neurol* **7**: 681-688, 1965.

Arthur A, Rychkov G, Dhi S, Koblar AS, Gronthos S. Adult human dental pulp stem cells differentiate toward functionally active neurons under appropriate environmental cues. *Stem Cells*. **26**, 1787-1795 (2008)

Arthur A, Shi S, Zannettino ACW, Fujii N, Gronthos S, Koblar S. Implanted adult human dental pulp stem cells induce endogenous axon guidance. *Stem Cell*. DOI: 10.1002/stem.138 (2009)

Bjornson CRR, Rietze RL, Reynolds BA, Magli MC, Vescovi AL. *Science* **283**, 534-537 (1999)

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*. **15(2)**, 427-35 (2009)

Buiting K, Saitoh S, Gross S, Dittrich B, Schwartz S, Nicholls RD, Horsthemke B. Inherited microdeletions in the Angelman and Prader-Willi syndromes define an imprinting center on human chromosome 15. *Nature Genet.* **9**, 395-400 (1995)

Butler MG. Genomic imprinting disorders in humans: a mini-review. *J Assist Reprod Genet.* DOI 10.1007/s10815-009-9353-3 (2009)

Caplan AI, Dennis JE. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *J Cell Biochem.* **98(5)**, 1076-84 (2006)

Chamberlain SJ, Li XJ, Lalande M. Induced pluripotent stem (iPS) cells as in vitro models of human neurogenetic disorders. *Neurogenet.* **9**, 227-235 (2008)

Chamberlain SJ, Lalande M. Neurodevelopmental disorders involving genomic imprinting at human chromosome 15q11-q13. *Neurobio of disease.* **39**, 13-20 (2010)

Chamberlain SJ, Chen PF, Ng KY, Bourgois-Rocha F, Lemtiri-Chlieh F, Levine ES, LAlande M. Induced pluripotent stem cell models of genomic imprinting disorders Angelman and Prader-Willi syndromes. *PNAS.* DOI 10.1073/pnas.1004487107 (2010)

D'Aquino R, de Rosa A, Laino G, Caruso F, Guida L, Rullo R, Checchi V, Laino L, Tirino V, Papaccio G. Human dental pulp stem cells: from biology to clinical applications. *J Exp Zool (Mol Dev Evol).* **310B** (2008)

Dindot SV, Antalffy BA, Bhattacharjee MB, Beaudet AL. The Angelman syndrome ubiquitin ligase localizes to the synapse and nucleus, and maternal deficiency results in abnormal dendritic spine morphology. *Hum Molec Genet.* **17(1)**, 111-118 (2008)

Glickman MH, Ciechanover A. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol. Rev.* **82**, 373-428 (2002)

Govindasamy V, Abdullah AN, Ronald VS, Musa S, Ab Aziz ZA, Zain RB, Totey S, Bhonde RR, Abu Kasim NH. Inherent differential propensity of dental pulp

stem cells derived from human deciduous and permanent teeth. *J Endod.* **36**(9),1504-1515 (2010)

Greer PL, Hanayama R, Bloodgood BL, Mardinly AR, Lipton DM, Flavell SW, Kim TK, Griffith EC, Waldon Z, Maehr R, Ploegh HL, Chowdhury S, Worley PF, Steen J, Greenberg ME. The Angelman syndrome protein Ube3A regulates synapse development by ubiquitinating Arc. *Cell.* **140**, 704-716 (2010)

Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Gehron Robey P, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) *in vitro* and *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97**, 13625-13630 (2000)

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), 531-535 (2002)

Gustin RM, Bichell TJ, Bubser M, Daily J, Filonova I, Mrelashvili D, Deutch AY, Colbran RJ, Weeber EJ, Haas KF. Tissue-specific variation of Ube3a protein expression in rodents and in a mouse model of Angelman syndrome. *Neurobiol Dis.* **39**(3), 283-291 (2010)

Holm VA, Cassidy SB, Butler MG, Hanchett JM, Greenswag LR, Whitman BY, Greenberg F. Prader-Willi syndrome: consensus diagnostic criteria. *Pediatrics* **91**, 398-402 (1993)

Herzing LBK, Cook EH, Jr, Ledbetter DH. Allele-specific expression analysis by RNA-FISH demonstrate preferential maternal expression of *UBE3A* and imprint maintenance within 15q11-q13 duplications. *Hum. Molec. Genet.* **11**(15), 1707-1718 (2002)

Hogart A, Wu D, LaSalle JM, Schanen NC. The comorbidity of autism with the genomic disorders of chromosome 15q11.2-q13. *Neurobiol. of Disease*. doi: 10.1016/j.nbd.2008.08.11 (2008)

Horsthemke B, Buiting K. Imprinting defects on human chromosome 15. *Cytogenet Genome Res.* **113** (1-4), 292-199 (2006)

Horsthemke B, Wagstaff J. Mechanisms of imprinting of the Prader-Willi/Angelman region. *Am. J. Med. Genet.* **146A**, 2041-2052 (2008)

Huang AHC, Snyder BR, Cheng PH, Chan AWS. Putative dental pulp-derived stem/stromal cells promote proliferation and differentiation of endogenous neural cells in the hippocampus of mice. *Stem Cells.* **26**, 2654-2663 (2008)

Huang GT, Gronthos S, Shi S. Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine. *J Dent Res.* **88(9)**, 792-806. (2009)

Huibregtse JM, Scheffner M, Beaudenon S, Howley PM. A family of proteins structurally and functionally related to the E6-AP ubiquitin-protein ligase. *PNAS.* **23**;92(11), 5249 (1995)

Igura K, Zhang X, Takahashi K, Mitsuru A, Yamaguchi S, Takashi TA. Isolation and characterization of mesenchymal progenitor cells from chorionic villi of human placenta. *Cytotherapy.* **6 (6)**, 543- 553 (2004)

Ji Y, Walkowicz MJ, Buiting K, Johnson DK, Tarvin RE, Rinchik EM, Horsthemke B, Stubbs L, Nicholls RD. The ancestral gene for transcribed, low-copy repeats in Prader-Willi/Angelman regions encodes a large protein implicated in protein trafficking, which is deficient in mice with neuromuscular and spermiogenic abnormalities. *Hum Mol Genet* **3**: 533-542, 1999.

Ji Y, Rebert NA, Joslin JM, Higgins MJ, Schultz RA, Nicholls RD. Structure of the highly conserved HERC2 gene and of multiple partially duplicated paralogs in human. *Genome Res.* **10(3)**, 319-329 (2000)

Jiang J, Lv Z, Jiang Z, Gu Y, Li J, Xu L, XU W, Lu J, Xu J. Adult rat mesenchymal stem cells differentiate into neuronal-like phenotype and express a variety of neuro-regulatory molecules *in vitro*. *Neurosci. Res.* DOI: 10.1016/j.neures.2009.09.1711

Johnstone KA, DuBose AJ, Futtner CR, Elmore MD, Brannan CI, Resnick JL. A human imprinting centre demonstrates conserved acquisition but diverged

maintenance of imprinting in a mouse model for Angelman syndrome imprinting defects. *Hum. Mol. Genet.* **15:3**, 393-404 (2006)

Kassem M. Mesenchymal Stem cells: Biological characteristics and potential clinical applications. *Cloning and stem cells.* **6(4)**: 369-374.

Kerkis I, Kerkis A, Dozortsev D, Stukart-Parsons GC, Massironi SMG, Pereira LV, Caplan AI, Cerruti HF. *Cell Tissue Organs.* **184**, 105-116 (2006)

Király M, Porcsalmy B, Pataki A, Kádár K, Jelítai M, Molnár B, Hermann P, Gera I, Grimm WD, Ganss B, Zsembery A, Varga G. Simultaneous PKC and cAMP activation induces differentiation of human dental pulp stem cells into functionally active neurons. *Neurochem Int.* **55:5**, 323-332 (2009)

Király M, Kádár K, Horváthy DB, Nardai P, Rácz GZ, Lacza Z, Varga G, Gerber G. Integration of neuronally predifferentiated human dental pulp stem cells into rat brain in vivo. *Neurochem Int.* (2011)

Kishino T, Lalande M, Wagstaff J. UBE3A/E6AP mutations cause Angelman syndrome. *Nature Genet* **15**, 70-73 (1997)

Knoll JHM, Nicholls RD, Magenis RE, Grajam Jr JM, Lalande M, Latt SA. Angelman and Prader-Willi syndromes share a common chromosome 15 deletion but differ in parental origin of the deletion. *Am J Med Genet* **32**, 285-290 (1989)

Lalande M, Calciano MA. Molecular epigenetics of Angelman syndrome. *Cell Mol Life Sci.* **64:7-9**, 947-960 (2007)

Lee MW, Choi J, Yang MS, Moon YJ, Park JS, Kim HC, Kim YJ. Mesenchymal stem cells from cryopreserved human umbilical cord blood. *Biochem Biophys Res Commun.* **320(1)**:273-278 (2004)

Leung KN, Vallero RO, DuBose AJ, Resnick JL, LaSalle JM. Imprinting regulates mammalian snoRNA-encoding chromatin decondensation and neuronal nucleolar size. *Hum Molec Gen.* **18:22**, 4227-4238 (2009)

- Li L, Li Z, Howley PM, Sacks DB. E6AP and calmodulin reciprocally regulate estrogen receptor stability. *J Biol Chem.* **281**(4), 1978-85. (2006)
- Lu P, Blesch A, Tuszynski MH. Induction of bone marrow stromal cells to neurons: differentiation, transdifferentiation, or artifact? *J Neurosci Res.* **77**(2), 174-91. (2004)
- Magenis RE, Toth-Fejel S, Allen LJ, Black M, Brown MG, Budden S, Cohen R, Friedman JM, Kalousek D, Zonana J, Lacy D, LaFranchi S, Lahr M, Macfarlane J, Williams CPS. Comparison of the 15q deletions in Prader-Willi and Angelman syndromes: specific regions, extent of deletions, parental origin, and clinical consequences. *Am J Med Genet* **35**, 333-349 (1990)
- Mardirossian S, Rampon C, Salvert D, Fort P, Sarda N. Impaired hippocampal plasticity and altered neurogenesis in adult *Ube3a* maternal deficient mouse model for Angelman syndrome. *Exper Neurol.* **220**, 341-348 (2009)
- Margolis SS, Salogiannis J, Lipton DM, Mandel-Brem C, Wills ZP, Mardinly AR, Hu L, Greer PL, Bikoff JB, Ho HYH, Soskis MJ, Sahin M. EphB-mediated degradation of the RhoA GEF ephexin5 relieves a developmental brake on excitatory synapse formation. *Cell.* **143**, 442-455 (2010)
- Mascari MJ, Gottlieb W, Rogan PK, Butler MG, Waller DA, Armour JAL, Jaffreys AJ, Ladda RL, Nicholls RD. The frequency of uniparental disomy in Prader-Willi syndrome. *N Engl J Med* **326**, 599-607 (1992)
- Matentzoglou K, Scheffner M. Ubiquitin ligase E6-AP and its role in human disease. *Biochem. Soc. Trans.* **36**, 797-801 (2008)
- Mishra A, Jana NR. Regulation of turnover of tumor suppressor p53 and cell growth by E6-AP, a ubiquitin protein ligase mutated in Angelman mental retardation syndrome. *Cell. Mol. Life Sci.* **65**, 656-666 (2008)
- 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.* **100**, 5807-5812 (2003)

Meng X, Ichim TE, Zhong J, Rogers A, Yin Z, Jackson J, Wang H, Ge W, Bogin V, Chan KW, Thébaud B, Riordan NH. Endometrial regenerative cells: a novel stem cell population. *J Transl Med.* **5**, 57 (2007)

Nicholls RD. Genomic imprinting and uniparental disomy in Angelman and Prader-Willi syndromes: A review. *Am J Med Genet* **46B**, 16-25 (1993)

Nawaz Z, Lonard DM, Smith CL, Lev-Lehman E, Tsai SY, Tsai MJ, O'Malley B. The Angelman syndrome-associated protein, E6-AP, is a coactivator for the nuclear hormone receptor superfamily. *Molec Cell Biol.* **19(2)**, 1182-1189 (1999)

Nicholls RD, Saitoh S, Horsthemke B. Imprinting in Prader-Willi and Angelman syndromes. *TIG* **14**, 194-200 (1998)

Nosrat IV, Widenfalk J, Olson L, Nosrat CA. Dental pulp cells produce neurotrophic factors, interact with trigeminal neurons in vitro, and rescue motoneurons after spinal cord injury. *Devel. Biol.* **238**, 120-132 (2001)

Nosrat IV, Smith CA, Mullally P, Olson L, Nosrat CA. Dental pulp cells provide neurotrophic support for dopaminergic neurons and differentiate into neurons in vitro; implication for tissue engineering and repair in the nervous system. *Eur. J. Neurosci.* **19**, 2388-2398 (2004)

Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature.* **448**, 313-318 (2007)

Patel AN, Park E, Kuzman M, Benetti F, Silva FJ, Allickson JG. Multipotent menstrual blood stromal stem cells: isolation, characterization, and differentiation. *Cell Transplant.* **17(3)**, 303-11 (2008)

Patel M, Smith AJ, Sloan AJ, Smith G, Cooper. Phenotype and behavior of dental pulp cells during expansion culture. *Archives of Oral Bio.* **54**, 898-908 (2009)

Perk J, Makedonski K, Lande L, Cedar H, Razin A, Shemer R. The imprinting mechanism of the Prader-Willi/Angelman region control center. *EMBO journal* **21**, 5807-5814 (2002)

Petersen BE, Bowen WC, Patrene KD, Mars WM, Sullivan AK, Murase N, Boggs SS, Greenberger JS, Goff JP. *Science* **284**, 1168-1170 (1999)

Roloff TC, Nuber UA. Chromatin, epigenetics and stem cells. *Eur. J Cell Biol.* **84**, 123-135 (2005)

Rougeulle C, Cardoso C, Fontés M, Colleaux L, Lalande M. *Nat. Genet.* **19 (1)**, 15-16 (1998)

Runte M., Hüttenhofer A, Groß S, Kiefmann M, Horsthemke, Buiting K. The IC-*SNURF-SNRPN* transcript serves as a host for multiple small nucleolar RNA species and as an antisense RNA for *UBE3A*. *Hum. Molec. Genet.* **10 (23)**, 2687-2700 (2001)

Runte M, Kroisel PM, Gillessen-Kaesbach G, Varon R, Horn D, Cohen MY, Wagstaff J, Horsthemke B, Buiting K. *SNURF-SNRPN* and *UBE3A* transcript levels in patients with Angelman syndrome. *Hum. Genet.* **114**, 553-561 (2004)

Ryu JS, Ko K, Lee JW, Park SB, Byun SJ, Jeong EJ, Ko K, Choo YK. Gangliosides are involved in neural differentiation of human dental pulp-derived stem cells. *Biochem Biophys Res Commun.* DOI: 10.1016/ibbrc 2009 07 005

Sadan O, Shemesh N, Cohen Y, Melamed E, Offen D. Adult neurotrophic factor-secreting stem cells: a potential novel therapy for neurodegenerative diseases. *IMAJ.* **11**. 201-204 (2009)

Sahoo T, del Gaudio D, German JR, Shinawi M, Peters SU, Person RE, Garnica A, Cheung SW, Beaudet AL. Prader-Willi phenotype caused by paternal deficiency for the HBII-85 C/D box small nucleolar RNA cluster. *Nat. Genet.* **40(6)**, 719-721 (2008)

Scheffner M, Nuber U, Huibregtse JM. Protein ubiquitination involving an E1-E2-E3 enzyme ubiquitin thioester cascade. *Nature.* **373**, 81-83 (1995)

Scheiffele P, Beg AA. Neuroscience: Angelman syndrome connections. *Nature.* **468(7326)**, 907-908 (2010)

- Shi S, Robey PG, Gronthos S. Comparison of human dental pulp and bone marrow stromal stem cells by cDNA microarray analysis. *Bone*. **29**:6, 532-539 (2001)
- Siegel GJ, Agranoff BW, Alberts RW, Fisher SK, Uhler MD. Basic Neurochemistry: molecular, cellular and medical aspects. Ed. 6. Chapter 15 (2005)
- Smith A. A glossary for stem-cell biology. *Nature*. **441**, 1060. (2006)
- Sommer CA, Mostoslavsky G. Experimental approaches for the generation of induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Res Therapy*. **1**:26 (2010)
- Sonoyama W, Liu Y, Fang D, Yamaza T, Seo BM, Zhang C, Liu H, Gronthos S, Wang CY, Shi S, Wang S. Mesenchymal stem cell-mediated functional tooth regeneration in Swine. *PLoS* **1**. **79** (2006)
- Sonoyama W, Liu Y, Yamaza T, Tuan RS, Wang S, Shi S, Huang GT. Characterization of the apical papilla and its residing stem cells from human immature permanent teeth: a pilot study. *J Endod*. **34**, 166-171 (2008)
- Stevens A, Zuliani T, Olejnik C, LeRoy H, Obriot H, Kerr-Conte J, Formstecher P, Bailliez Y, Polakowska RR. Human dental pulp stem cells differentiate into neural crest-derived melanocytes and have label-retaining and sphere-forming abilities. *Stem Cells and Devolp*. **17**, 1175-1184 (2008)
- Tai HC, Schuman EM. Angleman syndrome: finding the lost arc. *Cell*. **140**, 608-610 (2010)
- Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* **126**, 663-676 (2006)
- Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*. **131**, 861-872 (2007)

Tucker A, Sharpe P. The cutting-edge of mammalian development; how the embryo makes teeth. *Nat Rev Genet.* **5(7)**, 499-508. Review. (2004)

Ulloa-Montoya F, Verfaillie CM, Hu WS. Culture systems for pluripotent stem cells. *J Biosci. Bioeng.* **100**, 12-27 (2005)

Varela MC, Kok F, Otto PA, Koiffmann CP. Phenotypic variability in Angelman syndrome: comparison among different deletion classes and between deletion and UPD subjects. *Eur J Hum Genet* 12: 987-992 (2004).

Varela MC, Kok F, Setian N, Kim CA, Koiffmann CP. Impact of molecular mechanism, including deletion size, in Prader-Willi syndrome phenotype: study of 75 patients. *Clin Genet*, 67:47-52 (2005).

Vu TH, Hoffmann AR. Imprinting of the Angelman syndrome gene, UBE3A, is restricted to brain. *Nat Genet.* **17**:1, 12-13 (1997)

Waddington RJ, Youde SJ, Lee CP, Sloan AJ. Isolation of distinct progenitor stem cell populations from dental pulp. *Cell Tissues Organs.* **189**, 269-274 (2008)

Watt FM, Hogan BL. Out of Eden: stem cells and their niches. *Science* **287(5457)**: 1427-1430 (2000).

Weeber EJ, Jiang YH, Elgersma Y, Varga AW, Carrasquillo Y, Brown SE, Christian JM, Mirnikjoo B, Silva A, Beaudet AL, Sweatt JD. Derangements of hippocampal calcium/calmodulin-dependent protein kinase II in a mouse model for Angelman mental retardation syndrome. *J. Neurosci.* **23(7)**, 2634-2644 (2003)

Williams CA, Beaudet AL, Smith JC, Knoll JH, Kyllerman M, Laan LA, Magenis RE, Moncla A, Schinzel AA, Summers JA, Wagstaff J. Angelman syndrome 2005: updated consensus for diagnostic criteria. *Am J Med Genet* **140A**, 413-418 (2006)

Williams CA. The behavioral phenotype of the Angelman syndrome. *Am J Med Gen.* **154C**, 432-427 (2010)

Woerden GMV, Harris KD, Hojjati MR, Gustin RM, Qiu S, de Avila Freire R, Jiang YH, Elgersma Y, Weeber EJ. Rescue of neurological deficits in a mouse model for angelman syndrome by reduction of α CaMKII inhibitory phosphorylation. *Nature Neurosci.* **10(3)**, 280-282 (2007)

Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng.* **7(2)**, 211-28 (2001)

Yamasaki K, Joh K, Ohta T, Masuzaki H, Ishimaru T, Mukai T, Niikawa N, Ogawa M, Wagstaff J, Kishino T. *Hum. Molec. Genet.* **12(8)**, 837-847 (2003)

Yang X, Ahang W, Bolder JVD, Walboomers XF, Bian Z, Fan M, Jansen JA. Multilineage potential of STRO-1⁺ rat dental pulp cells *in vitro*. *J Tissue Eng Regen Med.* **1**, 128-135 (2007)

Yashiro K, Riday TT, Condon KH, Roberts AC, Bernardo DR, Prakash R, Weinberg RJ, Ehlers MD, Philpot BD. Ube3a is required for experience-dependent maturation of the neocortex. *Nat Neuro.* DOI:10.1038/nn.2327 (2009)

Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, Nie J, Jonsdottir GA, Ruotti V, Stewart R, Slukvin II, Thomson JA. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science.* **318**, 1917-1920 (2007)

Yu M, Xiao Z, Shen L, Li L. Mid-trimester fetal blood-derived adherent cells share characteristics similar to mesenchymal stem cells but full-term umbilical cord blood does not. *Br J Haematol.* **124(5)**, 666-75 (2004)