

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO



MAIDY REHDER WIMMERS FERREIRA

Avaliação do perfil de expressão gênica em grande escala de células indiferenciadas da polpa e de células odontoblásticas utilizando cDNA *microarray*

> Ribeirão Preto 2011

MAIDY REHDER WIMMERS FERREIRA

Avaliação do perfil de expressão gênica em grande escala de células indiferenciadas da polpa e de células odontoblásticas utilizando cDNA *microarray*

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Odontologia. Área de concentração: Biologia Oral

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Karina Fittipaldi Bombonato Prado

Ribeirão Preto 2011 AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Catalogação na Publicação

Serviço de Documentação Odontológica

Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

Ferreira, Maidy Rehder Wimmers

Avaliação do perfil de expressão gênica em grande escala de células indiferenciadas da polpa e de células odontoblásticas utilizando cDNA *microarray*. Ribeirão Preto, 2011.

112 p; 30 cm

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/USP. Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Área de concentração: Biologia Oral.

Orientador: Prof^a Dr^a Karina Fittipaldi Bombonato Prado

1. Células indiferenciadas da polpa 2. Células odontoblásticas

3. Expressão gênica 4. cDNA microarray

FOLHA DE APROVAÇÃO

Maidy Rehder Wimmers Ferreira

Avaliação do perfil de expressão gênica em grande escala de células indiferenciadas da polpa e de células odontoblásticas utilizando cDNA *microarray*.

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Odontologia. Área de concentração: Biologia Oral

Aprovado em: _____de _____de 2011.

Banca Examinadora

Prof. Dr	
Instituição:	_Assinatura:
Prof. Dr	
Instituição:	Assinatura:
Prof. Dr	
Instituição:	Assinatura:

Dedicatória

Dedico este trabalho primeiramente a Deus que me deu a vida. À minha mãe, Monica, que foi um exemplo de perseverança e alegria. Ao meu pai, Sergio, que me ensinou que para vencer na vida é preciso ter força de vontade e amor em tudo que se faz. Dedico este trabalho também ao meu irmão Samuel, que esteve ao meu lado em todos os momentos.

Agradecimento especial

Agradeço à Prof^a. Dr^a. Karina Fittipaldi Bombonato Prado, que me apresentou à pesquisa e que me orientou nas iniciações científicas e no mestrado. Por ter acreditado e confiado em mim, e pela paciência e compreensão em todos os momentos difíceis. Obrigada por tudo!

Agradecímentos

Agradeço,

Ao Roger Rodrigo Fernandes, técnico do Laboratório de Cultura de Células, e à Fabiola Singareti de Oliveira, técnica do Laboratório de Biologia Molecular, por me ensinarem com paciência as técnicas utilizadas neste trabalho, e por sempre poder contar com eles.

A todos os colegas e amígos do curso de pós-graduação, em especial à Glauce, Yamba e Lílian, pela cumplicidade e apoio sempre.

À mínha amiga Taísa, pela amizade síncera que temos desde a graduação, dedicação e carinho em todos estes momentos de mínha vída. Obrigada pela sua amizade.

Ao meu namorado Gabríel Rodrígues Alves Margarido, pelo companheirismo e exemplo por seus esforços e dedicações. Por sempre me estimular a alcançar meus objetivos.

A todos os meus amigos e familiares pelos incentivos e pelo apoio nos momentos difíceis.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Cultura de Células e do Laboratório de Imunogenética Molecular pelas alegrias, ensinamentos e colaborações.

Ao Prof. Dr. Geraldo A. S. Passos e sua equipe pela disponibilização e auxilio para a realização de alguns experimentos em seu laboratório. À Janaína por sua paciência e disponibilidade. Obrigada por compartilhar comigo seus conhecímentos e pela sua inestimável ajuda neste trabalho.

Aos professores do Departamento de Morfología, Estomatología e Físiología e do Departamento de Materiais Dentários e Prótese, pelas disciplinas que contribuíram para minha formação.

À Prof^a Dr^a Suzie Aparecida de Lacerda, pela fundamental colaboração e ensinamentos no projeto PAE.

Aos funcionários da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, pela dedicação e auxílio.

À Fundação de Amparo à Pesquísa do Estado de São Paulo pelo apoio financeiro, fundamental para realização deste trabalho. E pela bolsa de mestrado concedida.

Enfím, agradeço a todos que foram imprescindíveis para a realização deste trabalho.

"Comece fazendo o que é necessário, depois o que é possível, e de repente você estará fazendo o impossível."

São Francísco de Assís

Resumo

Resumo

Ferreira, M.R.W. Avaliação do perfil de expressão gênica em grande escala de células indiferenciadas da polpa e de células odontoblásticas utilizando cDNA *microarray*. Ribeirão Preto, 2011. 112 p. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Departamento de Morfologia, Estomatologia e Fisiologia, Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

O extraordinário potencial regenerativo do complexo dentino-pulpar enfatiza a importância da caracterização dos processos celulares e moleculares envolvidos na regeneração dentinária. O avanço da pesquisa com células-tronco desencadeou um grande interesse de cultivá-las na presenca de sinais de indução odontogênica. O objetivo do presente trabalho foi avaliar comparativamente células indiferenciadas da polpa (OD-21) e odontoblásticas (MDPC-23) através da avaliação do estímulo celular e do perfil de expressão gênica. As células OD-21 e MDPC-23 foram cultivadas em garrafas de cultura até a subconfluência e, em seguida, cultivadas em placas de 24 poços na concentração de 104 células /poço (n = 5). Os parâmetros analisados foram: (1) proliferação, viabilidade celular e atividade de fosfatase alcalina após 3, 7 e 10 dias; além de detecção e quantificação de matriz mineralizada após 17 dias (o teste estatístico utilizado foi o de Mann-Whitney para p≤0,05); (2) imunofluorescência para proteínas não-colágenas (DSPP е osteopontina) após 1, 3 e 7 dias; (3) análises de expressão transcricional através da tecnologia de cDNA microarray e PCR em tempo real. Os dados de microarrays foram analisados com o auxílio de programas de bioinformática especializados como SAM (significance analysis of microarrays), Cluster-TreeView e GeneNetwork. A expressão gênica foi avalidada pela reação em tempo real em cadeia da polimerase (PCR). Os resultados mostraram que a viabilidade celular ficou acima dos 80% em ambas as células, e que a proliferação celular e a atividade de fosfatase alcalina foram maiores nas células MDPC-23. Foram observados nódulos de mineralização somente na cultura de células odontoblásticas. A osteopontina apresentou-se igualmente presente em ambas as células, enquanto a sialofosfoproteína dentinária foi expressa em maior quantidade nas células MDPC-23. Os resultados demonstraram genes com comportamento semelhante nos dois tipos de células, tais como Bad (morte celular), Erf e Btg1 (proliferação celular), Cxcl10 e II13 (resposta imune) e Arfgef1 (comunicação celular). Além disso, regiões no heatmap mostraram diferenças na indução e repressão de genes, como C1qb (resposta imune), Jak2 (morte, comunicação e proliferação celular), Col4a1 (adesão celular), Rpl6 e Rpl26 (processo metabólico celular). Concluímos que as células OD-21, embora indiferenciadas, compartilham muitos genes com comportamento semelhante à células odontoblásticas MDPC-23, sugerindo seu potencial para se diferenciar em odontoblastos.

Palavras chave: células indiferenciadas da polpa, células odontoblásticas, expressão gênica, cDNA *microarray*.

Abstract

Abstract

Ferreira, M.R.W. Evaluation of large scale gene expression profile of undifferentiated pulp cells and odontoblastic cells using cDNA *microarray*. Ribeirão Preto, 2011. 112 p. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Departamento de Morfologia, Estomatologia e Fisiologia, Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

The extraordinary regenerative potential of pulp-dentin complex leads to the importance of the characterization of cell and molecular processes involved in regeneration of dentin. The advancement of stem cell research sparked great interest in cultivating them in the presence of signs of odontogenic induction. The purpose of the present investigation was to evaluate comparatively undifferentiated pulp cells (OD-21) and odontoblastic cells (MDPC-23) through the assessment of cell stimulation and gene expression profiling. OD-21 and MDPC-23 cells were grown in culture flasks until subconfluence, and then cultured in 24-well plates at a concentration of 10⁴ cells/well (n=5). The parameters analyzed were: (1) proliferation, cell viability and alkaline phosphatase activity after 3, 7 and 10 days, in addition to detection and quantification of mineralized matrix after 17 days (the statistical test used was the Mann-Whitney $p \le 0.05$), (2) immunofluorescence for non-collagen proteins (DSPP and osteopontin) at 1, 3 and 7 days, (3) transcriptional expression analysis using cDNA microarray technology and real-time PCR. The microarray data were analyzed with the aid of specialized bioinformatics programs such as SAM (significance analysis of microarrays), Cluster, TreeView and GeneNetwork. Gene expression was avalided by real-time polymerase chain reaction (PCR). The results showed that cell viability was above 80% in both cells, and cell proliferation and

alkaline phosphatase activity were higher in MDPC-23 cells. Mineralization nodules were observed only in the odontoblastic cell cultures. Osteopontin was present equally in both cells, whereas dentin sialophosphoprotein was higher expressed in MDPC-23 cells. The results showed genes with similar behavior in two cell types, such as Bad (cell death), Erf and Btg1 (cell proliferation), II13 and Cxcl10 (immune response) and Arfgef1 (cell communication). Moreover, regions of the heatmap showed differences in induction and repression of genes, such C1qb (immune response), Jak2 (death, communication and cell proliferation), Col4a1 (cell adhesion), Rpl26 and Rpl6 (cellular metabolic process). We conclude that the OD-21 cells, although undifferentiated, share many genes with similar behavior to the odontoblastic MDPC-23 cells, suggesting their potential to differentiate into odontoblasts.

Keywords: undifferentiated pulp cells, odontoblastic cells, gene expression, cDNA microarray.

Sumário

Sumário

1. Intro	1. Introdução	
2. Revi	2. Revisão de Literatura	
2.1	Dentinogênese	.26
2.2	Linhagens de células indiferenciadas da polpa e odontoblastos	.28
2.3	<i>Microarray</i>	.30
2.3.1	Genes	.30
2.3.2	Microarray	.31
3. Prop	oosição	.34
4. Mate	erial e Métodos	.36
4.1	Cultura da Linhagem Celular	.36
4.2	Métodos de Avaliação do Estímulo Celular	.37
4.2.1	Proliferação celular	.37
4.2.2	Viabilidade celular	.37
4.2.3	Medida da atividade de fosfatase alcalina (ALP)	.38
4.2.4	Detecção e quantificação de matriz mineralizada	.38
4.2.5	Imunolocalização	.39
4.2.6	Análise estatística	.40
4.3	Extração de RNA total das culturas de células	.40
4.4	Eletroforese de RNA total em gel denaturante	.42
4.4.1	Preparação do gel	.42
4.4.2	Preparação das amostras de RNA	.42
4.5	Quantificação de RNA total	.43
4.6	Preparação de cDNA <i>microarray</i> em lâminas de vidro	.43
4.6.1	Bibliotecas de cDNA murinos	.43
4.6.2	Amplificação dos insertos de cDNA para confecção dos <i>microarray</i> s	44
4.6.3	Purificação dos produtos de PCR	.45
4.6.4	Confecção das lâminas de <i>microarray</i>	.46
4.7	Delineamento das hibridações em <i>microarray</i>	.47
4.8	Marcação das sondas complexas de cDNA com fluorocromos Cy3 e Cy5	.49
4.9	Hibridação das lâminas de <i>microarray</i>	.54
4.10	Aquisição de imagens de <i>microarray</i>	.55
4.11 4.12 4.12.1 4.12.2	Quantificação e normalização dos dados de <i>microarray</i> s Análise bioinformática dos dados de <i>microarray</i> Agrupamento hierárquico	.55 .58 .58 .58
4.12.2 4.12.3 4.12.4	Gene Network Cytoscape	.61 .62

4.12.5	FatiGO	.63
4.13	Confirmação dos dados de microarray por PCR em real time	.63
4.13.1	Análise estatística dos dados de qRT-PCR	.64
5. Res	ultados	.67
5.1	Proliferação Celular	.67
5.2	Viabilidade Celular	.67
5.3	Atividade de Fosfatase Alcalina	.68
5.4	Mineralização	.69
5.4.1	Análise qualitativa de depósitos de cálcio	.69
5.4.2	Análise quantitativa de depósitos de cálcio	.69
5.5	Imunolocalização	.70
5.5.1	Morfologia celular	.70
5.5.2	Expressão de proteínas não colágenas	.70
5.6	Análise da expressão gênica transcricional	.74
5.6.1	Avaliação da integridade das preparações de RNA total	.74
5.7	Aquisição de imagens dos microarrays por scanning	.74
5.8	Perfil de expressão gênica	.76
5.9	Rede de interações transcricionais (redes gênicas)	.78
5.9.1	Sub-redes de interações transcricionais	.79
5.10	Confirmação dos dados de microarray por PCR em tempo real	.81
5.11	FatiGO	.82
6. Disc	ussão	.87
6.1	Avaliações do estímulo celular	.87
6.2	Perfis de expressão gênica, redes de interações gênicas e validação por	
PCR		.90
7. Con	clusões	.96
8. Refe	rências Bibliográficas	.98
9. Ane	xos1	09

1. Introdução

1. INTRODUÇÃO

Os implantes dentários constituem um método de reabilitação oral atual bastante investigado e muito bem aceito na prática odontológica, principalmente na substituição de elementos dentários ausentes (TAKAHASHI, T. et al., 2008). Entretanto, fatores como localização, suprimento sanguíneo, qualidade e quantidade de tecido ósseo podem interferir na osteointegração e levar ao sucesso ou fracasso dessa terapia (TOLSTUNOV, 2007).

Na odontologia, estudos de engenharia tecidual vêm crescendo com o intuito de desenvolver técnicas para a manipulação de células-tronco e tratamentos restauradores de tecidos e órgãos bucais. A engenharia tecidual estuda a regeneração funcional e fisiológica de estruturas teciduais perdidas. E baseia-se em três princípios básicos da biologia tecidual: as células-tronco progenitoras, uma matriz que funcione como arcabouço e substâncias indutoras do crescimento e diferenciação celular (SEGUNDO; VASCONCELOS, 2007; SOARES et al., 2007).

Na polpa dentária adulta foram identificadas diferentes células: *fibroblast-like*, neurais, vasculares, perivasculares, mesenquimais indiferenciadas e células relacionadas à resposta imune. Algumas destas células possuem a capacidade de se diferenciarem e participam do processo de reparação das estruturas dentárias (SOUZA, 2008).

Células indiferenciadas mesenquimais estão sendo usadas para aplicações clínicas em engenharia tecidual e na medicina regenerativa (NAKAMURA et al., 2009). No futuro, estratégias de engenharia tecidual dentária poderão ser usadas no tratamento de cáries, periodontites, tratamentos endodônticos, reparo alveolar, fraturas faciais, implantes dentários, aumento da altura do osso alveolar e reparo da cartilagem da articulação temporomandibular (SEGUNDO; VASCONCELOS, 2007).

Os conceitos emergentes sobre engenharia tecidual (LANGER; VACANTI 1993; NAKAHARA; IDE, 2007) colocaram os chamados "dentes biológicos" como alternativa promissora na recomposição de elementos dentários perdidos (SHARPE; YOUNG, 2005). Muitos avanços têm causado expectativas de que tecidos adultos poderiam ser feitos por métodos biológicos, sendo utilizados na regeneração tecidual (SEGUNDO; VASCONCELOS, 2007).

Células indiferenciadas da polpa dentária adulta possuem a capacidade de se proliferar e diferenciar em odontoblastos responsáveis pela formação de dentina e manutenção da integridade dentinária. O avanço da pesquisa com células-tronco desencadeou um grande interesse de cultivá-las na presença de sinais de indução odontogênica, programando-as assim na diferenciação em linhagens dentárias e, com a ajuda de um arcabouço/matriz extracelular, formar um novo dente (YEN; SHARPE, 2008).

Houve uma grande evolução nos estudos da expressão gênica com o surgimento de tecnologias de grande escala para o estudo de perfis de expressão gênica transcricional (transcriptoma). A evolução transcricional conectada a mudanças evolutivas dos genes e fenótipos é de fundamental importância para estimar a taxa de evolução da expressão gênica e para procurar os mecanismos moleculares ainda obscuros responsáveis pela evolução do transcriptoma (LIAO; ZHANG, 2006).

Os cDNA *microarray*s constituem uma tecnologia que possibilita a mensuração da expressão de RNAm de centenas ou mesmo milhares de genes em um único ensaio de hibridização, tornando-se uma ferramenta atrativa para a obtenção de uma visão global do estado de células em termos de expressão transcricional em grande escala (transcriptoma) em diferentes situações fisiológicas ou patológicas.

Já é conhecido que células-tronco da polpa possuem propriedades muito semelhantes às células-tronco mesenquimais, exibindo capacidade de autorenovação e diferenciação em multilinhagens. Entretanto, pouco se sabe sobre as características, propriedades, funções destas células, assim como pouco se sabe sobre os mecanismos genético-moleculares que ocorrem durante a diferenciação celular e seu controle.

Por isso, maiores conhecimentos sobre isolamento de células-tronco, suas localizações específicas, seus mecanismos moleculares de crescimento e diferenciação celular são necessários para que seja possível utilizar a terapia celular na odontologia. (SEGUNDO; VASCONCELOS, 2007)

Linhagens celulares estabelecidas, oriundas de linhagem odontoblástica ou que mimetizam odontoblastos, podem ter utilidade para uma variedade de objetivos como a síntese de moléculas específicas incluindo proteínas, RNAm e DNA para estudo do processo da dentinogênese, estudo de uma variedade de moléculas como hormônios, fatores de crescimento e citocinas para verificar possíveis efeitos na função celular e testes com biomateriais ou situações ambientais com possíveis efeitos na função celular com potencial para alterar a odontogênese (HANKS et al., 1998a).

As linhagens OD-21 e MDPC-23 foram desenvolvidas como uma linhagem celular espontaneamente imortalizada derivada de células da papila dentária do primeiro molar de fetos de camundongos, sendo de células indiferenciadas da polpa e odontoblastos, respectivamente. (HANKS et al., 1998a, 1998b).

23

Nossa hipótese de trabalho foi comparar células indiferenciadas da polpa e células diferenciadas em odontoblastos utilizando a tecnologia dos *microarray*s na identificação dos genes candidatos ao controle do processo da dentinogênese.

2. Revísão de Literatura

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Dentinogênese

A dentina é um tecido conjuntivo avascular e mineralizado que constitui a maior parte da estrutura do dente, sendo responsável pela sustentação do esmalte e proteção da polpa dentária.

Dentinogênese é um processo contínuo de deposição de matriz durante toda a vida do dente. Os odontoblastos formam uma camada de células localizadas na periferia da polpa, secretando primeiramente uma matriz dentinária pouco mineralizada (pré-dentina), sendo responsáveis subsequentemente pela mineralização desta matriz (SIMON et al., 2009). Odontoblastos são células altamente especializadas, de origem mesenquimal, diferenciadas a partir da papila dentária (SASAKI; GARANT, 1996). Eles secretam matriz orgânica e se movem em direção ao centro do dente formando o processo odontoblástico.

Na odontogênese, a formação da dentina é um processo complexo que envolve diversos passos de diferenciação celular; interações epiteliaismesenquimais são consideradas fatores primários para a citodiferenciação de células ectomesenguimais derivadas de células da crista neural em odontoblastos (SUN et al., 1998). Como a dentina é um tecido análogo ao osso, sua matriz extracelular compartilha muitas similaridades com a matriz óssea. Assim, na dentina, o colágeno tipo I representa 97% da matriz orgânica secretada pelos odontoblastos; os restantes 3% da matriz da dentina são constituídos pelas proteínas nãocolágenas, como a sialofosfoproteína (DSPP), proteínas da matriz dentinária (DMP-1, DMP-2, and DMP-3) e pequenas quantidades de osteopontina, osteonectina e osteocalcina, que são abundantes no osso (MJOR et al., 2001). Acredita-se também que as proteínas não colágenas exerçam um papel na formação dos tecidos mineralizados, por promover e controlar o processo de mineralização e a função celular (BUTLER et al., 1992a, 1992b). Mattuella et al. (2007) observaram que a dentina possui fatores de crescimento com capacidade de influenciar eventos celulares no complexo dentino-pulpar quando liberadas durante a desmineralização, podendo contribuir para o processo reparativo. Entre eles, o VEGF (*Vascular endothelial growth factor*) produzido por células estromais de polpas saudáveis (ARTESE et al., 2001) e em células odontoblásticas (BOTERO et al., 2003) pode ter uma ação autócrina e promover quimiotaxia e proliferação/diferenciação celular (MATTUELLA et al., 2007).

Quando os odontoblastos são destruídos por cáries ou procedimentos restauradores, a reposição dessas células pode ser realizada por meio de células progenitoras da polpa dentária; essas células progenitoras, sob certas condições, se diferenciam em odontoblastos os quais podem formar dentina reparativa (TZIAFAS et al., 1995; BALLINI et al., 2007).

As células-tronco são células dotadas de capacidade de auto-replicação e de diferenciação em células de outros tecidos. Avanços recentes da biologia das células-tronco têm revelado o seu grande potencial no uso terapêutico em regeneração de tecidos perdidos devido ao câncer, traumas ou cáries. A polpa dentária possui células progenitoras com potencial de regenerar ou reparar o complexo dentino-pulpar após alterações patológicas.

Foi reportada a presença de células-tronco pós-natais na polpa dentária (GRONTHOS et al., 2000, 2002). A característica mais importante dessas células é sua habilidade em regenerar um tecido similar ao complexo dentino-pulpar, composto de matriz mineralizada e túbulos ao redor de células parecidas a odontoblastos. Contudo, apesar de estas células terem a capacidade de se diferenciar em odontoblastos, esta diferenciação só acontece na presença de mecanismos moleculares de diferenciação celular capazes de desencadear este processo (LEAL, 2007).

2.2 Linhagens de célula-tronco da polpa e odontoblastos

Um grande número de pesquisadores têm se esforçado para desenvolver linhagens de odontoblastos. Inúmeros laboratórios relataram cultura de odontoblastos e células semelhantes isoladas de diferentes espécies (HANKS et al., 1998a).

Duas linhagens celulares foram desenvolvidas por Hanks et al. (1998a, 1998b), derivadas de células indiferenciadas da polpa (OD-21) e de odontoblastos (MDPC-23). Ambas foram desenvolvidas como linhagens celulares espontaneamente imortalizadas derivadas de células da papila dentária do primeiro molar de fetos de camundongos.

A linhagem MDPC-23 são células com formato epitelióide (RODRIGUEZ et al., 2009) que apresentam alta atividade de fosfatase alcalina (ALP) e a habilidade de formar nódulos calcificados em multicamadas e um tempo de duplicação de 24 horas (HANKS et al., 1998a). Além disso, essa linhagem celular é a única que sintetiza proteínas como a sialofosfoproteína dentinária (DSPP), que é clivada em sialoproteína dentinária (DSP) e fosfoproteína dentinária (DPP). Essas proteínas são sintetizadas principalmente por odontoblastos (BOTERO et al., 2003). A linhagem MDPC-23 apresenta características morfológicas e funcionais de células odontoblásticas, mas com pouca habilidade de induzir a formação de dentina (RODRIGUEZ et al., 2009).

Os mecanismos de diferenciação celular das células-tronco em odontoblastos ainda são muito pouco entendidos. A demonstração de alguns marcadores específicos nas vias de diferenciação das células-tronco da polpa ainda está em um estado rudimentar. Osteocalcina, osteonectina, fosfatase alcalina (ALP), sialoproteína óssea e sialofosfoproteína dentinária são usados como marcadores da mineralização de odontoblastos/osteoblastos diferenciação odontoblástica (WEI et al., 2007).

Apesar disso, todo este conhecimento é ainda fragmentário, e ainda necessitase saber como se dá a expressão de uma vasta quantidade de genes durante a diferenciação dessas células, para podermos selecionar os possíveis candidatos ao controle desse processo.

Diversos estudos têm utilizado linhagens celulares para aumentar o conhecimento sobre os eventos celulares envolvidos na dentinogênese, como Pang et al. (2006) que estabeleceram uma nova ligação molecular entre o metabolismo e o transporte de íons cálcio com a proteína DMP1, importante regulador de mineralização da dentina, utilizando células da linhagem odontoblásticas MDPC-23 como modelo de estudo. He et al. (2006) avaliaram a via SMAD na linhagem MDPC-23 e notaram que a SMAD3 parece estar envolvida na repressão da proteína DSPP por meio do fator TGF-beta1, fato que aumenta a possibilidade da sinalização de SMAD estar envolvida na dentinogênese. Outros estudos avaliaram a reação dessas células frente à exposição a agentes utilizados em tratamentos odontológicos. Lima et al. (2009) avaliaram o efeito do peróxido de carbamida (CP) nas células odontoblásticas e observaram que, mesmo em baixas concentrações, o extrato do gel de CP é citotóxico.

29

2.3 Microarray

2.3.1 <u>Genes</u>

No futuro, informações sobre os padrões de expressão gênica podem ser úteis na determinação detalhada dos papéis funcionais dos genes relevantes e aplicáveis às terapias com células-tronco, e estas células podem também ser usadas como fontes de células multipotentes para a engenharia genética e tecnologia de engenharia de tecidos (YAMADA et al., 2006).

A derivação dessas células progenitoras durante a dentinogênese reparativa está em franca investigação, mas algumas origens já foram sugeridas, como as células perivasculares, as mesenquimais indiferenciadas, os fibroblastos ou ainda as células-tronco da polpa (SLOAN; SMITH, 2007). Além disso, ainda não é conhecida a totalidade dos genes implicados no processo de diferenciação destas células. Alguns autores identificaram genes específicos relacionados à diferenciação odontoblástica, como o MEF2C (Myocyte enhancer factor 2C), que codifica uma proteína atuante como fator de transcrição e estaria relacionada com o processo terminal da diferenciação odontoblástica (BUCHAILLE et al., 2000). Outro gene já identificado em odontoblastos é o RARB (Retinoic acid receptor, beta), essencial para a odontogênese (BLOCH-ZUPAN et al., 1994). Uma alta expressão do gene PHEX (Phosphate regulating endopeptidase homolog, X-linked) foi detectada em odontoblastos de camundongos, o qual codifica uma proteína que regula a mineralização dentinária e óssea e a homeostase do fosfato (RUCHON et al., 1998). Também foi mostrado que a expressão do gene DSPP (Dentin sialophosphoprotein), que codifica a sialoproteína dentinária e a fosfoproteína dentinária, começa nos odontoblastos secretórios e aumenta com o grau de citodiferenciação das células em dentes de rato e camundongo (MACDOUGALL et al., 1997). Um novo gene denominado HUGO (*Human gene expressed in odontoblasts*) foi descrito por Carrouel et al. (2008), demonstrando indução em odontoblastos humanos; as proteínas codificadas por este gene estão localizadas no complexo de Golgi e a sua presença nestas células está associada à síntese de colágeno e glicosaminoglicanas.

Para conhecer mais genes relacionados à diferenciação odontoblástica, precisamos utilizar ferramentas da genômica funcional e mensurar a expressão diferencial dos genes em grande escala durante a diferenciação, realizando assim uma análise do transcriptoma.

A identificação dos genes controladores da diferenciação odontoblástica podem levar ao desenvolvimento de métodos que permitam a indução da formação de dentina reparativa em lesões de cárie. No processo ativo da odontogênese, a identificação dos genes podem levar ao reconhecimento de fatores regulatórios desta (PAAKKONEN; TJÄDERHANE, 2010).

Além disso, a perspectiva de futura aplicação de manipulações genéticas visando à indução direta da dentina auxiliada por transfecções de genes específicos (devidamente clonados em vetores apropriados) e aplicados na polpa viva, ou ainda à transfecção de células-tronco da polpa com o mesmo objetivo, ressalta a importância de identificarmos esses genes candidatos (NAKASHIMA et al., 2006).

2.3.2 <u>Microarray</u>

Nos últimos anos, o uso de métodos que permitem a análise da expressão em larga escala do transcriptoma e da proteômica tem expandido rapidamente na biologia molecular e na ciência biomédica. Métodos como o cDNA *microarray*

31

investigam os níveis de expressão de milhares de genes simultaneamente permitindo a formação de perfis de expressão de todo o genoma e a avaliação de redes de sinalização biológica (PAAKKONEN; TJÄDERHANE, 2010).

O número de genes expressos em uma célula depende tanto de condições ambientais como de desenvolvimento. Em geral, apenas uma fração dos genes são expressos em um determinado momento nas células e nos tecidos. Estudos de expressão gênica detectaram a abundância de certas moléculas de RNAm em momentos e circunstâncias específicas produzidos pelas células (PAAKKONEN; TJÄDERHANE, 2010).

A tecnologia dos *microarray*s é uma das últimas inovações na área de medidas de expressão gênica em grande escala, sendo largamente aplicada em biologia e medicina na aquisição de novos conhecimentos básicos sobre expressão gênica. Essa ferramenta tornou-se o método de escolha na exploração do transcriptoma em diversas situações normais e patológicas.

Os métodos baseados em hibridização (*microarrays* de clones de cDNA ou de oligonucleotídeos sintetizados *in situ*) têm sido amplamente utilizados para análise transcricional em diversos organismos (JÚNIOR; BENEDITO; FIGUEIRA, 2004). A alta performance desta técnica possibilita a integração de grandes conjuntos de dados oriundos de diversos experimentos.

O estudo do transcriptoma pode revelar fatores de crescimento e outras moléculas sinalizadoras capazes de estimular a proliferação e direcionar a diferenciação celular, favorecendo o seu uso na engenharia tecidual (PAAKKONEN; TJÄDERHANE, 2010).

3. Proposíção

3. PROPOSIÇÃO

O objetivo do presente trabalho foi:

- Caracterizar o comportamento de células indiferenciadas da polpa dentária e de células odontoblásticas, através dos seguintes parâmetros:
 - proliferação e viabilidade celular;
 - atividade de fosfatase alcalina;
 - detecção e quantificação de nódulos mineralizados;
 - imunolocalização de proteínas relacionadas com adesão e mineralização.
- Traçar o perfil de expressão gênica em grande escala dos dois tipos celulares, fazendo uso da tecnologia dos cDNA *microarray*s avaliando a expressão diferencial quantitativa de ~ 4.500 seqüências murinas.
- 3. Fazer uso de programas de bioinformática dedicados à análise dos dados de *microarray*s (Cluster e TreeView e SAM) para apontar os genes diferencialmente expressos durante o processo de diferenciação e selecionarmos os genes candidatos potencialmente associados à diferenciação celular.

4. Materíal e Métodos

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Cultura da Linhagem Celular

Duas linhagens celulares imortalizadas originárias de camundongos foram utilizadas: células indiferenciadas da polpa (OD-21) e células odontoblásticas (MDPC-23), que foram gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Jacques Eduardo Nor, professor da Faculdade de Odontologia da Universidade de Michigan, USA. Em nosso laboratório, as células são conservadas em tubos criogênicos de 2 mL em tambores de nitrogênio líquido e, quando necessário, são descongeladas para obtenção de culturas.

As células foram cultivadas em garrafas de cultura de 75 cm³ com 10 mL de meio de cultura D-MEM, 10% de soro fetal bovino (SFB) e 2,75 mL de penicilinaestreptomicina. Nas culturas das células odontoblásticas MDPC-23, foram adicionados 50 g de ácido ascórbico para promover a formação de colágeno e matriz extracelular (FRANCESCHI; IYER; CUI, 1994) e 2 mM de beta-glicerolfosfato para a formação e mineralização de nódulos em multicamadas (TENENBAUM, 1981). Durante todo o tempo de cultivo as células foram mantidas a 37°C em atmosfera umidificada, contendo 5% de CO₂ e 95% de ar atmosférico e os meios foram trocados a cada dois dias. Após a subconfluência, as células foram removidas dos frascos de cultura por meio de tratamento com EDTA 1 mM (Gibco) e tripsina 0,25% (Gibco) e contadas em microscópio com auxílio de um hemocitômetro (Fisher Scientific).
4.2 Métodos de Avaliação do Estímulo Celular

Para a comprovação do fenótipo odontoblástico, as células foram plaqueadas numa concentração de 1 x 10⁴ células por poço em placas de 24 poços (n=5). As culturas foram divididas em dois grupos experimentais: 1) células indiferenciadas da polpa (OD-21) e 2) células odontoblásticas (MDPC-23).

4.2.1 Proliferação celular

Ao final de 3, 7 e 10 dias em cultura, o meio foi removido e os poços lavados três vezes com salina tamponada com fosfato (PBS) aquecida a 37°C para retirar as células não aderidas. Em seguida, foram preenchidos com 1,5 ml de uma solução de EDTA 1 mM e tripsina 0,25%, para remover as células aderidas, etapa que foi monitorada pela observação em microscópio de fase invertido. Amostras dessa suspensão de células em solução enzimática foram utilizadas para contagem do número de células. Alíquotas das soluções de cada poço foram incubadas por 5 minutos com o mesmo volume de 1% de azul de Trypan (Sigma), que coram as células não viáveis, e as células viáveis foram contadas utilizando um hemocitômetro. A proliferação celular foi expressa em número de células contadas

4.2.2 Viabilidade celular

A viabilidade celular foi avaliada utilizando alíquotas das mesmas soluções utilizadas para calcular a proliferação celular. Estas alíquotas foram incubadas por 5 minutos com o mesmo volume de azul de tripan 1% (Sigma) e as células não-viáveis foram contadas utilizando um hemocitômetro. A viabilidade celular foi expressa como porcentagem de células viáveis.

4.2.3 <u>Medidas da atividade de fosfatase alcalina (ALP)</u>

A atividade de fosfatase alcalina foi determinada por meio da liberação de timolftaleína por hidrólise do substrato de timolftaleína monofosfato, utilizando *kit* comercial de acordo com as instruções do fabricante (Labtest diagnóstica, Belo Horizonte, MG, Brasil). Inicialmente, 50 mL de timolftaleína monofosfato foram misturados com 0,5 mL de tampão dietanolamina a 0,3 M, pH 10,1, por 2 minutos a 37°C. À solução foi então acrescentada alíquota de 50 mL de lisados obtidos de cada poço, permanecendo por 10 minutos a 37°C. Para o desenvolvimento de cor, foram adicionados 2 mL de Na2CO3 a 0,09 M e NaOH a 0,25 M. Em seguida a Absorbância foi medida em espectrofotômetro utilizando comprimento de 590 nm para as culturas nos tempos de 3, 7 e10 dias.

4.2.4 <u>Detecção e quantificação de matriz mineralizada</u>

Para detecção macro de acúmulos de cálcio, ao final de 17 dias em cultura, o meio foi removido, os poços lavados três vezes com salina tamponada com fosfato aquecida a 37°C e preenchidos com solução fixadora de glutaraldeído 3% em tampão fosfato (pH 7,3). Em seguida, os poços foram desidratados em série crescente de alcoóis e processados para coloração com Alizarin S a 2% (Sigma), pH 4,2, por 10 minutos, o que cora em vermelho os nódulos de mineralização, ricos em cálcio, e então as placas foram fotografadas e em seguida estocadas a -20°C. Para quantificação da coloração segundo método de Gregory et al. (2004), 150 µL de ácido acético a 10% foram acrescentados a cada poço e as placas deixadas sob agitação suave por 30 minutos. A camada de células foi então raspada com um raspador de células e a solução transferida para tubos de 1,5 mL e agitadas em vortex por 30 segundos. Em seguida, 100 µL de óleo mineral foram adicionados à

amostra para evitar evaporação, que foi aquecida a 85°C por 10 minutos e transferida para o gelo por 5 minutos. Os tubos foram centrifugados a 20.000xg por 15 minutos, foram adicionados 40 µL de hidróxido de amônia a 10% e os sobrenadantes foram lidos em espectrofotômetro em um comprimento de onda de 405 nm. A curva padrão foi realizada com dissoluções sucessivas de alizarina de 0,5 a 3 mM em acetato de amônia (10% de ácido acético glacial e 5 M de hidróxido de amônia). A média e a comparação entre os grupos foram realizadas através de teste estatístico, conforme descrito a seguir.

4.2.5 <u>Imunolocalização</u>

Para a imunolocalização de proteínas não-colágenas (DSPP e osteopontina), as células nos períodos experimentais de 1, 3, e 7 dias cultivadas sobre lamínulas de vidro foram fixadas em paraformaldeído a 4% em tampão fosfato a 0,1 M, pH 7,2 (PB), por 10 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, as células foram processadas rotineiramente para imunofluorescência indireta (OLIVEIRA; NANCI, 2004). A permeabilização foi feita com solução de Triton X-100 a 0,5% em PB por 10 minutos, seguida de bloqueio com leite desnatado a 5% em PB por 30 minutos. Os anticorpos primários monoclonais e/ou policionais para osteopontina (*Sigma-Aldrich, USA*) e DSPP (*Larry Fisher, USA*) foram diluídos em concentrações de trabalho e incubados por 1 hora, seguidos de incubação de anticorpo secundário conjugado com Alexa Fluor 594 (Molecular Probes, EUA), 1:200, por 50 minutos. Para a visualização dos limites celulares e dos núcleos de células aderidas à lamínula, foram utilizados, respectivamente, faloidina conjugada com Alexa Fluor 488 (1:200) e DAPI (4', 6-diamino-2-phenylindole, dihydrochloride/Molecular Probes - 1:300). A substituição dos anticorpos primários por PB foi usada como controle negativo. Após montagem de lamínula de vidro, com meio de montagem anti-fade (Prolong, Molecular Probes), as marcações foram analisadas por epiluminação em microscópio de fluorescência Leica (Alemanha). As imagens adquiridas foram processadas com o programa Adobe Photoshop para ajustes em dimensões, brilho e contraste, sobreposições de fluorescências vermelha, verde e azul (modo de mesclagem: clarear) e montagem de pranchas.

4.2.6 Análise estatística

Os dados relativos aos parâmetros de análise de diferenciação celular acima especificado foram apresentados como média \pm desvio padrão (n = 5). Os dados foram submetidos ao teste não paramétrico de Mann-Whitney, quando apropriado, para comparação de cada um dos parâmetros avaliados. Resultados com p \leq 0,05 foram considerados estatisticamente significantes.

4.3 Extração de RNA total das culturas de células

A fim de prevenir contra a contaminação por ribonuclease durante a extração e manuseio dos RNAs, toda vidraria, tubos plásticos, espátulas e pinças utilizadas foram previamente autoclavados. Os materiais plásticos (tubos e ponteiras) eram novos e mesmo assim foram previamente autoclavados. Todo o procedimento foi realizado usando luvas de látex sem talco e descartáveis.

Após a subconfluência da garrafa, o RNA total de cada cultura foi extraído utilizando-se o kit MirVANATM (Ambion), seguindo as instruções do fabricante. As células indiferenciadas da polpa e as células odontoblásticas foram removidas das garrafas utilizando-se 9,5 mL de solução de tripsina 0,25% com 0,5 mL de EDTA pH 8,0 por 5 minutos, seguido de inativação da tripsina com meio de cultura mais SBF. As células foram colhidas por centrifugação e lavadas duas vezes com PBS 1x,

seguida de centrifugação a 10.000xg durante 5 minutos. Adicionou-se 1 mL de solução de lise. Agitou-se vigorosamente (pipetagem e 10 segundos no vórtex) para lisar completamente as células e obter um lisado homogêneo. Adicionou-se 100 µL de Mirna Homogenate Additive e misturou-se bem (vórtex 15 segundos). Deixou-se a mistura em banho de gelo picado por 10 minutos. Adicionou-se 1 mL de solução de fenol: clorofórmio e agitou-se vigorosamente no vórtex por 60 segundos. O lisado foi então centrifugado a 10.000xg por 5 minutos à temperatura ambiente. A fase aquosa foi cuidadosamente transferida para um tubo novo e então foram adicionados 1,25 x volume recuperado após a centrifugação de etanol 100% à temperatura ambiente. Para cada amostra foi montada uma coluna em um tubo coletor. 700 µL da mistura foram pipetados na coluna e centrifugados 15 segundos a 10.000xg. O líquido foi descartado e o procedimento foi repetido até que toda a mistura lisado/etanol tivesse sido filtrada. Aplicou-se 700 µL de miRNA Wash Solution 1 à coluna e centrifugou-se por 10 segundos a 10.000xg. Descartou-se o líquido e 500 µL de miRNA Wash Solution 2/3 foram aplicados à coluna e centrifugados 10 segundos a 10.000xg. Repetiu-se o último passo e, após descartar o líquido, centrifugou-se 1 minuto para remover resíduos líquidos no filtro. A coluna foi transferida para um tubo novo coletor e a ela foram adicionados 100 µL de água DEPC pré-aquecida (95°C). Centrifugou-se 30 segundos para recuperar o RNA.

O grau de pureza das preparações de RNA total foi calculado por medidas espectrofotométricas (GENEQUANT – AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH) calculando-se as razões entre as absorbâncias; A260/A280 ~ 2,0 indicando que a preparação estava livre de proteínas e A260/A230 ~ 2,0 livre de fenol, entretanto razões inferiores podem indicar contaminação com guanidina e/ou fenol. No presente trabalho, utilizamos somente preparações puras de RNA.

A integridade das preparações foi avaliada por meio de eletroforese em gel de agarose corado com brometo de etídeo seguindo protocolo convencional como descrito adiante.

4.4 Eletroforese de RNA total em gel denaturante (SAMBROOK; FRITCH; MANIATS, 1989)

4.4.1 Preparação do gel

A agarose (70 mL) foi fundida em água Milli-Q autoclavada (1,5% de agarose), e quando à temperatura de 60°C foram adicionados 20 mL de formaldeído (37%) e 22 mL de tampão de migração 5X concentrado (20,6 g de MOPS [ácido propano sulfônico 3-(N-morfolino)], dissolvidos em 800 mL de acetato de sódio 50 mM, pH 7,0 com NaOH 2N e adicionados 10 mL de EDTA 0,5 M pH 8,0, volume final ajustado para 1000 mL). O gel foi solidificado em suporte de acrílico que foi, inicialmente, tratado com NaOH 0,5 M por 10 minutos, assim como a cuba e o pente para eliminação de RNAase sendo posteriormente lavado com água Milli-Q autoclavada.

4.4.2 Preparação das amostras de RNA

Em um tubo tipo *Eppendorf* novo e autoclavado, colocado em banho de gelo picado, foram adicionados 4,5 µL de solução de RNA (cerca de 3 µg de RNA), 2 µL de tampão de migração MOPS 5X (20,6g de MOPS dissolvidos em 800 mL de acetato de sódio 50 mM, pH 7,0 ajustado com NaOH 2N e adicionado 10 mL de EDTA 0,5 M pH 8,0; volume final ajustado para 1000 mL); 3,5 µL de formaldeído (37%) e 10 µL de formamida. A solução foi incubada a 65°C por 15 minutos e imediatamente resfriada em banho de gelo. Às amostras desnaturadas foram acrescentados 1 µL de solução de brometo de etídeo diluído 1:3 (a partir de solução estoque 10 mg/mL) e 2 µL (1/10 do volume) de *dye loading solution*. A solução de

RNA foi então aplicada no gel de agarose. A eletroforese foi realizada a 80 V por cerca de 2,5 horas.

A visualização de bandas de RNA foi conseguida iluminando-se o gel em luz UV de transiluminador, o qual foi fotografado com câmara digital. Bandas bem definidas dos RNAs ribossômicos RNAr 28 S (4,8 Kb) e RNAr 18 S (1,9 Kb), assim como RNAr 5S e RNAt 4S, permitiram a classificação da amostra como íntegra.

4.5 Quantificação de RNA total

O precipitado de RNA total foi dissolvido em 13 µL de água MilliQ previamente tratada com DEPC e autoclavada. A solução de RNA foi então diluída 100 x e submetida a dosagens em espectrofotômetro (GENEQUANT - AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH) usando luz ultravioleta. As dosagens tiveram como base a seguinte estimativa: 1U de A260 = 40 µg RNA/mL.

4.6 Preparação de cDNA *microarray*s em lâminas de vidro

4.6.1 <u>Bibliotecas de cDNAs murinos</u>

O Laboratório de Imunogenética Molecular (Departamento de Genética – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP), coordenado pelo Prof. Dr. Geraldo Passos, mantém uma biblioteca de cDNA murinos com cerca de 9.000 clones de timo provenientes do "*IMAGE Consortium*" (<u>http://image.hudsonalpha</u>.org/), gentilmente cedida pela Dra. Catherine Nguyen, do INSERM-TAGC U928, Marseille, França.

São clones com sequências "*expressed sequence tags*" (ESTs), cujos tamanhos moleculares variam de 500 a 1.500 pb, e a biblioteca está totalmente caracterizada, com clones sequenciados e catalogados. Os clones são identificados com seus respectivos "*acession numbers*" (Acc) no *GenBank*, Clone ID, o nome do

gene e a posição de cada clone nas placas de 384 poços em planilhas do programa Excel® Microsoft. Conservamos essa biblioteca em *E. coli* em placas de microtitulação (384 poços) a -80°C. As sequências depositadas nos *microarray*s utilizados nesse trabalho podem ser recuperadas on-line no endereço (www.rge.fmrp.usp.br/passos/mmu_array) para as sequências murinas.

4.6.2 <u>Amplificação dos insertos de cDNA para a confecção dos microarrays</u>

A amplificação foi realizada de acordo com modificação do protocolo de Hedge et al. (2000). Os clones de E. coli repicados em placas de 96 poços contendo meio de cultura 2XLB + ampicilina foram incubados durante 16 horas, na proporção de 5 μL de cultura diluídos em 45 μL de meio 2X LB1 (volume final em cada poço: 50 μL). A seguir uma alíquota de 8µL da cultura foi transferida para outra placa de 96 poços, contendo 72 µL de água deionizada estéril, e esta placa incubada a 95° C por 10 minutos para lise das células. Após centrifugação a 4.000xg por 5 minutos foi retirado 10 µL do sobrenadante e adicionado a 40 µL de um mix para PCR contendo tampão da reação de PCR (10X), solução de dNTP (2 mM), primers com seqüências consenso aos três vetores presentes na biblioteca (10 µM), primer LBP 1S (5'TGTGGATTGTGAGCGGATAA3') е primer 1AS (5'GGGTTGAATTAGCGGAACG3'), Taq polimerase (5 U/µl) e água deionizada estéril q.s.p 50 µL. O programa para amplificação dos insertos teve como base aquele descrito por Menossi et al., (2000): 1 x 5 minutos a 94°C, seguidos de 30 x (94°C, por 30 segundos; 55°C por 30 segundos, 72°C por 2 minutos), seguida por uma extensão final de 7 minutos a 72°C e 5 minutos a 4°C.

As reações de PCR foram realizadas em um aparelho termociclador "Mastercycler Gradient" (Eppendorf), em placas de PCR 96 wells seladas com adesivo laminado para evitar evaporação. Cerca de quatro amplificações PCR de cada clone foram realizadas.

A avaliação da qualidade dos produtos de PCR foi feita por eletroforese em gel de agarose 1%, em tampão TAE 1X (Tris-acetato 0,04 M, EDTA 0,001 M) contendo brometo de etídio (10 mg / mL) a 80 V, durante 15 a 30 minutos. A visualização das bandas foi realizada utilizando transluminador UV e os géis foram fotografados.

4.6.3 <u>Purificação dos produtos de PCR</u>

Para eficiente fixação dos insertos de cDNA amplificados nas lâminas de vidro foi necessária a remoção de nucleotídeos não incorporados e *primers* da reação de PCR (HEDGE et al., 2000) assim como os sais da reação de PCR. Isso foi conseguido por precipitação do DNA amplificado com etanol gelado.

Os produtos de PCR (50 µL) foram transferidos para placas de cultivo com fundo em "V" e foram adicionados 10 µL de acetato de sódio 3 M pH 4,8 em cada poço de uma placa de 96 poços. Em seguida, os produtos de duas PCR foram agrupados, totalizando 100 µL, que foram transferidos para esta mesma placa. Após a adição de 100 µL de etanol absoluto, as placas foram incubadas por 16 horas (*overnight*) a -20°C. Após este tempo, as placas foram centrifugadas a 4.000xg por 60 minutos a 4°C. O sobrenadante foi desprezado e o *pellet* foi lavado em etanol 70%. Finalmente o *pellet* de DNA foi ressuspenso em 50 µL de água deionizada autoclavada.

Uma alíquota de 5 µL destes produtos foi eletroforizada em gel de agarose 1% contendo brometo de etídeo, os quais foram visualizados em transluminador UV e fotografados.

As placas foram secas em forno a 42°C e adicionou-se 27 µL de solução de espotagem (dimetil sulfóxido DMSO 50%) por poço da placa. Em seguida, estas placas foram levadas ao freezer -20°C e os produtos foram congelados e descongelados por 3 vezes para uma melhor dissolução dos cDNAs. Os clones foram transferidos para as placas 384 *wells* Genetix do robô Gen-III Amersham Molecular Dynamics, e estocadas a 4°C até a deposição dos produtos de PCR em lâminas de vidro.

4.6.4 Confecção das lâminas de microarray

Amostras de produtos de PCR purificados foram preparadas para deposição em lâminas de vidro adicionando-se mesmo volume (1:1) de Reagente D (*GE Healthcare*) e transferidas para microplacas de 384 poços (Genetix). Por meio de um robô *Array Spotter III (Amersham Molecular Dynamics),* as amostras foram depositadas por um conjunto de 12 canetas que deposita um volume de 0,9 nL da amostra baseada na ação de capilaridade em superfície de lâminas de vidro (*Corning* ® - *UltraGaps* 40015). Após a deposição de cada conjunto de amostras as canetas foram lavadas automaticamente em uma estação de lavagem que utiliza sucessivamente água purificada (18 megohm/cm), etanol absoluto (Merck), solução 0,2 M de KOH e água novamente. As canetas foram secas com nitrogênio 5.0 analítico antes das próximas amostras serem carregadas. A câmara de deposição das amostras em lâminas do robô *Array Spotter III* possui temperatura e umidade controladas. A umidade relativa de deposição das amostras foi de \approx 55% e a temperatura foi de \approx 25°C. Este robô está instalado numa sala especial com ar limpo (sala limpa classe 100.000).

Após a deposição e secagem de todas as amostras nas lâminas, o DNA foi fixado por "*cross-linking*" por meio de irradiação ultravioleta a 500 mJ de energia (*Hoefer UV Crosslinker*).

4.7 Delineamento das hibridações em microarrays

Uma escolha chave em um projeto que envolve a tecnologia de *microarray* é utilizar comparações que podem ser diretas ou indiretas, isto é, estabelecer comparações dentro ou entre as lâminas. Existem três principais tipos de delineamento: 1) inversão de corantes (*dyeswap*), 2) experimentos em volta (*looping*) e 3) RNA de referência (Figura 1). Porém, não existe um delineamento experimental ideal para todas as situações, ou seja, diferentes desenhos experimentais são necessários para contextos experimentais diferentes. Qualquer que seja o tipo de desenho utilizado, será requerido o mesmo número de hibridações, e a decisão sobre o tipo de delineamento devem considerar a pergunta do trabalho.



Figura 1. Esquema dos principais tipos de delineamento experimental para *microarray*s. A, B e C - amostras controle; A', B' e C'- amostras teste; R – pool de RNA de referência.

O pool de RNA derivado de linhagens celulares é a amostra de referência mais utilizada atualmente. Para fornecer a cobertura ótima dos genes depositados na lâmina, as amostras de referência são frequentementes constituídas de diferentes linhagens celulares oriundas de vários tecidos. Nos experimentos com *microarrays* do presente trabalho adotou-se a estratégia do RNA de referência ao invés do *dyeswap*, pois para realizar os experimentos com troca de corantes seria necessário marcar a mesma amostra de RNA com os dois corantes (Cy3 e Cy5). Porém, tal abordagem passa a ser inviável, pois a quantidade de RNA seria insuficiente para a repetição das hibridações. Além disso, o corante Cy5 apresenta incorporação ineficiente em relação ao Cy3. O sistema monocolor adotado (Cy3) para marcar as amostras teste elimina o problema da incorporação desigual dos corantes. O corante Cy5 foi utilizado para marcar somente o pool de referência.

O pool de RNA de referência neste caso foi uma mistura "equimolar" de RNA total de timos de camundongos C57BL/6 adultos jovens. Como neste trabalho escolheu-se o uso de RNA de referência, seguem algumas considerações:

Ensaios de co-hibridação diferencial usando *microarrays* medem a expressão gênica relativa de amostras emparelhadas e de uma amostra referência, sendo que o poder da análise de *microarray* vem da identificação de padrões informativos de expressão de um gene através das experiências múltiplas. O cumprimento destes objetivos é facilitado usando uma amostra de referência comum para todos os experimentos que forneça uma medida da expressão base para cada gene, permitindo a normalização e a comparação de experimentos independentes.

Preparar o pool de RNA com um vasto número de linhagens celulares pode não melhorar necessariamente a representatividade total dos genes depositados no *array*, pois algumas linhagens celulares expressam significativamente mais genes do que outras, e nem todas as linhagens expressam todos os genes em níveis semelhantes. Misturar RNA de muitas linhagens celulares pode diluir os transcritos raros de modo que a sua representação no pool de RNA corre o risco de ficar abaixo do limite detectável (YANG; SPEED, 2002).

O uso de RNA de referência passou a ser uma abordagem bastante adequada eliminando assim a necessidade de repetir as marcações de uma mesma amostra com dois corantes (*dye-swap*) e, como já foi dito, evitando as diferenças de incorporação.

O delineamento das hibridações de *microarray*s consistiu em marcar todas as amostras de células indiferenciadas da polpa (OD-21) e células diferenciadas (MDPC-23) em diferentes condições com fluorocromo Cy3 e combiná-los numa mesma lâmina com amostras de RNA (cDNA) de referência marcados com Cy5.

As hibridações com cDNAs oriundos de RNA referência são importantes para os cálculos de normalização, pois refletem a estimativa da quantidade de material depositado em cada ponto do *microarray* (alvo).

4.8 Marcação das sondas complexas de cDNA com fluorocromos Cy3 e Cy5

Amostras de RNA foram copiadas em cDNA por transcrição reversa e marcadas utilizando o Kit *CyScribe Post-Labelling* (GE Healthcare - Buckinghamshire, UK) que envolve a preparação e adequação do cDNA em dois passos. No primeiro passo ocorre a síntese da primeira fita de cDNA com a incorporação de nucleotídeos amino-alil dUTP modificados, com posterior degradação da cadeia de RNAm e purificação do cDNA para remoção de nucleotídeos livres e oligômeros. No segundo passo, o cDNA é marcado com formas reativas de ésteres NHS Cy3 e Cy5 que se ligam aos nucleotídeos modificados e,

após um processo de purificação para eliminação dos CyDye não incorporados, a sonda está pronta para hibridação (Figura 2).



Figura 2. (continua na página seguinte)



Figura 2. Preparação do cDNA marcado com *CyDye* utilizando os reagentes do kit *"CyScribe Post Labelling"* (*GE Healthcare*).

a) Preparação da primeira fita de cDNA por incorporação de AAdUTP

Em um tubo *Eppendorf* de 1,5 µL imerso em gelo picado foram adicionados 10 µg de RNA total, 1 µL de *primers* randômicos, 3 µL de oligo (dT) e 0,5 µL de controle denominado "*spike mix*" para o Universal *ScoreCard* em um volume total de 11 µL (proporção de 2 µL de *spike mix* para cada 1 µg de RNA marcado). A reação foi cuidadosamente montada e incubada a 70°C por 5 minutos, sendo posteriormente resfriada a 4°C durante 5 minutos. A extensão da cadeia de cDNA foi realizada utilizando 4 µL de tampão 5X *CyScript,* 2 µL de DDT 0,1 M, 1 µL de nucleotídeo "*mix*", 1 µL de AA-dUTP (a quantidade de um tubo contendo AA-dUTP liofilizado foi ressuspensa em 30 µL de água livre de nucleases e mantida a -20°C por no máximo 30 dias), 1 µL de transcriptase reversa *CyScript,* em um volume final de reação de 20 µL. A reação foi incubada a 42°C por 1,5 hora. Procedemos à degradação do RNAm adicionando 2 µL de NaOH 2.5 M com incubação a 37°C durante 15 minutos, posteriormente foi adicionado 20 µL de HEPES 2M.

b) Purificação do cDNA com colunas de purificação CyScribe GFX

Para cada amostra de cDNA com volume entre 20 a 100 µL foram adicionados 500 µL de solução "*capture buffer*" em uma coluna de purificação GFX colocada dentro de um tubo coletor. O produto de cDNA marcado com aminoalil não purificado foi adicionado à coluna e misturado 5 vezes. A centrifugação foi feita a 13.800xg por 30 segundos. A coluna foi retirada e o líquido contido no tubo coletor foi descartado. A coluna foi novamente colocada no tubo coletor e foram adicionados 600 µL de etanol 80%. A centrifugação foi feita a 13.800xg por 30 segundos. A coluna foi retirada e o líquido contido no tubo coletor e foram adicionados 600 µL de etanol 80%. A centrifugação foi feita a 13.800xg por 30 segundos. A coluna foi retirada e o líquido contido no tubo coletor foi descartado. Esta lavagem foi repetida mais duas vezes. Uma nova centrifugação foi feita a 13.800xg por 10 segundos para retirada do excesso de etanol 80% da amostra. O tubo coletor foi

descartado e a coluna contendo o cDNA foi colocada em um tubo de 1,5 µL. Foi adicionada à coluna 60 µL de bicarbonato de sódio 0,1 M pH 9,0 e incubado durante 5 minutos. O material foi centrifugado a 13.800xg por 1 minuto.

c) Incorporação de Cy3 e Cy5

A amostra de cDNA marcada com aminoalil purificado foi adicionada a um tubo com a alíquota de *CyDye* NHS éster e ressuspendida várias vezes. O material foi centrifugado a 13.800xg por 1 minuto e incubado, no escuro, durante 1 hora. Posteriormente, foi adicionado 15 µL de hidroxilamina 4 M seguida de incubação no escuro, durante 15 minutos à temperatura ambiente.

 d) Purificação do cDNA marcado com CyDye com colunas de purificação CyScribe GFX

Para cada amostra de cDNA com volume entre 20 a 100 µL foram adicionados 500 µL de solução "*capture buffer*" em uma coluna de purificação GFX colocada dentro de um tubo coletor. O produto de cDNA marcado com *CyDye* não purificado foi adicionado à coluna e misturado 5 vezes. A centrifugação foi feita a 13.800xg por 30 segundos. A coluna foi retirada e o líquido contido no tubo coletor foi descartado. A coluna foi novamente colocada no tubo coletor e foram adicionados 600 µL da solução "*wash buffer*". A centrifugação foi feita a 13.800xg por 30 segundos. A coluna foi retirada e o líquido coletor foi descartado. A coluna foi retirada e o líquido coletor e foram adicionados 600 µL da solução "*wash buffer*". A centrifugação foi feita a 13.800xg por 30 segundos. A coluna foi retirada e o líquido contido no tubo coletor foi descartado. Esta lavagem foi repetida mais duas vezes. Uma nova centrifugação foi feita a 13.800xg por 10 segundos para retirada do excesso da solução "*wash buffer*" da amostra. O tubo coletor foi descartado e a coluna contendo o cDNA foi colocada em um tubo de 1,5 µL. Foi adicionada a coluna 60 µL da solução "*elution buffer*" pré-aquecido a 65°C e incubado durante 5 minutos. O material foi centrifugado a 13.800xg por 1 minuto.

e) Quantificação do CyDye incorporado no cDNA

Após a purificação foi feita a monitoração de incorporação dos fluorocromos por meio de leitura em espectrômetro (*Ultrospec* 2100, *GE Healthcare*) em comprimento de onda a 550 nm para Cy3 e 650 nm para o Cy5 usando amostras diluídas 100x. A quantidade de Cy3 ou Cy5 incorporados no cDNA pode ser calculada através do seu coeficiente de extinção molar 150 000 l mol⁻¹ cm⁻¹ para Cy3 e 250 000 l mol⁻¹ cm⁻¹ para Cy5. As proporções de Cy3 e Cy5 incorporados no cDNA foram calculadas pela fórmula: (A)/E x Z x fator de diluição x 10^{12,} onde:

A= absorbância de Cy3 a 550 nm ou Cy5 a 650 nm

E= coeficiente de extinção para Cy3 ou Cy5 x 10⁻⁶

Z= volume (µL) da sonda após purificação

Para hibridações com os dois fluorocromos foram adicionados os cDNA marcados com Cy3 e Cy5 em um tubo de microcentrífuga protegido da luz. A solução de cDNA foi concentrada no aparelho "Speed Vacuum". A seguir o cDNA foi dissolvido em 6 µL de água livre de nuclease e desnaturado a 95°C por 2 minutos. A solução foi imediatamente resfriada no gelo por 30 segundos. A essa reação adicionamos 1,5 µL de A80 (1 mg/ml) e incubamos a 75 °C por 45 minutos, estando assim pronta para o processo de hibridação.

4.9 Hibridações das lâminas de microarrays

As lâminas de *microarray*s foram hibridadas utilizando um processador automático de lâminas, "Lucidea Automated Slide Processor" – ASP (Amersham Biosciences) que permite a hibridação e lavagens de lâminas em câmaras independentes (12 lâminas por vez). Este aparelho inclui um software que automatiza a injeção de amostras líquidas e soluções de lavagens ou ar dentro das câmaras e possui parâmetros de controle de temperatura e velocidade de injeção e circulação destas soluções no interior das mesmas.

As lâminas foram hibridadas por 15 horas a 42°C. As condições de lavagens foram: 1XSSC/0,2%SDS (2 x 20 segundos à temperatura ambiente); 0,1X SSC/0,2% SDS (2 x 20 segundos à temperatura ambiente); 0,1X SSC (2 x 20 segundos à temperatura ambiente); 0,1X SSC (2 x 20 segundos à temperatura ambiente). A última lavagem das lâminas foi feita com isopropanol, sendo em seguida aquecida a 42°C, e novamente lavada com isopropanol. Após as lavagens as lâminas foram aquecidas a 60°C para secagem. As lâminas estavam prontas para serem "lidas" em aparelho "scanner" a laser.

4.10 Aquisições de imagens de *microarray*s

As lâminas foram lidas num aparelho Generation III "Array Scanner" (Amersham Biosciences) com lasers de 532 nm para o Cy3 (verde) e 633 nm para o Cy5 (vermelho). A leitura da lâmina gerou dois arquivos com imagens separadas com os pontos em preto para os dois canais (Cy3 e Cy5) e uma terceira imagem, agora colorida, sobrepondo Cy3 e Cy5 visualizadas usando o software ImageQuant (Amersham).

4.11 Quantificação e normalização dos dados de microarrays

A análise das imagens seguiu duas etapas:

 Inicialmente, os dados contidos nas imagens foram transformados em dados numéricos, utilizando o programa *Spotfinder* (http://www.tigr.org/software).
Esse programa, além de transformar as informações das imagens em valores numéricos, também analisa a qualidade dos pontos e calcula o "background".
Dois parâmetros foram considerados para o controle de qualidade neste programa: os pontos de boa qualidade apresentam valores superiores e/ou iguais a 1 valor "backgrounds" mais 1 valor desvio padrão.

Em seguida, estes dados foram normalizados. A normalização retira os erros experimentais sistemáticos por balancear a intensidade dos dois fluorocromos. Esses erros podem ocorrer devido à diferença de incorporação dos corantes, efeitos espaciais na lâmina e diferenças durante a aquisição das imagens nos dois canais. Para esses ajustes, utilizou-se a plataforma R (www.r-project.org), com 0 pacote AROMA (http://www.maths.lth.se/help/R/aroma/), que retém as funções necessárias para a normalização dos dados de microarrays. Portanto, após a retirada do background pelo programa Spotfinder, os dados foram importados para o ambiente R e transformados para o formato de dados "M versus A", onde M é igual a log2(R/G) e A é igual a 1/2·log2(R·G). Em seguida, os métodos de normalização "print-tip Lowess" e "absolute median deviation (MAD) re-scaling" foram aplicados respectivamente. O primeiro método aplica uma regressão linear nos dados, para corrigir erros espaciais que possam ter sido gerados durante os experimentos. O segundo re-escalona as razões de log para cada microarray, de maneira que cada slide adquire a mesma distribuição dos dados, de acordo com a MAD, capaz de estimar com robustez a variância de uma amostra. Na figura 3, observamos o fluxograma da "pipeline" desenvolvida para análise dos dados.

Utilizando o pacote LIMMA (Linear Models for Microarray Data) (SMYTH, 2004) foi aplicado o método Bayesiano empírico para análise estatística da expressão diferencial.



Figura 3. "Pipeline" utilizado na análise de dados de microarrays em lâminas de vidro.

4.12 Análise bioinformática dos dados de *microarray*s

4.12.1 Agrupamento hierárquico

A plataforma R gerou arquivos de extensão (.TAV), (.MOD) e (.MEV) que foram utilizados no programa TIGR MEV (The Institute for Genomic Research MultiExperiment Viewer) (<u>http://www.tm4.org/mev.html</u>), o qual inclui o programa SAM (Significance Analysis of Microarrays) (TUSHER; TIBSHIRANI; CHU, 2001) utilizado para a detecção dos genes diferencialmente expressos (SMYTH, 2004). O programa TIGR MEV gera um *heatmap* (mapa de cores relacionado com o nível de expressão dos genes) para os valores. O *heatmap* é composto por um código de cores a fim de facilitar a associação visual dos níveis de expressão gênica.

O programa SAM representa uma evolução dos softwares de análise estatística para a tecnologia de *microarray*s e encontra-se disponível no endereço (http://wwwstat.stanford.edu/~tibs/SAM/). A análise baseia-se em uma série de testes-t específicos para cada gene, que são adaptados para a detecção da expressão gênica diferencial em larga escala. A partir da observação de que as flutuações casuais são específicas para cada gene, o teste SAM é baseado na razão entre a diferença das médias das situações, como por exemplo, CTMs controles (Xc) e CTMs diferenciadas (Xp), e o desvio padrão de cada gene, calculados a partir de repetição experimental. A diferença relativa d*(i)* na expressão gênica é então definida pela equação 1:

$$\begin{bmatrix} \text{EQUAÇÃO} \end{bmatrix} \\ d(i) = \frac{X_p(i) - X_c(i)}{S(i) + S_0} \\ \begin{cases} d(i) = \text{diferença relativa} \\ Xp(i) = \text{níveis médios da expressão dos genes} \\ \text{no timo} \\ Xc(i) = \text{níveis médios da expressão dos genes} \\ \text{no pool de órgãos} \\ S(i) = \text{desvio padrão de medidas repetidas de} \\ expressão \\ So = \text{constante positiva} \\ \end{cases}$$

onde Xp(i) e Xc(i) são definidos como níveis médios da expressão do gene nos estados p (timo) e c (pool de órgãos), respectivamente. A dispersão gene-específica S(i) é o desvio padrão de medidas repetidas de expressão, e a constante positiva So no denominador da equação acima serve para certificação de que a variância de d(i) é independente da expressão gênica. Para a determinação de genes com mudanças significativas na expressão, utilizou-se um gráfico de dispersão de d(i) em relação à diferença relativa esperada d_E.(i). Para uma grande maioria de genes d(i) \cong d_E.(i), mas alguns genes são representados por pontos distantes da linha d(i) \cong d_E.(i). As alterações das expressões dos genes que se encontram a uma distância maior do que o limiar (Δ) são então consideradas significantes.

O limiar (Δ) determina dois cortes, ou seja, o menor valor de d(i) indica que o gene seja considerado significantemente induzido (hiperexpresso), e o valor menos negativo de d(i) indica que o gene está significantemente reprimido (hipoexpresso).

A porcentagem de genes identificados por mudanças aleatórias é chamada de Freqüência de Descobertas Falsas (FDR), um método inicialmente idealizado por Benjamini; Hochberg (1995) e definido como a proporção esperada de rejeições falsas. O cálculo de FDR e o número de genes com mudanças significativas estão intimamente relacionados com o limiar Δ . À medida que o valor de Δ diminui, o número de genes significantemente alterados aumenta à custa de um aumento de um FDR. Essa determinação do nível de significância pelo limiar providencia cortes assimétricos para genes induzidos e genes reprimidos. Essa assimetria é desejável, posto que os genes induzidos e genes reprimidos podem se comportar de maneira diferente em alguns experimentos. Ao utilizar o SAM, o usuário pode escolher o limiar Δ mais conveniente com base no nível de significância estimado pelo FDR e no número de genes com os quais se pretende trabalhar.

O programa SAM estabelece automaticamente uma ligação entre o número de acesso das sequências utilizadas com as páginas de informações sobre o clone em questão, situados no banco de dados S.O.U.R.C.E. (*"Stanford Online Universal Resource for Clones and ESTs"*) (http://source.stanford.edu/cgi-bin/source/sourceSearch). O S.O.U.R.C.E. compila informações de vários bancos de dados públicos (*UniGene, dbEST, Swiss-Prot, GeneMap99, RHdb, GeneCards e LocusLink*) e as disponibilizam de maneira a facilitar a identificação dos genes diferencialmente expressos.

O programa SAM permite ainda o agrupamento hierárquico, porém, o mais importante na elaboração deste agrupamento é a decisão sobre qual medida de similaridade será adotada, a necessidade de se transformar a escala dos valores de expressão (normalmente transformada em escala logarítmica) e a dependência dos genes entre si. O agrupamento hierárquico nos permite a definição de grupos de genes com o mesmo padrão de expressão, seja ele de indução ou de repressão. Todas as informações citadas acima foram retiradas do trabalho de Tusher; Tibshirani; Chu (2001), do manual do software SAM e de relatórios técnicos publicados na página de Robert Tibshirani (<u>http://www-stat.stanford.edu/~tibs/SAM</u>).

4.12.2 <u>Nomenclatura dos genes</u>

Neste trabalho, optou-se por seguir a nomenclatura usual para os genes de camundongos, ou seja, o símbolo do gene em inglês com a primeira letra maiúscula e as seguintes minúsculas. Os nomes dos genes estão em inglês, pois toda a literatura e os bancos de dados internacionais como Source, GenBank etc. estão neste idioma. Além disso, todos os arquivos da biblioteca de cDNA estão em inglês.

4.12.3 GeneNetwork

O programa escolhido para a inferência de redes gênicas foi o GeneNetwork por ser aquele que melhor se aplica aos nossos conjuntos de dados. O GeneNetwork é um software livre e encontra-se disponível aos usuários no site: http://genenetwork.sbl.bc.sinica.edu.tw/index.asp.

O fluxo do trabalho para GeneNetwork é como segue: (1) input dos dados experimentais no formato de texto limitado por tabulações; (2) proceder a interpolação dos dados através do controlador de interpolação se o número de pontos de dados experimentais for insuficiente para iniciar os cálculos de inferência; (3) executar a aproximação da inferência por engenharia reversa através do "Modeling controller" para gerar a matriz gênica regulatória que descreve como os genes se regulam; (4) extrair automaticamente a rede para a visualização, baseada na matriz regulatória; (5) comparar a rede intuitiva inferida com as bases de dados on-line tais como KEGG (http://www.genome.jp/kegg/), baseado na informação do GraphViewer Network e do Information Viewer; e (6) a revisão dos conjuntos de experiências propostos e geração da hipótese (WU et al., 2004).

Para facilitar a interpretação dos grafos gerados pelo programa GeneNetwork, um dos alunos de mestrado do laboratório do Prof. Dr. Geraldo A. S. Passos, Universidade de São Paulo, campus de Ribeirão Preto, Guilherme Silva Liberato desenvolveu o programa Mandala, ainda não publicado. Seu algoritmo, escrito em linguagem de programação C, decodifica a matriz regulatória proveniente do GeneNetwork, desvendando as interações gênicas existentes sem que seja necessário analisar o grafo correspondente à rede. O resultado é apresentado em formato textual.

4.12.4 Cytoscape

O cytoscape é uma plataforma de software para visualização e análise de redes de interação molecular e caminhos biológicos, além de integração dessas redes com anotações, perfis de expressão gênica e dados de outra fonte (http://www.cytoscape.org/) (SHANNON, 2003).

O plug-in MCODE (Molecular Complex Detection) é responsável por encontrar clusters (regiões altamente conectadas) em uma rede pré-estabelecida. O algoritmo MCODE opera em três estágios: valor do vértice (nó gênico), predição complexa e, opcionalmente, pós-processamento para filtrar ou adicionar genes nos complexos resultantes determinadas por critérios de conectividade.

Para encontrar localmente regiões densas de um gráfico, o MCODE usa um valor de vértice com base no coeficiente de *clustering*, Ci, que agrupa medidas da região de um vértice. Ci = 2n/ki (ki-1) onde ki é o tamanho do vértice do grupo i; e n é o número de arestas. Não existe nenhuma definição de teoria dos grafos de densidade, mas as definições são normalmente com base no nível de conectividade. Densidade de um grafo, G = (V, E), com o número de vértices, | V |, e número de arestas, | E |, é aqui definida como | E | dividido pelo número máximo de arestas possíveis para o gráfico, | E | max. Para obter um gráfico com loops (uma aresta conectando com o vértice de origem), | E | max = | V | (| V | +1) / 2 e para um gráfico

sem alças, | E | max = V (V-1)/2. Assim, a densidade de G, é, portanto, um número real variando 0,0-1,0. (BADER; HOGUE, 2003).

4.12.5 FatiGO

O FatiGO é uma ferramenta disponível na internet para a análise funcional de grupos de genes de experimentos em grande escala, orientando para a interpretação dos resultados de *microarray* (<u>http://babelomics3.bioinfo.cipf.es/</u>). Esta análise é feita comparando duas listas de genes por meio do teste exato de Fisher (AL-SHAHROUR, 2005).

Um dos principais campos de aplicação do FatiGO tem sido a análise de dados de *microarray*s de expressão gênica, mas pode ser aplicado a qualquer outro tipo de experimento envolvendo um grande número de genes (AL-SHAHROUR, 2005).

4.13 Confirmação dos dados de microarrays por PCR em tempo real

As análises por PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR) foram realizadas utilizando-se da metodologia SYBR Green, de acordo com o fabricante (Applied Biosyntems) num aparelho 7500 Real Time PCR (Applied Biosystems).

A primeira etapa do processo consiste na avaliação da especificidade dos produtos PCR por meio da análise de uma curva de dissociação. Para isso, é realizada quantificação absoluta de cada par de primers, inclusive dos genes constitutivos, utilizando diluições seriadas 1:10 a 1:10000 de cDNA para calcular a eficiência da reação e, conseqüentemente, a qualidade dos primers. A reação consiste de amplificação seguida de dissociação.

Os valores de *Slope* e de R2 fornecidos após a construção de uma curva de regressão linear são utilizados para avaliação da eficiência da reação (E) utilizandose a fórmula E=10(-1/Slope)-1 (*User Bulletin#2, ABI Prism 7700 Sequence Detection System*). A segunda etapa consiste na reação quantitativa propriamente dita. Dessa forma, foi realizada quantificação relativa para avaliar a expressão gênica em cada amostra e compará-las entre si. A reação final consiste em 20 µL, contendo 0,8 µL de cada primer, 1X solução de SYBR Green e 1 µL de cDNA sintetizado a partir de uma quantidade padronizada de RNA total (2 µg de RNA).

Os primers foram desenhados com o auxílio do software *Primer3* (<u>http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi</u>) cujos parâmetros foram ajustados para que todos apresentassem temperatura de anelamento a 60°C.

Símbolo	Primer	Sequências	Amplicon	Tm
do gene			(pb)	
Col4a1	Forward	5'-GTGCCACGGCAGAGGAACGT-3'	149	60°C
	Reverse	5'-ACACTTGGCAGCGGCTGACG-3'		
Alg9	Forward	5'-CGCTGATCGCCATGACGGGA-3'	132	60°C
	Reverse	5'-TGGCCAGCAAGTCGAAGGCG-3'		
Tusc4	Forward	5'-GCTGATTGGCTGCCCCGTGT-3'	146	60°C
	Reverse	5'-GCGTGGTCAAGTAGCCGGCC-3'		
ll13	Forward	5'-TGGCTCTTGCTTGCCTTGGTG-3'	146	60°C
	Reverse	5'-CCATACCATGCTGCCGTTGCA-3'		
Gapdh	Forward	5'-GGGTGTGAACCACGAGAAAT-3'	142	60°C
	Reverse	5'-CCTTCCACAATGCCAAAGTT-3'		

Tabela I – Primers Utilizados na	as reacões de gRT-	PCR
----------------------------------	--------------------	-----

4.13.1 Análise estatística dos dados de gRT-PCR

É importante notar que a avaliação da expressão dos transcritos por PCR em tempo real ocorre por meio de análise diferente daquela empregada nos dados de *microarray*s. Os valores de quantificação relativa são calculados utilizando-se a comparação de genes constitutivos, conforme descrito por Pfaffl (2001).

Para análise estatística dos dados, utilizou-se o teste estatístico One-way ANOVA por meio do software estatístico *GraphPad Prism* 4.00 (<u>http://www.graphpad.com/prism/Prism.htm</u>).

Os genes constitutivos utilizados foram Gapdh (*Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*) e o Hprt1 (*Hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase*). Foram feitas triplicatas experimentais de cada amostra (triplicata técnica). Os gráficos foram construídos de acordo com os valores de RQ (*Relative Quantification*), calculados utilizando como calibrador o menor dos valores de Δ Ct obtidos.

5. Resultados

5. **RESULTADOS**

5.1 Proliferação Celular

A proliferação celular (Figura 4) teve pico no 10º dia nos dois grupos. As células indiferenciadas da polpa apresentaram menor proliferação em todos os períodos quando comparadas às células odontoblásticas. Houve diferença estatística entre os dois grupos em todos os períodos estudados.



Figura 4. Proliferação celular após 3, 7 e 10 dias de cultura. Análise estatística de Mann-Whitney para $p \le 0.05$. *Diferença estatística com $p \le 0.05$.

5.2 Viabilidade Celular

A viabilidade celular (Figura 5), expressa como porcentagem de células viáveis, permaneceu acima de 80% em ambos os tipos celulares em todos os períodos estudados.



Figura 5. Viabilidade celular após 3, 7 e 10 dias de cultura. Análise estatística de Mann-Whitney para $p \le 0.05$. *Diferença estatística com $p \le 0.05$ no período de 7 dias.

5.3 Atividade de Fosfatase Alcalina

A maior produção de fosfatase alcalina (Figura 6), enzima relacionada ao processo de mineralização, foi observada no 10^o dia em ambos os grupos. Em todos os tempos, as células odontoblásticas foram as que apresentaram maior produção de ALP. Houve diferença estatística entre os dois grupos em todos os períodos.



Figura 6. Atividade de fosfatase alcalina após 3, 7 e 10 dias de cultura. Análise estatística de Mann-Whitney para $p \le 0.05$. *Diferença estatística com $p \le 0.05$.

5.4 Mineralização

5.4.1 Análise qualitativa de depósito de cálcio

A análise qualitativa da formação de nódulos mineralizados (Figura 7), realizada no 17º dia, indicou diferença na quantidade, na forma e na distribuição dos nódulos, entre os grupos estudados. No grupo (A) foi observado que as células indiferenciadas da polpa não formaram nódulos visíveis de mineralização. Por outro lado, no grupo (B), as células odontoblásticas formaram nódulos de mineralização principalmente na periferia dos poços.



Figura 7. Imagens macroscópicas de nódulos calcificados, corados em vermelho de alizarina após 17 dias, referentes à cultura de células indiferenciadas da polpa (A) e células odontoblásticas (B).

5.4.2 Análise quantitativa de depósito de cálcio

A quantificação do vermelho de alizarina mostrou que houve diferença na quantidade de depósito de cálcio entre os dois grupos, sendo que as células odontoblásticas apresentaram maior quantidade de cálcio que as células indiferenciadas da polpa (Figura 8).



Figura 8. Formação de nódulos calcificados após 17 dias em cultura de células indiferenciadas da polpa e células odontoblásticas. Os dados representam média aritimética (n= 10). Teste estatístico de Mann-Whitney, p≤0,05.

5.5 Imunolocalização

5.5.1 Morfologia celular

As imagens obtidas através de imunofluorescência mostraram que as células indiferenciadas da polpa apresentaram morfologia distinta das células odontoblásticas. Enquanto as primeiras apresentaram uma forma mais alongada e distribuíram-se uniformemente por toda a placa, as últimas apresentaram forma poligonal e organizaram-se em grupos.

5.5.2 Expressão de proteínas não colágenas

A imunolocalização das proteínas osteopontina (OPN) e DSPP foram realizadas após 24 horas, 3 e 7 dias de cultura. As imagens mostram que nas células indiferenciadas da polpa e nas células odontoblásticas, a marcação da proteína OPN foi mais intensa ao terceiro dia nos dois grupos, estando presente nos

dois tipos celulares de maneira uniforme principalmente ao redor do núcleo celular (Figura 9).

Já a imunolocalização para a proteína DSPP foi mais intensa. A expressão da DSPP foi maior aos 7 dias nas células odontoblásticas quando comparado às células indiferenciadas da polpa e aos demais períodos (Figura 10).



Figura 9. Epifluorescência de tripla marcação de cultura de células indiferenciadas da polpa (A,C e E) e odontoblásticas (B, D e F), nos período de 24 horas (A e B), 3 (C e D) e 7 dias (E e F). Marcação para osteopontina em fluorescência vermelha e para núcleos celulares em fluorescência azul (DAPI). O citoesqueleto de actina é detectado por marcação com faloidina (verde) conjugada com Alexa Fluor 488. Aumento de 40x.


Figura 10. Epifluorescência de tripla marcação de cultura de células indiferenciadas da polpa (A,C e E) e odontoblásticas (B, D e F), nos período de 24 horas (A e B), 3 (C e D) e 7 dias (E e F). Marcação para DSPP em fluorescência vermelha e para núcleos celulares em fluorescência azul (DAPI). O citoesqueleto de actina é detectado por marcação com faloidina (verde) conjugada com Alexa Fluor 488. Aumento de 40x.

5.6 Análise da expressão gênica transcricional

5.6.1 <u>Avaliação da integridade das preparações de RNA total</u>

As amostras de RNA total de células indiferenciadas da polpa e células odontoblásticas foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1% sob condições denaturantes. Utilizamos somente amostras que se apresentaram íntegras com relação às subunidades de RNAr 28S e 18S, e RNAt 4S, além de livres de proteínas ou de fenol, como avaliado por espectrofotometria UV (Figura 11).



Figura 11. Eletroforese de amostras de RNA em gel de agarose sob condições denaturantes, referentes à cultura de células indiferenciadas da polpa (A e B) e células odontoblásticas (C).

5.7 Aquisição de imagens dos *microarray*s por scanning

A Figura 12 ilustra uma imagem típica de hibridação de uma das lâminas de *microarray*. Neste caso utilizamos sonda complexa marcada com Cy3 (células indiferenciadas da polpa ou células odontoblásticas nos pontos verdes) e o pool de referência foi marcado com Cy5 (pontos vermelhos). Os pontos amarelos correspondem aos genes cujas seqüências de RNAm (cDNAs) estavam presentes tanto em células indiferenciadas da polpa ou células ou células odontoblásticas como no pool de referência.



Figura 12. Imagem de hibridização de microarray com sondas fluorescentes (Cy3 e Cy5).

5.8 Perfil de expressão gênica

Após a correção do background e a normalização dos dados, as análises dentro do pacote MEV, foram realizadas com os genes expressos em, no mínimo, 80% dos experimentos. Os dados (amostras e genes) foram centralizados pela mediana e a partir da matriz gerada foram calculadas as medianas dos 6 valores (Figura 13).

Observamos um conjunto total de 3515 seqüências presentes no *microarray*, deste foi obtido 297 genes diferencialmente expressos segundo análises estatísticas do programa SAM (FDR \leq 5%, p-value \leq 0.05), ou seja, trabalhamos com 95 % de confiabilidade estatística.



Figura 13. Matriz de expressão (heatmap) de 297 sequências (genes) de células indiferenciadas da polpa e células odontobásticas. O vermelho indica a indução da expressão, o verde indica a repressão e o preto ausência de modulação. O cinza indica ausência de valores. O heatmap à direita evidencia o início da matriz.

5.9 Rede de interações transcricionais (redes gênicas)

Redes de interações transcricionais, também chamadas de redes gênicas, foram obtidas com o uso do programa GeneNetwork (WU et al., 2004) com entrada (input) dos dados atuais de *microarray*s.

Para a construção do modelo linear, utilizamos o número de ligações igual ao número de genes de entrada. Nem todos os genes de entrada participaram das interações dentro da rede reconstruída, pois estes foram eliminados após a análise matemático-estatística. A rede gerada foi então visualizada e editada com o uso do software Cytoscape (Figura14).



Figura 14. Rede de interações transcricionais.

5.9.1 <u>Sub-redes de interações transcricionais</u>

Com a finalidade de facilitar a análise das interações transcricionais observadas, focando "regiões" de interesse, utilizamos o plug-in MCODE do software Cystoscape.

Dessa forma, geramos "sub-redes" da rede principal com um score estatístico associado. Esta sub-rede (score = 3,094) apresentou os nós gênicos: Tusc4 (*Nitrogen permease regulator-like 2*), Jak2 (*Janus kinase 2*), II13 (*Interleukin 13*), Arfgef1 (*ADP-ribosylation factor guanine nucleotide-exchange factor 1*), RpI7a (*Ribosomal protein L7a*), Rps25 (*Ribosomal protein S25*), Gga1(Golgi associated, gamma adaptin ear containing, ARF binding protein 1), RpI18a (*Ribosomal protein L18A*) e Gm4210 (*RIKEN cDNA A230070E04 gene*) (Figura 15).



Figura 15. Sub-rede transcricional.

5.10 Confirmação dos dados de *microarray*s por PCR em tempo real

As mesmas amostras utilizadas na preparação das sondas foram submetidas a Real Time PCR para alguns dos genes que se mostraram diferencialmente expressos nas análises feitas pelo SAM. Foram feitas triplicatas técnicas de cada um dos genes.

Os genes escolhidos para a confirmação foram Col4a1(Collagen, type IV, alpha 1), Alg9 (Asparagine-linked glycosylation 9 homolog), Tusc4 (Nitrogen permease regulator-like 2) e II13 (Interleukin 13), sendo que Col4a1 foi reprimido nas células indiferenciadas e induzido nas células odontoblásticas, Alg9 foi induzido nas células indiferenciadas e reprimido nas células odontoblásticas, Tusc4 foi reprimido nas duas células e II13 foi induzido nas duas células de acordo com a análise estatística feita pelo SAM.

O gene constitutivo mais apropriado para estas amostras, de acordo com o software *BestKeepes*, foi o Gapdh (*Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*), que se apresentou mais constante e melhor representado. Os gráficos foram construídos de acordo com os valores de RQ (Relative Quantification), calculados utilizando como calibrador o menor valor dos valores de Δ Ct.

Em vista de o calibrador ser o menor valor de expressão, o perfil de repressão encontra-se próximo ao valor de QR 0.00, enquanto o perfil de indução com valor próximo de 1.00 (Figura16).

O gene Col4a1 apresentou-se reprimido nas células odontoblásticas, mas induzido nas células indiferenciadas apresentando significância estatística. Esta observação contrária ao perfil de expressão gerado pela técnica dos *microarray*s.

Os genes Tusc4 e Alg9 apresentaram-se induzidos em ambas as células. No caso do gene Tusc4, o resultado é contrário ao perfil de expressão gerado pela

técnica dos *microarray*s. Já no gene Alg9 houve concordância com o perfil de expressão gênica gerado pela técnica dos *microarray*s somente nas células indiferenciadas.

O gene II13 apresentou-se induzido nas células odontoblásticas, mas reprimido nas células indiferenciadas apresentando significância estatística. Houve concordância com o perfil de expressão gênica gerado pela técnica dos *microarray*s nas células odontoblásticas.



Figura 16. Gráfico dos valores de expressão relativa (QR) dos genes Col4a1, Tusc4, Alg9 e II13 das células indiferenciadas e células odontoblásticas. (Análise estatística ANOVA; ** p<0.01).

5.11 FatiGO

Tabela II. Clone ID, localização cromossômica e função de genes cuja expressão foi

reprimida nas células indiferenciadas e nas células odontoblásticas.

Função	Gene	Clone ID	Localização cromossômica
Ativação celular	Traf6	1330069	2 E2
	Vav1	582976	17 D
	Bad	582454	19 A
	ll18	1328063	9 A5.3

	Cx3Cl1 Evi	1329058 582896	8 C5 12 F2
	Bcl6	573624	16 B1
Adesão Celular	Traf6	1330069	2 F2
	Vav1	582976	17 D
	1118	1328063	9 A5 3
	Cx3Cl1	1329058	8 C5
	BCI6	573624	16 B1
	Col27a1	1378843	4 C1
	00127 41	1010010	
Proliferação celular	ll18	1328063	9 A5.3
	Bcl6	573624	16 B1
	Erf	583589	7 A3
	Btg1	574654	10 C3
Ciclo Celular	Mic12	583030	11 B/
Cicio Ceidiai		1//7102	10 B1
		592067	5 C1
	Allapc4 Erf	503007	
	EII Eofo	592011	7 A3 4 D2
Divisão colular	Mic12	583030	4 D3
Divisão celular	Ananci	583067	5 C1
Morte Celular	Traf6	1330069	2 F2
Worte Cerular	Rel6	573624	2 L2 16 B1
	Bad	582454	
	E2f2	582011	4 D3
	Bta1	57/65/	10 C3
Produção de citocinas	Traf6	1330069	2 F2
i rouuçuo uo oncoomuo	1118	1328063	9 A5 3
	Bcl6	573624	16 B1
Resposta Imune	Traf6	1330069	2 E2
	Vav1	582976	 17 D
	1118	1328063	9 A5.3
	Cx3Cl1	1329058	8 C5
	Bcl6	573624	16 B1
	Ccl20	1226828	1 C5
	B2m	576493	2 F1-F3
	Irf8	640774	8 E1
	Ada	577879	2 H3
	Gzma	572830	13 D
Comunicação Celular	Traf6	1330069	2 E2
	Vav1	582976	17 D
	Bad	582454	19 A
	ll18	1328063	9 A5.3
	Cx3Cl	1329058	8 C5
	EVI	582896	12 +2
	BCI6	573624	16 B1
	Socs1	582855	16 A1
	Gzma	572830	13 D
	Casp8	5099113	1 B
	Btrc	639945	19 D1
	Rasa3	582174	8 A1.1
	Artget1	583594	1 A2
	Map3k1l	575211	19 A
	Cant1	1379942	11 E2

Função	Gene	Clone ID	Localização cromossômica
Ativação celular	II10	1002777	1 E4
Adesão Celular	Cd97	641135	8 C2
	Sema4d	583259	13 B1
	Itgax	5039085	7 F3
Proliferação celular	ll10	1002777	1 E4
	Cxcl10	5327290	5 E2
Ciclo Celular	Fos	5376627	12 D2
	Hspa8	575712	9 A5.1
	Gfi1	640751	5 F
	Erh	583664	12 D1
Morte Celular	II10	1002777	1 E4
	Fcgr1	575540	3 F2.1
	Sema4d	583259	13 B1
	Bcap31	574060	X A6
	Bclaf1	640482	10 A3
	Serpinb2	573970	1 E2.1
Produção de citocinas	ll10	1002777	1 E4
Resposta Imune	II10	1002777	1 E4
	II13	1140097	11 B1.3
	CxcI10	5327290	5 E2
	Fcgr1	575540	3 F2.1
	Sema4d	583259	13 B1
	Bcap31	574060	X A6
	Cd53	576862	3 F2.3
Comunicação Celular	II10	1002777	1 E4
	II13	1140097	11 B1.3
	Prkag1	640537	15 F1
	CxcI10	5327290	5 E2
	Cd97	641135	8 C2
	Fcgr1	575540	3 F2.1
	Cd53	576862	3 F2.3
	Mapk8ip3	576539	17 A3.3
	Lef1	575374	3 G3
	Itgax	5039085	7 F3
	Ncoa2	640607	1 A3-A5

Tabela III. Clone ID, localização cromossômica e função de genes cuja expressãofoi induzida nas células indiferenciadas e nas células odontoblásticas.

Função	Gene	Clone ID	Localização cromossômica
Ativação celular	Fas	621020	19 C1
	Rab27a	640750	9 D
Adesão Celular	Col4a1	575042	8 A1.1
Proliferação celular	Anxa1	640284	19 B
	Jak2	5068946	19 C1
	Evi2a	574757	11 B5
Ciclo Celular	Anxa1	640284	19 B
Morte Celular	Fas	621020	19 C1
	Rab27a	640750	9 D
	Jak2	5068946	19 C1
	Il2rb	1328304	15 E
Resposta Imune	Fas	621020	19 C1
	Rab27a	640750	9 D
	C1qb	583277	4 D3
	Cacnb3	583865	15 F1
Comunicação Celular	Fas	621020	19 C1
	Rab27a	640750	9 D
	Cacnb3	583865	15 F1
	Anxa1	640284	19 B
	Jak2	5068946	19 C1
	Il2rb	1328304	15 E
	Igf2r	577454	17 A-C
	Rap2a	583613	14 E4
	Dusp2	640913	2 F1
	Stam2	577234	2 C1.1

Tabela IV. Clone ID, localização cromossômica e função de genes cuja expressão

Ativação celular	Fas	621020	19 C1
	Rab27a	640750	9 D
Adesão Celular	Col4a1	575042	8 A1.1
Proliferação celular	Anxa1	640284	19 B
	Jak2	5068946	19 C1
	Evi2a	574757	11 B5
Ciclo Celular	Anxa1	640284	19 B
Morte Celular	Fas	621020	19 C1
	Rab27a	640750	9 D
	Jak2	5068946	19 C1
	Il2rb	1328304	15 E
Resposta Imune	Fas	621020	19 C1
	Rab27a	640750	9 D
	C1qb	583277	4 D3
	Cacnb3	583865	15 F1
Comunicação Celular	Fas	621020	19 C1
	Rab27a	640750	9 D
	Cacnb3	583865	15 F1
	Anxa1	640284	19 B
	Jak2	5068946	19 C1
	II2rb	1328304	15 E
	Igf2r	577454	17 A-C
	Rap2a	583613	14 E4
	Dusp2	640913	2 F1
	Stam2	577234	2 C1.1

foi reprimida nas células indiferenciadas e induzida nas células odontoblásticas.

Tabela V. Clone ID, localização cromossômica e função de genes cuja expressão foi

induzida nas células indiferenciadas e reprimida nas células odontoblásticas.

Função	Gene	Clone ID	Localização cromossômica
Resposta Imune	C1s	576427	6 F2
Comunicação Celular	Csnk1a1 Dgkd	640022 1328669	18 D3 1 D

6. Díscussão

6. DISCUSSÃO

6.1 Avaliações do estímulo celular

Linhagens de células indiferenciadas da polpa e odontoblásticas têm sido amplamente empregadas para estudar novas técnicas para o cultivo de órgãos e tecidos, buscando métodos de regeneração de tecidos dentários perdidos e até mesmo a formação de novos dentes. No presente estudo, realizou-se a caracterização do comportamento celular *in vitro* de duas linhagens: células indiferenciadas da polpa e células odontoblásticas com avaliação do perfil de expressão gênica utilizando a tecnologia dos cDNA *microarray*s. A avaliação *in vitro* permitiu estudar de forma mais detalhada os eventos celulares relacionados a estas duas linhagens.

No presente estudo pôde ser visto que a linhagem de células indiferenciadas da polpa apresentou menor proliferação celular que as células odontoblásticas, porém, apesar deste resultado, a viabilidade celular de ambas as células foi maior que 80%.

A atividade de fosfatase alcalina (ALP) das células odontoblásticas apresentouse maior que as células indiferenciadas em todos os períodos. Este resultado se relaciona com a formação de nódulos de mineralização e maior deposição de cálcio pelas células diferenciadas em odontoblastos, visto que a ALP estimula a mineralização fornecendo fosfato, sendo considerado um marcador da diferenciação odontoblástica (PANG et al., 2006). Foi relatado um comportamento similar na linhagem de células odontoblásticas demonstrando uma alta atividade de ALP e formação de múltiplos nódulos mineralizados (HANKS et al., 1998a, 1998b). Neste mesmo estudo observou-se que o ácido ascórbico promove a formação de colágeno e matriz extracelular; e o β-glicerofosfato é necessário para que ocorra a mineralização dos nódulos (HANKS et al., 1998a). A formação de nódulos tem sido considerada um predecessor e um importante distintivo para a mineralização (PANG et al, 2006). Considerando que a fosfatase alcalina está relacionada ao processo de mineralização (BALCERZAK et al., 2003), observou-se pela coloração de vermelho de alizarina um maior tamanho e quantidade de nódulos de cálcio nas células odontoblásticas, as mesmas que apresentaram maiores níveis de ALP. Estudos com M2H4 (sublinhagem de células da polpa dentária de rato) em contato com ácido ascórbico demonstraram numerosas fibrilas colágenas, no entanto não foram observados depósitos de mineralização (RITCHIE et al., 2002).

Através das análises morfológicas por imunofluorescência pudemos observar que as células indiferenciadas da polpa mostraram-se alongadas e com distribuição uniforme, enquanto as células odontoblásticas possuíam uma forma poligonal e organizada em grupos. Em um estudo com células-tronco da polpa dentária humana observaram-se culturas heterogêneas, variando de um formato estreito-fusiforme a poligonal, e na que subconfluência apresentaram-se com formato cubóide (BAKOPOULOU et al., 2011). Hanks et al. (1998b) ressaltaram que as células odontoblásticas apresentam formato epitelióide ou poligonal, е formam agrupamentos de células em multicamadas. A linhagem MDPC-23 apresentou características morfológicas e funcionais de células diferenciadas em odontoblastos, demonstrando um fenótipo odontoblástico (RODRIGUEZ et al., 2009).

A família das proteínas SIBLING é um grupo de proteínas não-colágenas que incluem sialofosfoproteína dentinária (DSPP), proteína da matriz dentinária 1 (DMP-1), sialoproteína óssea (BSP) e osteopontina (OPN). Essas proteínas estão presentes na matriz extracelular do tecido dentinário, e são responsáveis pela

iniciação e modulação da mineralização das fibras colágenas convertendo predentina em dentina (HUANG et al., 2008). Observamos através da imunofluorescência a exposição das proteínas não-colágenas OPN e DSPP nas células indiferenciadas da polpa e nas células odontoblásticas.

A OPN está presente em grande quantidade tanto em tecidos mineralizados como em tecidos não mineralizados. Alguns estudos *in vitro* demonstraram que a OPN é um efetivo inibidor da formação e crescimento da apatita, concluindo que esta proteína pode ser o maior fator inibitório da mineralização (HUANG et al., 2008). A imunofluorescência evidenciou a presença de OPN nas células indiferenciadas da polpa e nas células odontoblásticas, principalmente ao redor do núcleo. Rodriguez et al. (2009) apresentou um resultado similar detectando OPN na linhagem MDPC-23. Relatou-se a expressão de OPN em pré-odontoblastos e em odontoblastos maduros, mas não em odontoblastos jovens (HANKS et al., 1998b).

A sialofosfoproteína dentinária (DSPP) é proteoliticamente processada em sialoproteína dentinária (DSP) e fosfoproteína dentinária (DPP), e ambas são cruciais para a mineralização dentinária (HUANG et al., 2008). A avaliação por imunofluorescência da proteína DSPP demonstrou a mais expressa nas duas linhagens em relação à OPN, e uma maior expressividade nas células diferenciadas do que não diferenciadas, evidenciando sua importante função na diferenciação celular. Este resultado está de acordo com outros estudos, como Sun et al. (1998) e Hanks et al. (1998a, 1998b) que mostraram que a linhagem MDPC-23 expressou DSP e PP. Devido a estas proteínas não-colágenas serem exclusivas de células odontoblásticas, MDPC-23 foi descrita funcionalmente como uma linhagem de

células da polpa dentária de rato) na presença de ácido ascórbico resultou em uma quantidade significante de DSPP transcrita (RITCHIE et al., 2002).

6.2 Perfis de expressão gênica, redes de interações gênicas e validação por PCR

Apesar de a tecnologia do cDNA *microarray* ter a capacidade de monitorar simultaneamente a expressão de milhares de genes, empregamos os dados de expressão gênica do *microarray* para a construção de redes gênicas para um melhor entendimento do comportamento celular.

Neste estudo pôde ser ilustrado, por exemplo, que o Jak2 sofreu muitas interações, a maioria sendo negativas. Jak2 é membro da família da tirosina quinase, desempenhando um papel essencial na transdução de sinais de citocinas e na regulação do crescimento celular e expressão gênica (ITO et al., 2004). No presente estudo, relaciona-se à proliferação celular, morte celular e comunicação celular, estando reprimido nas células indiferenciadas da polpa e induzido nas células odontoblásticas.

Outro nó gênico com muitas interações negativas é o II13, o qual se apresentou induzido em ambas as células, relacionando-se à resposta imune e à comunicação celular. Vários estudos ilustraram que o papel central do II13 é na regulação de citocinas mediadas na resposta imune. Em algumas condições patológicas, a expressão do II13 está associada à diminuição da resistência a infecção, inflamação destrutiva e formação de tecido cicatricial (WYNN, 2003).

O Arfgef1 apresentou-se como um nó gênico promovendo a regulação de muitos genes, a maioria sendo de forma negativa, incluindo Jak2 e II13. Apresentou-se reprimido nas células indiferenciadas e nas células odontoblásticas, relacionado à

comunicação celular. As proteínas de ligação GTP da família ARF / SAR são chaves reguladoras do tráfego intracelular. Estas proteínas são controladas principalmente por dois fatores: fatores de troca nucleotídeos guanina (GEFs) e GTPase ativador de proteínas (BPA). A Arf desempenha um papel fundamental na formação de vesículas (SPANG; SHIBA; RANDAZZO, 2010).

O nó gênico Rpl7a recebeu a interação de muitos genes, estando relacionado ao processo metabólico celular, e encontrou-se induzido em ambas as células.

Os nós gênicos Gga1 e RpI18a sofreram diversas regulações, inclusive se auto-regularam de forma positiva. Enquanto Gga1 encontrou-se induzido, RpI18a encontrou-se reprimido nas células indiferenciadas da polpa e nas células odontoblásticas. Embora o papel dos Ggas esteja longe de ser esclarecido, está claro que eles contribuem, isoladamente ou em cooperação, para o transporte de receptores pelo Complexo de Golgi e compartimentos endossomais (DORAY et al., 2002).

O nó gênico Tusc4 é o que promoveu o maior número de regulações, tanto de forma positiva como de forma negativa. Apresentou-se reprimido nas duas células estudadas. Este nó gênico regula negativamente os genes Erf (*Ets2 repressor factor*), Cxcl10 (*Chemokine (C-X-C motif) ligand 10*), Rpl26 (*Ribosomal protein L26*), Psmc3 (*Proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, ATPase 3*), Capn2 (*Calpain 2*), Gga1, Atp6v0e (*ATPase, H+ transporting, lysosomal V0 subunit E*) e Jak2; e positivamente Fip111 (*FIP1 like 1*), Tcf711 (*Transcription factor 7-like 1*) e Cope (*Coatomer protein complex, subunit epsilon*). O Tusc4 está envolvido com processos oncogênicos e apoptose, tendo sido mapeado em determinadas regiões genômicas associadas com a supressão de tumor e apoptose em humanos e camundongos (KNORR et al., 2006).

Os genes Btg1 (*B-cell translocation gene 1, anti-proliferative*), Erf (*Ets2 repressor factor*) e Bad (*BCL2-associated agonist of cell death*) apresentaram-se reprimidos nas células indiferenciadas da polpa e nas células odontoblásticas. Estes genes estão relacionados à proliferação e morte celular, ciclo e proliferação celular, comunicação e morte celular, respectivamente. Segundo Takahashi, N. et al. (2008) a repressão de Btg1 parece estar envolvida na aceleração da resposta imune.

O gene Cxcl10 encontrou-se induzido em ambas as células, apresentando relação com a resposta imune, comunicação e proliferação celular. Kirouac et al. (2010) identificou Cxcl10 como inibidor da expansão de células-tronco *in vitro*.

C1qb (*Complement component 1, q subcomponent, beta polypeptide*), Col4a1 (*Collagen, type IV, alpha 1*), Rpl6 (*Ribosomal protein L6*) e Rpl26 (*Ribosomal protein L26*) foram genes reprimidos nas células indiferenciadas da polpa e induzidos nas células odontoblásticas, sendo que C1qb tem importância na resposta imune e Col4a1 na adesão celular. C1q é o primeiro componente da via clássica do sistema complemento em mamíferos, desempenhando um papel fundamental no reconhecimento de complexos imunes e é um importante elo de ligação entre a imunidade inata e adquirida (HU et al., 2010). As membranas basais desempenham papéis importantes na diferenciação, proliferação, adesão e migração celular. Col4a é o maior componente estrutural das membranas basais, e a expressão de suas subunidades Col4a1 e Col4a2 é essencial para a integridade estrutural e as propriedades funcionais da membrana basal (PARK et al., 2006).

Já o gene Alg9 encontrou-se induzido nas células indiferenciadas e reprimido nas odontoblásticas.

Os genes II13, Col4a1, Alg9 e Tusc4 foram utilizados para validação do microarray pelo PCR em tempo real, no entanto pudemos observar que somente

alguns desses genes apresentaram resultado similar ao cDNA microarray. Morey; Ryan; Van Dolah (2006) destacaram que o PCR em tempo real é utilizado como uma ferramenta para validação da expressão gênica obtida pelo *microarray*, contudo seus resultados apresentam-se muitas vezes em desacordo. Isto acontece porque os dois métodos requerem e utilizam procedimentos de normalização muito diferentes. Neste estudo, utilizamos para a normalização do cDNA *microarray* uma amostra de referência comum para todos os experimentos que fornecesse uma medida da expressão base para cada gene, através da plataforma R, com o pacote AROMA. Já no PCR em tempo real utilizamos a comparação de genes constitutivos e, para análise estatística dos dados, o teste estatístico One-way ANOVA.

Nas tabelas II e III, podemos observar que alguns genes associados com várias funções celulares odontogênicas foram similarmente expressos nas duas células estudadas. Tanase; Bawden (1996b) observaram que odontoblastos em diferenciação possuem receptores para II10 (*Interleukin-10*), o qual está associado ao início da dentinogênese. Em nosso estudo, o gene que codifica o II10 foi induzido nas células indiferenciadas e odontoblásticas. Ohazama et al. (2004) sugerem que o gene Traf6 (*TNF receptor-associated factor 6*) está envolvido na formação da cúspide molar indicando um papel essencial no desenvolvimento dentário. Na presente investigação, este gene se apresentou reprimido em ambas as células. Estes resultados sugerem que a expressão deste gene deve ocorrer em um momento posterior de deposição de matriz orgânica mineralizada. De acordo com Yokose; Naka (2010), o gene que codifica a proteína Lef1 (*Lymphocyte enhancerbinding factor 1*), que se apresentou induzido nas células indiferenciadas e odontoblásticas a través da regulação da expressão de RNAm para osteocalcina e DSP, proteínas essenciais

93

para a mineralização das fibras colágenas presentes na matriz orgânica extracelular. Os genes que codificam as proteínas da família das *heat shock proteins* (HSPs) exibem uma alta expressão durante a odontogênese, nas células do órgão do esmalte e da papila dentária, tanto na fase de capuz como de câmpanula, que posteriormente sofrerão diferenciação em ameloblastos e odontoblastos, respectivamente (WADA et al., 2002). Este estudo está de acordo com nossos resultados, sugerindo que a indução do gene Hspa8 (*Heat shock protein 8*) em ambas as células estudadas esteja relacionada com o desenvolvimento e diferenciação de células odontoblásticas.

Por outro lado, nas tabelas IV e V, a expressão diferenciada (indução em uma célula e repressão na outra) se deu em uma menor quantidade de genes. O gene Jak2 (*Janus kinase 2*) parece estar envolvido na formação do esmalte dentário (TANASE; BAWDEN, 1996a); este gene foi reprimido nas células indiferenciadas e induzido nas células odontoblásticas. O receptor FAS (*TNF receptor superfamily member 6*) apresenta diversos papéis na apoptose durante a odontogênese e na proliferação celular das alças cervicais (MATALOVA; TUCKER; MISEK, 2005). A análise realizada neste trabalho demonstrou uma repressão do gene FAS nas células indiferenciadas e indução nas células odontoblásticas. Esta diferença na expressão dos genes relacionados anteriormente deve ocorrer seguindo duas hipóteses: (1) a de que estes genes não são expressos em células indiferenciadas ou; (2) de que esta expressão acontece somente em fases mais tardias da diferenciação.

94

7. Conclusões

7. CONCLUSÕES

A caracterização do comportamento das duas células estudadas demonstrou:

-maior proliferação das células odontoblásticas ao longo do experimento;

-viabilidade celular maior que 80% em ambas as células;

-maior quantidade de fosfatase alcalina e formação de nódulos de mineralização nas células odontoblásticas;

-maior expressão das proteínas osteopontina e DSPP nas células odontoblásticas;

-interação de genes relacionados com atividades celulares presentes na formação dentária;

-compartilhamento de expressão de genes relacionados com diversas funções celulares, alguma associadas com a odontogênese.

Após estes resultados, concluímos que as duas células estudadas apresentaram um perfil de expressão gênica com similaridades, evidenciando o potencial de diferenciação odontoblástica das células indiferenciadas da polpa, o que sugere uma possível aplicação destas células na engenharia tecidual e na medicina regenerativa.

8. Referêncías

8. REFERÊNCIAS

AL-SHAHROUR, F.; MINGUEZ, P.; VAQUERIZAS, J.M.; CONDE, L.; DOPAZO, J. Babelomics: a suite of web-tools for functional annotation and analysis of group of genes in high-throughput experiments, *Nucleic Acids Research*, 33: 460-464, 2005.

ARTESE, L.; CORRADO, R.; FERRERO, G.; FIORINI, M.; SANTINELLI, A.; PIATELLI, A. Vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in healthy and inflamed human dental pulps. *J Endod*, 28: 20–23, 2001.

BADER, G.; HOGUE, C. An automated method for finding molecular complexes in large protein interaction networks. *BMC Bioinformatics*, 4: 2, 2003.

BAKOPOULOU, A.; LEYHAUSEN, G.; VOLK, J.; TSIFTSOGLOU, A.; GAREFIS, P.; KOIDIS, P.; GEURTSEN, W. Comparative analysis of *in vitro* osteo/odontogenic differentiation potential of human dental pulp stem cells (DPSCs) and stem cells from the apical papilla (SCAP). *Archives of Oral Biology*, 2011. [Article in Press].

BALCERZAK, M.; HAMADE, E.; ZHANG, L.; PIKULA, S.; AZZAR, G.; RADISSON, J.; BANDOROWICZ-PIKULA, J.; BUCHET, R. The roles of annexins and alkaline phosphatase in mineralization process. *Acta Biochim Pol*, 50: 1019-1038, 2003. Review.

BALLINI, A.; FRENZA, G. de; CANTORE, S.; PAPA, F.; GRANO, M.; MASTRANGELO, F.; TETE, S.; GRASSI, F.R. *In vitro* stem cell cultures from human dental pulp and periodontal ligament: new prospects in dentistry. *Int J Immunopathol Pharmacol* 20: 9-16, 2007.

BENJAMINI, Y.; HOCHBERG, Y. Controlling thefalse discovery rate – a practical and powerful approach to multiple testing. *J. R. Stat. Soc. B.*, 57: 289-300, 1995.

BOTERO, T.M.; MANTELLINI, M.G.; SONG, W.; HANKS, C.T.; NÖR, J.E. Effect of lipopolysaccharides on vascular endothelial growth factor expression in mouse pulp cells and macrophages. *Eur J Oral Sci*, 111: 228–234, 2003.

BLOCH-ZUPAN, A.; DECIMO, D.; LORIOT, M.; MARK, M.; RUCH, J.V. Expression of nuclear retinoic acid receptors during mouse odontogenesis. *Differentiation* 57: 195–203, 1994.

BUCHAILLE, R.; COUBLE, M.L.; MAGLOIRE, H.; BLEICHE, F. A substractive PCR-based cDNA library from human odontoblast cells: identification of novel genes expressed in tooth forming cells. *Matrix Biology* 19: 421-430, 2000.

BUTLER, W.T. Dentin extracellular matrix and dentinogenesis. *Oper Dent* 5: 18-23, 1992a.

BUTLER, W.T.; BHOWN, M.; BRUNN, J.C.; D'SOUZA, R.N.; FARACH-CARSON, M.C.; HAPPONEN, R.P. Isolation, characterization and immunolocalization of a 53-kDal dentin sialoprotein (DSP). *Matrix*, 12: 343-351, 1992b.

CARROUEL, F.; COUBLE, M.L.; VANBELL, C.; STAQUET, M.J.; MAGLOIRE ,H.; BLEICHER, F. HUGO (FNDC3A): a new gene overexpressed in human odontoblasts. *J Dent Res.* Feb; 87(2): 131-136, 2008.

DORAY, B.; GHOSH, P.; GRIFfiTH, J.; GEUZE, H.J.; KORNFELD, S. Cooperation of GGAs and AP-1 in packaging MPRs at the trans-Golgi network. *Science* 297:1700–1703, 2002.

FRANCESCHI, R.T.; IYER, B.S.; CUI Y. Effects of ascorbic acid on collagen matrix formation and osteoblast differentiation in murine MC3T3-E1 cells. *J Bone Miner Res*, 9: 843-854, 1994.

GREGORY, C.A.; GUNN, W.G.; PEISTER, A.; PROCKOP, D.J. An Alizarin redbased assay of mineralization by adherent cells in culture: comparison with cetylpyridinium chloride extraction. *Anal Biochem*, 329: 77-84, 2004.

GRONTHOS, S.; MANKANI, M.; BRAHIM, J.; GEHRON ROBEY, P.; SHI, S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) *in vitro* and *in vivo. PNAS* 97(25): 13625–13630, 2000.

GRONTHOS, S.; BRAHIM, J.; LI, W.; FISHER, L.W.; CHERMAN, N.; BOYDE, A.; DENBESTEN, P.; GEHRON ROBEY, P.; SHI, S. Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *J Dent Res* 81(8): 531-535, 2002.

HANKS, C.T.; FANG, D.; SUN, Z.; EDWARDS, C.; BUTLER, W.T. Dentinspecific proteins in MDPC-23 cell line. *Eur J Oral Sci*, 106: 260-266, 1998a.

HANKS, C.T.; SUN, Z.; FANG, D.N.; EDWARDS, C.A.; WATAHA, J.C.; RITCHIE, H.H.; BUTLER, W.T. Cloned 3T6 cell line from CD-1 mouse fetal molar dental papillae. *Connective Tissue Research*, 37(3-4): 233-249, 1998b.

HE, W.X.; NIU, Z.Y.; ZHAO, S.L.; LI, P.; GAO, J. Transcriptional regulation of dentin sialophosphoprotein by c-Jun/c-Fos. *Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi,* 24(1): 67-69, 2006.

HEDGE, P.; QI, R.; ABERNATHY, K.; GAY, C.; DHARAP, S.; GASPARD, R.; HUGUES, J.E.; SNESRUD, E.; LEE, N.; QUACKENBUSH, J. A concise guide to cDNA *microarray* analysis. *Biotechniques* 29(3): 548-562, 2000. HUANG, B.; SUN, Y.; MACIEJEWSKA, I.; QIN, D.; PENG, T.; MCINTYRE, B.; WYGANT, J.; BUTLER, W.T.; QIN, C. Distribution of SIBLING proteins in the organic and inorganic phases of rat dentin and bone. *Eur J Oral Sci.* 116(2): 104-112, 2008.

HU, Y.L.; PAN, X.M.; XIANG, L.X.; SHAO, J.Z. Characterization of C1q in teleosts: insight into the molecular and functional evolution of c1q family and classical pathway. *J Biol Chem.* 285(37): 28777-28786, 2010.

ITO, M.; NAKASATO, M.; SUZUKI,T.; SAKAI,S.; NAGATA,M.; AOKI, F. Localization of Janus Kinase 2 to the nuclei of mature oocytes and early cleavage stage mouse embryos. *Biology of reproduction*, 71: 89–96, 2004.

JÚNIOR, T.C.; BENEDITO, V.A.; FIGUEIRA, A.V.O. Análise serial da expressão gênica. *Rev Biot Ciência e Desenv*, 33: 88-100, 2004.

KIROUAC, D.C.; ITO, C.; CSASZAR, E.; ROCH, A.; YU, M.; SYKES, E.A.; BADER, G.D.; ZANDSTRA, P.W. Dynamic interaction networks in a hierarchically organized tissue. *Mol Syst Biol.* 5: 6:417, 2010.

KNORR, C.; BECK, J.; BEUERMANN, C.; CHEN, K.; DING, N.; GATPHAYAK, K.; HUANG, L.S.; LAENOI, W.; BRENIG, B. Chromosomal assignment of porcine oncogenic and apoptopic genes CACNA2D2, TUSC4, ATP2A1, COL1A1, TAC1, BAK1 and CASP9. *Animal Genetics*, 37(5): 523–525, 2006.

LANGER, R.; VACANTI, J.P. Tissue engineering. Science 14: 920-926, 1993.

LEAL, S.C. Células-tronco derivadas de polpa dentária humana: propriedades e perspectivas. *R Dental Press Ortodon Ortop Facial*, 12 (4): 17-18, 2007.

LIAO, B.Y.; ZHANG, J. Evolutionary conservation of expression profiles between human and mouse orthologous genes. *Mol Biol Evol*, 23: 530–540, 2006.

LIMA, A.F. de; LESSA, F.C.; GASPAROTO MANCINI, M.N.; HEBLING, J.; SOUZA COSTA, C.A. de; MARCHI, G.M. Cytotoxic effects of different concentrations of a carbamide peroxide bleaching gel on odontoblast-like cells MDPC-23. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater,* Aug; 90(2): 907-912, 2009.

MACDOUGALL, M.; SIMMONS, D.; LUAN, X.; NYDEGGER, J.; FENG, J.; GU, T.T. Dentin phosphoprotein and dentin sialoprotein are cleavage products expressed from a single transcript coded by a gene on human chromosome 4. *J Biol Chem* 272: 835–842, 1997.

MATALOVA, E.; TUCKER, A.S.; MISEK, I. Apoptosis-related factors (Fas receptor, Fas ligand, FADD) in early tooth development of the field vole (Microtus agrestis). *Arch Oral Biol.* 50(2):165-9, 2005. Epub 2004 Dec 31.

MATTUELLA, L.G.; WESTPHALEN, L.B.; DE FIGUEIREDO, J.A.; NOR, J.E.; ARAUJO, F.B. de; FOSSATI, A.C. Vascular endothelial growth factor and its relationship with the dental pulp. *J Endod*, v. 33, p. 524-530, 2007.

MENOSSI, M.; CREMONESE, N.; MARON, L.G.; ARRUDA, P. Making colony PCR easier by adding gel-loading buffer to the amplification reaction. *Biotechniques* 28: 424-426, 2000.

MJÖR, I.A.; SVEEN, O.B.; HEYERAAS, K.J. Pulp-dentin biology in restorative dentistry. Part 1: normal structure and physiology. *Quintessence Int* 32:425, 2001.

MOREY, J.S.; RYAN, J.C.; VAN DOLAH, F.M. Microarray validation: factors influencing correlation between oligonucleotide microarrays and real-time PCR. *Biol. Proced. Online* 8(1): 175-193, 2006.

NAKAHARA, T.; IDE, Y. Tooth regeneration: implications for the use of bioengineered organs in first-wave organ replacement. *Human Cell* 20: 63-70, 2007.

NAKAMURA, S.; YAMADA, Y.; KATAGIRI, W.; SUGITO, T.; ITO, K.; UEDA, M. Stem cell proliferation pathways comparison between human exfoliated deciduous teeth and dental pulp stem cells by gene expression profile from promising dental pulp. *JOE* 35 (11): 1536-1542, 2009.

NAKASHIMA, M.; IOHARA, K.; ZHENG, L. Gene Therapy for Dentin Regeneration with Bone Morphogenetic Proteins. *Current Gene Therapy* 6: 551-560, 2006.

OLIVEIRA, P.T. de; NANCI, A. Nanotexturing of titanium-based surfaces upregulates expression of bone sialoprotein and osteopontin by cultured osteogenic cells. *Biomaterials* 25: 403-413, 2004.

OHAZAMA, A.; COURTNEY, J.M.; TUCKER, A.S.; NAITO, A.; TANAKA, S.; INOUE, J.; SHARPE, P.T. Traf6 is essential for murine tooth cusp morphogenesis. *Dev Dyn*. 229(1):131-5, 2004.

PÄÄKKÖNEN, V.; TJÄDERHANE, L. High-throughput gene and protein expression analysis in pulp biologic research: review. *JOE* 36 (2): 179-189, 2010.

PANG, J.L.; WU, B.L.; HE, W.X.; ZHANG, Y.Q.; ZHAO, H.P.; XIE, Z.H. Effect of antisense oligonucleotide against mouse dentine matrix protein 1 on mineralization ability and calcium ions metabolism in odontoblast-like cell line MDPC-23. *Int Endod J*, 39: 527-537, 2006.

PARK, S.A.; KIM, I.A.; LEE, Y.J.; SHIN, J.W.; KIM, C.R.; KIM, J.K.; YANG, Y.; SHIN, J.W. Biological responses of ligament fibroblasts and gene expression profiling on micropatterned silicone substrates subjected to mechanical stimuli. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 102 (5): 402-412, 2006.

PFAFFL, M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research.* 29 (9): 45, 2001.

RITCHIE, H.H.; LIU, J.; KASUGAL, S.; MOLLER, P. A mineralizing rat dental pulp cell subline expressing collagen type I and dentin sialoprotein-phosphophoryn transcripts. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 38: 25-29, 2002.

RODRIGUEZ, A.P.; TSUJIGIWA, H.; GUNDUZ, M.; CENGIZ, B.; NAGAI, N.; TAMAMURA, R.; BORKOSKY, S.S.; TAKAGI, T.; INOUE, M.; NAGATSUKA, H. Influence of the microenvironment on gene and protein expression of odontogeniclike and osteogenic-like cells. *Biocell* 33 (1): 39-47, 2009.

RUCHON, A.F.; MARCINCKIEWICZ, M.; SIEGFRIED, G.; TENENHOUSE, H.S.; DESGROSEILLERS, L.; CRINE, P.; BOILEAU, G. Pex mRNA is localized in developing mouse osteoblasts and odontoblasts. *J Histochem Cytochem* 46: 459– 468, 1998.

SAMBROOK, J.; FRITCH, E.F.; MANIATS, T. Molecular cloning. A laboratory manual. *Cold Spring Harbor Press*. New York, 1989.

SASAKI, T.; GARANT, P.R. Structure and organization of odontoblasts. *Anat Rec*, 245: 235-249, 1996.

SEGUNDO, A.V.L.; VASCONCELOS, B.C.E. Stem cells and tissue engineering: application's perspectives in dentistry. *Rev. Ciênc. Méd.,* Campinas, 16(1): 23-30, 2007.

SHANNON, P.; MARKIEL, A.; OZIER, O.; BALIGA, N.; WANG, J.; RAMAGE, D.; AMIN, N.; SCHWIKOWSKI, B.; IDEKER, T. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res.*, 13: 2498-2504, 2003.

SHARPE, P.T.; YOUNG, C.S. Test-tube teeth. *Sci Am* 293: 34-41, 2005.

SIMON, S.; SMITH, A.J.; LUMLEY, P.J.; BERDAL, A.; SMITH, G.; FINNEY, S.; COOPER, P.R. Molecular chacacterization of young and mature odontoblasts. *Bone* 45: 693-703, 2009.

SLOAN, A.J.; SMITH, A.J. Stem cells and the dental pulp: potential roles in dentine regeneration and repair. *Oral Diseases* 13: 151–157, 2007.

SMYTH, G.K. Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Stat Appl Genet Mol Biol.* 2004; 3:Article3. Epub 2004 Feb 12.

SOARES, A.P.; KNOP, L.A.H.; JESUS, A.A. de; ARAÚJO, T.M. de. Célulastronco em Odontologia. *R Dental Press Ortodon Ortop Facial* 12(1): 33-40, 2007.

SOUZA, L.M. de. Caracterização de células-tronco de polpa dental humana obtida de dentes decíduos e permanentes. 2008. Dissertação (mestrado) – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, 2008.

SPANG, A.; SHIBA, Y.; RANDAZZO, P.A. Arf GAPs: Gatekeepers of vesicle generation. *FEBS Letters* 584: 2646–2651, 2010.

SUN, Z.L.; FANG, D.N.; WU, X.Y.; RITCHIE, H.H.; BÈGUE-KIRN, C.; WATAHA, J.C.; HANKS, C.T.; BUTLER, W.T. Expression of dentin sialoprotein (DSP) and other molecular determinants by a new cell line from dental papillae, MDPC-23. *Connect Tissue Res* 37: 251-261, 1998.

TAKAHASHI, N.; SATO, N.; TAKAHASHI, S.; TOJO, A. Gene-expression profiles of peripheral blood mononuclear cell subpopulations in acute graft-vs-host disease following cord blood transplantation. *Experimental Hematology*, 36:1760–1770, 2008.

TAKAHASHI, T.; INAI, T.; KOCHI, S.; FUKUDA, M.; YAMAGUCHI, T.; MATSUI, K.; ECHIGO, S.; WATANABE, M. Long-term follow-up of dental implants placed in a

grafted alveolar cleft: evaluation of alveolar bone height. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 105: 297-302, 2008.

TANASE, S.; BAWDEN, J.W. The immunohistochemical localization of Signal-transduction pathway components Jak1, Jak2, Jak3, Tyk2 and STAT-1 during early enamel and dentine formation in rat molars. *Archs Oral Biol.* 41 (10): 925-940, 1996a.

TANASE, S.; BAWDEN, J.W. The immunohistochemical localization of stat-2, -3, -4 and -5 during early enamel and dentine formation in rat molars. *Arch Oral Biol.* 41(12):1149-60, 1996b.

TENENBAUM, H.C. Role of organic phosphate in mineralization of bone *in vitro*. *J Dent Res,* 60: 1586-1589, 1981.

TOLSTUNOV, L. Implant zones of the jaws: implant location and related success rate. *J Oral Implantol* 33: 211-220, 2007.

TUSHER, V.G.; TIBSHIRANI, R.; CHU, G. Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc. Natl. Acad. Sci*, 98(9): 5116-5121, 2001.

TZIAFAS, D. Basic mechanisms of cytodifferentiation and dentinogenesis during dental pulp repair. Int *J Dev Biol* 39: 281-290, 1995.

WADA, H.; KOBAYASHI, I.; YAMAZA, H.; MATSUO, K.; KIYOSHIMA, T.; AKHTAR, M.; SAKAI, T.; KOYANO, K.; SAKAI, H. In situ expression of heat shock proteins, Hsc73, Hsj2 and Hsp86 in the developing tooth germ of mouse lower first molar. *Histochem J.* 34(3-4):105-9, 2002.

WEI, X.; LING, J.; WU, L.; LIU, L.; XIAO, Y. Expression of mineralization markers in dental pulp cells. *JOE* 33(6): 703-708, 2007.

WU, C.C.; HUANG, H.C.; JUAN, H.F.; CHEN, S.T. GeneNetwork: an interactive tool for reconstruction of genetic networks using microarray data. *Bioinformatics*, 20(18): 3691-3693, 2004.

WYNN, T.A. II-13 effector functions. Annu. Rev. Immunol., 21: 425-456, 2003.

YAMADA, Y.; FUJIMOTO, A.; ITO, A.; YOSHIMI, R.; UEDA, M. Cluster analysis and gene expression profiles: a cDNA microarray system-based comparison between human dental pulp stem cells (hDPSCs) and human mesenchymal stem cells (hMSCs) for tissue engineering cell therapy. *Biomaterials* 27: 3766-3781, 2006.

YANG, Y.H.; SPEED, T.P. Design issues for cDNA microarray experiments. *Nature Rev. Genet.* 3: 579-588, 2002.

YEN, A.H.; SHARPE, P.T. Stem cells and tooth tissue engineering. *Cell Tissue Res* 331: 359–372, 2008.

YOKOSE, S.; NAKA, T. Lymphocyte enhancer-binding factor 1: an essential factor in odontoblastic differentiation of dental pulp cells enzymatically isolated from rat incisors. *J Bone Miner Metab.* 28(6):650-8, 2010. Epub 2010 Apr 28.

9. Anexos
Símbolos	Nomes
Actr1a	ARP1 actin-related protein 1 homolog A, centractin alpha (yeast)
Ada	adenosine deaminase
Aldh9a1	aldehyde dehydrogenase 9, subfamily A1
Alg9	asparagine-linked glycosylation 9 homolog
Alox5ap	arachidonate 5-lipoxygenase activating protein
Anapc4	anaphase promoting complex subunit 4
Anxa1	annexin A1
Arfgef1	ADP-ribosylation factor guanine nucleotide-exchange factor 1(brefeldin A-
Atn6an1	ATPase H+ transporting lysosomal accessory protein 1
Atp6v0e	ATPase H+ transporting lysosomal V0 subunit E
B2m	heta-2 microglobulin
Bad	BCI 2-associated agonist of cell death
Bcan31	B-cell recentor-associated protein 31
Bel6	B-cell leukemia/lymphoma 6
Bolaf1	BCI 2-associated transcription factor 1
Brd4	bromodomain containing 4
Bta1	B-cell translocation gene 1, anti-proliferative
Btg	beta-transducin repeat containing protein
Clab	complement component 1 a subcomponent beta polypentide
Cls	complement component 1, s subcomponent
Cacnb3	calcium channel, voltage-dependent, beta 3 subunit
Cant1	calcium activated nucleotidase 1
Capn2	calpain 2
Casp8	caspase 8
Ccl20	chemokine (C-C motif) ligand 20
Cd53	CD53 antigen
Cd86	CD86 antigen
Cd97	CD97 antigen
Col27a1	collagen, type XXVII, alpha 1
Col4a1	collagen, type IV, alpha 1
Соре	coatomer protein complex, subunit epsilon
Csad	cysteine sulfinic acid decarboxylase
Csnk1a1	casein kinase 1, alpha 1
Cx3cl1	chemokine (C-X3-C motif) ligand 1
Cxcl10	chemokine (C-X-C motif) ligand 10

ANEXO A - Lista dos genes murinos com seus respectivos símbolos.

Cyb5b	cytochrome b5 type B
Dgkd	diacylglycerol kinase, delta
Dusp2	dual specificity phosphatase 2
E2f2	E2F transcription factor 2
Ehmt2	euchromatic histone lysine N-methyltransferase 2
Erf	Ets2 repressor factor
Erh	enhancer of rudimentary homolog (Drosophila)
Evi2a	ecotropic viral integration site 2a
Evl	Ena-vasodilator stimulated phosphoprotein
Fas	Fas (TNF receptor superfamily member 6)
Fbxl5	F-box and leucine-rich repeat protein 5
Fbxo34	F-box protein 34
Fcgr1	Fc receptor, IgG, high affinity I
Fip1I1	FIP1 like 1
Fos	FBJ osteosarcoma oncogene
Gapdh	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
Gfi1	growth factor independent 1
Gga1	golgi associated, gamma adaptin ear containing, ARF binding protein 1
Gm4210	RIKEN cDNA A230070E04 gene
Gzma	granzyme A
H2afy	H2A histone family, member Y
Hist1h2bc	histone cluster 1, H2bc
Hnrpll	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L-like
Hspa8	heat shock protein 8
lgf2r	insulin-like growth factor 2 receptor
ll10	interleukin 10
ll13	interleukin 13
ll18	interleukin 18
ll2rb	interleukin 2 receptor, beta chain
lrf8	interferon regulatory factor 8
ltgax	integrin alpha X
Jak2	Janus kinase 2
Kpna2	karyopherin (importin) alpha 2
Lef1	lymphoid enhancer binding factor 1
Ly6e	lymphocyte antigen 6 complex, locus E
Map3k11	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 11
Mapk8ip3	mitogen-activated protein kinase 8 interacting protein 3
Mis12	MIS12 homolog (yeast)
MIIt10	myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia (trithorax homolog, Drosophila);

	translocated to, 10
Mrpl22	mitochondrial ribosomal protein L22
Msr1	macrophage scavenger receptor 1
Ncoa2	nuclear receptor coactivator 2
Nfe2l1	nuclear factor, erythroid derived 2,-like 1
Pex12	peroxisomal biogenesis factor 12
Pfkfb3	6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 3
Ppig	peptidyl-prolyl isomerase G (cyclophilin G)
Prep	prolyl endopeptidase
Prkag1	protein kinase, AMP-activated, gamma 1 non-catalytic subunit
Psmb6	proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type 6
Psmc3	proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, ATPase 3
Psph	phosphoserine phosphatase
Rab27a	RAB27A, member RAS oncogene family
Rap2a	RAS related protein 2a
Rasa3	RAS p21 protein activator 3
Rpl18a	ribosomal protein L18A
Rpl26	ribosomal protein L26
Rpl27a	ribosomal protein L27A
Rpl6	ribosomal protein L6
Rpl7a	ribosomal protein L7a
Rps11	ribosomal protein S11
Rps25	ribosomal protein S25
Sema4d	sema domain, immunoglobulin domain (Ig), transmembrane domain (TM) and
	short cytoplasmic domain, (semaphorin) 4D
Serpinb2	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade B, member 2
SIc30a9	solute carrier family 30 (zinc transporter), member 9
Slc39a7	solute carrier family 39 (zinc transporter), member 7
Socs1	suppressor of cytokine signaling 1
Stam2	signal transducing adaptor molecule (SH3 domain and ITAM motif) 2
Stip1	stress-induced phosphoprotein 1
Sypl	synaptophysin-like protein
Tcf7l1	transcription factor 7-like 1
Tfam	transcription factor A, mitochondrial
Tmem81	transmembrane protein 81
Ттро	thymopoietin
Tomm40	translocase of outer mitochondrial membrane 40 homolog
Traf6	TNF receptor-associated factor 6
Tube1	epsilon-tubulin 1

Tusc 4	nitrogen permease regulator-like 2
Vav1	vav 1 oncogene
Vps36	vacuolar protein sorting 36 (yeast)
Xpot	exportin, tRNA (nuclear export receptor for tRNAs)
Zfp354c	zinc finger protein 354C
Zhx1	zinc fingers and homeoboxes 1
Zp3r	zona pellucida 3 receptor