**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA**

**Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas
(Bioquímica)**

MARLUCE DA CUNHA MANTOVANI

**Efeito da Variação do Oxigênio sobre o Perfil
Transcricional de Ilhotas Pancreáticas Humanas
em Cultura**

São Paulo

Data do Depósito na SPG:
18/12/2006

MARLUCE DA CUNHA MANTOVANI

**Efeito da Variação do Oxigênio sobre o Perfil
Transcricional de Ilhotas Pancreáticas Humanas
em Cultura**

Dissertação apresentada ao Instituto de Química
da Universidade de São Paulo para obtenção do
Título de Mestre em Ciências (Bioquímica)

Orientador: Prof. Dr. Hamza EL-Dorry

São Paulo
2007

Marluce da Cunha Mantovani

Efeito da Variação do Oxigênio sobre o Perfil Transcricional de Ilhotas Pancreáticas Humanas em Cultura.

Dissertação apresentada ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Mestre em Ciências (Bioquímica).

Aprovado em: _____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Aos meus inestimáveis pais Sylvia e Marcílio

Aos meus amados irmãos Marco e Mariana

Aos meus sábios avós Elza e Sylvio (In memoriam)

À minha tia e madrinha Tânia

Ao meu querido Adriano

Feche os seus lindos olhos e escute bem o que eu vou lhe dizer

O que sou, o que tenho, e o que faço na vida, eu dedico a você

Meu sorriso, meu pranto, meus versos, meu canto, minha grande paixão

Meus abraços, meus beijos, e o meu coração, eu dedico a você

Eu dedico a você

Meu sorriso, meu pranto, meus versos, meu canto, minha grande paixão

Meus abraços, meus beijos, e o meu coração, eu dedico a você

Eu dedico a você

Mesmo estando sozinho, sem ter seu carinho, eu não vou lhe esquecer

Pois o que sou, o que tenho, e o que faço na vida, eu dedico a você

Eu dedico a você

Eu dedico a você

(Eu dedico a você - Zé Geraldo)

AGRADECIMENTOS

Muitas pessoas, amigos e colegas participaram de alguma forma na elaboração deste trabalho, seja diretamente ou mesmo somente com palavras de incentivo. Gostaria de poder citar todos aqui, mas a gratidão sentida compensa o lapso. De qualquer forma a algumas devo minhas considerações especiais:

- Ao Prof. Dr. Hamza El-Dorry, por me acolher em seu laboratório e me deixar amadurecer, sempre com muito respeito, carinho e acima de tudo paciência.
- Ao Prof. Dr. Carlos Augusto Pereira e toda sua equipe, principalmente ao aluno de mestrado Mateus M. Conceição, por me apresentar novos rumos e novas maneiras de trabalhar.
- À Profa. Dra. Mari Cleide Sogayar pela sua supervisão, e toda sua equipe, principalmente às técnicas Patrícia Barros dos Santos e Renata Cristina Ferreira, à aluna de doutorado Luciana Oliveira Cruz e ao pós-doutorando Humberto Miguel G. Malpartida, pelo apoio, inspiração e exemplo de generosidade no trabalho científico.
- Ao Prof. Dr. João Pedro Simon Farah, por toda dedicação em me ensinar um pouco da arte de torturar os números.
- Ao laboratório CAGE, especialmente às técnicas Adriana Matsukuma e Denise Yamamoto, pela pronta ajuda sempre que necessária.
- Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro concedido durante a realização deste trabalho no Instituto de Química da Universidade de São Paulo.

- A todos os amigos de laboratório, pelo auxílio e apoio constantes: Augusto Ramos, César Camilo, Eric Bonaccorsi, Estela Ynés Valencia, Fabiana Diniz, Felipe Chambergo, Nathalie Cella e Thaís Campos de Oliveira.
- Ao amigo Wilton Rocha, por todo seu auxílio nos experimentos, pela sua amizade, pelo apoio e por todas as boas risadas.
- Aos amigos Erik Saenz e Charlotte Borda pela amizade e pelo auxílio e incentivo antes, durante e depois deste trabalho.
- Ao amigo Ari Ferreira, pela amizade e pela clareza de idéias, absolutamente indispensável quando sempre tudo parecia perdido.
- Aos amigos do laboratório Bioquímico, Antonio Marcos, Danielle, Lílian, Raquel, Selma e Vera pelo apoio e ajuda constantes em durante todos os momentos difíceis.
- Às amigas de coração Tatiana Correa e Zizi de Mendonça, pela amizade, pelo apoio e por me ensinarem, tão carinhosamente, a trilhar o caminho das pedras.
- À Zilda, minha mãe-emprestada, pela presença, pelo apoio e pela dedicação, simplesmente incomparáveis.
- Aos meus pais Sylvia e Marcílio, aos meus irmãos Marco e Mariana, aos meus avós Elza e Sylvio (*in memoriam*), a minha tia Tânia, pelo incentivo e apoio em todas as etapas de minha vida.
- Ao Adriano, por estar sempre ao meu lado nos bons e maus momentos.
- A Deus, por Sua infinita bondade, pelas chances que temos de aprender, de ensinar, de viver...

*É apenas com o coração que se pode ver direito; o essencial é invisível
aos olhos.*

(Antoine de Saint-Exupéry)

*O primeiro passo para conseguirmos o que queremos na vida é
decidirmos o que queremos.*

(Ben Stein)

*"É muito melhor arriscar coisas grandiosas, alcançar triunfo e glória,
mesmo expondo-se à derrota, do que formar fila com os pobres de
espírito, que nem fazem muito nem sofrem muito, porque vivem nessa
penumbra cinzenta que não conhece vitória nem derrota"*

(Theodore Roosevelt)

RESUMO

Mantovani, M.C. **Efeito da Variação do Oxigênio sobre o Perfil Transcricional de Ilhotas Pancreáticas Humanas em Cultura**. 2006. 131p. Dissertação de Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Glicose e oxigênio desempenham um importante papel na regulação do metabolismo celular. Dada a importância de ambos no metabolismo - o primeiro como fonte de carbono preferencial da maior parte das células, e o segundo como aceptor final de elétrons na cadeia respiratória, em diversos organismos desenvolveram-se métodos adequados para detectar sua presença de modo a ajustar o metabolismo em função de sua disponibilidade. Neste trabalho foi realizado o estudo da expressão, no nível transcricional, dos genes envolvidos nas vias metabólicas primárias e genes envolvidos em morte celular, em células humanas, com o intuito de determinar as alterações no metabolismo energético em resposta a condições de hipóxia e anóxia, por meio da técnica de *microarrays* de cDNA. Utilizamos, inicialmente, células normais de fibroblasto humano AS198 e células de fibroblasto humano MRC-5 imortalizadas por transfecção por SV40, e por fim células provenientes de ilhotas pancreáticas humanas, para a elaboração de um protocolo de cultura celular em que as mesmas crescessem aderidas a microcarregadores Cytodex 1. Numa segunda etapa, células de ilhotas pancreáticas humanas foram cultivadas em suspensão, aderidas aos microcarregadores, num biorreator, sendo então realizada a análise do perfil transcricional dos genes escolhidos, frente às condições de baixa tensão de oxigênio. É apresentada a análise da expressão gênica de aproximadamente 160 genes na qual foram verificados um comportamento de indução daqueles envolvidos no metabolismo de lipídios e alguns na morte celular e um comportamento inicial de indução, e posterior inibição, do

metabolismo primário como um todo. Em vista dos dados obtidos é de interesse ressaltar que essas células deveriam ser mantidas em saturações de oxigênio acima de 5% para evitar o efeito deletério observado na baixa concentração de oxigênio sobre a viabilidade celular, em termos da indução de alguns genes envolvidos na morte celular e da repressão geral dos relacionados ao metabolismo energético. Também foi verificado que, em saturações de oxigênio de até 10%, as células adotaram um padrão transcricional que indicou uma resposta ao estresse por falta de oxigênio, este por sua vez reflete-se na viabilidade celular, característica crucial para o sucesso do transplante clínico de ilhotas.

Palavras-chave: anóxia, hipóxia, metabolismo, ilhotas pancreáticas, biorreator, microcarregadores.

ABSTRACT

Mantovani, M.C. **Effect of Oxygen Concentration Variation on the Transcriptional Profile of Cultured Human Pancreatic Islets**. 2006. 131p. Masters Dissertation - Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Glucose and oxygen have important roles on the regulation of cellular metabolism. Due to their importance in metabolism, the former as the preferential carbon source and the later as the final electron acceptor of the respiratory chain, many organisms have developed suitable processes to detect their presence in order to adjust the cellular metabolism to their availability. In this work, we have studied, in human cells and at the transcriptional level, the expression of genes involved in primary metabolism pathways and some of those related to cell death, aiming to resolve alterations in the energetic metabolism as a response to hypoxic and anoxic conditions, by means of cDNA microarrays. We initially used AS198 human fibroblastic normal cells and MRC-5 human fibroblastic cells immortalized by SV40, and later on cells from human pancreatic islets, to develop a cell culture protocol in which they would grow on the surface of Cytodex 1 microcarriers. As a second step, cells from human pancreatic islets were cultured on microcarriers in suspension inside a bioreactor. This culture was then used to carry out the transcriptional profile analysis of selected genes in response to low levels of oxygen. This work presents the analysis of gene expression of approximately 160 genes that can be divided into two distinct groups. The first group, the expression of which is induced, comprises genes involved in lipid metabolism and some of those related to cell death. The expression of the second group, consisting of diverse genes of the primary metabolism, suffers an initial induction followed by repression. Given the data acquired it is interesting to note that the human pancreatic

islets should be maintained under at least 5% dissolved oxygen to avoid the deleterious effects on cell viability observed at lower oxygen concentrations, resulting in the induction of some genes involved in cell death and the repression of those related to energetic metabolism. It was also verified that, under oxygen saturation of at least 10%, these cells adopted a transcriptional profile that indicated a response to the stress created by the lack of oxygen, which would in turn reflect on cell viability, a crucial characteristic for success in clinical islet transplantation.

Keywords: anoxia, hypoxia, metabolism, pancreatic islet, bioreactor, microcarriers.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA	Página
Figura 1 - Ativação de SREBP por clivagem proteolítica.	32
Figura 2 - Composição do meio de cultura DULBECCO MEM (DMEM).	43
Figura 3 - Composição do meio de cultura CMRL 1066.	44
Figura 4 – Frascos com células em crescimento em estufa de CO ₂ , 37°C.	46
Figura 5 - Células AS198 em cultura em garrafa.	46
Figura 6 - Células MRC-5 em cultura em garrafa.	46
Figura 7 - Células de Ilhotas pancreáticas em cultura em garrafa.	47
Figura 8 – Características dos microcarregadores Cytodex 1.	47
Figura 9 – Frascos <i>spinners</i> e aparelhagem de cultivo celular em estufa de CO ₂ , 37°C.	49
Figura 10 – Componentes da dorna de 1,5L do Biorreator Celligen Cell Culture System (NBS).	51
Figura 11 – Biorreator Celligen Cell Culture System (NBS).	51
Figura 12 – Visualização dos núcleos livres corados em Câmara de Neubauer	52
Figura 13 – Visualização de células aderidas aos microcarregadores corados com azul de Trypan.	53
Figura 14 – Reações envolvidas na dosagem de glicose e lactato realizadas no aparelho YSI 2700 Select (Yellow Springs Instruments).	54
Figura 15 – Eletroforese em gel de agarose para verificação da qualidade das amplificações dos cDNAs para impressão nas lâminas de <i>microarray</i> .	59
Figura 16 – Gráfico indicando Coeficiente de Variação versus intensidade de média de fluorescência, onde pontos estatisticamente não-confiáveis foram marcados.	66

Figura 17 – Gráfico indicando a aplicação do método LOWESS.	68
Figura 18 – Gráfico indicando a aplicação do método LOWESS após a alteração das médias de intensidade de fluorescências dos genes aos genes que apresentaram valores extremos de intensidade de fluorescência e expressão muito induzida ou muito reprimida.	68
Figura 19 – Curva de crescimento obtida para as células AS198 cultivadas em microcarregadores no sistema de frascos <i>spinners</i> na melhor condição estabelecida.	72
Figura 20 – Curva de crescimento obtida para as células MRC-5 cultivadas em microcarregadores no sistema de frascos <i>spinners</i> na melhor condição estabelecida.	73
Figura 21 – Curva de crescimento obtida para as células de Ilhotas Pancreáticas cultivadas em microcarregadores no sistema de frascos <i>spinners</i> na melhor condição estabelecida.	74
Figura 22 – Curva de crescimento obtida para as células MRC-5 cultivadas em microcarregadores no sistema de biorreator.	75
Figura 23 – Lâminas de <i>Microarray</i> hibridizadas após as leituras realizadas no <i>scanner</i> Generation III DNA Scanner.	77 78
Figura 24 – Comportamento transcricional de genes envolvidos nas vias glicolítica e da gliconeogênese, metabolismo do glicogênio e metabolismo do piruvato, das células de ilhotas pancreáticas do primeiro <i>microarray</i> realizado nas diferentes condições de concentração de oxigênio.	80
Figura 25 – Comportamento transcricional de genes envolvidos na via das pentoses-fosfato, no ciclo dos ácidos tricarboxílicos e na fosforilação oxidativa, das células de ilhotas pancreáticas do primeiro <i>microarray</i> realizado nas diferentes condições de concentração de oxigênio.	81
Figura 26 – Comportamento transcricional de genes envolvidos no metabolismo de lipídios e na morte celular das células de ilhotas pancreáticas do primeiro <i>microarray</i> realizado nas diferentes condições de concentração de oxigênio.	82
Figura 27 – Eletroforese em gel de agarose de reações de polimerização em cadeia utilizando-se transcriptase reversa para verificação do comportamento transcricional de alguns genes das células de ilhotas pancreáticas nas diferentes condições de concentração de oxigênio.	83
Figura 28 – Formação de grumos entre as células e os microcarregadores após 120 horas de cultivo.	85

Figura 29 – Comportamento transcricional de genes do metabolismo energético de células de ilhotas pancreáticas do primeiro <i>microarray</i> nas condições de Hipóxia.	89
Figura 30 – Comportamento transcricional de genes do metabolismo energético de células de ilhotas pancreáticas do primeiro <i>microarray</i> na condição de Anóxia.	90

LISTA DE TABELAS

TABELA	Página
Tabela 1 - Transcritos dos genes estudados.	101
Tabela 2 - Pares de oligonucleotídeos sintetizados.	108
Tabela 3 - Disposição das sondas impressas na Lâmina de <i>Microarray</i> (um lado da lâmina).	114
Tabela 4 - Resposta transcricional dos genes pertencentes a fosforilação oxidativa às diferentes concentrações de oxigênio.	122
Tabela 5 - Resposta transcricional dos genes relacionados a defesa celular, sinalização e apoptose às diferentes concentrações de oxigênio.	123
Tabela 6 - Resposta transcricional dos genes pertencentes ao metabolismo de glicogênio às diferentes concentrações de oxigênio.	124
Tabela 7 - Resposta transcricional dos genes pertencentes às vias da glicólise e da gliconeoênese às diferentes concentrações de oxigênio.	125
Tabela 8 - Resposta transcricional dos genes pertencentes ao metabolismo de lipídeos às diferentes concentrações de oxigênio.	126
Tabela 9 - Resposta transcricional dos genes pertencentes à via das pentoses-fosfato às diferentes concentrações de oxigênio.	128
Tabela 10 - Resposta transcricional dos genes pertencentes ao metabolismo de piruvato às diferentes concentrações de oxigênio.	129
Tabela 11 - Resposta transcricional dos genes pertencentes ao ciclo dos ácidos tricarboxílicos às diferentes concentrações de oxigênio.	130

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A20	Homo sapiens fator de necrose tumoral, proteína 3 a-induzida
AACS	Homo sapiens acetoacetil-coA sintase
ABCG5	Homo sapiens cassete de ligação do ATP, sub-família G, membro 5
ABCG8	Homo sapiens cassete de ligação do ATP, sub-família G, membro 8
ACAA2	Homo sapiens acetil-coA aciltransferase 2
ACACA	Homo sapiens acetil coA carboxilase a
ACADL	Homo sapiens acil-coA dehidrogenase cadeia longa
ACADM	Homo sapiens acil-coA dehidrogenase, cadeia em linha reta C4 – C12
ACADS	Homo sapiens acil-coA dehidrogenase, cadeia curta C2 - C3
ACAS2	Homo sapiens acil coenzima A sintetase cadeia curta membro 2
ACAT1	Homo sapiens acetil coA acetiltransferase 1
ACLY	Homo sapiens ATP citrato liase, variante 1
ACO1	Homo sapiens aconitase 1 (solúvel)
ACO2	Homo sapiens aconitase 2 (mitocondrial)
ACOX1	Homo sapiens acil-coA oxidase 1, variante 1
ACSL1	Homo sapiens acil-CoA sintetase cadeia longa membro 1
ACSL3	Homo sapiens acil-coA sintetase de cadeia longa, membro 3, variante 1
ACSL5	Homo sapiens acil-coA sintetase de cadeia longa, membro 5, variante 1
ADH1A	Homo sapiens álcool desidrogenase 1, polipeptídeo alfa
AGL	Homo sapiens amilo-1,6 glucosidase, 4 alfa glucanotransferase, variante 1
AKR1A1	Homo sapiens aldocetoreductase família 1, membro A1
ALDH1A1	Homo sapiens aldeído desidrogenase 1
ALDOA	Homo sapiens Aldolase A, frutose bifosfatase, variante 1
ALDOB	Homo sapiens Aldolase B, frutose bifosfatase
ALDOC	Homo sapiens Aldolase C, frutose bifosfatase
AMP	Adenosina monofosfato
AP-1	Proteína ativadora-1
ARG2	Homo sapiens arginase tipo II
AS198	Células de fibroblasto humano de cultura primária
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosina trifosfato
BAX	Homo sapiens proteína X associada a BCL2
BCL-2	Homo sapiens célula-B CLL/linfoma 2, variante a
CASP1	Homo sapiens caspase 1
CASP3	Homo sapiens caspase 3
cDNA	DNA complementar
CMRL 1066	Meio de cultura desenvolvido no Connaugh Medical Research Laboratories
CO2	Gás carbônico molecular
COX4I1	Homo sapiens citocromo c oxidase subunidade IV, isoforma 1
COX4I2	Homo sapiens citocromo c oxidase subunidade IV, isoforma 2
CPT1A	Homo sapiens carnitina palmitoiltransferase 1A
CREB	Proteína que se liga ao elemento de resposta de AMP
CS	Homo sapiens citrato sintase, variante 1
CV	Coefficiente de variação
CYC1	Homo sapiens citocromo c-1
DEPC	Dietilpirocarbonato
DHCR7	Homo sapiens 7dehidrocolesterol reductase
DIABLO	Homo sapiens homólogo a diablo (Drosophila), variante 1
DLAT	Homo sapiens dihidrolipoamida S-acetiltransferase

DLD	Homo sapiens dihidrolipoamida desidrogenase
DLST	Homo sapiens diidrolipoamil S-succiniltransferase
DMEM	Meio de cultura modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
ECHS1	Homo sapiens enoil-coA hidratase, cadeia curta, 1
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EHHADH	Homo sapiens enoil-coA, hidratase/ 3-hidroxiacil Coenzima A desidrogenase
EIF4G2	Homo sapiens fator eucariótico iniciador da tradução 4 ?, 2
ENO1	Homo sapiens enolase 1
ERK-3	Homo sapiens proteína quinase 12 mitogen-activated (MAPK12)
FA2H	Homo sapiens ácidos graxos 2- hidroxilase
FADS5	Homo sapiens delta-5 ácido graxo desaturase
FADS6	Homo sapiens delta-6 ácido graxo desaturase
FAS	Homo sapiens superfamília receptor TNF, membro 6
FASL	Homo sapiens ligante de FAS
FBP1	Homo sapiens frutose 1,6bifosfatase 1
FBP2	Homo sapiens frutose 1,6bifosfatase 2
FDFT1	Homo sapiens squalene sintase
FDPS	Homo sapiens farnesil difosfato sintase
FH	Homo sapiens fumarato hidratase
G6PC	Homo sapiens glicose 6 fosfato, catalítica
G6PD	Homo sapiens glicose 6 fosfato desidrogenase
GAA	Homo sapiens glicosidase alfa
GAPD	Homo sapiens gliceraldeído 3 fosfato desidrogenase
GAS5	Homo sapiens growth arrest-specific 5
GAS6	Homo sapiens growth arrest-specific 6
GBE1	Homo sapiens glucan (1,4-alpha-), branching enzyme 1
GPAM	Homo sapiens glicerol-3-fosfato aciltransferase
GPI	Homo sapiens glicose fosfato isomerase
GPX1	Homo sapiens glutational peroxidase 1, variante 1
GSK3B	Homo sapiens glicogênio sintase quinase 3 beta
GYS2	Homo sapiens glicogênio sintase, fígado
H6PD	Homo sapiens hexose 6 fosfato desidrogenase
HIBADH	Homo sapiens hidroxibutirato desidrogenase
HIF-1	Fator induzido por hipóxia-1
HK1	Homo sapiens hexoquinase 1, variante 1
HMGCR	Homo sapiens HMG-coA redutase
HSCOAS	Homo sapiens HMG-coA sintase
HSD17B7	Homo sapiens 17-β-hidroxiesteroide desidrogenase-7
HSP 27	Homo sapiens proteína 1 de heat shock 27kDa
HSP 70	Homo sapiens proteína 4 de heat shock 70kDa, variante 1
HSPC105	Homo sapiens NAD(P) esteróide dependente desidrogenase-like
HUML14D	Homo sapiens lanosterol 14 a-demetilase
IDH2	Homo sapiens isocitrato desidrogenase 2 (mitochondrial)
IDH3A	Homo sapiens isocitrato desidrogenase 3 alfa
IDH3B	Homo sapiens isocitrato desidrogenase 3 beta, variante 1
IDH3G	Homo sapiens isocitrato desidrogenase 3 gama, variante 1
IDH1	Homo sapiens isopentenil-difosfato ? isomerase
IκBa	Homo sapiens conserved helix-loop-helix ubiquitous kinase
iNOS	Homo sapiens óxido nítrico sintase 2A, variante 1

INSIG1	Homo sapiens gene induzido por insulina 1, variante 1
JAK-2	Homo sapiens Janus quinase 2
kb	Kilo bases
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
LDHA	Homo sapiens lactato desidrogenase A
LDHB	Homo sapiens lactato desidrogenase B
LDHD1	Homo sapiens lactato desidrogenase D, variante 1
LDHD2	Homo sapiens lactato desidrogenase D, variante 2
LDLR	Homo sapiens receptor de lipoproteína de baixa densidade
LSS	Homo sapiens lanosterol sintase, variante 1
MAPKP2	Homo sapiens MAP quinase fosfatase 2
MCs	Microcarregadores
MDH1	Homo sapiens malato desidrogenase 1 (solúvel)
MDH2	Homo sapiens malato desidrogenase 2 (mitocondrial)
ME1	Homo sapiens enzima málica 1
ME2	Homo sapiens enzima málica 2
MnSOD	Homo sapiens superóxido dismutase 2, variante 1
MPTP	Poros de transição de permeabilidade mitocondrial
MRC-5	Células de fibroblasto humano de pulmão, transformadas por SV40
mRNA	RNA mensageiro
MVD	Homo sapiens mevalonato pirofosfato descarboxilase
MVK	Homo sapiens mevalonato quinase
N2	Nitrogênio molecular
NAD ou NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídio (oxidada ou reduzida)
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídio fosfato
NARC1	Homo sapiens proproteína convertase subtilisina/kexina tipo 9
NDUFA10	Homo sapiens NADH desidrogenase (ubiquinona) subcomplexo alfa 1, 10
NDUFA4	Homo sapiens NADH desidrogenase (ubiquinona) subcomplexo alfa 1, 4
NDUFA5	Homo sapiens NADH desidrogenase (ubiquinona) subcomplexo alfa 1, 5
NDUFA6	Homo sapiens NADH desidrogenase (ubiquinona) subcomplexo alfa 1, 6
NDUFA8	Homo sapiens NADH desidrogenase (ubiquinona) subcomplexo alfa 1, 8
NDUFA9	Homo sapiens NADH desidrogenase (ubiquinona) subcomplexo alfa 1, 9
NDUFB10	Homo sapiens NADH desidrogenase (ubiquinona) subcomplexo beta 1, 10
NDUFB5	Homo sapiens NADH desidrogenase (ubiquinona) subcomplexo beta 1, 5
NDUFB9	Homo sapiens NADH desidrogenase (ubiquinona) subcomplexo beta 1, 9
NDUFS1	Homo sapiens NADH desidrogenase (ubiquinona) Fe-S proteína 1
NFkB	Homo sapiens fator nuclear do polipeptídeo kappa light gene enhancer em células B 1
O2	Oxigênio molecular
OD	Oxigênio dissolvido
OGDH	Homo sapiens oxoglutarato desidrogenase
P38 MAPK	Homo sapiens proteína quinase 14 mitogen-activated (MAPK14), variante 1
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
PC	Homo sapiens piruvato carboxilase
PCK1	Homo sapiens fosfoenolpiruvato carboxiquinase
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PDHB	Homo sapiens piruvato desidrogenase beta
PFKFB1	Homo sapiens 6fosfofrutoquinase2/frutose2,6bifosfatase1
PFKL	Homo sapiens fosfofrutoquinase, fígado
PGAM1	Homo sapiens fosfoglicerato mutase 1
PGD	Homo sapiens fosfogluconato desidrogenase
PGK1	Homo sapiens fosfogliceratoquinase 1

PGLS	Homo sapiens 6 fosfogluconolactonase
PKLR	Homo sapiens piruvato quinase, variante 1
PLTP	Homo sapiens proteína de transferência de fosfolípidios, variante 1
PMVK	Homo sapiens fosfomevalonato quinase
pO2	Tensão de oxigênio
PRPS1	Homo sapiens fosforibosil pirofosfato sintetase 1
PYGL	Homo sapiens glicogênio fosforilase
RBKS	Homo sapiens riboquinase
RNA	Ácido ribonucléico
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RPIA	Homo sapiens ribose 5 fosfato isomerase A
RPM	Rotações por minuto
RT-PCR	Reação de polimerização em cadeia utilizando-se transcriptase reversa
SC4MOL	Homo sapiens esterol-C4-metil oxidase-like
SC5DL	Homo sapiens esterol-C5-desaturase
SCAP	Homo sapiens proteína de clivagem-ativação do SREBP
SCD	Homo sapiens esteroil-co-A desaturase
SDHA	Homo sapiens succinato desidrogenase subunidade A
SDHB	Homo sapiens succinato desidrogenase subunidade B
SDHC	Homo sapiens succinato desidrogenase subunidade C
SDHD	Homo sapiens succinato desidrogenase subunidade D
SDS	Dodecilsulfato de sódio
SOCS	Homo sapiens cytokine inducible SH2-containing protein (CISH)
SOM	Mapas auto-organiáveis
SQLE	Homo sapiens squalene epoxidase
SREBP1	Homo sapiens elemento esterol regulatório de ligação
SSC	Solução salina citratada
STARD4	Homo sapiens domínio START 4
SUCLA2	Homo sapiens succinil-coA ligase, formação de ADP, subunidade beta
SUCLG2	Homo sapiens succinil-coA ligase, formação de GDP, subunidade beta
SUR2	Homo sapiens cofator requerido para ativação transcricional de Sp1, subunidade 3, 130kDa,
SV40	Vírus símio 40
TALDO1	Homo sapiens transaldolase 1
TCA	Ciclo dos ácidos tricarboxílicos
TKT	Homo sapiens transacetolase
TPI1	Homo sapiens triose fosfato isomerase 1
UGP2	Homo sapiens UDP-glicose pirofosforilase 2
UQCR	Homo sapiens ubiquinol-citocromo C redutase
UQCRFS1	Homo sapiens ubiquinol-citocromo C redutase, Rieske iron-sulfur polypeptide 1
VEGF	Homo sapiens endothelial growth factor
XIAP	Homo sapiens baculoviral IAP repeat-containing 4 (BIRC4)

SUMÁRIO

I – INTRODUÇÃO.....	23
I.1 Respostas à variação do nível de oxigênio.....	23
I.2 Oxigênio e o metabolismo energético.....	27
I.3 Oxigênio e a via de indução de síntese de esteróis.....	30
I.4 Mitocôndria e a morte celular.....	33
I.5 Modelos celulares.....	35
I.5.1 Fibroblastos.....	35
I.5.2 Ilhotas pancreáticas.....	36
I.6 Biorreatores e microcarregadores.....	37
I.7 Método de análise de expressão genica diferencial.....	38
II. OBJETIVOS.....	41
III. MATERIAIS E METODOS.....	42
III.1 Modelos celulares.....	42
III.2 Condições de cultura e manutenção das linhagens celulares.....	42

III.3 Ensaios de cultura celular em diversas concentrações de oxigênio

dissolvido.....	43
III.3.1. Considerações gerais.....	45
III.3.2 Preparação dos microcarregadores (Mcs).....	45
III.3.3 Ensaio de cultura em <i>spinners</i>	48
III.3.4 Ensaio de cultura em biorreator.....	49
III.3.5 Contagem celular.....	51
III.3.6 Contagem de preenchimento de microcarregadores.....	52
III.3.7 Dosagem de glicose e lactato.....	52
III.4 Extração de RNA total.....	54
III.4.1 Extração de RNA total.....	54
III.4.2 Soluções utilizadas.....	55
III.5 Produção de lâminas de <i>microarrays</i> de genes humanos.....	56
III.5.1 Síntese de oligonucleotídeos.....	56
III.5.2 Confeção das lâminas de <i>microarrays</i> de DNA.....	57
III.5.3 Síntese e marcação dos cDNAs.....	60

III.5.3.1 Síntese de cDNA.....	60
III.5.3.2 Degradação do RNA (Hidrólise alcalina).....	61
III.5.3.3 Purificação de cDNA.....	61
III.5.3.4 Marcação de cDNA.....	62
III.5.3.5 Purificação de cDNA marcado fluorescentemente.....	62
III.5.3.6 Hibridização das lâminas de <i>microarray</i>	63
III.6 Extração e análise dos dados das hibridizações de <i>microarray</i>	64
III.6.1 Extração dos dados.....	64
III.6.2 Normalização e análise dos dados extraídos.....	65
III.7 Validação dos dados de <i>microarray</i>	69
IV. RESULTADOS.....	70
IV.1 Desenvolvimento da cultura de células em suspensão.....	71
IV.2 Estudo do nível de transcrição em resposta à limitação de oxigênio.....	76
V. DISCUSSÃO.....	84
V.1 Desenvolvimento da cultura de células em suspensão.....	84
V.2 Estudo do nível de transcrição em resposta à limitação de oxigênio.....	86

V.2.1 Metabolismo energético.....	87
V.2.2 Metabolismo de lipídeos / esteróis.....	91
V.2.3 Genes envolvidos em morte celular.....	91
VI. CONCLUSÕES e PERSPECTIVAS.....	93
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	95
APÊNDICE.....	100
SÚMULA CURRICULAR.....	131

I. INTRODUÇÃO.

Na Natureza há uma enorme variedade de organismos que ocupam diferentes estágios na escala evolutiva. Estes organismos podem diferir muito entre si com relação a aspectos morfológicos, fisiológicos e metabólicos, entre outros. Tais diferenças resultam das pressões evolutivas sofridas pelas espécies ao longo do tempo e revelam adaptações a distintas condições ambientais e nutricionais.

Mesmo com inúmeras diferenças, organismos evolutivamente distantes entre si também apresentam semelhanças. Certas características foram preservadas durante o desenvolvimento das diferentes espécies por representarem vantagens evolutivas e conferirem adequação às condições de vida das mesmas. Do ponto de vista bioquímico, um bom exemplo é o metabolismo de glicose em eucariotos. Componente básico de diversos açúcares complexos, a glicose representa o monossacarídeo mais abundante na natureza e fonte preferencial de carbono e energia para quase todos os organismos (Johnston, 1999; Vaulont *et al.*, 2000).

Outro exemplo de característica evolutiva conservada em termos metabólicos é a utilização do oxigênio molecular (O_2) comoceptor final de elétrons no catabolismo para obtenção de potenciais energéticos, na forma de ATP, e redutores, na forma de NADPH, para o anabolismo – o que se tornou conhecido como metabolismo aeróbico, ou respiração. O molecular é um substrato adequado a esse papel no metabolismo energético devido ao seu alto potencial de redução que garante grande conservação da energia contida em substratos reduzidos.

Louis Pasteur em 1860 mostrou que o oxigênio inibe a fermentação e que o consumo de glicose é inversamente proporcional à disponibilidade de oxigênio, mostrando que a glicólise é

positivamente regulada por hipóxia (baixa tensão de oxigênio), um efeito conhecido como “Efeito Pasteur”.

Muito conservada entre as espécies, a rede metabólica responsável pela produção de energia a partir da glicose é composta pela via glicolítica, vias alternativas do metabolismo de piruvato, ciclo dos ácidos tricarboxílicos (TCA ou ciclo de Krebs ou ciclo do ácido cítrico) e cadeia respiratória (compreendendo transporte de elétrons e fosforilação oxidativa). Ainda que esta rede tenha sido preservada ao longo da evolução, diferenças nas redes regulatórias que dirigem o fluxo de glicose por suas vias foram geradas entre as espécies por pressões seletivas (Pfeiffer *et al.*, 2001). Assim, a produção de energia na forma de ATP pode ocorrer tanto através do metabolismo aeróbico quanto do anaeróbico, conforme o destino das moléculas de piruvato originadas na glicólise, dependendo do organismo, tecido ou do estado metabólico da célula.

As inúmeras combinações de condições ambientais e nutricionais existentes devem ter imposto, em diferentes espécies e tecidos, seleção sobre qual o tipo de metabolismo (aeróbico ou anaeróbico) representaria maior vantagem para a sua sobrevivência e desenvolvimento. Sob este aspecto, glicose e oxigênio são importantes fatores cujas disponibilidades devem ser consideradas no estudo da regulação do metabolismo. Uma vez que ambos participam de pontos chave no metabolismo, desenvolveram-se nos organismos meios para detectar sua presença e abundância, para captá-los e para ajustar seu metabolismo em função de sua oferta (Johnston, 1999; Calhoun *et al.*, 1993; Fitton *et al.*, 1994; Poyton, 1999; Dagsgaard *et al.*, 2001). Estes mecanismos envolvem, por exemplo, sensores e transportadores de membrana, vias de sinalização intracelular, de regulação da expressão gênica e de controle hormonal.

Através das vias aeróbica e anaeróbica as células podem produzir ATP com velocidades e

rendimentos distintos. No catabolismo de qualquer substrato, parte da sua energia livre é conservada nas moléculas de ATP, enquanto outra parte é necessariamente consumida para “impulsionar” as reações envolvidas no processo. Quanto maior for a utilização desta energia para realizar o processo, maior a velocidade de produção, porém, menor é o rendimento energético na forma de ATP. Reações que consomem menor quantidade de energia contida no substrato ocorrem com menor velocidade, mas fornecem um alto rendimento na produção de ATP.

I.1 Respostas à variação do nível de oxigênio.

Microrganismos multicelulares e células de mamíferos metabolizam glicose preferencialmente através da respiração (Kelly *et al.*, 1990; Chambergo *et al.*, 2002). Em alguns casos, entretanto, quando a oferta de oxigênio não é suficiente para suprir a demanda por ATP através da respiração, a glicose pode ser utilizada por meio do metabolismo anaeróbico, resultando na redução de piruvato a lactato. Isso ocorre, por exemplo, com células musculares em exercício ou com células de determinados tipos de tumor (Pedersen *et al.*, 1999; Mazurek *et al.*, 1997; Dang & Semenza, 1999; Ziegler *et al.*, 2001; Cuezva *et al.*, 2002).

Já foi mencionada a importância de glicose e oxigênio no metabolismo no que se refere à localização destes compostos em pontos-chave da rede metabólica e como isto se reflete na necessidade que os organismos têm de possuir mecanismos eficientes para sentir a sua disponibilidade no meio extracelular e, em função disto, modular seu metabolismo. A importância em se entender como as células “sentem” e respondem às concentrações de oxigênio cresceu com o surgimento de evidências da relação de espécies reativas de oxigênio (ROS) com

doenças degenerativas e envelhecimento (Ames *et al.*, 1993; Shigenaga *et al.*, 1994; Irani *et al.*, 1997).

O oxigênio molecular (O_2) é um composto muito adequado ao papel que exerce no metabolismo de produção energética, uma vez que seu alto potencial de óxido-redução (potencial redox) garante grande conservação da energia contida em substratos reduzidos. Excetuando-se os organismos anaeróbios obrigatórios, os demais dependem de oxigênio para a produção de energia e reações biossintéticas e, ao mesmo tempo, devem se defender das ações danosas causadas por espécies reativas de oxigênio. Células, tecidos e organismos sentem quando oxigênio é limitante e respondem de forma adequada, sendo que a adaptação às alterações na concentração de oxigênio no ambiente depende de mudanças nos níveis de expressão de uma série de proteínas (Poyton, 1999).

Em mamíferos, a resposta à limitação de oxigênio vai desde alterações imediatas no metabolismo energético até a ativação de vias de controle da expressão gênica. No início da exposição a uma condição de hipóxia ou anóxia (baixa tensão e ausência de oxigênio, respectivamente), ocorre uma rápida mudança no metabolismo, de aeróbico para anaeróbico, e supressão de reações que consomem energia (Hochachka, *et al.*, 1996). Após exposição prolongada a baixas tensões de oxigênio, outro conjunto de adaptações se inicia, como por exemplo, alterações na expressão de genes envolvidos no transporte e metabolismo de glicose, entre outras, considerando-se que aproximadamente 1% do genoma é transcricionalmente induzido por estresses (Bunn & Poyton, 1996; Hochachka, *et al.*, 1996; Ratcliffe *et al.*, 1998; Le Quynh-Thu, *et al.*, 2004).

A resposta crítica a hipóxia deve-se a estabilização e ativação do fator de transcrição HIF-1 (*Hipoxia Inducible Factor 1*, Semenza, 1994), responsável pela expressão de vários genes hipóxicos, incluindo aqueles que codificam transportadores de glicose (Behrooz e Ismail-Beigi, 1999) e enzimas glicolíticas (Wenger, 2002; Semenza, 1998; Semenza, 1994). Outros fatores de transcrição como a proteína que se liga ao elemento de resposta de AMP (CREB), a proteína ativadora-1 (AP-1), o fator nuclear κ B (NF κ B) e a proteína Egr-1 (Webster, 2003) também estão envolvidos na alteração da expressão gênica induzida por hipóxia.

A tensão de oxigênio (pO_2) na atmosfera é de aproximadamente 150 mmHg, enquanto que a pO_2 normal de muitos tecidos está na faixa de 50-70 mmHg. Uma tensão de oxigênio menor que 40 mmHg (5% O_2) ativa a via de HIF-1, porém pequenas mudanças na fonte e demanda por oxigênio podem alterar o equilíbrio e promover a ativação de genes dependentes de hipóxia. A atividade HIF-1 foi descrita em células Hep3B de hepatoblastoma humano, células de ovário de hamster, fibroblastos Ltk-2 e mioblastos C₂C₁₂ de camundongo, fibroblastos Rat-1, células embrionárias 293 de rim humano e células HeLa de carcinoma cervical, mostrando que ao sinal de hipóxia leva a ativação de HIF-1 em diferentes tipos celulares (Semenza, 1994).

I.2 Oxigênio e o metabolismo energético.

Nos organismos aeróbicos enzimas que participam das vias que produzem energia têm evoluído juntamente com os mecanismos que sentem o oxigênio para equilibrar as mudanças nas concentrações de oxigênio.

Em condições normais de aeração, a fosforilação oxidativa é a fonte principal de energia em células eucarióticas multicelulares. Sob condições de hipóxia, entretanto, uma mudança metabólica desativa o transporte de elétrons na mitocôndria e ativa o metabolismo anaeróbico. Sem esta mudança, as células teriam um déficit imediato de energia e sofreriam danos por falta de ATP.

Um fato intrigante destas mudanças é que a mesma condição que regula o metabolismo energético também regula a expressão gênica, e que a atividade das enzimas e sua transcrição são reguladas simultaneamente, mas em diferentes momentos e por diferentes vias de sinalização. Genes que respondem a mudanças na disponibilidade de oxigênio podem ser divididos em duas categorias: genes aeróbicos, que são expressos em condições de normóxia, e genes hipóxicos, expressos em baixas concentrações de oxigênio (Kwast, 2002).

Um fato interessante é o que acontece no ácino hepático. Considerando-se a entrada de sangue, o ácino representa a menor unidade funcional do fígado, e se estende desde antes da área periportal a depois da área perivenosa. Devido ao metabolismo e eliminação, respectivamente, gradientes de concentrações de substratos como oxigênio e hormônios são formados durante a passagem do sangue através do fígado. Sendo a tensão de oxigênio de 65 mmHg na área periportal e de 35 mmHg na área perivenosa, a liberação de glicose, pela glicogenólise e gliconeogênese, acontece preferencialmente na área periportal mais oxigenada. Contrariamente, o transporte de glicose para a síntese de glicogênio e glicólise ocorre na área perivenosa menos oxigenada. Assim, o gradiente de oxigênio pode ser considerado um regulador chave para a expressão local dos genes das enzimas que metabolizam carboidratos (Kietzmann, 2002).

No nível celular a adaptação à hipóxia aumenta a eficiência das vias produtoras de energia, estimulando a glicólise anaeróbica e reduzindo processos que consomem energia. O transporte de íons por bombas ATPases e a síntese de proteínas são os processos que mais consomem energia celular em condições metabólicas normais, sendo maior o consumo do ATP em músculo esquelético (90%) e em timócito (66%) de rato. A redistribuição da energia celular entre processos essenciais e não-essenciais é um ponto chave para a sobrevivência celular em baixos níveis de oxigênio. Os processos que consomem ATP são organizados numa hierarquia, com síntese de proteína e sínteses de RNA / DNA como os primeiros a serem inibidos em condições limitantes de energia. Estudos em hepatócitos têm mostrado que a síntese de proteínas é fortemente inibida durante a hipóxia (Michiels, 2004).

Além da supressão metabólica para balanceamento energético, a célula ativa a glicólise para manter a oferta energética em hipóxia. Apesar da glicólise ser menos eficiente que a fosforilação oxidativa na produção de ATP, a glicólise pode manter a produção de ATP devido ao aumento da atividade das enzimas glicolíticas. Isto é manifestado em poucos minutos através da regulação alostérica da atividade da fosfofrutoquinase e, ao longo do tempo, através da superexpressão dos genes de enzimas glicolíticas, dependente de HIF-1. Em mamíferos, os genes das enzimas glicolíticas, fosfofrutoquinase, aldolase, piruvato quinase, fosfogliceroquinase, enolase, lactato desidrogenase, hexoquinase e gliceraldeído-fosfato desidrogenase são induzidos por HIF-1 cujo sítio de ligação está presente em seus promotores (Webster, 2003).

Em culturas de hepatócitos de rato, foi mostrado que na presença de alta concentração de glicose (50 mM) e pO_2 16% (arterial) os fatores de transcrição sensíveis a glicose (USF) ligam-se a elementos no promotor e medeiam a indução dependente de glicose do gene L-PK (piruvato quinase do fígado). Em alta glicose e pO_2 8% (venosa) o complexo HIF-1 substitui USF afetando

a ativação dependente de glicose do gene L-PK. Entretanto, em baixa concentração de glicose (5 mM) e pO₂ 8% HIF-1 induz a expressão do gene L-PK. Isto mostra a mútua interação molecular do sinal de oxigênio e glicose, que pode representar um mecanismo comum de regulação de genes dependente de glicose e oxigênio no metabolismo, tumorigênese ou desenvolvimento embrionário (Kietzmann, 2002).

É importante notar que condições de anóxia ocorrem em quadros de isquemia em células cerebrais e do miocárdio (Michiels, 2004), sendo responsável pelos sérios danos causados a esses tecidos nessa condição.

I.3 Oxigênio e a via de indução de síntese de esteróis.

Recentemente, Hughes *et al.* (2005) publicaram um trabalho no qual se demonstrou que a síntese de esteróis, que é dependente de oxigênio, atua como um mecanismo sensor indireto de sua disponibilidade, mediando a resposta a condições de hipóxia e anóxia na levedura *S. pombe*. Em células de mamíferos, o controle da síntese de ácidos graxos e colesterol é feita primariamente pelo fator de transcrição denominado SREBP (*Sterol regulatory element binding protein*). Este fator é sintetizado como um precursor inativo ancorado na membrana do retículo endoplasmático (RE) e contém três regiões: i) a região N-terminal contendo os domínios de transativação e de ligação ao DNA; ii) uma região contendo dois segmentos transmembrânicos; iii) a região C-terminal com função reguladora. Três membros foram identificados em várias espécies de mamíferos: SREBP-1a e 1c, produzidas a partir de um mesmo gene (*SREBP1*) e SREBP-2, codificada por um gene independente (*SREBP2*) (Eberlé *et al.*, 2004).

A regulação destes fatores de transcrição é feita por clivagem proteolítica dos precursores inativos. Conforme dito acima, as várias formas de SREBP são mantidas no Retículo Endoplasmático (RE) após terem sido sintetizadas. Quando os níveis de colesterol se reduzem, SREBP é conduzido do RE para o complexo de Golgi pela proteína SCAP (*SREBP cleavage activating protein*), onde o fator de transcrição sofre uma clivagem, resultando na liberação da região N-terminal ativa, que se desloca para o núcleo e ativa a transcrição dos genes sob o seu controle (Brown & Goldstein, 1999) Figura 1.

No trabalho de Hughes *et al.* (2005), não foram identificados fatores de transcrição homólogos a SREBP em *S. cerevisiae*. Por esta razão, os autores se voltaram para a levedura *S. pombe*, identificando genes homólogos a *SREBP* e *SCAP*, que foram denominados, respectivamente, de *SRE1* e *SCP1*. Eles demonstraram que um sistema semelhante ao de mamíferos opera em levedura: i) interação de Sre1 e Scp1; ii) clivagem de Sre1 em resposta a baixos níveis de esteróis, utilizando-se mevastatina, um inibidor da enzima HMG-CoA redutase, que catalisa o principal ponto de controle da síntese de esteróis; iii) indução de vários genes envolvidos na síntese de esteróis pelo inibidor mevastatina, e que essa indução é dependente de Sre1.

Figura 1: Ativação de SREBP por clivagem proteolítica. Em resposta aos baixos níveis de colesterol, SREBP é conduzido do Retículo Endoplasmático (ER) para o complexo de Golgi, onde sofre uma clivagem sequencial dupla, pelas proteases S1P e S2P. A extremidade N-terminal ativa do fator de transcrição desloca-se, então, para o núcleo a fim de ativar a expressão dos genes sob o seu controle. A extremidade C-terminal, responsável pela interação com SCAP possui função reguladora. Figura retirada do site do UT Southwestern Medical Center / Laboratório Brown-Goldstein, dirigido por Michael S. Brown, M.D. e Joseph L. Goldstein, M.D.

O ponto mais interessante do trabalho, no entanto, foi o fato de se relacionar a via de Sre1 e Scp1 ao sistema de resposta a hipóxia e anóxia. Vários genes hipóxicos foram induzidos por Sre1 durante a inibição da síntese de esteróis, incluindo genes que influenciam o metabolismo energético. Condições de anóxia, por sua vez, induziram a clivagem de Sre1, do mesmo modo que a falta de esteróis. Além disso, mutantes *Dsre1* foram incapazes de crescer na ausência de oxigênio. De acordo com os autores, a falta de oxigênio reduz os níveis de esteróis, o que leva à clivagem de Sre1 e, em consequência, à indução dos genes necessários à adaptação da levedura a condições de hipóxia e anóxia.

Nosso laboratório analisou o padrão de expressão de aproximadamente 2.000 genes do fungo filamentoso *Trichoderma reesei* (Bonaccorsi, *et al.*, 2006) em cultura sob diferentes concentrações de oxigênio. Genes homólogos a *SREBP* e *SCAP* foram identificados em *T. reesei*, e denominados, respectivamente, de *Trsrebp* e *Trscap*. Interessantemente, observamos que o gene *Trscap* foi fortemente induzido em condições de hipóxia / anóxia, sugerindo que um sistema sensor de oxigênio semelhante ao de *S. pombe* possa atuar em *T. reesei*.

I.4 Mitocôndria e a morte celular.

A mitocôndria participa da manutenção de funções celulares vitais, tais como respiração celular e síntese de ATP, modulação do estado redox da célula, regulação osmótica, controle do pH, homeostase do cálcio no citosol e sinalização intracelular. Paradoxalmente, a mitocôndria guarda no espaço intermembranar substâncias capazes de deflagrar o processo de morte celular, entre as quais figura o citocromo c. Quando liberado da mitocôndria, o citocromo c associa-se a duas proteínas presentes no citosol - a APAF-1 e a pró-caspase 9 - e na presença de ATP, ativa a caspase 9. A caspase 9, por sua vez, ativa as pró-caspases 3 e 7, que executam o processo de apoptose. A caspase 3 pode amplificar a cascata de proteólise pela ativação da caspase 8 e pela clivagem da proteína anti-apoptótica Bcl-2 que, normalmente, garante a integridade da membrana mitocondrial (Kaplowitz, 2000; . Patel e Gores, 1998).

Para a manutenção da integridade celular é necessário que os componentes pró-apoptóticos, presentes no interior da mitocôndria, não sejam liberados para o citosol. Existe na membrana mitocondrial interna uma estrutura protéica chamada poro de transição de permeabilidade mitocondrial (*mitochondrial permeability transition pore* - MPTP), que se mantém habitualmente fechado, assegurando a sobrevivência celular. Seu fechamento é facilitado

pelo magnésio intracelular, pelo potencial elevado da membrana mitocondrial, pela expressão das proteínas Bcl-2 e Bcl-X_L, pela maior expressão da superóxido dismutase mitocondrial, dependente de manganês, que elimina radicais superóxido, e pela translocação nuclear do fator nuclear κ B (NF- κ B) (Pessayre *et al.*, 1999).

Diferentes estímulos podem causar a abertura do poro de permeabilidade, resultando na morte celular pela ativação das caspases: a ligação do FNT- α , ligantes-Fas ou do fator de crescimento transformador- β 1 aos respectivos receptores na membrana celular; a entrada de granzime-B, liberada pelos linfócitos T citotóxicos e facilitada pela perforina. A caspase 8 ativada cliva a proteína pró-apoptótica Bid presente no citosol, gerando um fragmento truncado dessa proteína, que se liga à mitocôndria, permeabilizando as suas membranas. A lesão do DNA celular pode intensificar a expressão do *p53* que favorece maior expressão da proteína pró-apoptótica Bax que, por sua vez, causa abertura do poro mitocondrial. Outros estímulos para a abertura desse poro incluem: maior formação de espécies reativas de oxigênio, aumento do cálcio intra-mitocondrial, ácidos biliares hidrofóbicos e algumas drogas (Pessayre *et al.*, 1999).

Uma das conseqüências da abertura do poro de permeabilidade é a expansão da matriz mitocondrial devido a sua hiperosmolaridade. A membrana mitocondrial interna, que apresentando várias pregas, pode acomodar o aumento do volume da matriz, entretanto a membrana externa, que é esférica, se rompe, liberando componentes pró-apoptóticos, como o fator indutor da apoptose e o citocromo c. Outra conseqüência é a entrada de prótons na matriz, causando colapso no potencial de membrana mitocondrial e comprometendo a síntese de ATP (Feldmann, 2000; Pessayre *et al.*, 1999).

A abertura do poro de permeabilidade mitocondrial causa, simultaneamente, ativação das caspases (potencialmente levando à apoptose) e depleção de ATP (potencialmente causando

necrose). Essa disputa entre a ativação das caspases e a depleção de ATP irá orientar a morte celular, seja por apoptose, seja por necrose. Se decidida em favor das caspases, quando diretamente ativadas, o poro de permeabilidade se abre em apenas algumas mitocôndrias, permitindo que as demais sintetizem ATP. Nessa circunstância a célula entra no processo de apoptose. Por outro lado, se o poro de permeabilidade for aberto rapidamente e a célula não obter energia suficiente a partir da glicólise anaeróbia, a depleção do ATP impede que a apoptose se instale (processo ativo que requer energia) e a célula morre por necrose (Pessayre *et al.*, 1999).

I.5 Modelos celulares.

I.5.1 Fibroblastos.

Fibroblastos humanos de derme são células que vem sendo largamente utilizadas para o estudo em biologia celular. Sua popularidade como um sistema *in vitro* vem da abundância das amostras de pele e sua relativa facilidade de cultivo. Os fibroblastos constituem um importante sistema modelo *in vitro* de estudo do envelhecimento e para desenvolver tecnologias de imortalização celular (Huschtscha e Holliday, 1983). Em vista dessas características iniciamos os estudos de cultivo celular em baixa tensão de oxigênio utilizando duas linhagens celulares de fibroblastos descritas abaixo.

AS198 são células humanas diplóides de fibroblasto humano em cultura primária desenvolvida pelo laboratório do Prof. Dr. Carlos Menck (Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biomédicas, USP-SP), o qual nos disponibilizou-as.

MRC-5 são células humanas diplóides derivadas de tecido pulmonar fetal e tem morfologia de fibroblastos, imortalizadas por transfecção de SV40 (Jacobs *et al.*, 1970). Essas

células são amplamente usadas em produção de vacinas virais, incluindo, rinovírus, Sabin polivírus, rubéola, rábica e varicela. Essas células também nos foram disponibilizadas pelo laboratório do Prof. Dr. Carlos Menck.

1.5.2 Ilhotas pancreáticas.

As ilhotas foram descobertas em 1869 por Langerhans, que não suspeitou que fossem órgãos de secreção endócrina. Laguesse, em 1893, que também estudou o pâncreas minuciosamente, concluiu que as ilhotas eram órgãos de secreção interna.

As ilhotas pancreáticas, ou ilhotas de Langerhans, são corpos bem definidos que se encontram dispersos através do pâncreas e compõem 1-2 % do seu peso. Em humanos, as células beta representam 70-80% do total de células das ilhotas e se encontram preferencialmente em seus centros, enquanto 15-20% são células alfa, 5% são células delta e apenas 1% são células PP. Esses diferentes tipos celulares têm como função específica a produção dos hormônios insulina, glucagon, somatostatina e polipeptídeo pancreático, respectivamente. Embora cada uma destas células endócrinas seja tradicionalmente associada à produção do seu hormônio clássico, mais de 20 hormônios diferentes, no total, são secretados pelas células de ilhotas na circulação portal. Estes hormônios são, em grande parte, responsáveis pela homeostase da glicose (Moldovan e Brunicardi, 2001).

Utilizamos células provenientes de ilhotas pancreáticas humanas de culturas primárias (preparadas e fornecidas pelo laboratório da Profa. Dra. Mari Cleide Sogayar – Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, USP). Por serem de baixa passagem mantêm suas características como ilhotas pancreáticas como secreção de insulina, que influencia o metabolismo energético e de lipídios. Além do mais, essas células também são utilizadas para

transplantes pelo laboratório da Profa. Dra Sogayar, sendo, portanto, de grande interesse investigar os efeitos da falta de oxigenação causada pelo processo de sua obtenção. O estresse sofrido por falta de oxigenação é proporcional ao tempo necessário para retirada do pâncreas, extração e preparo das ilhotas pancreáticas. Esse estresse por falta de oxigênio reflete-se na viabilidade celular, crucial para o transplante. Por esses motivos a cultura de ilhotas pancreáticas humanas mostrou-se como a mais adequada para desenvolvimento completo do estudo.

I.6 Biorreatores e microcarregadores.

O cultivo de célula animal desempenha um papel muito importante na biotecnologia moderna, especialmente no que se refere à produção de enzimas, hormônios, anticorpos e proteínas. Esses produtos são amplamente utilizados nas áreas de biomédica, alimentos, agropecuária e farmacológica, e também na indústria de vacinas e em bio-indústrias.

A necessidade da produção de um grande número de produtos terapêuticos em grandes quantidades resultou no desenvolvimento de biorreatores que trabalham com células animais. Os biorreatores consistem em um recipiente estéril no qual se cultivam células ou enzimas, com agitação, que levam a termo uma reação biológica (Glossário de Biotecnologia, por Aluizio Borém, UFV, e Maria Lúcia Carneiro Vieira, ESALQ-USP). Esses biorreatores constituem um ambiente extremamente controlado e de rápida resposta por meio de equipamentos que conseguem controlar o pH e a mistura de gases do meio de acordo com as necessidades requeridas.

Para se beneficiar desses sistemas devidamente controlados e altamente produtivos, que são os biorreatores, cultivos de células que necessitam de ancoragem empregam cada vez mais microcarregadores, microesferas de material inerte que servem de suporte para as células.

No cultivo de células animais dependentes de ancoragem em microcarregadores o crescimento acontece na superfície e/ou no interior de pequenas partículas, cuja matriz é especialmente desenvolvida para promover a adesão, espalhamento e crescimento das células, uma vez que as características físico-químicas da superfície têm um papel crucial em alguns processos celulares como síntese de DNA, RNA e de proteínas. Além de significar um aumento considerável da área para crescimento, a cultura em microcarregadores reduz a exigência de meio de cultura, reduz os riscos de contaminação e possibilita a obtenção de uma alta concentração celular e, conseqüentemente, de maior rendimento de produto (Pharmacia, 1991).

Para se estudar o efeito do oxigênio sobre a expressão gênica em condições devidamente controladas, optamos pela utilização de um sistema de cultivo de células humanas aderidas aos microcarregadores em biorreator por todas as qualidades acima citadas.

I.7 Método de Análise de Expressão Gênica Diferencial.

A identificação do conjunto de genes diferencialmente expressos por uma célula, tecido ou organismo numa determinada condição, em relação a outra situação com a qual se deseja comparar, pode permitir a compreensão dos fatores necessários ou responsáveis pela manifestação do fenótipo diferencial. Entretanto, em geral esta é uma análise extremamente difícil, devido à complexidade de RNAs transcritos pela célula e pela existência de grande

variação entre o nível de expressão de diferentes transcritos. Além disso, para muitos genes, a diferença no nível da expressão entre as condições que se quer comparar pode ser muito pequena, dificultando ainda mais a identificação.

Diversas técnicas foram desenvolvidas para a identificação de genes diferencialmente expressos, dentre as quais podemos citar a exposição diferenciada (*differential display*), a análise sequencial de expressão gênica (*serial analysis of gene expression* - SAGE) e os microarranjos de DNA (DNA *microarrays*).

A técnica de *microarrays* de DNA baseia-se na construção de arranjos de milhares de moléculas de DNA , ou cDNA, de seqüência conhecida e correspondente a diferentes genes, depositadas ordenadamente sobre lâminas de vidro. Duas populações de mRNA, de duas condições que se queira comparar, são retro-transcritas a cDNA, cada uma das quais na presença de nucleotídeos marcados com fluorocromos diferentes. Em seguida, os cDNAs marcados com os fluorocromos são desnaturados, misturados em igual proporção e hibridizados contra as moléculas fixadas na lâmina. As lâminas são então expostas a *lasers* de comprimentos de onda apropriados a cada fluorocromo e os sinais emitidos por cada um são registrados através da aquisição de imagens por câmaras de alto ganho. A comparação entre as imagens geradas para cada fluorocromo permite a identificação dos genes diferencialmente expressos (Schena *et al.*, 1995).

Para esse estudo do efeito do oxigênio sobre a expressão gênica em condições devidamente controladas, optamos pela utilização da técnica de *microarrays* pela experiência acumulada no nosso laboratório durante os últimos anos em teses de alunos de doutorado

(Chambergo, 2002. Bonaccorsi, 2003; Ferreira, 2006) e publicações em periódicos (Chambergo, 2002. Bonaccorsi, 2006).

II. OBJETIVOS.

O projeto apresentado nessa dissertação teve como principal objetivo o estudo da expressão em nível transcricional de aproximadamente 160 genes envolvidos nas vias metabólicas - glicólise, ciclo dos ácidos tricarboxílicos, fosforilação oxidativa, cadeia respiratória, gliconeogênese, via das pentoses, via do piruvato (*pyruvate bypass*), metabolismo de glicogênio e metabolismo de lípidios - , e genes envolvidos em morte celular, em células humanas, com o intuito de determinar as alterações no metabolismo primário em resposta a condições de hipóxia e anóxia.

O projeto de pesquisa foi desenvolvido nas seguintes etapas:

1) Desenvolvimento de cultura de células em um sistema com todas as vantagens da cultura em suspensão;

2) Estudo do nível de transcrição dos genes mencionados anteriormente em resposta a gradiente de hipóxia e condições de anóxia. Determinação do perfil transcricional na transição entre os estados de hipóxia e de anóxia e na transição entre o estado de anóxia e a reoxigenação da cultura.

Este trabalho foi realizado em colaboração com o Laboratório de Imunologia Viral do Instituto Butantan, sob responsabilidade do Dr. Carlos Augusto Pereira, e com o Laboratório de Biologia Molecular & Unidade de Ilhotas Pancreáticas Humanas, sob responsabilidade da Dra. Mari Cleide Sogayar.

III. MATERIAIS E MÉTODOS.

III.1 Modelos celulares.

Células normais de fibroblasto humano de cultura primária (AS198); e células de fibroblasto humano de pulmão, transformadas por SV40 (MRC5) (ATCC CCL-171), foram proporcionadas pelo Professor Dr. Carlos Menck, do departamento de Microbiologia, Instituto de Biociências, USP-SP.

Células normais de Ilhotas pancreáticas humanas, provenientes de cultura primária de baixíssima passagem, foram proporcionadas pela Professora Dra. Mari Cleide Sogayar, Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, USP-SP.

III.2 Condições de cultura e manutenção das linhagens celulares.

As células de fibroblastos foram cultivadas a 37°C em garrafas plásticas descartáveis contendo meio DULBECCO MEM (DMEM - Dulbecco's Modified Eagle Medium) suplementado com 10% Soro fetal bovino (Lote 063 – 024/04), provenientes da CultiLab (Materiais para cultura de células, Campinas, São Paulo) Figura 2. As células de ilhotas pancreáticas foram cultivadas nas mesmas condições apenas com a utilização de outro meio de cultura CMRL 1066 (desenvolvido na década de 60 no Connaugh Medical Research Laboratories, daí sua denominação) - Figura 3. O pH e a temperatura foram mantidos na faixa fisiológica através da incubação em estufa a 37° C e atmosfera contendo 5% de CO₂ e saturada de umidade – Figuras 4, 5, 6 e 7. As células foram sub-cultivadas sempre que atingiram, aproximadamente, 80% da densidade de saturação, utilizando, para tanto, 3 lavagens com tripsina 0,2% em solução

com PBS e EDTA. Os estoques celulares são mantidos no meio de cultivo contendo 10% DMSO (dimetilsulfóxido) a -190°C , em reservatório contendo nitrogênio líquido.

III.3 Ensaios de cultura celular em diversas concentrações de oxigênio dissolvido.

Os ensaios de cultura celular em diversas concentrações de oxigênio dissolvido foram realizados no laboratório de Imunologia Viral do Instituto Butantan do Professor Dr. Carlos Augusto Pereira.

COMPOSIÇÃO DULBECCO MEM (DMEM)

Sais Inorgânicos	mg/L	L-serina	42,00
CaCl2H2O	265,00	L-treonina	95,00
Fe(NO3)3.9H2O	0,10	L-triptofano	16,00
KCL	400,00	L-tirosina	104,20
MgSO4.7H2O	200,00	L-valina	94,00
NaCL	6.400,00		
NaH2PO4H2O	125,00	VITAMINAS	mg/L
NaHCO3	3.700,00	Cloreto de Colina	4,00
		pantotenato de cálcio	4,00
Aminoácidos	mg/L	ácido fólico	4,00
L-arginina.HCL	84,00	inositol	7,20
L-cistina	62,57	nicotinamida	4,00
L-glutamina	584,00	piridoxina.HCL	4,00
glicina	30,00	riboflavina	0,40
L-histidina.HCL.H2O	42,00	tiamina.HCL	4,00
L-isoleucina	105,00		
L-leucina	105,00	Outros Componentes	mg/L
L-lisina.HCL	146,00	glicose	1.000,00
L-metionina	30,00	piruvato de sódio	110,00
L-fenilalanina	66,00	vermelho de fenol	15,00

Figura 2: Composição do meio de cultura DULBECCO MEM (DMEM).

COMPOSIÇÃO MEIO CMRL 1066

COMPONENTES	Concentração (mg/L)
L-Tirosina	58
L-Valina	25
Ácido Ascórbico	50
Biotina	0.01
Colesterol	0.2
Cloreto de Colina	0.5
D-Pantotenato de Cálcio	0.01
Ácido Fólico	0.01
D-Inositol	0.05
Niacinamida	0.025
Ácido Nicotínico (Niacin)	0.025
Ácido Para-Aminobenzoico	0.05
Piridoxal HCl	0.025
Piridoxine HCl	0.025
Riboflavina	0.01
Tiamina HCl	0.01
Cloreto de Cálcio (CaCl ₂) (anidro)	200
Sulfato de Magnésio (MgSO ₄) (anidro)	97.7
Cloreto de Potássio (KCl)	400
NaHCO ₃	2200
NaCl	6800
Fosfato de Sódio monobásico (NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O)	140
2'Deoxiadenosina	10
2'Deoxicitidina	10
2'Deoxiguanosina	10
5-Metil-deoxicitidina	0.1
Co-carboxilase	1
Coenzyma A	2.5
D-Glicose (Dextrose)	1000
Difosfopiridina nucleotídeo (NAD)	7
FAD (flavinadenina-dinucleotídeo)	1
Glutathione (reduzida)	10
Vermelho de fenol	20
Acetato de Sódio ·3H ₂ O	83
Glucuronato de Sódio ·H ₂ O	4.2
Timidina	10
Trifosfopiridina Nucleotídeo (NADP)	1
Tween 80	5
Uridina 5'- trifosfato	1

COMPONENTES	Concentração (mg/L)
Glicina	50
Hidroxi L-prolina	10
L-Alanina	25
hidrocloreto de L-Arginina	70
L- ácido Aspartico	30
Hidrocloreto de L-Cisteína-H ₂ O	260
L-Cistina	26
Ácido L-Glutâmico	75
Hidrocloreto de L-Histidina ·H ₂ O	20
L-Isoleucina	20
L-Leucina	60
Hidrocloreto de L-Lisina	70
L-Metionina	15
L-Fenilalanina	25
L-Prolina	40
L-Serina	25
L-Treonina	30
L-Triptofano	10

Figura 3: Composição do meio de cultura CMRL 1066.

III.3.1 Considerações gerais.

O estudo do efeito do oxigênio sobre a expressão gênica foi analisado, em condições devidamente controladas, por um sistema de cultivo de células humanas dependentes de ancoragem em um sistema com todas as vantagens da cultura em suspensão, em biorreator . Para isso foi necessária a montagem de um protocolo em que as células humanas utilizadas, crescessem aderidas á suportes inertes, e esse sistema, por sua vez, colocado em suspensão. Como o sistema de microcarregadores permite um excelente controle dos parâmetros de cultura (ex. pH, tensão de gases), foi decidido então cultivar as células em microcarregadores Cytodex –1 (Yokomizo, 2004) Figura 8.

Para a montagem de um protocolo de crescimento das células em microcarregadores Cytodex I, a cultura inicialmente foi realizada em frascos *spinners* (Bellco Glass - 196500100), com um volume de trabalho de 100mL pelo fato de os biorreatores utilizarem 12 vezes mais quantidade de meio de cultura, soro fetal bovino e células; sua preparação ser mais trabalhosa, detalhista e mais demorada; além do fato de podermos trabalhar com vários *spinners* em paralelo.

III.3.2 Preparação dos microcarregadores (MCs).

Os microcarregadores foram hidratados na proporção de 100mL de PBS por 1g de microcarregadores a 37°C em frascos siliconizados. Após 30 minutos a metade do volume de PBS foi retirada e substituída por solução de PBS nova. Este procedimento repetiu-se por mais duas vezes. Dessa maneira os microcarregadores hidratados foram então autoclavados em PBS nos frascos em que seriam utilizados (*spinners* ou biorreator) por 15 minutos a 120°C.

Figura 4: Frascos com células em crescimento em estufa de CO₂, 37°C.

Figura 5: Células AS198 em cultura em garrafa.

Figura 6: Células MRC-5 em cultura em garrafa.

Figura 7: Células de Ilhotas pancreáticas em cultura em garrafa.

Figura 8: Microcarregadores Cytodex 1. **A)** Características físico-químicas. **B)** Mecanismo de adesão celular aos microcarregadores.

III.3.3 Ensaio de cultura em Spinners.

Como mencionado anteriormente, para a montagem de um protocolo de crescimento das células em microcarregadores foram realizados ensaios em frascos *spinners* – Figura 9. Para isso, as células foram crescidas em garrafas até atingirem, no total, uma concentração mínima de 6×10^6 por *spinner*. Foram então tripsinizadas utilizando, para tanto, 3 lavagens com tripsina 0,2% em solução com PBS e EDTA, e colocadas nos frascos, cada um contendo 100 mL de meio DMEM, ou CMRL, suplementado com 10% Soro fetal bovino, na presença de 1 g/L de microcarregadores. Após esse inóculo inicial, os *spinners* foram incubados em estufa a 37° C e atmosfera contendo 5% de CO₂ e saturada de umidade, sobre base magnética mantendo uma rotação inicial de 40 rpm por 3 horas, para facilitar a adesão inicial das células aos microcarregadores. Após esse período inicial, uma alíquota para dosagem de glicose e lactato, além de contagem de células e de preenchimento de microcarregadores, foi retirada. A rotação passou-se então para 60rpm, mantida até o fim do cultivo (Wu *et al.*, 2004). Alíquotas foram retiradas de aproximadamente 24 em 24 horas.

Figura 9: Frascos *spinners* com volume de trabalho de 100mL e aparelhagem de cultivo celular em estufa de CO₂, 37°C usada no estabelecimento de protocolo e condições experimentais para cultivo em biorreator.

III.3.4 Ensaio de cultura em Biorreator.

Para o ensaio de cultura em Biorreator as células, aderidas a microcarregadores, foram cultivadas em suspensão em uma dorna de 1.500 mL e volume de trabalho de 1.200 mL, em um biorreator – Figura 10 e 11, equipado com eletrodos de oxigênio, analisador de gases (CO₂ e O₂) e fluxômetros de massa (para o controle da vazão de entrada de ar comprimido e N₂).

Figura 10: Componentes da dorna de 1,5L do Biorreator Celligen Cell Culture System (NBS).

Figura 11: Biorreator Celligen Cell Culture System (NBS), com sua dorna de 1,5L em funcionamento.

Para esse ensaio as células também foram crescidas em garrafas até atingirem, no total, uma concentração de aproximadamente 1×10^8 . Foram então tripsinizadas utilizando, para tanto, 3 lavagens com tripsina 0,2% em solução com PBS e EDTA, e colocadas no biorreator já devidamente preparado, autoclavado e com os eletrodos calibrados. O biorreator foi alimentado com meio de cultura apropriado suplementado com 10% Soro fetal bovino e Ciprofloxacina ($4\mu\text{M}$), totalizando um volume de trabalho de 1200 mL. Após o inóculo das células foi iniciada uma rotação de 40 rpm por 3 horas, para a adesão das células aos microcarregadores. Após o que foi elevada para 60rpm e mantida até o fim do cultivo.

Após estabelecimento das células nas condições de normóxia (OD.-Oxigênio dissolvido– 40% da saturação) por 24 horas, as células foram submetidas, gradualmente, a concentrações cada vez menores de oxigênio, até o estado de anóxia. Em seguida, os níveis de oxigênio foram restaurados ao valor inicial. Em condições de hipóxia (OD. 10% e 5%), as células foram mantidas por 30 minutos em cada condição; em anóxia, por 30 minutos; e após a reoxigenação da cultura, por mais 1 hora. Para cada concentração de oxigênio alíquotas foram removidas ao final de cada período para a preparação de RNA total.

III.3.5 Contagem celular.

A contagem celular foi feita retirando-se uma alíquota da cultura, deixando-a em repouso por alguns minutos, para decantação dos microcarregadores, desprezando 800 μL do sobrenadante e repondo esse volume com Solução Cristal de Violeta a 0,1% em ácido cítrico 0,1 mol/L, que rompe as células aderidas aos microcarregadores e colore os núcleos livres num tom arroxeado. Esses núcleos foram contados em Câmara de Neubauer (Jannini,P., & Jannini, P.F., 1995) - Figura 12.

Figura 12: Visualização dos núcleos livres corados em Câmara de Neubauer.

III.3.6 Contagem de preenchimento de microcarregadores.

A contagem de preenchimento de microcarregadores foi feita retirando-se uma alíquota da cultura, deixando-a em repouso por alguns minutos, quando os microcarregadores com as células aderidas decantam. A parte decantada é retirada e colocada em lâmina de microscopia comum, qualificando os microcarregadores como vazios, parcialmente recobertos e completamente recobertos em 3 campos. Para melhor visualização do preenchimento dos microcarregadores utiliza-se Azul Trypan 0,025%, que se adere às regiões dos microcarregadores que não possuem células aderidas - Figura 13.

III.3.7 Dosagem de glicose e lactato.

Para a dosagem de glicose e lactato, após repouso por alguns minutos foram retirados os sobrenadantes das alíquotas retiradas da cultura e imediatamente congelados. A dosagem foi feita de uma só vez ao final de cada experimento no aparelho YSI 2700 Select (Yellow Springs Instruments Co., Yellow. Springs, Ohio, EUA), segundo as especificações do fabricante. Este

aparelho utiliza uma enzima específica para o substrato de interesse, imobilizada entre duas membranas uma de policarbonato e outra de acetato de celulose. O substrato a ser dosado é oxidado, produzindo peróxido de hidrogênio, que por sua vez é oxidado no eletrodo de platina, produzindo elétrons. Esse fluxo de elétrons é proporcional à concentração de peróxido de hidrogênio e por sua vez a concentração do substrato – Figura 14.

Figura 13: Visualização de células aderidas aos microcarregadores corados com azul de Trypan para qualificação dos mesmos.

Figura 14: Reações envolvidas na dosagem de glicose e lactato realizadas no aparelho YSI 2700 Select (Yellow Springs Instruments).

III.4 Extração de RNA total.

III.4.1 Extração de RNA total.

Para cada concentração de oxigênio dos experimentos realizados no biorreator, alíquotas foram removidas para a extração de RNA total. Cada alíquota retirada para o ponto de normóxia (ponto de referência) totalizou 120 mL e para os demais pontos (hipóxia 1, hipóxia 2, anóxia e reoxigenação) cada uma totalizou 60 mL. Cada amostragem continha meio de cultura e os

microcarregadores com as células aderidas. Para desprezar o meio de cultura, as amostras foram, imediatamente após suas retiradas, centrifugadas por 2 minutos a 1000 rpm, após o que foi então adicionada solução de lise e o lisado estocado a -70°C .

Em posse do lisado das amostragens iniciou-se o processo de extração do RNA total. Em tubos novos de ultracentrífuga, foram adicionados 2 mL de solução de cloreto de cézio, sobre os quais 3 mL do lisado foram dispensados cuidadosamente pela parede do tubo. Os tubos foram então ultracentrifugados em rotor basculante SW50.1 em ultracentrífuga L8-80M Beckman® - U.S., a 37.000 rpm por 18 horas.

Após as 18 horas os tubos foram retirados e os sobrenadantes desprezados. Os tubos foram secos e os RNAs ressuspensos em 50 μL de água autoclavada e tratada com dietilpirocarbonato (DEPC).

Os RNAs foram quantificados no aparelho The NanoDrop® ND-1000 UV-Vis Spectrophotometer, segundo o protocolo fornecido pelo fabricante.

III.4.2 Soluções utilizadas.

Solução de lise.

Reagente	Concentração	Para 100 mL
Tiocianato de guanidínio (PM 118,6)	4 mol/L	47,26 g
Citrato de sódio 1,0 mol/L (pH 7,0)	25 mmol/L	2,5 mL

Autoclavar a solução. Adicionar 0,1 mol/L de β -Mercaptoetanol no momento do uso.

Solução de cloreto de céσιο.

Reagente	Concentração	Para 50 mL
Cloreto de céσιο (PM 168,36)	5,7 mol/L	48,0 g
Acetato de sódio 1,0 mol/L (pH 5,0)	25 mmol/L	1,25 mL

Autoclavar a solução.

III.5 Produção de Lâminas de *Microarrays* de Genes Humanos.

As etapas de impressão das lâminas de *microarrays*, hibridização das mesmas com as misturas de cDNAs marcados com fluoróforos e leitura das fluorescências das sondas nas lâminas hibridizadas foram todas desenvolvidas no laboratório CAGE (“Center for Analysis of Gene Expression” – IQ/USP), sob orientação das técnicas Adriana Matsukuma e Denise Yamamoto, e do Prof. Dr. Eduardo M. Reis; responsáveis pelo laboratório na época do desenvolvimento do trabalho.

III.5.1 Síntese de Oligonucleotídeos.

Para realizar este estudo foram escolhidas enzimas envolvidas nas vias metabólicas energéticas centrais, conforme descrito anteriormente, em um total aproximado de 160 genes. Estes genes foram escolhidos com base nos Mapas Metabólicos do banco de dados público KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*; www.genome.ad.jp/kegg/) - Tabela 1, Apêndice.

Foram confeccionados pares de oligonucleotídeos desenhados no programa Primer3 (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi), utilizando-se seqüências de mRNA do genoma humano, obtidas no banco de dados público GeneBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) - Tabela 2, Apêndice.

Utilizando uma mistura de RNAs de fígado humano adulto e de células MRC-5 foram amplificados os genes cujos oligonucleotídeos foram confeccionados, que apresentaram um perfeito funcionamento.

III.5.2 Confeção das lâminas de microarray de DNA.

Os DNAs utilizados para a impressão das lâminas de *microarrays* foram amplificados por meio de reações de PCR em 100µL, realizadas em placas de 96 poços, a partir de um cDNA proveniente de uma mistura de 2µg de RNAs de fígado humano adulto e de células MRC-5 utilizando os oligonucleotídeos específicos confeccionados. As condições das reações empregadas nas 154 amplificações estão descritas a seguir:

Reagentes	Para 100mL	Programa da reação
cDNA	2µL	1x 95°C – 5 minutos 40x 95°C – 45 segundos 60°C – 45 segundos 72°C – 1 minuto
dNTPs (10 mmol/L)	2µL	
Oligonucleotídeos específicos (10 mmol/L)	2µL Oligonucleotídeo 5' 2µL Oligonucleotídeo 3'	
MgCl ₂ (50 mmol/L)	3µL	
Tampão reação 10x	10µL	1x 72°C – 5 minutos 4°C - ∞
Biolase (5U/µL)	0,5µL	
Água	78,5µL	

Desenvolveu-se uma eletroforese em gel de agarose 1,0% de 1μL de cada amplificação com o marcador de peso molecular 1kb DNA Ladder (Invitrogen™ Life Technologies) para verificação da qualidade das amplificações – Figura 15.

Aos 100μL do produto de cada amplificação foram misturados 100μL do tampão de purificação por sucessivas pipetagens. Os 200μL das 154 amostras foram então transferidos para 2 placas de filtro MultiScreen-FB filter plates, modelo MAFB-NOB50 (Millipore) de 96 poços, previamente umedecidas com tampão. As placas então foram centrifugadas por 1.300 g por 1 minuto em centrífuga apropriada. Duas posteriores lavagens dos filtros com 200μL de etanol 80% preparado no momento do uso, com centrifugações a 1 300 g de 1 a 10 minutos, foram realizadas. Por último seguiu-se centrifugação a 1300 g da placa seca e sem tampa por 5 minutos para eliminação de possíveis resquícios de etanol. Foi então realizada a eluição dos 154 amplificados com 50μL de Tris-HCl 10 mmol/L, pH 8,0, para duas placas de 96 poços com fundo U, por centrifugação a 1.300 g por 5 minutos.

Desenvolveu-se uma eletroforese em gel de agarose 1,2% de 3μL de cada amplificação com os marcadores de peso molecular 1kb DNA Ladder e de massa Low Mass DNA Ladder (Invitrogen™ Life Technologies) para verificação das concentrações (dados não apresentados). Como a maioria das amplificações não alcançou a concentração desejada de 50 ng/μL as placas foram secas à temperatura ambiente na sala limpa do laboratório CAGE durante uma noite e então ressuspensas em 20μL de solução DMSO (reagente D, GE Healthcare) em água deionizada estéril. Os amplificados das 2 placas de 96 poços foram então transferidos para a placa de 384 poços (GE Healthcare) apropriada para o sistema de impressão.

apresentada em Apêndice (Tabela 3), gerando um total de 12 multiplicatas de cada gene por lâmina e um espaço vazio ao redor de cada gene para a minimização de possível contaminação de sinal fluorescente de um gene para outro. Para controle da marcação com os fluoróforos e hibridização da lâmina com a mistura dos cDNAs marcados foi impressa nas lâminas a placa Universal ScoreCard que contém sondas que hibridizam com cDNAs provenientes de RNAs referências adicionados ao RNA da condição de estudo no preparo das amostras desde o estágio inicial.

As lâminas dos *microarrays* de DNA que foram confeccionadas para esse estudo permanecem estocadas no Laboratório CAGE, do Instituto de Química, USP-SP.

III.5.3 Síntese e marcação dos cDNAs.

Preconizamos a normóxia como referência e hipóxia 1, hipóxia 2, anóxia e reoxigenação como condições de estudo. Para a síntese e marcação desses cDNAs foi utilizado o kit SuperScriptTM Plus Indirect cDNA Labeling System (InvitrogenTM Life Technologies) com fluoróforos Alexa Fluor® 647 e Alexa Fluor® 555, usando um protocolo adaptado do kit desenvolvido pelo laboratório CAGE.

III.5.3.1 Síntese de cDNA.

Reagentes	Massa e/ou Volume
RNA total	10µg
Oligo(dT) ₁₈₋₂₀ ancorado	6µL
RNA spike controle	1µL
Água DEPC	Para 18µL

Incubação por 5 minutos a 70°C em bloco termostatizado ThermoBlock II (Eppendorf), e gelo por pelo menos 1 minuto. Acrescentado:

Reagentes	Volume
Tampão da reação 5X	6µL
0.1M DTT	1,5µL
dNTP mix	1,5µL
RNAse OUT TM (40U/µL)	1µL
SuperScript TM III RT (400U/µL)	2µL

Incubação por 3 horas a 46°C em bloco termostatizado ThermoBlock II (Eppendorf).

III.5.3.2 Degradação do RNA (Hidrólise Alcalina).

Adicionado 2µL de hidróxido de sódio 2,5 mol/L às reações.

Incubado em bloco termostatizado a 37°C por 15 minutos.

Adicionado 10µL de ácido HEPES 2,0 mol/L às reações.

III.5.3.3 Purificação de cDNA.

Foram misturados 120µL do tampão de purificação por sucessivas pipetagens. Todo o volume foi então transferidos para placas de filtro MultiScreen-FB filter plates, modelo MAFB-NOB50 (Millipore) de 96 poços, previamente umedecidas com tampão. As placas então foram centrifugadas por 1.300 g por 1 minuto em centrífuga apropriada e submetidas a quatro posteriores lavagens dos filtros com 200µL de etanol 80% preparado no momento do uso, com centrifugações a 1.300 g de 1minuto e a uma última lavagem com centrifugação a 1.300 g por 5

minutos. Foram então realizadas duas eluições seguidas com 45µL de Tris-HCl 10 mmol/L, pH 8,0 por centrifugação a 1.300 g por 5 minutos. As eluições foram transferidas para tubos eppendorf e evaporadas no SpeedVac.

III.5.3.4 Marcação de cDNA.

Os cDNAs foram ressuspensos em 5µL de tampão de acoplamento. Sem a incidência de luz direta os fluoróforos foram ressuspensos em mistura de 2µL de DMSO e 3µL de água DEPC por agitação em vórtex e imediatamente adicionados ao tubo eppendorf contendo os cDNAs correspondentes àquela marcação. Os tubos com as reações de marcação foram mantidos durante uma noite a temperatura ambiente em recipiente protegido da luz dentro da gaveta da bancada. A partir dessa etapa, todas as etapas posteriores foram feitas sob abrigo da luz.

As amostras das condições de referência foram marcadas com o fluoróforo Alexa Fluor® 647, correspondente ao fluoróforo Cy-5 e com excitação a 647nm, enquanto as amostras das condições de estudo foram marcadas com fluoróforo Alexa Fluor® 555, correspondente ao fluoróforo Cy-3 e com excitação a 555nm. Foram então realizadas medidas espectrofotométricas para determinação do rendimento da marcação das amostras.

III.5.3.5 Purificação de cDNA marcado fluorescentemente.

Foram misturados 120µL do tampão de purificação aos cDNAs marcados por sucessivas pipetagens. Todo o volume foi então transferido para placas de filtro MultiScreen-FB filter plates, modelo MAFB-NOB50 (Millipore) de 96 poços, previamente umedecidas com tampão. As placas então foram centrifugadas por 1.300 g por 1 minuto em centrífuga apropriada e submetidas a quatro posteriores lavagens dos filtros com 200µL de etanol 80% preparado no

momento do uso, com centrifugações a 1.300 g de 1 minuto e a uma última lavagem com centrifugação a 1.300 g por 5 minutos. Foram então realizadas duas eluições seguidas com 45µL de Tris-HCl 10 mmol/L, pH 8,0 por centrifugação a 1.300 g por 5 minutos.

As eluições foram transferidas para tubos eppendorf e então realizadas medidas espectrofotométricas para quantificação e determinação do rendimento de todo o processo de síntese e marcação. Após as quantificações as amostras são evaporadas no SpeedVac.

III.5.3.6 Hibridização das lâminas de microarray com cDNAs marcados fluorescentemente.

Cada par de amostras, contando um cDNA de referência e um duma condição de estudo, foi ressuspenso em 13,5µL de tampão de hibridização e 27µL de formamida deionizada. Essa solução foi então fervida a 92°C por 3 minutos em bloco termostaticado, após o que foi rapidamente colocada em gelo e centrifugada. Foi então dispensada sobre a lâmina de *microarray* em forma de uma linha próxima as colunas das sondas. Cuidadosamente uma lamínula foi sobreposta à solução para espalhá-la de forma homogênea. As lâminas de todas as condições de estudo foram colocadas conjuntamente em uma câmara de hibridização de vidro contendo um algodão umedecido com água deionizada e mantidas por no mínimo 16 horas em forno de hibridização a 42°C.

Após esse período as lâminas sofreram uma lavagem para retirada da solução contendo os cDNAs marcados que não hibridizaram. As lâminas foram lavadas primeiramente com uma solução de 1X SSC e 0,2 % SDS a 55°C por 10 minutos em agitador orbital, seguiu-se lavagem com solução de 0,1X SSC e 0,2% SDS a 55°C por 10 minutos em agitador orbital duas vezes e

por fim foram lavadas em uma solução de 0,1X SSC a temperatura ambiente por 1 minuto. As lâminas foram então passadas em 3 cubas de água deionizada e secas com jato de nitrogênio ultrapuro.

As lâminas ficaram estocadas protegidas da luz até serem realizadas as leituras em *scanner* Generation III DNA Scanner (GE Healthcare) utilizando protocolo padrão de obtenção de imagem de lâminas segundo o fabricante. As melhores leituras foram realizadas em ganho de sinal a 750V na câmera CCD. O programa de análise de imagens do *scanner* transforma o sinal de fluorescência dos fluoróforos Alexa Fluor® 647 e Alexa Fluor® 555, nas colorações vermelha e verde respectivamente, sendo a intensidade de fluorescência diretamente proporcional a intensidade da coloração.

III.6 Extração e Análise dos Dados das Hibridizações de *Microarray*.

O tratamento de normalização e estatístico dos dados de fluorescência e sua apresentação visual foram desenvolvidos pelo Professor Dr. João Pedro Simon Farah do Departamento de Química Fundamental do Instituto de Química da USP/SP.

III.6.1 Extração dos dados

As leituras realizadas no *scanner* Generation III DNA Scanner geraram arquivos que foram então submetidos à análise pelo programa ArrayVisionTM 8.0 (Imaging Research, Inc.).

Os dados foram analisados e extraídos seguindo as seguintes opções: principal medida, densidade com remoção de artefatos, valor de *background* calculado pela mediana, e desvio padrão com remoção de artefatos.

O protocolo seguido para cálculo do *background*, normalização por fluoróforos, alinhamentos das grades de impressão das sondas e as opções de controle de qualidade foram realizadas como descritas por Ferreira (2006). Os arquivos extraídos foram gravados em arquivo texto de planilhas do MS Excel (Microsoft®) e colocados seus respectivos nomes pela posição de cada gene na lâmina.

III.6.2 Normalização e análise dos dados extraídos

A análise inicial dos dados é baseada nos valores de intensidades de fluorescência do fluoróforo Alexa Fluor® 647 (vermelho) e do fluoróforo Alexa Fluor® 555 (verde) para cada sonda, que serão respectivamente designadas por R (*red*) e G (*green*). Primeiramente foi calculada a razão das intensidades R/G para cada sonda, em cada lâmina de *microarray*. Em seguida, foram calculadas as médias e o coeficiente de variação (desvio padrão relativo à média, $CV = \text{desvio padrão} / \text{média}$) para cada gene, em cada lâmina.

Os pontos cuja razão apresentaram CV maiores que 100% foram recalculados tirando a multiplicata mais distante da média. Este procedimento foi repetido nos casos em que os novos CVs ainda eram maiores que 100%. Se depois da segunda multiplicata retirada ainda persistiu o problema os dados do gene para a lâmina em questão foram descartados.

Seguindo a metodologia descrita por Tseng *et al.* (2001), os dados de CV da razão R/G e a média das intensidades $(R+G)/2$ foram utilizados para descartar os pontos menos confiáveis

estatisticamente. Utilizando subgrupos de 50 genes com médias de intensidade mais próximas ao um determinado gene, a média de intensidade de fluorescência para esse gene foi marcada como estatisticamente não-confiável se o valor do CV correspondente pertencesse aos 5 valores de CV (10%) mais altos dentro do subgrupo de genes. Se pertencesse aos 45 valores de CV inferiores, a média de fluorescência para esse gene foi considerada estatisticamente confiável para as análises posteriores. O procedimento pode ser visto através do gráfico da Figura 16.

Figura 16: CV versus intensidade de média de fluorescência. Os pontos mais escuros indicam o limite de CV para cada intensidade de média de fluorescência, acima dos quais os dados de média de fluorescência dos genes foram marcados como estatisticamente não-confiáveis.

Foi então feita a normalização em cada placa utilizando a metodologia descrita por Dudoit *et al.* (2000), calculando o logaritmo na base dois das médias das razões, M ($M = \log_2[R/G]$), e das intensidades, A ($A = [\log_2 R + \log_2 G] / 2$). Procedeu-se então à normalização dos dados pelo método conhecido como LOWESS (*LOcally WEighted Smoothing System*) ou regressão robusta com pesos locais, realizada através do programa S-PLUS 2000 (Professional MathSoft, Inc., Venables & Ripley, 1998), utilizando 40% como fração local (f). A idéia é obter, como valores das razões normalizadas, os resíduos entre os valores calculados pelo LOWESS e os valores experimentais.

Como o *microarray* compreendia um número limitado de genes e a condição experimental provavelmente afetaria a maioria deles, foi necessário aplicar um peso menor aos genes que apresentaram valores extremos de intensidade de fluorescência e expressão muito induzida ou muito reprimida. A fim de que o peso desses genes não afetasse a análise dos demais, os casos de alta expressão ou repressão tiveram suas intensidades alteradas para situá-los dentre os maiores aglomerados de genes, de modo a afetarem muito pouco a mediana. Dessa forma, apesar de perder alguma precisão na determinação das expressões destes casos, essa técnica possibilita usar uma abrangência dentro de uma faixa aceitável ($25\% = f = 40\%$), tornando o processo menos dependente de artefatos locais sem perder resolução. Uma comparação pode ser vista através das Figuras 17 e 18.

Figura 17: $M(mr)$ versus $A(mpd)$. A linha contínua indica a função LOWESS antes da alteração das intensidades das médias de fluorescências para genes com fluorescências extremas (baixas ou altas) que sofreram grande indução ou repressão (círculos tracejados em azul).

Figura 18: $M(mr)$ versus $A(mpd)$. A linha contínua indica a função LOWESS após a alteração das médias de intensidade de fluorescências dos genes destacados na figura 17. As mudanças conseqüentes no perfil da curva de normalização estão destacadas por círculos azuis.

O agrupamento de genes, segundo o perfil transcricional apresentado durante experimento de limitação de oxigênio foi realizado pelo método conhecido como SOM (*Self Organizing Maps*) por meio do programa GeneCluster v2.1.7 (*Cancer Genomics Group, Whithead/MIT Center for Genome Research*) e por um programa específico, desenvolvido pelo Prof. Dr. João Pedro Simon Farah (Instituto de Química – USP-SP) utilizando a plataforma Metal 1.7.1, que permite uma forma alternativa e mais amigável de visualização dos grupos formados pelo GeneCluster.

III.7 Validação dos dados de *Microarray*.

A validação dos dados de *microarray* foi feita por reação de polimerização em cadeia utilizando-se transcriptase reversa (RT-PCR) com os mesmos RNAs utilizados para realização dos experimentos de *microarray* e com genes específicos escolhidos a partir dos resultados obtidos nesses experimentos.

Os cDNAs foram sintetizados a partir dos RNAs das amostragens durante os experimentos com a variação de oxigênio. A amplificação dos genes de interesse foi também realizada como descrito anteriormente no item III.5.2, apenas diferindo em:

- diluição do cDNA acima citado de 1:20
- volume final da reação que passou a ser de 25µL

Desenvolveu-se eletroforese em gel de agarose 1,0% de 13µL de cada amplificação para comparação com os dados de *microarray*.

IV. RESULTADOS.

Para estudar os efeitos de diferentes concentrações de oxigenação sobre o comportamento transcricional de células humanas em cultura (AS198, MRC-5 e células de ilhotas pancreáticas) foram estudadas as seguintes condições:

- Normóxia (Oxigênio dissolvido – O.D. - 40% da saturação)
- Hipóxia 1 (OD. 10%)
- Hipóxia 2 (OD. 5%)
- Anóxia (OD. 0%)
- Reoxigenação (OD. 40%)

Para isso foi necessário o desenvolvimento de um protocolo para que as células humanas, dependentes de adesão, crescem em um sistema com todas as vantagens da cultura em suspensão. Para isso fizemos o uso de microcarregadores Cytodex 1 como suporte inerte para as células. O estabelecimento dessa técnica foi realizado inicialmente em frascos *spinners* e depois adaptado ao biorreator.

Utilizando-nos apenas das células provenientes de ilhotas pancreáticas, os efeitos dessas condições sobre o perfil transcricional foram examinados através de hibridizações de *microarrays* com aproximadamente 160 genes amplificados de uma mistura de RNAs de fígado humano adulto e de células MRC-5 cujos oligonucleotídeos foram confeccionados utilizando-se seqüências de mRNA do genoma humano, obtidas no banco de dados público GeneBank.

IV.1 Desenvolvimento da cultura de células em um sistema com todas as vantagens da cultura em suspensão.

A cultura inicialmente foi realizada em frascos *spinners* pelo fato que os biorreatores utilizam 12 vezes mais quantidade de meio de cultura, soro fetal bovino e células, sua preparação ser mais trabalhosa, detalhista e mais demorada, além do fato que podemos trabalhar com vários *spinners* em paralelo para facilitar a montagem de um protocolo.

Foram realizados diversos experimentos em *spinners* para a montagem de um protocolo de cultivo celular em microcarregadores Cytodex –1.

Iniciou-se o desenvolvimento do protocolo de crescimento em microcarregadores pela determinação da melhor condição de adesão celular. As células foram crescidas em garrafas até atingirem no total uma concentração mínima de 6×10^6 para 100mL de meio adequado ao tipo celular suplementado com 10% Soro fetal bovino e então tripsinizadas e colocadas nos frascos *spinners*. Após vários testes, escolheu-se a concentração de 1g/L de microcarregadores para o desenvolvimento dos cultivos. Chegou-se também à conclusão que, após o inóculo inicial, os *spinners* deveriam ser incubados em estufa a 37° C; sob atmosfera contendo 5% de CO₂ e saturada de umidade; e com uma rotação inicial de 40rpm por 3 horas. Essa rotação facilita a adesão das células aos microcarregadores sem permitir que esses precipitem. Após essas 3 horas iniciais, a melhor rotação observada para o crescimento celular durante todo o cultivo foi 60rpm.

Uma vez determinada a melhor condição para adesão celular aos microcarregadores, vários experimentos foram realizados com as células AS198, MRC-5 e células de Ilhotas

pancreáticas em diversas condições de cultivo por um período de 9 dias visando verificar o crescimento e o comportamento desses tipos celulares quando aderidos aos microcarregadores. Os valores da contagem celular, preenchimento de microcarregadores e dosagens de glicose e lactato para esses cultivos foram então tabelados e comparados. Com base na comparação dos resultados concluiu-se que a concentração de glicose deveria ser mantida constante em aproximadamente 1g/L para o desenvolvimento de uma cultura em homeostase, sem flutuações metabólicas significativas. As melhores curvas de crescimento obtidas para cada tipo celular são apresentadas nas figuras 19, 20 e 21.

Figura 19: Curva de crescimento obtida para as células AS198 cultivadas em microcarregadores no sistema de frascos *spinners* na melhor condição estabelecida. Apresentam-se a concentração celular (linha vermelha) e o preenchimento dos microcarregadores (colunas).

As células AS198 apresentaram um bom crescimento atingindo uma fase aparentemente inerte quanto ao crescimento celular próximo às 120 horas de cultivo, retomando o crescimento aparente próximo às 149 horas (Figura 19). Considerando o preenchimento dos

microcarregadores observado, cerca de 80-90% permaneceram parcialmente recobertos durante todo o cultivo.

As células MRC-5 apresentaram um ótimo crescimento atingindo uma fase de aparente confluência próximo às 120 horas de cultivo (Figura 20). Cerca de 60-80% dos microcarregadores permaneceram completamente recobertos após aproximadamente 95 horas de cultivo.

Figura 20: Curva de crescimento obtida para as células MRC-5 cultivadas em microcarregadores no sistema de frascos *spinners* na melhor condição estabelecida. Apresentam-se a concentração celular (linha vermelha) e o preenchimento dos microcarregadores (colunas).

As células de ilhotas pancreáticas apresentaram um bom crescimento atingindo uma fase aparentemente inerte quanto ao crescimento celular próximo às 45 horas de cultivo, retomando o crescimento entre 100 e 124 horas (Figura 21). A observação do preenchimento dos

microcarregadores indicou que 80-90% dos mesmos permaneceram parcialmente recobertos durante todo o cultivo.

Figura 21: Curva de crescimento obtida para as células de Ilhotas Pancreáticas cultivadas em microcarregadores no sistema de frascos *spinners* na melhor condição estabelecida. Apresentam-se a concentração celular (linha vermelha) e o preenchimento dos microcarregadores (colunas).

Portanto, conseguimos obter crescimento satisfatório para todas os tipos celulares escolhidos em microcarregadores Cytodex 1 quando cultivados nos frascos *spinners*. Também foi observado que aproximadamente após 120 horas de cultivo estes 3 tipos celulares têm uma tendência de se agruparem em grumos que interfeririam no nosso experimento.

Para confirmarmos que o comportamento das células se manteria no biorreator, uma vez que o escalonamento pode levar a perda dos padrões de comportamento celulares observados nos frascos *spinners*, cultivamos as células MRC-5 e realizamos um cultivo em biorreator para observarmos o seu comportamento. Utilizamos as células MRC-5 por serem células de linhagem tornando-se de mais fácil manipulação. Os resultados obtidos encontram-se na figura 22.

Figura 22: Curva de crescimento obtida para as células MRC-5 cultivadas em microcarregadores no sistema de Biorreator. Apresentam-se a concentração celular (linha vermelha) e o preenchimento dos microcarregadores (colunas).

As células MCR-5 mantiveram o mesmo padrão de crescimento observado nos experimentos com *spinner*, apresentando apenas uma concentração final inferior, o que pode ter sido ocasionado pelo número inferior de células/mL. Com um menor número de células por

microcarregador, o menor contato célula-a-célula pode ter acarretado num menor crescimento global.

Com base nas análises do comportamento das células e em seu crescimento nos microcarregadores, foi escolhido como ponto inicial do experimento, correspondente ao ponto de referência (normóxia), o tempo de 24 horas de cultivo, sendo as subseqüentes alíquotas das condições de estudo retiradas como descrito anteriormente (MATERIAIS E MÉTODOS).

Pelo tempo disponível para este estudo infelizmente foi impossível prosseguir com a realização do experimento com os três tipos celulares. Nesse caso, então, escolhemos a células provenientes de ilhotas pancreáticas, visando a segunda parte dos objetivos deste trabalho de análise do metabolismo primário celular, no qual essas células apresentam maior participação do que as células fibroblásticas. Utilizamos as condições previamente descritas em MATERIAIS E MÉTODOS , com um sistema de cultivo num biorreator contendo 1,2 L de meio de cultura adequado e devidamente suplementado, equipado com eletrodos de pH, oxigênio, analisador de gases (CO_2 e O_2) e fluxômetros de massa (para o controle da vazão de entrada de ar comprimido e N_2).

IV.2 Estudo do nível de transcrição em resposta à limitação de oxigênio.

Os RNAs preparados a partir das amostras coletadas durante o crescimento celular das células de ilhotas pancreáticas em condições de normóxia, hipóxia 1, hipóxia 2, anóxia e re-oxigenação foram quantificados e, então, utilizados na síntese de moléculas de cDNA marcados fluorescentemente, para hibridização de lâminas de *microarray*, como descrito detalhadamente

em MATERIAIS E MÉTODOS. O experimento foi realizado com sucesso em todas as suas etapas duas vezes, com réplicas biológicas distintas.

Após as etapas de hibridização e leitura das fluorescências das lâminas hibridizadas, foram realizadas as extrações dos dados. Um exemplo das lâminas hibridizadas encontra-se na figura 23.

Figura 23: Lâminas de *Microarray* hibridizadas após as leituras realizadas no *scanner* Generation III DNA Scanner. Essas imagens geraram arquivos que foram então submetidos à análise pelo programa ArrayVision™ 8.0 (Imaging Research, Inc.) para extração das intensidades de fluorescência de cada condição.

Como esse *microarray* compreendia um número limitado de genes e a condição experimental provavelmente afetaria a maioria deles, os tratamentos de normalização e estatístico dos dados de fluorescência foram especialmente desenvolvidos pelo Prof. Dr. João Pedro Simon Farah (Departamento de Química Fundamental, Instituto de Química, USP/SP) como descrito em MATERIAIS E MÉTODOS.

O agrupamento de genes, segundo o perfil transcricional apresentado durante experimento de limitação de oxigênio, foi realizado pelo método conhecido como SOM (*Self Organizing Maps*) por meio do programa GeneCluster v2.1.7 (*Cancer Genomics Group, Whithead/MIT Center for Genome Research*). Utilizando os parâmetros de inicialização por vetores aleatórios, busca de vizinhança por bolhas, 500.000 interações com faixa de difusão igual a 42, faixa de aprendizado de 0,1 a 0,005 e faixa de atualização de 5 a 0,5 e fornecendo dados de genes arranjados por via metabólica, foram gerados grupos de genes de comportamento transcricional semelhantes para cada via.

As figuras 24, 25 e 26 apresentam o comportamento desses grupos de genes formados pelo GeneCluster, separados por via metabólica, por meio de um programa específico, também desenvolvido pelo Prof. Dr. Farah utilizando o *software* Metal 1.7.1, que permite uma forma alternativa e mais amigável de visualização dos grupos. Os dados numéricos das respostas às diferentes concentrações de oxigênio se encontram em listas presentes no ANEXO (Tabelas 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 e 11) as quais os genes foram separados nas vias a que pertencem, sendo apresentados os valores das respectivas medianas da razão de expressão (M), conjuntamente com sua identificação e descrição funcional.

Gliconeogênese / Glicólise

Metabolismo Glicogênio

Metabolismo Piruvato

Figura 24: Comportamento transcricional de genes das células de ilhotas pancreáticas do primeiro *microarray* realizado nas diferentes condições de concentração de oxigênio. Nessa figura apresentam-se os grupos de genes, envolvidos nas vias glicolítica e da gliconeogênese, metabolismo do glicogênio e metabolismo do piruvato, que foram agrupados de acordo com seus perfis de expressão através do algoritmo SOM do pacote de análise do programa GeneCluster 2.1.7. A escala corresponde à razão da expressão / $\log_2(M)$.

Figura 25: Comportamento transcricional de genes das células de ilhotas pancreáticas do primeiro *microarray* realizado nas diferentes condições de concentração de oxigênio. Nessa figura apresentam-se os grupos de genes, envolvidos na via das pentoses-fosfato, no TCA e na fosforilação oxidativa, que foram agrupados de acordo com seus perfis de expressão através do algoritmo SOM do pacote de análise do programa GeneCluster 2.1.7. A escala corresponde à razão da expressão / $\log_2(M)$.

Figura 26: Comportamento transcricional de genes das células de ilhotas pancreáticas do primeiro *microarray* realizado nas diferentes condições de concentração de oxigênio. Nessa figura apresentam-se os grupos de genes, envolvidos no metabolismo de lipídios e na morte celular, que foram agrupados de acordo com seus perfis de expressão através do algoritmo SOM do pacote de análise do programa GeneCluster 2.1.7. A escala corresponde à razão da expressão / $\log_2(M)$.

A validação dos dados de *microarray* foi feita por reação de polimerização em cadeia utilizando-se transcriptase reversa (RT-PCR) partindo dos mesmos RNAs totais do segundo cultivo utilizados para realização do segundo experimento de *microarray* e com genes específicos escolhidos a partir dos resultados obtidos nesses experimentos.

Os cDNAs foram sintetizados a partir dos RNAs das amostragens durante os experimentos com a variação de oxigênio, como descrito em MATERIAIS E MÉTODOS. Desenvolveu-se eletroforese em gel de agarose 1,0% de 13μL de cada amplificação para comparação com os dados de *microarray* como mostra a figura 27.

Figura 27: Eletroforese em gel de agarose de reações de RT-PCR para verificação do comportamento transcricional de alguns genes das células de ilhotas pancreáticas apresentados no *microarray* realizado nas diferentes condições de concentração de oxigênio.

V. DISCUSSÃO.

V.1 Desenvolvimento da cultura de células em um sistema com todas as vantagens da cultura em suspensão.

Durante o desenvolvimento do protocolo para que as células humanas, dependentes de adesão, crescessem em um sistema com todas as vantagens da cultura em suspensão utilizando microcarregadores Cytodex 1, foram realizados diversos experimentos em *spinners* dos quais conseguimos obter informações relevantes.

Um fato observado foi que as células de ilhotas pancreáticas e as AS198 não conseguem preencher os microcarregadores de forma tão eficaz quanto a MRC-5, apesar de apresentarem uma curva de crescimento satisfatória. Deve-se lembrar que as células de ilhotas pancreáticas e as AS198 são células de cultura primária e as MRC-5 são células imortalizadas. Conseqüentemente o crescimento das células imortalizadas certamente superaria o crescimento das células de cultura primária. Isso não constituiu um grande problema nesse trabalho, uma vez que precisávamos apenas de uma concentração celular adequada para a extração de RNA durante as fases de normóxia, hipóxia 1, hipóxia 2, anóxia e re-oxigenação; portanto poderia retirar-se uma alíquota maior dessas células de cultura primária do que das células transformadas durante o experimento.

Observando as curvas de crescimento dos três tipos celulares optamos por utilizar as células 24 horas após o inóculo inicial por três motivos principais: 1) nesse tempo todos os três tipos celulares apresentam um bom crescimento, 2) após aproximadamente 120 horas os microcarregadores e as células começam a formar grumos, perdendo a característica do experimento que é uma oxigenação homogênea para todas as células presentes no biorreator – figura 28, e 3) menor manipulação levando a um menor risco de contaminação.

Figura 28: : Após 120 horas de cultivo, as células começam a formar grumos com os microcarregadores, inviabilizando uma oxigenação homogênea, característica de cultivo imprescindível ao experimento de resposta à variação da concentração de oxigênio disponível.

Após a preparação de protocolo eficaz, este foi escalonado para o biorreator, e, como visto em RESULTADOS, apresentou um bom funcionamento na nova escala, mantendo as características observadas em *spinners*.

Pelo tempo disponível para este estudo infelizmente foi impossível prosseguir com a realização do experimento de análise do perfil transcricional frente à variação da oxigenação da cultura com as três linhagens celulares. Nesse caso, escolhemos então a células provenientes de ilhotas pancreáticas, preparadas e fornecidas pelo laboratório da Profa. Dra. Mari Cleide Sogayar (Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, USP-SP), considerando-se os seguintes motivos. Em função do objetivo de análise do metabolismo primário celular, essas células apresentam maior importância do que as células fibroblásticas, visto sua função fisiológica. Além do mais, por serem de baixa passagem mantêm suas principais características, como a secreção de insulina, que influencia o metabolismo energético e de lipídios. Por fim, as ilhotas

pancreáticas são utilizadas para transplantes pelo laboratório da Profa. Dra. Sogayar. O estresse sofrido por falta de oxigenação é proporcional ao tempo utilizado para retirada do pâncreas, extração e preparo das ilhotas pancreáticas. Esse estresse por falta de oxigênio reflete-se então na viabilidade celular, característica crucial para o transplante.

V.2 Estudo do nível de transcrição em resposta à limitação de oxigênio.

O experimento como um todo foi realizado, com sucesso em todas as etapas, duas vezes com réplicas biológicas distintas.

Como o *microarray* compreendia um número limitado de genes e a condição experimental provavelmente afetaria a maioria deles, foi necessário o desenvolvimento, pelo Professor Dr. João Pedro Simon Farah, de um programa para normalizar e analisar os dados utilizando-se da técnica de LOWESS modificada a fim de aplicar um peso menor aos genes que apresentaram valores extremos de intensidade de fluorescência e expressão muito induzida ou muito reprimida. Para que o peso desses genes não afetasse a análise dos demais, os casos de alta expressão ou repressão tiveram suas intensidades alteradas para situá-los dentre os maiores aglomerados de genes, de modo a afetarem muito pouco a mediana. Apesar de perder alguma precisão na determinação das expressões destes casos, essa técnica possibilita usar uma abrangência dentro de uma faixa aceitável ($25\% = f = 40\%$), tornando o processo menos dependente de artefatos locais, sem perder resolução. Dessa forma, traçamos então o perfil do comportamento dos genes nas determinadas vias metabólicas ao invés de discriminarmos os genes como diferencialmente expressos em cada condição.

O oxigênio foi destacado na INTRODUÇÃO desta dissertação como uma substância que exerce papel fundamental no metabolismo de produção de energia em praticamente todos os

organismos. Por este motivo, é de extrema importância que estes organismos tenham como modular e re-programar funções essenciais de seu metabolismo de acordo com a disponibilidade de oxigênio.

V.2.1 Metabolismo Energético.

A adaptação à hipóxia no nível celular aumenta a eficiência das vias produtoras de energia, estimulando a glicólise anaeróbica e reduzindo processos que consomem energia.

Em mamíferos, os genes das enzimas glicolíticas, fosfofrutoquinase, aldolase, fosfogliceroquinase, enolase, lactato desidrogenase e gliceraldeído-fosfato desidrogenase são induzidos por HIF-1 cujo sítio de ligação está presente em seus promotores (Webster, 2003). Em nossos experimentos de *microarray* esse comportamento foi verificado em alguns genes sendo que uns aumentavam sua expressão já na primeira condição de hipóxia (10% saturação de oxigênio), lactato desidrogenase D variantes 1 e 2 (LDHD1, LDHD2), enquanto outros somente a partir da segunda condição de hipóxia (5% saturação de oxigênio): fosfofrutoquinase (PFKL), aldolase A (ALDOA) e enolase (ENO1). Na condição de anóxia foi observada uma repressão da maioria dos genes, adotando um comportamento na re-oxigenação de retorno a níveis de transcrição próximos aos da condição normal de aeração (40% saturação de oxigênio). Esses resultados são ilustrados nas figuras 24, 29 e 30.

Em condições limitantes de oxigênio, verificou-se primeiramente uma diminuição dos transcritos das enzimas do TCA, que é indício da modulação negativa que deve ocorrer no metabolismo energético dessas células para que elas possam se adequar a uma condição em que a capacidade de produção de energia é limitada. Alguns genes responderam com uma redução da sua transcrição já na primeira condição de hipóxia e outros somente na segunda (Figura 25).

Sugerindo o mecanismo de que, quando a oferta de oxigênio não é suficiente para suprir a demanda por ATP através da respiração, a glicose pode ser utilizada por meio do metabolismo anaeróbico com a redução de piruvato a lactato, observamos que as enzimas acetil-coA sintetase (ACAS2) e lactato desidrogenase D (LDHD1 e LDHD2) apresentaram um perfil de repressão e indução, respectivamente (Figuras 24 e 29).

Em condições normais de aeração, a fosforilação oxidativa é a fonte principal de energia em células eucarióticas multicelulares. Sob condições de hipóxia, entretanto, uma mudança metabólica desativa o transporte de elétrons na mitocôndria e ativa o metabolismo anaeróbico. Sem esta mudança, as células teriam um déficit imediato de energia e sofreriam danos por falta de ATP. Interessantemente nesse estudo genes pertencentes ao complexo NADH desidrogenase tiveram sua transcrição aumentada durante a primeira ou segunda condição de hipóxia, seguido de uma inibição da mesma em anóxia e um retorno próximo aos níveis usuais na re-oxigenação (Figura 25).

Em anóxia foi observada uma repressão do metabolismo energético como um todo indicando que as células seriam incapazes de sobreviver na ausência de oxigênio (Figura 30). Devido à escassez de informações a respeito da resposta de células de mamíferos a condições de anóxia, esses resultados obtidos podem fornecer informações relevantes em relação a como a expressão desses genes é afetada por condições de hipóxia / anóxia / re-oxigenação em células humanas.

Figura 30: Comportamento transcripcional de genes do metabolismo energético de células de ilhotas pancreáticas do primeiro *microarray* na condição de Anóxia. Nessa figura apresentam-se seus perfis de expressão demonstrados por meio da coloração verde para genes reprimidos e vermelha para induzidos, genes sem coloração não sofreram mudança significativa. Os substratos e intermediários são apresentados em *itálico*. Figura da fosforilação oxidativa adaptada de *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*; www.genome.ad.jp/kegg/.

V.2.2 Metabolismo de Lipídios / Esteróis.

Hughes *et al.* (2005) descreveram a indução de vários genes hipóxicos por Sre1 (gene homólogo ao *SREBP* em *S. pombe*) durante a inibição da síntese de esteróis, incluindo genes que influenciam o metabolismo energético; condições de anóxia, por sua vez, induziram a clivagem de Sre1, do mesmo modo que a falta de esteróis.

Nosso laboratório analisou o padrão de expressão de aproximadamente 2.000 genes do fungo filamentoso *Trichoderma reesei* (Bonaccorsi *et al.*, 2006) em cultura sob diferentes concentrações de oxigênio. Genes homólogos a *SREBP* e *SCAP* foram identificados em *T. reesei* e denominados, respectivamente, *Trsrebp* e *Trscap*. Foi observado que o gene *Trscap* foi fortemente induzido em condições de hipóxia / anóxia, sugerindo que um sistema sensor de oxigênio semelhante ao de *S. pombe* possa atuar em *T. reesei*. Interessantemente os resultados obtidos neste trabalho também indicam uma forte indução de *SCAP* em hipóxia e anóxia.

Outros genes envolvidos na síntese de esteróis, tiveram um padrão de indução observado ao longo da diminuição da concentração de oxigênio.

V.2.3 Genes envolvidos em Morte Celular.

Como descrito por Kaplowitz. (2000) e Patel e Gores (1998), a caspase 3, envolvida no processo de apoptose, pode amplificar a cascata de proteólise pela ativação da caspase 8 e pela clivagem da proteína anti-apoptótica Bcl-2, que normalmente garante a integridade da membrana mitocondrial. De acordo com nossos resultados, a caspase 3 teve um padrão de indução logo na primeira condição de hipóxia (10% saturação de oxigênio), enquanto o perfil de transcrição do gene da proteína Bcl-2 indica a repressão de sua expressão. Isso pode levar a uma possível

abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial (MPTP), que se mantém habitualmente fechado, resultando na morte celular. É importante ressaltar que com a falta de oxigênio, a fosforilação oxidativa diminui e a produção de ATP pára, ou decai. Inicia-se o processo de glicólise anaeróbia, com acúmulo de ácido láctico e fosfatos inorgânicos. Quando a célula é novamente oxigenada, o oxigênio pode reagir com esses resíduos e formar radicais livres. Esses radicais livres constituem outro estímulo para a abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial (Pessayre *et al.*, 1999).

Em nosso trabalho o fator nuclear κ B (NF κ B) mostrou-se induzido em hipóxia, podendo indicar uma sinalização mediada por citocinas também favorecendo a morte celular. Esse fator de transcrição (NF κ B), juntamente com outros fatores de transcrição, como a proteína que se liga ao elemento de resposta de AMP (CREB), a proteína ativadora-1 (AP-1), o fator nuclear γ B (NF γ B) e a proteína Egr-1, foram descritos por Webster, (2003) como estando envolvidos na alteração da expressão gênica induzida por hipóxia.

VI. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS.

Neste trabalho foi realizado o estudo da expressão, no nível transcricional, dos genes envolvidos nas vias metabólicas primárias e genes envolvidos em morte celular, em células humanas, com o intuito de determinar as alterações no metabolismo energético em resposta a condições de hipóxia e anóxia. O projeto de pesquisa foi desenvolvido em duas etapas.

Durante a primeira etapa, realizamos uma adaptação de um protocolo de crescimento das células MRC-5 aderidas aos microcarregadores Cytodex 1, colocados em suspensão. Posteriormente, desenvolvemos um protocolo de crescimento de células AS198 e células de ilhotas pancreáticas também aderidas aos microcarregadores em biorreator.

Uma vez estabelecido o protocolo de cultura de ilhotas pancreáticas em biorreator, iniciamos a análise do perfil transcricional dos genes escolhidos, frente às condições de baixa tensão de oxigênio. Durante essa segunda etapa, foi analisada a expressão gênica de aproximadamente 160 genes em que se verificou: i) um perfil de indução daqueles envolvidos no metabolismo de lipídios e esteróis, como por exemplo SCAP que foi fortemente induzido em condições de hipóxia / anóxia, sugerindo um possível sistema sensor de oxigênio; ii) um perfil de indução inicial nos estados de hipóxia que sugere uma rápida mudança no metabolismo, de aeróbico para anaeróbico, e supressão de reações que consomem energia; seguido de repressão do metabolismo energético como um todo no estado de anóxia mostrando que as células seriam incapazes de sobreviver na ausência de oxigênio; iii) um padrão de expressão dos genes associados com a morte celular cuja tendência seria a de comprometer a viabilidade celular com a diminuição da concentração de oxigênio.

Em vista dos dados obtidos é de interesse ressaltar que essas células deveriam ser mantidas em saturações de oxigênio acima de 5% para evitar o efeito deletério observado da baixa concentração de oxigênio sobre a viabilidade celular, em termos da indução de genes envolvidos na morte celular e da repressão geral dos relacionados ao metabolismo energético. Também foi verificado que, em saturações de oxigênio de até 10%, as células adotaram um padrão transcricional que indicou uma resposta ao estresse por falta de oxigênio, este por sua vez reflete-se na viabilidade celular, característica crucial para o sucesso do transplante clínico de ilhotas.

Visto que as ilhotas pancreáticas desempenham um papel regulatório complexo no metabolismo de todo o organismo, para um melhor entendimento de sua regulação da expressão gênica serão necessários novos estudos mais detalhados envolvendo também a variação de outros fatores, como concentração de glicose, que incitem uma resposta fisiológica desse tipo celular.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMES, B.N., Shigenaga, M.K., Hagen, T.M. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90,7915-22. 1993.
- BEHROOZ, A, ISMAIL-BEIGI, F. Stimulation of Glucose Transport by Hypoxia: Signals and Mechanisms. *News Physiol Sci.*, 14,105-110. 1999.
- BONACCORSI, Eric D'Alessandro. *Regulação da expressão gênica por oxigênio em microorganismos eucariotos: Análises de ESTs ("Expressed Sequence Tags") e "microarrays" de cDNA de Trichoderma reesei*. São Paulo, 2003. Tese de Doutorado em Ciências Biológicas (Bioquímica). Universidade de São Paulo.
- BONACCORSI, E.D., Ferreira, A.J., Chambergo, F.S., Ramos, A.S., **Mantovani, M.C.**, Farah, J.P., Sorio, C.S., Gombert, A.K., Tonso, A., El-Dorry, H. – "Transcriptional response of the obligatory aerobic *Trichoderma reesei* to hypoxia and transient anoxia: implications for energy production and survival in the absence of oxygen.", *Biochemistry*, vol. 45, p. 3912 – 3924 (2006).
- BOREM, A & VIEIRA, M.L.C Glossário de Biotecnologia, 1ªed., Editora Folha de Viçosa, São Paulo, Brasil. 2005.
- BROWN, M.S. and GOLDSTEIN, J.L. A proteolytic pathway that controls the cholesterol content of membranes, cells, and blood. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 28;96(20):11041-8. 1999.
- BUNN, H.F., POYTON, R.O. Oxygen sensing and molecular adaptation to hypoxia. *Physiol. Rev.*, 76,839-885. 1996.
- CALHOUN, M.W., Oden, K.L., Gennis, R.B., de Mattos, M.J., Neijssel, O.M. Energetic efficiency of *Escherichia coli*: effects of mutations in components of the aerobic respiratory chain. *J. Bacteriol.* 175,3020-5. 1993.
- CHAMBERGO, Felipe Santiago. *Elucidación do destino metabólico de glicose no fungo filamentoso Trichoderma reesei por análise EST ("Expressed Sequence Tags") e "microarrays" de cDNA*. São Paulo, 2003. Tese de Doutorado em Ciências Biológicas (Bioquímica). Universidade de São Paulo.
- CHAMBERGO, F. S.; Bonaccorsi, E. D.; Ferreira, A. J.; Ramos, A. S.; Ferreira JR, Junior JR.; Abrahao-Neto, J.; Farah, J. P. and El-Dorry, H. Elucidation of the Metabolic Fate of Glucose in the Filamentous Fungus *Trichoderma reesei* Using Expressed Sequence Tag (EST) Analysis and cDNA Microarrays. *J Biol Chem.* Apr 19; 277 (16): 13983-8. 2002.

- CUEZVA, J.M., Krajewska, M., de Heredia, M.L., Krajewski, S., Santamaria, G., Kim, H., Zapata, J.M., Marusawa, H., Chamorro, M., Reed, J.C. The bioenergetic signature of cancer: a marker of tumor progression. *Cancer Res.* 15,6674-81. 2002.
- DAGSGAARD, C., Taylor, L.E., O'Brien, K.M., Poyton, R.O. Effects of anoxia and the mitochondrion on expression of aerobic nuclear COX genes in yeast: evidence for a signaling pathway from the mitochondrial genome to the nucleus. *J. Biol. Chem.* 276,7593-601. 2001.
- DANG, C.V., SEMENZA, G.L. Oncogenic alterations of metabolism. *Trends Biochem Sci.* 24 68-72. 1999.
- DUDOIT, Y., Yang, Y.H., Callow, M.J., Speed, T.P. Statistical methods for identifying differentially expressed genes in replicated cDNA microarray experiments. Technical Report 578, Department of Statistics, UC Berkeley, CA. 2000.
- EBERLE, D., Hegarty, B., Bossard, P., Ferre, P., Foulle, F. SREBP transcription factors: master regulators of lipid homeostasis. *Biochimie.* Nov;86(11):839-48. Review. 2004.
- FELDMANN, G., Haouzi, D., Moreau, A., Durand-Schneider, A-M., Bringuier, A., Berson, A., Mansouri, A., Fau, D., Pessayre, D. Opening of the mitochondrial permeability transition pore causes matrix expansion and outer membrane rupture in Fas-mediated hepatic apoptosis in mice. *Hepatology.* 31,674-83. 2000.
- FERREIRA, Ari José Scatone. *Regulação da resposta transcricional a estresses ambientais em fungos: Análises de "microarrays" de cDNA de Trichoderma reesei*. São Paulo, 2006. Tese de Doutorado em Ciências Biológicas (Bioquímica). Universidade de São Paulo.
- FITTON, V., Rigoulet, M., Ouhabi, R., Guerin, B. Mechanistic stoichiometry of yeast mitochondrial oxidative phosphorylation. *Biochemistry.* 16, 9692-8. 1994.
- HOCHACHKA, P.W., Buck, L.T., Doll, C.J., Land, S.C. Unifying theory of hypoxia tolerance: molecular/metabolic defense and rescue mechanisms for surviving oxygen lack. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93,9493-8. 1996.
- HUGHES, A.L., Todd, B.L., Espenshade, P.J. SREBP pathway responds to sterols and functions as an oxygen sensor in fission yeast. *Cell.* 120(6):831-42. 2005.
- HUSCHTSCHA, L.I., HOLLIDAY, R. Limited and unlimited growth of SV40-transformed cells from human diploid MRC-5 fibroblasts. *J Cell Sci.*, 63,77-99. 1983.
- IRANI, K., Xia, Y., Zweier, J.L., Sollott, S.J., Der, C.J., Fearon, E.R., Sundaresan, M., Finkel, T., Goldschmidt-Clermont, P.J. Mitogenic signaling mediated by oxidants in Ras-transformed fibroblasts. *Science* 275,1649-52. 1997.

- JACOBS, J.P., JONES, C.M., J. P. Baille, J.P. Characteristics of a Human Diploid Cell Designated MRC-5. *Nature*. 227, 168 – 170. 11 July 1970.
- JANNINI, P., & JANNINI, P.F. Interpretação Clínica do Hemograma, 10ªed. P22-29, Editora Sarvier, São Paulo, Brasil. 1995.
- JOHNSTON, M. Feasting, fasting and fermenting. Glucose sensing in yeast and other cells. *Trends Genet*. 15,29-33. 1999.
- KAPLOWITZ, N. Cell death at the millennium. Implications for liver diseases. *Clin Liver Dis*. 4,1-23. 2000.
- KELLY, J.M., Drysdale, M.R., Sealy-Lewis, H.M., Jones, I.G., Lockington, R.A. Alcohol dehydrogenase III in *Aspergillus nidulans* is anaerobically induced and post-transcriptionally regulated. *Mol. Gen. Genet*. 222,323-8. 1990.
- KIETZMANN, T., Krones-Herzig, A. & Jungermann, K. Signaling cross-talk between hypoxia and glucose via hypoxia-inducible factor 1 and glucose response elements, *Biochem Pharmacol*. 64, 903-11. 2002.
- KWAST, K. E., Lai, L. C., Menda, N., James, D. T., 3rd, Aref, S. & Burke, P. V. Genomic analyses of anaerobically induced genes in *Saccharomyces cerevisiae*: functional roles of Rox1 and other factors in mediating the anoxic response, *J Bacteriol*. 184, 250-65. . 2002.
- LE QUYNH-THU, N. C. Denko, et al. Hypoxic gene expression and metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 23(3-4): 293-310. 2004.
- MAZUREK, S., Boschek, C.B., Eigenbrodt, E. The role of phosphometabolites in cell proliferation, energy metabolism, and tumor therapy. *J. Bioenerg. Biomembr*. 29,315-30. 1997.
- MICHIELS, C.. Physiological and pathological responses to hypoxia. *Am J Pathol* 164(6): 1875-82. 2004.
- MOLDOVAN, S., BRUNICARDI, F.C. Endocrine pancreas: summary of observations generated by surgical fellows. *World J Surg*. Apr;25(4):468-73. Review. 2001.
- PATEL, T., GORES, G.J. Apoptosis in liver transplantation: a mechanism contributing to immune modulation, preservation injury, neoplasia, and viral disease. *Liver Transplant Surg*. 4, 42-50. 1998.
- PEDERSEN, P.S., Frederiksen, O., Holstein-Rathlou, N.H., Larsen, P.L., Qvortrup, K. Ion transport in epithelial spheroids derived from human airway cells. *Am. J. Physiol*. 276,L75-80. 1999.

- PESSAYRE, D., Haouzi, D., Fau, D., Robin, M.A., Mansouri, A., Berson, A. Withdrawal of life support, altruistic suicide, fratricidal killing and euthanasia by lymphocytes: different forms of drug-induced hepatic apoptosis. *J Hepatol.* 31,760-70. 1999.
- PFEIFFER, T., Schuster, S., Bonhoeffer, S. Cooperation and competition in the evolution of ATP-producing pathways. *Science* 292,504-7. 2001.
- PHARMACIA: Microcarrier cell culture-principle and method. Uppsala, Sweden: *Pharmacia LKB Biotechnology*; 1991.
- POYTON, R.O. Models for oxygen sensing in yeast: implications for oxygen-regulated gene expression in higher eucaryotes. *Respir. Physiol.* 115,119-33. 1999.
- RATCLIFFE, P.J., O'Rourke, J.F., Maxwell, P.H., Pugh, C.W. Oxygen sensing, hypoxia-inducible factor-1 and the regulation of mammalian gene expression. *J. Exp. Biol.* 201,1153-62. 1998.
- SEMENZA, G. L., Roth, P. H., Fang, H. M. & Wang, G. L. Transcriptional regulation of genes encoding glycolytic enzymes by hypoxia-inducible factor 1, *J Biol Chem.* 269, 23757-63. 1994.
- SEMENZA, G. L., Agani, F., Iyer, N., Jiang, B. H., Leung, S., Wiener, C. & Yu, A. Hypoxia-inducible factor 1: from molecular biology to cardiopulmonary physiology, *Chest.* 114, 40S-45S. 1998.
- SCHENA, M., Shalon, D., Davis, R.W., Brown, P.O. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science.* Oct 20;270(5235):467-70. 1995.
- SHIGENAGA, M.K., Hagen, T.M., Ames, B.N. Oxidative damage and mitochondrial decay in aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91,10771-8. 1994.
- TSENG, G.C., Oh, M.K., Rohlin, L., Liao, J.C., Wong, W.H.. Issues in cDNA microarray analysis: quality filtering, channel normalization, models of variations and assessment of gene effects. *Nucleic Acids Res.* Jun 15;29(12):2549-57. 2001.
- VAULONT, S., Vasseur-Cognet, M., Kahn, A. Glucose regulation of gene transcription. *J Biol Chem.* 13, 31555-8. 2000.
- VENABLES, W.N., RIPLEY, B.D. Modern Applied Statistics with S-PLUS, 2nd Edn. Springer, New York, NY. 1998.
- WEBSTER, K. A. Evolution of the coordinate regulation of glycolytic enzyme genes by hypoxia. *J Exp Bio.l* 206 (Pt 17), 2911-22. 2003.

- WENGER, R. H. Cellular adaptation to hypoxia: O₂-sensing protein hydroxylases, hypoxia-inducible transcription factors, and O₂-regulated gene expression, *Faseb J.* 16, 1151-62. 2002.
- WU, S.C., Liu, C.C., Lian, W.C. Optimization of microcarrier cell culture process for the inactivated enterovirus type 71 vaccine development. *Vaccine*, 28;22(29-30):3858-64. 2004.
- YAMAURA, G., Turoczi, T., Yamamoto, F., Siddqui, M. A., Maulik, N., Das, D. K. STAT signaling in ischemic heart: a role of STAT5A in ischemic preconditioning. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 285:H476–H482. 2003.
- YOKOMIZO, A. Y., M. M. Antoniazzi, *et al.* Rabies virus production in high vero cell density cultures on macroporous microcarriers. *Biotechnol Bioeng* 85(5): 506-15. 2004.
- ZIEGLER, A., von Kienlin, M., Decorps, M., Remy, C. High glycolytic activity in rat glioma demonstrated in vivo by correlation peak ¹H magnetic resonance imaging. *Cancer Res.* 15, 5595-600. 2001.

APÊNDICE

Tabela 1: Transcritos dos genes estudados.

TRANSCRITOS ANALISADOS	SIGLA	CÓDIGO GENE BANK
Homo sapiens fator de necrose tumoral, proteína 3 a-induzida	A20	gi 26051241
Homo sapiens acetoacetil-coA sintase	AACS	gi 31982926
Homo sapiens cassete de ligação do ATP, sub-família G, membro 5	ABCG5	gi 14141174
Homo sapiens cassete de ligação do ATP, sub-família G, membro 8	ABCG8	gi 34452700
Homo sapiens acetil-coA aciltransferase 2	ACAA2	gi 5174428
Homo sapiens acetil coA carboxilase a	ACACA	gi 38679979
Homo sapiens acil-coA dehidrogenase cadeia longa	ACADL	gi 46488924
Homo sapiens acil-coA dehidrogenase, cadeia em linha reta C4 – C12	ACADM	gi 21327681
Homo sapiens acil-coA dehidrogenase, cadeia curta C2 - C3	ACADS	gi 4557232
Homo sapiens acil coenzima A sintetase cadeia curta membro 2	ACAS2	gi 21269869
Homo sapiens acetil coA acetiltransferase 1	ACAT1	gi 31563501
Homo sapiens ATP citrato liase, variante 1	ACLY	gi 38569420
Homo sapiens aconitase 1 (solúvel)	ACO1	gi 8659554
Homo sapiens aconitase 2 (mitocondrial)	ACO2	gi 4501866
Homo sapiens acil-coA oxidase 1, variante 1	ACOX1	gi 34304338
Homo sapiens acil-CoA sintetase cadeia longa membro 1	ACSL1	gi 40807490
Homo sapiens acil-coA sintetase de cadeia longa, membro 3, variante 1	ACSL3	gi 42794751:452-2614
Homo sapiens acil-coA sintetase de cadeia longa, membro 5, variante 1	ACSL5	gi 42794755:113-2332
Homo sapiens álcool desidrogenase 1, polipeptídeo alfa	ADH1A	gi 11496886
Homo sapiens amilo-1,6 glucosidase,4 alfa glucanotransferase, variante 1	AGL	gi 4557276
Homo sapiens aldocetoreductase família 1, membro A1	AKR1A1	gi 24497575

Homo sapiens aldeído desidrogenase 1	ALDH1A1	gi 25777722
Homo sapiens Aldolase A, frutose bifosfatase, variante 1	ALDOA	gi 34577108
Homo sapiens Aldolase B, frutose bifosfatase	ALDOB	gi 40354204
Homo sapiens Aldolase C, frutose bifosfatase	ALDOC	gi 4885062
Homo sapiens arginase tipo II	ARG2	gi 52426739
Homo sapiens proteína X associada a BCL2	BAX	gi 34335114
Homo sapiens célula-B CLL/linfoma 2, variante a	BCL-2	gi 4557354
Homo sapiens caspase 1	CASP1	gi 15431327
Homo sapiens caspase 3	CASP3	gi 14790118
Homo sapiens citocromo c oxidase subunidade IV, isoforma 1	COX4I1	gi 17017985
Homo sapiens citocromo c oxidase subunidade IV, isoforma 2	COX4I2	gi 17999525
Homo sapiens carnitina palmitoiltransferase 1A	CPT1A	gi 73623029
Homo sapiens citrato sintase, variante 1	CS	gi 38327624
Homo sapiens citocromo c-1	CYC1	gi 21359866
Homo sapiens 7dehidrocolesterol redutase	DHCR7	gi 4503320
Homo sapiens homólogo a diablo (Drosophila), variante 1	DIABLO	gi 42544195
Homo sapiens dihidrolipoamida S-acetiltransferase	DLAT	gi 31711991
Homo sapiens dihidrolipoamida desidrogenase	DLD	gi 5016092
Homo sapiens dihidrolipoamil S-succiniltransferase	DLST	gi 32307170
Homo sapiens enoil-coA hidratase, cadeia curta, 1	ECHS1	gi 12707569
Homo sapiens enoil-coA, hidratase/ 3-hidroxiacil Coenzima A desidrogenase	EHHADH	gi 68989262
Homo sapiens fator eucariótico iniciador da tradução 4 [?] , 2	EIF4G2	gi 4503538
Homo sapiens enolase 1	ENO1	gi 16507965
Homo sapiens proteína quinase 12 mitogen-activated (MAPK12)	ERK-3	gi 48255969
Homo sapiens ácidos graxos 2-hidroxilase	FA2H	gi 33636751

Homo sapiens desta-5 ácido graxo desaturase	FADSD5	gi 14141179
Homo sapiens delta-6 ácido graxo desaturase	FADSD6	gi 4406527:14-1348
Homo sapiens superfamília receptor TNF, membro 6	FAS	gi 23510419
Homo sapiens ligante de FAS	FASL	gi 4557328
Homo sapiens frutose 1,6bifosfatase 1	FBP1	gi 16579887
Homo sapiens frutose 1,6bifosfatase 2	FBP2	gi 22907027
Homo sapiens squalene sintase	FDFT1	gi 67089146
Homo sapiens farnesil difosfato sintase	FDPS	gi 41281370
Homo sapiens fumarato hidratase	FH	gi 19743874
Homo sapiens glicose 6 fosfato, catalítica	G6PC	gi 4557598
Homo sapiens glicose 6 fosfato desidrogenase	G6PD	gi 21614519
Homo sapiens glicosidase alfa	GAA	gi 11496988
Homo sapiens gliceraldeído 3 fosfato desidrogenase	GAPD	gi 7669491
Homo sapiens growth arrest-specific 5	GAS5	gi 10438485
Homo sapiens growth arrest-specific 6	GAS6	gi 4557616
Homo sapiens glucan (1,4-alpha-), branching enzyme 1	GBE1	gi 4557618
Homo sapiens glicerol-3-fosfato aciltransferase	GPAM	gi 40254942
Homo sapiens glicose fosfato isomerase	GPI	gi 18201904
Homo sapiens glutationa peroxidase 1, variante 1	GPX1	gi 41406083
Homo sapiens glicogênio sintase quinase 3 beta	GSK3B	gi 21361339
Homo sapiens glicogênio sintase, fígado	GYS2	gi 40254814
Homo sapiens hexose 6 fosfato desidrogenase	H6PD	gi 4758497
Homo sapiens hidroxibutirato desidrogenase	HIBADH	gi 41393565
Homo sapiens hexoquinase 1, variante 1	HK1	gi 4504390
Homo sapiens HMG-coA redutase	HMGCR	gi 4557642
Homo sapiens HMG-coA sintase	HSCOAS	gi 30008
Homo sapiens 17-β-hidroxiesteroide desidrogenase-7	HSD17B7	gi 50593017

Homo sapiens proteína 1 de heat shock 27kDa	HSP 27	gi 4996892
Homo sapiens proteína 4 de heat shock 70kDa, variante 1	HSP 70	gi 38327038
Homo sapiens NAD(P) esteróide dependente desidrogenase-like	HSPC105	gi 21553310
Homo sapiens lanosterol 14 a-demetilase	HUML14D	gi 871882
Homo sapiens isocitrato desidrogenase 2 (mitochondrial)	IDH2	gi 28178831
Homo sapiens isocitrato desidrogenase 3 alfa	IDH3A	gi 28178835
Homo sapiens isocitrato desidrogenase 3 beta, variante 1	IDH3B	gi 28178820
Homo sapiens isocitrato desidrogenase 3 gama, variante 1	IDH3G	gi 28178836
Homo sapiens isopentenil-difosfato ? isomerase	IDI1	gi 40018632
Homo sapiens conserved helix-loop-helix ubiquitous kinase	IkBa	gi 62241000
Homo sapiens óxido nítrico sintase 2A, variante 1	iNOS	gi 24041028
Homo sapiens gene induzido por insulina 1, variante 1	INSIG1	gi 38327527
Homo sapiens Janus quinase 2	JAK-2	gi 13325062
Homo sapiens lactato desidrogenase A	LDHA	gi 5031856
Homo sapiens lactato desidrogenase B	LDHB	gi 22726178
Homo sapiens lactato desidrogenase D, variante 1	LDHD1	gi 37595753
Homo sapiens lactato desidrogenase D, variante 2	LDHD2	gi 37595755
Homo sapiens receptor de lipoproteína de baixa densidade	LDLR	gi 8051613
Homo sapiens lanosterol sintase, variante 1	LSS	gi 47933394
Homo sapiens MAP quinase fosfatase 2	MAPKP2	gi 58331238
Homo sapiens malato desidrogenase 1 (solúvel)	MDH1	gi 21735619
Homo sapiens malato desidrogenase 2 (mitochondrial)	MDH2	gi 21735620
Homo sapiens enzima málica 1	ME1	gi 13435400
Homo sapiens enzima málica 2	ME2	gi 62953132
Homo sapiens superóxido dismutase 2, variante 1	MnSOD	gi 67782304

Homo sapiens mevalonato pirofosfato descarboxilase	MVD	gi 4505288
Homo sapiens mevalonato quinase	MVK	gi 4557768
Homo sapiens proproteína convertase subtilisina/kexina tipo 9	NARC1	gi 31317306
Homo sapiens NADH desidrogenase (ubiquinona) subcomplexo alfa 1, 10	NDUFA10	gi 33519462
Homo sapiens NADH desidrogenase (ubiquinona) subcomplexo alfa 1, 4	NDUFA4	gi 33519463
Homo sapiens NADH desidrogenase (ubiquinona) subcomplexo alfa 1, 5	NDUFA5	gi 13699821
Homo sapiens NADH desidrogenase (ubiquinona) subcomplexo alfa 1, 6	NDUFA6	gi 20070136
Homo sapiens NADH desidrogenase (ubiquinona) subcomplexo alfa 1, 8	NDUFA8	gi 33519464
Homo sapiens NADH desidrogenase (ubiquinona) subcomplexo alfa 1, 9	NDUFA9	gi 39725687
Homo sapiens NADH desidrogenase (ubiquinona) subcomplexo beta 1, 10	NDUFB10	gi 4758773
Homo sapiens NADH desidrogenase (ubiquinona) subcomplexo beta 1, 5	NDUFB5	gi 33519567
Homo sapiens NADH desidrogenase (ubiquinona) subcomplexo beta 1, 9	NDUFB9	gi 6274549
Homo sapiens NADH desidrogenase (ubiquinona) Fe-S proteína 1	NDUFS1	gi 33519474
Homo sapiens fator nuclear do polipeptideo kappa light gene enhancer em células B 1	NFkB	gi 34577121
Homo sapiens oxoglutarato desidrogenase	OGDH	gi 4505492
Homo sapiens proteína quinase 14 mitogen-activated (MAPK14), variante 1	P38 MAPK	gi 4503068
Homo sapiens piruvato carboxilase	PC	gi 33871110
Homo sapiens fosfoenolpiruvato carboxiquinase	PCK1	
Homo sapiens piruvato desidrogenase beta	PDHB	gi 4505686
Homo sapiens 6fosfofrutoquinase2/frutose2,6bifosfatase1	PFKFB1	gi 4505744
Homo sapiens fosfofrutoquinase, fígado	PFKL	gi 21361069
Homo sapiens fosfoglicerato mutase 1	PGAM1	gi 31543395
Homo sapiens fosfogluconato desidrogenase	PGD	gi 4006851

Homo sapiens fosfogliceratoquinase 1	PGK1	gi 22095338
Homo sapiens 6 fosfogluconolactonase	PGLS	gi 42794610
Homo sapiens piruvato quinase, variante 1	PKLR	gi 32967595
Homo sapiens proteína de transferência de fosfolipídios, variante 1	PLTP	gi 33356542
Homo sapiens fosfomevalonato quinase	PMVK	gi 20127505
Homo sapiens fosforibosil pirofosfato sintetase 1	PRPS1	gi 19923737
Homo sapiens glicogênio fosforilase	PYGL	gi 42476165
Homo sapiens riboquinase	RBKS	gi 11545854
Homo sapiens ribose 5 fosfato isomerase A	RPIA	gi 21389336
Homo sapiens esterol-C4-metil oxidase-like	SC4MOL	gi 14714987
Homo sapiens esterol-C5-desaturase	SC5DL	gi 13376362
Homo sapiens proteína de clivagem-ativação do SREBP	SCAP	gi 66932901
Homo sapiens esteroil-co-A desaturase	SCD	gi 53759150
Homo sapiens succinato desidrogenase subunidade A	SDHA	gi 4759079
Homo sapiens succinato desidrogenase subunidade B	SDHB	gi 9257241
Homo sapiens succinato desidrogenase subunidade C	SDHC	gi 9257243
Homo sapiens succinato desidrogenase subunidade D	SDHD	gi 4506864
Homo sapiens cytokine inducible SH2-containing protein (CISH)	SOCS	gi 21614506
Homo sapiens squalene epoxidase	SQLE	gi 62865634
Homo sapiens elemento esterol regulatório de ligação	SREBP1	gi 409404
Homo sapiens domínio START 4	STARD4	gi 21040246
Homo sapiens succinil-coA ligase, formação de ADP, subunidade beta	SUCLA2	gi 11321582
Homo sapiens succinil-coA ligase, formação de GDP, subunidade beta	SUCLG2	gi 29788999
Homo sapiens cofator requerido para ativação transcricional de Sp1, subunidade 3, 130kDa, variante 1	SUR2	gi 28558970
Homo sapiens transaldolase 1	TALDO1	gi 5803186
Homo sapiens transacetolase	TKT	gi 4507520

Homo sapiens triose fosfato isomerase 1	TPI1	gi 26024330
Homo sapiens UDP-glicose pirofosforilase 2	UGP2	gi 48255965
Homo sapiens ubiquinol-citocromo C redutase	UQCR	gi 19923785
Homo sapiens ubiquinol-citocromo C redutase, Rieske iron-sulfur polypeptide 1	UQCRFS1	gi 5174742
Homo sapiens endothelial growth factor	VEGF	gi 30172563
Homo sapiens baculoviral IAP repeat-containing 4 (BIRC4)	XIAP	gi 32528298

Tabela 2: Pares de oligonucleotídeos sintetizados.

GENES	PAR DE OLIGONUCLEOTÍDEOS
A20	5'gCTCTAAggggAAAgTgTgC 3'CTCCCCAggAAAgAaggAAT
AACS	5'gCTATGggAACCCgTgACTT 3'TTCTTCCCTTCCCATCTCAg
ABCG5	5'CCCTgCAAgtTgTAAgAgCA 3'TAgTggCTCTgCTgTCCATT
ABCG8	5'gAgCAgAAATCCCTTTCgAC 3'CTTCAgCAATgCCCTCTACA
ACAA2	5'gAgCCAAgCTCCCTACTgTg 3'TTgTgTCACCATggCTTgAT
ACACA	5'ACCACCAATgCCAAAgtAgC 3'TgAAATCTCCgATCCACCTC
ACADL	5'CCCAggATACCgCAgAACTA 3'AgCAAATggTAgCCgAAATg
ACADM	5'gTggAggTCTTggACTTggA 3'TCCTTTCCAaggCATACTTg
ACADS	5'TTgCCgAgAAggAgTTgTTT 3'TgCgACAgTCCTCAAAGATg
ACAS2	5'ATTgACTTgTggTggCATgA 3'TCTgCAACAgCCTCATgTTC
ACAT1	5'ggCTggTgCAggAAATAAgA 3'gTTCTACAgCAgCgTCAGCA
ACLY	5'TggCCAATggAgTCATTgTA 3'CCAgTgCATAATCgAgCAgA
ACO1	5'AgACTTCACCCAggTTgTgg 3'TgCTAAggCATTCCAgtTTT
ACO2	5'CAACATgggTgCAgAAATTg 3'CCTCCAgtCCTgAACTTCTTg
ACOX1	5'gAACTCACCTTCgAggCTTg 3'CATgCCACACACCAACTTTC
ACSL1	5'AgTCAATCCTTgCCCAGATg 3'CTgCACAgTTCCTCAAACgA
ACSL3	5'TCAgCTTgAAggCATCTgTC 3'TgggAggAAggTggATACTT
ACSL5	5'ATgTCAgCCACATCTTCCAgt 3'TATgAgCCCACTCCTgATgA
ADH1A	5'CAgCCTCgCCTCTAgAgAAA 3'gAAgACTgCCACAagggAAA
AGL	5'AAACACATgCAgggCATACA 3'CCACTCAggTCCTTggTgAT
AKR1A1	5'TgCTgCTATCTACggCAATg 3'TTCAgggCATTTAgCTgCTT]
ALDH1A1	5'TCCTggTTATgggCCTACAg 3'TACCACgCCATAgCAATTCA
ALDOA	5'TgTgggCATCAAggTAACA 3'ACgACACCACACACCACTgT
ALDOB	5'AAggTCCTggCTgCTgTCTA 3'gCAAaggAAACTgCTgTgTA
ALDOC	5'gCCTCTAgCTgggACTgATg 3'AAgggCTgTggTATggAgTg

ARG2	5'CTATCCCCTCAATgCCTCAT 3'gTggACCCTCCTgAACATTT
BAX	5'gAgggCAgAAggCACTAATC 3'CAAgAAgCTgAgCgAgTgTC
BCL-2	5'TAgCTAATggTggCCAACtg 3'gAgCACAgAAgATgggAACA
CASP1	5'gATCACCTTCggTTTgTCCT 3'CTgggACTCTCAGCAGATCA
CASP3	5'gCCgTCTAgAgTCCTATgTgC 3'CCCCTggATCTACCAgCATA
COX4I1	5'TTCCTCgATCCCgTggT 3'gAgTTgCATggCggTgA
COX4I2	5'gAggAAAggTggAggTggA 3'gCCCTgCACAggATTCA
CPT1A	5'gCACATCgTCgTgTACCATC 3'CTCAGACgCCAACCTgAACA
CS	5'TTATggCATgACggAgATgA 3'ATCAAACATTgggTgCCAgT
CYC1	5'TCTCTTCCTTggACCAACC 3'TATgCCAgCTTCCgACTCTT
DHCR7	5'ACAgTCACAgggCAAgACAg 3'ACgCTCTgTTCCTTgCTTTT
DIABLO	5'ATCCCAACAgAgggAACAAG 3'TgAAACTgCaggTggAAgAg
DLAT	5'gCTTCAGCTTTggCATgTTT 3'TTTgggTgTAATCggCATTT
DLD	5'TggTTgTTATTggTgCaggA 3'ggATCTTCACCATgCCATCT
DLST	5'ATggCAgAgAggCTgTgACT 3'ggTTggAAAgggTTgCTACA
ECHS1	5'TgATTgACgAgCTCAACCAg 3'CACggACACTgCTCTTgAAA
EHHADH	5'gCATTCCgTATCTTgggAgA 3'AggAAAggCTTgCCACACTA
EIF4G2	5'gCCTATgATAACTggCAGCA 3'TCAGTgCCCTgTATgCTCTC
ENO1	5'ggAgCTTggCAGAAgTTCAC 3'CTTgggCCAATTACACgACT
ERK-3	5'CTCAGgTggAAggTgAAggT 3'CTCCCgAggTCATCTTgAAT
FA2H	5'gATTAgAAAgggCCgTCTgA 3'gAAgTgggTCTgTgggATCT
FADSD5	5'AggTAATCATCCAaggCCAAG 3'gCTgTACCTgCTgCACATCT
FADSD6	5'TAgCggCTTCTCCTggTATT 3'CATCgAgTACggCAAgAAgA
FAS	5'ggTggTTCCAaggTATCTgCT 3'TAgAgCTTTgCCACCTCTCC
FASL	5'CATgCTTCTCCCTCTTCACA 3'TTgTCCTgCTTTCTggAgTg
FBP1	5'TCAACTgCTTCATgCTggAC 3'AgggAgTgCCAAgCATTCTA
FBP2	5'ggACCTCTTCATgCTTgACC 3'ggCTTCCAAACCTgTCgTAA

FDFT1	5'ACATATgCAgCgACTTCACC 3'TAgAATCCCCgACTCAgACC
FDPS	5'CCACTTTCTCAgCCTCCTTC 3'ggggACAgATCTgCTggTAT
FH	5'TgCAATAATgAAggCAgCAG 3'CCATggTCATTgCTTCACAC
G6PC	5'TTCCgCCTCAgCTCTATTgT 3'CCTCCTTAaggCAgCCTTCTT
G6PD	5'CAACCACATCTCCTCCCTgT 3'TCAgggAgCTTCACgTTCTT
GAA	5'CCCAAggACTCTAgCACCTg 3'CgAgAAACTgCTCTCCCATC
GAPD	5'AATCCCATCACCATCTTCCA 3'TgCTgTAgCCAAATTCgTTg
GAS5	5'CCAgCTCCTggTAACgTTTT 3'CggTggCATgATCTCAgTT
GAS6	5'gTTgACCTCCAgTgTCATgC 3'AAgTgAACACgAggATgCAG
GBE1	5'CgCTTTgATggATTTcgtTT 3'CgCCTggCATAATggTAACT
GPAM	5'ATCATTggggCTgTTCTCTC 3'TgTTAACTgAgACggCTTCg
GPI	5'ACTggATggACCAgCACTTC 3'ggTAgAAgCgTCgTgAgAgg
GPX1	5'ACCCggCACTTTATTAgtgg 3'AgTTTgggCATCAggAgAAC
GSK3B	5'TTCCTTTggAATCTgCCATC 3'TgCAgAAgCAgCATTATTgg
GYS2	5'gTggAAACCCTgAAAggACA 3'TCTgTCgTTggTggTgATgT
H6PD	5'gCACAAGCTTCAggTCTTCC 3'ggCCgCTACTgAACTCAAAg
HIBADH	5'CggAgCAAATgggATTCTAA 3'CCTTTgCACACATCATCCTg
HK1	5'ggCCACgATgTAgtCACCTT 3'ACATTCAgACggTCCAgTCC
HMGCR	5'CAgCTTTCCAAGAgCAACAC 3'ACAAgCAAgACTgggACCTT
HSCOAS	5'CCTgCTAAATgCTgAggTgA 3'TACAggTggAgTTggAgCag
HSD17B7	5'CCCACCTCATCCTTCTgAgT 3'CCTgTCCAggTACAgCATTg
HSP 27	5'gACAgggAggAggAAACTTg 3'TTTTCTgAgCAGACgTCCAg
HSP 70	5'TCCTCTTTTggAggTTCCAC 3'gCTgCTgACATgACAAAggT
HSPC105	5'TTCTgAggCCAgAATgTgAg 3'TgCAgACgTCACTTgTgTgT
HUML14D	5'AgTTAggCCCCgAgTTACAA 3'CAgTTgTTCCCTgCTTCCTT
IDH2	5'AACACCgACgAgTCCATCTC 3'TTgCTCTTgATggTgTCgAg
IDH3A	5'CCTgggAAAgtTCACATCAAA 3'gTTACACAAgggCCAAAggA
IDH3B	5'gTCACACgAgCCAAgTCTCA 3'ATAgCCACCCATgTCAgAgg

IDH3G	5'AgTggTggAgAgCCTgAAgA 3'gAATCCAAggAgCAAACCAA
IDI1	5'AgTTgggggTTgACTCTgTC 3'ggACTTgCTATTTGCCAggT
IkBα	5'TCAGTgCAACACAaggAggT 3'CgACACATTTgCCTTCAgTC
iNOS	5'CACTCAgCAgCAAgTTCCAT 3'gCCAgCTCTgCATTATCTgA
INSIG1	5'AggTTgAgggTTCAgTggAg 3'AgTgggTCAACTgCTTgTCA
JAK-2	5'AACACCAgCCCTCATgTgT 3'TCTTCATgAggCCACCAgTA
LDHA	5'AgCaggTggTTgAgAgTgCT 3'CTggATCCCaggATgTgACT
LDHB	5'gCagCATgggAgCTTATTTTC 3'CCCACAgggTATCTgCACTT
LDHD1	5'gCgCACAgAggAgATAgTCC 3'ggATgCgTAggAgCAGAgAg
LDHD2	5'gATgTgTgTgTgCCCATCTC 3'ATgCgTAggAgCAGAgAggA
LDLR	5'gAAaggCTTATCACggTTCC 3'TTgAggCTgTCgTgAgCTAT
LSS	5'TCCCAACACAgTTCCTTCAg 3'CTTTgCCTgATgTggATgAg
MAPKP2	5'ggTgCTCAgCTgTTTgACAT 3'CAGAAgTgCCTggTTCTgTg
MDH1	5'gTTgCCTTCAAAgACCTggA 3'gCagATCATCaggAACACCA
MDH2	5'gCagCCACTTTCACTTCTCC 3'CATTCAATTgCATCCACAagg
ME1	5'AgggACgTgCTTCCTTAACA 3'AgCggAcAAATgCTTCTTTg
ME2	5'TCTgggTCTTggAgATCTgg 3'AAgTTTCACTggCCCAAATg
MnSOD	5'ggAgATTgggTCTCAAgCAT 3'ggTgAACTgAACTggggTTT
MVD	5'AgAACTgggCATAgCCAgAg 3'gACgACACTgTggCTgAgTT
MVK	5'AAAgggAgAgAgAAggCACA 3'gTggCATCACACTCCTCAAg
NARC1	5'gCCgggTgAAgTAAGAAgAg 3'AggCATTCATCCCTCaggTC
NDUFA10	5'TACCACAggAgATgggAAgC 3'gCTATATggCgTCCAggAgA
NDUFA4	5'gACCTCTgCCgCAAACAT 3'TgTgCggATgTggCTTC
NDUFA5	5'gTggTCgATTgAgCaggTCT 3'TTATCACCAgCCACTTgTgC
NDUFA6	5'AACACTgTgCACCAATTCCA 3'TCTgTgCCCTgACACTgAAg
NDUFA8	5'TCCgAggCggTgTTTAgA 3'gCCACggACCCATCTTTA
NDUFA9	5'gATTgTggCCACTgTgTTTg 3'CCTTgTTATCCAgggCTCAA
NDUFB10	5'AAgCgTTCgACCTCATCg 3'CTgTTTggCCAggCACTT

NDUFB5	5'CTTCCTCACTCgTggCTTTC 3'ACTggAAgCCAAACTCCTCA
NDUFB9	5'CCgTAATggCgTTCTTgg 3'AgggCAAATgCATgTTCTg
NDUFS1	5'ggCagTAgAggAACCATCCA 3'AgACCTCCCTCATTCCAAagg
NFkB	5'ATgATgCTgTggTCAgAagg 3'CTggggATgAggTTgCTTAC
OGDH	5'AgTCCTAATgCCCTggTCCT 3'CCCTAggCagCATCTACgAg
P38 MAPK	5'TCCTTCCTTCTTgCTCCAgt 3'gggTggAgAAgTgTCgTTTT
PC	5'TCCTgCagAATgTgCTCAAC 3'ATCCATgCCATTCTCTTTgg
PCK1	5'ACTgggAAggCATTgATgAg 3'gAACACTTgCCCTCTCTTgC
PDHB	5'ggTATggATgAggAgCTggA 3'ggAgCATCCAggAAATTgAA
PFKFB1	5'CATggCgAgAgTgAACTCAA 3'AgTTgCggAggACTTCTTCA
PFKL	5'ggAgCTTCgAgAACAActgg 3'TCCCATagTTCCggTCAAAG
PGAM1	5'gCATCTggAgggTCTCTCTg 3'ACATCACCACgCaggTTACA
PGM1	5'ATATgCagTTTgCCCTgACC 3'TgTCCTCCACACTCTgCTTg
PGD	5'AAgTTCCAAGACACCgATgg 3'TgTggATAAACTgCCCTggT
PGK1	5'CagTTTggAgCTCCTggAag 3'TgCCATAAAgTAggCCCTTg
PGLS	5'TCTCggTgTTCTCgAgTTCC 3'CCTCTggCCAgtACAAAgt
PKLR	5'CACTAAgCCgTgATCCCACT 3'gCACgAgATgCCCagATTAT
PLTP	5'CCggTTCTTCTCAATCACCT 3'CCACCTACTTTgggAgCATT
PMVK	5'CCCagCTCACTCCTAgAACC 3'gCTgATgTCTgTgCTgTCCT
PRPS1	5'ggCTTgCTCCAgTgTAgCTT 3'ggATATTTggCCAggAAAagg
PYGL	5'TCACgATgTACAACCgCATT 3'AAggTTCCACgTTCCAgATg
RBKS	5'TTATTggCTTTggAgggAAA 3'gCTTTggCTCaggTTCTgTC
RPIA	5'ATggCCTATgTCCCAGTgAg 3'TCaggAgATCACTgCTggTg
SC4MOL	5'CAgCTCAAActggTCAgCTC 3'CCATAggCCTgAAgTTCACA
SC5DL	5'TAgCTgCCTCCTTgTgTCAA 3'gAgCCCACCACAAgTACTCA
SCAP	5'AgAACTTgATgCCTgTgCTg 3'TIACCgCTCTggTgTTCTTg
SCD	5'CggACgTATCAAgtTCATgg 3'TTgCACCTgAgACCCTACTg
SDHA	5'CAAaggCgAAAgtTTTATggA 3'CAAagggCTTCTTCTgTTgC

SDHB	5'TCTATCgATgggACCCAgAC 3'ggACAggTCCTTgTgCagTT
SDHC	5'gATggAgCggTTCTggAATA 3'AgCTgACCCTCagCACAAAT
SDHD	5'CTggACTAgCgAgAgggTTg 3'TCCCAAggCAAATATggAAg
SOCS	5'gTgCCCATACAgTTCaggTg 3'ggAggTgTCACACAACCTTgg
SQLE	5'gATgCagggaATCATCTgTg 3'ggCTTTTCTCCAAgTTCagg
SREBP1	5'CCTCAggTCaggAggCTAAg 3'TgCACgACTgTCagCagAT
STARD4	5'TTTCagggCTCACTTTACCC 3'AATACaggTgCACgCCACTA
SUCLA2	5'gTTCTACggCAggCTAgTgg 3'CCATCgAggCCAATgTAgTT
SUCLG2	5'gAAgCTCTCgAggCTgCTAA 3'TCACAAAgCAggCAATgTTC
SUR2	5'ggATAgCCAACCCACTCTgT 3'TgAAATgCACCTgAgAgACC
TALDO1	5'CTgTCATCAACCTgggAAgg 3'CTCAgggATgCgCTACTTTC
TKT	5'CCATCTCCgAgAgCAACATT 3'AATggCATCCCTgTCgATAC
TPI1	5'AgATCCCAAgATTgCTgTgg 3'CTTCCATCTCTCagCCAagg
UGP2	5'TCCCAgCTgCTAAAggAAgA 3'CCATTgggTgggTTCATTAg
UQCR	5'gAAACCCACAgCTCAgCTTC 3'CCTCTTTgTTgCCCaggTTA
UQCRFS1	5'CCCACACAgACATCAaggTg 3'TTTCgCgTgTATgACTgAgC
VEGF	5'CTAgCACCAgCgCTCTgTC 3'CggCgAgCTACTCTTCCCTC
XIAP	5'CCTgCCTCagTCgCTCTAgT 3'CAgggATAgCAagggACAAT

Oligonucleotídeos descritos encontram-se no sentido 5`à 3`.

5` - oligo sintetizado na fita senso

3` - oligo sintetizado na fita anti senso

[illegible][illegible][illegible]

[illegible][illegible][illegible]

[illegible][illegible][illegible]

[illegible][illegible][illegible]

[illegible][illegible][illegible]

Tabela 4:

Resposta transcricional dos genes pertencentes a fosforilação oxidativa às diferentes concentrações de oxigênio. São apresentados os valores do logaritmo na base 2 das medianas das razões de fluorescência para as sondas de cada gene em referência a cada uma das condições estudadas. Também é fornecido o grupo de perfil transcricional determinado pelo algoritmo SOM do programa GeneCluster a que cada gene pertence.

ID GENE	NOME	GRUPO	NORMÓXIA	HIPOXIA 1	HIPOXIA 2	ANÓXIA	REOXIGENAÇÃO
COX4I2	Homo sapiens citocromo c oxidase subunidade IV, isoforma 2	1	-0.47	0.48	-0.08	-0.31	0.05
NDUFA10	Homo sapiens NADH desidrogenase (ubiquinona) subcomplexo alfa 1, 10	1	-0.69	0.75	-0.26	-0.1	-0.61
CYC1	Homo sapiens citocromo c-1	2	-3.6	-0.15	-1.16	-0.62	-0.42
NDUFB10	Homo sapiens NADH desidrogenase (ubiquinona) subcomplexo beta 1, 10	2	-0.31	-0.48	-0.51	-0.04	-0.18
NDUFA5	Homo sapiens NADH desidrogenase (ubiquinona) subcomplexo alfa 1, 5	3	-0.46	-0.85	0.51	-0.97	-0.01
NDUFA8	Homo sapiens NADH desidrogenase (ubiquinona) sub alfa 1, 8	4	1.66	0.29	1.16	-1.07	0.01
NDUFB9	Homo sapiens NADH desidrogenase (ubiquinona) subcomplexo beta 1, 9	5	0.03	0.59	1.44	0.58	0.54
NDUFA9	Homo sapiens NADH desidrogenase (ubiquinona) subcomplexo alfa 1, 9	6	0.61	0.33	0.94	-0.32	-0.14
NDUFA4	Homo sapiens NADH desidrogenase (ubiquinona) subcomplexo alfa 1, 4	7	0.65	-0.38	-0.42	0.02	-0.09
NUDFA6	Homo sapiens NADH desidrogenase (ubiquinona) subcomplexo alfa 1, 6	8	1.01	0.88	0.23	-0.31	-0.12
NUDFA8	Homo sapiens NADH desidrogenase (ubiquinona) subcomplexo alfa 1, 8	8	0.70	0.24	0.80	0.13	1.29
COX4I1	Homo sapiens citocromo c oxidase subunidade IV, isoforma 1	8	1.37	0.56	0.95	0.47	1.31
NDUFA6	Homo sapiens NADH desidrogenase (ubiquinona) subcomplexo alfa 1, 6	9	2.27	2.62	-0.43	-2.05	-0.53
NDUFB5	Homo sapiens NADH desidrogenase (ubiquinona) subcomplexo beta 1, 5	9	1.30	1.46	-0.83	-0.47	-0.59
NDUFS1	Homo sapiens NADH desidrogenase (ubiquinona) Fe-S proteína 1	9	0.52	2.55	-0.38	0.07	-0.89

Tabela 5: Resposta transcricional dos genes relacionados a defesa celular, sinalização e apoptose às diferentes concentrações de oxigênio. São apresentados os valores do logaritmo na base 2 das medianas das razões de fluorescência para as sondas de cada gene em referência a cada uma das condições estudadas. Também é fornecido o grupo de perfil transcricional determinado pelo algoritmo SOM do programa GeneCluster a que cada gene pertence.

ID GENE	NOME	GRUPO	NORMÓXIA	HIPOXIA 1	HIPOXIA 2	ANOXIA	REOXIGENAÇÃO
INOS	Homo sapiens óxido nítrico sintase 2A, variante 1	1	0.49	0.22	-1.13	-0.45	-0.42
BCL2	Homo sapiens célula-B CLL/linfoma 2, variante a	2	0.05	0.18	0.18	-0.61	0.75
EIF4G2	Homo sapiens fator eucariótico iniciador da tradução 4 ? 2	2	0.67	0.1	-0.31	-0.22	0.11
ERK3	Homo sapiens proteína quinase 12 mitogen-activated (MAPK12)	2	0.64	-0.69	-0.61	-0.05	0.16
P38MAPK	Homo sapiens proteína quinase 14 mitogen-activated (MAPK14), variante 1	2	0.26	0.22	-0.22	0.04	-0.43
A20	Homo sapiens fator de necrose tumoral, proteína 3 a-induzida	2	0.68	-0.25	0.23	0.43	-0.12
HSP27	Homo sapiens proteína 1 de heat shock 27kDa	3	-0.03	-0.31	-0.12	0.14	0.15
MAPKP2	Homo sapiens MAP quinase fosfatase 2	4	0.37	0.75	-0.27	-0.56	0.79
JAK2	Homo sapiens Janus quinase 2	5	-0.66	0.87	0.11	-0.93	0.23
IKBALFA	Homo sapiens conserved helix-loop-helix ubiquitous kinase	5	-1.24	0.85	0.32	-0.54	-0.84
DIABLO	Homo sapiens homólogo a diablo (Drosophila), variante 1	6	1.82	0.79	0.39	-0.99	0.32
IKBALFA	Homo sapiens conserved helix-loop-helix ubiquitous kinase	6	1.32	0.49	-0.57	-0.09	0.05
MNSOD	Homo sapiens superóxido dismutase 2, variante 1	7	0.12	-1.3	0.85	-0.32	0.58
SOCS	Homo sapiens cytokine inducible SH2-containing protein (CISH)	8	1.84	-0.46	0.94	0.22	-0.21
FASL	Homo sapiens ligante de FAS	8	1.15	-0.97	1.05	0.24	0.45
ARG2	Homo sapiens arginase tipo II	9	-0.41	0.16	-0.01	0.62	-0.02
CASP3	Homo sapiens caspase 3	9	-1.31	-0.14	0.18	0.87	-0.37
GPX1	Homo sapiens glutatona peroxidase 1, variante 1	10	-0.26	0.82	0.86	-0.44	0.53
GAS5	Homo sapiens growth arrest-specific 5	10	-1.54	0.54	0.71	0.32	0.17
GAS6	Homo sapiens growth arrest-specific 6	10	0.04	1.14	0.72	0.53	0.97
BAX	Homo sapiens proteína X associada a BCL2	11	1.11	0.91	0.31	0.32	0.46
FAS	Homo sapiens superfamília receptor TNF, membro 6	11	0.37	0.88	0.5	0.68	0.78
NFKB1	H. sapiens fator nuclear polipeptideo kappa light gene enhancer, células B 1	11	1.50	3.08	1.59	0.96	1.00
CASP1	Homo sapiens caspase 1	12	0.18	0.65	2.29	0.21	0.08
HSP70	Homo sapiens proteína 1 de heat shock 70kDa	13	0.42	1.96	2.04	1.54	0.24

Tabela 6: Resposta transcricional dos genes pertencentes ao metabolismo de glicogênio às diferentes concentrações de oxigênio. São apresentados os valores do logaritmo na base 2 das medianas das razões de fluorescência para as sondas de cada gene em referência a cada uma das condições estudadas. Também é fornecido o grupo de perfil transcricional determinado pelo algoritmo SOM do programa GeneCluster a que cada gene pertence.

ID GENE	NOME	GRUPO	NORMÓXIA	HIPOXIA 1	HIPOXIA 2	ANÓXIA	REOXIGENACAO
GSK3B	Homo sapiens glicogênio sintase quinase 3 beta	1	-0.6	-0.92	-1.39	-0.47	-0.52
PYGL	Homo sapiens glicogênio fosforilase	1	-0.93	-0.43	-1.21	0.01	0.68
GBE1	Homo sapiens glucan (1,4-alpha-), branching enzyme 1	2	0.09	-0.07	-0.16	0.07	-0.31
AGL	Homo sapiens amilo-1,6 glucosidase,4 alfa glucanotransferase, variante 1	3	0.13	1.16	0.2	0.12	0.5
GYS2	Homo sapiens glicogênio sintase, fígado	4	0.01	-0.28	0.73	-0.16	0.51
G6PC	Homo sapiens glicose 6 fosfato	4	-0.56	-5.92	1.57	1	2.41
GAA	Homo sapiens glicosidase alfa	5	-0.05	-1.1	0.1	0.32	0.65

Tabela 7: Resposta transcricional dos genes pertencentes às vias da glicólise e da gliconeoênese às diferentes concentrações de oxigênio. São apresentados os valores do logaritmo na base 2 das medianas das razões de fluorescência para as sondas de cada gene em referência a cada uma das condições estudadas. Também é fornecido o grupo de perfil transcricional determinado pelo algoritmo SOM do programa GeneCluster a que cada gene pertence.

ID GENE	NOME	GRUPO	NORMOXIA	HIPOXIA 1	HIPOXIA 2	ANOXIA	REOXIGENAÇÃO
FBP1	Homo sapiens frutose 1,6bifosfatase 1	1	-1.27	1.94	-1.99	-6.69	-0.63
PGM1	Homo sapiens fosfoglicerato mutase 1	2	0.27	-0.71	-0.74	-0.59	-0.77
ALDH1A1	Homo sapiens aldeído desidrogenase 1	2	-0.58	-0.32	-0.9	-0.56	-1.01
ACAS2	Homo sapiens acil coenzima A sintetase cadeia curta membro 2	2	-0.2	0.36	-1.1	-0.09	-0.59
GPI	Homo sapiens glicose fosfato isomerase	3	-1.01	0.18	-0.15	0.07	-0.99
DLD	Homo sapiens dihidrolipoamida desidrogenase	4	-0.38	0.02	-0.17	0.2	0.23
ENO1	Homo sapiens enolase 1	5	-0.57	-1.52	-0.53	-0.13	0.65
PGK1	Homo sapiens fosfogliceratoquinase 1	5	-0.42	-0.9	-0.13	-0.02	-0.59
GAPD	Homo sapiens gliceraldeído 3 fosfato desidrogenase	5	-1.35	-1.64	-0.77	0.1	-0.52
ADH1A	Homo sapiens álcool desidrogenase 1, polipeptídeo alfa	6	-0.03	-0.84	0.56	-1.12	0.21
PFKL	Homo sapiens fosfofrutoquinase, fígado	6	-0.04	-0.88	0.64	0.11	-0.41
AKRIA1	Homo sapiens aldocetoreductase família 1, membro A1	6	-0.17	-1.05	-0.16	0.27	0.87
PFKFBP1	Homo sapiens 6fosfofrutoquinase2/frutose2,6bifosfatase1	6	-0.79	-0.7	-0.01	0.4	0.59
ALDOA	Homo sapiens Aldolase A, frutose bifosfatase, variante 1	7	0.05	-0.22	0.38	-0.25	-0.59
PFKFB1	Homo sapiens 6fosfofrutoquinase2/frutose2,6bifosfatase1	7	0.23	-0.15	-0.01	0.1	0.3
DLAT	Homo sapiens dihidrolipoamida S-acetiltransferase	7	-0.17	-0.18	0.24	0.3	-0.46
PEGAM1	Homo sapiens fosfoglicerato mutase 1	8	1.16	0.15	-0.48	-0.28	-0.39
HK1	Homo sapiens hexoquinase 1, variante 1	9	1.34	-0.14	0.03	-0.34	-0.78
ALDOB	Homo sapiens Aldolase B, frutose bifosfatase	9	0.89	-0.92	0.08	0.01	0.79
FBP2	Homo sapiens frutose 1,6bifosfatase 2	10	1.07	0.16	0.4	0.19	1.21
PKLR	Homo sapiens piruvato quinase, variante 1	10	1.1	0.52	0.28	0.23	0.41
ALDOC	Homo sapiens Aldolase C, frutose bifosfatase	11	1.86	1.15	1.13	0.42	0.96

Tabela 8: Resposta transcricional dos genes pertencentes ao metabolismo de lipídeos às diferentes concentrações de oxigênio. São apresentados os valores do logaritmo na base 2 das medianas das razões de fluorescência para as sondas de cada gene em referência a cada uma das condições estudadas. Também é fornecido o grupo de perfil transcricional determinado pelo algoritmo SOM do programa GeneCluster a que cada gene pertence.

ID GENE	NOME	GRUPO	NORMÓXIA	HIPOXIA 1	HIPOXIA 2	ANOXIA	REOXIGENAÇÃO
AACS	Homo sapiens acetoacetil-coA sintase	1	0.63	0.5	0.39	-0.2	-0.37
SQUELE	Homo sapiens squalene epoxidase	1	0.42	0.21	-0.38	-0.18	-0.08
STARD4	Homo sapiens domínio START 4	1	-0.28	0.14	0.16	0.04	-0.61
ID11	Homo sapiens isopentenil-difosfato ? isomerase	2	0.35	1.84	-0.3	0.3	0.34
FADSD5	Homo sapiens desta-5 ácido graxo desaturase	3	0.88	1.31	-0.37	0.21	0.66
HSPC105	Homo sapiens NAD(P) esteróide dependente desidrogenase-like	3	1.04	0.35	0.45	0.22	0.12
HSCOAS	Homo sapiens HMG-coA sintase	3	0.75	0.08	1.1	0.31	0.31
ABCG8	Homo sapiens cassette de ligação do ATP, sub-família G, membro 8	3	0.78	1.1	-0.09	0.44	0.43
ECHS1	Homo sapiens enoil-coA hidratase, cadeia curta, 1	3	0.34	0.39	0.24	0.47	0.42
FA2H	Homo sapiens ácidos graxos 2- hidroxilase	3	0.6	0.91	-0.07	0.77	0.37
INSIG1	Homo sapiens gene induzido por insulina 1, variante 1	4	1.11	0.01	0.92	0.11	0.01
HMGCR	Homo sapiens HMG-coA redutase	4	1.37	1.42	0.85	0.53	0.44
HSD17B7	Homo sapiens 17-β-hydroxisteroide dehidrogenase-7	4	0.41	1.6	0.98	0.95	0.06
FDFT1	Homo sapiens squalene sintase	4	1.05	1.64	1.24	1.35	0.5
ACADS	Homo sapiens acil-coA dehidrogenase, cadeia curta C2 - C3	4	0.71	2.4	1.03	1.36	0.86
HUML140	Homo sapiens lanosterol 14 a-demetilase	5	-0.79	-0.37	2.33	2.03	-0.18
SCAP	Homo sapiens proteína de clivagem-ativação do SREBP	5	0.1	1.26	2.61	2.23	0.14
ACSL1	Homo sapiens acil-coA sintetase de cadeia longa, membro 1, variante 1	5	2.95	1.14	0.31	2.41	0.48
ACSL3	Homo sapiens acil-coA sintetase de cadeia longa, membro 3, variante 1	6	-0.05	0.89	0.97	0.17	0.42
MVK	Homo sapiens mevalonato quinase	6	-1.34	1.31	0.68	0.39	0.82
LDLR	Homo sapiens receptor de lipoproteína de baixa densidade	6	-0.67	-0.58	0.18	0.48	0.3
SCDS	Homo sapiens esterol-C4-metil oxidase-like	6	-0.98	0.54	0.13	0.61	0.79
GPAM	Homo sapiens glicerol-3-fosfato aciltransferase	7	-3.01	0.06	-0.36	0.02	0.15
DHCR7	Homo sapiens 7dehidrocolesterol redutase	8	-0.76	0.86	0.2	-1.19	0.02
PLTP	Homo sapiens proteína de transferência de fosfolipídios, variante 1	8	-1.82	-0.25	-0.06	-0.38	0.23
CPT1A	Homo sapiens carnitina palmitoiltransferase 1A	8	-0.87	0.17	0.1	-0.2	-0.82
ABCG5	Homo sapiens cassette de ligação do ATP, sub-família G, membro 5	8	-0.45	0.29	0.05	-0.13	-0.43
FADSD6	Homo sapiens delta-6 ácido graxo desaturase	9	-0.83	0.36	0.02	-0.07	0.71
SUR2	H. sapiens cofator requerido para ativação transc. de Sp1, sub 3, 130kDa, v. 1	10	2.51	-0.34	0.5	-1.4	-0.47
SC4MOL	Homo sapiens esterol-C4-metil oxidase-like	10	1.7	-0.16	-0.36	-0.22	0.07

ID GENE	NOME	GRUPO	NORMÓXIA	HIPOXIA 1	HIPOXIA 2	ANOXIA	REOXIGENAÇÃO
SCD	Homo sapiens esterol-co-A desaturase	11	2.22	-1.83	0.41	0.16	0.2
MVD	Homo sapiens mevalonato pirofosfato descarboxilase	11	0.4	-0.66	0.94	0.2	-0.24
SREBP1	Homo sapiens elemento esterol regulatório de ligação	12	0.56	-0.61	0.22	-0.61	0.17
ACSL5	Homo sapiens acil-coA sintetase de cadeia longa, membro 5, variante 1	12	0.4	-1.98	0.34	-0.43	0.27
FDP5	Homo sapiens farnesil difosfato sintase	12	-0.29	-0.13	0.27	0.09	0.53
EHHADH	H. sapiens enoil-coA, hydratase/ 3-hidroxiacil Coenzima A dehidrogenase	13	-0.32	-0.95	-1.07	-0.55	0.66
ACADAM	Homo sapiens acil-coA dehidrogenase, cadeia em linha reta C4 – C12	13	-0.89	-0.78	-1.37	-0.45	-0.23
ACAA2	Homo sapiens acetil-coA aciltransferase 2	13	-1.95	-1.56	-0.61	-0.4	-0.53
PMVK	Homo sapiens fosfomevalonato quinase	13	-0.33	-0.89	-0.74	-0.31	-0.03
ACOX1	Homo sapiens acil-coA oxidase 1, variante 1	14	-0.49	-0.45	-0.49	-0.66	-0.42
NARC1	Homo sapiens proprotéina convertase subtilisina/kexina tipo 9	14	-0.2	-0.43	-0.59	-0.54	-0.2
ACADL	Homo sapiens acil-coA dehidrogenase cadeia longa	14	-0.97	-0.33	-0.98	-0.51	-0.68
LSS	Homo sapiens lanosterol sintase, variante 1	14	0.11	-0.13	-0.87	-0.44	-0.87

Tabela 9: Resposta transcricional dos genes pertencentes à via das pentoses-fosfato às diferentes concentrações de oxigênio. São apresentados os valores do logaritmo na base 2 das medianas das razões de fluorescência para as sondas de cada gene em referência a cada uma das condições estudadas. Também é fornecido o grupo de perfil transcricional determinado pelo algoritmo SOM do programa GeneCluster a que cada gene pertence.

ID GENE	NOME	GRUPO	NORMÓXIA	HIPOXIA 1	HIPOXIA 2	ANÓXIA	REOXIGENAÇÃO
PRPS1	Homo sapiens fosforibosil pirofosfato sintetase I	1	-1.14	-0.17	-0.03	-0.45	-0.25
RPIA	Homo sapiens ribose 5 fosfato isomerase A	1	-1.32	-1.13	-0.33	-0.23	-0.33
PGLS	Homo sapiens 6 fosfogluconolactonase	1	-0.63	-0.69	-1.14	-0.01	-0.75
PGD	Homo sapiens fosfogluconato desidrogenase	1	-0.7	-0.64	-0.62	0.03	0.04
G6PD	Homo sapiens glicose 6 fosfato desidrogenase	2	0.15	-0.41	-0.74	-0.17	-0.37
RBKS	Homo sapiens riboquinase	3	-0.3	-0.41	0.41	-0.43	0.26
TP1	Homo sapiens triose fosfato isomerase I	4	2.6	-0.7	0.57	-0.57	-0.74
HIBADH	Homo sapiens hidroxibutirato desidrogenase	5	-0.68	0.07	0.37	-0.25	-0.27
H6PD	Homo sapiens hexose 6 fosfato desidrogenase	6	-0.36	0.72	0.11	-0.08	0.57
TKT	Homo sapiens transacetolase	6	-0.51	-0.15	-0.63	1.24	0.14
TALDO1	Homo sapiens transaldolase I	7	-0.48	0.23	2.15	0.23	-0.45

Tabela 10: Resposta transcricional dos genes pertencentes ao metabolismo de piruvato às diferentes concentrações de oxigênio. São apresentados os valores do logaritmo na base 2 das medianas das razões de fluorescência para as sondas de cada gene em referência a cada uma das condições estudadas. Também é fornecido o grupo de perfil transcricional determinado pelo algoritmo SOM do programa GeneCluster a que cada gene pertence.

ID GENE	NOME	GRUPO	NORMÓXIA	HIPOXIA	HIPOXIA 1	HIPOXIA 2	ANÓXIA	REOXIGENAÇÃO
LDHB	Homo sapiens lactato desidrogenase B	1	0.02	-0.63	-0.29	-1.07	-0.53	
LDHA	Homo sapiens lactato desidrogenase A	1	0.39	-1.35	-0.36	-0.02	-1.32	
ME2	Homo sapiens enzima málica 2	2	-1.19	-1.22	-1.15	-0.34	-0.57	
ACACA	Homo sapiens acetil coA carboxilase a	3	-0.13	-0.1	-1.51	-1.28	-0.94	
ACAT1	Homo sapiens acetil coA acetiltransferase 1	4	-1.2	-0.17	-0.31	-0.34	-0.44	
LDHD1	Homo sapiens lactato desidrogenase D, variante 1	5	0.84	1.05	0.29	0	0.43	
LDHD2	Homo sapiens lactato desidrogenase D, variante 2	6	-0.39	1.39	0.57	0.29	1.55	

Tabela 11: Resposta transcricional dos genes pertencentes ao ciclo dos ácidos tricarboxílicos (TCA) às diferentes concentrações de oxigênio. São apresentados os valores do logaritmo na base 2 das medianas das razões de fluorescência para as sondas de cada gene em referência a cada uma das condições estudadas. Também é fornecido o grupo de perfil transcricional determinado pelo algoritmo SOM do programa GeneCluster a que cada gene pertence.

ID GENE	NOME	GRUPO	NORMÓXIA	HIPOXIA 1	HIPOXIA 2	ANÓXIA	REOXIGENAÇÃO
MDH2	Homo sapiens malato desidrogenase 2 (mitocondrial)	1	2.78	-0.05	-0.7	-0.39	-0.13
ACO1	Homo sapiens aconitase 1 (solúvel)	1	1.69	-0.18	-0.17	0.17	-0.25
IDH3B	Homo sapiens isocitrato desidrogenase 3 beta, variante 1	2	1.16	-1.11	-0.42	-0.12	-1.17
SUCLA2	Homo sapiens succinil-coA ligase, formação de ADP, subunidade beta	2	0.97	-1.07	0.46	0.6	-0.13
IDH3G	Homo sapiens isocitrato desidrogenase 3 gama, variante 1	3	0.81	-2.76	0.55	0.51	-0.07
IDH2	Homo sapiens isocitrato desidrogenase 2 (mitocondrial)	4	-0.54	-0.91	-0.13	-0.33	-0.43
ACO2	Homo sapiens aconitase 2 (mitocondrial)	4	-0.85	-1.36	-0.18	-0.01	-0.68
PDHB	Homo sapiens piruvato desidrogenase beta	4	-0.36	-1.3	-0.14	0.15	-0.11
SUCLG2	Homo sapiens succinil-coA ligase, formação de GDP, subunidade beta	5	-0.25	0.24	-1.21	-0.57	-0.69
CS	Homo sapiens citrato sintase, variante 1	5	-0.52	0.13	-0.49	-0.51	-0.6
FH	Homo sapiens fumarato hidratase	5	-0.26	-0.51	-0.31	-0.16	-0.26
DLST	Homo sapiens diidrolipoamil S-succiniltransferase	6	0.05	-0.26	0.25	-0.28	-0.24
PC	Homo sapiens piruvato carboxilase	6	0.4	0.04	-0.09	0.13	-0.13
OGDH	Homo sapiens oxoglutarato desidrogenase	7	-1.51	-0.33	-0.08	-0.06	-0.31
MDH1	Homo sapiens malato desidrogenase 1 (solúvel)	7	-1.68	-0.06	-0.03	-0.03	-0.58
SDHD	Homo sapiens succinato desidrogenase subunidade D	8	0.19	0.13	-0.16	0.58	0.53
ME1	Homo sapiens enzima málica 1	9	-0.64	0.46	0.67	0.7	0.15
PCK1	Homo sapiens fosfoenolpiruvato carboxiquinase	10	-0.28	-0.37	0.69	0.24	0.5
SDHC	Homo sapiens succinato desidrogenase subunidade C	11	-0.72	0.52	-0.18	1.25	-0.18
ACLY	Homo sapiens ATP citrato liase, variante 1	11	-0.16	1.3	0.45	0.4	-0.54
IDH3A	Homo sapiens isocitrato desidrogenase 3 alfa	11	-0.04	1.12	-0.36	0.45	-0.14
SDHA	Homo sapiens succinato desidrogenase subunidade A	12	0.44	-0.45	2.69	0.56	0.23
SDHB	Homo sapiens succinato desidrogenase subunidade B	12	-0.46	-0.7	2.32	1.81	-0.15

SÚMULA CURRICULAR

DADOS PESSOAIS

Nome: Marluce da Cunha Mantovani

Data de nascimento: 06 de Agosto de 1980

Naturalidade: São Vicente – São Paulo - Brasil

EDUCAÇÃO

Ensino Fundamental:

Educandário São Gabriel de Nossa Senhora das Dores - São Vicente/SP – 1986 – 1994

Ensino Médio:

Colégio Santa Cecília – Santos/SP - 1995 – 1997

Graduação:

Universidade de Mogi das Cruzes – Mogi das Cruzes/SP – 1998 – 2001

Bacharelado em Ciências Biológicas Modalidade Médica – Biomedicina

PUBLICAÇÕES

Artigos Completos

1.) Bonaccorsi, E.D., Ferreira, A.J., Chambergo, F.S., Ramos, A.S., **Mantovani, M.C.**, Farah, J.P., Sorio, C.S., Gombert, A.K., Tonso, A., El-Dorry, H. – “Transcriptional response of the obligatory aerobe *Trichoderma reesei* to hypoxia and transient anoxia: implications for energy production and survival in the absence of oxygen.”, *Biochemistry*, vol. 45, p. 3912 – 3924 (2006).

2.) Ferreira, A.J.S., **Mantovani, M.C.**, Eleiche, A., Freitas, J.A.A., Ouf A., Chambergo, F.S., Ramos, A.S.P., Raouf A.A., Ibrahim, T.M., Badr, M.T., El-Dorry, H., Quayle, T. - "Differential gene expression in Hepatitis C-affected Hepatocellular Carcinoma using SAGE technique", em preparação.

Resumos em Congressos

1.) **Mantovani M.C.**, Bonaccorsi, E.D., Conceição M.M., Chambergo F.S., El-Dorry, H., Pereira C.A., “Growth of Human Fibroblastic Cells AS198 on Microcarriers Spinner Culture”, XXXIV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular / Águas de Lindóia – SP (2005).

2.) **Mantovani M.C.**, Bonaccorsi, E.D., Matheus, Pereira C.A., El-Dorry, H., Chambergo, F.S., “Efeito da variação do oxigênio no metabolismo energético de células humanas em cultura”, 3º Reunião Científica do Instituto Butantan / SP (2005).

3.) **Mantovani M.C.**, Sena E.A. “Alterações Morfológicas Eritrocitárias e Laboratoriais nos Diferentes Genótipos das Síndromes Falcêmicas”, 3º Encontro Regional de Biomedicina / UNESP (2001), IV Congresso de Iniciação Científica / UMC (2001), 1º CONIC SEMESP / São Paulo (2001).