UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica)

ERIK HALCSIK

**Fosfoproteômica e Proteômica quantitativa de células
mesenquimais durante a diferenciação osteoblástica
mediada por BMP2, expressão e purificação de diferentes
tipos de Proteínas Morfogenéticas Ósseas.**

Versão corrigida da Tese defendida

São Paulo

2012

Data do Depósito na SPG:

03/09/2012

ERIK HALCSIK

**Fosfoproteômica e Proteômica quantitativa de células
mesenquimais durante a diferenciação osteoblástica
mediada por BMP2, expressão e purificação de diferentes
tipos de Proteínas Morfogenéticas Ósseas.**

*Tese apresentada ao Instituto de Química da
Universidade de São Paulo para obtenção do
Título de Doutor em Ciências (Bioquímica)*

Orientadora: Profa. Dra. Mari Cleide Sogayar

São Paulo

2012

AGRADECIMENTOS

À PROFA. MARI CLEIDE SOGAYAR, POR TER ME DADO À OPORTUNIDADE DE TRABALHAR NO SEU LABORATÓRIO E POR TER ME AJUDADO TANTO NA MINHA TESE DE DOUTORADO, MARCANDO E INFLUENCIANDO POR SEMPRE MINHA FORMAÇÃO CIENTÍFICA.

AO PROFESSOR OLE NØRREGARRD JENSEN, QUE PERMITIU A REALIZAÇÃO DE TODOS OS EXPERIMENTOS DE PROTEÔMICA E FOSFOPROTEÔMICA NO LABORATÓRIO DO GRUPO DE PESQUISA EM PROTEÍNAS EM ODENSE, DINAMARCA.

AOS MEUS AMIGOS DO GRUPO DE PESQUISA EM PROTEÍNAS DA UNIVERSITY OF SOUTHERN DENMARK: GIUSEPPE PALMISANO, MELANIE SCHULTZ, THIAGO E MARCELA BRAGA E FÁBIO NOGUEIRA.

À MINHA AMIGA E COLEGA DE TRABALHO MARIA FERNANDA FORNI.

ÀO PROFESSOR JOSÉ MAURO GRANJEIRO PELA COLABORAÇÃO E BOAS IDÉIAS, E AO JUAN, POR TER INICIADO O PROJETO DAS BMP'S.

À ANA CLÁUDIA, PELA AJUDA COM OS VETORES E COM AS TRANSFECCÕES

À ZIZI DE MENDONÇA, DÉBORA E SANDRA PELA AJUDA COM O MATERIAL SEMPRE LIMPO E ESTÉRIL.

À ERICA MOREIRA E GISELLA GRAZIOLI, PELA AJUDA COM A EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL.

AO ANDRÉ FUJITA PELA AJUDA COM O TRABALHO REALIZADO NA NORMALIZAÇÃO DOS DADOS.

À LETÍCIA LABRIOLA, PELAS DISCUSSÕES E PELA AJUDA COM OS PROTOCOLOS DE FOSFOPROTEÔMICA.

AO WAGNER PELA DISCUSSÃO SOBRE ASSUNTOS DE PROTEÔMICA.

À MARINA, LETICIA TERRA, ANA LÚCIA, GUSTAVO, ALINE, TATIANE, PATRÍCIA KOSSUGUE, ROSÂNGELA, LUCIANA GOMES, FERNANDO, MIGUEL, RENATO E KATIÚCIA.

ÀS PESSOAS QUE, SEM QUERER, VOU ESQUECER DE AGRADECER, MAS QUE DE ALGUMA FORMA COLABORARAM COMIGO.

À NICOLE, PELO COMPANHEIRISMO E PELA AJUDA INCONDICIONAL NA MINHA TESE E NA MINHA VIDA.

AO INSTITUTO DE QUÍMICA E EM ESPECIAL AOS FUNCIONÁRIOS DA SECRETÁRIA DE PÓS-GRADUAÇÃO.

APOIO FINANCEIRO

CNPQ – CONSELHO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO E TECNOLÓGICO

BNDES – BANCO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO SOCIAL E ECONÔMICO

FAPESP – FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO

FINEP – FINANCIADORA DE ESTUDOS E PROJETOS

PRP – USP – PRÓ-REITORIA DE PESQUISA DA USP.

Halcsik E. **Fosfoproteômica e Proteômica quantitativa de células mesenquimais durante a diferenciação osteoblástica mediada por BMP2, expressão e purificação de diferentes tipos de Proteínas Morfogenéticas Ósseas**. 2012. 148p. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

RESUMO

As fraturas e perdas ósseas representam altos riscos para o Sistema público de Saúde (SUS), além de afetar a qualidade de vida do paciente, portanto é necessário o entendimento das bases moleculares que envolvem os mecanismos de reparo ósseo. Citocinas secretadas por células do sistema imune presentes no local da inflamação, como as IL-6, IL-10 e $TNF\alpha$ atuam como fatores quimiotáticos para células mesenquimais, que proliferam e se diferenciam em osteoblastos pela ação autócrina e parácrina de Proteínas Morfogenéticas Ósseas (BMPs), principalmente a BMP2. Embora seja conhecido que a ação de BMP2 ocorra através de sua ligação nos receptores ActRI/BMPR, que ativam proteínas SMADS 1/5/8 efetoras, pouco se sabe sobre os mecanismos intracelulares que participam do processo de diferenciação osteoblástico. Neste estudo propôs-se analisar as diferenças no conteúdo de proteínas totais e de proteínas fosforiladas em células mesenquimais de pele induzidas à osteogênese pelo tratamento com BMP2 por diferentes períodos de tempo, utilizando-se de Isótopos Estáveis de Dimetila acoplado ao LC/MS. A partir de 150µg de material inicial, foi possível identificar 2.264 proteínas, as quais foram quantificadas nos diferentes pontos de indução, sendo que 235 são fosforiladas. Análise de motivos de quinases mostrou que diversos substratos possuem sítios fosforilados correspondentes àqueles dos motivos de fosforilação das quinases Casein Kinase, p38, CDK e JNK. A análise da ontologia gênica mostrou um aumento de processos biológicos relacionados com sinalização e

diferenciação após a primeira hora de indução com rhBMP2. Além disso, proteínas envolvidas com o rearranjo do citoesqueleto e com vias de sinalização Wnt e Ras foram encontradas como tendo fosforilação diferencial durante todos os períodos estudados. Os dados revelaram novos substratos intracelulares que são fosforilados nos primeiros momentos do comprometimento com a diferenciação osteoblástica mediada pelo tratamento com rhBMP2 em células mesenquimais derivadas da pele. Além disso, clones celulares que superexpressam as proteínas recombinantes humanas BMP2 e BMP4 foram gerados, e sua atividade verificada *in vitro*. Paralelamente, a rhBMP7, obtida anteriormente, foi purificada por cromatografia de afinidade utilizando-se uma coluna de Heparina-Sepharose, que foi posteriormente utilizada para ensaios *in vitro* e *in vivo*, nos quais se mostrou capaz de gerar osteoblastos e tecido ósseo, respectivamente, o que abre novas possibilidades para o uso destas proteínas como biofármacos no Brasil.

Palavras-chave: Proteômica, Fosfoproteômica, Diferenciação Celular, Osteoblastogênese de células mesenquimais, Proteínas Morfogenéticas Ósseas, Clonagem e Expressão.

Halcsik E. **Quantitative Phosphoproteomics and Proteomics of mesenchymal stem cells during BMP2-mediated osteoblastic differentiation, expression and purification of different types of Bone Morphogenetic Proteins.** 2012. 148p. Thesis (PhD) - Post-Graduate Program in Biological Sciences (Biochemistry). Institute of Chemistry, University of São Paulo, São Paulo, Brazil.

ABSTRACT

Bone fractures and loss represent significant costs for the public health system and often affect the patients quality of life, therefore, understanding the molecular basis for bone regeneration is essential. Cytokines, such as IL-6, IL-10 and TNF α , secreted by inflammatory cells at the lesion site, at the very beginning of the repair process, act as chemotactic factors for mesenchymal stem cells, which proliferate and differentiate into osteoblasts through the autocrine and paracrine action of bone morphogenetic proteins (BMPs), mainly BMP-2. Although it is known that BMP-2 binds to ActRI/BMPRI and activates the SMAD 1/5/8 downstream effectors, little is known about the intracellular mechanisms participating in osteoblastic differentiation. We assessed differences in the phosphorylation status of different cellular proteins upon BMP-2 osteogenic induction of isolated human skin mesenchymal stem cells using Triplex Stable Isotope Dimethyl Labeling coupled with LC/MS. From 150 μ g of starting material, 2,264 proteins containing two or more peptides were identified and quantified at five different time points, 235 of which are differentially phosphorylated. Kinase motif analysis showed that several substrates display phosphorylation sites for Casein Kinase, p38, CDK and JNK. Gene ontology analysis showed an increase in biological processes related with signaling and differentiation at early time points after BMP2 induction. Moreover, proteins involved in cytoskeleton rearrangement, Wnt and Ras pathways were found to be differentially phosphorylated during all timepoints studied. Taken together, these data, allow new insights on the intracellular

substrates which are phosphorylated early on during commitment to BMP2-driven osteoblastic differentiation of skin-derived mesenchymal stem cells. Cell clones overexpressing the human BMP 2 and 4 recombinant proteins were also generated, and their biological activity was confirmed *in vitro*. In parallel, chromatography-affinity purified rhBMP7, obtained using heparin-Sepharose columns, was used for *in vivo* and *in vitro* assays to evaluate the ability of this purified protein to generate osteoblasts and bone tissue, respectively, opening new avenues for the use of these proteins as biopharmaceuticals in Brazil.

Keywords: Proteomics, Phosphoproteomics, Cell Differentiation, Osteoblastogenesis, Bone Morphogenetic Proteins, Cloning and Expression.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Vias de sinalização descritas para a diferenciação óssea.

Figura 2. A) Diagrama representando a topologia de BMP2 e B) Visão estérica da proteína BMP2 nativa, dimérica.

Figura 3. Proteínas da superfamília das TGF- β conforme Ducy e Karsenty et al 2000. *Proteínas de *Drosophila*, ***Xenopus* e ***ouriço do mar.

Figura 4. Estágios envolvidos no reparo de fraturas e a expressão de moléculas envolvidas neste processo.

Figura 5. Amplificação de rhBMP2 a partir de um Banco de cDNA de Tecidos.

Figura 6. Amplificação de rhBMP4 a partir de um Banco de cDNA de Tecidos.

Figura 7. Diagnóstico de restrição por digestão com endonucleases para confirmação da clonagem de rhBMP2 (*XbaI/BamHI*) nos vetores pGEM (esquerda) e pCMV-rhBMP2-IRES-EGFP (direita).

Figura 8. Diagnóstico de restrição por endonucleases para confirmação da clonagem de rhBMP4 (*XbaI/BamHI*) nos vetores pGEM (esquerda) e pCMV-rhBMP4-IRES-EGFP (direita).

Figura 9. Clones estáveis de células 293T co-transfectadas com os vetores pCMV-hBMP2-IRES-EGFP + pTK-Hyg.

Figura 10. Clones estáveis de células HEK293 co-transfectadas com os vetores pCMV-hBMP4-IRES-EGFP + pTK-Hyg.

Figura 11. Análise da expressão de rhBMP2 nos clones de células 293T transfectadas com o vetor pCMV-hBMP2-IRES-EGFP

Figura 12. Análise da expressão de rhBMP4 nas células HEK293 transfectadas com o vetor pCMV-hBMP4-IRES-EGFP

Figura 13. Análise funcional do meio condicionado das células 293T contendo o vetor pCMV-hBMP2-IRES-EGFP através da indução de diferenciação osteoblástica de células C2C12

Figura 14. Análise funcional do meio condicionado das células 293T contendo o vetor pCMV-hBMP2-IRES-EGFP através da indução de diferenciação osteoblástica de células C2C12

Figura 15. Atividade de Fosfatase Alcalina das células C2C12 tratadas durante sete dias com o meio condicionado de células 293T e HEK293 contendo o vetor pCMV-hBMP2-IRES-EGFP e o vetor pCMV-hBMP4-IRES-EGFP, respectivamente

Figura 16. SDS-PAGE da purificação de rhBMP7 do meio de cultura de células 293T transfectadas com o vetor pCMV-hBMP7-IRES-EGFP

Figura 17. Análise das formas secretadas e de amostras purificadas de rhBMP7 presentes no meio condicionado de células 293T transfectadas com pCMV-hBMP7-IRES-EGFP. Purificação de rhBMP7

Figura 18. Desglicosilação enzimática de rhBMP7 purificada utilizando-se N-glicosidase F (PNGase F) analisada por *Western blot*

Figura 19. Análise funcional do meio condicionado das células 293T contendo o vetor pCMV-hBMP7-IRES-EGFP através da indução de diferenciação osteoblástica de células C2C12

Figura 20. Atividade de Fosfatase Alcalina das células C2C12 tratadas com o meio condicionado (MC) das células 293TpCMV-hBMP7-IRES-EGFP N°12

Figura 21. Análise histológica da osteodiferenciação *in vivo* utilizando-se a proteína rhBMP7 purificada à partir de meio condicionado de células 293T contendo o vetor pCMV-hBMP7-IRES-EGFP

Figura 22. Desenho experimental e esquema da aminação redutiva de aminoácidos

Figura 23. Fosfoenriquecimento por *beads* contendo TiO₂ imobilizado

Figura 24. Cromatografia Líquida de Interação Hidrofílica de peptídeos com grupos metila contendo ou não combinações de isótopos estáveis de hidrogênio e carbono

Figura 25. Cromatograma total combinado e espectro full-MS de um dado tempo de retenção para avaliação da marcação por isótopos estáveis por reação da amina primária de peptídeos com formaldeído

Figura 26. Gráficos de dispersão dos peptídeos quantificados e normalizados utilizando-se LOWESS

Figura 27. Interface gráfica do software StatQuant

Figura 28. Histograma dos motivos de fosforilação das quinases correspondentes àqueles encontrados nos fosfopeptídeos e gráfico de ocorrências de motivos por família de quinases

Figura 29. Classificação ontológica dos processos biológicos a partir das proteínas encontradas na análise proteômica

Figura 30. Rede de interações entre proteínas obtidas a partir dos dados obtidos nos experimentos de fosfoproteômica

Figura 31. Variação dos níveis de mRNA medidos nos de genes relacionados com a osteogênese avaliados através de experimentos de qRT-PCR (1)

Figura 32. Variação dos níveis de mRNA medidos nos de genes relacionados com a osteogênese avaliados através de experimentos de qRT-PCR (2)

Figura 33. Síntese das informações obtidas nos experimentos de fosfoproteômica, proteômica e qRT-PCR em células msMSCs induzidas com rhBMP2

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Principais moléculas envolvidas no desenvolvimento e reparo ósseos

Tabela 2. Tabela-resumo da redução de custos/indivíduo obtida através da utilização de rhBMP2 em fraturas tibiais abertas Gustilo-Anderson de grau III (estudo BESTT) em três países europeus (Alemanha, França e Reino Unido)

Tabela 3. Seqüência dos oligonucleotídeos utilizados para análise da expressão gênica através de PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR)

Tabela 4. Proteínas diferencialmente fosforiladas em cada período de indução com rhBMP2

Tabela 5. Sítios de fosforilação encontrados nos fosfopeptídeos e análise dos motivos de fosforilação de quinases utilizando NetworKIN 2.0 Beta

Tabela 6. Tabela contendo a lista das proteínas encontradas na rede que apresentaram interação com os dados da análise fosfoproteômica, obtida através do software Ingenuity

Tabela 7. Lista de fatores de transcrição resultantes da análise de redes de interação de proteínas com os dados obtidos na análise fosfoproteômica

LISTA DE ABREVIATURAS

µg	microgramas
µL	microlitro
µM	micromolar
°C	Graus Celsius
Abs	Absorbância
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BCA	Ácido bicinconínico
BMP	Proteína Morfogenética de Osso
cDNA	DNA complementar
CHO	<i>Chinese Hamster Ovary cells</i> (células de ovário de hamster chinês)
CID	<i>Collision Induced Dissociation</i> (Dissociação induzida por colisão)
Ct	número de ciclos da PCR que uma amostra atinge um valor de corte arbitrário nos ensaios de qPCR.
DDA	<i>Data Dependent Acquisition</i> (Aquisição dependente de dados)
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	dimetilsulfóxido
DNA	Acido desoxirribonucléico
dNTP	Desoxinucleotídeo
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
ESI	<i>Electrospray Dissociation</i>
ESTs	<i>Expressed Sequence Tags</i>
LC	Liquid Chromatography

LC-MS/MS	Liquid Chromatography coupled to Tandem Mass Spectrometry (Cromatografia acoplada à espectrometria de massas)
GAPDH	Gliceraldeído 3 fosfato desidrogenase
h	Hora(s)
HILIC	Cromatografia Líquida de Interação Hidrofílica
HMBS	Hydroxymethylbilane Synthetase
HPRT	hypoxantina fosforibosil transferase
IRES	<i>Internal Ribosome Entry Sequence</i>
Kpb	kilo pares de bases
kDa	kilodaltons
l	litro
LTD	Linear Triplo Quatrupolo
M	molar
mg	miligrama
min	minutos
ml	mililitros
mM	milimolar
mmol	milimol
MS	Espectrometria de massas
mRNA	RNA mensageiro
nm	nanômetro
nmol	nanomol
ORF	Caixa de leitura aberta
pb	pares de bases
PBSA	<i>Phosphate Buffered Saline</i> – sem íons divalentes (cálcio ou magnésio)

PCR	Reação da polimerização em cadeia
pmol	picomol
PNGase F	N-Glicosidase F
qPCR	PCR quantitativo
rhBMP2	Proteína Morfogenética de Osso humana recombinante 2
rhBMP4	Proteína Morfogenética de Osso humana recombinante 4
rhBMP7	Proteína Morfogenética de Osso humana recombinante 7
RNA	Ácido Ribonucleico
RNase	Ribonuclease
rpm	revoluções por minuto
RT-PCR	Transcrição reversa seguida de PCR
SDS	Sódio Dodecil Sulfato
SDS-PAGE	<i>Sodium Dodecil Sulfate - Polyacrilamide Gel Electrophoresis</i>
seg	segundos
SFB	Soro fetal bovino
TAE	Tris-Acetate-EDTA
TEAB	Bicarbonato de trietilamônio
TFA	Ácido Trifluoracético
T _m	Temperatura de <i>melting</i>
UI	Unidades Internacionais
V	Volt

Sumário

1. INTRODUÇÃO	17
1.1. O osso e o tecido ósseo: composição celular e histologia	17
1.2.2. Ossificação Endocondral.....	19
1.3. Vias de sinalização envolvidas na diferenciação de células mesenquimais em osteoblastos.....	21
1.4. As proteínas morfogenéticas ósseas.....	25
1.5. Homeostase do tecido ósseo no indivíduo adulto.....	28
1.6. Fraturas e o reparo ósseo	29
1.7. Utilização de BMPs recombinantes na clínica	33
2. OBJETIVOS.....	37
2.1. Objetivos gerais.....	37
2.2. Objetivos específicos.....	37
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	39
3.1. Plasmídeos.....	39
3.2. Soluções para cultura de bactérias.....	39
3.3. Cultura de bactérias	40
3.4. Preparação de estoques glicerinados.....	40
3.5. Linhagens celulares.....	40
3.6. Soluções e meios de cultura para células de mamíferos	41
3.7. Soluções.....	41
3.8. Amplificação do cDNA correspondente às proteínas hBMP2 e hBMP4	41
3.9. Inserção de timina nas extremidades dos cDNAs amplificados de hBMP2 e hBMP4 para clonagem em vetor pGEM-T Easy.....	42
3.10. Ligação do vetor pGEM-T Easy aos cDNAs correspondentes à hBMP2 e hBMP4	42
3.11. Eletroporação de <i>E. coli</i> DH10B	43
3.12. Identificação de clones bacterianos positivos para a clonagem de pGEM-T easy-hBMP2 e pGEM-T easy-hBMP4	43
3.12.1. Minipreparação de plasmidial.....	43
3.12.2. Diagnóstico de Restrição por endonucleases.....	44
3.12.3. Purificação dos fragmentos de cDNA de rhBMP2 e rhBMP4 para clonagem em vetor lentiviral	45
3.12.4. Ligação do vetor pCMV-IRES-EGFP com os cDNAs correspondentes à hBMP2 e hBMP4	45
3.12.5. Eletroporação de <i>E. coli</i> DH10B.....	45
3.13. Identificação de clones bacterianos positivos para a clonagem de pCMV-rhBMP2-IRES-EGFP e pCMV-rhBMP4-IRES-EGFP	46
3.13.1. Minipreparação plasmidial.....	46
3.13.2. Diagnóstico de Restrição por endonucleases.....	46
3.14. Transfecção estável de células 293T com pCMV-hBMP2- IRES-EGFP e pCMV-hBMP4-IRES-EGFP.....	47
3.15. Análise da expressão de hBMP2 e hBMP4 em clones estáveis de células 293TpCMV-hBMP2-IRES-EGFP, HEK293pCMV-hBMP4-IRES-EGFP e de frações purificadas de rhBMP7 através de Western Blot.....	47
3.16. Purificação de rhBMP7 do meio de cultura do clone estável de células 293TpCMV-hBMP7-IRES-EGFP através de cromatografia de afinidade por heparina.	48
3.17. Ensaio de desglicosilação da rhBMP7 utilizando a endoglicosidase PNGase F	49
3.18. Análise funcional das proteínas rhBMP 2, 4 e 7 expressas em células HEK 293 e 293T utilizando-se as células C2C12 como modelo de diferenciação osteoblástica através de análise de morfologia por microscopia e da atividade enzimática por fosfatase alcalina.	50
3.19. Osteodiferenciação <i>in vivo</i> utilizando-se rhBMP7 purificada por cromatografia de afinidade	51
3.19.1. Recuperação das amostras.....	52

3.20.	Indução osteogênica de células msMSC com rhBMP2 e obtenção do extrato celular total.	52
3.21.	Preparação de amostras para experimentos de espectrometria de massas.	53
3.21.1.	Hidrólise enzimática das proteínas do extrato celular.	53
3.21.2.	Dessanilização das amostras utilizando microcolunas de fase reversa.	54
3.21.3.	Adição de grupos dimetila contendo isótopos pesados estáveis de hidrogênio e carbono às aminas primárias dos peptídeos obtidos na digestão triptica.	54
3.21.4.	Fosfoenriquecimento através de cromatografia de afinidade por dióxido de titânio.	55
3.21.5.	Fracionamento de amostras para estudos de proteoma utilizando-se Cromatografia Líquida de Interação Hidrofílica (HILIC).	57
3.21.6.	Nanocromatografia Líquida de Fase Reversa e espectrometria de massas dos peptídeos tripsínicos.	58
3.21.7.	Análise dos dados obtidos dos experimentos de espectrometria de massas através de busca em banco de dados de peptídeos.	59
3.21.8.	Quantificação relativa e normalização dos peptídeos.	59
3.21.9.	Busca em banco de dados de motivos de fosforilação de quinases correspondentes aos fosfopeptídeos encontrados.	60
3.21.10.	Classificação dos peptídeos identificados na análise proteômica através de ontologia gênica.	60
3.22.	PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR).	61
3.22.1.	Extração do RNA total de msMSCs tratadas com rhBMP2.	61
3.23.	Síntese de cDNA.	62
3.24.	Determinação da concentração final de primers.	62
3.25.	Reação de PCR quantitativo em tempo real.	63
3.26.	Confirmação da expressão diferencial através de qPCR.	66
4.	RESULTADOS	68
4.1.	Clonagem de hBMP2 e hBMP4.	68
4.1.1.	Amplificação de hBMP2 e hBMP4 a partir de um Banco de cDNAs de Tecidos Humanos para clonagem no vetor pGEM T-easy.	68
4.1.2.	Clonagem de hBMP2 e hBMP4 no vetor pGEM-T Easy®.	71
4.1.3.	Subclonagem de rhBMP2 e rhBMP4.	71
4.2.	Transfecção estável de células HEK293T com os vetores pCMV-hBMP2- IRES-EFGP e pCMV-hBMP4-IRES-EFGP.	74
4.3.	Análise da expressão de rhBMP2, rhBMP4 em células HEK293 e 293T contendo os vetores pCMV-IRES-EGFP-hBMP2 e pCMV-hBMP4-IRES-EGFP respectivamente.	76
4.3.1.	Western Blot.	76
4.3.2.	Avaliação da atividade biológica de rhBMP 2 e 4 através da análise morfológica da diferenciação osteoblástica de células C2C12.	78
4.3.3.	Avaliação da atividade biológica de rhBMP 2 e 4 através de ensaio de atividade de fosfatase alcalina produzida por células C2C12 durante a diferenciação osteoblástica.	81
4.4.	Purificação de rhBMP7 presente no meio de cultura condicionado por células 293T contendo o vetor pCMV-hBMP7-IRES-EGFP.	83
4.5.	Análise das frações obtidas durante o processo de purificação do meio de cultura condicionado de células 293T pCMV-hBMP7-IRES-EGFP.	85
4.5.1.	Western Blot.	85
4.5.2.	Tratamento de rhBMP7 purificada por cromatografia de afinidade por heparina com endoglicosidase PNGase F.	87
4.5.3.	Análise da atividade biológica da rhBMP7 purificada através cromatografia por afinidade à heparina através da alteração morfológica de células C2C12 durante a diferenciação osteogênica.	88
4.5.4.	Avaliação da atividade biológica de rhBMP7 através de ensaio de atividade de fosfatase alcalina produzida por células C2C12 durante a diferenciação osteoblástica.	90
4.5.5.	Análise histológica da osteodiferenciação in vivo.	91
4.6.	Fosfoproteômica e proteômica quantitativa de proteínas diferencialmente abundantes durante a osteodiferenciação das células mMSCs induzida por rhBMP2.	93

4.9.	Análise <i>in silico</i> dos dados obtidos através de espectrometria de massas.....	101
4.9.1.	Busca por peptídeos a partir dos espectros.....	101
4.9.3.	Agrupamento dos peptídeos quantificados em proteínas	105
4.9.4.	Identificação das proteínas diferencialmente fosforiladas através da análise comparativa da abundância relativa em experimentos distintos	107
4.9.5.	Quinases possivelmente envolvidas com a fosforilação de substratos encontrados nos experimentos de espectrometria de massas	112
4.9.6.	Análise proteômica das proteínas diferencialmente abundantes e classificação ontológica destas ao longo do tratamento de células mMSCs com rhBMP2	129
4.9.7.	Redes de interações de proteínas	131
4.9.8.	Busca de genes-alvo relacionados à osteogênese a partir dos Fatores de Transcrição selecionados	136
4.10.	Confirmação da expressão diferencial dos genes ativados em células msMSCs analisada através de qRT-PCR.....	138
4.10.1.	Análise da expressão diferencial dos genes relacionados com a osteogênese durante a indução com rhBMP2 em mMSCs.....	138
5.	DISCUSSÃO	143
5.1.	Expressão de rhBMP2 e rhBMP4.....	144
5.2.	Purificação de rhBMP7 a partir do meio condicionado de células 293T contendo o vetor pCMV-hBMP7-IRES-EGFP.....	145
5.3.	Análise dos substratos fosforilados de células msMSCs tratadas com rhBMP2 através de fosfoproteômica quantitativa.....	147
5.4.	Análise das quinases envolvidas na fosforilação de substratos em células msMSCs tratadas com rhBMP2	151
5.4.1.	CK2.....	152
5.4.2.	p38 MAPK.....	152
5.4.3.	JNK.....	152
5.4.4.	CDKs.....	153
5.5.	Análise proteômica e classificação por ontologia genética em processos biológicos das proteínas diferencialmente abundantes em células msMSCs tratadas com rhBMP2.....	154
5.6.	Análise dos transcritos correspondentes a genes selecionados durante a diferenciação óssea ativada por rhBMP2 em msMSC's através de PCR quantitativo em tempo real.....	155
5.7.	Novas proteínas candidatas com aumento de fosforilação mediante indução por rhBMP2 em células msMSCs.....	158
6.	CONCLUSÕES	162
7.	PERSPECTIVAS.....	164
8.	REFERÊNCIAS.....	165
	SÚMULA CURRICULAR.....	179

1. INTRODUÇÃO

1.1. O osso e o tecido ósseo: composição celular e histologia

Os ossos são fundamentais para o rendimento do trabalho muscular, formando eficientes sistemas de alavancas nas articulações; formam estruturas protetoras de órgãos internos (como por exemplo, o crânio e caixa torácica); armazenam substâncias gordurosas no tecido adiposo da medula amarela; executam a hematopoiese, na medula vermelha, e, ainda, atuam como depósito de cálcio, fosfato e outros íons. O tecido ósseo, juntamente com outros tipos de tecidos, entre os quais se o fibroso, reticular, cartilaginoso, adiposo, sanguíneo e nervoso irão formar os ossos, principais componentes do sistema de sustentação e proteção dos vertebrados. Este tecido é multifuncional, metabolicamente ativo e heterogêneo, sendo constituído por vários tipos celulares em distintos estágios de diferenciação celular. A matriz orgânica é colagênica (colágeno tipo I), contendo proteoglicanas de baixo peso molecular e proteínas não colagênicas, que correspondem a 25% de seu peso, além de uma porção mineral (hidroxiapatita), correspondente a 65%, e 10% de água (BUCKWALTER; COOPER, 1987).

As células que compõem tecido ósseo constituem-se de osteócitos e osteoblastos. Os osteócitos estão localizados em cavidades ou lacunas dentro da matriz óssea. Destas lacunas, formam-se canalículos que se dirigem para outras lacunas, deste modo permitindo a difusão de nutrientes graças à comunicação entre estas células. Estes dois tipos celulares principais realizam funções fundamentais na manutenção e formação da matriz óssea:

- Osteoblastos, que são células que sintetizam a parte orgânica (colágeno tipo I, proteoglicanas e glicoproteínas) da matéria óssea. São capazes de concentrar fosfato de cálcio, participando da mineralização da matriz.
- Osteoclastos que participam dos processos de reabsorção e remodelamento do tecido ósseo. Na forma ativa, são células gigantes e multinucleadas, extensamente ramificadas, derivadas da fusão de monócitos originários da corrente sanguínea.

1.2. Formação do tecido ósseo

A formação do tecido ósseo humano tem início durante o desenvolvimento embrionário, durante a formação do eixo dorsoventral, sendo que o processo de crescimento e desenvolvimento se completa na fase adulta. Durante a embriogênese, o tecido ósseo é formado através de dois processos, que envolvem a transformação de um tecido mesenquimal, previamente formado, em tecido ósseo. A diferenciação direta de células mesenquimais em osteoblastos é chamada ossificação intramembranosa, originando os ossos achatados do corpo, como, por exemplo, os ossos do crânio (OPPERMAN, 2000). A outra forma é a ossificação endocondral ou intracartilaginosa, que ocorre por substituição de um molde cartilaginoso por osso, originando a maioria dos ossos do corpo, como, por exemplo, o fêmur, o úmero e a tíbia (ORNITZ; MARIE, 2002).

1.2.1. Ossificação Intramembranosa

A ossificação intramembranosa é caracterizada pela direta transformação das células mesenquimais em osteoblastos. Este processo é predominante no desenvolvimento dos ossos chatos do crânio, nas suturas, na maioria dos ossos da

face e partes da mandíbula e clavícula. Após a proliferação e condensação de células mesenquimais da crista neural nas áreas que irão dar origem ao tecido ósseo, ocorre a diferenciação óssea mediada pela expressão de *Runx2*, primeiro fator de transcrição específico da diferenciação óssea. A expressão de RunX2 induz outro fator de transcrição envolvido na diferenciação óssea, Osterix (Osx) (NAKASHIMA *et al.*, 2002). Estes dois fatores são críticos para a formação óssea, uma vez que Komori e colaboradores (KOMORI *et al.*, 1997) demonstraram que a deleção de RunX2 em camundongos causa ausência de ossificação e predominância de condrócitos, e, em humanos, alterações no gene codificante para RunX2 ocasiona displasia cleidocranial (OTTO *et al.*, 1997). Estas células começam a secretar colágeno tipo I em conjunção com proteoglicanos de matriz extracelular, que se depositam formando uma matriz mineral óssea, juntamente com matéria inorgânica composta por íons fosfato e cálcio. Esta matriz forma uma trabécula cristalina, que é responsável pela característica rígida do osso. Esta secreção contínua de matriz osteóide forma camadas ósseas, as quais podem apresentar células derivadas de osteoblastos chamadas de osteócitos que se afixam entre estas camadas.

1.2.2. Ossificação Endocondral

A formação óssea endocondral é caracterizada pela formação óssea através da formação primária de uma cartilagem, a qual é substituída, posteriormente, por tecido ósseo mineralizado, sendo responsável pela formação óssea do fêmur, tíbia e outros ossos longos do corpo. Este tipo de ossificação é iniciado quando células mesenquimais da crista neural proliferam e condensam. Dirigidas pelos fatores de transcrição Sox9 e RunX2, estas células se diferenciam em condrócitos e passam a

secretar componentes de matriz extracelular ricos em agrecan e colágeno tipo 2a1. A expressão de Runx2 em uma população específica destes condrócitos os torna condrócitos hipertróficos e permite que estes se diferenciem em osteoblastos. Há, porém, áreas que podem ser identificadas isoladamente, de acordo com o grau de especialização do tecido: a) zona de repouso; b) zona de proliferação, uma região rica em condrócitos com alta capacidade de replicação; c) zona hipertrófica, região onde há aumento do volume celular e d) zona de crescimento vascular, que apresenta trabéculas ósseas, osteoblastos, osteoclastos e células vasculares e hematopoiéticas. Das regiões que compõem a formação de tecido ósseo, a zona hipertrófica se destaca, devido ao fato de que nesta região, os condrócitos hipertróficos estimulam a diferenciação de células do pericôndrio em osteoblastos, sendo, portanto, pontos chave na regulação da formação óssea endocondral (NOONAN *et al.*, 1998). Nesta região, ocorre crescimento da matriz mineralizada, aproximação de vasos sanguíneos através da produção de fatores de crescimento endotelial (VEGF) e outros fatores, além de células que darão origem aos osteoclastos. Com o aumento do número de osteoblastos, originando o colar ósseo, os condrócitos hipertróficos entram em apoptose (RAJPUROHIT *et al.*, 1999), promovendo um arcabouço ósseo aonde os osteoblastos migrarão juntamente com os vasos sanguíneos, formando a espongiosa primária. No pericôndrio, importantes fatores autócrinos e parácrinos são expressos para sustentar e maturar a diferenciação óssea: Bone Morphogenetic Proteins 2, 4 e 7 (BMP), Indian Hedgehog (Ihh) e Parathormone Related Protein (PTHrP).

1.3.Vias de sinalização envolvidas na diferenciação de células mesenquimais em osteoblastos

O conhecimento do papel destes fatores de crescimento no desenvolvimento do esqueleto e de outros tecidos e órgãos relacionados ao tecido ósseo abre caminho para utilizar estas proteínas na prática clínica. Na formação óssea, diferentes vias de sinalização podem ser ativadas para promover e manter o processo de formação de osteoblastos. A Tabela 1 e a Figura 1 resumizam e ilustram a função de cada um destes fatores envolvidos na diferenciação óssea. Dentre eles, as BMPs possuem uma pronunciada importância, pois estão envolvidas na determinação dos primeiros sinais para formação óssea em células precursoras e mesenquimais e na maturação de osteoblastos. Em particular, as BMP2 e 4 possuem um papel fundamental no disparo dos primeiros sinais para a diferenciação óssea, pois animais deficientes destas proteínas apresentam falhas na formação de tecido cartilaginoso e a formação de membros é defeituosa. (Bandyopadhyay et al, 2006). Estas proteínas são membros da superfamília das TGF-beta (GRIMAUD *et al.*, 2002), e se ligam a receptores BMPRII e Alk 2,3 ou 6 (Activin receptor-like kinase) presentes nas células precursoras. Dependendo da disposição dos receptores na superfície celular, e quais tipos de receptores são ativados, diferentes vias de sinalização podem ser ativadas. Na sinalização do tipo PFC (*Pre-Formed Complex*), os receptores BMPRII, constitutivamente ativos, já se encontram ligados aos receptores Alk quando da ligação de BMP. BMPRII catalisa a fosforilação de Alk, o qual por sua vez, catalisa a fosforilação de proteínas efetadoras da transdução de sinal das vias das BMPs, como as Smads 1, 5 e 8 (*Sma and Mother Against Decapentaplegic homolog*), que se associam à co-Smad 4, formando um complexo

proteico que se dirige ao núcleo para ativação dos genes Runx2, Dlx5 e Osterix (Osx). Na sinalização do tipo BISC (*BMP-Induced Signaling Complex*), os receptores não estão previamente dimerizados, e a ligação de BMP ao receptor BMPRII leva à aproximação dos receptores que sofrem internalização mediada por caveolina. Neste tipo de sinalização, a via das MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinase*) é ativada, levando à transcrição do gene Runx2, que posteriormente, ativará as proteínas Smads 1, 5 e 8 para consolidação do *loop* de sinalização para a diferenciação óssea (SIEBER *et al.*, 2009). A maneira com que uma via é ativada em detrimento da outra é, portanto, tempo dependente, e processos envolvidos nesta regulação ainda precisam ser elucidados. O sinal das BMPs pode ainda ser regulado pelas Smads inibitórias 6 e 7 e pelas Smurfs (*Smad specific E3 ubiquitin protein ligase*), antagonizando intracelularmente o efeito das BMPs. (CHEN, D. *et al.*, 2004).

Tabela 1. Principais moléculas envolvidas no desenvolvimento e reparo ósseos.

Fatores	Função	Efeitos <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>
<i>Mensageiros extracelulares</i>		
TGFb	Fator mitogênico e osteogênico	Induz a diferenciação osteoblástica em células não diferenciadas; inibe a osteogênese em células comprometidas
BMP2	Fator osteogênico	Inicia a formação e reparo ósseo e induz a expressão de outras BMPs
BMP4	Fator osteogênico	Fator osteocondrogênico <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>
BMP7	Fator osteogênico	Fator osteogênico <i>in vivo</i> and <i>in vitro</i> ; ativo em osteoblastos maduros
FGFb	Fator angiogênico e mitogênico	Mutações no gene produzem condrodisplasia e craniosinostose; estimula a expressão de Sox9
IGF-I, II	Fator mitogênico e osteogênico	Estimula a formação da placa de crescimento, a ossificação endocondral e formação de osso e de osteoblastos
Wnt	Fator mitogênico e osteogênico	Crucial para a proliferação de osteoprogenitores; pode inibir a maturação osteoblástica
Ihh	Fator osteocondrogênico	Função essencial na formação da placa de crescimento e formação endocondral; pode induzir a expressão de PTHrP
PTHrP	Fator osteocondrogênico	Função essencial na formação da placa de crescimento e formação endocondral; pode induzir a expressão de PTHrP
<i>Mensageiros intracelulares</i>		
MAPKs	Transdução de sinais para osteogênese	Essencial para regulação da sinalização intracelular de fatores osteogênicos
PKA/CREB	Transdução de sinais para osteogênese	Transdução de sinal osteogênico
β-catenina	Fator de transdução osteogênico	Função essencial na transdução de sinal de Wnt e negativamente regulada por GSK3b
Runx2	Fator de transcrição osteogênico inicial	Principal regulador do início da osteogênese
Osterix	Fator de transcrição osteogênico tardio	Principal regulador da osteogênese tardia e inibe a condrogênese
Dlx5	Fator de transcrição osteogênico	Induz a maturação de osteoblastos e inibe a formação de osteócitos
Msx2	Fator de transcrição osteogênico	Induz a proliferação de células precursoras; a resposta depende de Dlx5

A tabela mostra as principais proteínas envolvidas com a osteogênese, divididas por compartimento extra ou intracelular. Retirado de Deschaseaux et al 2009.

Figura 1. Vias de sinalização descritas para a diferenciação óssea. a) Ihh-PTHrP: A *Indian Hedgehog* (Ihh) é outro regulador envolvido com a diferenciação e proliferação condro-óssea durante o desenvolvimento. Através da síntese de PTHrP (*Parathormone Related Protein*), regula a diferenciação hipertrófica de condrócitos, nas extremidades ósseas. A via de sinalização inicia-se com a ligação da proteína Ihh ou Hh ao receptor *Patched* (Ptch), que desassocia-se de *Smoothed* (Smo), e desta maneira permite que as proteínas citoplasmáticas Gli transloquem-se para o núcleo e ativem genes alvo. **b)** Via canônica da diferenciação óssea mediada por BMPs (*vide texto*). **c)** Wnt/β-catenina: As proteínas Wnt ligam-se aos receptores de membrana *Frizzled* (Fzd) e aos co-receptores *Lipoprotein receptor related protein* (Lrp), que permitem o recrutamento de proteínas *Dishevelled* (Dsh), que inibem a degradação de β-catenina, auxiliando-a na translocação para o núcleo. Uma vez no núcleo, a β-catenina interage com os fatores LEF/TCF permitindo a ligação da histona acetilase CBP/p300 e a ativação da transcrição gênica. Camundongos deficientes em Lrp ou Wnt10b possuem defeitos ósseos congênitos. **d)** As MAPK estão envolvidas na diferenciação óssea através da fosforilação de GSK3β, impedindo a degradação de β-catenina; fosforilação de Dlx5, e aumento da transcrição de Osterix; ativação direta de Runx2. Estas quinases também podem realizar interações com as Smads 1,5 e 8, presentes na via canônica das BMPs. Por outro lado, ERK1/2 pode inibir a transcrição de genes relacionados à diferenciação óssea.

1.4. As proteínas morfogenéticas ósseas

As proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs) são citocinas multifuncionais que pertencem à superfamília das TGF- β , que compreendem cerca de 50 genes (CHEN, D. *et al.*, 2004). Estas proteínas desempenham um papel crítico no crescimento e diferenciação de vários tipos celulares em diversos tecidos, atuando em processos como a: proliferação celular, diferenciação celular, morfogênese, organogênese e apoptose (DUCY, P; KARSENTY, G, 2000; EBENDAL *et al.*, 1998; GRAFF, 1997; WOZNEY, J M, 1998). As proteínas codificadas por estes genes consistem de precursores de 400 a 500 aminoácidos que possuem um peptídeo sinal N-terminal, um pró-domínio não conservado entre os membros pertencentes da família, além da proteína madura, que consiste da porção C-terminal da proteína não processada. A proteína precursora é clivada por uma convertase semelhante à subtilisina (*SCP - subtilisin-like convertase*), produzindo a proteína madura, que contém de 100 a 140 aminoácidos. Esta última possui sete resíduos de cisteína conservados, dos quais seis realizam pontes dissulfeto intramolecular, que caracteriza um domínio de nó de cistina (*cystine knot*), enquanto o resíduo restante realiza pontes dissulfeto intermolecularmente, permitindo a formação de homodímeros da proteína, essencial para sua atividade (GRIFFITH *et al.*, 1996) (figura 2). Formas precursoras contendo pró-domínio ligado não covalentemente à estrutura da proteína madura podem ser secretadas, sem, no entanto, afetar a atividade da mesma (GREGORY *et al.*, 2005). As BMPs possuem dois sítios para glicosilação N e O ligadas, as quais aumentam a estabilidade e meia-vida da proteína no organismo, além de determinar a especificidade de ligação ao receptor (WALSH, 2010). A figura 3 mostra as proteínas

da superfamília das TGF- β , classificadas de acordo com a similaridade de sequência da proteína em humanos e outras espécies.

Figura 2. A) Diagrama representando a topologia de BMP2 e B) Visão estérica da proteína BMP2 nativa, dimérica. Em a), α -hélices são representadas por cilindros e folhas β -pregueadas são representadas por setas. As pontes dissulfeto estão representadas por traços entre duas moléculas de enxofre ("S"). O *cystine knot* constitui o centro do monômero e consiste de três pontes dissulfeto. Estruturas antiparalelas das sequências de folhas β -pregueadas de $\beta 1$ A $\beta 9$ representam estruturas em projeções denominadas *fingers*. A α -hélice, localizada no lado oposto ao *cystine knot*, é perpendicular ao eixo da estrutura formada pelas folhas β -pregueadas, formando uma estrutura denominada *Wrist* ou punho. Em b), é possível ver a estrutura dimérica de BMP7, sendo que cada monômero está representado por uma cor (azul e laranja). As pontes disulfeto estão representadas por projeções das cadeias laterais das cisteínas (verde). Figura adaptada de Griffith et al.,1996.

A atividade osteogênica das BMPs foi primeiramente descrita nos anos de 1960, quando Urist e colaboradores (URIST, MARSHALL R, 1965), através da formação óssea em enxertos autólogos, porém o isolamento da primeira BMP somente foi conseguido nos anos 80, com a purificação de BMP3 a partir de extrato de osso bovino. Atualmente, existem em torno 20 proteínas morfogenéticas ósseas descritas, sendo que as BMPs 2 e a 7 possuem potencial osteogênico. Outras BMP's, porém, possuem ações distintas, como metaloprotease de matriz, (BMP1), formação cartilaginosa (BMP 8 e 9), formação de trabéculas no coração do embrião (BMP 10) e desenvolvimento do oócito e formação folicular (XIAO *et al.*, 2007).

Figura 3. Proteínas da superfamília das TGF-β retirado de (Ducy e Karsenty et al 2000).

*Proteínas de *Drosophila*, ***Xenopus* e ***ouriço do mar.

1.5. Homeostase do tecido ósseo no indivíduo adulto

Embora o tecido ósseo seja, aparentemente, um órgão estático, na verdade, a manutenção deste tecido é complexa e dependente de diversos fatores circulantes como hormônios, proteínas e sais inorgânicos, os quais devem estar em equilíbrio, caso contrário, pode resultar em patologias ósseas para o paciente, diminuindo sua mobilidade e sua qualidade de vida. Para reter a força mecânica a que é submetido diariamente, é necessário que haja mecanismos de reparo aos microdanos estruturais no tecido. Isto é conhecido graças à constante formação e absorção de tecido ósseo, de maneira a substituir o antigo tecido ósseo danificado por tecido ósseo recém mineralizado, capaz de ser submetido à estresse mecânico sem sofrer ruptura. As primeiras bases para o entendimento da remodelação óssea foram lançadas por Courpron e Vignon (COURPRON *et al.*, 1975), que postularam que a remodelação óssea teria início em uma Unidade Básica Multicelular (Basic Multicellular Unit - BMU), composta por osteoblastos, osteoclastos e osteócitos dentro do locus de remodelação óssea. A remodelação óssea no osso esponjoso é iniciada pela aproximação de células mononucleares precursoras à matriz a ser absorvida. Estas células possuem RANK na superfície e, quando da ligação de RANKL expresso pelos osteoblastos adjacentes, se diferenciam em osteoclastos, iniciando o processo de reabsorção da matriz óssea, que pode ser modulado negativamente por osteoprotegerina (OPG) secretada pelos osteoblastos. Esta ação dos osteoclastos leva à formação de uma lacuna de erosão, que é posteriormente preenchida com células mesenquimais que darão origem a osteoblastos. Os osteoblastos, que expressam RunX2, secretam diversos fatores autócrinos e parácrinos que irão regular a proliferação celular, a deposição de matriz óssea e a

formação de novos vasos, pela secreção de VEGF, RANKL, *Sclerostin* e a proteína de matriz de dentina 1 (DMP1). Diferentes fatores atuam na maturação desta população como: paratormônio (PTH), BMPs, FGFs IGFs, prostaglandinas e endotelinas, que estimulam os osteoblastos a secretarem uma matriz mineralizada rígida. Nesta altura, os osteoblastos maduros são chamados de osteócitos e secretam DMP1, FGF 23 e Sclerostina, responsáveis pela manutenção do metabolismo ósseo e mineral. No final do processo, que dura em média 200 dias, ocorre a formação de um novo tecido ósseo, que pode se estender até dois anos. A remodelação do tecido ósseo compacto ocorre de maneira diferente. Canais formados pela ação dos osteoclastos, pela retirada do antigo tecido ósseo são preenchidos por osteoblastos que se proliferam, causando a oclusão do canal (ERIKSEN, 2010).

1.6. Fraturas e o reparo ósseo

Diferentemente do que ocorre em outros tecidos, o tecido ósseo, em quadros de fraturas ou pequenas fissuras, possui a capacidade de produzir novo tecido ósseo, não produzindo tecido fibrótico característico da cicatrização de tecidos moles. Nas fraturas, há um intenso processo inflamatório no local da lesão, e, em seguida, o processo de reparo se inicia, com a proliferação de células precursoras que constituirão o calo ósseo, e, posteriormente, a remodelação do tecido para atender aos esforços mecânicos. Os aspectos moleculares que irão participar na recuperação de uma fratura óssea de um indivíduo adulto são os mesmos em relação àqueles que participam na formação destas estruturas na embriogênese (formação óssea intramembranosa e endocondral), adicionadas da participação de interleucinas pró-inflamatórias. Contudo, os aspectos celulares são diferentes, uma

vez que no local da fratura há pouca disponibilidade de células precursoras ou células-tronco capazes de se diferenciar em osteoblastos e a presença de uma constante carga física em que o tecido é submetido ao sustentar o corpo. O processo inflamatório ocasionado após a fratura promove a migração e a agregação de células mesenquimais provenientes da circulação e do periósteo para o local da lesão, através de fatores quimiotáticos pró-inflamatórios como IL1, IL6 e TNF- α . Após intensa proliferação em hipóxia estas células formam os primeiros núcleos de diferenciação em osteoblastos e condrócitos. As células mesenquimais passam então a secretar fatores autócrinos e parácrinos de diferenciação, entre eles os quais o fator de crescimento vascular (VEGF), o fator de crescimento de fibroblasto (FGF), Indian Hedgehog (Ihh), Wnt e proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs), que estimulam o processo de diferenciação destas células e a maturação do fenótipo osteoblástico (GERSTENFELD *et al.*, 2003). Além disso, o processo de lesão de vasos que ocorre em fraturas estimula a angiogênese e a vasculogênese por recrutamento de células precursoras endoteliais, estimuladas por VEGF e PIGF, que permitirão a irrigação do novo tecido ósseo a ser formado. Quando um destes fatores é deficiente no local da lesão, a fratura não se recupera plenamente, ocasionando a não-união das extremidades e perdas ósseas, que levam o paciente a ser submetido a intervenções cirúrgicas secundárias (DESCHASEAUX, F *et al.*, 2010). Ao longo da vida do indivíduo, e em quadros clínicos onde há extenso dano ao tecido ósseo, como em infecções, tumores, traumas originados de procedimentos incorretos, cistos, doença periodontal, tumores e defeitos congênitos, a disponibilidade de células mesenquimais capazes de iniciar o processo de recuperação no local diminui, e tais quadros de falha na recuperação óssea tornam-se mais frequentes. Nos últimos anos, a Medicina Regenerativa mostrou-se eficaz

na tentativa de se obter métodos terapêuticos alternativos para a recuperação óssea, através da reposição de fatores de estímulo da diferenciação óssea no local da lesão utilizando-se de proteínas recombinantes, uma vez que já se encontram disponíveis no mercado europeu e americano medicamentos baseados em proteínas terapêuticas para utilização em pacientes. Outras metodologias recentes incluem a utilização de células-tronco mesenquimais (MSCs) autólogas. Em ambos os casos, a capacidade de regeneração do tecido ósseo foi melhorada, enquanto os custos, o tempo de internação e a reincidência de lesão foram diminuídos (GARCÍA-CASTRO *et al.*, 2008). A utilização de proteínas recombinantes e de MSCs é potencializado através do uso de matrizes minerais ou sintéticas, como: carboximetilcelulose, ácido poli-glicólico, osso bovino sinterizado e hidroxiapatita.

Figura 4. Estágios envolvidos no reparo de fraturas e a expressão de moléculas envolvidas neste processo. Os períodos de tempo relativos para cada uma das fases da recuperação óssea é representado por triângulos, que também demonstram a intensidade dos processos moleculares. As barras horizontais representam a expressão dos genes, correspondentes aos períodos de cada fase de recuperação óssea. Barras mais grossas correspondem a uma maior expressão e barras mais finas, a uma menor expressão. Adaptado de Gerstenfeld et al, 2003.

1.7. Utilização de BMPs recombinantes na clínica

Embora as BMPs possam apresentar atividade mesmo em doses baixas no local da fratura, a obtenção de miligramas desta proteína parcialmente pura a partir de extratos ósseos desmineralizados requer quilogramas de material inicial (GAO, T. *et al.*, 1996). Tais custos levam à busca de novas metodologias de obtenção destas proteínas. No final dos anos 80, as primeiras seqüências codificadoras das proteínas da família das BMPs foram clonadas, abrindo a possibilidade de futura aplicação desta proteína na terapêutica (CELESTE *et al.*, 1990; WANG, E. A. *et al.*, 1988), o que se concretizou em 2001 através da permissão pelo FDA do uso de rhBMP7 e em 2002, de rhBMP2 recombinantes sob o nome farmacológico de dibotermína-alfa e eptotermína-alfa. Estas proteínas recombinantes foram obtidas a partir da clonagem de seus respectivos cDNAs e sua expressão em células CHO (Chinese Hamster Ovary cells) (ISRAEL *et al.*, 1992). Atualmente, estas proteínas são vendidas com o nome de InductOS®, InFUSE® e OP-1 Implant®.

Vários são os estudos clínicos explorando o potencial osteoregenerativo das BMPs. Em Ortopedia, as BMPs forneceram resultados satisfatórios em fraturas tibiais abertas, não-união escafóide, defeitos fibulares, melhoramento do quadro em fraturas periprostéticas, melhoramento do processo de recuperação após reconstrução do acetábulo e artrodese de articulações (GIANNOUDIS; TZIOUPIS, 2005). Na Odontologia, a utilização clínica de BMP se estende à regeneração periodontal, em casos de perda óssea, implantes (crescimento no volume ósseo para inserção de implantes e aumento do seio maxilar) e cirurgias restauradoras endodônticas. Não é apenas o uso clínico extenso de BMP que incentiva os estudos com o objetivo de aprimorar sua aplicação terapêutica, mas, também, a redução de

dias de internação hospitalar, re-intervenções cirúrgicas, devido à necessidade de correções anatômicas, a melhora na recuperação do paciente e redução da morbidade. A tabela 2 mostra o resumo de um estudo clínico realizado em três países europeus, que demonstrou a redução de custos e dos períodos de tempos de internação (que foi em média 45 dias) para o sistema de Saúde e para o paciente (ALT *et al.*, 2009), o que mostra que a utilização de BMP2 permite uma melhora efetiva no tratamento de fraturas ósseas.

Tabela 2. Tabela-resumo da redução de custos/indivíduo obtida através da utilização de rhBMP2 em fraturas tibiais abertas Gustilo-Anderson de grau III (estudo BESTT) em três países europeus (Alemanha, França e Reino Unido).

	Economia líquida por caso (€)	População em 2009 (milhões de habitantes)	Incidência estimada de fraturas tibiais do tipo III (2,8/100.000 hab)	Economia total estimada (milhões €)
Alemanha	6300	82,2	1700	14,5
França	6341	63,8	1800	11,4
Reino Unido	5672	60,6	1700	9,6

A economia líquida por caso de fratura foi multiplicada pelo casos estimados na população, levando em conta o tamanho da população de cada país pela incidência média européia da patologia (2,8 casos por 100.000 habitantes), resultando em economias totais estimadas naqueles países.

Este e outros estudos (GRANJEIRO *et al.*, 2005) mostram que, na maioria dos casos, as BMPs recombinantes são eficazes na reversão de quadros patológicos diversos em Ortopedia e Odontologia, reduzindo a invasividade da cirurgia realizada, os períodos de tempo de internação, os custos com operações secundárias e o tempo para reabilitação. Tais efeitos se traduzem em uma melhoria na qualidade de vida do paciente. Não há dúvida que os avanços dos estudos destas proteínas em usos clínicos futuramente serão o padrão para o tratamento de patologias ósseas que apresentam dificuldade de recuperação. Todavia, a tecnologia precisa ser aprimorada e várias questões relacionadas ao uso clínico destas proteínas necessitam ser respondidos. Para tal, um entendimento melhor das fases iniciais da recuperação óssea se faz necessário, sobretudo nas células que constituirão o tecido ósseo neoformado. Apesar do conhecimento já acumulado sobre as vias canônicas de ativação da programação osteogênica, a participação de vias alternativas neste processo não está clara, como a participação das MAPK e o *crosstalk* destas vias. Desta maneira, o presente estudo pretende, através da utilização de técnicas proteômicas do tipo *high-throughput* para análise de proteínas fosforiladas em células mesenquimais derivadas da pele tratadas com rhBMP2, contribuir para a elucidação dos processos moleculares ativados direta ou indiretamente pelas BMPs, e, futuramente aprimorar os efeitos destas proteínas na terapia celular em Ortopedia e Odontologia.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos gerais

- a) Determinar os substratos protéicos fosforilados durante a osteogênese induzida por BMPs em culturas de células pré-osteoblásticas, através de técnicas de fosfoproteômica;
- b) Expressar rhBMP2 e rhBMP4 em sistemas de expressão heteróloga;
- c) Purificar e caracterizar a proteína recombinante rhBMP7 produzida em células de mamífero.

2.2. Objetivos específicos

- a) Detectar, por técnicas de proteômica quantitativa *shotgun* e fosfoenriquecimento de peptídeos, os substratos protéicos fosforilados presentes nos extratos totais de células mesenquimais de pele murina durante as primeiras horas de indução osteogênica com rhBMP2;
- b) Determinar as possíveis quinases catalizadoras deste processo, através de análise *in silico*;
- c) Analisar a cinética de ativação de genes relacionados com a osteogênese nas células mesenquimais de pele murina ao longo dos períodos estudados de diferenciação osteogênica induzida por rhBMP2;
- d) Clonar e subclonar os cDNAs codificantes correspondentes às proteínas osteoindutoras humanas recombinantes rhBMP2 e rhBMP4.

- e) Expressar rhBMP2 e rhBMP4 em células de mamíferos (HEK 293T e 293T) e Analisar a expressão e atividade de rhBMP2 e rhBMP4;
- f) Purificar e realizar a análise funcional in vitro e in vivo de rhBMP7 presente no meio de cultura de células 293T estavelmente transfectadas com o vetor de expressão pCMV-hBMP7-IRES-EGFP.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Plasmídeos

3.1.1. pGEM-T Easy®: vetor de clonagem comercial (Life Technologies)

3.1.2. pTK-Hyg: vetor que contém o gene que confere resistência à higromicina, utilizado em co-transfecções de células de mamíferos (Clontech), derivado a partir do vetor pY3 (BLOCHLINGER; DIGGELMANN, 1984).

3.1.3. pCMV-IRES-EGFP: vetor de expressão lentiviral para células de mamíferos, modificado a partir do vetor pCMV cedido pelo Professor Inder Verma (Salk Institute, La Jolla, Califórnia).

3.2. Soluções para cultura de bactérias

3.2.1. Meio líquido de cultura SOC: 2% triptona, 0,5% extrato de levedura, 10mM NaCl, 2,5mM KCl, 10mM MgCl₂, 20mM MgSO₄, 20mM glicose.

3.2.2. Meio LB (Luria-Bertani): Triptona 10g/l; extrato de levedura 5g/l; NaCl 10g/l (pH 7,5).

3.2.3. LB-ágar: meio LB com 1,5g/l de ágar (Difco)

3.3. Cultura de bactérias

Bactérias (DH10B ou XLB1) foram crescidas à 37°C em meio LB (líquido) ou meio LB-ágar (sólido) contendo 100µg/ml de ampicilina ou 50µg/ml de kanamicina. No caso do crescimento em meio líquido, utilizou-se um agitador orbital e, para o crescimento em meio sólido, uma estufa.

3.4. Preparação de estoques glicerizados

Uma suspensão de bactérias (3mL) foi crescida durante a noite em meio líquido e as bactérias foram sedimentadas por centrifugação a 20.000g. O *pellet* foi ressuspenso em 500µL de meio LB e foram adicionados 500µL de glicerol estéril para a geração de estoques glicerizados, que foram armazenados à -70°C.

3.5. Linhagens celulares

3.5.1. 293T: linhagem humana do epitélio renal derivada de células HEK 293 (ATCC CRL1573) por transformação com o antígeno LT do vírus SV40.

3.5.2. C2C12: Número ATCC CRL-1772, linhagem celular de camundongo que se diferencia em células musculares. O tratamento com rhBMP2 ou rhBMP7 inibe esta diferenciação, induzindo à diferenciação osteoblástica.

3.5.3. msMSC (murine skin mesenchymal stem cells): linhagem mesenquimal de pele de camundongo que possui a capacidade de diferenciação em condrócitos, adipócitos e osteoblastos, isolada e caracterizada em nosso laboratório pela aluna de Doutorado Maria Fernanda Demonte Araújo Forni.

3.6. Soluções e meios de cultura para células de mamíferos

3.6.1. Meios de cultura: DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium* e α -MEM (Life Technologies), suplementados com soro fetal bovino (Cultilab).

3.6.2. Solução salina: PBSA (Phosphate Buffered Saline – sem cálcio ou magnésio), solução salina-fosfato tamponada pH7,2, composta por 140mM NaCl, 2,7mM KCl, 8mM Na₂HPO₄ e 1,5mM KH₂PO₄.

3.6.3. Tripsina: solução 0,1% de tripsina (Gibco) em PBSA contendo 1mM EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético).

3.7. Soluções

Todas as soluções utilizadas foram feitas a partir de reagentes de grau de pureza para análise, segundo formulações descritas em manuais de laboratório (AUSUBEL *et al.*, 1992).

3.8. Amplificação do cDNA correspondente às proteínas hBMP2 e hBMP4

Para amplificar ambas BMPs humanas, foi utilizado um Banco de cDNAs de Tecidos Humanos previamente gerado em nosso laboratório, durante o projeto Transcript Finishing Initiative (TFI), utilizando-se as linhagens celulares correspondentes aos seguintes tecidos: mama (ZR 75.1, MDA-MD-231) e pulmão (NCI-H1155). A reação de PCR para a amplificação de hBMP2 foi feita numa mistura de reação de volume total de 20 μ l utilizando-se 0.25 μ M de cada um dos *primers*: N2Xba (5'-TTCTAGAGCCACCATGGTGGCCGGGACC-3') e N2Bam (5'-GGATCCCTAGCGACACCCACAACCCT-3'), e 1U de Phusion Taq Hi-Fi DNA polimerase (Life Technologies). As amostras foram tratadas à 94°C por 3min e

submetidas a 30 ciclos de 30seg à 94°C, 30seg à 76°C e 1min à 72°C, com uma etapa de extensão posterior à 72°C por 10min. A reação de PCR para a amplificação de hBMP4 foi feita numa mistura de reação em volume total de 20µl utilizando-se uma solução contendo 0.25µM de cada um dos *primers*, 4XbaF (5'-TCTAGAGCCACCATGATTCCTGGTAACCGAATG- 3') e 4BamR (5'-GGATCCTCAGCGGCACCCACATCC -3') e 1U de Phusion Taq Hi-Fi DNA polimerase (Life Technologies). As amostras foram tratadas à 94°C por 3min e submetidas a 30 ciclos de 94°C por 30s, 78°C por 30s e 72°C por 1min. Posteriormente, uma etapa de extensão de 10min a 72°C. Para cada caso, 10µl de cada reação foram aplicados a um gel de agarose 1% contendo brometo de etídeo, para a separação através de eletroforese em gel de agarose.

3.9. Inserção de timina nas extremidades dos cDNAs amplificados de hBMP2 e hBMP4 para clonagem em vetor pGEM-T Easy

Uma vez amplificados, os fragmentos de DNA correspondentes à hBMP2 e hBMP4 foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% e purificados com o *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen). Para inserção do cDNA no vetor pGEM-T Easy, os fragmentos foram incubados com DNA polimerase I e 0,2mM de dTTP a 70°C por 30 minutos num volume final de 10µl.

3.10. Ligação do vetor pGEM-T Easy aos cDNAs correspondentes à hBMP2 e hBMP4

Para a reação de ligação foram utilizadas 100ng do vetor pGEM-T Easy e 1µg dos fragmentos correspondentes aos cDNAs de hBMP2 e hBMP4 devidamente tratados, conforme descrito na seção 1.9, numa mistura de reação de volume total

25µl contendo 5U de T4 DNA ligase (Fermentas). As amostras foram incubadas por 16h a 25°C, e, posteriormente, a 65°C durante 15min. Como controles, foram incubados somente o vetor ou o vetor com os fragmentos na ausência da ligase.

3.11. Eletroporação de E. coli DH10B

Após o término da reação de ligação da seção anterior, 2µl de cada amostra foram misturadas com 50µl de bactérias eletrocompetentes e estas foram eletroporadas numa cubeta a 2.800V. Para cada amostra, foi adicionado 1ml de meio líquido de cultura SOC e estas culturas foram incubadas durante 1h à 37°C sob agitação constante. Posteriormente, 100µl de cada amostra foram semeados em placa LB Agar contendo 50µg/ml de ampicilina.

3.12. Identificação de clones bacterianos positivos para a clonagem de pGEM-T easy-hBMP2 e pGEM-T easy-hBMP4

3.12.1. Minipreparação de plasmidial

As colônias resistentes à ampicilina, obtidas a partir transformação de bactérias DH10B com o vetor pGEM-T Easy-hBMP2 e pGEM-T Easy-hBMP4, foram selecionadas a partir das placas de LB-ágar e inoculadas em 3ml de meio LB líquido suplementado com 50µg/ml de ampicilina e incubadas sob agitação a 200rpm por 16h a 37°C. Em seguida, a cultura de bactérias foi centrifugada a 8.000g por 2min e o sobrenadante foi descartado. As células foram então ressuspensas vigorosamente em tampão de ressuspensão (50mM glicose, 10 mM EDTA e 25 mM Tris-Cl pH 8,0) e, posteriormente, adicionou-se tampão de lise (0.2N NaOH, 1% w/v SDS) e incubou-se a temperatura ambiente por 5min. A lise celular foi interrompida

com tampão de neutralização (3M acetato de potássio). A suspensão foi centrifugada a 12.000g por 15min, e o sobrenadante foi transferido para outro tubo. Ao sobrenadante, foram adicionados dois volumes de etanol 100%, agitando-se levemente os tubos. O DNA plasmidial foi então recuperado centrifugando-se os tubos a 12.000g por 5min e descartando-se o sobrenadante. Posteriormente, 1000µl de uma solução 70% etanol foram adicionados aos tubos, que foram posteriormente centrifugados a 12.000g por 5min. O sobrenadante foi descartado, e os tubos foram deixados abertos para que houvesse completa evaporação do solvente. Após a verificação da secagem completa dos tubos, 50 µl de água ultrapura deionizada livre de DNase, contendo 20 µg/ml RNase A pancreática foram adicionados. A concentração de ácido nucléico foi posteriormente medida através da leitura da absorbância a 260nm, e os tubos foram armazenados a -20°C para posterior uso.

3.12.2. Diagnóstico de Restrição por endonucleases

Para a verificação da existência de clones positivos para a clonagem de rhBMP2 e 4 no vetor de manutenção, realizou-se um ensaio de diagnóstico de restrição por endonucleases. Uma amostra (500µg) da minipreparação de DNA plasmidial obtida na seção anterior foi digerida com 1U da enzima *Xba*I e 1U da enzima *Bam*HI em tampão Tango® 2x (Fermentas), à 37°C por 2h e à 65°C durante 15min, para inativação das endonucleases. A amostra foi submetida à eletroforese em gel de agarose 1%, e as bandas correspondentes aos tamanhos do vetor linearizado e ao inserto de cDNA foram verificados. Em seguida, as sequências dos plasmídios foram verificadas por sequenciamento automático.

3.12.3. Purificação dos fragmentos de cDNA de rhBMP2 e rhBMP4 para clonagem em vetor lentiviral

Uma amostra de 1µg de DNA plasmidial de cada um dos clones bacterianos positivos contendo o vetor pGEM-rhBMP2 ou pGEM-rhBMP4, foi digerida com 1U da enzima *Xba*I e 1U da enzima *Bam*HI, conforme descrito na seção anterior. A amostra foi submetida à eletroforese em gel de agarose de baixo ponto de fusão a 0,8%, e a banda correspondente ao cDNA de cada uma das sequências acima citadas foi retirada com auxílio de um escalpe e purificada utilizando-se o kit *Qiaquick Gel Extraction* (Qiagen).

3.12.4. Ligação do vetor pCMV-IRES-EGFP com os cDNAs correspondentes à hBMP2 e hBMP4

A reação de ligação foi feita utilizando-se 50ng do vetor pCMV-IRES-EGFP digerido e purificado e 50ng dos fragmentos de DNA correspondentes à hBMP2 e hBMP4 purificados, conforme descrito na seção anterior. O vetor contendo cada um dos respectivos cDNAs foi incubado com 5U de T4 DNA ligase (Fermentas) e 2µl de tampão numa mistura de reação em um volume total de 20µl. As amostras foram incubadas por 16h à 16°C e, posteriormente, à 65°C durante 15min, para a inativação da enzima. Como controles, um grupo contendo apenas o vetor, sem fragmentos, e vetor sem ligase, mas contendo fragmentos foram utilizados.

3.12.5. Eletroporação de *E. coli* DH10B

Após o término da reação de ligação do item 1.14, 2µl de cada amostra foram misturados com 50µl de bactérias eletrocompetentes e submetidas à eletroporação em uma cubeta à 2.400V. Posteriormente, para cada amostra, foi adicionado 1 ml de

meio de cultura LB e as bactérias foram incubadas durante 1h à 37°C sob agitação a 200rpm. Posteriormente, 100µl de cada amostra foram plaqueados em placa LB ágar contendo 100µg/ml de ampicilina.

3.13. Identificação de clones bacterianos positivos para a clonagem de pCMV-rhBMP2-IRES-EGFP e pCMV-rhBMP4-IRES-EGFP

3.13.1. Minipreparação plasmidial

As colônias resistentes à ampicilina, obtidas a partir da transformação de bactérias DH10B com o vetor lentiviral pCMV-rhBMP2-IRES-EGFP e pCMV-rhBMP4-IRES-EGFP foram selecionadas das placas de LB-ágar, inoculadas em 3ml de meio LB líquido suplementado com 50µg/ml de ampicilina e incubadas sob agitação a 200rpm por 16h a 37°C, para obtenção do DNA plasmidial, como descrito na sessão 1.12.

3.13.2. Diagnóstico de Restrição por endonucleases

Para a verificação da existência de clones positivos para a clonagem de rhBMP2 e 4 no vetor lentiviral, realizou-se um ensaio de diagnóstico de restrição por endonucleases. 500µg da minipreparação obtida na seção anterior foram digeridos com 1U da enzima *Xba*I e 1U da enzima *Bam*HI em tampão Tango® 2x (Fermentas), à 37°C por 2h e à 65°C durante 15min, para inativação das endonucleases. A amostra foi submetida à eletroforese em gel de agarose 1%, e as bandas correspondentes aos tamanhos do vetor linearizado e ao cDNA foram verificados. Em seguida, as sequências dos plasmídios foram verificadas por sequenciamento automático.

3.14. Transfecção estável de células 293T com pCMV-hBMP2- IRES-EGFP e pCMV-hBMP4-IRES-EGFP

Amostra de 8µg de pCMV-IRES-EGFP, pCMV-hBMP2-IRES-EGFP e pCMV-hBMP4-IRES-EGFP foi co-transfetada, em cada caso, com 0,4µg do vetor pTK-Hyg, através do método de lipofecção, utilizando-se Lipofectamina 2000 (Life Technologies), em células HEK293 ou 293T, cultivadas em placas P60. Após 48h, as culturas células foram tripzinizadas e subdivididas (1:5, 1:10, 1:20 e 1:40) em placas P60 contendo meio DMEM suplementado com 10% soro e 200µg/ml de Higromicina (Life Technologies). O meio foi trocado a cada 3-4 dias até que houvesse o surgimento de clones celulares resistentes ao antibiótico. Estes clones celulares foram isolados, utilizando-se um anel de aço inoxidável ao redor da colônia. Para descolamento das células, foi adicionada uma solução de tripsina. Estas células foram semeadas em placas de 24 poços contendo meio DMEM suplementado com higromicina, conforme descrito acima.

3.15. Análise da expressão de hBMP2 e hBMP4 em clones estáveis de células 293TpCMV-hBMP2-IRES-EGFP, HEK293pCMV-hBMP4-IRES-EGFP e de frações purificadas de rhBMP7 através de Western Blot

O protocolo utilizado foi feito conforme descrito em BUSTOS-VALENZUELA *et al.*, 2010. Amostras de 100µg de proteína total do meio condicionado coletado foram aplicadas em um gel de poliacrilamida 12% (SDS-PAGE 12%). Após a eletroforese, o gel foi colocado em tampão de transferência (20% metanol, 39mM glicina, 48mM Tris-HCl pH 8,3) e as proteínas foram transferidas do gel para a membrana de nitrocelulose por eletroforese (400mA, 1h), em cuba úmida (Bio-Rad). Os sítios inespecíficos da membrana de nitrocelulose foram bloqueados com 5%

w/w leite em tampão TBST (150mM NaCl, 50mM Tris-HCl pH 7,5) por 1h à temperatura ambiente, sob agitação. A membrana foi, então, lavada com TBST (3X 5min, temperatura ambiente, sob agitação) e incubada com o anticorpo monoclonal anti-BMP-2/4 (1:500 – *mouse*) e policlonal anti-BMP-7 (1:2000 – *rabbit*) (R&D Systems) por 1h à temperatura ambiente, sob agitação. Novamente, a membrana foi lavada (3X 10min com TBST, sob agitação) e, então, incubada com o anticorpo secundário correspondente (anti-IgG mouse ou rabbit, Vector), conjugado com peroxidase, diluído 1:1.000 em TBST (1h, temperatura ambiente, sob agitação). Após três lavagens com TBST (dez minutos cada, sob agitação), a membrana foi revelada utilizando-se o sistema quimioluminescente (Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate, Millipore). Um filme de raio-X (Hyperfilm, GE Healthcare) foi exposto à membrana até obtenção do sinal adequado.

3.16. Purificação de rhBMP7 do meio de cultura do clone estável de células 293TpCMV-hBMP7-IRES-EGFP através de cromatografia de afinidade por heparina.

O protocolo de purificação foi feito conforme publicado em BUSTOS-VALENZUELA *et al.*, 2010. As células 293T contendo o vetor pCMV-hBMP7-IRES-EGFP N°12 foram semeadas em placas P100 e mantidas em D-MEM 10% SFB à 37°C, 2,0% CO₂. Ao atingirem 80-100% de confluência, o meio de cultura foi trocado por meio DMEM sem suplementação com soro fetal bovino. A cada 24h e durante 4-5 dias o meio de cultura foi coletado, filtrado com filtro de 0.45µm e armazenado à – 80°C. Utilizando Centricon 10kDa (Millipore), 500ml do meio condicionado coletado foram concentrados para 1ml, sendo este dialisado por ultrafiltração contra o tampão de lavagem (150mM NaCl, 20mM Tris-HCl pH 7,4). O meio condicionado

concentrado e dialisado foi aplicado em uma coluna contendo heparina imobilizada (SP Heparin, GE Healthcare) previamente equilibrada com o tampão de lavagem. A fração do meio condicionado que não se ligou a coluna (*Flowthrough*) foi coletada, e a coluna foi lavada com o tampão de lavagem em um volume equivalente a dez vezes aquele da coluna. A eluição foi feita por método *Step-Wise*, utilizando-se as concentrações salinas de 300mM, 500mM e 1M de NaCl em tampão de lavagem. As frações coletadas foram armazenadas à 4°C para posterior análise por SDS-PAGE.

3.17. Ensaio de desglicosilação da rhBMP7 utilizando a endoglicosidase PNGase F

Para verificação da existência de glicosilações do tipo N-ligada na proteína rhBMP7 produzida em células 293T, foi realizado o ensaio de desglicosilação. Uma amostra de 20µg da proteína rhBMP7 purificada foi desnaturada por 10 minutos a 100°C em 10µl de tampão desnaturante (0,5% SDS, 0,04M DTT) e posteriormente incubada com 2 unidades de PNGase F (New England Biolabs, Ipswich, USA) em 10 µl tampão de reação (5 mM Na₃PO₄, 0.1% NP-40, pH 7.5), a 37°C por 90 minutos. A reação foi interrompida pela adição do tampão de amostra para SDS-PAGE e as amostras foram submetidas à eletroforese em géis de 12% de concentração de poliacrilamida. Após a eletroforese, as amostras foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose para realização do ensaio de Western Blot, utilizando-se anticorpos policlonais específicos para a rhBMP7.

3.18. Análise funcional das proteínas rhBMP 2, 4 e 7 expressas em células HEK 293 e 293T utilizando-se as células C2C12 como modelo de diferenciação osteoblástica através de análise de morfologia por microscopia e da atividade enzimática por fosfatase alcalina.

O meio condicionado na ausência de soro, proveniente de cada linhagem celular foi misturado com um volume de D-MEM 10% SFB (Hyclone) e aplicado a culturas de células C2C12 confluentes, previamente semeadas em placas de 6 ou 12 poços. Estas culturas foram mantidas à 37°C, 2% CO₂ até o 6º dia, para realização do teste de fosfatase alcalina ou até o 12º dia para visualização, e registro de diferenças morfológicas que evidenciam processos de diferenciação em microscópio óptico, resultante do tratamento com os referidos meios condicionados. Para o ensaio de fosfatase alcalina, foi utilizado um teste colorimétrico enzimático do tipo Roy modificado (Labtest). As células, no 6º ou 12º dia de tratamento com rhBMP 2, 4 ou 7, foram lavadas com PBSA e lisadas com tampão de lise (0,5M Tris pH 9,0, 0,9%NaCl e 1% Triton X-100). O lisado foi então centrifugado por 15min a 12.000g e, posteriormente, o sobrenadante foi retirado e armazenado. Uma amostra (5µl) do sobrenadante foi incubada com o 50µl do Tampão de Reação Comercial 1 contendo 5 µl da solução contendo o substrato timoftaleína monofosfato por 5min a 37°C e, em seguida, a reação foi parada adicionando-se 200µl do Reagente de Cor (94mM NaCO₃, 250mM NaOH). A absorbância foi lida posteriormente a 590nm. Os dados foram normalizados em relação à absorbância medida para o padrão comercial para cada teste e a concentração foi apresentada em UI/l.

3.19. Osteodiferenciação *in vivo* utilizando-se rhBMP7 purificada por cromatografia de afinidade

Para análise da atividade funcional *in vivo* das preparações de rhBMP7 purificada, foram escolhidos camundongos Balb/c *nudes* imunodeficientes, machos, de quatro semanas de idade, com massa corporal entre 20 e 25g. Os procedimentos foram realizados de acordo com as normas do CONSEA (Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal). A antisepsia da região cervical posterior dos animais foi feita com Clorexidina aquosa a 0,2%. A pré-anestesia foi realizada através de inalação utilizando-se isoflurano. Posteriormente, realizou-se uma incisão de 5,0 mm na região dorsal do animal. Divulsionou-se com pinça, a pele do tecido celular subcutâneo, formando uma área subcutânea virtual com aproximadamente 100mm de diâmetro, na qual foi implantado o material a ser testado. À direita da linha média dorsal do animal, implantou-se o material que continha em média, 80mg de Hidroxiapatita sinterizada bovina (SIN Sistema de Implante) e 50µg ou 200µg de proteína rhBMP7 purificada e, à esquerda, apenas o material (hidroxiapatita) e veículo (300mM NaCl e 20Mm Tris-HCl pH7,4) no interior de cápsulas de gelatina. Três animais foram implantados apenas com hidroxiapatita, outros três animais com este material contendo 50µg de rhBMP7, outros três animais com 200µg de rhBMP7. Após revisão da hemostasia local, realizou-se sutura dos bordos cirúrgicos com fio inabsorvível monofilamentar de nylon 6-0. A analgesia pós-operatória foi realizada através de injeção intramuscular de 0,5µl de 1mg/ml Meloxicam–Movatec® na coxa direita. Ao final do ato cirúrgico, os animais foram acondicionados em gaiolas que foram colocadas sobre uma cama térmica até que houvesse um nível adequado de recuperação anestésica, e os animais, foram mantidos em observação.

3.19.1. Recuperação das amostras

A recuperação das amostras foi realizada através de procedimento padrão, sob anestesia em dose letal de 20µl/g da mistura de 40mg/ml Ketamina/4mg/ml Xilazina e antissepsia com Clorexidina aquosa a 0,2%, executando-se incisão no mesmo local onde foi feito o implante, e dissecação cortante das áreas de implante.

Os materiais recuperados foram separados por indivíduo e por posição de implante, colocados sobre fragmento de papel filtro devidamente identificado e encaminhados para análise histológica por colorações de hematoxilina/eosina e Tricrômio de Masson, imersos em 5ml de solução tamponada de paraformaldeído 4% previamente filtrado com filtro 0,22µm.

3.20. Indução osteogênica de células msMSC com rhBMP2 e obtenção do extrato celular total.

As células msMSC foram semeadas em placas p100 e tratadas conforme detalhado acima para a diferenciação por diferentes períodos de tempo de incubação com rhBMP2. Os períodos de tempo utilizados para o estudo foram: 10min, 30min, 1h e 2h de indução. Após o período indicado, as culturas foram lavadas com PBSA à 4°C duas vezes. 100µl de PBSA foi adicionado e as células foram coletadas em um tubo cônico de centrífuga de 1,5ml. A suspensão celular foi então centrifugada a 1.000g por 5 min, e o sobrenadante foi descartado. Ao precipitado celular, foram adicionados 100µl de tampão de lise contendo 7M uréia (Sigma), 2M tiouréia (Merck), 1% N-octil glicosídeo (Sigma) e 40 mM Tris Base (Sigma), suplementado com inibidores de fosfatase e protease (Phos-Stop e Cømplete, respectivamente – Roche e 300 unidades de DNase (Benzonase – Merck). O lisado foi então submetido à sonicação por ultrassom em cuba contendo

líquido a 40% da potência em 3 vezes, separados por intervalos de 15 segundos no gelo. Após este processo, os lisados celulares foram incubados a -80°C por 30min. Após a incubação, 20mM DTT foi adicionado e as amostras foram incubadas por 35min à temperatura ambiente. Após este processo, 40mM de iodoacetamida foi adicionado, e o lisado foi novamente incubado por 35min à temperatura ambiente, ao abrigo da luz. Após este processo, 14ml de acetona pré resfriada à -20°C foram adicionados, e a solução foi incubada a -20°C por 20min para a precipitação das proteínas. A recuperação das proteínas foi realizada por centrifugação a 6.000g por dez minutos à 4°C , e o sobrenadante foi descartado. O precipitado foi armazenado a -20°C para posterior utilização.

3.21. Preparação de amostras para experimentos de espectrometria de massas.

3.21.1. Hidrólise enzimática das proteínas do extrato celular.

As proteínas das células msMSC, precipitadas conforme descrito no item 1.24, foram ressuspensas em 100mM de bicarbonato de trietilamônio (TEAB, Sigma), e avaliadas quanto a quantidade de proteínas pelo método do ácido bicinconínico (BCA, Pierce). Uma amostra (50 μg) do extrato total foi então incubada com tripsina porcina modificada quimicamente (Promega) em uma proporção de 1:100 w/w por 18h à 25°C .

3.21.2. Dessanilização das amostras utilizando microcolunas de fase reversa.

As microcolunas de fase reversa para dessanilização das amostras foram montadas utilizando-se a resina Poros Oligo R3 (PerSeptive) dissolvida em uma solução contendo 70% acetonitrila em água deionizada ultrapura. 50µl desta suspensão foram inseridos em uma ponteira descartável de pipeta GELoader com a ponta restringida (Eppendorf) contendo um microdisco de resina C18 adsorvida. Com o auxílio do êmbolo, o material foi empacotado em uma seringa, até se obter 3mm de coluna. As amostras acidificadas de peptídeos foram introduzidas na coluna e levemente pressionadas com o êmbolo da seringa. As colunas foram posteriormente lavadas com 30µl de uma solução contendo 0,1%TFA, e os peptídeos foram eluídos da microcoluna com 30µl de uma solução 70% acetonitrila, 0,1%TFA. Os peptídeos eluídos foram posteriormente secos por centrifugação a vácuo, e armazenados a -20°C para posterior utilização.

3.21.3. Adição de grupos dimetila contendo isótopos pesados estáveis de hidrogênio e carbono às aminas primárias dos peptídeos obtidos na digestão trípica.

Após a digestão trípica, os peptídeos obtidos foram novamente quantificados pelo método do BCA e 50µg de peptídeos obtidos a partir de extratos preparados para cada condição de indução foram utilizados para se realizar a reação. O volume foi ajustado para 100µl com uma solução 100 mM TEAB. A cada tubo adicionou-se a respectiva solução aquosa contendo formaldeído, de acordo com a seguinte ordem: formaldeído sem isótopos pesados estáveis, (CH₂O, na concentração final de 4%, marcação leve ou *light* – períodos de indução de 30min e

o respectivo grupo controle, Sigma), formaldeído contendo deutério (CD_2O , na concentração final de 4%, marcação média ou *intermediate* – tempos de indução de 10min e 1h, Sigma) e formaldeído contendo deutério e ^{13}C ($^{13}\text{CD}_2\text{O}$, na concentração final de 4%, marcação pesada ou *heavy* – tempos de indução 30min e 2h, Sigma). Em cada tubo, separadamente, foram adicionados 4 μl de uma solução 0,6M de cianoborodireto. Os tubos foram incubados por uma hora à 25°C, sob leve agitação. A reação foi interrompida utilizando-se para cada tubo, 16 μl de uma solução 1% de amônia ($\text{NH}_3\cdot\text{H}_2\text{O}$, Merck) e, posteriormente, 8 μl de uma solução concentrada de ácido fórmico (Merck). As amostras foram posteriormente reunidas em dois tubos, cada dos quais contendo três condições diferentes, correspondentes aos períodos de indução: inicial, contendo as amostras controle, 10min e 30min de indução (leve, média e pesada, respectivamente) e a condição tardia, contendo as amostras de 30 min, 1 h e 2 h de indução (leve, média e pesada, respectivamente). As amostras foram dessanilizadas utilizando-se microcolunas contendo *beads* de resina Poros R3 (Applied), submetidas à centrifugação à vácuo e armazenadas à -20°C até posterior utilização.

3.21.4. Fosfoenriquecimento através de cromatografia de afinidade por dióxido de titânio.

As amostras de peptídeos trítipicos marcadas com isótopos de formaldeído, conforme descrito na seção anterior foram submetidas ao enriquecimento de fosfopeptídeos por cromatografia de afinidade. As amostras reunidas de cada condição (precoce e tardia) foram ressuspensas em tampão de equilíbrio (ácido glicólico 1M, 80% acetonitrila, 5% ácido trifluoracético), e, posteriormente, 15mg de uma suspensão de *beads* de dióxido de titânio imobilizados em tampão de equilíbrio

foram adicionadas a cada tubo. A mistura foi incubada por 15 minutos a 25°C sob agitação (150rpm) e, posteriormente, centrifugada por 60seg 12.000g para retirada do sobrenadante, o qual foi submetido à centrifugação à vácuo e armazenado, para estudos posteriores de proteômica. As *beads* de dióxido de titânio foram lavadas duas vezes com 500µl de tampão de equilíbrio e, subsequentemente, com 30 µl de tampão de lavagem para retirada do ácido glicólico (80% acetonitrila, 5% ácido trifluoracético em água). As amostras foram eluídas da coluna utilizando-se 50µl de uma solução concentrada de amônio $\text{NH}_3\cdot\text{H}_2\text{O}$ (pH11,3) e 10µl de uma solução contendo 30% de acetonitrila. O eluato foi acidificado com 5µl de uma solução de ácido fórmico concentrada e, em seguida, dessalinizado utilizando-se as microcolunas Poros R3.

3.21.5. Fracionamento de amostras para estudos de proteoma utilizando-se Cromatografia Líquida de Interação Hidrofílica (HILIC).

A separação das amostras armazenadas que não aderiram à coluna de afinidade por dióxido de titânio e armazenadas foram ressuspendidas em uma solução contendo 90% de acetonitrila e 0,1%TFA e carregadas em uma coluna pré-empacotada TSK Amide-80 HILIC (Tosoh Bioscience) em microcapilar de sílica contendo 17 cm de comprimento, 320 µm de diâmetro interno e 450 µm de diâmetro externo, acoplado a um HPLC preparativo (Agilent 1200 Series). As amostras foram submetidas a um gradiente 100-60% de 90% acetonitrila/0.1% ácido trifluoracético em água por 42 minutos, e as frações foram recolhidas a cada minuto. As frações foram então combinadas em oito frações de acordo com a intensidade do cromatograma registrada através da medição a 210,8nm. As amostras foram então centrifugadas à vácuo e armazenadas à - 20°C.

3.21.6. Nanocromatografia Líquida de Fase Reversa e espectrometria de massas dos peptídeos tripsínicos.

As amostras enriquecidas com fosfopeptídeos e as frações dessanilizadas e secas de peptídeos provenientes do HILIC foram ressuspensas em 5 µl de uma solução contendo 0,1% ácido fórmico em água e carregadas em um microcapilar medindo 18 cm de comprimento, 100 µm de diâmetro interno e 360 µm de diâmetro externo contendo ReproSil-Pur C18 AQ de 3 µm pré-empacotada (Dr. Maisch), e acoplado a um nanoHPLC (EASY nano-LC system - Proxeon Biosystems). As amostras foram submetidas a um gradiente 0-100% de solução contendo 80% acetonitrila/0,1% ácido fórmico de por 113 minutos, a um fluxo máximo de 45 nl/min. A extremidade do microcapilar foi constringida para formação do spray, o qual foi submetido à ionização para captação no espectrômetro de massa equipado com triplo quadrupolo com 7-tesla de capacidade, equipado com câmara de seleção de íons por oscilação em órbita e câmara de fragmentação por CID (LTQ Orbitrap XL - Thermo Scientific). A detecção dos peptídeos ionizados regulares e daqueles contendo grupos fosfato foi feita através de *data acquisition-dependent mode* dos 10 íons precursores mais intensos do espectro, de modo que o aparelho pudesse realizar automaticamente MS, MS² e pseudo MS³ (separação dos peptídeos para fragmentação pela análise teórica de possíveis fragmentos que possam gerar ácido fosfórico, o produto da fragmentação de fosfopeptídeos por CID (*collision induced dissociation*)). Os dados foram armazenados em formato ".raw" para posterior análise.

3.21.7. Análise dos dados obtidos dos experimentos de espectrometria de massas através de busca em banco de dados de peptídeos.

Os arquivos ".raw" foram processados no software Thermo Proteome Discoverer (Thermo). Cada arquivo ".mgf" gerado foi posteriormente submetido à busca de peptídeos que correspondessem ao valor m/z encontrado, utilizando-se um servidor local do site MASCOT (<http://www.matrixscience.com>). O banco de dados de proteínas murino utilizado foi o International Protein Index (IPI) (<http://www.ebi.ac.uk/IPI/>), versão v3.77. O mecanismo de busca utilizado foi configurado para os seguintes parâmetros: Modificações fixas do tipo carbamidometilações na cisteína (+57Da), dimetilações leve, média e intermediária (+28Da, +32Da e +36Da) para o grupamento grupo ϵ -amino da lisina e extremidade N-terminal de qualquer peptídeo; modificações variáveis do tipo oxidação em metionina (+16Da), e fosforilação em serina, treonina e tirosina (+80Da); tolerância para o íon precursor de 10 ppm e de 0,8Da para o fragmento obtido do peptídeo; realização de busca em banco de dados *decoy* para a busca de falsos positivos, derivados da lista de peptídeos presente no IPI (*IPI-mousedecoy*) e *PeptideScore* maior que 20.

3.21.8. Quantificação relativa e normalização dos peptídeos.

A quantificação de todos os peptídeos foi realizada através do cálculo da área obtida no cromatograma do íon (*Extracted Ion Chromatogram*), que relaciona a intensidade do pico do íon de um determinado peptídeo com o tempo de retenção do mesmo na coluna, o qual é proporcional à quantidade do peptídeo na amostra. Estes dados, contidos em formato ".raw" e convertidos ao formato ".mgf" foram processados no software Thermo Proteome Discoverer® (Thermo). Posteriormente,

os dados obtidos foram exportados em formato ".xls" e normalizados utilizando-se o algoritmo LOWESS (*Locally Weighted Scatterplot Smoothing*) (BERGER *et al.*, 2004). Estes dados foram então convertidos ao formato ".txt" e inseridos no software StatQuant (BREUKELLEN, VAN *et al.*, 2009), que realizou o agrupamento dos peptídeos com mesmo número de acesso IPI na proteína correspondente e calculou a abundância relativa da proteína de acordo com a média aritmética das razões de abundância obtidas.

3.21.9. Busca em banco de dados de motivos de fosforilação de quinases correspondentes aos fosfopeptídeos encontrados.

Os fosfopeptídeos correspondentes às proteínas encontradas, em formato ".xls", foram submetidos ao banco de dados do site NetworkKIN (http://www.networkin.info/version_2_0/) (LINDING *et al.*, 2008), que disponibiliza uma compilação de motivos de sítios de fosforilação e das quinases envolvidas. Cada motivo de fosforilação foi validado manualmente e os dados foram reunidos em uma tabela em formato ".xls".

3.21.10. Classificação dos peptídeos identificados na análise proteômica através de ontologia gênica.

Os dados referentes aos peptídeos que apresentaram aumento na abundância relativa em pelo menos dois dos três experimentos foram normalizados e agrupados pelo número de acesso das proteínas obtidas nos experimentos de proteômica. Posteriormente, os dados foram classificados de acordo com processos biológicos presentes no banco de dados interno do software Blast2go (<http://www.blast2go.com>) (CONESA *et al.*, 2005), que realiza, a partir de uma lista

de sequências de proteínas em formato “fasta”, mapeamento, anotação e agrupamento dos dados de acordo com a ontologia gênica em “processos celulares”, “compartimento celular” e “processos biológicos”. Para cada processo biológico encontrado, foi calculado um *score*, que compreende fatores como a evidência experimental para a classificação gênica e o grau de interação entre as proteínas que compõem um mesmo processo biológico. Os dados foram compilados e reunidos em Tabelas no formato “.xls”.

3.22. PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR).

3.22.1. Extração do RNA total de msMSCs tratadas com rhBMP2.

Células msMSC foram plaqueadas em placas P100, em uma densidade de 30.000 células/cm². No dia seguinte, o meio foi substituído por meio DMEM suplementado com 200ng/ml de rhBMP2 e 10% de soro fetal bovino, de acordo com os respectivos períodos de tratamento: 10min, 30min, 1h e 2h. Posteriormente, as placas foram lavadas com PBSA e o RNA total foi extraído com o kit RNeasy (Qiagen). A concentração de RNA foi determinada pela absorbância das preparações a 260nm, utilizando-se, como valor padrão, 1 Abs_{260nm} = 40µg/ml de RNA. Todas as medidas de absorbância realizadas foram feitas em espectrofotômetro de nanovolume (Nanodrop). O grau de pureza da preparação foi estimado pela relação Abs_{260nm}/Abs_{280nm}, considerando-se como pureza satisfatória uma relação próxima de 2,0.

3.23. Síntese de cDNA

Os cDNAs das msMSC tratadas (ou não) com rhBMP2 foram sintetizados por transcrição reversa, para a verificação da expressão relativa de genes relacionados com a osteogênese. 1µg do RNA total de interesse foi submetido a tratamento prévio com 2U de DNase I (Thermo Fischer Scientific) e 20 unidades de RNaseOUT (Life Technologies) por 10min a 37°C no tampão adequado. Para a inativação das enzimas, a amostra foi incubada à 75°C por 10min. Posteriormente, cada amostra foi incubada com 1µl de uma solução de 0,5µg/µl de oligo-dT, 1µl de 10mM dNTPs por 10min a 65°C e, imediatamente após este período, colocadas à 4°C. Posteriormente, adicionou-se 2µl de uma solução de 100mM DTT, 20 unidades de SuperScript®, e 20 unidades de RNaseOUT a cada um dos tubos. A mistura foi incubada por dez minutos à temperatura ambiente, e a reação de síntese de cDNA propriamente dita foi feita à 50°C por 120 minutos. A enzima SuperScript®, foi inativada e o RNA total celular molde, que atuou como molde para a síntese do cDNA, foi degradado após a incubação com cinco unidades de RNaseH, por 30min à 37°C.

3.24. Determinação da concentração final de *primers*.

As seqüências de todos os *primers* utilizados nos ensaios de qRT-PCR estão listados na Tabela 3. Todos os primers utilizados foram selecionados à partir de dados previamente existentes na literatura, descrevendo a detecção da expressão dos respectivos genes durante a diferenciação osteoblástica. A sequência dos primers foi retirada de um banco de dados de primers validados PrimerBank (<http://pga.mgh.harvard.edu/primerbank/>), observando-se os seguintes parâmetros: amplificação de um fragmento de aproximadamente 150pb, conteúdo de GC entre

30 e 80%, a inexistência de estruturas secundárias e temperatura de anelamento entre 58°C e 60°C. Além disso, para evitar uma eventual co-amplificação de DNA genômico que pudesse estar contaminando a amostra, sempre que possível, os pares de *primers* foram desenhados em diferentes exons dos transcritos. As reações contendo *primers* variando entre uma concentração final máxima de 800nM e mínima de 100nM foram realizadas utilizando-se uma mistura de cDNAs de todas as amostras de todos os grupos experimentais. Pôde-se determinar, assim, a concentração ótima de cada *primer* correspondente a cada gene, sendo caracterizada como a menor concentração do respectivo *primer* que é capaz de permitir uma curva de amplificação em um Ct médio para todas as concentrações utilizadas no experimento e com menor formação de dímeros de *primers* (quando estes estavam presentes).

3.25. Reação de PCR quantitativo em tempo real.

A reação de qPCR foi feita utilizando-se 6µl de SYBR® Green Dye (Life Technologies), 3µl de uma solução de cDNA diluída 30 vezes à partir do sintetizado original e 3µl de uma solução contendo uma mistura de *primers forward* e *reverse*. Os tubos foram submetidos ao seguinte protocolo de temperatura: 2min a 50°C, 10min a 95°C, seguida de quarenta ciclos de 15seg à 95°C e 60°C por 1min. Os dados foram coletados e analisados no software 7300 System (Life Technologies). O controle de qualidade de cada reação foi feito através da análise do ciclo de dissociação, para diminuir possíveis contaminações cruzadas ou a presença de dímeros. A expressão diferencial de cada gene foi avaliada através do software GeneAmp 5700 (Life Technologies), ajustando-se o limiar de expressão para 0,1. Os dados de expressão foram exportados e interpretados utilizando-se o software

qBASE^{PLUS2} (Biogazelle). O algoritmo Genorm (ETSCHMANN *et al.*, 2006) foi utilizado para determinar o gene controle da expressão, a partir de uma lista de genes que, supostamente, não deveriam apresentar variação na expressão, no caso, GAPDH, HMBS e HPRT. Um fator de normalização da expressão foi então calculado para cada amostra e para cada gene baseado na média geométrica dos genes de referência. Os gráficos e a análise estatística foram feitos utilizando-se o software Prism 5 (GraphPad). Os dados obtidos são representativos de três experimentos distintos, realizados em duplicatas e analisados através de teste de Tukey ($p < 0,005$) e ANOVA.

Tabela 3. Sequência dos oligonucleotídeos utilizados para análise da expressão gênica através de PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR).

Gene	Sequência 5' - 3'
mBMP-2 F	TCTTCCGGGAACAGATACAGG
mBMP-2 R	TGGTGTCCAATAGTCTGGTCA
mOsterix F	ATGGCGTCCTCTCTGCTTG
mOsterix R	TGAAAGGTCAGCGTATGGCTT
mRunX-2 F	GACTGTGGTTACCGTCATGGC
mRunX-2 R	ACTTGGTTTTTTCATAACAGCGGA
mDlx5 F	CACCACCCGTCTCAGGAATC
mDlx5 R	GCTTTGCCATAAGAAGCAGAGG
mTGFB1 F	CTCCCGTGGCTTCTAGTGC
mTGFB1 R	GCCTTAGTTTGGACAGGATCTG
mSMAD-2 F	ATGTCGTCATCTTGCCATTC
mSMAD-2 R	AACCGTCCTGTTTTCTTTAGCTT
mTGFB2 F	CCGCTGCATATCGTCCTGTG
mTGFB2 R	AGTGGATGGATGGTCCTATTACA
mTwist1 F	GGACAAGCTGAGCAAGATTCA
mTwist1 R	CGGAGAAGGCGTAGCTGAG
mSox9 F	GAGCCGGATCTGAAGAGGGA
mSox9 R	GCTTGACGTGTGGCTTGTTT
mCol4a1 F	CTGGCACAAAAGGGACGAG
mCol4a1 R	ACGTGGCCGAGAATTTTACC
mCol-1 F	GCTCCTCTTAGGGGCCACT
mCol-1 R	ATTGGGGACCCTTAGGCCAT
mCol-2 F	CAGGATGCCCCGAAAATTAGGG
mCol-2 R	ACCACGATCACCTCTGGGT

As seqüências estão representadas na direção 5'-3'. Os oligonucleotídeos foram desenhados a partir de um banco de dados de primers validados (<http://pga.mgh.harvard.edu/primerbank/>). Os amplicons gerados apresentam um tamanho médio de 150pb. F: Forward, R: Reverse.

3.26. Confirmação da expressão diferencial através de qPCR.

As PCRs foram realizadas com 3µl dos cDNAs de interesse diluídos 1:30 vezes em triplicatas ou duplicatas, adicionando-se 3µl da concentração indicada do *primer* específico para cada transcrito de interesse (determinada previamente) e 6µl de Syber®Green Dye (Applied Biosystems). As reações foram montadas em placas de 96 poços e colocadas no Termociclador 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems) com o seguinte programa: 50°C por 2min (etapa da ativação da enzima Uracil N-Glicosidade, AmpEraser), 95°C por 10min (ativação da Taq DNA polimerase, Taq Gold), 40 ciclos de 95°C por 15seg (desnaturação) e 60°C por 1min (anelamento e extensão). Cada reação de PCR foi repetida no mínimo 3 vezes. A detecção do produto de PCR em tempo real e a coleta dos dados foram realizadas pelo programa 7300 System SDS Software (Applied Biosystems).

De posse dos Cts de cada amostra, inicialmente, foi calculada a média dos Cts das réplicas, considerando-se um desvio padrão máximo de 0,5 entre as médias obtidas. Dado que a expressão do transcrito é analisada em relação a uma amostra que é tomada como referência (células msMSC sem tratamento), calculou-se, então, a diferença entre a média dos Cts da amostra referência e a média dos Cts das amostras estudadas nos diferentes períodos de tempo de tratamento (0, 10min, 30min, 1h e 2h). Para a normalização, foram utilizados como controles três genes murinos GAPDH, HPRT e HMBS, calculando-se um fator de normalização através do programa GeNorm (Vandesompele, De Preter *et al.*, 2002), que, numa primeira etapa, calcula a estabilidade de cada gene controle do conjunto de dados fornecidos dando um valor (M) para cada gene. Dependendo do valor de estabilidade, pode-se retirar o gene controle menos

estável e trabalhar com até dois genes. Depois de escolhidos os genes mais estáveis, o programa calcula a média geométrica dos controles para cada cDNA testado. Utilizando-se o programa Graphpad Prism 4, calculou-se, através de Two-Way ANOVA (teste de Bonferroni), a significância estatística das diferenças observadas entre as amostras controle e aquelas tratadas por diferentes períodos de tempo com rhBMP2.

4. RESULTADOS

4.1. Clonagem de hBMP2 e hBMP4

4.1.1. Amplificação de hBMP2 e hBMP4 a partir de um Banco de cDNAs de Tecidos Humanos para clonagem no vetor pGEM T-easy

Para obtenção de clones bacterianos contendo a sequência do cDNA de rhBMP2 e 4, foram desenhados *primers*, contendo seqüências de Kozak imediatamente antes do códon iniciador ATG nos cDNAs correspondentes às seqüências das BMPs humanas 2 e 4. Na extremidade 5' dos *primers forward* e *reverse*, foram adicionadas seqüências correspondentes a sítios de restrição para que pudessem ser utilizadas posteriormente na etapa de clonagem, de tal forma a não clivar as seqüências de cDNA. Estes primers (doravante denominados N2Xba e N2Bam para hBMP2 e 4XbaF e 4BamR para hBMP4) foram desenhados, sintetizados e utilizados na amplificação dos referidos cDNAs provindos de amostras de mRNA de diferentes tecidos humanos em que se constatou expressão de mRNA verificada por SAGE (www.genecards.org). Foi obtida uma amplificação específica de DNA em torno de 1.200pb, que corresponde à sequência descrita para o mRNA que codifica para a sequência da hBMP2 não processada, e que possui 1.185pb. Na Figura 5, é possível observar a amplificação na amostra provinda de tecido de pulmão, utilizando-se uma temperatura de 70°C de anelamento dos primers. No que concerne à hBMP4, a amplificação específica de DNA foi obtida a 1.283pb, que corresponde à sequência descrita para o mRNA que codifica para a hBMP4 não processada. Na Figura 6, é possível observar a amplificação em amostras de cDNA a partir da linhagem ZR-75-1, utilizando-se 68°C como temperatura de anelamento.

Houve também amplificação utilizando-se a temperatura de 72°C nas linhagens MDA-MD-435, MDA-MD-231 e ZR-75-1.

Figura 5. Amplificação de rhBMP2 a partir de um Banco de cDNA de Tecidos. Bandas correspondentes ao tamanho esperado para rhBMP2 foram encontrados na linhagem NCI-H. Ladder: Marcador de peso molecular de ácido nucléico Gene Ruler Ladder Mix (Fermentas). 68°C: reação de amplificação com 68°C de anelamento; 72°C: reação de amplificação com 72°C de anelamento. 435: linhagem MDA-MD-435; 231:linhagem MDA-MD-231 e ZR: linhagem ZR- 75-1 e NCI-H: linhagem de pulmão NCI-H1155. pb: peso molecular em pares de bases.

Figura 6. Amplificação de rhBMP4 a partir de um Banco de cDNA de Tecidos. Bandas correspondentes ao tamanho esperado para rhBMP4 foram encontrados nas linhagens ZR, 435 E 231, nas diferentes temperaturas de anelamento utilizadas. Verificação dos sítios de restrição do vetor pCMV-rhBMP2-IRES-EGFP, e dos sites de clonagem de rhBMP4 (XbaI/BamHI). MW: Marcador de peso molecular de ácido nucléico Gene Ruler Ladder Mix (Fermentas). 68°C: reação de amplificação com 68°C de anelamento; 72°C: reação de amplificação com 72°C de anelamento. 435: linhagem MDA-MD-435; 231: linhagem MDA-MD-231 e ZR: linhagem ZR-75-1. pb: peso molecular em pares de bases.

4.1.2. Clonagem de hBMP2 e hBMP4 no vetor pGEM-T Easy®

Os cDNAs ligados ao vetor pGEM-T Easy® foram inseridos em bactérias *E. coli* DH10B por eletroporação e as colônias transformantes obtidas foram selecionadas para diagnóstico de restrição utilizando-se endonucleases. Foram selecionadas duas colônias positivas, que apresentaram a amplificação esperada, para posteriores etapas de subclonagem no vetor pCMV-IRES-EGFP. Nas figuras 7 e 8, pode-se observar bandas de 1.200 e 1.300 pares de bases, que correspondem às hBMP2 e hBMP4, respectivamente. Tais plasmídeos foram posteriormente seqüenciados para confirmar a identidade dos cDNAs.

4.1.3. Subclonagem de rhBMP2 e rhBMP4

Com o objetivo de expressar as rhBMPs 2 e 4 em células HEK 293 e 293T, foi necessário realizar a subclonagem das sequências de hBMP2 e hBMP4 em vetor apropriado. O vetor utilizado é de origem lentiviral e possui um promotor originário de citomegalovírus. No vetor, existe também uma sequência IRES (*Internal Ribosome Entry Sequence*) que está *upstream* em relação ao gene repórter GFP (*Green Fluorescent Protein*), e que permite monitorar as células transfectadas, pois sua expressão ocorre independentemente da via celular utilizada para processos de tradução. Deste modo, a clonagem da sequência de cada hBMP foi feita entre o promotor do citomegalovírus e a sequência IRES. A partir de uma minipreparação plasmidial, realizou-se a digestão com as enzimas de clonagem *Xba*I/*Bam*HI, e o inserto foi isolado através de recuperação da banda correspondente após eletroforese do material. O inserto foi então ligado com o vetor já previamente digerido com as enzimas supracitadas e o produto da reação de ligação foi inserido em bactérias *E. coli* DH10B por eletroporação. A figura 7 e a figura 8 mostram,

respectivamente, os clones obtidos para cada tipo de hBMP: pCMV-rhBMP2-IRES-EGFP e pCMV-rhBMP4-IRES-EGFP.

Figura 7. Diagnóstico de restrição por digestão com endonucleases para confirmação da clonagem de rhBMP2 (*Xba*I/*Bam*HI) nos vetores pGEM (esquerda) e pCMV-rhBMP2-IRES-EGFP (direita). Os fragmentos foram obtidos após a digestão com endonucleases *Xba*I/*Bam*HI, e correspondem aos vetores linearizados (3.015pb e 8.361pb, respectivamente) e ao fragmento correspondente ao cDNA de rhBMP2 (**1.185 pb**). MW: Padrão de peso molecular λ HindIII (Fermentas); pb = peso molecular em pares de bases.

Figura 8. Diagnóstico de restrição por endonucleases para confirmação da clonagem de rhBMP4 (*XbaI/BamHI*) nos vetores pGEM (esquerda) e pCMV-rhBMP4-IRES-EGFP (direita). Os fragmentos foram obtidos após digestão com endonucleases *XbaI/BamHI*, e correspondem aos vetores linearizados (3.015pb e 8.361pb, respectivamente) e ao o fragmento correspondente ao cDNA de rhBMP4 (**1.283 pb**). MW: Padrão de peso molecular λ HindIII (Fermentas); pb = peso molecular em pares de bases.

4.2. Transfecção estável de células HEK293T com os vetores pCMV-hBMP2-IRES-EFGP e pCMV-hBMP4-IRES-EFGP

Clones de células HEK293 e 293T transfectadas estavelmente com os vetores pCMV-hBMP2-IRES-EFGP + pTK-Hyg ou pCMV-hBMP4-IRES-EFGP + pTK-Hyg foram obtidos, como mostram as Figuras 9 e 10. A presença do vetor de expressão é favorecida pela utilização de uma proporção de 1:40 do vetor de resistência (pTK-Hyg):vetor de expressão lentiviral. Assim sendo, a probabilidade de uma população de células resistentes à higromicina possuir o vetor lentiviral é alta. A resistência à higromicina, aliada ao constante monitoramento pela presença de fluorescência verde em microscopia, permitiu certificar-se da presença dos dois vetores nas populações e clones celulares estudados. Devido ao fato que a sequência codificante da EGFP está sob a influência de um promotor fraco de poliovírus (IRES), a presença de proteína verde nas culturas mostra que há quantidade suficiente de mRNA transcrito no citoplasma, que está disponível para tradução, e portanto, níveis razoáveis de expressão da proteína recombinante podem ser atingidos, pois a sequência codificante da proteína está sob a atuação de um forte promotor (pCMV). Vale lembrar que o vetor é bicistrônico portanto os mRNAs oriundos da transcrição deste vetor poderão produzir simultaneamente tanto a proteína recombinante de interesse quanto a proteína GFP.

Figura 9. Clones estáveis de células 293T co-transfectadas com os vetores pCMV-hBMP2-IRES-EGFP + pTK-Hyg. A seleção de células 293T resistentes à higromicina é detalhada em Materiais e Métodos. O mesmo campo foi visualizado através de microscopia de fase e fluorescência, correspondendo às diferentes populações obtidas em cada caso. Aumento 40X.

Figura 10. Clones estáveis de células HEK293 co-transfectadas com os vetores pCMV-hBMP4-IRES-EGFP + pTK-Hyg. A seleção de células HEK293 resistentes à higromicina é detalhada em Materiais e Métodos. O mesmo campo foi visualizado através de microscopia de fase e fluorescência, correspondendo às diferentes populações obtidas em cada caso. Aumento 40X.

4.3. Análise da expressão de rhBMP2, rhBMP4 em células HEK293 e 293T contendo os vetores pCMV-IRES-EGFP-hBMP2 e pCMV-hBMP4-IRES-EGFP respectivamente

4.3.1. Western Blot

A detecção das proteínas recombinantes secretadas no meio de cultura foi realizado através de Western Blot. Os meios condicionados das células produtoras das proteínas recombinantes foram coletados e uma fração de 100µg de proteína total foi aplicada em gel de poliacrilamida, que foi posteriormente transferido para uma membrana de nitrocelulose, e a detecção das proteínas foi feita utilizando-se um anticorpo específico para as duas proteínas. No caso da análise da expressão de rhBMP2 à partir do meio condicionado de células transfectadas com pCMV-hBMP2-IRES-EGFP, como pode ser visto na Figura 11, foi possível detectar a expressão da proteína no meio de cultura em diversos clones, correspondendo ao peso molecular esperado, ou seja, entre 34 a 36kDa. Da mesma maneira, na Figura 12, pode-se observar a detecção da proteína rhBMP4 no meio de cultura em diferentes clones de células transfectadas com o vetor pCMV-hBMP4-IRES-EGFP.

Figura 11. Análise da expressão de rhBMP2 nos clones de células 293T transfectadas com o vetor pCMV-hBMP2-IRES-EGFP. O *Western blot* foi realizado utilizando-se um anticorpo monoclonal *mouse* anti rhBMP2/4, a partir do meio condicionado concentrado por ultrafiltração de três clones de células 293T transfectadas com os vetores supracitados **rhBMP2c**: proteína disponível comercialmente (R&D systems) expressa em células CHO, como controle positivo. **Cneg**: meio condicionado de células 293T não transfectadas.

Figura 12. Análise da expressão de rhBMP4 nas células HEK293 transfectadas com o vetor pCMV-hBMP4-IRES-EGFP. O *Western blot* foi realizado utilizando-se um anticorpo monoclonal *mouse* anti rhBMP2/4, e de meios condicionados concentrados por ultrafiltração provenientes de três clones de células HEK293 transfectadas com os vetores supracitados **rhBMP4c**: proteína disponível comercialmente (Life Technologies) expressa em linhagens de células humanas, como controle positivo. **Cneg**: meio condicionado de células HEK293 não transfectadas.

4.3.2. Avaliação da atividade biológica de rhBMP 2 e 4 através da análise morfológica da diferenciação osteoblástica de células C2C12

A linhagem C2C12 é uma linhagem murina derivada de células-satélite musculares, que possui capacidade limitada de diferenciação. A confluência em cultura leva as mesmas a se diferenciarem em mioblastos, enquanto que a adição de BMPs ao meio de cultivo, em concentrações adequadas, promove a diferenciação destas células em osteoblastos (KATAGIRI *et al.*, 1994). Desta maneira, estas células podem ser usadas para testar a atividade das proteínas recombinantes produzidas, secretadas no meio condicionado das células que expressam tais proteínas. A hipótese apresentada é que, caso haja uma quantidade mínima necessária na forma ativa de BMP recombinante no meio condicionado, este deverá estimular a diferenciação de células C2C12 indiferenciadas em osteoblastos. Deste modo, tais células foram tratadas com o meio condicionado das células produtoras da rhBMP2 e rhBMP4 purificadas a partir do meio condicionado. As Figuras 13 e 14 mostram os diferentes fenótipos das células após sete dias de tratamento, sendo possível observar a aparição de células musculares no controle negativo (meio de cultura apenas) enquanto as células tratadas com o meio condicionado contendo ou rhBMP2 ou rhBMP4, apresentam células com formato poligonal e citoplasma reduzido, característica morfológica de osteoblastos.

Figura 13. Análise funcional do meio condicionado de clones as células 293T contendo o vetor pCMV-hBMP2-IRES-EGFP através da indução de diferenciação osteoblástica de células C2C12. Células C2C12 foram cultivadas na presença de meio condicionado de clones de células que expressam a proteína BMP2 humana recombinante, suplementada ao meio de cultivo. No 7º dia do tratamento, as células foram visualizadas através de microscopia óptica. **MC+**: Meio condicionado de células 293T contendo o vetor pCMV-hBMP7-IRES-EGFP. **MC-**: Suplementação de meio condicionado de células 293T contendo o vetor pCMV-IRES-EGFP. Aumento: 100x.

Figura 14. Análise funcional do meio condicionado de clones de células 293T contendo o vetor pCMV-hBMP2-IRES-EGFP através da indução de diferenciação osteoblástica de células C2C12. Células C2C12 foram cultivadas na presença de meio condicionado de clones de células que expressam a proteína BMP2 humana recombinante, suplementada ao meio de cultivo. No 7º dia do tratamento, as células foram visualizadas através de microscopia óptica. MC+: Meio condicionado de células 293T contendo o vetor pCMV-hBMP7-IRES-EGFP. MC-: Suplementação de meio condicionado de células 293T contendo o vetor pCMV-IRES-EGFP. Aumento: 100x.

4.3.3. Avaliação da atividade biológica de rhBMP 2 e 4 através de ensaio de atividade de fosfatase alcalina produzida por células C2C12 durante a diferenciação osteoblástica

Para avaliar a capacidade das proteínas expressas, presentes no meio condicionado, de induzirem a expressão de fosfatase alcalina, um marcador de diferenciação óssea, em células C2C12, foi realizado o teste de detecção da enzima a partir de um kit diagnóstico usado para detecção desta proteína no plasma. As células C2C12 foram cultivadas com 50% do volume de meio de cultura originário do meio condicionado de células 293T contendo o vetor pCMV-hBMP2-IRES-EGFP ou células HEK293 contendo o vetor pCMV-hBMP4-IRES-EGFP, o qual era trocado a cada três dias, em um total de sete dias de incubação. A Figura 15 mostra que os meios condicionados dos três clones de células transfectadas, tanto para rhBMP2 quanto para rhBMP4, foram capazes de induzir a expressão de fosfatase alcalina em células C2C12, portanto, apresentam atividade biológica, de BMPs.

Figura 15. Atividade de Fosfatase Alcalina das células C2C12 tratadas durante sete dias com o meio condicionado de células 293T e HEK293 contendo o vetor pCMV-hBMP2-IRES-EGFP e o vetor pCMV-hBMP4-IRES-EGFP, respectivamente. O gráfico mostra a atividade da enzima (absorbância a 590nm) presente no lisado de células C2C12 induzidas para a osteodiferenciação com os respectivos meios originários dos clones ZIII, 42A05, 42A02 para rhBMP2 e os clones 13C01, 24D01 E 13C02 para rhBMP4, representados no eixo das abcissas. **MC+**: meio condicionado de células 293T contendo o vetor pCMV-hBMP7-IRES-EGFP. **MC-**: meio condicionado de células 293T contendo o vetor pCMV-IRES-EGFP sem o cDNA de rhBMP7. **Padrão**: padrão comercial de fosfatase alcalina contido no kit (Labtest).

4.4. Purificação de rhBMP7 presente no meio de cultura condicionado por células 293T contendo o vetor pCMV-hBMP7-IRES-EGFP

Com o objetivo de utilizar a rhBMP7 em outras aplicações na pesquisa, tornou-se importante purificar esta proteína a partir do meio condicionado. Proteínas da família das BMPs possuem domínio natural de ligação à heparina, o que permite que se utilize etapas de cromatografia de afinidade por heparina no processo de purificação. A parte superior da Figura 16 mostra um gel de poliacrilamida 12%, no qual é possível observar a existência de uma banda de coloração mais intensa na altura de 35kDa nas eluições E1-300 (300mM NaCl) e E1 e E2-500 (500mM NaCl), correspondente à proteína rhBMP7 na forma madura (processada) e glicosilada. As frações que apresentaram a banda assinalada em torno de 34kDa foram reunidas em um *pool* e, posteriormente, uma outra eletroforese em gel de poliacrilamida foi realizada para verificar a presença de monômeros em condições redutoras (R) utilizando-se ditioneitol (DTT), o que pode ser visto na parte inferior da Figura 16. Estes resultados mostram que a proteína é expressa na forma de homodímeros ligados por pontes dissulfeto, as quais são rompidas em condições redutoras, ou seja, quando se utiliza DTT (BUSTOS-VALENZUELA *et al.*, 2010).

Figura 16. SDS-PAGE da purificação de rhBMP7 do meio de cultura de células 293T transfectadas com o vetor pCMV-hBMP7-IRES-EGFP. *Superior esquerdo*: gel de poliácridamida 12% corado pelo método de Coomassie, contendo as diferentes frações obtidas antes e após a purificação. **T:** Meio condicionado total concentrado de células transfectadas com o vetor lentiviral (retentado da ultrafiltração); **FT:** Parte do meio condicionado concentrado que não se ligou à coluna de heparina-Sepharose; **W150:** Fração correspondente à lavagem da coluna com tampão de equilíbrio (150mM NaCl, 20mM Tris-HCl pH7,4); **E1/E2-300:** frações que correspondem às eluições com tampão de equilíbrio contendo uma concentração de 300mM NaCl (300mM NaCl, 20mM Tris-HCl pH7,4); **E1/E2/E3-500:** frações que correspondem às eluições com tampão de equilíbrio contendo uma concentração de 500mM NaCl (500mM NaCl, 20mM Tris-HCl pH7,4) e **MW:** Padrão de peso molecular. ***Superior direito:*** Rendimento das frações de purificação de cada uma das frações de eluição realizado por densitometria das bandas. ***Inferior:*** gel de poliácridamida 12% corado pelo método de Coomassie, contendo o *pool* de diferentes frações de eluições obtidas após a purificação. **R1:** *Pool* das frações eluídas com 300mM e 500mM NaCl em condições redutoras; **R2:** Duplicata do *Pool* das frações eluídas com 300mM e 500mM NaCl em condições redutoras; **O:** *Pool* das frações eluídas com 300mM e 500mM NaCl em condições não redutoras e **MW:** Padrão de peso molecular (BUSTOS-VALENZUELA *et al.*, 2010).

4.5. Análise das frações obtidas durante o processo de purificação do meio de cultura condicionado de células 293T pCMV-hBMP7-IRES-EGFP

4.5.1. Western Blot

Na Figura 17, é possível observar o *Western blot* realizado com amostras purificadas a partir do meio condicionado. Em **A)** utilizou-se um anticorpo monoclonal anti-rhBMP7, sendo possível observar a fração total, ou seja, o meio condicionado concentrado que foi aplicado à coluna, as lavagens da mesma e o *pool* das eluições, que mostram a presença de bandas em torno de 35kDa, somente nas condições não-redutoras (O), o que mostra que o anticorpo é incapaz de reconhecer os monômeros da proteína nas frações reduzidas (R). Por outro lado, em **B)**, utilizou-se um anticorpo policlonal, que, de fato, é capaz de detectar os monômeros de rhBMP7, o que não ocorre com o anticorpo utilizado em **A)**. Foi possível observar que, tanto em **A)** quanto em **B)** três bandas de tamanhos diferentes da proteína rhBMP7 secretada podem ser observadas. Estas bandas correspondem aos diferentes processamentos possíveis da proteína. A banda superior, em **A)**, que está ausente na condição redutora de **B)**, correspondente a aproximadamente 100-110kDa, é a molécula precursora de rhBMP7 dimerizada (duas moléculas com 50-55kDa ligadas por uma ponte dissulfeto intermolecular). A banda inferior, de 67kDa, observável em **A)** e em **B)**, representa um estado intermediário no processamento (moléculas de 50-55kDa ligadas através de uma ponte dissulfeto intermolecular com uma molécula de 17-20kDa já clivada). A banda de 34-40kDa (duas moléculas de aproximadamente 17-20kDa ligadas pela ponte dissulfeto), representa a molécula no estado final de processamento (molécula madura). Finalmente, em **B)**, é possível observar os monômeros glicosilados da proteína (17-20kDa), resultantes da

utilização de um agente redutor que rompe as interações intermoleculares do tipo ponte dissulfeto. É interessante notar que há uma maior abundância das formas completamente processadas (34-40kDa), o que leva a concluir que a plataforma de expressão utilizada permite produzir e secretar corretamente as formas finais da proteína, o que facilitou as etapas posteriores de caracterização e purificação.

Figura 17. Análise das formas secretadas e de amostras purificadas de rhBMP7 presentes no meio condicionado de células 293T transfectadas com pCMV-hBMP7-IRES-EGFP Purificação de rhBMP7. a) *Western blot* realizado utilizando-se um anticorpo **monoclonal** anti-rhBMP7. **T**: Meio condicionado total concentrado de células transfectadas estavelmente com o vetor lentiviral; **FT**: Parte do meio condicionado concentrado que não se ligou à coluna de heparina-Sepharose; **W150**: Fração correspondente à lavagem da coluna com tampão de equilíbrio (150mM NaCl, 20mM Tris-HCl pH7,4); **O**: *Pool* das frações da eluição com 300mM e 500mM NaCl por heparina em condições não redutoras; **R**: *Pool* das frações eluídas com 300mM e 500mM NaCl por heparina em condições redutoras; **C+**: 1µg da proteína rhBMP7 produzida em células CHO, comercialmente disponível e **C-**: meio condicionado concentrado de células contendo o vetor lentiviral, mas sem a sequência da BMP7 humana clonada (pCMV-IRES-EGFP). **b)** *Western blot* realizado utilizando-se um anticorpo **policlinal** anti-rhBMP7 **O**: *Pool* das frações eluídas com 300mM e 500mM NaCl em condições não redutoras; **R**: *Pool* das frações eluídas com 300mM e 500mM NaCl por heparina em condições redutoras (BUSTOS-VALENZUELA *et al.*, 2010).

4.5.2. Tratamento de rhBMP7 purificada por cromatografia de afinidade por heparina com endoglicosidase PNGase F

Com a finalidade de verificar a ocorrência de glicosilação na proteína rhBMP7 secretada pelos clones de células 293T contendo o vetor de expressão lentiviral, foi utilizada a digestão com uma endoglicosidase foi feito, obtendo-se uma mudança no padrão de migração da proteína (a mudança no perfil de migração da proteína de “arraste” para bandas definidas) devido à desglicosilação, além da redução do peso molecular (Figura 18). Uma busca no banco de dados UniprotKB (<http://www.uniprot.org/>) para a proteína BMP7 humana mostrou que esta possui quatro sítios de glicosilação potenciais do tipo N-ligado. Isto demonstra que a linhagem de células escolhida para a expressão de rhBMP's é capaz de adicionar glicosilações N-ligadas, que ajudam a aumentar a estabilidade da proteína.

Figura 18. Desglicosilação enzimática de rhBMP7 purificada utilizando-se *N*-glicosidase F (PNGase F) analisada por *Western blot*. A proteína rhBMP7 purificada foi incubada com 2 U da enzima PNGase F (NEB) por 90 min a 37°C. Posteriormente, realizou-se a análise por *Western blot* utilizando-se anticorpos policlonais anti-rhBMP7. NT – rhBMP7 não-tratada enzimaticamente; PNGase F: rhBMP7 incubada por 90min com PNGase F. As setas indicam as formas monomérica e dimérica de rhBMP-7 após tratamento com PNGase F, em que houve redução do peso molecular se comparado à forma nativa da proteína (BUSTOS-VALENZUELA *et al.*, 2010).

4.5.3. Análise da atividade biológica da rhBMP7 purificada através cromatografia por afinidade à heparina através da alteração morfológica de células C2C12 durante a diferenciação osteogênica

Este ensaio foi feito conforme citado no item 4.3.2, com a diferença que, neste caso, as células foram incubadas com a proteína rhBMP7 purificada a partir do meio condicionado obtido de clones de células 293T contendo o vetor pCMV-hBMP7-IRES-EGFP. A Figura 19 mostra os diferentes fenótipos das células após sete dias de tratamento, sendo possível observar a aparição de células musculares no controle negativo (meio de cultura apenas) enquanto as células tratadas com a rhBMP7 purificada apresentam morfologia poligonal e citoplasma reduzido, características morfológicas de osteoblastos.

Figura 19. Análise funcional do meio condicionado das células 293T contendo o vetor pCMV-hBMP7-IRES-EGFP através da indução de diferenciação osteoblástica de células C2C12. Células C2C12 foram cultivadas na presença de rhBMP7 purificada por cromatografia de afinidade por heparina, suplementada ao meio em diferentes doses crescentes. Ao 7º dia do tratamento, as células foram visualizadas através de microscopia óptica. **MC 293T-pCMV-hBMP7-IRES-EGFP:** Suplementação do meio condicionado de células 293T contendo o vetor pCMV-hBMP7-IRES-EGFP ao invés da proteína purificada. **MC 293T-pCMV-IRES-EGFP:** Suplementação de meio condicionado de células 293T contendo o vetor pCMV-IRES-EGFP ao invés da proteína purificada. Aumento: 100x (BUSTOS-VALENZUELA *et al.*, 2010).

4.5.4. Avaliação da atividade biológica de rhBMP7 através de ensaio de atividade de fosfatase alcalina produzida por células C2C12 durante a diferenciação osteoblástica

Este ensaio foi feito conforme citado na secção 4.3, com a diferença que, neste caso, as células foram incubadas com a proteína rhBMP7 purificada a partir do meio condicionado de clones de células 293T contendo o vetor pCMV-hBMP7-IRES-EGFP. A Figura 20 mostra a atividade de fosfatase alcalina expressa em células C2C12 cultivadas com a proteína rhBMP7 purificada suplementada ao meio por sete dias, através de um teste colorimétrico.

Figura 20. Atividade de Fosfatase Alcalina das células C2C12 tratadas com o meio condicionado (MC) das células 293TpCMV-hBMP7-IRES-EGFP N°12. O ensaio foi feito conforme descrito em Materiais e Métodos. O gráfico mostra a atividade da enzima (nmol pNF/min/mg proteína) durante a osteodiferenciação das células C2C12 induzida por rhBMP7 presente no MC das células pCMV-hBMP7-IRES-EGFP N°12. Este resultado é representativo de 3 experimentos diferentes.

4.5.5. Análise histológica da osteodiferenciação *in vivo*

Uma vez demonstrado que a rhBMP7 purificada possui a capacidade de induzir a diferenciação de células C2C12 *in vitro*, investigou-se a capacidade destas proteínas em realizar diferenciação óssea *in vivo*, através da formação ectópica de tecido ósseo. A Figura 21 mostra a análise histológica após 21 dias da operação em camundongos *nude* BALB/c, que receberam no lado esquerdo da região posterior dorsal, implantes contendo hidroxiapatita sinterizada bovina apenas, e, no lado direito da região posterior dorsal, o mesmo implante contendo hidroxiapatita e 200µg de rhBMP7. Estes resultados mostram que a rhBMP7 purificada a partir do meio condicionado das células 293TpCMV-hBMP7-IRES-EGFP N°12 é capaz de induzir formação ectópica de osso.

Figura 21. Análise histológica da osteodiferenciação *in vivo* utilizando-se a proteína rhBMP7 purificada à partir de meio condicionado de células 293T contendo o vetor pCMV-hBMP7-IRES-EGFP. Implantes de hidroxiapatita contendo ou 200µg de proteína rhBMP7 purificada (**200µg rhBMP7**), ou meio condicionado de células 293T com o vetor pCMV-IRES-EGFP (**MC-**), ou veículo (tampão de eluição a 500mM NaCl - **0µg rhBMP7**) ou meio condicionado de células 293T contendo o vetor pCMV-rhBMP7-IRES-EGFP (**MC+**) foram introduzidas subcutaneamente na região posterior dorsal de camundongos *nude* BALB/c. **Esquerda:** coloração de hematoxilina/eosina mostrando a disposição histológica das células ao redor do implante. **Direita:** coloração de tricrômio de Masson para identificação de colágeno e tecido ósseo. **T:** trabéculas ósseas; **M:** células mielóides; **H:** cristais de hidroxiapatita; **F:** fibroblastos e **setas:** osteócitos. Barras: 100µm, aumento de 40x.

4.6. Fosfoproteômica e proteômica quantitativa de proteínas diferencialmente abundantes durante a osteodiferenciação das células mMSCs induzida por rhBMP2

Para avaliação da abundância diferencial das proteínas que são alteradas após a adição de rhBMP2 ao meio, realizou-se a fosfoproteômica e proteômica dos peptídeos tripsínicos oriundos dos lisados celulares totais de quatro diferentes períodos de indução com rhBMP2 e um controle sem tratamento. Para evitar que ocorressem aberrações nas quantificações entre os diferentes períodos de indução, e para que fosse possível realizar o *pooling* das amostras após a derivatização química dos peptídeos com isótopos estáveis de formaldeído, os tempos de indução foram agrupados três a três. Desta maneira, períodos mais próximos ao início da indução (sem indução - 0h, 10min e 30 min) foram agrupados em grupos diferentes dos extratos cuja indução correspondia aos períodos mais distantes do início da indução (30min, 1 h e 2 h). É possível notar que estes dois grupos, contudo, são interligados por um período de indução de 30 minutos, para tornar possível a correlação entre todos os períodos de indução do experimento. Dois experimentos multiplexados foram então realizados, contendo três diferentes marcações cada um: leve (+28Da), médio (+32Da) e pesado (+36Da). Na Figura 22, apresenta-se um esquema do experimento realizado, em que são mostrados os períodos de indução e os respectivos isótopos utilizados para cada condição. A derivatização com isótopo leve foi utilizada a partir de 50µg de extrato celular total nos tempos 0h (sem indução - grupo 1), e 30min (grupo 2); o isótopo intermediário foi utilizado nos tempos 10min (grupo 1) e 1h (grupo 2) e, finalmente, o isótopo pesado foi utilizado nos tempos de 30min (grupo 1) e 2h (grupo 2). Posteriormente, amostras pertencentes ao mesmo grupo foram agrupadas, totalizando 150µg de extrato protéico, o qual foi submetido

ao fosfoenriquecimento por cromatografia por afinidade a dióxido de titânio. Os eluatos das colunas foram submetidos à análise por LC-MS diretamente, por representarem uma subpopulação que corresponde a 10% com características próximas (possuir o grupo fosfato adicionado à cadeia lateral do aminoácido) enquanto que as frações que não foram retidas na coluna, correspondendo a peptídeos outros que não os fosforilados e, portanto, representando uma mistura complexa, foram submetidos a um fracionamento por cromatografia em fase normal (HILIC), e submetidos à análise por LC-MS.

Figura 22. Desenho experimental e esquema da aminação redutiva de aminoácidos.

As mMSC foram tratadas com rhBMP2 por quatro períodos de indução distintos: 10min, 30min, 1h e 2h. 50µg de extrato celular total correspondente a cada tempo de indução, incluindo o controle, foram agrupados em dois grupos três a três, e digeridos com tripsina. Os peptídeos digeridos foram então incubados com formaldeído e cianoborohidreto, formando um composto alquilado (aminação redutiva direta). Variando-se a quantidade de isótopos pesados estáveis no formaldeído e no cianoborohidreto, pode-se obter combinações de compostos que diferem entre si de 4Da. *light*: marcação com formaldeído sem isótopos pesados estáveis; *medium*: marcação com formaldeído contendo dois átomos de deutério por molécula; *heavy*: marcação com formaldeído contendo dois átomos de deutério, um átomo de ¹³C por molécula e utilização de cianoborohidreto contendo deutério. Um *pool* contendo cada uma destas condições foi então submetido à cromatografia por afinidade a TiO_2 para separação dos fosopeptídeos. A fração que não se ligou à coluna foi fracionada por HILIC.

4.7. Enriquecimento de fosopeptídeos derivatizados e separação de peptídeos por cromatografia de fase normal

Os peptídeos tripsínicos derivatizados, conforme descrito na seção anterior foram separados por cromatografia de afinidade utilizando-se resinas ligadas a TiO_2 (Figura 23). Assim, a população de peptídeos contendo modificações do tipo fosforilação foi separada da mistura inicial de peptídeos, e reservada para estudos por LC-MS/MS. A fração que não se ligou a coluna, denominada de *flowthrough* foi separada para posterior fracionamento em coluna de fase normal TSK Amide 20 (Tosoh Biosciences). A Figura 24 mostra cada fração eluída da coluna, realizada com um gradiente de 0-100% de uma solução 0,1% de TFA por 42 minutos. O total de 31 frações foi combinado em oito frações finais, de acordo com a intensidade obtida no cromatograma. Esta combinação serve para normalizar as quantidades de amostra a serem introduzidas no sistema LC-MS/MS, pois peptídeos muito hidrofílicos interagem mais fortemente com a fase estacionária e tendem a ter um tempo de retenção maior, porém presentes em menores quantidades.

Figura 23. Fosfoenriquecimento por *beads* contendo TiO₂ imobilizado. Os produtos de digestões tripticas de três diferentes extratos celulares foram submetidos à aminação redutiva. As amostras foram então reunidas em um só tubo, totalizando 150µg de extrato celular. A este *pool* foi adicionado 10mg de beads contendo TiO₂ adsorvido. Seletivamente, há interação entre os grupos PO₄⁻ da fosfoserina, fosfotirosina e fosfotreonina e o átomo de titânio imobilizado na resina. A eluição da coluna é feita utilizando-se NH₃.H₂O a pH11,5 e posteriormente, acetonitrila.

Figura 24. Cromatografia Líquida de Interação Hidrofílica de peptídeos com grupos metila contendo ou não combinações de isótopos estáveis de hidrogênio e carbono. A fração *flowthrough* do fosfoenriquecimento foi submetida à secagem por centrifugação à vácuo anteriormente à ressuspensão com 90% de acetonitrila e aplicação na coluna (TSK-Amide-80-Tosoh Biosciences). As amostras foram submetidas a um gradiente 0-100% de uma solução 0,1%ácido trifluoroacético em água por 42 minutos. Cada barra vertical representa uma fração distribuída em placas de 96 poços (31 frações), enquanto que a linha azul representa a intensidade relativa a 280nm em função do tempo. Após o fracionamento, as amostras foram combinadas em oito frações finais, obedecendo à intensidade e ordem de eluição da coluna. A figura acima é representativa de seis experimentos distintos.

4.8. Análise dos peptídeos derivatizados e fosfoenriquecidos por espectrometria de massas

Os peptídeos tripsínicos derivatizados conforme descrito na seção anterior, foram separados por cromatografia de afinidade por dióxido de titânio. A fração eluída foi reservada para inserção direta ao sistema de cromatografia reversa acoplada ao espectrômetro de massa, enquanto que a fração não ligada foi submetida a um fracionamento posterior por HILIC. Apesar da reação de dimetilação ser favorável à temperatura ambiente nas condições citadas, é aconselhável a checagem da derivatização dos peptídeos por MALDI, através da análise de uma pequena parte da amostra, para avaliação de um trio de *clusters* isotópicos. A Figura 25 mostra um exemplo de cromatograma, em que é possível ver a abundância relativa ao pico de maior intensidade (m/z 387,18 a 110,74 minutos) e de um espectro *full-MS* do tempo de retenção 51,34 a 55,39 minutos mostrando três clusters isotópicos marcados com três diferentes isótopos de formaldeído, que modificam a massa total do peptídeo de 28, 32 ou 36 Da. Especificamente para o peptídeo representado na Figura 25, há a diferença de +8Da entre os peptídeos assinalados a 1425,81 m/z , 1433,86 m/z e 1441,90 m/z , mostrando que no peptídeo há duas aminas primárias livres para reação: o grupo amina presente no N-terminal do peptídeo e o grupo amina presente na lisina ou arginina terminal, por este se tratar de um peptídeo tríptico.

Figura 25. Cromatograma total combinado e espectro full-MS de um dado tempo de retenção para avaliação da marcação por isótopos estáveis por reação da amina primária de peptídeos com formaldeído. Os peptídeos que sofreram aminação redutiva utilizando-se três tipos distintos de combinações de isótopos estáveis do hidrogênio e carbono foram submetidos a um protocolo de fosfoenriquecimento e submetidos ao RPLC-MS/MS. Acima: Cromatograma contendo a abundância relativa dos peptídeos de acordo com o pico mais intenso (*Base Peak Chromatogram*); abaixo: *clusters* isotópicos apresentando 8Da de diferença entre si, derivados de metilação da lisina terminal da digestão tríptica ou de aminoácidos com aminas primárias na cadeia lateral, correspondente à marcação *triplex* realizada. Interface gráfica obtida através do software Xcalibur (Thermo).

4.9. Análise *in silico* dos dados obtidos através de espectrometria de massas

4.9.1. Busca por peptídeos a partir dos espectros

Os dados em formato ".raw" adquiridos no aparelho LTQ Orbitrap XL® foram convertidos em formato ".mgf", e submetidos a um servidor local do MASCOT (<http://www.matrixscience.com/home.html>), uma ferramenta que permite realizar a busca por peptídeos correspondentes a uma determinada proteína em um banco de dados a partir dos dados de espectros de íons precursores e íons fragmentados obtidos. Para realizar a busca, alguns parâmetros foram pré-determinados: a) presença de modificações fixas nos peptídeos, como a carbamilação em resíduos de cisteína (+48Da) e a presença de metilação (+28Da,+32Da ou +36Da) no grupo ε-amino de lisina, arginina e no grupo amino do peptídeo; b) modificações variáveis como sendo a presença de fosfoserina, fosfotirosina e fosfotreonina (p~S, p~Y ,+98Da e +78Da p~T, respectivamente); c) seleção de picos que representassem a forma monoisotópica do peptídeo, com carga +2 ou +3 e tolerância de 2ppm para o íon precursor e de 0,8 Da para o íon fragmentado; d) tripsina como enzima utilizada para geração dos peptídeos, com erro de clivagem (*misscleavage*) permitido em até dois sítios; e) espécie selecionada *Mus musculus* em banco de dados IPI_MOUSE 3.77 e IPI_MOUSE_Decoys v.1.71.

4.9.2. Quantificação e normalização da abundância dos peptídeos

Os peptídeos identificados foram quantificados de acordo com a área total do cromatograma extraído correspondente, que é uma relação entre a intensidade do pico para um dado peptídeo em função do tempo de retenção deste na coluna de fase reversa, sendo diretamente proporcional à abundância deste peptídeo. Assim pode-se, determinar, em números arbitrários, a abundância do peptídeo através do cálculo da área do pico. Através do software Proteome Discoverer® (Thermo) foi possível obter os dados para quantificação dos peptídeos, que posteriormente, foram agrupados, dois a dois, para realizar a quantificação relativa, totalizando quatro grupos (10min/0h, 30min/10min, 1h/30min, e 2h/1h). A tabela I do Anexo I sumariza todos os fosfopeptídeos quantificados e o material Anexo em mídia CD-ROM sumariza todos os peptídeos quantificados. A quantificação relativa entre dois dados de um determinado grupo somente é possível caso o peptídeo em questão esteja presente em ambos os grupos (a área no cromatograma deve ter valor positivo diferente de zero). Todavia, diferenças grandes de abundância entre dois grupos em comparação levam a relações de abundância que são demasiadamente altos ou baixos, e que representariam mudanças drásticas no conteúdo celular em um curto período de tempo, o que não é esperado, uma vez que a maioria dos períodos estudados não diferem entre si mais do que 30 minutos. Assim sendo, foi introduzido um passo de normalização dos dados por LOWESS (*Locally Weighted Scatterplot Smoothing*). A Figura 26 mostra gráficos de dispersão de dados entre dois períodos de indução distintos, em que a inclinação de 45° significa igual abundância nos dois grupos. Tal normalização foi realizada tanto para os dados de proteoma quanto para os dados de fosfoproteoma.

A) Proteoma**10min(M) / 0h (L)** **30min (H) / 10min(M)** **1h (M) / 30min (L)** **2h(H) / 1h (M)**

B) Fosfoproteoma

Figura 26. Gráficos de dispersão dos peptídeos quantificados e normalizados utilizando-se LOWESS. O gráfico compara um dado peptídeo quantificado em dois diferentes pontos de indução (círculos). Uma linha imaginária a 45° representa uma situação em que não há variação entre os dois tempos de comparação estudados (relação de abundância entre dois tempos distintos igual a 1,0), e desvios desta reta representam uma diferença na abundância relativa daquele peptídeo nos dois grupos em questão. Os números nas abscissas e ordenadas representam o número arbitrário ordenado dado a um peptídeo.

4.9.3. Agrupamento dos peptídeos quantificados em proteínas

Os peptídeos e os fosfopeptídeos quantificados e normalizados foram agrupados em proteínas utilizando-se o *software* StatQuant (BREUKELLEN, VAN *et al.*, 2009). Em experimentos de proteômica *high throuput*, frequentemente, uma proteína está representada por vários peptídeos, que são diferentemente abundantes. Desta maneira, o software calcula a abundância relativa da proteína baseado na média aritmética da abundância relativa dos peptídeos e realiza uma análise estatística para determinar se o dado é significativo ou não ($p < 0,05$). A Figura 27 mostra a interface gráfica do software, na qual é possível obter, além da abundância relativa, o p-value, o Q-value, assim como estes valores em escala logarítmica para estes dados.

StatQuant

File Process Help

0h_c_medium_light Median:0.1764440726_76_0h_c_medium_light

#	protID	Ratio	log Ratio	(log) STDEV	nr peptides	P-value	Qvalue	Description
633	IPI:IP100555069.3	2.0621731	0.4626397	0.7496276	90	2.5962722E-8	1.4645637910403727E-7	IPI:IP100555069.3
241	IPI:IP100874728.1	0.47187838	-1.38157	1.4576612	92	2.0428104E-14	1.3785836821112374E-13	IPI:IP100874728.1
1066	IPI:IP100407339.7zIPI:I...	0.6853234	-0.5626634	0.23037198	96	0.0	0.0	IPI:IP100407339.7zIPI:I...
781	IPI:IP100319992.1	1.0091777	-0.018769091	0.29628056	96	0.536289	0.7823844487218072	IPI:IP100319992.1
317	IPI:IP100230395.5	1.2519877	0.115564965	1.0502517	97	0.28120148	0.46725321752427207	IPI:IP100230395.5
987	IPI:IP100122450.1zIPI:I...	0.81309813	-0.38459533	0.76524544	101	1.983283E-6	9.568470747118435E-6	IPI:IP100122450.1zIPI:I...
915	IPI:IP100125778.4	0.942752	-0.11180577	0.27228972	103	6.471816E-5	2.5981742536893834E-4	IPI:IP100125778.4
312	IPI:IP100230108.6	1.2614564	0.1656239	0.6502268	107	0.009679735	0.026097323964623845	IPI:IP100230108.6
530	IPI:IP100663627.1	2.1709714	0.48907405	0.9529076	113	2.9516295E-7	1.5031446441458616E-6	IPI:IP100663627.1
835	IPI:CON_00698900.1zIP...	7.150849	0.24131955	0.91912097	116	0.005530209	0.015478955970427765	IPI:CON_00698900.1zIP...
280	IPI:IP100421223.3	0.6775039	-0.7269289	1.0031585	117	2.434275E-12	1.5751191201014295E-11	IPI:IP100421223.3
1045	IPI:IP100761696.2zIPI:I...	1.4379618	-0.57676595	0.9859715	118	4.1671875E-9	2.399950906999671E-8	IPI:IP100761696.2zIPI:I...
115	IPI:IP100307837.6	1.2510703	0.30176345	0.32479462	130	0.0	0.0	IPI:IP100307837.6
1035	IPI:IP100226515.5	1.1637366	-0.5583727	0.64259696	131	0.0	0.0	IPI:IP100226515.5
217	IPI:CON_00729194.2	1.6946008	-0.005811529	1.3615651	149	0.9585184	1.0	IPI:CON_00729194.2
158	IPI:IP100407130.4	1.6456023	0.42547455	0.61026454	151	1.1990409E-14	8.141635513917815E-14	IPI:IP100407130.4
1013	IPI:CON_00695489.1	1.6384363	-0.24666406	1.1026533	167	0.004356244	0.012577082741800256	IPI:CON_00695489.1
1096	IPI:IP100317794.5	0.8243624	-0.33367586	0.46042308	172	0.0	0.0	IPI:IP100317794.5
670	IPI:IP100131138.10zIPI:I...	1.7005246	0.28832486	0.66292256	176	3.529547E-8	1.951005958687516E-7	IPI:IP100131138.10zIPI:I...
726	IPI:IP100462072.3	2.590306	0.5944112	1.0609285	192	4.889422E-13	3.239978566562716E-12	IPI:IP100462072.3
496	IPI:IP100229517.5	0.72313917	-0.78176117	1.5772768	210	1.1831869E-11	7.479917068872839E-11	IPI:IP100229517.5
555	IPI:CON_00707101.1	4.3583817	-0.4937004	1.7840528	222	5.2888005E-5	2.138853126191808E-4	IPI:CON_00707101.1

IPI:IP100125778.4

#	include	Peptides	modification(s)	Ratio	Signal A	Signal B
1	☒	yGINTTDFQTVDLWEKG		1.0783491	2957699.625	3604362.125
2	☒	qmEQISQFLQAAR		1.0175315	14928363.81	17166235.5
3	☒	yGINTTDFQTVDLWEKG		0.85066235	13068188.75	12562833.25
4	☒	yGINTTDFQTVDLWEKG		0.85066235	13068188.75	12562833.25
5	☒	yGINTTDFQTVDLWEKG		1.0783491	2957699.625	3604362.125
6	☒	yGINTTDFQTVDLWEKG		0.85066235	13068188.75	12562833.25
7	☒	yGINTTDFQTVDLWEKG		0.85066235	13068188.75	12562833.25
8	☒	yGINTTDFQTVDLWEKG		0.85066235	13068188.75	12562833.25
9	☒	qmEQISQFLQAAR		1.0175315	14928363.81	17166235.5
10	☒	qmEQISQFLQAAR		1.0175315	14928363.81	17166235.5
11	☒	qmEQISQFLQAAR		0.9420392	5284391.406	5625730.656
12	☒	yGINTTDFQTVDLWEKG		0.85066235	13068188.75	12562833.25
13	☒	gASQAGMTGYGMPR		0.77133733	5922149.375	5162245.875
14	☒	yGINTTDFQTVDLWEKG		0.85066235	13068188.75	12562833.25
15	☒	TLMLNLGGLAVAR		1.3384006	36079113	54570373
16	☒	qmEQISQFLQAAR		1.0175315	14928363.81	17166235.5
17	☒	qmEQISQFLQAAR		0.639287	557887	403048.2813
18	☒	rFSDNQLQEGK		0.83650357	37369637.75	35326585.06
19	☒	ITNSLYPEGQAPVik		0.8387795	14215631.69	13475004.56
20	☒	yGINTTDFQTVDLWEKG		1.104547	385516.4688	481218.2656
21	☒	ITNSLYPEGQAPVik		0.86214274	3902116.125	3801844.156
22	☒	TLMLNLGGLAVAR		1.4761257	22427535.25	37412767.5
23	☒	gASQAGMTGYGMPR		0.8624778	2122079.906	2068352.859
24	☒	qmEQISQFLQAAR		0.9420392	5284391.406	5625730.656
25	☒	rFSDNQLQEGK		0.83650357	37369637.75	35326585.06
26	☒	gASQAGMTGYGMPR		0.84011286	5281064.438	5013881.5
27	☒	ITNSLYPEGQAPVik		0.9117934	19694118.19	20293077.38

Figura 27. Interface gráfica do software StatQuant. Os dados das áreas calculadas correspondentes ao cromatograma total extraído para cada peptídeo, após normalização, foram inseridos no software StatQuant, que agrupa os dados com mesmo número de acesso, e calcula a abundância relativa final para uma dada proteína a partir da media dos peptídeos quantificados no experimento. As colunas apresentam as listagem das proteínas, cálculo da abundância relativa (ratio), P-value, Q-value e o número de peptídeos correspondentes àquele número de acesso.

4.9.4. Identificação das proteínas diferencialmente fosforiladas através da análise comparativa da abundância relativa em experimentos distintos

Os fosfopeptídeos quantificados e normalizados foram agrupados nas fosfoproteínas correspondentes, de acordo com o respectivo número de acesso. Os dados de abundância relativa das fosfoproteínas encontradas foram verificados e reunidos manualmente, e a determinação da abundância relativa diferencial foi realizada através da existência de valores de abundância relativa correspondendo a um aumento (valor maior que 1,000) ou a uma diminuição (valor menor que 1,000) em pelo menos dois experimentos distintos dos três possíveis. A Tabela 4 compila os dados da abundância relativa de cada proteína contendo fosfopeptídeos, discriminada por experimento. Nela também podem ser encontrados os dados distribuídos por tipo de abundância: “mais” ou “menos” abundantes nos períodos de tempo estudados

Tabela 4. Proteínas diferencialmente fosforiladas em cada período de indução com rhBMP2.

10min/0h				
	Número de Acesso	Exp1	Exp2	Exp3
Proteínas Positivamente Fosforiladas				
Bcl-2-associated transcription factor 1	IPI00415385.1	1,494	1,027	0,997
Caldesmon 1	IPI00122450.1	3,324	1,094	
Catenin alpha-1	IPI00112963.1	2,293	1,063	0,732
Eukaryotic translation initiation factor 4B	IPI00221581.1	1,328	1,007	1,158
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U	IPI00458583.3	3,031		1,004
Isoform A of Lamin-A/C	IPI00620256.3	1,126	1,234	0,902
Isoform PLEC-0 of Plectin-1	IPI00230061.2	1,467	1,229	1,170
Isoform PLEC-1 of Plectin-1	IPI00421268.1	1,801		1,020
Microtubule-associated protein 1B	IPI00130920.1	1,588	2,004	1,119
Microtubule-associated protein 4	IPI00408119.6	1,692	1,124	1,067
Nexilin	IPI00400168.2	1,149	1,5674	
Nuclease-sensitive element-binding protein 1	IPI00120886.3	1,687	1,434	
Nucleolar RNA helicase 2	IPI00120691.3	1,903		1,119
Proteasome subunit alpha type-3	IPI00331644.5	1,266	1,334	0,939
Ras GTPase-activating protein-binding protein 1	IPI00130095.1	1,203	1,115	0,996
Septin-2	IPI00114945.1	2,024	1,282	0,800
Small acidic protein	IPI00127941.1	0,554	1,114	1,352
Small glutamine-rich tetratricopeptide repeat-containing protein	IPI00116331.1	1,107		1,086
Thyroid hormone receptor-associated protein 3	IPI00556768.1	1,094	1,000	
Transcriptional regulator ATRX	IPI00322707.5	1,085	0,582	1,343
Proteínas Negativamente Fosforiladas				
		10'/0h		
Acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 family member B	IPI00831258.1	0,768		0,945
AHNAK nucleoprotein	IPI00553798.2	0,964	0,880	1,054
Alpha-parvin	IPI00470003.3	0,852		0,711
ATP-binding cassette sub-family F member 1	IPI00396671.1	0,688	0,514	
Calnexin	IPI00119618.1	0,860	0,641	0,639
Chromobox homolog 3	IPI00677454.2	3,573	0,934	0,914
Cytosolic phospholipase A2	IPI00111169.1	0,784	1,110	0,780
Eif3b protein	IPI00229859.1	0,696		0,933
Elongation factor 1-beta	IPI00320208.3	0,664	0,634	5,613
Elongation factor 1-delta	IPI00118875.5	1,748	0,926	0,892
Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 1	IPI00421179.1	0,935		0,994
Eukaryotic translation initiation factor 5B	IPI00756424.3		0,890	0,955
General vesicular transport factor p115	IPI00128071.7	1,385	0,920	0,989
H/ACA ribonucleoprotein complex subunit 4	IPI00113635.7	0,792	0,971	
Heat shock protein HSP 90-beta	IPI00554929.2	1,466	0,800	0,698
Isoform Beta of LIM domain and actin-binding protein 1	IPI00759925.1	0,746		0,830
High mobility group protein HMG-I	IPI00314240.5	0,634	0,608	1,322
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1	IPI00817004.1	0,906	0,905	
Myb-binding protein 1A	IPI00331361.2	0,476	0,635	
Myosin-9	IPI00123181.4	0,698	0,833	1,474
Nuclear mitotic apparatus protein 1	IPI00263048.2	0,731	0,525	
Nuclear Ubiquitous Casein Kinase Substrate	IPI00341869.5	0,734	0,842	0,918
nucleolar and coiled-body phosphoprotein 1 isoform D	IPI00719871.1	0,737	0,573	
Nucleolar protein 56	IPI00318048.5	0,637	0,734	0,928
Palladin	IPI00858000.1	0,960	1,479	0,868
Probable ATP-dependent RNA helicase DDX10	IPI00896604.1	0,875	0,620	
Putative uncharacterized protein	IPI00323820.4	0,962	0,926	0,391
Reticulon-4	IPI00469392.2	0,783		0,936
Serine/arginine repetitive matrix protein 1	IPI00605037.1	0,650	0,912	1,083
Treacle protein	IPI00115660.1	0,825	0,979	
Vimentin	IPI00227299.6	0,941	0,947	1,040

30min/10min				
	Número de Acesso	Exp1	Exp2	Exp3
Proteínas Positivamente Fosforiladas				
60S Acidic Ribosomal Protein P0	IPI00314950.2		2,010	1,291
AHNAK nucleoprotein	IPI00553798.2	1,060	1,450	1,552
Alpha-parvin	IPI00470003.3	1,062		3,486
ATP-binding cassette sub-family F member 1	IPI00396671.1	0,891	3,409	1,111
Catenin alpha-1	IPI00112963.1	1,239	1,800	1,549
Chloride channel, nucleotide-sensitive, 1A	IPI00124248.1		1,118	1,042
Cytoplasmic dynein 1 light intermediate chain 1	IPI00153421.1	0,963	1,027	1,693
Eif3b protein	IPI00229859.1	1,014		1,952
Elongation factor 1-beta	IPI00320208.3	1,007	1,480	1,138
Elongation factor 1-delta	IPI00118875.5	0,947	1,178	1,411
Eukaryotic translation initiation factor 5B	IPI00756424.3		1,547	1,413
FACT complex subunit SSRP1	IPI00652593.2		1,589	1,974
General vesicular transport factor p115	IPI00128071.7	1,081	2,933	
GPN-loop GTPase 1	IPI00122054.1		1,266	1,115
H/ACA ribonucleoprotein complex subunit 4	IPI00113635.7	0,983	1,191	1,411
Heat shock protein HSP 90-beta	IPI00554929.2	1,099	1,575	0,988
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3	IPI00269661.1	1,075		1,092
Importin subunit alpha-3	IPI00230429.4		1,662	1,073
Isoform A of Lamin-A/C	IPI00620256.3	1,020	1,037	1,230
Isoform PLEC-0 of Plectin-1	IPI00230061.2	0,966	1,507	2,366
La-Related Protein 1	IPI00929786.1		1,511	1,053
Microtubule-associated protein 1B	IPI00130920.1	1,163	5,437	1,460
Myb-binding protein 1A	IPI00331361.2	1,137	1,982	1,451
Nuclear mitotic apparatus protein 1	IPI00263048.2	1,043	2,555	1,987
Nuclease-sensitive element-binding protein 1	IPI00120886.3	1,323	0,810	1,177
nucleolar and coiled-body phosphoprotein 1 isoform D	IPI00719871.1	1,039	1,537	0,857
Nucleolar protein 56	IPI00318048.5	1,169	1,989	1,078
Nucleolin	IPI00317794.5		1,497	1,032
Probable ATP-dependent RNA helicase DDX10	IPI00896604.1	1,193	2,217	2,130
Proteasome subunit alpha type-3	IPI00331644.5	0,919	1,844	1,928
Ras GTPase-activating protein-binding protein 1	IPI00130095.1	1,017	0,923	1,551
Septin-2	IPI00114945.1	0,885	1,855	2,160
Small acidic protein	IPI00127941.1	1,470	1,041	1,853
Transcriptional regulator ATRX	IPI00322707.5	0,781	1,834	
Xrn2 5'-3' exoribonuclease 2	IPI00120046.1		1,878	2,205
Proteínas Negativamente Fosforiladas				
60S acidic ribosomal protein P2	IPI00139795.2		1,115	0,472
A-kinase anchor protein 12	IPI00123709.1		0,929	0,708
Bcl-2-associated transcription factor 1	IPI00415385.1	1,220	0,650	0,739
Caldesmon 1	IPI00122450.1	0,757	0,643	0,997
Calnexin	IPI00119618.1	0,847	2,613	0,525
Chromobox homolog 3	IPI00677454.2	0,867	0,883	0,978
Cytosolic phospholipase A2	IPI00111169.1	0,952	2,033	0,966
Eukaryotic translation initiation factor 4B	IPI00221581.1	1,064	0,803	0,864
Hepatoma-Derived Growth Factor-Related Protein 2	IPI00875101.1		0,739	0,955
High mobility group protein HMGI-C	IPI00331612.3	0,996	1,268	0,680
Histone H1.5	IPI00230133.5		0,540	0,515
Isoform Beta of LIM domain and actin-binding protein 1	IPI00759925.1	2,446		1,001
High mobility group protein HMG-IY	IPI00314240.5	0,851	1,995	0,677
Leucine-rich repeat flightless-interacting protein 1	IPI00654388.2	1,410	0,741	0,808
Membrane-associated progesterone receptor component 1	IPI00319973.3	0,685		0,866
Microtubule-associated protein 4	IPI00408119.6	0,885	0,678	0,914
Myosin-9	IPI00123181.4	0,908	4,260	0,959
Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate	IPI00229534.5	1,036	0,648	0,709
Nexilin	IPI00400168.2	0,600	0,7989	0,375
Non-histone chromosomal protein HMG-14	IPI00338745.4	0,718	0,759	
Nuclear Ubiquitous Casein Kinase Substrate	IPI00341869.5	1,580	0,866	0,714
Palladin	IPI00858000.1	0,926	1,289	0,848
Rho GTPase-activating protein 1	IPI00404970.2	0,888	0,905	1,284
Serine/arginine repetitive matrix protein 1	IPI00605037.1	0,866	0,605	0,855
Thyroid hormone receptor-associated protein 3	IPI00556768.1	0,842	0,705	0,996
TGF beta-1-induced transcript 1 protein	IPI00850187.1	0,946		0,327
Ubiquitin-Associated Protein 2-Like	IPI00761937.1		0,649	0,621

1h/30min				
	Número de Acesso	Exp1	Exp2	Exp3
Proteínas Positivamente Fosforiladas				
Isoform A of Lamin-A/C	IPI00620256.3	1,039	1,118	0,636
Isoform PLEC-0 of Plectin-1	IPI00230061.2	1,136	1,138	0,772
Microtubule-associated protein 4	IPI00408119.6	2,007	1,100	0,824
Elongation factor 1-delta	IPI00118875.5	1,109	1,224	0,960
Catenin alpha-1	IPI00112963.1	1,555	2,088	0,970
Hepatoma-Derived Growth Factor-Related Protein 2	IPI00875101.1		1,531	1,035
Cytoplasmic dynein 1 light intermediate chain 1	IPI00153421.1		1,079	1,053
Serine/Arginine Repetitive Matrix Protein 2	IPI00785240.1		1,623	1,056
Hepatoma-derived growth factor	IPI00313817.1	1,058	0,960	1,069
similar to KIAA2019 protein	IPI00850843.2	1,392	1,124	1,084
Nuclear mitotic apparatus protein 1	IPI00263048.2	0,947	1,699	1,099
Rho GTPase-activating protein 1	IPI00404970.2		1,000	1,117
Microtubule-associated protein 1B	IPI00130920.1	1,039		1,131
FACT complex subunit SSRP1	IPI00652593.2	1,343	1,492	1,169
Bcl-2-associated transcription factor 1	IPI00415385.1	1,206	2,060	1,178
Probable ATP-dependent RNA helicase DDX10	IPI00896604.1		1,328	1,234
182 Kda Tankyrase-1-Binding Protein	IPI00459443.5		1,118	1,262
H/ACA ribonucleoprotein complex subunit 4	IPI00113635.7		1,390	1,323
Xrn2 5'-3' exoribonuclease 2	IPI00120046.1		1,143	1,323
Cordon-Bleu Protein-Like 1	IPI00762331.2		2,217	1,336
Septin-2	IPI00114945.1	1,316	1,826	1,357
Membrane-associated progesterone receptor component 1	IPI00319973.3	1,264		1,510
Eukaryotic translation initiation factor 5B	IPI00756424.3	0,740	1,045	1,540
Zinc finger Ran-binding domain-containing protein 2	IPI00126804.6		1,356	1,561
60S Acidic Ribosomal Protein P0	IPI00314950.2		1,132	1,631
nucleolar and coiled-body phosphoprotein 1 isoform D	IPI00719871.1	1,209	0,947	1,792
Importin subunit alpha-3	IPI00230429.4		1,799	1,804
Nucleolar protein 56	IPI00318048.5	1,042	1,340	2,095
ATP-binding cassette sub-family F member 1	IPI00396671.1	1,006	0,922	2,110
GPN-loop GTPase 1	IPI00122054.1		1,081	2,203
Cytosolic phospholipase A2	IPI00111169.1	0,852	1,032	2,290
TGF beta-1-induced transcript 1 protein	IPI00850187.1	1,321		2,305
Heat shock protein HSP 90-beta	IPI00554929.2	1,180	1,320	2,908
Proteínas Negativamente Fosforiladas				
Leucine-rich repeat flightless-interacting protein 1	IPI00654388.2	0,685	1,171	0,407
Small acidic protein	IPI00127941.1	0,704	0,855	0,410
Nuclease-sensitive element-binding protein 1	IPI00120886.3		0,761	0,547
Caldesmon 1	IPI00122450.1		0,830	0,573
28 Kda Heat- and Acid-Stable Phosphoprotein	IPI00352475.3		0,911	0,593
Eukaryotic translation initiation factor 4B	IPI00221581.1	1,073	0,922	0,642
Nuclear Ubiquitous Casein Kinase Substrate	IPI00341869.5		0,917	0,656
22 kDa protein	IPI00116120.3		0,759	0,675
Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate	IPI00229534.5	0,533	1,036	0,777
Elongation factor 1-beta	IPI00320208.3	1,119	0,890	0,793
High mobility group protein HMG-I	IPI00314240.5		0,648	0,801
Glycylpeptide N-tetradecanoyltransferase 1	IPI00224128.7		0,884	0,830
Alpha-parvin	IPI00470003.3	0,833		0,831
Thyroid hormone receptor-associated protein 3	IPI00556768.1	0,713	1,686	0,856
Histone H1.5	IPI00230133.5		0,662	0,908
Nexilin	IPI00400168.2		0,6361	0,967
High mobility group protein HMGI-C	IPI00331612.3		0,390	0,983
Ras GTPase-activating protein-binding protein 1	IPI00130095.1	0,899	2,151	0,991
A-kinase anchor protein 12	IPI00123709.1	0,956	0,949	1,409
Calnexin	IPI00119618.1	0,581	0,718	4,369
ATP-citrate synthase	IPI00762047.1	0,939	0,878	

2h/1h				
	Número de Acesso	Exp1	Exp2	Exp3
Proteínas Positivamente Fosforiladas				
Nuclear mitotic apparatus protein 1	IPI00263048.2	1,170	1,912	0,657
Heat shock protein HSP 90-beta	IPI00554929.2	1,054	1,173	0,789
Eukaryotic translation initiation factor 5B	IPI00756424.3	1,027	2,503	0,799
FACT complex subunit SSRP1	IPI00652593.2	0,905	1,172	1,043
PLEC-O	IPI00230061.2	0,933	1,740	1,093
Uncharacterized protein C10orf78 homolog	IPI00458153.2	1,075		1,243
Ras GTPase-activating protein-binding protein 1	IPI00130095.1	0,996	1,009	1,275
Small acidic protein	IPI00127941.1	1,352	0,677	1,291
High mobility group protein HMG-I	IPI00314240.5		1,475	1,521
Leucine-rich repeat flightless-interacting protein 1	IPI00654388.2	2,025	0,723	2,209
Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate	IPI00229534.5	1,040	0,727	2,424
Tensin 1	IPI00378438.6		1,355	2,547
Proteínas Negativamente Fosforiladas				
Nucleolar protein 56	IPI00318048.5	0,781	2,361	0,517
Non-histone chromosomal protein HMG-14	IPI00338745.4	0,749	0,136	0,586
Calnexin	IPI00119618.1	0,639	7,281	0,692
Catenin alpha-1	IPI00112963.1	0,732	1,415	0,733
Filamin-A	IPI00131138.10	0,520		0,737
ATP-citrate synthase	IPI00762047.1	0,830	1,005	0,753
Eif3b protein	IPI00229859.1	0,736		0,774
Eukaryotic translation initiation factor 4B	IPI00221581.1	1,158	0,573	0,785
Cytosolic phospholipase A2	IPI00111169.1	0,780	2,666	0,837
nucleolar and coiled-body phosphoprotein 1 isoform D	IPI00719871.1	0,914	3,516	0,855
Isoform cw17 of splicing factor 1	IPI00116284.4		0,585	0,865
General vesicular transport factor p115	IPI00128071.7	0,909		0,873
Septin-2	IPI00114945.1	0,800	1,709	0,893
Thyroid hormone receptor-associated protein 3	IPI00556768.1	0,698	0,664	1,033
Hepatoma-derived growth factor	IPI00313817.1	0,850	0,628	1,129
Elongation factor 1-delta	IPI00118875.5	0,791	0,838	1,447
A-kinase anchor protein 12	IPI00123709.1	0,891	0,961	1,562
Elongation factor 1-beta	IPI00320208.3	0,889	0,957	1,591
Microtubule-associated protein 4	IPI00408119.6	0,922	0,690	1,769
Spectrin beta chain, brain 1	IPI00319830.7	0,928	0,803	

Os peptídeos correspondentes a um mesmo número de acesso do IPI (International Protein Index), foram agrupados e a abundância relativa, foi calculada. Uma determinada fosfoproteína foi dada como tendo abundância relativa positiva ou negativa se, em pelo menos duas das três replicatas, houveram dados superiores a 1,000 (positivamente fosforiladas) ou menor que 1,000, (negativamente fosforiladas). Experimentos que apresentaram variação nula foram descartados da lista. Verde: proteínas negativamente fosforiladas; vermelho: proteínas positivamente fosforiladas.

4.9.5. Quinases possivelmente envolvidas com a fosforilação de substratos encontrados nos experimentos de espectrometria de massas

Para cada fosfopeptídeo quantificado, foi feita a análise de quinases que poderiam estar com a fosforilação deste substrato, utilizando-se um mecanismo de busca denominado NetworKIN (http://www.networkin.info/version_2_0/), que compila todos os dados experimentais ou de predição de um determinado sítio de fosforilação em uma dada proteína foi adicionado por meio da catálise por uma determinada quinase. Na Tabela 5, estão listados todos os peptídeos encontrados que possuem a modificação em serina, tirosina e treonina, e a(s) correspondente(s) quinase(s) que poderiam estar envolvidas na fosforilação destes substratos. Na figura 28, é possível observar a distribuição das quinases pelo número de ocorrência de sítios associados às mesmas.

Distribuição de motivos por quinase

Figura 28. Histograma dos motivos de fosforilação das quinases correspondentes àqueles encontrados nos fosfopeptídeos e gráfico de ocorrências de motivos por família de quinases. O histograma mostra os motivos de quinases encontrados correspondentes ao banco de dados combinado do PhosphoELM e Phosphosite, e reunidos no site NetworkKin (http://www.networkkin.info/version_2_0/). O gráfico inferior compila os mesmos dados, considerando as famílias de quinases em relação ao total de motivos encontrados.

Tabela 5. Sítios de fosforilação encontrados nos fosfopeptídeos e análise dos motivos de fosforilação de quinases utilizando NetworKIN 2.0 Beta.

Quinase	Peptídeo	Posição	Substrato
Activin receptor type II	FCRSSsMADRS	S20	BAG-family molecular chaperone regulator-2
	RSRSSsVGSSS	S4386	Plectin 1
	KKTKRtADSSS	T8	Chromobox protein homolog 5
	PARSQsSDTEQ	S496	Eukaryotic translation initiation factor 4B
	GAQSDsELPSY	S1300	BFA-resistant GEF 1
Serine/threonine-protein kinase PAK 1	TESRSsTPLPT	S159	Lamina-associated polypeptide 2 isoform alpha
	TESRSsTPLPT	S158	Lamina-associated polypeptide 2 isoform alpha
	RSQIRsRTPSA	S301	SGTA protein
	PSKARsVSPPP	S314	Splicing factor, arginine/serine-rich 6
	GSPRRsASPER	S231	Splicing factor, arginine/serine-rich 7
Serine-protein kinase ATR	ATAPQtQHVSP	T495	Elongation factor 1-delta
	EEEGIsQESSE	S99	High mobility group protein HMG-I/HMG-Y
	ASSHSsQTQGG	S407	Lamin A/C
	MYKTIsQEFLT	S365	Nexilin
	VINETsQHDD	S459	Vimentin
	SKLPRTQPDGT	T1744	Nuclear mitotic apparatus protein 1
	TQFPPsQSEER	S126	Ran-binding protein 3
	RSQIRsRTPSA	S301	SGTA protein
ACTRIIA Activin receptor type II	SSDNQsSSPQP	S475	Ubiquitin associated protein 2-like
	SFGGRsSGSPY	S355	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3
	ATEQRtSSKES	T2159	Spectrin beta chain, brain 1
	TSSKEsSPIPS	S2164	Spectrin beta chain, brain 1
ACVR2B Activin receptor type IIB	FCRSSsMADRS	S20	BAG-family molecular chaperone regulator-2
	SFGGRsSGSPY	S355	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3
	RSRSSsVGSSS	S4386	Plectin 1
	ATEQRtSSKES	T2159	Spectrin beta chain, brain 1
	TSSKEsSPIPS	S2164	Spectrin beta chain, brain 1
	KKTKRtADSSS	T8	Chromobox protein homolog 5
	GAQSDsELPSY	S1300	BFA-resistant GEF 1
AKT1 RAC-alpha serine/threonine-protein kinase	RRRLSsLRAST	S236	40S ribosomal protein S6
	RERSRtGSESS	T419	Eukaryotic translation initiation factor 4B
	RSRSSsVGSSS	S4386	Plectin 1
	PSRTAsFSESR	S455	ATP-citrate synthase
	RSRTGsESSQT	S421	Eukaryotic translation initiation factor 4B
	RSRTPsASNDD	S305	SGTA protein
AKT2 RAC-beta serine/threonine-protein kinase	RRRLSsLRAST	S236	40S ribosomal protein S6
	PSRTAsFSESR	S455	ATP-citrate synthase
	RERSRtGSESS	T419	Eukaryotic translation initiation factor 4B
	RSRTGsESSQT	S421	Eukaryotic translation initiation factor 4B
	RSRSSsVGSSS	S4386	Plectin 1
	RSRTPsASNDD	S305	SGTA protein

ATM Serine-protein kinase ATM	ATAPQtQHVSP	T495	Elongation factor 1-delta
	EEEGIsQESSE	S99	High mobility group protein HMG-I/HMG-Y
	ASSHSsQTQGG	S407	Lamin A/C
	MYKTIsQEFLT	S365	Nexilin
	SKLPRtQPDGT	T1744	Nuclear mitotic apparatus protein 1
	TQFPPsQSEER	S126	Ran-binding protein 3
	RSQIRsRTPSA	S301	SGTA protein
	VINETsQHDD	S459	Vimentin
AURKB Serine/threonine-protein kinase 12	ASSAKtSPAKQ	T521	Dihydropyrimidinase-related protein 2
	TESRSsTPLPT	S159	Lamina-associated polypeptide 2 isoform alpha
	TESRSsTPLPT	S158	Lamina-associated polypeptide 2 isoform alpha
	GSPRRsASPER	S231	Splicing factor, arginine/serine-rich 7
BTK Tyrosine-protein kinase BTK	VCAEAyNPDEE	Y120	cAMP-dependent protein kinase type II-beta regulatory subunit
CAMK2A Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II alpha chain	WLRDPsASPGD	S288	Vinculin
CAMK2G Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II gamma	ATEQRtSSKES	T2159	Spectrin beta chain, brain 1
CAMK2G CaMK-II gamma subunit	HSRQAsTDAGT	S109	65 kDa Yes-associated protein (YAP65)
	DKSKAsLEKAG	S213	Monocarboxylate transporter
	PERQPsWDSP	S107	Reticulon-4
	KDRKksPIINE	S277	Serine/threonine-protein kinase PRP4 homolog
	RKRSYsPDGKE	S598	Matrin-3
	STRQKsPEIHR	S648	Bcl-2-associated transcription factor 1
	PARSQsSDTEQ	S496	Eukaryotic translation initiation factor 4B
CDC2 Cell division control protein 2 homolog	EDEILNRsPRNRKPR	S583	Calnexin
	GSPSPAGtPPQPKRP	T490	Junctophilin-2
	PPNPEDRsPSPEIY	S80	Splicing factor 1 (Transcription factor ZFM1)
	NPEDRSPsPEIYNS	S82	Splicing factor 1 (Transcription factor ZFM1)
CDK2 Cell division protein kinase 2	EILPTtPISEQ	T221	40S ribosomal protein S3
	VLMIRtPEELD	T634	Alpha-1 catenin
	SFGSVsPGGVK	S962	Band 4.1-like protein 3
	KRLSTsPVRLA	S762	Band 4.1-like protein 3
	KKETQsPEQVK	S496	Bcl-2-associated transcription factor 1
	HSIQHsPERSG	S268	Bcl-2-associated transcription factor 1
	STRQKsPEIHR	S648	Bcl-2-associated transcription factor 1
	EPQEEsPLKSK	S177	Bcl-2-associated transcription factor 1
	VDKVTsPTKV-	S789	Caldesmon
	EDEILNRsPRNRKPR	S583	Calnexin
	PSGPPsPNSPH	S1690	CDC42-binding protein kinase beta
	PPSPNsPHRSQ	S1693	CDC42-binding protein kinase beta
	SSAKTSPAKQQ	S522	Dihydropyrimidinase-related protein 2
	GSARGsPTRPN	S636	Dihydropyrimidinase-related protein 3
	LARLSsPVLHR	S142	Drebrin
	KPVTVsPTTPT	S510	Dynein light intermediate chain 1
	QTQHVSPMRQV	S133	Elongation factor 1-delta
	AKKPAtPAEDD	T147	Elongation factor 1-delta

	PSESPsPPAAE	S85	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit 9
	NRGGLsPANDT	S47	Glycylpeptide N-tetradecanoyltransferase 1
	DLLEDsPKRPK	S165	Hepatoma-derived growth factor (HDGF)
	MSKSEsPKEPE	S6	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1
	HTGPNsPDTAN	S104	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H
	DYDDMsPRRGP	S284	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K
	YSRAKsPQPPV	S252	Heterogenous nuclear ribonucleoprotein U
	APVEKsPAKKK	S18	Histone H1.5
	GSPSPAGtPPQPKRP	T490	Junctophilin-2
	SSTPLsPTRIT	S22	Lamin A/C
	ERLRLsPSPTS	S390	Lamin A/C
	ESRSStPLPTI	T160	Lamina-associated polypeptide 2 isoform alpha
	PDGKEsPSDKK	S604	Matrin-3
	IEKVLsPLRSP	S1396	Microtubule-associated protein 1B
	LSPLRsPPLIG	S1400	Microtubule-associated protein 1B
	PSATQsPISKK	S1163	Myb-binding protein 1A
	DGATPsPSNET	S145	Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate
	GPRLGsPSGKT	S559	Protein AHNAK
	GGVTGsPEASI	S5731	Protein AHNAK
	PGEPAsPISQR	S1757	Nuclear mitotic apparatus protein 1
	ATVTPsPVK GK	S181	Nuclear ubiquitous casein and cyclin-dependent kinases substrate
	TSRDTsPSSGS	S205	Periphilin 1
	AQKSSsPAPAD	S232	Ras-GTPase-activating protein binding protein 1
	QECPPsPEPTR	S186	Ras-related protein R-Ras2
	DSKSSsPELVT	S51	Rho-GTPase-activating protein 1
	KKAEGsPNQ GK	S583	Ribosome-binding protein 1
	IGKARsPTDDK	S257	Serine/threonine-protein kinase PRP4 homolog
	KDRKKsPIINE	S277	Serine/threonine-protein kinase PRP4 homolog
	SGSPHsPHQLS	S2032	Serine/threonine-protein kinase WNK1
	KRRPPsPEPST	S2102	Spectrin beta chain, brain 1
	SSKEsSPIPSP	S2165	Spectrin beta chain, brain 1
	SSPIPsPTSDR	S2169	Spectrin beta chain, brain 1
	PSRSSsPQPKV	S914	splicing coactivator subunit SRm300
	LKSGMsPEQSR	S1132	splicing coactivator subunit SRm300
	NQSISsPVLDA	S1404	splicing coactivator subunit SRm300
	PPNPEDRsPSPEPIY	S80	Splicing factor 1 (Transcription factor ZFM1)
	NPEDRSsPEPIYNS	S82	Splicing factor 1 (Transcription factor ZFM1)
	PIETGsPKTKE	S449	Splicing factor arginine/serine-rich 11
	KARSVsPPPKR	S316	Splicing factor, arginine/serine-rich 6
	KKRKRSPSPSP	S302	SWI/SNF complex 170 kDa subunit
	RSPSPsPTPEA	S306	SWI/SNF complex 170 kDa subunit
	AVSELsPRERS	S243	TRAP150 protein
	SAAASsPAGGG	S50	Transcription intermediary factor 1-beta
	SAPQMSPGSSD	S467	Ubiquitin associated protein 2-like

	SLYASsPGGVY	S56	Vimentin
CDK3 Cell division protein kinase 3	EDEILNRsPRNRKPR	S583	Calnexin
	GSPSPAGtPPQPKRP	T490	Junctophilin-2
	PPNPEDRsPSPEPIY	S80	Splicing factor 1 (Transcription factor ZFM1)
	NPEDRSPsPEPIYNS	S82	Splicing factor 1 (Transcription factor ZFM1)
CDK5 Cell division protein kinase 5	EDEILNRsPRNRKPR	S583	Calnexin
	GSARGsPTRPN	S636	Dihydropyrimidinase-related protein 3
	PPNPEDRsPSPEPIY	S80	Splicing factor 1 (Transcription factor ZFM1)
	NPEDRSPsPEPIYNS	S82	Splicing factor 1 (Transcription factor ZFM1)
	DLLEDsPKRPK	S165	Hepatoma-derived growth factor (HDGF)
	GSPSPAGtPPQPKRP	T490	Junctophilin-2
CK II Casein kinase II, alpha and alpha' chain	ASRVPSDEEV	S1620	182 kDa tankyrase 1-binding protein
	SRVPSsDEEVV	S1621	182 kDa tankyrase 1-binding protein
	KKEKKsLDSDE	S57	28 kDa heat- and acid-stable phosphoprotein
	KKSLDsDESED	S60	28 kDa heat- and acid-stable phosphoprotein
	LDSDEsEDEED	S63	28 kDa heat- and acid-stable phosphoprotein
	AEDSDsEPEPE	S501	5'-3' exoribonuclease 2
	AEDSDsEPEPE	S501	5'-3' exoribonuclease 2
	EAKEEsEESDE	S304	60S acidic ribosomal protein P0
	EESEEDEDMDG	S307	60S acidic ribosomal protein P0
	VEAKKEEsEESDDDM	S101	60S acidic ribosomal protein P1
	KKEESEEsDDDMGFG	S104	60S acidic ribosomal protein P1
	EKKEEsEESDD	S102	60S acidic ribosomal protein P2
	EESEEsDDDMG	S105	60S acidic ribosomal protein P2
	KRKREtDDEGE	T244	Acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32
	EEGATsDGEKK	S598	A-kinase anchor protein 12
	EELDDsDFETE	S641	Alpha-1 catenin
	PRKSSsISEEK	S208	Apoptotic chromatin condensation inducer in the nucleus
	LSVPTsDEEDE	S109	ATP-binding cassette sub-family F member 1
	LSVPTsDEEDE	S109	ATP-binding cassette sub-family F member 1
	ALDYFsDKESG	S385	Bcl-2-associated transcription factor 1
	QKFNDsEGDDT	S397	Bcl-2-associated transcription factor 1
	EDEGDsEPEAV	S1468	Bromodomain adjacent to zinc finger domain protein 1B
	KLEEKQKsDAEEDGG	S554	Calnexin precursor
	VRVGGsSVDLH	S268	Catenin delta-1
	SFHDDsDEDLL	S2484	Insulin-like growth factor II receptor
	SKATIsDEEIE	S199	Charged multivesicular body protein 2b
	DEYADsDEDQH	S444	Chromatin-specific transcription elongation factor 80 kDa subunit
	KRKSLsDSESD	S95	Chromobox protein homolog 3
	KRTADsSSSED	S11	Chromobox protein homolog 5
	RTADsSSSEDE	S12	Chromobox protein homolog 5
	TADSSsSEDEE	S13	Chromobox protein homolog 5
	ADSSsEDEEE	S14	Chromobox protein homolog 5
	NDSSDsDDESH	S437	Cytosolic phospholipase A2

	RSEDEsETEDE	S672	DNA replication licensing factor MCM3
	VEAVNsDSDSE	S1522	DNA topoisomerase 2-beta
	AVNSDsDSEFG	S1524	DNA topoisomerase 2-beta
	IDLFGsDDEEE	S106	Elongation factor 1-beta
	DDIDLFGsDNEEEDK	S162	Elongation factor 1-delta
	IDLFGsDNEEE	S162	Elongation factor 1-delta
	AKKPAtPAEDD	T147	Elongation factor 1-delta
	QPLLLsEDEED	S39	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit 8
	RERSRtGSESS	T419	Eukaryotic translation initiation factor 4B
	ARSQSsDTEQQ	S497	Eukaryotic translation initiation factor 4B
	EMYSGsDDDDD	S137	Eukaryotic translation initiation factor 5B
	GPNIesGNEDD	S214	Eukaryotic translation initiation factor 5B
	EDELEsGDQED	S951	General vesicular transport factor p115
	GAQSDsELPSY	S1300	BFA-resistant GEF 1
	KAGLEsGAEPG	S485	H/ACA ribonucleoprotein complex subunit 4
	RVHDRsEEEEEE	S99	DDB1- and CUL4-associated factor 8
	IEDVGsDEEEE	S263	Heat shock protein HSP 90-alpha
	IEDVGsDEEDD	S255	Heat shock protein HSP 90-beta
	DEEDDsGKDKK	S261	Heat shock protein HSP 90-beta
	GNAEGsSDEEG	S132	Hepatoma-derived growth factor (HDGF)
	NAEGSsDEEGK	S133	Hepatoma-derived growth factor (HDGF)
	MSKsESPKEPE	S4	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1
	MKNDKsEEEQS	S233	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1/C2
	EEEGIsQESSE	S99	High mobility group protein HMG-I/HMG-Y
	GISQEsSEEEQ	S102	High mobility group protein HMG-I/HMG-Y
	ISQEsSEEEQ-	S103	High mobility group protein HMG-I/HMG-Y
	AIPEEsGDEDE	S393	Histone deacetylase 1
	AVHEDsGDEDG	S394	Histone deacetylase 2
	ESLEDsDVDAD	S60	Importin alpha-3 subunit
	VEDERsDREET	S191	LAG1 longevity assurance homolog 2
	SDREEtESSEG	T196	LAG1 longevity assurance homolog 2
	REETEsSEGEE	S198	LAG1 longevity assurance homolog 2
	EETESsEGEEA	S199	LAG1 longevity assurance homolog 2
	VEDERsDREET	S341	LAG1 longevity assurance homolog 2
	SDREEtESSEG	T346	LAG1 longevity assurance homolog 2
	REETEsSEGEE	S348	LAG1 longevity assurance homolog 2
	EETESsEGEEA	S349	LAG1 longevity assurance homolog 2
	GPPDFsSDEER	S66	Lamina-associated polypeptide 2 isoform alpha
	PPDFSsDEERE	S67	Lamina-associated polypeptide 2 isoform alpha
	EPTVYsDEEEP	S181	Membrane associated progesterone receptor component 1
	EPSEYtDEEDT	T211	Membrane associated progesterone receptor component 2
	EVVGEsDSEVE	S116	Microfibrillar-associated protein 1
	VGESDsEVEGD	S118	Microfibrillar-associated protein 1
	ASLELsDDDTTE	S1956	Myosin-10

	GAGDGsDEEVD	S1943	Myosin-9
	KEMLAsDDEED	S80	Nexilin
	SQFQEsDDADE	S19	Nuclear ubiquitous casein and cyclin-dependent kinases substrate
	NSQEDsEDED	S58	Nuclear ubiquitous casein and cyclin-dependent kinases substrate
	PAENSsAPEAE	S314	Nuclease sensitive element binding protein 1
	KAAKNsEEEE	S563	Nucleolar phosphoprotein p130
	EELMSsDLEET	S520	Nucleolar protein Nop56
	EVEEDsEDEEM	S28	Nucleolin
	EDEEMsEDEED	S34	Nucleolin
	DEEDDsSGEEV	S41	Nucleolin
	AKKEDsDEEED	S145	Nucleolin
	AAAPAsEDEDD	S184	Nucleolin
	EEDAesEDEEE	S125	Nucleophosmin
	KTGVTSTsDSEEEGD	S273	PC4 and SFRS1 interacting protein
	GVTSTSDsEEEGDDQ	S275	PC4 and SFRS1 interacting protein
	RKVMDsDEDDDD	S119	Programmed cell death protein 5
	KYAKEsLKEED	S243	Proteasome subunit alpha type 3
	KEEEDsDDDNM	S250	Proteasome subunit alpha type 3
	RKDDDsDDESQ	S458	Protein KIAA0776
	GGGEesEGEEV	S304	purine-rich element binding protein B
	YHLPDAEsDEDEDfK	S218	Septin-2 (NEDD5 protein homolog)
	ATEQRtSSKES	T2159	Spectrin beta chain, brain 1
	RPDPDsDEDED	S155	Splicing factor 45
	DEYADsDEDQH	S444	Structure-specific recognition protein 1
	DWEDDsDEDMS	S113	Telomerase-binding protein p23
	DEEDVsEEEEAE	S247	Thioredoxin domain containing protein 1 precursor
	KDQQPsGSEGE	S86	THUMP domain containing protein 1
	QQPSGsEGEDD	S88	THUMP domain containing protein 1
	GVDEQsDSSEE	S305	Transcription initiation factor IIF alpha subunit
	DEQSDsSEESE	S307	Transcription initiation factor IIF alpha subunit
	EQSDSsEESSE	S308	Transcription initiation factor IIF alpha subunit
	DSSEEsEEKP	S311	Transcription initiation factor IIF alpha subunit
	VEDKESGEEEE	S153	Zinc finger protein 265
CLK1 Dual specificity protein kinase CLK1	RRRLSsLRAST	S236	40S ribosomal protein S6
	HSRQAsTDAGT	S109	65 kDa Yes-associated protein (YAP65)
	FCRSSsMADRS	S20	BAG-family molecular chaperone regulator-2
	FTRRAsVCAEA	S114	cAMP-dependent protein kinase type II-beta regulatory subunit
	RSRTGsESSQT	S421	Eukaryotic translation initiation factor 4B
	RRRAPsVANVG	S2152	Filamin A
	TSRDTsPSSGS	S205	Periphrin 1
	RSRSSsVGSSS	S4386	Plectin 1
	RSQIRsRTPSA	S301	SGTA protein
	PRRSAsPERMD	S233	Splicing factor, arginine/serine-rich 7
	RSPSPsPTPEA	S306	SWI/SNF complex 170 kDa subunit

CLK2 Dual specificity protein kinase CLK2	RRRLSsLRAST	S236	40S ribosomal protein S6
	HSRQAsTDAGT	S109	65 kDa Yes-associated protein (YAP65)
	FCRSSsMADRS	S20	BAG-family molecular chaperone regulator-2
	FTRRAsVCAEA	S114	cAMP-dependent protein kinase type II-beta regulatory subunit
	RSRTGsESSQT	S421	Eukaryotic translation initiation factor 4B
	RRRAPsVANVG	S2152	Filamin A
	TSRDTsPSSGS	S205	Periphrin 1
	RSRSSsVGSSS	S4386	Plectin 1
	RSQIRsRTPSA	S301	SGTA protein
	RSPSPsPTPEA	S306	SWI/SNF complex 170 kDa subunit
CSNK1A1 Casein kinase I, alpha isoform	VEAKKEEsEESDDDM	S101	60S acidic ribosomal protein P1
	KKEESEEsDDDMGFG	S104	60S acidic ribosomal protein P1
	KTGVTSTsDSEEEGD	S273	PC4 and SFRS1 interacting protein
	GVTSTSDsEEEGDDQ	S275	PC4 and SFRS1 interacting protein
	TSSKEsSPIPS	S2164	Spectrin beta chain, brain 1
CSNK1D Casein kinase I, delta isoform	VEAKKEEsEESDDDM	S101	60S acidic ribosomal protein P1
	KKEESEEsDDDMGFG	S104	60S acidic ribosomal protein P1
	KTGVTSTsDSEEEGD	S273	PC4 and SFRS1 interacting protein
	GVTSTSDsEEEGDDQ	S275	PC4 and SFRS1 interacting protein
	TSSKEsSPIPS	S2164	Spectrin beta chain, brain 1
	VEAKKEEsEESDDDM	S101	60S acidic ribosomal protein P1
	KKEESEEsDDDMGFG	S104	60S acidic ribosomal protein P1
	KTGVTSTsDSEEEGD	S273	PC4 and SFRS1 interacting protein
	GVTSTSDsEEEGDDQ	S275	PC4 and SFRS1 interacting protein
	TSSKEsSPIPS	S2164	Spectrin beta chain, brain 1
CSNK1G2 Casein kinase I, gamma 2 isoform	VEAKKEEsEESDDDM	S101	60S acidic ribosomal protein P1
	KKEESEEsDDDMGFG	S104	60S acidic ribosomal protein P1
	KTGVTSTsDSEEEGD	S273	PC4 and SFRS1 interacting protein
	GVTSTSDsEEEGDDQ	S275	PC4 and SFRS1 interacting protein
DMPK Myotonin-protein kinase	RRRLSsLRAST	S236	40S ribosomal protein S6
	EKRLStSPVRL	T761	Band 4.1-like protein 3
	FTRRAsVCAEA	S114	cAMP-dependent protein kinase type II-beta regulatory subunit
	ERLRLsPSPTS	S390	Lamin A/C
	GFRSRsSSVGS	S4384	Plectin 1
	GSPRRsASPER	S231	Splicing factor, arginine/serine-rich 7
	WLRDPsASPGD	S288	Vinculin
EPHA3 Ephrin type-A receptor 3	PSYDEyADSDE	Y441	Structure-specific recognition protein 1
EPHA4 Ephrin type-A receptor 4	PSYDEyADSDE	Y441	Structure-specific recognition protein 1
EPHA7 Ephrin type-A receptor 7	PSYDEyADSDE	Y441	Structure-specific recognition protein 1
GSK3A Glycogen synthase kinase-3 alpha	HSIQHsPERSG	S268	Bcl-2-associated transcription factor 1
	EDEILNRsPRNRKPR	S583	Calnexin
	ASSAKtSPAKQ	T521	Dihydropyrimidinase-related protein 2
	GAQSDsELPSY	S1300	BFA-resistant GEF 1
	GSPSPAGtPPQPKRP	T490	Junctophilin-2

	RSQIRsRTPSA	S301	SGTA protein
	LKSGMsPEQSR	S1132	splicing coactivator subunit SRm300
	PPNPEDRsPSPEPIY	S80	Splicing factor 1 (Transcription factor ZFM1)
	NPEDRSPsPEPIYNS	S82	Splicing factor 1 (Transcription factor ZFM1)
GSK3B Glycogen synthase kinase-3 beta	EDEILNRsPRNRKPR	S583	Calnexin
	ASSAKtSPAKQ	T521	Dihydropyrimidinase-related protein 2
	GAQSDsELPSY	S1300	BFA-resistant GEF 1
	GSPSPAGtPPQPKRP	T490	Junctophilin-2
	RSQIRsRTPSA	S301	SGTA protein
	LKSGMsPEQSR	S1132	splicing coactivator subunit SRm300
	HSIQHsPERSG	S268	Bcl-2-associated transcription factor 1
	PPNPEDRsPSPEPIY	S80	Splicing factor 1 (Transcription factor ZFM1)
	NPEDRSPsPEPIYNS	S82	Splicing factor 1 (Transcription factor ZFM1)
IGF1R Insulin-like growth factor 1 receptor	GMNPSyDEYAD	Y438	Structure-specific recognition protein 1
	EPNVSyICSRy	Y279	Glycogen synthase kinase-3 alpha
	PSYDEyADSDE	Y441	Structure-specific recognition protein 1
	PYGGGyGSGGG	Y364	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3
INSR Insulin receptor	EPNVSyICSRy	Y279	Glycogen synthase kinase-3 alpha
	PYGGGyGSGGG	Y364	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3
	GMNPSyDEYAD	Y438	Structure-specific recognition protein 1
	PSYDEyADSDE	Y441	Structure-specific recognition protein 1
ITK Tyrosine-protein kinase ITK/TSK	VCAEAyNPDEE	Y120	cAMP-dependent protein kinase type II-beta regulatory subunit
MAP2K3 Dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase 3	VCAEAyNPDEE	Y120	cAMP-dependent protein kinase type II-beta regulatory subunit
MAP2K4 Dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase 4	VCAEAyNPDEE	Y120	cAMP-dependent protein kinase type II-beta regulatory subunit
MAP2K6 Dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase 6	VCAEAyNPDEE	Y120	cAMP-dependent protein kinase type II-beta regulatory subunit
MAPK1 Mitogen-activated protein kinase 1	SAPQMSPGSSD	S467	Ubiquitin associated protein 2-like
MAPK10 c-Jun N-terminal kinase 3	KRLSTsPVRLA	S762	Band 4.1-like protein 3
	KKETQsPEQVK	S496	Bcl-2-associated transcription factor 1
	EDEILNRsPRNRKPR	S583	Calnexin
	LARLSPVLHR	S142	Drebrin
	PSESPSPAAE	S85	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit 9
	NRGGLsPANDT	S47	Glycylpeptide N-tetradecanoyltransferase 1
	MSKSEsPKEPE	S6	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1
	GSPSPAGtPPQPKRP	T490	Junctophilin-2
	ERLRLsPSPTS	S390	Lamin A/C
	PEGRAsPAPGS	S91	Mitochondrial precursor proteins import receptor
	DGATPSPNET	S145	Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate
	GPRLGsPSGKT	S559	Protein AHNAK
	GGVTGsPEASI	S5731	Protein AHNAK
	ATVTPsPVKGK	S181	Nuclear ubiquitous casein and cyclin-dependent kinases substrate
	TSRDTsPSSGS	S205	Periphilin 1
	AQKSSsPAPAD	S232	Ras-GTPase-activating protein binding protein 1
	DSKSSsPELVT	S51	Rho-GTPase-activating protein 1

	KDRKKsPIINE	S277	Serine/threonine-protein kinase PRP4 homolog
	SSKEsPIPS	S2165	Spectrin beta chain, brain 1
	PPNPEDRsPSPEPIY	S80	Splicing factor 1 (Transcription factor ZFM1)
	NPEDRSPsPEPIYNS	S82	Splicing factor 1 (Transcription factor ZFM1)
	KARsVsPPPKR	S316	Splicing factor, arginine/serine-rich 6
	PRRSAsPERMD	S233	Splicing factor, arginine/serine-rich 7
MAPK11 Mitogen-activated protein kinase p38 beta	VLMIRtPEELD	T634	Alpha-1 catenin
	SFGSVsPGGVK	S962	Band 4.1-like protein 3
	KRLSTsPVRLA	S762	Band 4.1-like protein 3
	KKETQsPEQVK	S496	Bcl-2-associated transcription factor 1
	HSIQHsPERSG	S268	Bcl-2-associated transcription factor 1
	EDEILNRsPRNRKPR	S583	Calnexin
	GSARGsPTRPN	S636	Dihydropyrimidinase-related protein 3
	LARLSsPVLHR	S142	Drebrin
	KPVTVsPTTPT	S510	Dynein light intermediate chain 1
	PSESPsPPAAE	S85	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit 9
	NRGGLsPANDT	S47	Glycylpeptide N-tetradecanoyltransferase 1
	DYDDMsPRRGP	S284	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K
	GSPSPAGtPPQPKRP	T490	Junctophilin-2
	ERLRLsPSPTS	S390	Lamin A/C
	LRLSPsPTSQR	S392	Lamin A/C
	PEGRAsPAPGS	S91	Mitochondrial precursor proteins import receptor
	PSATQsPISKK	S1163	Myb-binding protein 1A
	GPRLGsPSGKT	S559	Protein AHNAK
	GGVTGsPEASI	S5731	Protein AHNAK
	TSRDTsPSSGS	S205	Periphilin 1
	AQKSSsPAPAD	S232	Ras-GTPase-activating protein binding protein 1
	DSKSSsPELVT	S51	Rho-GTPase-activating protein 1
	KKAEGsPNQGK	S583	Ribosome-binding protein 1
	KRRPPsPEPST	S2102	Spectrin beta chain, brain 1
	SSKEsPIPS	S2165	Spectrin beta chain, brain 1
	SSPIPsPTSDR	S2169	Spectrin beta chain, brain 1
	PSRSSsPQPKV	S914	splicing coactivator subunit SRm300
	LKSGMsPEQSR	S1132	splicing coactivator subunit SRm300
	PPNPEDRsPSPEPIY	S80	Splicing factor 1 (Transcription factor ZFM1)
	NPEDRSPsPEPIYNS	S82	Splicing factor 1 (Transcription factor ZFM1)
	KARsVsPPPKR	S316	Splicing factor, arginine/serine-rich 6
	PRRSAsPERMD	S233	Splicing factor, arginine/serine-rich 7
	RSPSPsPTPEA	S306	SWI/SNF complex 170 kDa subunit
	AVSELsPRERS	S243	TRAP150 protein
	SAPQMSPGSSD	S467	Ubiquitin associated protein 2-like
MAPK12 Mitogen-activated protein kinase 12	EDEILNRsPRNRKPR	S583	Calnexin
	GSPSPAGtPPQPKRP	T490	Junctophilin-2
	PPNPEDRsPSPEPIY	S80	Splicing factor 1 (Transcription factor ZFM1)

	NPEDRSPsPEPIYNS	S82	Splicing factor 1 (Transcription factor ZFM1)
MAPK13 Mitogen-activated protein kinase p38 delta	VLMIRtPEELD	T634	Alpha-1 catenin
	SFGSVsPGGVK	S962	Band 4.1-like protein 3
	KRLSTsPVRLA	S762	Band 4.1-like protein 3
	KKETQsPEQVK	S496	Bcl-2-associated transcription factor 1
	HSIQHsPERSG	S268	Bcl-2-associated transcription factor 1
	EDEILNRsPRNRKPR	S583	Calnexin
	GSARGsPTRPN	S636	Dihydropyrimidinase-related protein 3
	LARLSsPVLHR	S142	Drebrin
	KPVTVsPTTPT	S510	Dynein light intermediate chain 1
	PSESPsPPAAE	S85	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit 9
	NRGGLsPANDT	S47	Glycylpeptide N-tetradecanoyltransferase 1
	DYDDMsPRRGP	S284	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K
	GSPSPAGtPPQPKRP	T490	Junctophilin-2
	ERLRLsPSPTS	S390	Lamin A/C
	LRLSPsPTSQR	S392	Lamin A/C
	PEGRAsPAGGS	S91	Mitochondrial precursor proteins import receptor
	PSATQsPISKK	S1163	Myb-binding protein 1A
	GPRLGsPSGKT	S559	Protein AHNAK
	GGVTGsPEASI	S5731	Protein AHNAK
	TSRDTsPSSGS	S205	Periphilin 1
	AQKSSsPAPAD	S232	Ras-GTPase-activating protein binding protein 1
	DSKSSsPELVT	S51	Rho-GTPase-activating protein 1
	KKAEGsPNQ GK	S583	Ribosome-binding protein 1
	KRRPPsPEPST	S2102	Spectrin beta chain, brain 1
	SSKEsPIPS	S2165	Spectrin beta chain, brain 1
	SSPIPsPTSDR	S2169	Spectrin beta chain, brain 1
	PSRSSsPQPKV	S914	splicing coactivator subunit SRm300
	LKSGMsPEQSR	S1132	splicing coactivator subunit SRm300
	PPNPEDRsPSPEPIY	S80	Splicing factor 1 (Transcription factor ZFM1)
	NPEDRSPsPEPIYNS	S82	Splicing factor 1 (Transcription factor ZFM1)
	KARSVsPPPKR	S316	Splicing factor, arginine/serine-rich 6
	PRRSAsPERMD	S233	Splicing factor, arginine/serine-rich 7
	RSPSPsPTPEA	S306	SWI/SNF complex 170 kDa subunit
	AVSELsPRERS	S243	TRAP150 protein
	SAPQMsPGSSD	S467	Ubiquitin associated protein 2-like
MAPK14 Mitogen-activated protein kinase p38 alpha	VLMIRtPEELD	T634	Alpha-1 catenin
	SFGSVsPGGVK	S962	Band 4.1-like protein 3
	KRLSTsPVRLA	S762	Band 4.1-like protein 3
	KKETQsPEQVK	S496	Bcl-2-associated transcription factor 1
	HSIQHsPERSG	S268	Bcl-2-associated transcription factor 1
	EDEILNRsPRNRKPR	S583	Calnexin
	KPVTVsPTTPT	S510	Dynein light intermediate chain 1
	PSESPsPPAAE	S85	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit 9

	NRGGLsPANDT	S47	Glycylpeptide N-tetradecanoyltransferase 1
	DYDDMsPRRGp	S284	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K
	GSPSPAGtPPQPKRP	T490	Junctophilin-2
	ERLRLsPSPTS	S390	Lamin A/C
	LRLSPsPTSQR	S392	Lamin A/C
	PEGRApPAPGS	S91	Mitochondrial precursor proteins import receptor
	PSATQsPISKK	S1163	Myb-binding protein 1A
	GPRLGsPSGKT	S559	Protein AHNAK
	GGVTGsPEASI	S5731	Protein AHNAK
	TSRDTsPSSGS	S205	Periphilin 1
	AQKSSpPAPAD	S232	Ras-GTPase-activating protein binding protein 1
	DSKSSsPELVT	S51	Rho-GTPase-activating protein 1
	KKAEGsPNQGK	S583	Ribosome-binding protein 1
	KRRPPsPEPST	S2102	Spectrin beta chain, brain 1
	SSKEsPIPSp	S2165	Spectrin beta chain, brain 1
	SSPIPsPTSDR	S2169	Spectrin beta chain, brain 1
	PSRSSpPQPKV	S914	splicing coactivator subunit SRm300
	LKSGMsPEQSR	S1132	splicing coactivator subunit SRm300
	PPNPEDRsPSPEPIY	S80	Splicing factor 1 (Transcription factor ZFM1)
	NPEDRSpPEPIYNS	S82	Splicing factor 1 (Transcription factor ZFM1)
	KARSVsPPPKR	S316	Splicing factor, arginine/serine-rich 6
	PRRSAsPERMD	S233	Splicing factor, arginine/serine-rich 7
	RSPSPsPTPEA	S306	SWI/SNF complex 170 kDa subunit
	AVSELsPRERS	S243	TRAP150 protein
	SAPQMSPGSSD	S467	Ubiquitin associated protein 2-like
	GSARGsPTRPN	S636	Dihydropyrimidinase-related protein 3
	LARLSpVLHR	S142	Drebrin
MAPK3 Mitogen-activated protein kinase 3	SAPQMSPGSSD	S467	Ubiquitin associated protein 2-like
MAPK7 Mitogen-activated protein kinase 7	SAPQMSPGSSD	S467	Ubiquitin associated protein 2-like
MAPK8 c-Jun N-terminal kinase 1	KRLSTsPVRLA	S762	Band 4.1-like protein 3
	KKETQsPEQVK	S496	Bcl-2-associated transcription factor 1
	EDEILNRsPRNRKPR	S583	Calnexin
	LARLSpVLHR	S142	Drebrin
	PSESPpPAAE	S85	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit 9
	NRGGLsPANDT	S47	Glycylpeptide N-tetradecanoyltransferase 1
	MSKSEsPKEPE	S6	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1
	GSPSPAGtPPQPKRP	T490	Junctophilin-2
	ERLRLsPSPTS	S390	Lamin A/C
	PEGRApPAPGS	S91	Mitochondrial precursor proteins import receptor
	DGATPpPSNET	S145	Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate
	GPRLGsPSGKT	S559	Protein AHNAK
	GGVTGsPEASI	S5731	Protein AHNAK
	ATVTPsPVKGK	S181	Nuclear ubiquitous casein and cyclin-dependent kinases substrate
	TSRDTsPSSGS	S205	Periphilin 1

	AQKSSsPAPAD	S232	Ras-GTPase-activating protein binding protein 1
	DSKSSsPELVT	S51	Rho-GTPase-activating protein 1
	KDRKKsPIINE	S277	Serine/threonine-protein kinase PRP4 homolog
	SSKEsPIPSP	S2165	Spectrin beta chain, brain 1
	PPNPEDRsPSPEPIY	S80	Splicing factor 1 (Transcription factor ZFM1)
	NPEDRSPsPEPIYNS	S82	Splicing factor 1 (Transcription factor ZFM1)
	KARSVsPPPKR	S316	Splicing factor, arginine/serine-rich 6
	PRRSAsPERMD	S233	Splicing factor, arginine/serine-rich 7
MAPK9 c-Jun N-terminal kinase 2	KRLSTsPVRLA	S762	Band 4.1-like protein 3
	KKETQsPEQVK	S496	Bcl-2-associated transcription factor 1
	EDEILNRsPRNRKPR	S583	Calnexin
	LARLSsPVLHR	S142	Drebrin
	PSESPsPPAAE	S85	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit 9
	NRGGLsPANDT	S47	Glycylpeptide N-tetradecanoyltransferase 1
	MSKESsPKEPE	S6	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1
	GSPSPAGtPPQPKRP	T490	Junctophilin-2
	ERLRLsPSPTS	S390	Lamin A/C
	PEGRAsPAPGS	S91	Mitochondrial precursor proteins import receptor
	DGATPsPSNET	S145	Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate
	GPRLGsPSGKT	S559	Protein AHNAK
	GGVTGsPEASI	S5731	Protein AHNAK
	ATVTPsPVKGK	S181	Nuclear ubiquitous casein and cyclin-dependent kinases substrate
	TSRDTsPSSGS	S205	Periphilin 1
	AQKSSsPAPAD	S232	Ras-GTPase-activating protein binding protein 1
	DSKSSsPELVT	S51	Rho-GTPase-activating protein 1
	KDRKKsPIINE	S277	Serine/threonine-protein kinase PRP4 homolog
	SSKEsPIPSP	S2165	Spectrin beta chain, brain 1
	PPNPEDRsPSPEPIY	S80	Splicing factor 1 (Transcription factor ZFM1)
	NPEDRSPsPEPIYNS	S82	Splicing factor 1 (Transcription factor ZFM1)
	KARSVsPPPKR	S316	Splicing factor, arginine/serine-rich 6
	PRRSAsPERMD	S233	Splicing factor, arginine/serine-rich 7
MOK MAPK/MAK/MRK overlapping kinase	EKRLStSPVRL	T761	Band 4.1-like protein 3
	STRQKsPEIHR	S648	Bcl-2-associated transcription factor 1
	PARSQsSDTEQ	S496	Eukaryotic translation initiation factor 4B
	ARRSAsASHQA	S99	Lamin B receptor
	RKRSYsPDGKE	S598	Matrin-3
	GPRLGsPSGKT	S559	Protein AHNAK
	KRRPPsPEPST	S2102	Spectrin beta chain, brain 1
	PRRSAsPERMD	S233	Splicing factor, arginine/serine-rich 7
	SAPQMSPGSSD	S467	Ubiquitin associated protein 2-like
MST2 Serine/threonine-protein kinase 3	ASSAKtSPAKQ	T521	Dihydropyrimidinase-related protein 2
NEK2 Serine/threonine-protein kinase Nek2	SFGGRsSGSPY	S355	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3
	GFRSRsSSVGS	S4384	Plectin 1
	APQTSsSPPPV	S695	serine/arginine repetitive matrix 1

	TSSKEsSPIPS	S2164	Spectrin beta chain, brain 1
PAK2 Serine/threonine-protein kinase PAK 2	TESRSsTPLPT	S159	Lamina-associated polypeptide 2 isoform alpha
	TESRSsTPLPT	S158	Lamina-associated polypeptide 2 isoform alpha
	RSQIRsRTPSA	S301	SGTA protein
	PSKARsVSPPP	S314	Splicing factor, arginine/serine-rich 6
	GSPRRsASPER	S231	Splicing factor, arginine/serine-rich 7
PAK3 Serine/threonine-protein kinase PAK 3	PSKARsVSPPP	S314	Splicing factor, arginine/serine-rich 6
	GSPRRsASPER	S231	Splicing factor, arginine/serine-rich 7
	TESRSsTPLPT	S159	Lamina-associated polypeptide 2 isoform alpha
	TESRSsTPLPT	S158	Lamina-associated polypeptide 2 isoform alpha
	RSQIRsRTPSA	S301	SGTA protein
PAK4 Serine/threonine-protein kinase PAK 4	FCRSSsMADRS	S20	BAG-family molecular chaperone regulator-2
	FTRRAsVCAEA	S114	cAMP-dependent protein kinase type II-beta regulatory subunit
	GTKRKsLSDSE	S93	Chromobox protein homolog 3
	TESRSsTPLPT	S159	Lamina-associated polypeptide 2 isoform alpha
	TESRSsTPLPT	S158	Lamina-associated polypeptide 2 isoform alpha
	GFRSRsSSVGS	S4384	Plectin 1
	RSRSSsVGSSS	S4386	Plectin 1
	PSKARsVSPPP	S314	Splicing factor, arginine/serine-rich 6
	GSPRRsASPER	S231	Splicing factor, arginine/serine-rich 7
PAK7 Serine/threonine-protein kinase PAK 7	FCRSSsMADRS	S20	BAG-family molecular chaperone regulator-2
	GTKRKsLSDSE	S93	Chromobox protein homolog 3
	TESRSsTPLPT	S159	Lamina-associated polypeptide 2 isoform alpha
	TESRSsTPLPT	S158	Lamina-associated polypeptide 2 isoform alpha
	GFRSRsSSVGS	S4384	Plectin 1
	RSRSSsVGSSS	S4386	Plectin 1
	PSKARsVSPPP	S314	Splicing factor, arginine/serine-rich 6
	GSPRRsASPER	S231	Splicing factor, arginine/serine-rich 7
PCTK1 Serine/threonine-protein kinase PCTAIRE-1	GSPSPAGtPPQPKRP	T490	Junctophilin-2
PFTK1 Serine/threonine-protein kinase PFTAIRE-1	GSPSPAGtPPQPKRP	T490	Junctophilin-2
Pim1 Threonine-protein kinase Pim-1	RRRLsLRAST	S236	40S ribosomal protein S6
	RERSRtGSESS	T419	Eukaryotic translation initiation factor 4B
	RRATRsGAQAS	S12	Lamin A/C
	RSRTPsASNDD	S305	SGTA protein
PIM2 Serine/threonine-protein kinase Pim-2	RRRLsLRAST	S236	40S ribosomal protein S6
	HSRQAsTDAGT	S109	65 kDa Yes-associated protein (YAP65)
	GTKRKsLSDSE	S93	Chromobox protein homolog 3
	KKTKRtADSSS	T8	Chromobox protein homolog 5
	PTRSPsDSSTA	S339	Drebrin
	RERSRtGSESS	T419	Eukaryotic translation initiation factor 4B
	RSRTGsESSQT	S421	Eukaryotic translation initiation factor 4B
	RRRAPsVANVG	S2152	Filamin A
	RRATRsGAQAS	S12	Lamin A/C
	ARRSAsASHQA	S99	Lamin B receptor

	KSRKRsYSPDG	S596	Matrin-3
	RKRSYsPDGKE	S598	Matrin-3
	KPRHRsNSFSD	S5780	Protein AHNAK
	PKRKVsSAEGA	S7	Nonhistone chromosomal protein HMG-14
	RSRSSsVGSSS	S4386	Plectin 1
	PERQP sWDSP	S107	Reticulon-4
	RSRTP sASNDD	S305	SGTA protein
	KRRPP sPEPST	S2102	Spectrin beta chain, brain 1
	KARSV sPPPKR	S316	Splicing factor, arginine/serine-rich 6
	KKRKR sPSPSP	S302	SWI/SNF complex 170 kDa subunit
	RKRSP sPSPTP	S304	SWI/SNF complex 170 kDa subunit
PKACA cAMP-dependent protein kinase, alpha-catalytic subunit	FTRRASVCAEA	S114	cAMP-dependent protein kinase type II-beta regulatory subunit
PKN1 Protein kinase N1 (Protein kinase C-like 1)	HRATAPQtQHVSPMR	T495	Elongation factor 1-delta
PKN2 Protein kinase N2 (Protein kinase C-like 2)	HRATAPQtQHVSPMR	T495	Elongation factor 1-delta
PRKAA1 5'-AMP-activated protein kinase, catalytic alpha-1 chain	VRVGGsSVDLH	S268	Catenin delta-1
PRKAA2 5'-AMP-activated protein kinase, catalytic alpha-2 chain	VRVGGsSVDLH	S268	Catenin delta-1
PRKACB cAMP-dependent protein kinase, beta-catalytic subunit	FTRRASVCAEA	S114	cAMP-dependent protein kinase type II-beta regulatory subunit
PRKCA Protein kinase C, alpha type	HRATAPQtQHVSPMR	T495	Elongation factor 1-delta
	RSQIRsRTPSA	S301	SGTA protein
	TSSKEsSPIPS	S2164	Spectrin beta chain, brain 1
PRKCB1 Protein kinase C, beta type	HRATAPQtQHVSPMR	T495	Elongation factor 1-delta
PRKCD Protein kinase C, delta type	HRATAPQtQHVSPMR	T495	Elongation factor 1-delta
	RSQIRsRTPSA	S301	SGTA protein
	TSSKEsSPIPS	S2164	Spectrin beta chain, brain 1
PRKCE Protein kinase C, epsilon type	HRATAPQtQHVSPMR	T495	Elongation factor 1-delta
PRKCG Protein kinase C, gamma type	TSSKEsSPIPS	S2164	Spectrin beta chain, brain 1
	HRATAPQtQHVSPMR	T495	Elongation factor 1-delta
	RSQIRsRTPSA	S301	SGTA protein
PRKCH Protein kinase C, eta type	HRATAPQtQHVSPMR	T495	Elongation factor 1-delta
PRKCI Protein kinase C, iota type	HRATAPQtQHVSPMR	T495	Elongation factor 1-delta
	RSQIRsRTPSA	S301	SGTA protein
	TSSKEsSPIPS	S2164	Spectrin beta chain, brain 1
PRKCQ Protein kinase C, theta type	HRATAPQtQHVSPMR	T495	Elongation factor 1-delta
	RSQIRsRTPSA	S301	SGTA protein
	TSSKEsSPIPS	S2164	Spectrin beta chain, brain 1
PRKCZ Protein kinase C, zeta type	HRATAPQtQHVSPMR	T495	Elongation factor 1-delta
	RSQIRsRTPSA	S301	SGTA protein
	TSSKEsSPIPS	S2164	Spectrin beta chain, brain 1
PRKDC DNA-dependent protein kinase catalytic subunit	RSQIRsRTPSA	S301	SGTA protein
PRKG1 cGMP-dependent protein kinase 1, beta isozyme	WLRDP sASPGD	S288	Vinculin
RPS6KA1 Ribosomal protein S6 kinase alpha 1	NPEDRSP sPEPIYNS	S82	Splicing factor 1 (Transcription factor ZFM1)
RPS6KA2 Ribosomal protein S6 kinase alpha 2	NPEDRSP sPEPIYNS	S82	Splicing factor 1 (Transcription factor ZFM1)

RPS6KA3 Ribosomal protein S6 kinase alpha 3	NPEDRSPsPEPIYNS	S82	Splicing factor 1 (Transcription factor ZFM1)
RPS6KA4 Ribosomal protein S6 kinase alpha 4	NPEDRSPsPEPIYNS	S82	Splicing factor 1 (Transcription factor ZFM1)
RPS6KA5 Ribosomal protein S6 kinase alpha 5	NPEDRSPsPEPIYNS	S82	Splicing factor 1 (Transcription factor ZFM1)
RPS6KB1 Ribosomal protein S6 kinase 1	NPEDRSPsPEPIYNS	S82	Splicing factor 1 (Transcription factor ZFM1)
	RRRLSsLRAST	S236	40S ribosomal protein S6
	TRRTRtFSATV	T50	Calcium-regulated heat stable protein 1
	RERSRtGSESS	T419	Eukaryotic translation initiation factor 4B
	RSRTGsESSQT	S421	Eukaryotic translation initiation factor 4B
	KSRKRsySPDG	S596	Matrin-3
	RKRsySPDGKE	S598	Matrin-3
	KPRHRsNSFSD	S5780	Protein AHNAK
	GFRSRsSSVGS	S4384	Plectin 1
	RSRSSsVGSSS	S4386	Plectin 1
	RYHGHsMSDPG	S293	Pyruvate dehydrogenase E1 component alpha subunit
	RSRTPsASND	S305	SGTA protein
	KKRKRsyPSPSP	S302	SWI/SNF complex 170 kDa subunit
	RKRSPsPSTP	S304	SWI/SNF complex 170 kDa subunit
RPS6KB2 Ribosomal protein S6 kinase 2	NPEDRSPsPEPIYNS	S82	Splicing factor 1 (Transcription factor ZFM1)
SGK Serine/threonine-protein kinase Sgk1	HGHSMsDPGVS	S295	Pyruvate dehydrogenase E1 component alpha subunit
STK24 Serine/threonine-protein kinase 24	ASSAKtSPAKQ	T521	Dihydropyrimidinase-related protein 2
STK6 Serine/threonine-protein kinase 6	APQTSSPPPV	S695	serine/arginine repetitive matrix 1
	RSQIRsRTPSA	S301	SGTA protein
	TSSKEsSPIPS	S2164	Spectrin beta chain, brain 1
	GSPRRsASPER	S231	Splicing factor, arginine/serine-rich 7
TEC Tyrosine-protein kinase Tec	VCAEAyNPDEE	Y120	cAMP-dependent protein kinase type II-beta regulatory subunit
TGFB2 TGF-beta receptor type II	FCRSSsMADRS	S20	BAG-family molecular chaperone regulator-2
	KKTKRtADSSS	T8	Chromobox protein homolog 5
	PARSQsSDTEQ	S496	Eukaryotic translation initiation factor 4B
	GAQSDsELPSY	S1300	BFA-resistant GEF 1
	SFGGRsSGSPY	S355	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3
	RSRSSsVGSSS	S4386	Plectin 1
	ATEQRtSSKES	T2159	Spectrin beta chain, brain 1
	TSSKEsSPIPS	S2164	Spectrin beta chain, brain 1
	SSDNQsSSPQP	S475	Ubiquitin associated protein 2-like
	WLRDPsASPGD	S288	Vinculin

Para investigar quais quinases estariam envolvidas na fosforilação dos peptídeos encontrados e quantificados nos experimentos, uma análise no banco de dados Networkin, que consiste de uma compilação de dados que evidenciam a fosforilação de tais sítios na literatura, e em outros sites relacionados (Phosphosite - <http://www.phosphosite.org> e phosphoELM - <http://phospho.elm.eu.org/>) foi feita. Cada sítio de fosforilação identificado foi verificado manualmente para cada quinase, sendo que um dado motivo de fosforilação pode envolver a atividade de mais um tipo de quinase.

4.9.6. Análise proteômica das proteínas diferencialmente abundantes e classificação ontológica destas ao longo do tratamento de células mMSCs com rhBMP2

A análise dos peptídeos regulares, que representam a parte proteômica dos dados obtidos, foi realizada comparando-se as abundâncias relativas de cada proteína em replicatas biológicas distintas. Uma determinada proteína foi dada como tendo abundância relativa positiva ou negativa se em pelo menos duas das três replicatas, for observado o evento, enquanto que dados divergentes nas replicatas distintas foram ignorados. Estas proteínas que, consistentemente apresentaram diferenças na expressão relativa foram selecionadas para mapeamento e anotação para ontologia gênica através do programa Blast2go (<http://www.blast2go.cpinfo.es>), em que foi realizada a análise dos processos biológicos para as proteínas com maior abundância relativa. A Figura 29 mostra os processos biológicos, distribuídos pela relação temporal de indução com rhBMP2. Em cada um dos grupos estão representados os processos biológicos com maior *score*. Processos biológicos contendo menos que duas proteínas foram descartados.

10 min/0h

Termo GO	Nº proteínas	Score
signaling	14	4,21
cellular response to stimulus	19	5,67
anatomical structure morphogenesis	13	4,21
cell differentiation	18	5,95
regulation of signaling	6	1,08
cell morphogenesis involved in differentiation	7	2,06
organ development	21	8
regulation of cell differentiation	6	1,12
signal transduction	11	5,73
transmembrane receptor protein tyrosine kinase signaling pathway	2	0,96

30min/10 min

Termo GO	Nº proteínas	Score
signaling	31	8,92
anatomical structure development	22	9,48
multicellular organismal development	8	2,39
cell differentiation	6	2,48
cell surface receptor linked signaling pathway	3	2,6
regulation of signaling	3	2,6
cell morphogenesis involved in differentiation	30	5,77
G-protein coupled receptor protein signaling pathway	4	3,2
signal transduction	8	2,14
epithelial cell differentiation	13	6,01
phosphorylation	14	4,67
transmembrane receptor protein tyrosine kinase signaling pathway	4	2,56

1h/30min

Termo GO	Nº proteínas	Score
signaling	40	13,3
multicellular organismal development	48	12,78
anatomical structure development	46	13,06
cell-cell signaling	9	2,96
cell activation	7	3,18
system development	40	10,12
cell differentiation	33	15,09
cytoskeleton organization	26	9,55
regulation of signaling	20	6,75
cell surface receptor linked signaling pathway	18	7,95
signal transduction	37	18,99
organ development	26	11,08
cell morphogenesis involved in differentiation	13	3,15
enzyme linked receptor protein signaling pathway	9	3,8
intracellular protein kinase cascade	7	3,34
G-protein coupled receptor protein signaling pathway	6	4,77
small GTPase mediated signal transduction	5	2,01
second-messenger mediated signaling	3	1,22
Wnt receptor signaling pathway	3	1,08
integrin-mediated signaling pathway	2	2
phosphorylation	17	8,1
positive regulation of signal transduction	9	5,2
transmembrane receptor protein tyrosine kinase signaling pathway	9	6,33
MAPKKK cascade	5	4
negative regulation of cell proliferation	5	4,6
positive regulation of intracellular protein kinase cascade	5	3
negative regulation of cell cycle	4	1,84
post-translational protein modification	4	4
Ras protein signal transduction	4	1,68
regulation of Wnt receptor signaling pathway	3	1,56
Rho protein signal transduction	4	2,8
regulation of Ras protein signal transduction	3	1,8
insulin-like growth factor receptor signaling pathway	2	2
regulation of Rho protein signal transduction	3	3

2h/1h

Termo GO	Nº proteínas	Score
developmental process	47	15
signaling	17	4,13
anatomical structure development	41	12,3
multicellular organismal development	43	8,57
cell differentiation	20	9,36
cell surface receptor linked signaling pathway	9	3,63
embryo development	7	3,14
system development	36	8,95
cell development	15	5,97
cell morphogenesis involved in differentiation	9	2,47
organ development	26	10,7
regulation of signal transduction	6	2,1
signal transduction	17	6,54
epithelial cell differentiation	2	2
regulation of gene expression	14	4,99
transmembrane receptor protein tyrosine kinase signaling pathway	5	2,92
DNA damage response, signal transduction by p53 class mediator resulting in cell cycle arrest	3	3
positive regulation of H-ras/RAF-1/MEK1 cascade	2	2
negative regulation of ubiquitin-protein ligase activity involved in mitotic cell cycle	4	4
positive regulation of ubiquitin-protein ligase activity involved in mitotic cell cycle	4	4
regulation of ubiquitin-protein ligase activity involved in mitotic cell cycle	4	4,8

Figura 29. Classificação ontológica dos processos biológicos a partir das proteínas encontradas na análise proteômica. A análise proteômica foi realizada comparando-se as abundâncias relativas de cada proteína em replicatas biológicas distintas, conforme realizado na análise das fosfoproteínas. Em seguida, as proteínas que consistentemente apresentaram alteração quanto à abundância foram selecionadas para mapeamento e anotação da ontologia gênica no software Blast2go.

4.9.7. Redes de interações de proteínas

A lista de proteínas encontradas nos experimentos de fosfoproteômica foi inserida no software Ingenuity para análise de interações entre proteínas intracelulares. A Figura 30 mostra graficamente as interações possíveis entre as proteínas e a Tabela 6 mostra a lista completa de proteínas organizadas por compartimento celular.

Figura 30. Rede de interações entre proteínas obtida a partir dos dados obtidos nos experimentos de fosfoproteômica. O software Ingenuity foi utilizado para identificar as proteínas que poderiam interagir com as proteínas encontradas na análise fosfoproteômica presentes nos diferentes períodos de indução de células msMSC's com rhBMP2. As setas pontilhadas representam as interações não comprovadas experimentalmente, mas com validação *in silico*, enquanto que as setas inteiras representam interações com evidências experimentais na literatura. As proteínas estão separadas por compartimento celular. Proteínas tendo função de fatores de transcrição foram selecionadas para busca de genes-alvo relacionados com a osteogênese.

Tabela 6. Lista das proteínas encontradas na rede que apresentaram interação com os dados da análise fosfoproteômica, obtida através do software Ingenuity..

<i>Símbolo do Gene</i>	<i>Nome da Proteína</i>	<i>Localização</i>
ACLY	ATP Citrate Lyase	Citoplasma
ACSL1	Acyl-CoA Synthetase Long-Chain Family Member 1	Citoplasma
AKAP12	A Kinase (PRKA) Anchor Protein 12	Citoplasma
BCL2	B-Cell CLL/Lymphoma 2	Citoplasma
BMF	Bcl2 Modifying Factor	Citoplasma
Bnip3	BCL2/Adenovirus E1B Interacting Protein 3	Citoplasma
BNIP3L	BCL2/Adenovirus E1B 19kda Interacting Protein 3-Like	Citoplasma
CANX	Calnexin	Citoplasma
CASP4	Caspase 4, Apoptosis-Related Cysteine Peptidase	Citoplasma
Ces2b/Ces2c	Carboxylesterase 2C	Citoplasma
CIDEC	Cell Death-Inducing DFFA-Like Effector C	Citoplasma
CRAT	Carnitine O-Acetyltransferase	Citoplasma
CYP24A1	Cytochrome P450, Family 24, Subfamily A, Polypeptide 1	Citoplasma
CYP51A1	Cytochrome P450, Family 51, Subfamily A, Polypeptide 1	Citoplasma
CYP7B1	Cytochrome P450, Family 7, Subfamily B, Polypeptide 1	Citoplasma
DVL2	Dishevelled, Dsh Homolog 2 (Drosophila)	Citoplasma
DVL3	Dishevelled, Dsh Homolog 3 (Drosophila)	Citoplasma
FHL1	Four And A Half LIM Domains 1	Citoplasma
GPX2	Glutathione Peroxidase 2 (Gastrointestinal)	Citoplasma
GSTA5	Glutathione S-Transferase Alpha 5	Citoplasma
HSP90AB1	Heat Shock Protein 90kda Alpha (Cytosolic), Class B Member 1	Citoplasma
IQGAP1	IQ Motif Containing Gtpase Activating Protein 1	Citoplasma
LIMA1	LIM Domain And Actin Binding 1	Citoplasma
MAP1B	Microtubule-Associated Protein 1B	Citoplasma
MAP4	Microtubule-Associated Protein 4	Citoplasma
MARCKSL1	MARCKS-Like 1	Citoplasma
MYH9	Myosin, Heavy Chain 9, Non-Muscle	Citoplasma
NEDD4	Neural Precursor Cell Expressed, Developmentally Down-Regulated 4	Citoplasma
NMT1	N-Myristoyltransferase 1	Citoplasma
PALLD	Palladin, Cytoskeletal Associated Protein	Citoplasma
PIK3R3	Phosphoinositide-3-Kinase, Regulatory Subunit 3 (Gamma)	Citoplasma
PLA2G4A	Phospholipase A2, Group IVA (Cytosolic, Calcium-Dependent)	Citoplasma
PLEC	Plectin	Citoplasma

<i>Símbolo do Gene</i>	<i>Nome da Proteína</i>	<i>Localização</i>
PLS3	Plastin 3	Citoplasma
PPP2CA	Protein Phosphatase 2, Catalytic Subunit, Alpha Isozyme	Citoplasma
PPP2R2B	Protein Phosphatase 2, Regulatory Subunit B, Beta	Citoplasma
RPLP0	Ribosomal Protein, Large, P0	Citoplasma
RPLP2	Ribosomal Protein, Large, P2	Citoplasma
SH3KBP1	SH3-Domain Kinase Binding Protein 1	Citoplasma
TNFAIP8	Tumor Necrosis Factor, Alpha-Induced Protein 8	Citoplasma
TSPO	Translocator Protein (18kda)	Citoplasma
VIM	Vimentin	Citoplasma
AFP	Alpha-Fetoprotein	Espaço Extracelular
CLCF1	Cardiotrophin-Like Cytokine Factor 1	Espaço Extracelular
LGALS3	Lectin, Galactoside-Binding, Soluble, 3	Espaço Extracelular
LGALS8	Lectin, Galactoside-Binding, Soluble, 8	Espaço Extracelular
RELN	Reelin	Espaço Extracelular
SERPINA1	Serpin Peptidase Inhibitor, Clade A Member 1	Espaço Extracelular
TNC	Tenascin C	Espaço Extracelular
TNFSF14	Tumor Necrosis Factor (Ligand) Superfamily, Member 14	Espaço Extracelular
WNT4	Wingless-Type MMTV Integratção Site Family, Member 4	Espaço Extracelular
WNT5A	Wingless-Type MMTV Integratção Site Family, Member 5A	Espaço Extracelular
AHNAK	AHNAK Nucleoprotein	Núcleo
Ap1	Transcription factor AP-1	Núcleo
BARD1	BRCA1 Associated RING Domain 1	Núcleo
BIN1	Bridging Integrator 1	Núcleo
BMI1	BMI1 Polycomb Ring Finger Oncogene	Núcleo
CBX3	Chromobox Homolog 3	Núcleo
CBX4	Chromobox Homolog 4	Núcleo
CCND1	Cyclin D1	Núcleo
CDC6	Cell Division Cycle 6 Homolog (S. Cerevisiae)	Núcleo
CDC47L	Cell Division Cycle Associated 7-Like	Núcleo
CTNNB1	Catenin (Cadherin-Associated Protein), Beta 1, 88kda	Núcleo
DNMT1	DNA (Cytosine-5-)-Methyltransferase 1	Núcleo
DUSP16	Dual Specificity Phosphatase 16	Núcleo
E2F4	E2F Transcription Factor 4, P107/P130-Binding	Núcleo
ECT2	Epithelial Cell Transforming Sequence 2 Oncogene	Núcleo
HIC1	Hypermethylated In Cancer 1	Núcleo
Histone h3	Histone H3	Núcleo
HMGA1	High Mobility Group AT-Hook 1	Núcleo
HMGA2	High Mobility Group AT-Hook 2	Núcleo
HNF4A	Hepatocyte Nuclear Factor 4, Alpha	Núcleo
HNRNPK	Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein K	Núcleo
ID3	Inhibitor Of DNA Binding 3, Dominant Negative Helix-Loop-Helix Protein	Núcleo
KDM5B	Lysine (K)-Specific Demethylase 5B	Núcleo
KPNA3	Karyopherin Alpha 3 (Importin Alpha 4)	Núcleo
LMNA	Lamin A/C	Núcleo
MAD2L1	MAD2 Mitotic Arrest Deficient-Like 1 (Yeast)	Núcleo
MAZ	MYC-Associated Zinc Finger Protein (Purine-Binding Transcription Factor)	Núcleo
MCM2	Minichromosome Maintenance Complex Component 2	Núcleo
MCM3	Minichromosome Maintenance Complex Component 3	Núcleo
MCM5	Minichromosome Maintenance Complex Component 5	Núcleo
MTA1	Metastasis Associated 1	Núcleo
MYC	V-Myc Myelocytomatosis Viral Oncogene Homolog (Avian)	Núcleo
NAA10	N(Alpha)-Acetyltransferase 10, Nucleolar Catalytic Subunit	Núcleo
Ncl	Nucleolin	Núcleo
NDC80	NDC80 Homolog, Kinetochore Complex Component (S. Cerevisiae)	Núcleo
NFATC1	Nuclear Factor Of Activated T-Cells, Cytoplasmic, Calcineurin-Dependent 1	Núcleo
NFKB1	Nuclear Factor Of Kappa Light Polypeptide Gene Enhancer In B-Cells 1	Núcleo
NOLC1	Nucleolar And Coiled-Body Phosphoprotein 1	Núcleo
NR1I3	Nuclear Receptor Subfamily 1, Group I, Member 3	Núcleo
NR3C1	Nuclear Receptor Subfamily 3, Group C, Member 1 (Glucocorticoid Receptor)	Núcleo
PPP1R13L	Protein Phosphatase 1, Regulatory (Inhibitor) Subunit 13 Like	Núcleo
PRMT1	Protein Arginine Methyltransferase 1	Núcleo
PSIP1	PC4 And SFRS1 Interacting Protein 1	Núcleo
PTBP1	Polypyrimidine Tract Binding Protein 1	Núcleo
SIAH2	Seven In Absentia Homolog 2 (Drosophila)	Núcleo
SMAD3	SMAD Family Member 3	Núcleo
SMN1/SMN2	Survival Of Motor Neuron 1, Telomeric	Núcleo
SOX4	SRY (Sex Determining Region Y)-Box 4	Núcleo
SP1	Sp1 Transcription Factor	Núcleo
SREBF1	Sterol Regulatory Element Binding Transcription Factor 1	Núcleo
TCOF1	Treacher Collins-Franceschetti Syndrome 1	Núcleo
TFDP1	Transcription Factor Dp-1	Núcleo
TGFB11	Transforming Growth Factor Beta 1 Induced Transcript 1	Núcleo
TLE1	Transducin-Like Enhancer Of Split 1 (E(Sp1) Homolog, Drosophila)	Núcleo

<i>Símbolo do Gene</i>	<i>Nome da Proteína</i>	<i>Localização</i>
TMPO	Thymopoietin	Núcleo
TOP2A	Topoisomerase (DNA) II Alpha 170kda	Núcleo
TP53BP2	Tumor Protein P53 Binding Protein, 2	Núcleo
YAP1	Yes-Associated Protein 1	Núcleo
ACVR2A	Activin A Receptor, Type IIA	Membrana Plasmática
AGTR1	Angiotensin II Receptor, Type 1	Membrana Plasmática
AMIGO2	Adhesion Molecule With Ig-Like Domain 2	Membrana Plasmática
Ap2 alpha	Transcription factor AP-2-alpha	Membrana Plasmática
Cadherin	Cadherin	Membrana Plasmática
Cald1	Caldesmon 1	Membrana Plasmática
CFTR	ATP-Binding Cassette Sub-Family C, Member 7	Membrana Plasmática
CLNS1A	Chloride Channel, Nucleotide-Sensitive, 1A	Membrana Plasmática
DAB2	Disabled Homolog 2, Mitogen-Responsive Phosphoprotein (Drosophila)	Membrana Plasmática
DAG1	Dystroglycan 1 (Dystrophin-Associated Glycoprotein 1)	Membrana Plasmática
EPB41L1	Erythrocyte Membrane Protein Band 4.1-Like 1	Membrana Plasmática
EZR	Ezrin	Membrana Plasmática
F2R	Coagulation Factor II (Thrombin) Receptor	Membrana Plasmática
HMMR	Hyaluronan-Mediated Motility Receptor (RHAMM)	Membrana Plasmática
IL15RA	Interleukin 15 Receptor, Alpha	Membrana Plasmática
IL2RG	Interleukin 2 Receptor, Gamma	Membrana Plasmática
IL7R	Interleukin 7 Receptor	Membrana Plasmática
ITGA2	Integrin, Alpha 2 (CD49B, Alpha 2 Subunit Of VLA-2 Receptor)	Membrana Plasmática
JAM2	Junctional Adhesion Molecule 2	Membrana Plasmática
LRP2	Low Density Lipoprotein Receptor-Related Protein 2	Membrana Plasmática
MARCKS	Myristoylated Alanine-Rich Protein Kinase C Substrate	Membrana Plasmática
PMP22	Peripheral Myelin Protein 22	Membrana Plasmática
PTH1R	Parathyroid Hormone 1 Receptor	Membrana Plasmática
SCNN1A	Sodium Channel, Nonvoltage-Gated 1 Alpha	Membrana Plasmática
SFRP1	Secreted Frizzled-Related Protein 1	Membrana Plasmática
SLC9A3R1	Solute Carrier Family 9 (Sodium/Hydrogen Exchanger), Member 3 Regulator 1	Membrana Plasmática
SLC9A3R2	Solute Carrier Family 9 (Sodium/Hydrogen Exchanger), Member 3 Regulator 2	Membrana Plasmática
let-7	Microrna Let-7b	Unknown
Thymidine Kinase	Thymidine Kinase	Unknown

A tabela representa a Figura 33 em formato de dados. As proteínas foram agrupadas por compartimento celular e os símbolos dos genes são os mesmos representados na Figura 30.

4.9.8. Busca de genes-alvo relacionados à osteogênese a partir dos Fatores de Transcrição selecionados

A partir da lista de proteínas encontradas no software Ingenuity, aqueles que apresentaram função de fatores de transcrição foram agrupadas, como mostra a Tabela 7. Utilizando-se um banco de dados que contém informações sobre genes-alvo de determinados fatores de transcrição, denominado TRED (<http://rulai.cshl.edu/cgi-bin/TRED/>) e metanálise, foram encontrados três fatores de transcrição relacionados com a osteogênese (c-myc, NK-kB, e SP1), para posterior validação por PCR Quantitativo em Tempo Real. O motivo de ligação destes fatores de transcrição foram verificados no banco de dados curados não redundantes, denominado JASPAR (<http://jaspar.genereg.net/>), e usados como *template* para busca destes motivos de ligação nos genes alvos, através do *ENSEMBL cisRED database*. Aqueles que possuíam pelo menos um dos motivos de ligação possíveis foram selecionados para análise através de PCR quantitativo em Tempo Real (qRT-PCR).

Tabela 7. Lista de fatores de transcrição resultantes da análise de redes de interação de proteínas com os dados obtidos na análise fosfoproteômica.

Gene	Descrição
BARD1	BRCA1 associated RING domain 1
BMI1	BMI1 polycomb ring finger oncogene
CBX3	chromobox homolog 3
CTNNB1	catenin (cadherin-associated protein), beta 1, 88kDa
HIC1	hypermethylated in cancer 1
HMGAI1	high mobility group AT-hook 1
HNF4A	hepatocyte nuclear factor 4, alpha
ID3	inhibitor of DNA binding 3, dominant negative helix-loop-helix protein
KDM5B	lysine (K)-specific demethylase 5B
MAZ	MYC-associated zinc finger protein (purine-binding transcription factor)
MTA1	metastasis associated 1
MYC	v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)
NFATC1	nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent 1
NFKB1	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1
PPP1R13L	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 13 like
SIAH2	seven in absentia homolog 2 (Drosophila)
SMAD3	SMAD family member 3
SOX4	SRY (sex determining region Y)-box 4
SP1	Sp1 transcription factor
SREBF1	sterol regulatory element binding transcription factor 1
TFDP1	transcription factor Dp-1
TGFB1I1	transforming growth factor beta 1 induced transcript 1
TLE1	transducin-like enhancer of split 1 (E(sp1) homolog, Drosophila)
YAP1	Yes-associated protein 1
CBX4	chromobox homolog 4
E2F4	E2F transcription factor 4, p107/p130-binding

Gene	Sequência de ligação do fator de transcrição ao promotor
Osterix	*AGTGCGCACGTGG
RunX2	**CGTACGCCGAGGC
	**CTCTGGTCCCCC
	**GGGTTTCATTTTC
Dlx5	**CCTTTTATTACGA
	**TCTGGGCTGCGACT
Tgfb1	**CGGCCCCGCCCGG
	*CCCAGTAGTGGGCG
Smad2	*CGCCGAGCTGCTC
Tfip1	*TGGCTCTCGCGATG
Twist1	*CCCCAGAGTTCCG
Sox9	**AAGGAGGGGTGGG
Col4a1	**AACGCAAGAGAAA
Col1a	*CACGCGAGTGAG
Col2a	**GCCCAAACCGCGGG

*myc; **sp1

O software Ingenuity foi utilizado para identificar as proteínas que poderiam interagir com aquelas encontradas na análise fosfoproteômica obtidas nos diferentes tempo de indução das células msMSC's com rhBMP2. Os fatores de transcrição foram selecionados e, separadamente, realizou-se a busca por genes-alvo daqueles que estivessem relacionados com a osteogênese. Os motivos de ligação dos fatores de transcrição foram analisados e confirmados nos genes-alvo.

4.10. Confirmação da expressão diferencial dos genes ativados em células msMSCs analisada através de qRT-PCR

4.10.1. Análise da expressão diferencial dos genes relacionados com a osteogênese durante a indução com rhBMP2 em mMSCs

Os resultados dos ensaios de qPCR estão representados na forma de expressão gênica relativa, calculada conforme descrito em Materiais e Métodos, sendo que a amostra tomada como referência corresponde às células msMSC's não-tratadas. Os dados de qRT-PCR foram normalizados através do algoritmo denominado geNorm (ETSCHMANN *et al.*, 2006). Para as análises realizadas, foram utilizados três genes *housekeeping* : mGAPDH, mHPRT, e mHMBS, que foram ensaiados nas mesmas amostras de cDNA para as quais foi medida a expressão dos transcritos de interesse. Para cada amostra, foi obtido um fator, o qual foi utilizado para a normalização dos dados. Treze genes relacionados com os processos de osteogênese foram selecionados para avaliação da expressão ao longo dos períodos de tempo de indução com rhBMP2, nos mesmos períodos de indução realizados nos experimentos de proteômica (0h, 10min, 30min, 1h e 2h). Dez genes foram regulados positivamente (TGF-beta receptor, TGF-beta induced protein, Collagen 1 e Collagen 4a1, Sox9, Smad2, Twist, e os genes controle da osteogênese RunX2, Osx e Dlx5), como pode ser visto nas Figuras 31 e 32. *TGF-Beta* (TGFB1) e *TGF-beta receptor* (TGFB2) apresentaram os motivos de regulação pelos fatores de transcrição na região do promotora analisada. Os níveis relativos de mRNA destes dois genes foram aumentados mais de duas vezes após 30 minutos da indução com rhBMP2, decrescendo aos níveis basais após 2h (Figura 31A, 3,2 vezes, $p < 0,001$). Para TGFB2, houve aumento dos níveis de mRNA da ordem de

3,6 vezes em uma hora e mais de 4,9 vezes no período de 2h de indução (Figura 31B, $p<0,001$).

Uma vez que a síntese de componentes da matriz extracelular, como colágenos está intimamente relacionada com a osteogênese, selecionamos dois membros desta família de proteínas para a verificação dos níveis de mRNA, ou seja: colágenos tipo 1 (COL1) e 4A (COL4A). Ambos componentes da matriz extracelular tiveram os níveis de mRNA aumentados somente no período correspondente à uma hora após a indução com rhBMP2 (COL1 - Figura 31C, 8,6 vezes, $p<0,001$). Este aumento foi incremental para COL1 (Figura 31D, 5.96 vezes em 1h e 10,8 vezes em 2h, $p<0,05$ and $p<0,001$, respectivamente).

Por outro lado, o gene Twist apresentou um padrão de diminuição dos níveis de mRNA (0,39 vezes após dez minutos de indução) em relação aos níveis basais do controle. Após este período, um aumento pequeno de 1,6 vezes no período de 1h hora de indução foi observado, ocorrendo uma diminuição para 1,2 vezes os níveis basais (Figura 31E, $p<0,05$).

SMAD2, um componente da via de sinalização SMAD, apresentou níveis de mRNA ligeiramente aumentados quando comparado ao controle, em torno de 3,4 vezes em dez minutos de, aumentando para mais de 7,5 vezes na segunda hora de indução (Figura 31F, $p<0,001$).

Analizamos também quatro fatores de transcrição, que além de apresentarem os motivos de ligação de fatores de transcrição na região promotora, são elementos-chave durante o comprometimento das células osteoprogenitoras. Os níveis relativos de mRNA do gene RunX2 (RUNX2) foram os primeiros que tiveram aumento dos níveis de mRNA, em torno de 400 vezes após 30 minutos, com

drástica diminuição dos níveis de mRNA nos períodos de indução subsequentes (Figura 32A, $p<0,001$). Um outro fator, Dlx5 (DLX5), apresenta um aumento progressivo em dez minutos de indução (14,4 vezes, $p<0,05$) e em 30 minutos (72,9 vezes, $p<0,001$), com um aumento máximo dos níveis de mRNA após uma hora de indução (135,2 vezes, $p<0,001$), seguido por um decréscimo aos níveis basais em duas horas de indução (Figura 32B, $p<0,001$). Osterix (OSX) por sua vez, apresentou um aumento incremental, iniciado em dez minutos de indução, chegando a valores de indução de 10 vezes nas 2h posteriores ao início do tratamento (Figura 32C, $p<0,001$). De maneira similar, Sox9 (SOX9) teve os níveis de mRNA aumentados aos 30 minutos (6,4 vezes, $p<0,05$) e em 1h (15,2 vezes, $p<0,001$) (Figura 32D).

Figura 31. Variação dos níveis de mRNA medidos nos de genes relacionados com a osteogênese avaliados através de experimentos de qRT-PCR (1). Os dados de PCR Quantitativo em Tempo Real dos genes *Tgfβ*, *Tgfβr1*, *Col1*, *Col4A*, *Twist*, e *Smad2*, relacionados à osteodiferenciação em células msMSC's induzidas com rhBMP2. Os dados dos níveis de mRNA foram normalizados e comparados aos genes controle, os quais não apresentam variação da expressão frente ao tratamento com rhBMP2, mHPRT (hypoxanthine phosphoribosyltransferase), mGAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate synthase) e HMBS (hydroxymethylbilane synthase). Foram realizados três experimentos independentes para cada amostra, e os dados foram normalizados através do software Genorm. Os asteriscos referem-se à significância estatística (Two-Way ANOVA, teste Bonferroni) entre o controle e o as células C2C12 tratadas com 200ng/ml de rhBMP2 ou rhBMP7 (* $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$). ns: não significativo.

Figura 32. Variação dos níveis de mRNA medidos nos de genes relacionados com a osteogênese avaliados através de experimentos de qRT-PCR (2). Os dados de PCR Quantitativo em Tempo Real dos genes Runx2, Dlx5, Osx e Sox9, relacionados à osteodiferenciação em células msMSC's induzidas com rhBMP2. Os dados dos níveis de mRNA foram normalizados e comparados aos genes controle, os quais não apresentam variação da expressão frente ao tratamento com rhBMP2, mHPRT (hypoxanthine phosphoribosyltransferase), mGAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate synthase) e HMBS (hydroxymethylbilane synthase). Foram realizados três experimentos independentes para cada amostra, e os dados normalizados através do software Genorm. Os asteriscos referem-se à significância estatística (Two-Way ANOVA, teste Bonferroni) entre o controle e o as células C2C12 tratadas com 200ng/ml de rhBMP2 ou rhBMP7 (* $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$). ns: não significativo.

5. DISCUSSÃO

A homeostase do tecido ósseo é mantida pelo balanço entre as atividades de reabsorção e formação óssea. A regulação da formação de tecido ósseo se dá principalmente, pela atividade das células formadoras de osteoblastos, portanto, quando esta capacidade de formação óssea está comprometida, o paciente é acometido de patologias, como a osteoporose. Desta maneira, o entendimento do processo de formação óssea em suas bases moleculares se faz necessário para que novas estratégias no combate destas patologias possam ser desenvolvidas e implementadas na clínica médica. Diversos sinais podem iniciar o processo diferenciativo osteoblástico no local da lesão, entre os quais encontram-se as BMPs que tem papel essencial neste processo. No presente trabalho, investigamos os substratos intracelulares modificados pela indução de células-tronco mesenquimais com rhBMP2, e que estão envolvidos direta ou indiretamente com o comprometimento das células para a diferenciação osteoblástica. Para tanto, utilizamos as tecnologias de proteômica *shotgun* e fosfoenriquecimento de amostras peptídicas do extrato total de células msMSCs induzidas à osteogênese através do tratamento com rhBMP2. Em paralelo, realizamos a clonagem molecular de dois tipos diferentes de BMP humanas, a BMP2 e a BMP4, além de estabelecer um protocolo de purificação de rhBMP7 por cromatografia de afinidade à heparina, a partir do meio condicionado de cultura de células 293T contendo o vetor pCMV-rhBMP7-IRES-GFP, as quais foram originadas durante o Doutorado do Dr. Juan Carlos Bustos-Valenzuela.

5.1. Expressão de rhBMP2 e rhBMP4

Visando sua utilização em protocolos de pesquisa, conseguimos expressar duas proteínas recombinantes da família das BMPs relacionadas com a diferenciação óssea em células HEK293 e 293T: rhBMP2 e rhBMP4, respectivamente. Como os níveis de expressão heteróloga em células de mamífero é inferior aquele que se obtém em procariotos, estratégias que empregam ferramentas de Engenharia Genética tem sido utilizadas. Atualmente, a expressão de proteínas recombinantes em linhagens celulares, como a CHO, foi otimizada para produzir proteínas na ordem de g/l (WURM, 2004). Neste sentido, utilizamos algumas estratégias existentes na literatura para aumentar a expressão das proteínas recombinantes nos sistemas heterólogos de expressão escolhidos. Primeiramente, o cDNA utilizado na clonagem de rhBMP2 e 4, amplificado a partir de um Banco de mRNA de tecidos continha modificações para: a) expressar a proteína de interesse em maiores níveis através da inserção, nos primers utilizados para amplificação do cDNA, sequências consenso de Kozak, que favorecem uma maior afinidade do sítio de ligação do ribossomo ao mRNA maduro (KOZAK, 1981) ; b) inserção de sequências para sítios de clonagem através de enzimas de restrição *XbaI* e *BamHI*, visando a clonagem, manutenção e subclonagem em vetor de expressão lentiviral. Além disso, outras estratégias utilizadas compreendem a utilização de um promotor viral originário do citomegalovírus (XIA *et al.*, 2006) e a co-transfecção com um vetor para seleção por higromicina, juntamente com a utilização de GFP, que facilita a seleção de clones positivos estáveis através da presença de fluorescência desta proteína.

Os cDNAs foram amplificados com sucesso a partir de amostras teciduais de pulmão e de tecido tumoral de mama. Estas sequências amplificadas foram clonados em vetor pGEM-Teasy® e subclonadas no vetor pCMV. Os vetores lentivirais foram posteriormente co-transfectados, juntamente com o vetor pTK-Hyg, que auxilia na seleção de clones positivos por conferir resistência à higromicina, a qual é suplementada ao meio de cultura das populações de células HEK293 e 293T transfectadas. Isto permitiu o aparecimento das primeiras colônias transfectantes após uma semana de cultivo, e vinte colônias iniciais foram isoladas de cada construção e cultivadas por dois meses na presença de 200µM/ml de higromicina. Neste período, foi monitorada a estabilidade da expressão de GFP, e clones que tiveram perda da expressão de GFP foram descartados. Uma dezena de clones estáveis de cada construção foram reservados para experimentos de avaliação da expressão de rhBMP2 e rhBMP4 através de ensaios de fosfatase alcalina e *Western blot*.

5.2. Purificação de rhBMP7 a partir do meio condicionado de células 293T contendo o vetor pCMV-hBMP7-IRES-EGFP

Clones de células HEK293T pCMV-hBMP7-IRES-EGFP, obtidas anteriormente durante o período de desenvolvimento da tese de Doutorado do Dr. Juan Carlos Bustos-Valenzuela, os quais expressam estavelmente a proteína BMP7 humana recombinante na ordem de 4,5mg de rhBMP7 por litro de meio condicionado, foram selecionados e expandidos em meio de cultivo com o objetivo de se purificar a proteína por cromatografia de afinidade. Devido ao rápido crescimento das células 293T em cultura, foi possível obter quantidades razoáveis de meio condicionado para iniciar a purificação de miligramas de rhBMP7. Isto é

facilitado pela continuidade de expressão de rhBMP7 mesmo após 72h da retirada do meio contendo soro, o que permitiu a coleta por três dias consecutivos (24h, 48h e 72h). Baseado no fato de que as proteínas da família das BMPs em sua grande maioria apresentam naturalmente afinidade de ligação à heparina (RIDER, 2006), utilizamos este princípio para purificação da rhBMP7. Utilizando-se uma coluna de Sepharose com heparina imobilizada, conseguiu-se realizar a purificação da proteína na sua forma dimérica nativa (~34kDa), atingindo 80% de pureza em apenas um passo, o que atende aos requisitos de pesquisa, e a presença de monômeros (~17kDa), resultantes do tratamento com um agente redutor. A utilização de proteínas na terapêutica, porém, requer que a pureza do composto injetável seja de pelo menos 99,9%, e, portanto, processos posteriores de *polishing* para a purificação desta proteína deverão ser desenvolvidos, como passos de cromatografia de gel-filtração e troca iônica. Investigamos também a presença de glicosilações existentes na proteína purificada, uma vez que a sequência para a proteína BMP7 madura possui três sítios N-ligados potenciais (<http://www.uniprot.org/uniprot/P18075>) e, por ensaio de glicosidase e western blot, detectamos uma diferença em torno de 4kDa entre a proteína purificada intacta e a proteína tratada com N-glicosidase F. Isto sugere que a plataforma de expressão utilizada consegue, com sucesso, introduzir glicosilações correspondentes aos motivos de glicosilação existentes na sequência da proteína. A inserção de carboidratos na proteína aumenta a estabilidade da proteína, o que melhora as condições de armazenamento e transporte, aumenta a meia-vida da proteína no organismo, o que permite a utilização de menores doses, que resultam em menores efeitos colaterais, e, em determinados tipos de proteína, a glicosilação é essencial para a atividade (WALSH, 2010).

Quanto à atividade biológica da fração purificada, o teste de fosfatase alcalina e a observação das mudanças morfológicas em células C2C12 mostraram que a proteína é capaz de ativar a diferenciação osteoblástica nestas células, de maneira dose-dependente. Nos ensaios *in vivo*, constatou-se que a proteína purificada possui a capacidade de induzir a formação de tecido ósseo ectópico através de ossificação intramembranosa, evidenciado pela análise histológica, o que não ocorre nos grupos controle em que apenas utilizou-se apenas o carreador (hidroxiapatita). Estes resultados encorajam o desenvolvimento de uma proteína promissora para utilização em terapêutica na clínica Ortopédica e Odontológica.

5.3. Análise dos substratos fosforilados de células msMSCs tratadas com rhBMP2 através de fosfoproteômica quantitativa

Nos experimentos de proteômica e fosfoproteômica quantitativa, foram utilizadas células mesenquimais murinas derivadas da pele, tratadas com rhBMP2 por diferentes períodos de tempo. As proteínas destas células foram extraídas e, posteriormente, realizou-se uma digestão trípica em solução. 50µg de material inicial foi separado em cada ponto de indução com rhBMP2 para a digestão trípica em solução. Esta quantidade é considerada relativamente pequena para ensaios de proteômica, uma vez que, normalmente, são utilizadas quantidades de extrato protéico inicial da ordem de miligramas, como descrito na literatura, onde 10mg de material inicial foram utilizados (OLSEN, J. V. *et al.*, 2006). Pelo fato das células mesenquimais estromais de pele isoladas possuírem número definido de passagens e não serem imortalizadas, foi crítico realizar os experimentos em passagens precoces desta cultura para garantir que as condições de osteodiferenciação destas células fossem as mais próximas possível da época em que foram caracterizadas

(FORNI, M.A. *et al.*, em preparação). Assim sendo, não seria possível obter quantidades elevadas de material para realizar os experimentos de fosfoproteômica. Esta é uma das limitações para a utilização de marcadores isotópicos metabólicos como o SILAC (BANTSCHEFF *et al.*, 2007), pois é necessário um tempo de assimilação dos peptídeos contendo isótopos estáveis pesados, que ocorre em torno de cinco passagens em cultivo. Esforços no sentido de diminuir a quantidade de material utilizado têm sido realizados, mantendo-se a quantidade dos dados quantificados. A partir de 100µg de material inicial, Lemeer e colaboradores (BOERSEMA *et al.*, 2009; LEMEER, SIMONE *et al.*, 2008) realizaram experimentos de fosfoproteômica comparativa em embriões de peixes, utilizando fosfoenriquecimento de amostras por TiO₂ diretamente acopladas à coluna de fase reversa, ou seja, fosfoenriquecimento *on-line*. Como limites muito inferiores em relação à quantidade de material inicial poderiam prejudicar a quantidade de fosfopeptídeos identificada, as amostras das três condições diferentes foram reunidas em um *pool*, que resultou em 150µg de material a ser submetido ao fosfoenriquecimento em coluna de afinidade por TiO₂, tendo sido possível identificar e quantificar 235 proteínas distintas e um total de 5.511 fosfopeptídeos, os quais foram quantificados em todos os grupos experimentais analisados. Um grande número (2.029) de proteínas diferentes foram quantificadas, com mais de 156.000 peptídeos identificados em todos os grupos estudados, com média de 39.000 peptídeos quantificados cada um. Foram comparados cinco diferentes períodos de indução com rhBMP2, dois a dois, uma vez que a marcação por dimetilação *triplex* permite uma quantificação relativa, isto é, um determinado dado de abundância relativa correspondente a um grupo experimental é sempre comparado a outro, portanto, é necessário que haja marcação em pelo menos duas amostras

correspondentes a dois experimentos distintos. Como neste experimento é possível fazer no máximo três marcações diferentes, correspondentes a três isótopos distintos, os cinco pontos de indução foram agrupados em dois grupos diferentes. Estes dois grupos podem ser distinguidos entre: tempo de indução inicial (*early* - 0h, 10min e 30min) e tempo de indução tardio (*late* - 30min, 1h e 2h). Cada grupo foi submetido ao fosfoenriquecimento por cromatografia de afinidade a TiO_2 , e o eluato foi submetido ao LC/MS diretamente, uma vez que a amostra contendo fosfopeptídeos é relativamente simples e representa apenas 10% do extrato celular total. A fração que não se ligou à coluna, porém, representa peptídeos de diferentes propriedades químicas e em maior quantidade (90% do material inicial), sendo desejável utilizar outro método de separação. Uma vez que os peptídeos são separados por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas de acordo com sua hidrofobicidade (coluna de fase reversa C18), utilizou-se o princípio inverso para separação desta população de peptídeos. Foi empregada uma separação por fase normal, também chamada de *Hydrophilic Interaction Chromatography* (HILIC), utilizando-se uma coluna contendo amida como grupo trocador polar. Desta maneira, peptídeos de caráter hidrofílico ligam-se mais fortemente à coluna, sendo eluídos através do aumento do caráter polar da fase móvel, sendo as amostras inseridas na coluna em uma solução aquosa contendo 90% de acetonitrila através de um gradiente de 42 minutos contra uma solução aquosa de TFA a 1%. Neste procedimento, foram geradas 31 frações, que foram combinadas em oito frações, de acordo com a intensidade detectada no cromatógrafo e o tempo de eluição. É crítico que não se exceda a capacidade do LC-MS/MS em quantidades absolutas de amostra, uma vez que entupimentos no capilar de sílica podem ocorrer, acarretando em aumento de pressão com

consequente diminuição de fluxo, perda de amostra, alterações no tempo de retenção dos peptídeos na coluna e no aumento excessivo do tempo de carregamento de amostra na coluna. Cada uma das oito frações (17µg cada) foi inserida, separadamente, no sistema LC-MS/MS, o que permitiu um grande ganho de identificação e quantificação de peptídeos.

Em experimentos de espectrometria de massa *high-throughput*, tipicamente, se obtém uma grande quantidade de dados, correspondente a diferentes proteínas, e dados falsos correspondentes a artefatos na amostra, sequências palindrômicas teóricas que apresentam o mesmo valor de m/z para um dado peptídeo (*False Discovery Rate* - FDR, sendo que, o nível considerado aceitável neste trabalho foi de 1%) sendo no caso de proteômica quantitativa, peptídeos não quantificados ou quantificados inadequadamente. Gerenciar esta quantidade de dados e transformá-los em processos representativos coordenados ao meio celular que se pretende elucidar tem sido o principal desafio dos pesquisadores na área (MÜLLER *et al.*, 2011). A normalização da expressão dos peptídeos também é necessária, uma vez que a relação inicial das quantidades de proteína de dois experimentos que se deseja comparar é de 1:1 (portanto, assume-se que, nesta condição, não há variação na abundância de proteínas entre as diferentes amostras), sendo que desvios nesta relação introduzem um viés na quantificação, levando à falsa interpretação de maior ou menor abundância relativa. Em experimentos de proteômica, a normalização das abundâncias relativas é realizada através da divisão do valor obtido para a relação entre dois pontos que se quer comparar pelo valor de $\log_2$ da relação obtida. Entretanto, este método apenas divide o valor da abundância dos peptídeos por um fator comum, reescalando esta abundância relativa. Em vista disto, empregou-se o método LOWESS para normalização dos dados. Este

algoritmo é amplamente empregado em experimentos de *microarray* (QUACKENBUSH, 2001). Uma premissa para aplicar esta normalização é que as diferenças entre dois experimentos distintos não sejam devidas aos fenômenos biológicos observados, e que, portanto, a maioria dos peptídeos encontrados não apresentará mudança significativa na abundância relativa em experimentos nas quais as amostras a serem comparadas são próximas, como no caso dos experimentos realizados neste trabalho. Em experimentos ideais, o gráfico de dispersão entre duas determinadas amostras deverá manter os valores para cada dado de tal maneira que o coeficiente angular da equação da regressão linear tenha valor 1,0. Assim, o algoritmo realiza uma adequação local (um determinado dado e seus vizinhos) da intensidade dos valores de abundância relativa de cada experimento, através de uma regressão polinomial local para atender os valores de coeficiente angular iguais àqueles do experimento ideal.

5.4. Análise das quinases envolvidas na fosforilação de substratos em células msMSCs tratadas com rhBMP2

A análise de proteínas quinases envolvidas na osteodiferenciação induzida por rhBMP2 em células msMSCs mostrou que a maioria dos sítios fosforilados encontrados são motivos de fosforilação de Casein Kinase (CKI e CKII), de MAPK p38, CDK e JNK. Também foi possível identificar motivos de fosforilação de receptores das famílias das Activinas (Activin Like Kinase – Alk), a família de receptores à qual pertencem os receptores das BMPs. A descrição destas quinases na literatura mostra que as mesmas possuem envolvimento com a diferenciação óssea mediada por BMP.

5.4.1. CK2

Bragdon e colaboradores (BRAGDON *et al.*, 2011, 2010) demonstraram que a proteína CK2 interage com o receptor de BMP (BMPRIa), e que, utilizando-se inibidores peptídicos específicos desta interação, ocorre a liberação de CK2, com consequente aumento na expressão de marcadores ósseos. Mais do que um simples regulador do receptor de BMP, CK2 poderia ter funções na fosforilação de substratos intracelulares ainda não descritos na osteogênese.

5.4.2. p38 MAPK

O envolvimento das MAPK p38 na osteogênese é descrito em vários trabalhos (CELIL; CAMPBELL, 2005; DESCHASEAUX, FRÉDÉRIC *et al.*, 2009; LEMONNIER, *et al.*, 2004; ULSAMER *et al.*, 2008). Estudos mostram que p38 é ativo durante a primeira hora da indução com rhBMP2, fosforilando Dlx5 e Osterix, essenciais na diferenciação óssea (ULSAMER *et al.*, 2008). Estudos mostram que Runx2 pode ser ativado independentemente da via das Smads, sugerindo que após a ligação de BMPs aos seus respectivos receptores, ocorre também a ativação de vias de sinalização paralelas que atuam em sinergia. Greenblatt e colaboradores (GREENBLATT *et al.*, 2010) demonstraram que o sinal das Smads 1/5/8 pode ser regulado por MAPK, via a proteína quinase TAK1, de modo sinérgico promovendo a ativação de Runx2.

5.4.3. JNK

Os dados apresentados neste trabalho mostraram que 9% dos substratos encontrados podem apresentar fosforilação catalisada por JNK. Diversos estudos mostram que JNK está envolvido na diferenciação osteoblástica mediada por BMP2

(CELIL; CAMPBELL, 2005; GUICHEUX, J. *et al.*, 2003; HUANG *et al.*, 2012; LIU, H. *et al.*, 2011). Em células MC3T3-E1 e em osteoblastos derivados de cultura primária de calvária de ratos, foi demonstrada uma ativação transitória de JNK em um período compreendido entre as primeiras quatro horas até as oito horas de indução, sendo que a utilização de drogas específicas utilizadas para inibir esta quinase levam à diminuição da expressão de osteocalcina, prejudicando o processo de maturação óssea. Por outro lado, JNK pode estar envolvido com a regulação negativa do sinal de Smads em períodos de tempo posteriores de osteoindução por rhBMP2 (HUANG *et al.*, 2012), pois células C2C12 tratadas com inibidores de JNK apresentaram aumento da expressão de fosfatase alcalina após quatro dias de suplementação com 100ng/ml de rhBMP2 adicionado ao meio de cultivo. Além disso, mutações no resíduo de serina 104 de RunX2, que seria fosforilado por JNK, promoveriam estímulo da atividade de fosfatase alcalina e da mineralização. Estes resultados mostram que JNK pode possuir ações distintas na diferenciação óssea, as quais são moduladas de maneira tempo dependente. Em um estágio inicial de osteodiferenciação, JNK atua promovendo a fosforilação de substratos citoplasmáticos aumentando a sensibilidade celular para o sinal de rhBMP2 (LIU, H. *et al.*, 2011), enquanto que em períodos de tempos posteriores, JNK atuaria diminuindo a sinalização intracelular para a osteodiferenciação.

5.4.4. CDKs

Motivos de fosforilação pertencentes às proteínas da família das quinases dependentes de ciclina (CDKs) também foram encontrados neste estudo. Tais quinases estão relacionadas com a progressão das células ao longo do ciclo celular, sendo que sua regulação promove a quiescência ou a proliferação celular. Por um

lado, a atividade de CDKs pode ser antagônica em relação à diferenciação óssea, por estimular a proliferação celular. Porém, a ausência da proteína p21 inibidora de CDK tem efeitos positivos na diferenciação óssea. Camundongos deficientes em p21 apresentaram um aumento na formação óssea, enquanto que células que superexpressam p21 em cultura apresentam atraso na formação de um fenótipo osteoblástico, mostrando que a ação de CDK/p21 não é somente influenciar na progressão do ciclo celular, mas, também, regular a atividade osteogênica (BELLOSTA *et al.*, 2003). Porém estudos posteriores são necessários para elucidar a ação de CDKs e suas inibidoras na diferenciação óssea.

5.5. Análise proteômica e classificação por ontologia genética em processos biológicos das proteínas diferencialmente abundantes em células msMSCs tratadas com rhBMP2

Os dados obtidos na análise proteômica, que apresentaram um aumento da abundância relativa das proteínas foram classificados de acordo com sua ontologia genética. Nesta classificação, incluem-se os processos biológicos relacionados com diferenciação, sinalização celular, desenvolvimento, fosforilação e ativação de vias de sinalização. De todas as proteínas que foram mapeadas utilizando-se o software Blast2go, grande parte está relacionada com os processos acima citados. É interessante notar, que, no período descrito para a primeira hora de indução, comparada com 30 minutos de indução, obteve-se um número considerável de sequências com *score* elevado em processos biológicos distintos, como: sinalização (40 proteínas distintas, *score* 13,3), desenvolvimento (48 proteínas distintas, *score* 12,78), desenvolvimento de estruturas anatômicas (46 proteínas distintas, *score* 13,06), diferenciação celular (33 proteínas distintas, *score* 13,06) e transdução de

sinal (37 proteínas distintas, *score* 18,99), entre outros. Foi possível observar, também, no grupo que compara uma hora com 30 minutos de indução, em menor número, proteínas de vias de sinalização contendo termos como: *enzyme linked receptor protein signaling pathway*, *intracellular protein kinase cascade*, *G-protein coupled receptor protein signaling pathway*, *transmembrane receptor protein tyrosine kinase signaling pathway* e *Wnt receptor signaling pathway* associados. Este processo é menos proeminente no grupo que compara 30 minutos com dez minutos de indução. Isto pode ser explicado pelo fato que neste tempo estudado não ser suficientemente necessário para induzir alterações qualitativas significativas nos níveis protéicos (WATERS *et al.*, 2012). Entretanto, estes dados não foram observados no grupo que compara os primeiros dez minutos de indução com o controle. Estes dados sugerem que o tratamento com rhBMP2 por uma hora levou direta ou indiretamente à ativação de alguns genes relacionados aos processos supracitados.

5.6. Análise dos transcritos correspondentes a genes selecionados durante a diferenciação óssea ativada por rhBMP2 em msMSC's através de PCR quantitativo em tempo real

Como a indução por rhBMP2 estimula alterações nas modificações pós-traducionais das proteínas intracelulares que resultam na ativação ou repressão de genes, investigamos estudamos quais fatores de transcrição interagem com as proteínas identificadas nos experimentos. Para tanto, utilizou-se o software (Ingenuity) de análise de redes de interação de proteínas. As proteínas encontradas na análise de interações foram agrupadas por compartimento celular, e aquelas contendo função de fator de transcrição foram selecionadas. Utilizando-se o banco

de dados TRED (<http://rulai.cshl.edu/cgi-bin/TRED>) de genes-alvo dos fatores de transcrição estudados, um banco de dados de ocorrência de sítios de motivos de ligação de fatores de transcrição, JASPAR (<http://jaspar.genereg.net/>), e trabalhos na literatura, Foram selecionados, da lista inicial, fatores de transcrição que estariam relacionados com a ativação de genes relacionados à diferenciação óssea: SP1, c-myc e NF- κ B. Treze genes foram selecionados para a realização de PCR quantitativo em tempo real, por possuir motivos de ligação aos fatores de transcrição selecionados: *Osx*, *Dlx5*, *RunX2*, *Twist*, *Sox9*, *Col1*, *Col4A*, *Tgfb1*, *Tgfbr* e *BMP2* foram verificados e experimentos quantitativos de PCR em tempo real foram realizados, no sentido de avaliar a indução da expressão destes genes ao longo da indução com rhBMP2. A amplificação esperada foi obtida para dez genes, dentre os quais *Tgfbr*, *Tgfb1*, *Smad2*, *Col1* e *Col4A*, *Sox9*, *Twist*, além dos genes marcadores da osteogênese utilizados neste estudo: *Dlx5*, *RunX2* e *Osx*.

A superfamília das TGF- β /BMPs possuem funções fundamentais na formação do tecido ósseo durante o desenvolvimento embrionário de mamíferos, atuando como reguladores em diversos processos (CHEN, G. *et al.*, 2012). Foi observado um aumento dos níveis de mRNA para *Tgfb1* e *Tgfbr*, o que pode indicar ativação das vias de sinalização canônicas mediada por BMPs, as Smads, e também de vias não-canônicas como as vias das MAPK (ULSAMER *et al.*, 2008). Estas duas vias convergem para a ativação de *RunX2*, um dos principais genes relacionados à ativação da diferenciação óssea. Além disso, este último gene apresentou níveis de mRNA aumentados somente em 30 minutos após a indução por rhBMP2, reafirmando que após os primeiros minutos de indução com rhBMP2, *Runx2* é um dos primeiros genes relacionados com a osteogênese.

Sox9, um fator de transcrição da família dos genes SRY (*sex determining region Y*), presente em todas as células precursoras osteoblásticas, é essencial para o desenvolvimento do esqueleto (LONG, 2011), e capaz de induzir a expressão de RunX2 (KOMORI *et al.*, 1997; NAKASHIMA *et al.*, 2002; OTTO *et al.*, 1997). Apesar disto, a participação de Sox9 na diferenciação osteoblástica ainda não está totalmente esclarecida. A deleção condicional de Sox9 nas células mesenquimais formadoras dos membros ocasiona a perda de condrócitos e osteoblastos (BI *et al.*, 1999). Por outro lado, a deleção de Sox9 em células da crista neural, que contribuem para a formação do esqueleto crânio-facial ocasiona a mudança de células que expressam marcadores condroblásticos para marcadores osteoblásticos (DUCY, PATRICIA *et al.*, 1999). Sox9 não é expresso em osteoblastos maduros, (LONG, 2011) o que pode explicar sua diminuição de abundância após a segunda hora de indução com rhBMP2.

As proteínas originárias dos genes Col1 e Col4A desempenham funções essenciais na construção da membrana basal de ossos recém-formados no indivíduo adulto. Um estudo recente, que realizou a análise comparativa da transcrição de diferentes genes durante a diferenciação osteoblástica de amostras de adulto e feto, mostrou que os colágenos dos tipos 1 e 4a apresentaram aumento da abundância relativa em vários modelos de diferenciação osteoblástica (GUILLLOT *et al.*, 2008), enquanto que mutações no gene Col1 levam a um aumento de massa na patologia *osteogenesis imperfecta* (LINDAHL *et al.*, 2011).

O gene Twist é um fator de transcrição que possui funções inibitórias sobre RunX2 (BIALEK *et al.*, 2004). A diminuição da abundância destes genes nos

primeiros momentos de indução com rhBMP2, compreendido entre 10 e 30 minutos, pode ser indicativo da diferenciação mediada por RunX2.

RunX2 (*Runt domain-containing transcription fator 2*) é um fator de transcrição indispensável para a osteodiferenciação tanto endocondral quanto intramembranosa, além de participar na formação de matriz óssea no indivíduo adulto. Camundongos duplo homozigotos para a deleção do gene RunX2 apresentaram completa ausência de osteoblastos (DUCY, PATRICIA *et al.*, 1999). Os resultados apresentados mostram uma ativação bastante proeminente de RunX2, da ordem de 400 vezes em relação aos valores basais.

Osx, outro fator de transcrição relacionado à osteogênese (BANDYOPADHYAY, A. *et al.*, 2006), é ativado em células C2C12, e sua deleção resulta em ausência completa de osteoblastos em embriões, mesmo havendo função normal de RunX2 (NAKASHIMA *et al.*, 2002), sugerindo que Osx é ativado posteriormente em relação à RunX2. Isto foi observado nos experimentos de PCR quantitativo em Tempo Real realizados neste trabalho, após duas horas de indução com rhBMP2. Finalmente, Dlx5, um gene do tipo homeobox, possui funções essenciais no desenvolvimento dos esqueletos craniofacial, axial e apendicular (ROBLEDO *et al.*, 2002). Dlx5 também possui funções reguladoras sobre RunX2 através da ligação em elementos de resposta homeodomínios na região promotora distal deste gene (LEE, M.-H. *et al.*, 2005). O aumento da expressão relativa deste gene após a exposição à rhBMP2 indica que este gene está presente também no modelo de diferenciação proposto, através do eixo RunX2/Osx/Dlx5.

5.7. Novas proteínas candidatas com aumento de fosforilação mediante indução por rhBMP2 em células msMSCs

A partir de três experimentos independentes, foram escolhidos as proteínas que apresentaram aumento da fosforilação. Dentre estas, encontra-se um grupo de proteínas relacionado com rearranjo do citoesqueleto, além de vias de sinalização por Wnt e Ras. Alterações no citoesqueleto são observadas durante a diferenciação óssea, uma vez que as células passam de uma morfologia fibroblastóide para estruturas celulares que lembram pequenas esferas mediante suplementação com meio de osteodiferenciação (ODM), o que é antagonizado pelo tratamento das células com citocalasina D, levando à redução da expressão dos marcadores de diferenciação (RODRÍGUEZ *et al.*, 2004). Deste modo, as proteínas *catenin alpha 1*, *alpha parvin*, *septin-2*, *caldesmon*, *microtubule associated protein 1B*, *microtubule associated protein 4*, *nexilin*, *cytoplasmic dynein 1 light intermediate chain*, *lamin A/C* e a proteína *plectin 1* apresentaram um aumento da fosforilação em todos os períodos de tempo estudados, o que está de acordo com estudos presentes na literatura para células tratadas com ODM (LO *et al.*, 2012; RODRÍGUEZ *et al.*, 2004). Portanto, demonstramos que estas proteínas também são ativadas pelo tratamento com BMP2. Isto pode ser explicado pelo fato de tais proteínas fazerem parte de um repertório comum de proteínas mobilizadas para a diferenciação óssea. Na mesma linha, um membro da família das Rho, *Rho GTPase-activating protein*, apresentou aumento nos níveis de fosforilação, sob a ação de rhBMP2. A ativação de proteínas da família da Rho relaciona-se com o remodelamento do citoesqueleto, através da atividade GTPásica desta proteína. É interessante o fato de estudos anteriores terem mostrado que células-tronco que expressam constitutivamente esta proteína apresentam um maior comprometimento com a diferenciação óssea (MCBEATH *et al.*, 2004). Estes dados sugerem que as células msMSCs sofrem alterações na sua estrutura citoplasmática, precedida por eventos de fosforilação de proteínas

relacionadas ao citoesqueleto. Outras proteínas que estão relacionadas com vias de sinalização na diferenciação óssea, e que apresentaram aumento nos níveis de fosforilação foram encontradas: *Transforming growth factor beta 1 induced transcript (Hic-5)* e *Bcl-2-associated transcription factor 1*. Estas proteínas são associadas à via das proteínas Wnt, e especificamente *Hic-5* está envolvida na regulação das proteínas Smads 1,5 e 8, proteínas efetoras na sinalização intracelular de BMPs (SHOLA *et al.*, 2011). Esta regulação dá-se de modo negativo, pela inibição de Smads por *Hic-5*. É interessante notar que o aumento da fosforilação de *Hic-5*, que ocorre ao se comparar os períodos tempo de 1h e 30 minutos, é precedido por uma diminuição dos níveis de fosforilação no grupo em que é comparado períodos mais curtos de indução com rhBMP2 (30min/10min). A figura 33 ilustra os resultados apresentados, resumizando os dados descobertos na análise proteômica, fosfoproteômica e transcriptômica de células msMSC's induzidas por rhBMP2, nos primeiros momentos do comprometimento destas células com a diferenciação em osteoblastos.

Figura 33. Síntese das informações obtidas nos experimentos de fosfoproteômica, proteômica e qRT-PCR em células msMSCs induzidas com rhBMP2. As proteínas encontradas nos experimentos de fosfoproteômica, proteômica e os genes validados por PCR quantitativo em tempo real foram analisados um a um. Estes dados foram agrupados de acordo com o tempo de indução, e tipo de ação intracelular. As quinases que tiveram o maior número de sítios encontrados dos substratos fosforilados estão também representadas. O gráfico representa em que período de tempo de indução com rhBMP2 foi encontrado amplificação do mRNA do respectivo gene.

6. CONCLUSÕES

1. Foi possível realizar a clonagem de duas proteínas humanas da família das BMPs, as rhBMP2 e rhBMP4, em vetores lentivirais de expressão, o que permitirá o futuro uso destas proteínas em protocolos de pesquisa no estudo da diferenciação e manutenção da indiferenciação de células-tronco, respectivamente;
2. A cromatografia por afinidade à heparina é um método eficiente para a purificação de rhBMP7 produzida por células 293T transfectadas com o vetor lentiviral a partir do meio condicionado concentrado na ausência de soro fetal bovino;
3. A proteína rhBMP7 purificada foi capaz de induzir a diferenciação óssea, *in vitro*, através de ensaios de diferenciação óssea em células C2C12 e *in vivo*, através da formação de osso ectópica após 21 dias da inserção de implantes contendo a proteína recombinante em camundongos *nude* Balb/c, o que permite concluir que a proteína purificada possui atividade biológica e estabilidade.
4. Utilizando-se uma técnica de custo relativamente baixo (cerca de 0,10€ por reação) foi possível realizar estudos de proteômica e fosfoproteômica quantitativa duplo *triplex* a partir de quantidades pequenas de material inicial (50µg de cada ponto de indução), tendo-se encontrado 2.029 proteínas e 235 proteínas fosforiladas em todos os cinco pontos de indução estudados;

5. Foram encontradas 38 diferentes quinases que possuem motivos de fosforilação iguais aos peptídeos encontrados na análise proteômica, sendo que Casein Kinase, MAPKp38, CDK e JNK apresentaram o maior número de sítios correlatos com os dados da análise fosfoproteômica. Tais dados corroboram as publicações da literatura que descrevem funções importantes destas quinases na diferenciação osteoblástica;
6. A ontologia genética mostrou que as 2.029 proteínas distintas encontradas na análise proteômica estão distribuídas diferentemente ao longo dos períodos de tempo de indução, sendo que processos relacionados com a diferenciação e sinalização celular são mais proeminentes após uma hora de indução das células com rhBMP2, mostrando que as alterações no conteúdo protéico das msMSCs, em um número razoável, ocorrem após a primeira hora de indução com rhBMP2.
7. Os fatores de transcrição investigados quanto a sua participação na osteogênese mostraram que houve ativação de genes-alvo essenciais para a osteodiferenciação, mostrando que os substratos fosforilados de maneira direta ou indireta participam no disparo da diferenciação óssea mediada por rhBMP2.
8. Este estudo mostrou, de varias maneiras, que a ativação de rhBMP2, ao invés de ser mediada exclusivamente por vias canônicas, pode ocorrer através de outras vias, como aquelas de p38 e outras, de maneira que o *crosstalk* de diferentes tipos de proteínas esteja regulando o disparo e a manutenção da diferenciação óssea em células mesenquimais.

7. PERSPECTIVAS

1. Obter maiores níveis de expressão das rhBMPs expressas utilizando outros vetores que permitem a amplificação gênica (Sistema DHFR / Metotrexato) para utilização destas proteínas na terapêutica;

2. A partir das proteínas candidatas como tendo fosforilação diferencial encontrados, encontradas, determinar, por ensaios de western blot, imunofluorescência, ec ensaios farmacológicos de inibição, quais os efeitos da ausência destas proteínas no processo de diferenciação osteoblástica das células mesenquimais de pele.

8. REFERÊNCIAS

- ALT, V.; DONELL, S. T.; CHHABRA, A. *et al.* A health economic analysis of the use of rhBMP-2 in Gustilo-Anderson grade III open tibial fractures for the UK, Germany, and France. **Injury**, v. 40, n. 12, p. 1269-75, 2009.
- AUSUBEL, F. M.; BRENT, R.; KINGSTON, R. E. *et al.* **Short Protocols in Molecular Biology**. [S.I.]: John Wiley and Sons, 1992. v. 3p. 1512
- BANDYOPADHYAY, A.; TSUJI, K.; COX, K. *et al.* Genetic Analysis of the Roles of BMP2, BMP4, and BMP7 in Limb Patterning and Skeletogenesis. **PLoS Genetics**, v. 2, n. 12, p. 15, 2006.
- BANTSCHEFF, M.; SCHIRLE, M.; SWEETMAN, G.; RICK, J.; KUSTER, B. Quantitative mass spectrometry in proteomics: a critical review. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 389, n. 4, p. 1017-1031, 2007.
- BELLOSTA, P.; MASRAMON, L.; MANSUKHANI, A.; BASILICO, C. p21(WAF1/CIP1) acts as a brake in osteoblast differentiation. **Journal of bone and mineral research the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research**, v. 18, n. 5, p. 818-826, 2003.
- BERGER, J. A.; HAUTANIEMI, S.; JARVINEN, A. K. *et al.* Optimized LOWESS normalization parameter selection for DNA microarray data. **BMC Bioinformatics**, v. 5, p. 194, 2004.
- BI, W.; DENG, J M; ZHANG, Z; BEHRINGER, R R; CROMBRUGGHE, B DE. Sox9 is required for cartilage formation. **Nature Genetics**, v. 22, n. 1, p. 85-89, 1999.
- BIALEK, P.; KERN, B.; YANG, X. *et al.* A twist code determines the onset of osteoblast differentiation. **Developmental Cell**, v. 6, n. 3, p. 423-435, 2004.
- BLOCHLINGER, K.; DIGGELMANN, H. Hygromycin B phosphotransferase as a selectable marker for DNA transfer experiments with higher eucaryotic cells. **Molecular and Cellular Biology**, v. 4, n. 12, p. 2929-2931, 1984.
- BOERSEMA, P. J.; RAIJMAKERS, R.; LEMEER, S; MOHAMMED, S; HECK, A. J. Multiplex peptide stable isotope dimethyl labeling for quantitative proteomics. **Nat Protoc**, v. 4, n. 4, p. 484-494, 2009.
- BRAGDON, B.; THINAKARAN, S.; MOSEYCHUK, O. *et al.* Casein kinase 2 regulates in vivo bone formation through its interaction with bone morphogenetic protein receptor type Ia. **Bone**, v. 49, n. 5, p. 944-54, 2011.
- BRAGDON, B.; THINAKARAN, S.; MOSEYCHUK, O. *et al.* Casein kinase 2 beta-subunit is a regulator of bone morphogenetic protein 2 signaling. **Biophysical Journal**, v. 99, n. 3, p. 897-904, 2010.
- BREUKELLEN, B. VAN; TOORN, H. W. VAN DEN; DRUGAN, M. M.; HECK, A. J. StatQuant: a post-quantification analysis toolbox for improving quantitative mass spectrometry. **Bioinformatics**, v. 25, n. 11, p. 1472-1473, 2009.

BUCKWALTER, J. A.; COOPER, R. R. Bone structure and function. **Instructional Course Lectures**, v. 36, p. 27-48, 1987.

BUSTOS-VALENZUELA, J. C.; HALCSIK, E.; BASSI, E. J. *et al.* Expression, purification, bioactivity, and partial characterization of a recombinant human bone morphogenetic protein-7 produced in human 293T cells. **Molecular Biotechnology**, v. 46, n. 2, p. 1544, 2010.

CELESTE, A. J.; IANNAZZI, J. A.; TAYLOR, R. C. *et al.* Identification of transforming growth factor beta family members present in bone-inductive protein purified from bovine bone. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 87, n. 24, p. 9843-9847, 1990.

CELIL, A. B.; CAMPBELL, P. G. BMP-2 and insulin-like growth factor-I mediate Osterix (Osx) expression in human mesenchymal stem cells via the MAPK and protein kinase D signaling pathways. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 36, p. 31353-9, 2005.

CHEN, D.; ZHAO, M.; MUNDY, G. R. Bone morphogenetic proteins. **Growth factors Chur Switzerland**, v. 1, n. 4, p. 267-280, 2004.

CHEN, G.; DENG, C.; LI, Y. P. TGF-beta and BMP signaling in osteoblast differentiation and bone formation. **Int J Biol Sci**, v. 8, n. 2, p. 272-288, 2012.

CONESA, A.; GÖTZ, S.; GARCÍA-GÓMEZ, J. M. *et al.* Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. **Bioinformatics**, v. 21, n. 18, p. 3674-6, 2005.

COURPRON, P.; MEUNIER, P.; VIGNON, G. Dynamics of bone remodeling explained by Harold Frost. Theory of the B. M.U. (basic multicellular unit). **La Nouvelle Presse Medicale**, v. 4, n. 6, p. 421-424, 1975.

DESCHASEAUX, F.; PONTIKOGLOU, C.; SENSEBE, L. Bone regeneration: the stem/progenitor cells point of view. **J Cell Mol Med**, v. 14, n. 1-2, p. 103-115, 2010.

DESCHASEAUX, FRÉDÉRIC; SENSÉBÉ, L.; HEYMANN, D. Mechanisms of bone repair and regeneration. **Trends in Molecular Medicine**, v. 15, n. 9, p. 417-429, 2009.

DUCY, P.; KARSENTY, G. The family of bone morphogenetic proteins. **Kidney International**, v. 57, n. 6, p. 2207-2214, 2000.

DUCY, PATRICIA; STARBUCK, M.; PRIEMEL, M. *et al.* A Cbfa1-dependent genetic pathway controls bone formation beyond embryonic development. **Genes & Development**, v. 13, n. 8, p. 1025-1036, 1999.

EBENDAL, T.; BENGTSSON, H.; SÖDERSTRÖM, S. Bone morphogenetic proteins and their receptors: potential functions in the brain. **Journal of Neuroscience Research**, v. 51, n. 2, p. 139-146, 1998.

ERIKSEN, E. F. Cellular mechanisms of bone remodeling. **Reviews in endocrine metabolic disorders**, v. 11, n. 4, p. 219-227, 2010.

- ETSCHMANN, B.; WILCKEN, B.; STOEVE SAND, K.; DER SCHULENBURG, A. VON; STERNER-KOCK, A. Selection of reference genes for quantitative real-time PCR analysis in canine mammary tumors using the GeNorm algorithm. **Veterinary Pathology**, v. 43, n. 6, p. 934-942, 2006.
- GAO, T.; LINDHOLM, T. S.; MARTTINEN, A.; URIST, M R. Composites of bone morphogenetic protein (BMP) and type IV collagen, coral-derived coral hydroxyapatite, and tricalcium phosphate ceramics. **International Orthopaedics**, v. 20, n. 5, p. 321-325, 1996.
- GARCÍA-CASTRO, J.; TRIGUEROS, C.; MADRENAS, J. *et al.* Mesenchymal stem cells and their use as cell replacement therapy and disease modelling tool. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 12, n. 6B, p. 2552-2565, 2008.
- GERSTENFELD, L. C.; CULLINANE, D. M.; BARNES, G. L.; GRAVES, D. T.; EINHORN, T. A. Fracture healing as a post-natal developmental process: molecular, spatial, and temporal aspects of its regulation. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 88, n. 5, p. 873-884, 2003.
- GIANNOUDIS, P. V.; TZIOUPIS, C. Clinical applications of BMP-7: the UK perspective. **Injury**, v. 36 Suppl 3, p. S47-S50, 2005.
- GRAFF, J. M. Embryonic patterning: to BMP or not to BMP, that is the question. **Cell**, v. 89, n. 2, p. 171-174, 1997.
- GRANJEIRO, J. M.; OLIVEIRA, R. C.; BUSTOS-VALENZUELA, J. C.; SOGAYAR, M. C.; TAGA, R. Bone morphogenetic proteins: from structure to clinical use. **Brazilian journal of medical and biological research Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas Sociedade Brasileira de Biofisica et al**, v. 38, n. 10, p. 1463-1473, 2005.
- GREENBLATT, M. B.; SHIM, J.-H.; GLIMCHER, L. H. TAK1 mediates BMP signaling in cartilage. **Annals Of The New York Academy Of Sciences**, v. 1192, n. 1, p. 385-390, 2010.
- GREGORY, K. E.; ONO, R. N.; CHARBONNEAU, N. L. *et al.* The prodomain of BMP-7 targets the BMP-7 complex to the extracellular matrix. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 30, p. 27970-27980, 2005.
- GRIFFITH, D. L.; KECK, P. C.; SAMPATH, T. K.; RUEGER, D. C.; CARLSON, W. D. Three-dimensional structure of recombinant human osteogenic protein 1: structural paradigm for the transforming growth factor beta superfamily. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, n. 2, p. 878-883, 1996.
- GRIMAUD, E.; HEYMANN, D.; RÉDINI, F. Recent advances in TGF-beta effects on chondrocyte metabolism. Potential therapeutic roles of TGF-beta in cartilage disorders. **Cytokine growth factor reviews**, v. 13, n. 3, p. 241-257, 2002.
- GUICHEUX, J.; LEMONNIER, J.; GHAYOR, C; *et al.* Activation of p38 mitogen-activated protein kinase and c-Jun-NH2-terminal kinase by BMP-2 and their

implication in the stimulation of osteoblastic cell differentiation. **Journal of bone and mineral research the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research**, v. 18, n. 11, p. 2060-2068, 2003.

GUILLOT, P. V.; BARI, C. DE; DELL'ACCIO, F. *et al.* Comparative osteogenic transcription profiling of various fetal and adult mesenchymal stem cell sources. **Differentiation research in biological diversity**, v. 76, n. 9, p. 946-957, 2008.

HUANG, Y.-FENG; LIN, J.-JER; LIN, C.-HSIUNG; SU, Y.; HUNG, S.-CHIEH. **c-Jun N-terminal kinase 1 negatively regulates osteoblastic differentiation induced by BMP-2 via phosphorylation of Runx2 at Ser104**. [S.l: s.n.], 2012.

ISRAEL, D. I.; NOVE, J.; KERNS, K. M.; MOUTSATSOS, I. K.; KAUFMAN, R. J. Expression and characterization of bone morphogenetic protein-2 in Chinese hamster ovary cells. **Growth factors Chur Switzerland**, v. 7, n. 2, p. 139-150, 1992.

KATAGIRI, T.; YAMAGUCHI, A.; KOMAKI, M. *et al.* Bone morphogenetic protein-2 converts the differentiation pathway of C2C12 myoblasts into the osteoblast lineage [published erratum appears in J Cell Biol 1995 Feb;128(4):following 713]. **The Journal of Cell Biology**, v. 127, n. 6, p. 1755-1766, 1994.

KOMORI, T.; YAGI, H.; NOMURA, S. *et al.* Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. **Cell**, v. 89, n. 5, p. 755-764, 1997.

KOZAK, M. Possible role of flanking nucleotides in recognition of the AUG initiator codon by eukaryotic ribosomes. **Nucleic Acids Research**, v. 9, n. 20, p. 5233-5252, 1981.

LEE, M.-H.; KIM, Y.-J.; YOON, W.-J. *et al.* Dlx5 specifically regulates Runx2 type II expression by binding to homeodomain-response elements in the Runx2 distal promoter. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 42, p. 35579-87, 2005.

LEMEER, SIMONE; JOPLING, C.; GOUW, J. *et al.* Comparative phosphoproteomics of zebrafish Fyn/Yes morpholino knockdown embryos. **Molecular cellular proteomics MCP**, v. 7, n. 11, p. 2176-2187, 2008.

LEMONNIER, JÃ©.; GHAYOR, CHAFIK; GUICHEUX, JÃ©.; CAVERZASIO, JOSEPH. Protein Kinase C-independent Activation of Protein Kinase D Is Involved in BMP-2-induced Activation of Stress Mitogen-activated Protein Kinases JNK and p38 and Osteoblastic Cell Differentiation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 1, p. 259-264, 2004.

LINDAHL, K.; BARNES, A. M.; FRATZL-ZELMAN, N. *et al.* COL1 C-propeptide cleavage site mutations cause high bone mass osteogenesis imperfecta. **Human Mutation**, v. 32, n. 6, p. 598-609, 2011.

LINDING, R.; JENSEN, L. J.; PASCULESCU, A. *et al.* NetworKIN: a resource for exploring cellular phosphorylation networks. **Nucleic Acids Research**, v. 36, n. Database issue, p. D695-D699, 2008.

- LIU, H.; LIU, YUNSHAN; VIGGESWARAPU, M. *et al.* Activation of c-Jun NH(2)-terminal kinase 1 increases cellular responsiveness to BMP-2 and decreases binding of inhibitory Smad6 to the type 1 BMP receptor. **Journal of bone and mineral research the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research**, v. 26, n. 5, p. 1122-1132, 2011.
- LO, T.; TSAI, C.-F.; SHIH, Y.-R. V. *et al.* Phosphoproteomic Analysis of Human Mesenchymal Stromal Cells during Osteogenic Differentiation. **Journal of Proteome Research**, v. 11, n. 2, p. 586-598, 2012.
- LONG, F. Building strong bones: molecular regulation of the osteoblast lineage. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 13, n. 1, p. 27-38, 2011.
- MCBEATH, R.; PIRONE, D. M.; NELSON, C. M.; BHADRIRAJU, K.; CHEN, C. S. Cell shape, cytoskeletal tension, and RhoA regulate stem cell lineage commitment. **Developmental Cell**, v. 6, n. 4, p. 483-495, 2004.
- MÜLLER, T.; SCHRÖTTER, A.; LOOSSE, C. *et al.* Sense and nonsense of pathway analysis software in proteomics. **Journal of Proteome Research**, v. 10, n. 12, p. 5398-408, 2011.
- NAKASHIMA, K.; ZHOU, X.; KUNKEL, G. *et al.* The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. **Cell**, v. 108, n. 1, p. 17-29, 2002.
- NOONAN, K. J.; HUNZIKER, E. B.; NESSLER, J.; BUCKWALTER, J. A. Changes in cell, matrix compartment, and fibrillar collagen volumes between growth-plate zones. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 16, n. 4, p. 500-508, 1998.
- OLSEN, J. V.; BLAGOEV, B.; GNAD, F. *et al.* Global, in vivo, and site-specific phosphorylation dynamics in signaling networks. **Cell**, v. 127, n. 3, p. 635-648, 2006.
- OPPERMAN, L. A. Cranial sutures as intramembranous bone growth sites. **Developmental dynamics an official publication of the American Association of Anatomists**, v. 219, n. 4, p. 472-485, 2000.
- ORNITZ, D. M.; MARIE, P. J. FGF signaling pathways in endochondral and intramembranous bone development and human genetic disease. **Genes & Development**, v. 16, n. 12, p. 1446-1465, 2002.
- OTTO, F.; THORNELL, A. P.; CROMPTON, T. *et al.* Cbfa1, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development. **Cell**, v. 89, n. 5, p. 765-771, 1997.
- QUACKENBUSH, J. Computational analysis of microarray data. **Nature Reviews Genetics**, v. 2, n. 6, p. 418-427, 2001.
- RAJPUROHIT, R.; MANSFIELD, K.; OHYAMA, K.; EWERT, D.; SHAPIRO, I. M. Chondrocyte death is linked to development of a mitochondrial membrane permeability transition in the growth plate. **Journal of Cellular Physiology**, v. 179, n. 3, p. 287-296, 1999.

- RIDER, C. C. Heparin/heparan sulphate binding in the TGF-beta cytokine superfamily. **Biochemical Society Transactions**, v. 34, n. Pt 3, p. 458-460, 2006.
- ROBLEDO, R. F.; RAJAN, L.; LI, X.; LUFKIN, T. The Dlx5 and Dlx6 homeobox genes are essential for craniofacial, axial, and appendicular skeletal development. **Genes & Development**, v. 16, n. 9, p. 1089-1101, 2002.
- RODRÍGUEZ, J. P.; GONZÁLEZ, M.; RÍOS, S.; CAMBIAZO, V. Cytoskeletal organization of human mesenchymal stem cells (MSC) changes during their osteogenic differentiation. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 93, n. 4, p. 721-731, 2004.
- SHOLA, D. T. N.; WANG, H.; WAHDAN-ALASWAD, R.; DANIELPOUR, D. Hic-5 controls BMP4 responses in prostate cancer cells through interacting with Smads 1, 5 and 8. **Oncogene**, n. July, p. 1-11, 2011.
- SIEBER, C.; KOPF, J.; HIEPEN, C.; KNAUS, P. Recent advances in BMP receptor signaling. **Cytokine growth factor reviews**, v. 20, n. 5-6, p. 343-355, 2009.
- ULSAMER, A.; ORTUÑO, M. J.; RUIZ, S. *et al.* BMP-2 induces Osterix expression through up-regulation of Dlx5 and its phosphorylation by p38. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 7, p. 3816-26, 2008.
- URIST, MARSHALL R. Bone: formation by autoinduction. 1965. **Science**, v. 150, n. 395, p. 893-899, 1965.
- WALSH, G. Post-translational modifications of protein biopharmaceuticals. **Drug Discovery Today**, v. 15, n. 17-18, p. 773-780, 2010.
- WANG, E. A.; ROSEN, V.; CORDES, P. *et al.* Purification and characterization of other distinct bone-inducing factors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 85, n. 24, p. 9484-9488, 1988.
- WATERS, K. M.; LIU, T.; QUESENBERRY, R. D. *et al.* Network Analysis of Epidermal Growth Factor Signaling Using Integrated Genomic, Proteomic and Phosphorylation Data. **PLoS ONE**, v. 7, n. 3, p. e34515, 2012.
- WOZNEY, J M. The bone morphogenetic protein family: multifunctional cellular regulators in the embryo and adult. **European Journal of Oral Sciences**, v. 106 Suppl , n. 0909-8836 (Print) LA - eng PT - Journal Article PT - Review RN - 0 (Bone Morphogenetic Proteins) RN - 0 (Transforming Growth Factor beta) SB - D SB - IM, p. 160-166, 1998.
- WURM, F. M. Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. **Nature Biotechnology**, v. 22, n. 11, p. 1393-1398, 2004.
- XIA, W.; BRINGMANN, P.; MCCLARY, J. *et al.* High levels of protein expression using different mammalian CMV promoters in several cell lines. **Protein Expression and Purification**, v. 45, n. 1, p. 115-124, 2006.
- XIAO, Y.-T.; XIANG, L.-X.; SHAO, J.-Z. Bone morphogenetic protein. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 362, n. 3, p. 550-553, 2007.

TABELA DE ANEXOS

Tabela A1.

Razão das relações de abundância relativa para as fosfoproteínas em diferentes períodos de indução e análise estatística correspondente a um determinado número de acesso

Tabela A2.

Razão das relações de abundância relativa para as proteínas em diferentes períodos de indução e análise estatística correspondente a um determinado número de acesso.(em mídia CD-ROM).

Material A1.

Manuscrito: *Novel players in osteogenic differentiation revealed by mass spectrometric assessment of phosphorylated substrates in murine skin mesenchymal cells.* HALCSIK E, FORNI MA, JENSEN, ON,SOGAYAR MC. *In preparation.* (em mídia CD-ROM).

Material A2.

Manuscrito: *Unveiling novel genes upregulated by both rhBMP2 and rhBMP7 during early osteoblastic transdifferentiation of C2C12 cells.* BUSTOS-VALENZUELA JC, FUJITA A, HALCSIK E, GRANJEIRO JM, SOGAYAR MC. BMC Res Notes. 2011 Sep 26;4:370. (em mídia CD-ROM).

Material A3.

Manuscrito: *Expression, purification, bioactivity, and partial characterization of a recombinant human bone morphogenetic protein-7 produced in human 293T cells.* BUSTOS-VALENZUELA JC, HALCSIK E, BASSI EJ, DEMASI MA, GRANJEIRO JM, SOGAYAR MC Mol Biotechnol. 2010 Oct;46(2):118-26. (em mídia CD-ROM).

Tabela 1. Razão das relações de abundância relativa para as fosfoproteínas em diferentes períodos de indução e análise estatística correspondente a um determinado número de acesso

Proteína / Peptídeos identificados / Razão / p-value	Nº acesso IPI	Indução BMP2/peptídeos encontrados			
DNA replication licensing factor MCM3	IPI00108338.1			1h/30'	2h/1h
peptídeos identificados				5	5
razão				2,179	1,256
p-value				0,000	0,012
of Na(+)/H(+) exchange regulatory cofactor NHE-RF1	IPI00109311.3	10'/0h	30'/10'	1h/30'	2h/1h
peptídeos identificados		4	4	2	2
razão		1,363	0,924	0,664	0,799
p-value		0,000	0,070	0,000	0,000
Cytosolic phospholipase A2	IPI00111169.1	10'/0h	30'/10'	1h/30'	2h/1h
peptídeos identificados		18	18	2	2
razão		1,110	2,033	1,032	2,666
p-value		0,442	0,000	0,000	0,000
Protein SET	IPI00111560.3	10'/0h	30'/10'	1h/30'	2h/1h
peptídeos identificados		6	6	2	2
razão		0,785	0,314	0,708	0,399
p-value		0,000	0,000	0,000	0,000
Catenin alpha-1	IPI00112963.1	10'/0h	30'/10'	1h/30'	2h/1h
peptídeos identificados		4	4	5	5
razão		1,063	1,800	2,088	1,415
p-value		0,305	0,006	0,000	0,001
60S acidic ribosomal protein P1	IPI00113377.1	10'/0h	30'/10'	1h/30'	2h/1h
peptídeos identificados		16	16	5	5
razão		0,978	1,077	1,140	0,928
p-value		0,000	0,000	0,001	0,000
H/ACA ribonucleoprotein complex subunit 4	IPI00113635.7	10'/0h	30'/10'	1h/30'	2h/1h
peptídeos identificados		4	4	2	2
razão		0,971	1,191	1,390	1,128
p-value		0,661	0,008	0,237	0,262
Junctophilin-2	IPI00113638.1			1h/30'	2h/1h
peptídeos identificados				2	2
razão				0,577	4,469
p-value				0,131	0,028
Myc box-dependent-interacting protein 1	IPI00114352.1	10'/0h	30'/10'		
peptídeos identificados		2	2		
razão		1,294	0,541		
p-value		0,157	0,061		
Myosin-11	IPI00114894.1	10'/0h	30'/10'	1h/30'	2h/1h
peptídeos identificados		1	1	1	1
razão		12,332	1,657	0,145	4,106
p-value		1,000	1,000	1,000	1,000
Septin-2	IPI00114945.1	10'/0h	30'/10'	1h/30'	2h/1h
peptídeos identificados		16	16	5	5
razão		1,282	1,855	1,826	1,709
p-value		0,000	0,000	0,000	0,000
Lens epithelium-derived growth factor	IPI00115257.1	10'/0h	30'/10'	1h/30'	2h/1h
peptídeos identificados		10	10	4	4
razão		0,652	1,589	0,963	1,570
p-value		0,000	0,000	0,000	0,000
Treacle protein	IPI00115660.1	10'/0h	30'/10'	1h/30'	2h/1h
peptídeos identificados		4	4	3	3
razão		0,979	0,453	2,054	0,354
p-value		0,555	0,000	0,006	0,002
22 kDa protein	IPI00116120.3	10'/0h	30'/10'	1h/30'	2h/1h
peptídeos identificados		10	10	3	3
razão		1,094	1,108	0,759	0,864
p-value		0,002	0,000	0,000	0,000
Isoform Cw17 of Splicing Factor 1	IPI00116284.4	10'/0h	30'/10'	1h/30'	2h/1h
peptídeos identificados		18	18	10	10
razão		1,287	0,869	1,106	0,585
p-value		0,000	0,000	0,001	0,000
Polymerase I and Transcript Release Factor.	IPI00117689.1	10'/0h	30'/10'	1h/30'	2h/1h
peptídeos identificados		1	1	1	1
razão		0,018	0,631	2,852	0,614
p-value		1,000	1,000	1,000	1,000
Elongation Factor 1-Delta.	IPI00118875.5	10'/0h	30'/10'	1h/30'	2h/1h
peptídeos identificados		40	40	20	20
razão		0,926	1,178	1,224	0,838
p-value		0,000	0,836	0,000	0,000
Calnexin	IPI00119618.1	10'/0h	30'/10'	1h/30'	2h/1h
peptídeos identificados		32	32	15	15
razão		0,641	2,613	0,718	7,281
p-value		0,000	0,000	0,000	0,000

Proteína / Peptídeos identificados / Razão / p-value	Nº acesso IPI	Indução BMP2/peptídeos encontrados			
Xrn2 5'-3' exoribonuclease 2	IPI00120046.1	10'/0h	30'/10'	1h/30'	2h/1h
peptídeos identificados		4	4	2	2
razão		0,900	1,878	1,143	1,674
p-value		0,024	0,000	0,556	0,147
DEAD box protein 21 Nucleolar RNA helicase 2	IPI00120691.3	10'/0h	30'/10'	1h/30'	2h/1h
peptídeos identificados		26	26	6	6
razão		0,608	2,411	1,227	5,071
p-value		0,000	0,000	0,001	0,000
Nuclease-sensitive element-binding protein 1	IPI00120886.3	10'/0h	30'/10'	1h/30'	2h/1h
peptídeos identificados		2	2	1	1
razão		1,434	0,810	0,761	0,189
p-value		0,002	0,039	1,000	1,000
Isoform 3 of Ribosome-binding protein 1	IPI00121149.1			1h/30'	2h/1h
peptídeos identificados				7	7
razão				0,774	3,230
p-value				0,002	0,000
Thioredoxin-related transmembrane protein 1	IPI00121341.1			1h/30'	2h/1h
peptídeos identificados				1	1
razão				0,355	7,547
p-value				1,000	1,000
GPN-loop GTPase 1	IPI00122054.1	10'/0h	30'/10'	1h/30'	2h/1h
peptídeos identificados		2	2	2	2
razão		1,294	1,266	1,081	1,360
p-value		0,117	0,069	0,478	0,348
Caldesmon 1	IPI00122450.1	10'/0h	30'/10'	1h/30'	2h/1h
peptídeos identificados		2	2	1	1
razão		1,094	0,643	0,830	0,591
p-value		0,008	0,016	1,000	1,000
Ser/Thr-Protein Phosphatase 6 Regulatory Subunit 3	IPI00122858.1	10'/0h	30'/10'		
peptídeos identificados		3	3		
razão		4,631	1,538		
p-value		0,612	0,062		
Myosin-9	IPI00123181.4	10'/0h	30'/10'		
peptídeos identificados		16	16		
razão		0,833	4,260		
p-value		0,000	0,000		
A-kinase anchor protein 12	IPI00123709.1	10'/0h	30'/10'	1h/30'	2h/1h
peptídeos identificados		6	6	11	11
razão		1,157	0,929	0,949	0,961
p-value		0,001	0,130	0,021	0,231
Chloride channel, nucleotide-sensitive, 1A	IPI00124248.1	10'/0h	30'/10'	1h/30'	2h/1h
peptídeos identificados		14	14	4	4
razão		0,856	1,118	1,187	0,633
p-value		0,000	0,000	0,001	0,000
of Band 4.1-like protein 3	IPI00125501.1	10'/0h	30'/10'	1h/30'	2h/1h
peptídeos identificados		2	2	2	2
razão		0,932	0,868	0,972	0,988
p-value		0,223	0,033	0,761	0,051
LAG1 longevity assurance homolog 2	IPI00126253.1	10'/0h	30'/10'		
peptídeos identificados		4	4		
razão		0,543	3,998		
p-value		0,000	0,000		
Lamina-associated polypeptide 2, isoforms alpha/zeta	IPI00126338.5	10'/0h	30'/10'		
peptídeos identificados		2	2		
razão		0,387	3,525		
p-value		0,007	0,001		
Zinc finger Ran-binding domain-containing protein 2	IPI00126804.6	10'/0h	30'/10'	1h/30'	2h/1h
peptídeos identificados		2	4	5	5
razão		1,155	0,672	1,356	0,732
p-value		0,017	0,000	0,000	0,000
Small acidic protein	IPI00127941.1	10'/0h	30'/10'	1h/30'	2h/1h
peptídeos identificados		6	6	3	3
razão		1,114	1,041	0,855	0,677
p-value		0,168	0,188	0,171	0,007
Prostaglandin E synthase 3	IPI00127989.1	10'/0h	30'/10'	1h/30'	2h/1h
peptídeos identificados		10	10	3	3
razão		0,852	1,022	1,796	0,890
p-value		0,000	0,045	0,001	0,061
of General vesicular transport factor p115	IPI00128071.7	10'/0h	30'/10'		
peptídeos identificados		2	2		
razão		0,920	2,933		
p-value		0,499	0,075		
Ras GTPase-activating protein-binding protein 1	IPI00130095.1	10'/0h	30'/10'	1h/30'	2h/1h
peptídeos identificados		8	8	4	4
razão		1,115	0,923	2,151	1,009
p-value		0,000	0,000	0,000	0,151

Proteína / Peptídeos identificados / Razão / p-value	Nº acesso IPI	Indução BMP2/peptídeos encontrados			
Bag Family Molecular Chaperone Regulator 2	IPI00130304.1			1h/30'	2h/1h
peptídeos identificados				1	1
razão				1,516	0,512
p-value				1,000	1,000
Microtubule-associated protein 1B	IPI00130920.1	10'/0h	30'/10'		
peptídeos identificados		3	3		
razão		2,004	5,437		
p-value		0,964	0,583		
Calcium-regulated heat stable protein 1	IPI00133349.1			1h/30'	2h/1h
peptídeos identificados				3	3
razão				0,996	0,671
p-value				0,000	0,000
DNA Topoisomerase 2-beta	IPI00135443.2	10'/0h	30'/10'		
peptídeos identificados		2	2		
razão		0,051	26,138		
p-value		0,000	0,000		
Monocarboxylate Transporter 1	IPI00137194.1			1h/30'	2h/1h
peptídeos identificados				3	3
razão				1,257	1,489
p-value				0,284	0,019
60S acidic ribosomal protein P2	IPI00139795.2	10'/0h	30'/10'	1h/30'	2h/1h
peptídeos identificados		12	12	4	4
razão		0,712	1,115	0,878	0,726
p-value		0,000	0,000	0,007	0,000
Cytoplasmic dynein 1 light intermediate chain 1	IPI00153421.1	10'/0h	30'/10'	1h/30'	2h/1h
peptídeos identificados		2	2	2	2
razão		0,668	1,027	1,079	1,276
p-value		0,046	0,219	0,578	0,181
Ataxin-2-like protein	IPI00169500.3	10'/0h	30'/10'		
peptídeos identificados		2	2		
razão		1,207	0,737		
p-value		0,233	0,157		
Periphrilin-1	IPI00169907.1	10'/0h	30'/10'	1h/30'	2h/1h
peptídeos identificados		6	6	3	3
razão		1,094	0,722	1,217	0,472
p-value		0,004	0,000	0,099	0,000
Eukaryotic translation initiation factor 4B	IPI00221581.1	10'/0h	30'/10'	1h/30'	2h/1h
peptídeos identificados		52	52	22	22
razão		1,007	0,803	0,922	0,573
p-value		0,947	0,000	0,009	0,000
Charged Multivesicular Body Protein 2B	IPI00222386.3	10'/0h	30'/10'		
peptídeos identificados		2	2		
razão		1,019	1,275		
p-value		0,876	0,261		
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	IPI00223253.1	10'/0h	30'/10'	1h/30'	2h/1h
peptídeos identificados		4	4	2	2
razão		1,651	0,989	1,654	0,857
p-value		0,001	0,690	0,049	0,047
Glycylpeptide N-tetradecanoyltransferase 1	IPI00224128.7			1h/30'	2h/1h
peptídeos identificados				2	2
razão				0,884	1,055
p-value				0,598	0,517
Protein IWS1 homolog	IPI00224200.1	10'/0h	30'/10'		
peptídeos identificados		2	2		
razão		1,155	0,736		
p-value		0,130	0,021		
Matrix-Remodeling-Associated Protein 7	IPI00226263.5	10'/0h	30'/10'	1h/30'	2h/1h
peptídeos identificados		6	6	2	2
razão		1,330	0,879	0,507	2,683
p-value		0,001	0,015	0,046	0,002
Vimentin	IPI00227299.6	10'/0h	30'/10'	1h/30'	2h/1h
peptídeos identificados		2	2	2	2
razão		0,947	1,015	2,676	0,721
p-value		0,359	0,467	0,250	0,160
Microfibrillar-Associated Protein 1	IPI00228590.2	10'/0h	30'/10'		
peptídeos identificados		2	2		
razão		0,819	0,724		
p-value		0,019	0,013		
Isoform 3 of Band 4.1-like protein 3	IPI00229295.1	10'/0h	30'/10'		
peptídeos identificados		2	2		
razão		1,201	0,962		
p-value		0,166	0,381		
Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate	IPI00229534.5	10'/0h	30'/10'	1h/30'	2h/1h
peptídeos identificados		29	29	19	19
razão		8,410	0,648	1,036	0,727
p-value		0,006	0,000	0,401	0,000

Proteína / Peptídeos identificados / Razão / p-value	Nº acesso IPI	Indução BMP2/peptídeos encontrados			
Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit B	IPI00229859.1	10/0h	30/10'	1h/30'	2h/1h
peptídeos identificados		8	8	6	6
razão		1,641	1,460	1,260	1,571
p-value		0,133	0,000	0,012	0,015
Plectin	IPI00230061.2	10/0h	30/10'	1h/30'	2h/1h
peptídeos identificados		4	4	4	4
razão		1,229	1,507	1,138	1,740
p-value		0,000	0,000	0,018	0,000
Histone H1.5	IPI00230133.5	10/0h	30/10'	1h/30'	2h/1h
peptídeos identificados		10	10	5	5
razão		0,623	0,540	0,662	3,064
p-value		0,000	0,000	0,000	0,000
Importin subunit alpha-3	IPI00230429.4	10/0h	30/10'	1h/30'	2h/1h
peptídeos identificados		6	6	5	5
razão		0,917	1,662	1,799	1,725
p-value		0,014	0,000	0,000	0,000
Nuclear Mitotic Apparatus Protein 1	IPI00263048.2	10/0h	30/10'	1h/30'	2h/1h
peptídeos identificados		2	2	2	2
razão		0,525	2,555	1,699	1,912
p-value		0,013	0,000	0,431	0,160
Marcks-Related Protein	IPI00281011.7	10/0h	30/10'	1h/30'	2h/1h
peptídeos identificados		4	4	3	3
razão		0,875	0,623	0,933	0,400
p-value		0,040	0,001	0,000	0,000
Arginine/Serine-Rich Splicing Factor 6	IPI00310880.4	10/0h	30/10'		
peptídeos identificados		2	2		
razão		0,958	0,682		
p-value		0,028	0,018		
Leiomodin 1	IPI00311422.5			1h/30'	2h/1h
peptídeos identificados				1	1
razão				0,450	1,432
p-value				1,000	1,000
Hepatoma-Derived Growth Factor	IPI00313817.1	10/0h	30/10'	1h/30'	2h/1h
peptídeos identificados		10	10	7	7
razão		0,831	1,017	0,960	0,628
p-value		0,003	0,756	0,387	0,006
High Mobility Group Protein HMG-I	IPI00314240.5	10/0h	30/10'	1h/30'	2h/1h
peptídeos identificados		22	22	15	15
razão		0,608	1,995	0,648	1,475
p-value		0,000	0,000	0,000	0,000
Hematological and Neurological Expressed Protein1	IPI00314755.5	10/0h	30/10'	1h/30'	2h/1h
peptídeos identificados		12	12	6	6
razão		0,850	0,819	0,582	0,524
p-value		0,000	0,000	0,000	0,000
60S Acidic Ribosomal Protein P0	IPI00314950.2	10/0h	30/10'	1h/30'	2h/1h
peptídeos identificados		10	10	11	11
razão		0,940	2,010	1,132	2,510
p-value		0,026	0,000	0,132	0,000
Nucleolin	IPI00317794.5	10/0h	30/10'	1h/30'	2h/1h
peptídeos identificados		26	26	9	9
razão		0,909	1,497	1,278	0,711
p-value		0,022	0,006	0,000	0,000
Nucleolar Protein 56	IPI00318048.5	10/0h	30/10'	1h/30'	2h/1h
peptídeos identificados		10	10	1	1
razão		0,734	1,989	1,340	2,361
p-value		0,000	0,000	1,000	1,000
Spectrin Beta Chain 1	IPI00319830.7	10/0h	30/10'	1h/30'	2h/1h
peptídeos identificados		4	4	2	2
razão		1,088	1,154	1,379	1,520
p-value		0,211	0,003	0,029	0,030
Membrane Associated Progesterone Receptor Component 1	IPI00319973.3	10/0h	30/10'	1h/30'	2h/1h
peptídeos identificados		36	36	10	10
razão		1,629	1,364	0,724	2,751
p-value		0,000	0,000	0,000	0,000
Elongation Factor 1 beta		10/0h	30/10'	1h/30'	2h/1h
peptídeos identificados		26	26	11	11
razão		0,634	1,480	0,890	0,957
p-value		0,000	0,000	0,000	0,000
Eukaryotic Translation Factor 3 Subunit C	IPI00321647.2			1h/30'	2h/1h
peptídeos identificados				1	1
razão				1,326	1,726
p-value				1,000	1,000
Transcriptional Regulator ATRX	IPI00322707.5	10/0h	30/10'	1h/30'	2h/1h
peptídeos identificados		2	2	1	1
razão		0,582	1,834	1,024	1,131
p-value		0,001	0,016	1,000	1,000

Proteína / Peptídeos identificados / Razão / p-value	Nº acesso IPI	Indução BMP2/peptídeos encontrados / razão			
Putative Uncharacterized Protein	IPI00323820.4	10'/0h	30'/10'		
peptídeos identificados		9	9		
razão		0,926	4,115		
p-value		0,355	0,016		
Pleckstrin Homology-Like Domain Family B Member 2	IPI00330773.3	10'/0h	30'/10'	1h/30'	2h/1h
peptídeos identificados		4	4	2	2
razão		1,136	0,853	1,093	0,606
p-value		0,087	0,066	0,274	0,054
Myb-Binding Protein 1A	IPI00331361.2	10'/0h	30'/10'	1h/30'	2h/1h
peptídeos identificados		8	8	5	5
razão		0,635	1,982	0,837	3,515
p-value		0,000	0,000	0,290	0,001
High Mobility Group Protein HMGI-C	IPI00331612.3	10'/0h	30'/10'	1h/30'	2h/1h
peptídeos identificados		32	32	10	10
razão		0,870	1,268	0,390	3,671
p-value		0,000	0,000	0,001	0,000
Proteasome Subunit Alpha Type-3	IPI00331644.5	10'/0h	30'/10'	1h/30'	2h/1h
peptídeos identificados		23	23	10	10
razão		1,334	1,844	0,995	1,935
p-value		0,020	0,000	0,589	0,000
Non-Histone Chromosomal Protein HMG-14	IPI00338745.4	10'/0h	30'/10'	1h/30'	2h/1h
peptídeos identificados		2	2	1	1
razão		1,241	0,759	0,734	0,136
p-value		0,080	0,019	1,000	1,000
La-Related Protein 7	IPI00340860.5	10'/0h	30'/10'	1h/30'	2h/1h
peptídeos identificados		2	2	2	2
razão		1,126	0,616	1,546	0,930
p-value		0,000	0,015	0,000	0,000
Nuclear Ubiquitous Casein Kinase Substrate	IPI00341869.5	10'/0h	30'/10'	1h/30'	2h/1h
peptídeos identificados		26	26	21	21
razão		0,842	0,866	0,917	0,544
p-value		0,000	0,000	0,043	0,000
28 Kda Heat- and Acid-Stable Phosphoprotein	IPI00352475.3	10'/0h	30'/10'	1h/30'	2h/1h
peptídeos identificados		30	30	7	7
razão		1,079	0,962	0,911	0,573
p-value		0,003	0,065	0,001	0,000
Fermtrophin (Arhgef) and Pleckstrin Domain Protein 1	IPI00356904.7	10'/0h	30'/10'	1h/30'	2h/1h
peptídeos identificados		2	2	2	2
razão		1,550	0,939	2,835	0,889
p-value		0,091	0,447	0,125	0,455
Tensin 1	IPI00378438.6	10'/0h	30'/10'	1h/30'	2h/1h
peptídeos identificados		2	2	2	2
razão		1,938	1,409	1,101	1,355
p-value		0,015	0,003	0,000	0,000
ATP-Binding Cassette Sub-Family F Member 1	IPI00396671.1	10'/0h	30'/10'		
peptídeos identificados		4	4		
razão		0,514	3,409		
p-value		0,030	0,001		
Nexilin	IPI00400168.2	10'/0h	30'/10'	1h/30'	2h/1h
peptídeos identificados		34	34	15	15
razão		1,5674	0,7989	0,6361	0,9266
p-value		0,0000	0,0000	0,0000	0,1134
Pleckstrin Homology Domain-Containing Family O,2	IPI00403031.5	10'/0h	30'/10'		
peptídeos identificados		2	2		
razão		1,900	0,887		
p-value		0,029	0,052		
Rho GTPase-Activating Protein 1	IPI00404970.2	10'/0h	30'/10'	1h/30'	2h/1h
peptídeos identificados		2	2	2	2
razão		1,307	0,905	1,000	1,590
p-value		0,010	0,133	0,983	0,015
Microtubule-Associated Protein 4	IPI00408119.6	10'/0h	30'/10'	1h/30'	2h/1h
peptídeos identificados		6	6	2	2
razão		1,124	0,678	1,100	0,690
p-value		0,250	0,000	0,344	0,023
Bcl-2-Associated Transcription Factor 1	IPI00415385.1	10'/0h	30'/10'	1h/30'	2h/1h
peptídeos identificados		16	16	6	6
razão		1,027	0,650	2,060	0,646
p-value		0,016	0,000	0,001	0,002
Ubiquitin Carboxyl-Terminal Hydrolase 10	IPI00420601.5	10'/0h	30'/10'		
peptídeos identificados		2	2		
razão		0,615	1,057		
p-value		0,116	0,797		
Eukaryotic Translation Initiation Factor 4 Gamma 1	IPI00421179.1			1h/30'	2h/1h
peptídeos identificados				1	1
razão				1,028	2,138
p-value				1,000	1,000

Proteína / Peptídeos identificados / Razão / p-value	Nº acesso IPI	Indução BMP2/peptídeos encontrados / razão			
Swi5-Dependent Recombination DNA Repair Homolog	IPI00458153.2	10'/0h	30'/10'	1h/30'	2h/1h
peptídeos identificados		26	26	6	6
razão		0,822	1,251	1,346	0,572
p-value		0,003	0,044	0,000	0,000
182 Kda Tankyrase-1-Binding Protein	IPI00459443.5	10'/0h	30'/10'	1h/30'	2h/1h
peptídeos identificados		4	4	3	3
razão		1,256	1,094	1,118	0,830
p-value		0,000	0,001	0,080	0,019
E3 Ubiquitin-Protein Ligase Nedd4	IPI00462445.2	10'/0h	30'/10'		
peptídeos identificados		4	4		
razão		5,416	2,364		
p-value		0,184	0,011		
Ferm Domain-Containing Protein 4a	IPI00465706.2	10'/0h	30'/10'		
peptídeos identificados		4	4		
razão		1,629	0,903		
p-value		0,128	0,217		
Sh3 Domain-Containing Kinase-Binding Protein 1	IPI00466258.2			1h/30'	2h/1h
peptídeos identificados				1	1
razão				0,805	0,367
p-value				1,000	1,000
Isoform 2 of DNA (Cytosine-5)-Methyltransferase 1	IPI00469323.1	10'/0h	30'/10'		
peptídeos identificados		2	2		
razão		0,624	3,016		
p-value		0,045	0,007		
Ahnak Nucleoprotein	IPI00553798.2	10'/0h	30'/10'	1h/30'	2h/1h
peptídeos identificados		103	103	46	46
razão		0,880	1,450	1,474	0,715
p-value		0,000	0,020	0,000	0,000
Heat Shock Protein Hsp 90-Beta	IPI00554929.2	10'/0h	30'/10'	1h/30'	2h/1h
peptídeos identificados		46	46	19	19
razão		0,800	1,575	1,320	1,173
p-value		0,000	0,000	0,000	0,000
Thyroid Hormone Receptor-Associated Protein 3	IPI00556768.1	10'/0h	30'/10'	1h/30'	2h/1h
peptídeos identificados		4	4	3	3
razão		1,000	0,705	1,686	0,664
p-value		0,870	0,000	0,005	0,000
Serine/Arginine Repetitive Matrix Protein 1	IPI00605037.1	10'/0h	30'/10'	1h/30'	2h/1h
peptídeos identificados		10	18	5	5
razão		0,912	0,605	1,659	0,565
p-value		0,022	0,000	0,000	0,013
Isoform A of Prelamin-A/C	IPI00620256.3	10'/0h	30'/10'	1h/30'	2h/1h
peptídeos identificados		42	42	29	29
razão		1,234	1,037	1,118	0,669
p-value		0,000	0,230	0,000	0,000
Isoform 2 of Yorkie Homolog	IPI00621717.2	10'/0h	30'/10'		
peptídeos identificados		2	2		
razão		1,503	0,485		
p-value		0,003	0,009		
FACT COMPLEX SUBUNIT SSRP1.	IPI00652593.2	10'/0h	30'/10'	1h/30'	2h/1h
peptídeos identificados		12	12	1	1
razão		0,931	1,589	1,492	1,172
p-value		0,031	0,000	1,000	1,000
Leucine-Rich Repeat Flightless-Interacting Protein 1	IPI00654388.2	10'/0h	30'/10'	1h/30'	2h/1h
peptídeos identificados		10	10	3	3
razão		1,025	0,741	1,171	0,723
p-value		0,000	0,000	0,045	0,090
Chromobox Homolog 3		10'/0h	30'/10'	1h/30'	2h/1h
peptídeos identificados	IPI00677454.2	28	28	13	13
razão		0,934	0,883	1,148	0,532
p-value		0,000	0,000	0,000	0,000
Nucleolar and Coiled-Body Phosphoprotein 1 Isoform D	IPI00719871.1	10'/0h	30'/10'	1h/30'	2h/1h
peptídeos identificados		2	2	3	3
razão		0,573	1,537	0,947	3,516
p-value		0,020	0,004	0,063	0,000
Mitochondrial Import Receptor Subunit Tom22 Homolog	IPI00751137.1	10'/0h	30'/10'		
peptídeos identificados		2	2		
razão		1,379	2,513		
p-value		0,016	0,003		
Eukaryotic Translation Initiation Factor 5b	IPI00756424.3	10'/0h	30'/10'	1h/30'	2h/1h
peptídeos identificados		18	18	8	8
razão		0,890	1,547	1,045	2,503
p-value		0,003	0,000	0,012	0,000
of Lim Domain and Actin-Binding Protein, beta	IPI00759925.1	10'/0h	30'/10'	1h/30'	2h/1h
peptídeos identificados		22	22	10	10
razão		1,456	0,786	0,861	1,010
p-value		0,000	0,000	0,000	0,723

Proteína / Peptídeos identificados / Razão / p-value	Nº acesso IPI	Indução BMP2/peptídeos encontrados / razão			
Ubiquitin-Associated Protein 2-Like	IPI00761937.1	10/0h	30/10'		
peptídeos identificados		2	2		
razão		1,256	0,649		
p-value		0,009	0,027		
ATP-Citrate Synthase	IPI00762047.1			1h/30'	2h/1h
peptídeos identificados				1	1
razão				0,878	1,005
p-value				1,000	1,000
Cordon-Bleu Protein-Like 1	IPI00762331.2			1h/30'	2h/1h
peptídeos identificados				2	2
razão				2,217	0,637
p-value				0,000	0,000
ATP-Binding Cassette Sub-Family F Member 1	IPI00762360.1			1h/30'	2h/1h
peptídeos identificados				7	7
razão				0,922	3,333
p-value				0,335	0,001
Serine/Arginine Repetitive Matrix Protein 2	IPI00785240.1	10/0h	30/10'	1h/30'	2h/1h
peptídeos identificados		16	16	6	6
razão		1,216	0,721	1,623	0,541
p-value		0,001	0,000	0,008	0,018
Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein A1	IPI00817004.1	10/0h	30/10'	1h/30'	2h/1h
peptídeos identificados		10	10	3	3
razão		0,905	0,976	1,233	0,630
p-value		0,008	0,092	0,002	0,007
Lamina-Associated Polypeptide 2 Isoform Delta	IPI00828461.1	10/0h	30/10'	1h/30'	2h/1h
peptídeos identificados		8	8	2	2
razão		0,575	2,776	0,624	12,087
p-value		0,000	0,000	0,033	0,004
Acidic Leucine-Rich Nuclear Phosphoprotein 32, B	IPI00831258.1			1h/30'	2h/1h
peptídeos identificados				6	6
razão				1,038	0,851
p-value				0,007	0,000
TGF Beta-1-Induced Transcript 1 Protein	IPI00850187.1			1h/30'	2h/1h
peptídeos identificados				3	3
razão				0,522	0,676
p-value				0,000	0,015
Uncharacterized Protein	IPI00850843.2			1h/30'	2h/1h
peptídeos identificados				1	1
razão				1,124	0,914
p-value				1,000	1,000
Protein Dpy-19 Homolog 1	IPI00857720.1	10/0h	30/10'		
peptídeos identificados		1	1		
razão		0,077	18,666		
p-value		1,000	1,000		
Palladin	IPI00858000.1	10/0h	30/10'	1h/30'	2h/1h
peptídeos identificados		16	16	6	6
razão		1,479	1,289	0,841	0,696
p-value		0,000	0,000	0,000	0,000
Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein C2	IPI00874321.1	10/0h	30/10'		
peptídeos identificados		1	1		
razão		0,132	13,642		
p-value		1,000	1,000		
Hepatoma-Derived Growth Factor-Related Protein 2	IPI00875101.1	10/0h	30/10'	1h/30'	2h/1h
peptídeos identificados		22	22	4	4
razão		1,137	0,739	1,531	0,738
p-value		0,000	0,000	0,003	0,000
Probable ATP-Dependent Rna Helicase Ddx10	IPI00896604.1	10/0h	30/10'	1h/30'	2h/1h
peptídeos identificados		2	2	1	1
razão		0,620	2,217	1,328	2,210
p-value		0,000	0,011	1,000	1,000
Protein Prrc2c	IPI00903422.1			1h/30'	2h/1h
peptídeos identificados				2	2
razão				1,314	0,737
p-value				0,000	0,000
Tyrosine-Protein Kinase Baz1b	IPI00923656.1	10/0h	30/10'	1h/30'	2h/1h
peptídeos identificados		2	2	2	2
razão		0,376	5,182	0,771	3,806
p-value		0,093	0,133	0,269	0,103
La-Related Protein 1	IPI00929786.1	10/0h	30/10'		
peptídeos identificados		2	2		
razão		1,235	1,511		
p-value		0,364	0,410		
High Mobility Group Protein Hmg-I/Hmg-Y Isoform C	IPI00954313.1	10/0h	30/10'		
peptídeos identificados		8	8		
razão		0,772	1,276		
p-value		0,000	0,003		

SÚMULA CURRICULAR

Dados Pessoais

Nome: Erik Halcsik

Local e data de nascimento: São Paulo, 29 de abril de 1985

EDUCAÇÃO

Ensino Médio: Colégio São Luís, São Paulo, 2002

Graduação: Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 2007.

Bacharel em Ciências Biomédicas

FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

EMBO Course on Phosphoproteomics, Odense, Dinamarca. 2010.

OCUPAÇÃO

Bolsista de Doutorado, FAPESP, vigência da bolsa: 08/2008 a 10/2012

PUBLICAÇÕES (Artigos Completos e Resumos em Congressos)

Artigos completos

BUSTOS-VALENZUELA JC, FUJITA A, **HALCSIK E**, GRANJEIRO JM, SOGAYAR MC. BMC Res Notes. 2011 Sep 26;4:370. Unveiling novel genes upregulated by both rhBMP2 and rhBMP7 during early osteoblastic transdifferentiation of C2C12 cells.

BUSTOS-VALENZUELA JC, **HALCSIK E**, BASSI EJ, DEMASI MA, GRANJEIRO JM, SOGAYAR MC. Expression, purification, bioactivity, and partial characterization of a recombinant human bone morphogenetic protein-7 produced in human 293T cells. Mol Biotechnol. 2010 Oct;46(2):118-26.

Resumo em congressos

XXXIX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular - SBBq. Novel players in osteoblastic differentiation of mesenchymal stem cells revealed by mass spectrometry of phosphorylated substrates. 2011.

XXXVIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular - SBBq. Expression, Purification and Bioactivity of a Recombinant Human BMP-7 Expressed in 293T Cells. 2009.

Third Brazilian Mass Spectrometry Congress - BrMass. Phosphoproteomic analysis of murine skin-derived adult stem cells during osteoblastic differentiation using IMAC and LC-MALDI/TOF. 2009.

SBPz - XXIII Reunião da Sociedade de Protozoologia/XXXIV Reunião para Pesquisa Básica em Doença de Chagas. Eukaryotic translation initiation factor 2 (eIF2 α) has a punctuated distribution in the cytosol of trypanosomes. 2007.

XIV Congresso de Iniciação Científica da UNIFESP. Caracterização do mutante M62 de *Candida albicans* obtido por recombinação homóloga direcionada ao gene *CaRix7*, utilizando o método URA-Blaster. 2006.

SBBq - Reunião anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular. 2005.

XIII Congresso de Iniciação Científica da UNIFESP. Produção em larga escala de isoformas do antígeno gp43 recombinante em *Pichia pastoris*. 2005.