

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Centro de Desenvolvimento Tecnológico – CDTec
Curso de Graduação em Biotecnologia



Trabalho de Conclusão de Curso

Análise *in silico* da expressão de genes ligados a autofagia e a pluripotência em banco de dados de microarranjos de iPSCs, ESCs e células somáticas

Mariana Brutschin Pereira

Pelotas, 2014

MARIANA BRUTSCHIN PEREIRA

Análise in silico da expressão de genes ligados a autofagia e a pluripotência em banco de dados de microarranjos de iPSCs, ESCs e células somáticas

Trabalho acadêmico apresentado ao Curso de Bacharelado em Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador Acadêmico: Prof^a. Dr^a. Daiane Drawanz Hartwig

Orientador de Estágio: Prof. Dr. Guido Lenz

Pelotas, 2014

Dados de catalogação na fonte:
Ubirajara Buddin Cruz – CRB-10/901
Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

P436a Pereira, Mariana Brutschin

Análise in silico da expressão de genes ligados a autofagia e a pluripotência em banco de dados de microarranjos de iPSCs, ESCs e células somáticas / Mariana Brutschin Pereira. – 56f. : il. – Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Biotecnologia). Universidade Federal de Pelotas. Centro de Desenvolvimento Tecnológico. Pelotas, 2014. – Orientador Daiane Drawanz Hartwig ; co-orientador Guido Lenz.

1.Biotecnologia. 2.Células-tronco. 3.iPSC. 4.ESCs. 5.Reprogramação. 6.Microarranjo. I.Hartwig, Daiane Drawanz. II.Lenz, Guido. III.Título.

CDD:

616.02774

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Vinicius Farias Campos, Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dr. Luciano da Silva Pinto, Universidade Federal de Pelotas

Dr.^a Helena Thurow, Universidade Federal de Pelotas

Prof.^a Dr.^a Daiane Drawanz Hartwig, Universidade Federal de Pelotas

“Dedico este trabalho de conclusão de curso à minha mãe Rosalva e à minha irmã Priscila, pelo amor incondicional, pela dedicação, pelo apoio e por terem acreditado no meu sonho e lutado junto comigo para conquistá-lo. Amo vocês!”

Agradecimentos

À Universidade Federal de Pelotas e ao Núcleo de Biotecnologia do CDTEC, pela oportunidade de realizar um curso de graduação de qualidade, do qual me orgulho de ter feito parte;

Aos meus orientadores de estágio, Guido Lenz e Tiago Dalberto, pela confiança em mim depositada para a realização deste trabalho, pela paciência, pelo apoio e por me proporcionarem um enriquecimento científico gigantesco durante o período do meu estágio final. Sem vocês isso não seria possível;

À minha orientadora Daiane Hartwig, a quem acompanhei durante minha iniciação científica e sou muito grata pelo conhecimento que me foi proporcionado, pelo incentivo, pela confiança, pela persistência e pela cobrança. Te admiro muito pela pessoa e pela profissional que és;

Ao prof. Odir Dellagostin, por ter me dado a oportunidade de fazer parte da sua equipe, pelos conselhos, pelos ensinamentos e por ser um exemplo de profissionalismo e competência;

Ao Marcus Eslabão, por me apresentar o fantástico mundo da bioinformática e da programação, pelos litros e litros de café, pelos churrascos e pelos conhecimentos úteis e nem tão úteis assim a mim repassados;

À minha mãe e à minha irmã, Rosalva e Priscila, pelo apoio, pelo amor incondicional, pelos princípios e valores a mim transmitidos e por serem um exemplo de força, coragem e determinação. Não tenho palavras pra expressar o meu amor por vocês;

Aos meus avós, Carlos e Iná, pela preocupação, pela presença, pelos conselhos, apoio e por sempre estarem presentes na minha vida;

Ao meu afilhado, Thomás, por me ensinar coisas novas a cada dia e pela quantidade de emoções que ele me proporciona a todo momento;

Aos membros do quarteto fantástico, Carol, Fernanda Valiati e Fernanda Rodrigues, por estarem sempre ao meu lado, tanto nos seminários quanto na mesa de bar, pelos conselhos, pelas discussões acadêmicas, por compartilharem conhecimento comigo e me apoiarem sempre. Vocês foram meu incentivo, minhas amigas. Amo vocês!

Aos presentes que Pelotas me deu, Aline de Jagher e Fernanda Valiati, por terem sido mais do que amigas, e sim irmãs. Vocês me deram forças quando eu

não tinha, foram minhas companheiras de sono, de filmes e de gordices, compartilharam comigo meus melhores e piores momentos da graduação. Obrigada por sempre estarem ao meu lado, amo muito vocês!

Às duas grandes amigas que a Biotecnologia me deu, Marina e Júlia, pelos cafés, pelas cervejas, pelas risadas, pela amizade e pela parceria. Somos a prova de que pessoas com opiniões e personalidades fortes podem se dar bem;

Às companheiras de laboratório, Thaís Larré e Carolina Ximendes, por tornarem a rotina laboratorial mais divertida e por serem mais do que colegas de laboratório e sim, grandes amigas. Agradeço especialmente à Thaís, pela paciência, pelo conhecimento passado, pelo companheirismo e pelo apoio;

Aos colegas do laboratório de Bioinformática, Jéssica, Frederico e Paulo, por compartilharem conhecimento comigo, pelo convívio agradável, pela amizade, pela paciência e pelas risadas;

Aos guris, Mineiro, Schuch, Renan e Carlus. Mineiro, não tenho palavras pra agradecer todo o apoio que tu me deu durante esses quatro anos. Só tu sabe quantas vezes me levantou e me fez continuar, e eu sou eternamente grata por isso. Schuch e Renan, pela quantidade de cervejas destampadas e besteiras faladas, sem vocês esses anos não seriam os mesmos. E Carlus, pelo melhor abraço matinal e melhor companhia pro café.

Às amigas porto-alegrenses que eu gosto tanto, Mari e Bianca, por me acolherem de um jeito tão bonito, por me arrancarem risadas sem fim, pelas festas, pelos passeios no parque, pelas conversas e pelas receitas médicas, né Bia?

Às amigas porto-alegrenses do interior também, Kelly e Fernanda, por sempre me disponibilizarem uma cama, cerveja gelada, festas alternativas, conversas, conselhos e papo furado.

Às minhas amigas de sempre as quais eu amo tanto, Elizabethe, Jade e Agnes, pelo apoio incondicional, pela parceria, por estarem ao meu lado sempre apesar da distância e por tudo que passamos juntas;

Aos meus queridos amigos que me proporcionaram as mais incríveis indias, risadas e conversas inusitadas de bar, PC, Bruno e Vanessa, pela amizade, pelas risadas e pela parceria. Vocês são demais!

Às amigas que me apoiaram durante a realização deste trabalho, Carol e Natália, pelo apoio, companheirismo, pela paciência durante as minhas variações de humor e por terem me dado força pra seguir em frente;

Aos amigos que fiz em Pelotas e tornaram esses anos muito mais agradáveis, Monize, Milena, Bruno, Maurício, Spohr, Michele, Arthur, Vinicius, Bárbara, Gabriela e tantos outros pelas conversas, desabafos, risadas, bebedeiras e conselhos;

Aos colegas do laboratório de Vacinologia, pela ajuda durante a graduação, estímulo e pelo convívio agradável;

Aos colegas da graduação, que tornaram esses quatro anos muito mais divertidos, pela parceria e pela amizade;

Aos membros da banca, Vinicius, Luciano e Helena, por terem prontamente aceitado o convite, pelos ensinamentos e por serem exemplos de profissionalismo;

Aos demais amigos, colegas, funcionários e professores do Núcleo de Biotecnologia pela boa convivência, amizade e aprendizado;

Muito obrigada!

Resumo

Pereira, Mariana Brutschin. **Análise *in silico* da expressão de genes ligados a autofagia e a pluripotência em banco de dados de microarranjos de iPSCs, ESCs e células somáticas.** 2014. 56f. Trabalho de Conclusão de Curso — Curso de Bacharelado em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas.

Células-tronco pluripotentes induzidas (iPSC) estão sendo cada vez mais exploradas como ferramentas terapêuticas na medicina regenerativa e *screening* de drogas. A eficiência da técnica de reprogramação para geração de iPSC e do processo de diferenciação celular parecem estar relacionadas com as mudanças no metabolismo energético dessas células. A autofagia, por sua vez, parece ser essencial para o sucesso da técnica. A identificação de vias metabólicas específicas e fatores que regulam o destino das células-tronco buscam facilitar a eficiência de reprogramação e controlar a diferenciação e o destino das iPSCs. Neste estudo, foi realizada a análise *in silico* da correlação entre grupos de genes de pluripotência e de autofagia em 12 bancos de dados de microarranjo incluindo ESCs (célula-tronco embrionária), iPSCs e células somáticas. As amostras dos bancos de dados foram agrupadas em *clusters* onde foram realizadas a análise de correlação dos grupos de genes de pluripotência e autofagia nos diferentes tipos celulares. Nossos achados sugerem que genes de pluripotência, como Sox2, c-Myc e Lin28 estão correlacionados com genes importantes na indução da autofagia em ESCs e iPSCs, sugerindo a interação entre essas duas vias e buscando aprimorar o entendimento da relação entre elas e suas respectivas vias de sinalização

Palavras-chave: células-tronco; iPSC; ESC; microarrajo; reprogramação.

Abstract

Pereira, Mariana Brutschin. **In silico analysis of gene expression profiling in genes linked to autophagy and pluripotency in microarray databases of iPSC, ESCs and somatic cells**. 2014. 56f. Trabalho de Conclusão de Curso — Curso de Bacharelado em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas.

Induced pluripotent stem cells (iPSC) have been widely explored as therapeutic tools in regenerative medicine and drug screening. The efficiency of the cellular reprogramming technique for the iPSC generation and of the cell differentiation process seem to be related to changes in energetic metabolism of these cells. Autophagy, in turn, appears to be essential to the success of the technique. The identification of specific metabolic pathways and factors that regulate the destination of stem cells is important to the efficiency of reprogramming and to control the differentiation and destination of iPSCs. In this study, the in silico analysis of the correlation between groups of pluripotency genes and autophagy genes was performed using 12 microarray databases including ESCs, iPSCs and somatic cells. Samples from each database were grouped into clusters and the analysis of the correlation between groups of pluripotency genes and autophagy genes was realized for the different cell types. Our findings indicate that pluripotency genes, such as Sox2, c-Myc and Lin28, are correlated with important genes involved in the autophagy induction in ESCs and iPSCs, suggesting the interaction between these two pathways and contributing to the better understanding of the relationship between them and their respective signaling pathways.

Key-words: stem cells; iPSC; ESC; microarray; reprogramming.

Lista de figuras

- Figura 1.** Representação esquemática da obtenção de iPSC e posterior diferenciação, destacando as mudanças no metabolismo da célula durante essas etapas.24
- Figura 2.** Rota molecular que regula a autofagia mitocondrial, a respiração celular, os níveis de ROS e sobrevivência das células em MEFs submetidos à hipóxia prolongada.25
- Figura 3.** Exemplificação do *script* utilizado para extração dos dados .CEL de microarranjos utilizando o GSE48830.31
- Figura 4.** Exemplificação dos dendogramas gerados a partir dos diferentes grupos de genes selecionados utilizando o GSE26455. A) Pluripotência B) Autofagia C) Ciclo Celular D) Estruturais E) *Housekeeping* F) Aleatórios G) Cluster dos genes de autofagia e de pluripotência.35
- Figura 5.** Vias de sinalização da autofagia. Em vermelho, destacam-se os genes que foram correlacionados com os genes de pluripotência neste estudo e seu papel em cada etapa da indução da autofagia.44

Lista de Tabelas

Tabela 1. Pacotes utilizados nas análises utilizando o software RStudio.	31
Tabela 2. Relação entre os genes, grupos e sondas utilizadas no trabalho.	32
Tabela 3. Relação entre os bancos de dados, tipo de amostras utilizadas e número de amostras de cada banco.	37
Tabela 4. Dados brutos da correlação dos genes de Autofagia com genes de Pluripotência entre as amostras de ESCs, exemplificando o resultado da correlação.	39
Tabela 5. Resumo dos resultados obtidos em análises de correlação entre os genes de pluripotência e autofagia dos diferentes grupos de células.	41

Lista de Abreviaturas e Siglas

- Akt - *V-akt murine thymoma viral oncogene* (oncogene viral de timoma murino)
- ATG - *Autophagy related gene* (gene relacionado a autofagia)
- ATM - *Ataxia telangiectasia mutated* (Ataxia telangiectasia mutado)
- Bcl2 - *B-cell CLL/lymphoma 2* (linfoma de células B 2)
- c-Myc - *Myelocytomatosis oncogene* (oncogene da mielocitomatose)
- COX4 - *Cytochrome C oxidase subunit IV* (citocromo C oxidase subunidade 4)
- DNA - *Deoxyribonucleic acid* (ácido desoxirribonucleico)
- DPPA2 - *Developmental pluripotency associated 2* (associado ao desenvolvimento de pluripotência 2)
- DPPA4 - *Developmental pluripotency associated 4* (associado ao desenvolvimento de pluripotência 4)
- ESC – *Embryonic stem cell* (célula-tronco embrionária)
- ESG1 - *Embryonal stem cell gene 1* (gene de célula tronco embrional tipo 1)
- FGF4 - *Fibroblast growth factor 4* (fator de crescimento de fibroblasto 4)
- GCRMA - *Robust Multi-Array based in GC* (multi arranjo robusto baseado em CG)
- GDF3 - *Growth differentiation factor 3* (fator de diferenciação de crescimento 3)
- GEO - *Gene Expression Omnibus*
- HIF-1 - *Hypoxia inducible factor 1* (fator de indução de hipóxia 1)
- hTERT – *Human telomerase reverse transcriptase* (transcriptase reversa de
- iPSC – *Induced pluripotent stem cell* (célula -tronco pluripotente induzida)
- JNK1 - *c-Jun N-terminal kinase 1* (Quinase N-terminal c-Jun 1)
- Klf4 – *Kruppel-like factor 4* (fator similar a kruppel 4)

LC3 - *Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3* (Proteína associada aos microtubules 1A/1B de cadeia leve)

Limma - *Linear Models for Microarray Data* (Modelo linear para dados de microarranjo)

Lin28 – *Protein lin28* (proteína de ligação à RNA lin28)

MAPK - *Mitogen-activated protein kinase* (proteína quinase ativada por mitógeno)

Mbd3 - *Methyl-CpG binding domain protein 3* (proteína 3 de ligação a CpG-metil)

MIAME – *Minimum Information About Microarray Expression* (Informação mínima sobre expressão de microarranjo)

mTOR - *mechanistic target of rapamycin (serine/threonine kinase)* (alvo mecânico da rapamicina (serina/treonina quinase))

Nanog – *Gene regulador Nanog* (Regulador gênico Nanog)

NuRD - *Nucleosome Remodeling Deacetylase* (Desacetilase de remodelamento do nucleossomo)

Oct4 – *octamer-binding protein 4* (proteína de ligação octâmera 4)

p53 - *Tumor protein p53* (Proteína tumoral p53)

PDK1 - *Pyruvate dehydrogenase kinase, isozyme 1* (Quinase piruvato desidrogenase, isômero 1)

PI3K - *Phosphoinositide 3-kinase* (Quinase 3 fosfoinosítídeo)

RB1CC1 - *RB1-inducible coiled-coil 1* (RB1 induzível em espiral espiralada 1)

Rex1 - *RNA exonuclease 1 homolog* (Exonuclease de RNA homóloga 1)

RNA - *ribonucleic acid* (ácido ribonucleico)

ROS – *Reactive oxygen species* (espécies reativas de oxigênio)

SOX2 - *Sex determining region Y-box 2* (região determinante de sexo em Y)

TCF3 - *transcription factor 3* (fator de transcrição telomerase humana 3)

ULK1 - *unc-51 like autophagy activating kinase 1* (Quinase de ativação de autofagia similar a unc-51)

Sumário

1. Introdução Geral	17
2. Revisão de literatura	18
2.1 Células-tronco.....	18
2.2 Células-tronco embrionárias	19
2.3 Células-tronco adultas	21
2.4 Células-tronco pluripotentes induzidas	21
2.5 Ferramentas para análise de expressão gênica	27
3. Objetivos.....	29
3.1 Objetivo geral.....	29
3.2 Objetivos específicos	29
4. Materiais e métodos.....	30
4.1 Obtenção dos dados.....	30
4.2 Software.....	30
4.3 Instalação de pacotes	30
4.4 Leitura e processamento dos dados	31
4.5 Seleção das sondas	31
4.6 Clusterização das amostras.....	34
4.7 Correlação de Pearson	35
5. Resultados.....	37
5.1 Obtenção dos dados.....	37
5.2 Clusterização das amostras.....	38
5.3 Correlação dos dados.....	38

6. Discussão	41
7. Conclusões e Perspectivas.....	46
8. Referências.....	47

1. Introdução Geral

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Sinalização e Plasticidade Celular localizado no departamento de Biofísica do Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e afiliado ao Centro de Biotecnologia da mesma instituição. As principais linhas de pesquisa do laboratório envolvem estudo das vias de sinalização celular com especial foco em câncer e reprogramação celular. Nesse sentido, este trabalho de conclusão de curso propõe a análise *in silico* da expressão gênica diferencial de genes de autofagia e de pluripotência em células reprogramadas (iPSC), células-tronco embrionárias (ESC) e células somáticas. Células-tronco pluripotentes induzidas (iPSC) estão sendo cada vez mais exploradas como ferramentas terapêuticas na medicina regenerativa e para *screening* de drogas. No entanto, existem algumas limitações para a geração dessas células, como a eficiência da técnica de reprogramação e do processo de diferenciação celular. Estes processos parecem estar relacionados com as mudanças no metabolismo energético dessas células de um estado oxidativo para glicólise anaeróbia, quando as células estão indiferenciadas. A autofagia, por sua vez, parece ser essencial para o sucesso da técnica. A identificação de vias metabólicas específicas e fatores que regulam o destino das células-tronco buscam facilitar a eficiência de reprogramação e controlar a diferenciação e o destino das iPSCs.

2. Revisão de literatura

2.1 Células-tronco

Células-tronco são células que possuem a capacidade ilimitada ou prolongada de auto-renovação e o potencial de gerar células especializadas através da diferenciação. O destino dessas células é altamente regulado por fatores intrínsecos e pelo microambiente externo (WATT & HOGAN, 2000). Em geral, essas células partilham as seguintes características: (1) elevada capacidade de auto-renovação, (2) potencial de diferenciação em no mínimo um tipo celular especializado, (3) capacidade de serem cultivadas *ex-vivo* e utilizadas na engenharia tecidual, e (4) a capacidade de originar células especializadas (VATS et al., 2005).

Com base no seu potencial de diferenciação, as células-tronco podem ser classificadas em quatro categorias: (1) totipotentes, (2) pluripotentes, (3) multipotentes, e (4) oligopotentes ou monopotentes. As células-tronco totipotentes têm potencial para se diferenciarem em células das três principais camadas germinativas (ectoderme, endoderme e mesoderme) e tecidos dos anexos embrionários. Células-tronco pluripotentes têm a capacidade de se diferenciarem somente em tecidos derivados de ectoderme, endoderme e mesoderme. Já células-tronco multipotentes podem se diferenciarem em células progenitoras de tecidos específicos dentro de um determinado órgão. Enquanto isso, células-tronco oligopotentes ou monopotentes só tem a capacidade de originarem alguns tipos específicos de células especializadas ou um tipo celular específico, respectivamente (LEEPER et al., 2010).

Quanto à sua origem e suas propriedades biológicas, as células-tronco podem também ser classificadas como (1) células-tronco embrionárias ou (2) células-tronco adultas (LEEPER et al., 2010). As células-tronco embrionárias (ESC) são células-tronco isoladas da massa interna do blastocisto ou das gônadas primordiais

de fetos (THOMSON, 1998). Já as células-tronco do adulto ou pós-natal podem ser isoladas de diferentes tecidos de um indivíduo após o nascimento (DA SILVA MEIRELLES et al., 2006).

2.2 Células-tronco embrionárias

Células-tronco embrionárias (ESC) são células pluripotentes isoladas da massa celular interna do blastocisto em desenvolvimento ou de células germinativas primordiais (REUBINOFF et al., 2000; THOMSON, 1998; WATT & HOGAN, 2000). Essas células têm como função biológica originar todos os tecidos e órgãos de um indivíduo. O primeiro isolamento de ESC foi realizado em 1981 por dois grupos diferentes, utilizando camundongo como modelo (EVANS & KAUFMAN, 1981; MARTIN, 1981). Anos mais tarde, em 1998, foi estabelecida a primeira linhagem de ESC humana (THOMSON, 1998).

As ESC apresentam expressão de marcadores de superfície e fatores de transcrição que possibilitam a manutenção do estado indiferenciado das células. Além disso, altas taxas de proliferação, pluripotência e cariótipo euplóide são importantes características dessas células. Estudos recentes demonstraram que ESC mantêm suas características em longos períodos de cultura *in vitro*, sendo células estáveis quanto à expressão de marcadores de pluripotência, expressão de telomerase, habilidade de diferenciação e a manutenção do cariótipo normal (HOFFMAN & CARPENTER, 2005).

Um conjunto básico de fatores de transcrição que consistem em Oct4, Nanog, Sox2 e Tcf3 mantêm o estado pluripotente das ESCs (BOYER et al., 2005; LOH et al., 2006; MARSON et al., 2008). Oct4 é expresso durante o desenvolvimento precoce de mamíferos e é essencial para a formação da massa celular interna pluripotente e para a manutenção do estado pluripotente das ESC (NICHOLS et al., 1998). Nanog é outro regulador de pluripotência importante que é ativado na fase de 8 células do desenvolvimento embrionário. No entanto, Nanog também é expresso mais tarde em um subconjunto de células da massa celular interna e coopera com outros fatores na reativação do cromossomo X. Oct4, Sox2 e Nanog induzem e realizam a regulação cruzada da sua própria expressão. Esses fatores também co-ativam os genes-alvo redundantes e cooperam com fatores de

transcrição secundários, oferecendo mais estabilidade para o estado ESC (CHEN et al., 2008).

Além desses, essas células expressam outros marcadores importantes, como fator de Kruppel tipo 4 (Klf4), c-Myc, fator de crescimento e de diferenciação 3 (GDF3), fator expressão reduzido 1 (Rex1), fator de crescimento de fibroblastos 4 (FGF4), gene específico de células embrionárias 1 (ESG1), fator de desenvolvimento associado a pluripotência 2 (DPPA2) e DPPA 4, bem como transcriptase reversa de telomerase humana (hTERT).

As primeiras características que fazem ESC células de interesse na medicina regenerativa é a capacidade a longo prazo de auto-renovação e sua pluripotência (PATEL & YANG, 2010). Esta última característica pode ser avaliada através da diferenciação *in vitro* pela presença do corpo embrióide (JOHNSON et al., 2013) ou pela formação de teratoma *in vivo* (MENENDEZ et al., 2005).

No entanto, o uso terapêutico destas células é dificultado por três principais fatores: (1) o isolamento destas células requer obrigatoriamente a destruição do embrião, gerando uma série de discussões sobre ética (TAKAHASHI et al., 2007); (2) pouco se sabe a respeito da manutenção *in vitro* destas células; (3) ESC originam teratomas quando aplicadas em camundongos imunodeficientes, colocando em risco a segurança do paciente no uso terapêutico dessas células (HOFFMAN & CARPENTER, 2005).

Uma preocupação adicional associada às terapias celulares baseadas em células-tronco embrionárias humanas está no fato de que as células transplantadas serem de origem alogênica e poderem, portanto, ser reconhecidas como não próprias pelo sistema imune do hospedeiro, induzindo a rejeição do enxerto e consequências indesejáveis (MENENDEZ et al., 2005).

Assim, é necessário um entendimento sobre a biologia básica da ESCs para que haja uma compreensão quase total dos mecanismos moleculares e celulares que regulam o comportamento dessas células, incluindo a auto-renovação, proliferação, apoptose e diferenciação para linhagens específicas (MENENDEZ et al., 2005).

2.3 Células-tronco adultas

Células-tronco adultas são células indiferenciadas presentes em tecidos diferenciados ou em órgãos e possuem a capacidade de se especializarem em células do tecido ou órgão do qual se originaram. A sua capacidade de auto-renovação permite a manutenção da estabilidade funcional desses órgãos e tecidos (VATS et al., 2005; WATT & HOGAN, 2000).

Essas células podem ser encontradas em diversos tecidos de mamíferos adultos. Em alguns tecidos, tais como o coração, o tecido adiposo, medula óssea, sangue, fígado e epiderme contribuem para o reabastecimento das células perdidas através de processos de senescência ou injúria celular. Também podem estar presentes em outros órgãos adultos, tais como o cérebro e o pâncreas, que normalmente sofrem regeneração celular muito limitada (WATT & HOGAN, 2000).

Em comparação com células-tronco embrionárias, as células-tronco adultas não enfrentam grandes controvérsias éticas ou imunológicas quanto ao seu uso no mesmo indivíduo de onde foram obtidas (DENKER, 2006). No entanto, sua capacidade de proliferação e diferenciação é inferior em relação às células-tronco embrionárias e essas são muitas vezes difíceis de identificar, isolar e purificar, além de não serem obtidas em quantidade suficiente para uso em transplantes, necessitando serem substancialmente expandidas *in vitro*. As principais limitações incluem também a utilização de órgãos essenciais como fonte para a sua coleta, sendo necessário o uso de procedimentos de coleta de células que são caros e freqüentemente associados com o risco de morbidez de tecido para o doador. Portanto, o interesse de pesquisa tem aumentado para o uso de fontes alternativas de células-tronco (Revisado por MADONNA et al., 2013).

2.4 Células-tronco pluripotentes induzidas

As células-tronco pluripotentes induzidas (iPSC) são geradas a partir de células não pluripotentes, tipicamente uma célula somática adulta, pela indução da expressão forçada de genes específicos. Esse processo foi chamado de reprogramação celular e primeiramente descrito por Yamanaka et al. (2006) que reprogramaram fibroblastos murinos em iPSC a partir da transdução retroviral de 24

fatores de transcrição. Esse mesmo estudo descreveu que destes 24 fatores, apenas 4 eram suficientes para reprogramar fibroblastos em células-tronco pluripotentes induzidas, sendo eles Oct4, Sox2, c-Myc e Klf4, conhecidos a partir de então como fatores de Yamanaka. Mais tarde, Takahashi et al., (2007) reproduziram o mesmo experimento, dessa vez gerando iPSC a partir de fibroblastos humanos utilizando os mesmos 4 fatores de Yamanaka.

Em outro estudo, Yu et al. (2007) conseguiram obter iPSC a partir de diferentes fibroblastos humanos utilizando como fatores de reprogramação OCT4, SOX2, NANOG e LIN28.

A partir daí, muitos artigos subsequentes surgiram e confirmaram que a indução da expressão de fatores reguladores específicos pode reprogramar diferentes células somáticas adultas em iPSC. Além disso, diferentes vetores já foram testados quanto a super-expressão dos fatores de Yamanaka (Revisado por BILIC & BELMONTE, 2012).

Apesar desses avanços, normalmente se observa uma eficiência extremamente baixa na reprogramação de células somáticas (HANNA et al., 2009). Na maioria dos casos o número de colônias de iPSC geradas é pequeno, não passando de 0,1%, como relatado nas primeiras publicações (TAKAHASHI & YAMANAKA, 2006). Em diferentes abordagens, a eficiência de reprogramação chegou próxima a 1% (BRAMBRINK et al., 2008; PAPAPETROU et al., 2009; YAN et al., 2010). O processo de super-expressão dos fatores de Yamanaka na célula é considerado estocástico (HANNA et al., 2009). Em contrapartida, Rais et al. (2013), relataram que através da repressão de fatores específicos, como o complexo Mbd3/NuRD, é possível tornar a reprogramação um processo determinístico, atingindo uma eficiência próxima a 100%.

Outro mecanismo que utiliza células já diferenciadas para gerar diferentes tipos celulares é a transdiferenciação. Neste processo, uma célula diferenciada gera outro tipo celular também diferenciado sem a formação de intermediários pluripotentes (Revisado por JOPLING et al., 2011). Este fenômeno já foi observado *in vivo* na regeneração das células de lente realizada pelas células epiteliais pigmentadas da Iris (Revisado por JOPLING et al., 2011); e *in vitro* na transdiferenciação de células pancreáticas acinares em hepatócitos e fibroblastos que originaram neurônios (SON et al., 2011; SWENSON, 2012).

Em geral, células iPSC possuem características semelhantes a células-tronco embrionárias, como a sua morfologia, proliferação, expressão gênica, capacidade de formar corpos embrióides em cultura, capacidade de diferenciação em células especializadas originárias dos três folhetos embrionários e de originar teratoma. Além disso, quando transplantadas para blastocisto, essas células são capazes de formar quimeras e camundongos viáveis. (MAHERALI et al., 2007; OKITA et al., 2007; WERNIG et al., 2007). Estas características tornam as iPSC extremamente atrativas e seu potencial terapêutico vêm sendo estudado na medicina regenerativa. Além disso, estas células não precisam ser isoladas de blastocistos, evitando os problemas éticos relacionados a destruição de embriões (PHANTHONG et al., 2013).

A técnica da reprogramação celular para geração de iPSC é considerada uma metodologia consolidada. No entanto, ainda existem diversos desafios técnicos importantes para a implementação das iPSC na medicina regenerativa e terapêutica, como: o risco de integração de DNA estranho no genoma das células, a presença de células com potencial tumorigênico e rearranjos genéticos indesejados no genoma de células em cultura, além da compreensão total dos mecanismos de reprogramação (Revisado por GONZALEZ et al., 2011).

As alterações no metabolismo energético das células parecem estar bastante relacionadas com o processo de reprogramação. A glicólise e os níveis de oxigênio podem representar elementos regulatórios importantes que intervêm no destino dessas células (FOLMES et al., 2011; PANOPOULOS et al., 2012; VARUM et al., 2011). No estado indiferenciado, células-tronco se caracterizam pela capacidade oxidativa limitada e a ativação de um metabolismo energético anaeróbio (PRIGIONE & ADJAYE, 2010) (Figura 1).

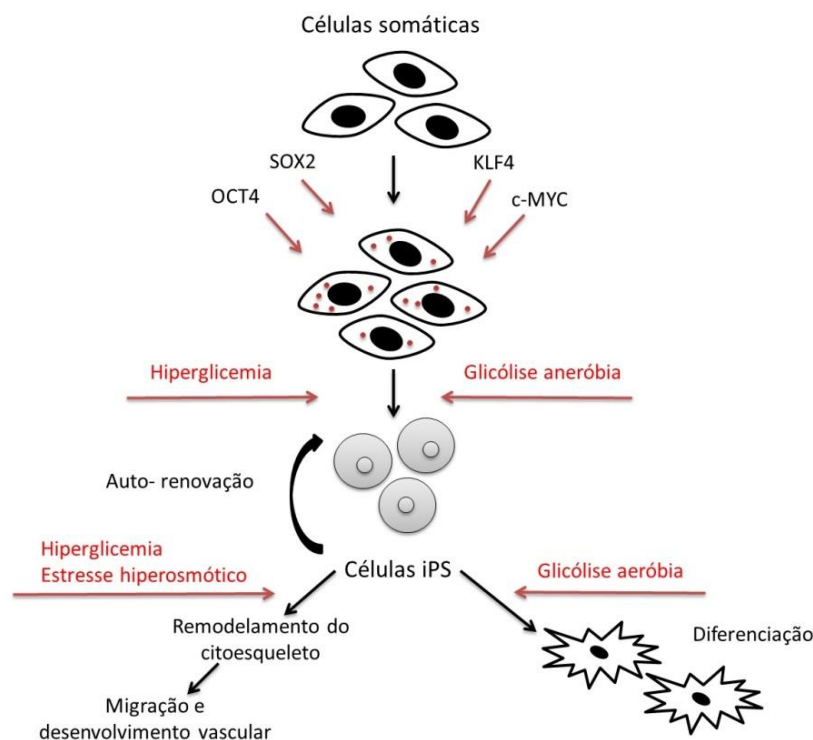


Figura 1. Representação esquemática da obtenção de iPSC e posterior diferenciação, destacando as mudanças no metabolismo da célula durante essas etapas (Adaptado de MADONNA et al, 2013).

O fator 1 de indução de hipóxia (HIF1), principalmente a sua subunidade alfa (HIF1- α), tem sido implicado na regulação do fenótipo de células-tronco, incluindo o metabolismo da glicose. Quando os níveis de oxigênio na célula são baixos, HIF1- α é responsável por estabilizar muitos genes reguladores da glicólise, auxiliando na absorção e na fosforilação da glicose e regulação das fases finais da glicólise. A sinalização HIF também se correlaciona com a manutenção do estado indiferenciado da célula e a manutenção da pluripotência (GORDAN et al., 2007). Através da indução de HIF- α , a hipóxia parece regular positivamente fatores de transcrição de pluripotência, como OCT4 (COVELLO et al., 2006).

Foram identificados três mecanismos moleculares dependentes de HIF-1 pelos quais as células adaptam seu metabolismo de energia para condições de hipóxia: (1) comutação da subunidade COX4 (FUKUDA et al., 2007), a inibição da síntese de acetil-CoA pela ativação de PDK1 (KIM et al., 2006) e inibição da biogênese mitocondrial pela repressão da atividade de c-Myc (ZHANG et al., 2008). Em cada um destes estudos, a incapacidade de regular adequadamente o metabolismo mitocondrial em resposta à hipóxia foi associada com níveis de ROS aumentados e aumento da morte celular. A autofagia mitocondrial parece ser o

quarto mecanismo mediado HIF-1 e parece ser uma adaptação necessária para evitar o aumento dos níveis de ROS e morte celular em culturas hipóxicas (ZHANG et al., 2008) (Figura 2).

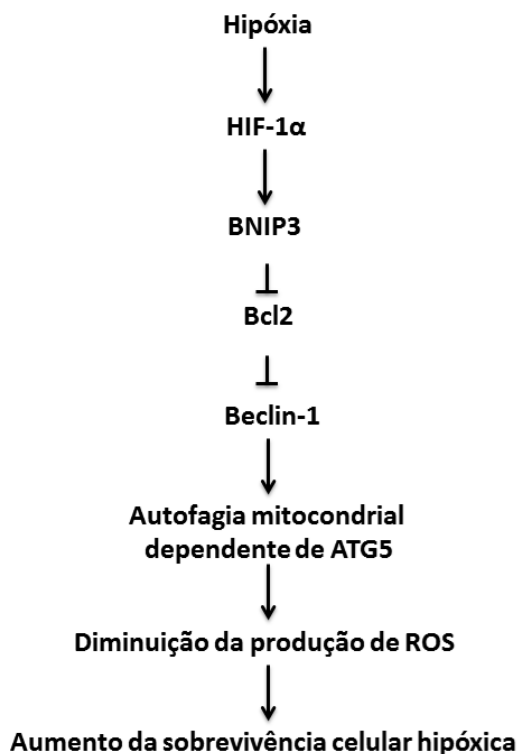


Figura 2. Rota molecular que regula a autofagia mitocondrial, a respiração celular, os níveis de ROS e sobrevivência das células em MEFs submetidos à hipóxia prolongada (Adaptado de ZHANG et al. 2008).

Deste modo, a cultura hipóxica e inibição mitocondrial têm sido associadas com a redução da diferenciação de ESC e, mais recentemente, com a melhoria da geração de iPSC (EZASHI et al., 2005; VARUM et al., 2009; YOSHIDA et al., 2009). Por estas razões, a estrutura e a função mitocondrial têm sido sugeridos como os indicadores de capacidade de células-tronco (CHEN et al., 2010; LONERGAN et al., 2007; PARKER et al., 2009; SIGGINS et al., 2008).

Além das alterações de metabolismo energético, análises genômicas e proteômicas identificaram alterações no perfil de expressão de proteínas de forma altamente coordenada nos períodos iniciais da reprogramação (BUGANIM et al., 2012; GOLIPOUR et al., 2012; POLO et al., 2012), sugerindo uma relação entre as modificações epigenéticas da célula e a síntese e degradação de proteínas.

A autofagia é um mecanismo celular essencial que degrada proteínas e organelas a fim de reciclar seus componentes citoplasmáticos para a sobrevivência

da célula e a manutenção da homeostase dos tecidos (HE & KLIONSKY, 2009; KUNDU & THOMPSON, 2008). Esse processo parece ser essencial para a reprogramação celular, pois participa de processos importantes auxiliando na manutenção celular durante condições de hipóxia.

A sinalização para autofagia envolve várias vias, que incluem as ativadas por energia ou níveis de aminoácidos, (MAPK / mTOR), fatores de crescimento (PI3K/Akt) e danos no DNA (ATM/p53) (CORCELLE ET AL., 2007; KIM et al., 2011; SHANWARE et al., 2013). Estas vias colidem em diferentes pontos na rota central do processo de autofagia, composta principalmente por membros ATG (MIZUSHIMA et al., 2011). Como na maioria dos processos celulares complexos, essas rotas regulam além da autofagia, a maioria dos processos celulares importantes, tais como ciclo celular, apoptose, metabolismo e diferenciação. Portanto, os fatores que regulam essas vias e qual a ligação direta da autofagia à reprogramação e diferenciação celular ainda não foram completamente elucidados (VESSONI et al., 2013).

O fator de transcrição SOX2 parece ter papel essencial no controle da autofagia durante a reprogramação celular. Dados indicam que o alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR) é regulado negativamente por Sox2 numa fase inicial de geração iPSC a partir de células somáticas e que esta regulação negativa transitória de mTOR é necessária para que a reprogramação ocorra com sucesso. Na ausência de SOX2, mTOR permanece em níveis elevados e inibe a autofagia. A autofagia também parece ser reforçada na fase de quatro a oito células do desenvolvimento embrionário numa via semelhante envolvendo inibição de mTOR por SOX2 (WANG et al., 2013).

Além do SOX2, outro fator de transcrição importante, c-MYC, parece estar envolvido no processo de autofagia. O c-MYC desempenha um papel importante em vários aspectos fundamentais da biologia da célula, tais como a proliferação celular, diferenciação e sensibilidade a apoptose (MEYER & PENN, 2008). Toh et al. (2013), mostraram que a depleção de c-MYC inibe a formação autofagossomo e prejudica a liberação de substratos de autofagia. A supressão de c-MYC parece ter um efeito inibitório sobre a autofagia via redução de JNK1 e fosforilação de Bcl2. Além disso, a diminuição da fosforilação JNK1 observadas na diminuição da expressão de c-MYC parece estar associada com uma redução na produção de ROS.

2.5 Ferramentas para análise de expressão gênica

A tecnologia de microarranjo de DNA tem se mostrado uma ferramenta poderosa e muito difundida para estudos de expressão gênica, com aplicação em vários organismos. Esse tipo de análise fornece um perfil transcricional global de milhares de genes em resposta a diferentes condições fisiológicas ou patológicas (KURELLA et al., 2001).

Os microarranjos são utilizados na detecção e quantificação de mRNA na forma de cDNA, provenientes de amostras biológicas, as quais são postas para hibridizar através de complementariedade de bases com o DNA fixado no arranjo. A detecção é possível através da marcação das amostras com fluorocromos cianina 3 (Cy3) ou cianina 5 (Cy5), no caso de microarranjo em lâminas de vidro, ou com o isótopo ³³P, quando os arranjos são preparados em membranas de nylon. As sequências de cDNA fixadas no microarranjo são chamadas alvo e os cDNAs marcados extraídos das células são chamados de sonda (JORDAN, 1998).

Através do conhecimento do perfil de expressão gênica, é possível responder importantes questões, como: quais genes são expressos em determinadas condições e quais as intensidades da sua expressão. Assim, é possível avaliar quais genes estão sendo co-expressos em condições específicas, em comparação com outras condições (KURELLA et al., 2001).

O banco de dados GEO (*Gene Expression Omnibus*) é um repositório de dados de MIAME (*Minimum Information About a Microarray Experiment*). Nessa plataforma é possível obter dados de expressão gênica experimentais e curados. Os *GEO Data Sets* possuem dados avançados do GEO, como dados de expressão gênica curados, bem como registros de série e plataformas originais de dados de microarranjos. Esse banco de dados permite a pesquisa por organismo, palavras-chave, autores e número de série. Além disso, os *GEO Data Sets* fornecem ferramentas para visualização de *heatmaps* e clusterização de dados (GENE EXPRESSION OMNIBUS, 2013).

Análises de microarranjos de todo o genoma dependem do uso de computação e de métodos de mineração de dados estatísticos para identificar padrões de expressão gênica significativos. Nos últimos anos, várias ferramentas surgiram para análise desses dados. Uma das plataformas mais populares é o *Bioconductor*, um projeto de software de desenvolvimento aberto para a análise e

compreensão de dados genômicos, baseado na linguagem de programação R (ZHANG et al., 2009).

O Software R é uma linguagem de programação livre para computação estatística e gráficos. A linguagem R é amplamente utilizada entre os estatísticos e os mineradores de dados para o desenvolvimento de *softwares* estatísticos e análise de dados (FOX & ANDERSEN, 2005). Essa linguagem fornece uma ampla variedade de técnicas estatísticas e gráficos, incluindo modelagem linear e não linear, testes estatísticos clássicos, análise de séries temporais, classificação, clusterização de dados, entre outros. Uma das principais vantagens do R são suas contribuições ativas em termos de pacotes para funções específicos ou áreas de estudo específicas (THE R PROJECT FOR STATISTICAL COMPUTING, 2013)

O Modelo linear para dados de microarranjo (Limma) é um pacote do R disponível no *Bioconductor* para análise da expressão diferencial dos dados resultantes dos experimentos de microarranjos. Este pacote foi projetado para analisar experiências complexas que envolvem comparações entre vários alvos de RNA simultaneamente, mantendo-se razoavelmente fácil de usá-los para experimentos simples (SMYTH, 2005). O pacote *affy* é um pacote de funções e classes para a análise de arranjos de nucleotídeos gerados pela plataforma *affymetrix*. Ele possibilita ao usuário grande flexibilidade para analisar, acessar e manipular dados de intensidades de sondas. Para o processamento dos dados, é necessário realizar a normalização e a correção de *background* dos dados obtidos. O pacote GCRMA ajusta as intensidades do *background* em microarranjos *Affymetrix* através do ruído óptico e das ligações não específicas (WU & IRIZARRY, 2005).

3. Objetivos

3.1 Objetivo geral

Analisar *in silico* da expressão de genes ligados a autofagia e pluripotência em amostras coletadas de banco de dados de microarranjos de amostras de iPSC, ESC e células somáticas.

3.2 Objetivos específicos

3.2.1. Analisar a expressão diferencial de genes de pluripotência e autofagia, bem como outros grupos de genes, em células somáticas, iPSC e ESCs.

3.2.2 Agrupar em *cluster* as amostras de acordo com a expressão dos genes de cada conjunto selecionado.

3.2.3 Agrupar em *cluster* os grupos de genes de autofagia e pluripotência em cada banco de dados.

3.2.4 Analisar a correlação entre os genes de autofagia e de pluripotência.

4. Materiais e métodos

4.1 Obtenção dos dados

Foram utilizados bancos de dados de perfis de expressão gênica envolvendo iPSC, ESC e células somáticas com a utilização da plataforma *Affymetrix HG-U133 Plus 2.0*. Esses dados foram obtidos a partir do NCBI *Gene Expression Omnibus*. Os arquivos foram obtidos em um formato *.RAW*, e os arquivos *.CEL* individuais foram extraídos a partir desse arquivo e descompactados utilizando o programa *WinZip* na plataforma *Windows*.

4.2 Software

A linguagem R foi utilizada a partir do *software RStudio* que pode ser obtido no <http://www.rstudio.com/ide/download/> e instalado nos três principais sistemas operacionais (*Windows*, *Mac* e *Linux*). O manual de instalação geral e tutoriais introdutórios podem ser obtidas a partir do mesmo sítio eletrônico.

4.3 Instalação de pacotes

Os pacotes utilizados para a análise foram o *Limma*, *Gcrma* e *Affy*. A Tabela 1 sumariza os pacotes utilizados junto com uma breve descrição da sua utilização. Estes pacotes foram instalados através do *RStudio* a partir de linhas de comando conforme o protocolo de instalação e os *scripts* apropriados.

Tabela 1. Pacotes utilizados nas análises utilizando o software RStudio.

Pacote	Descrição
Limma	Modelo linear para análise de <i>microarray</i>
Affy	Funções básicas para a análise de baixo nível de microarranjos de <i>Affymetrix Gene Chip</i>
GCRMA	Pacote para normalização e sumarização de dados em nível de sondas

4.4 Leitura e processamento dos dados

Os dados em formato .CEL foram lidos e analisados com *scripts* específicos conforme Figura 3. Para a normalização e sumarização de dados foi utilizado o pacote GCRMA e para a criação da matriz de expressão foi utilizado o pacote Affy.

```

Carregar workspace:
>setwd("~/Mariana/R/DadosHumanos/GSE48830")
Carregar bibliotecas:
>library(limma)
>library(gcrma)
>library(affy)
Ler os dados:
> GSE48830 <- ReadAffy()
Processando dados: (normalização e correção de background)
>GSEeset <- gcrma(GSE48830)
>exprsMat <- exprs(GSEeset)
Salvando dados em txt:
>write.table(exprsMat, file="GSE48830.txt", quote = FALSE, sep
= "\t", col.names = NA)

```

Figura 3. Exemplificação do script utilizado para extração dos dados .CEL de microarranjos utilizando o GSE48830.

4.5 Seleção das sondas

As sondas representando os genes de interesse foram identificadas e selecionadas com o auxílio do banco de dados do *GeneAnnot* e posteriormente categorizadas em 6 grupos; sendo 5 de acordo com sua função: pluripotência, autofagia, ciclo celular, estruturais, *housekeeping*; ou genes aleatórios (Tabela 2).

Tabela 2. Relação entre os genes, grupos e sondas utilizadas no trabalho.

Gene	Grupo	Sondas
OCT4	Pluripotência	208286_x_at, 210905_x_at, 214532_x_at
SOX2	Pluripotência	213721_at, 213722_at, 228038_at
c-MYC	Pluripotência	202431_s_at, 244089_at
KLF4	Pluripotência	220266_s_at, 221841_s_at
NANOG	Pluripotência	220184_at
FBXO15	Pluripotência	231472_at
DPPA2	Pluripotência	240301_at
LIN28	Pluripotência	219823_at
CTNNB1	Pluripotência	1554411_at, 201533_at, 223679_at
REX1	Pluripotência	1554776_at, 1554777_at, 243161_x_at
ATG2A	Autofagia	213300_at
ATG2B	Autofagia	1559485_at, 219164_s_at, 222840_at, 226684_at
ATG3	Autofagia	220237_at, 221492_s_at
ATG4A	Autofagia	213115_at
ATG4B	Autofagia	204902_s_at, 204903_x_at, 212280_x_at
ATG4C	Autofagia	228190_at
ATG4D	Autofagia	226871_s_at
ATG5	Autofagia	202511_s_at, 202512_s_at, 210639_s_at
ATG7	Autofagia	218673_s_at, 222709_at, 224025_s_at
ATG9A	Autofagia	202492_at
ATG9B	Autofagia	1553390_at, 229252_at
ATG10	Autofagia	1570523_s_at, 207774_at, 223677_at, 243477_at
ATG12	Autofagia	204833_at, 213026_at, 213930_at
ATG13	Autofagia	203363_s_at, 203364_s_at, 209021_x_at
ATG14	Autofagia	204568_at
ATG16L1	Autofagia	220521_s_at, 232612_s_at
ATG16L2	Autofagia	225883_at, 229389_at
BECN1	Autofagia	208945_s_at, 208946_s_at
ULK1	Autofagia	209333_at
ULK2	Autofagia	1554112_a_at, 204062_s_at, 204063_s_at, 215154_at
ACTB	<i>Housekeeping</i>	200801_x_at, 213867_x_at, 224594_x_at
GAPDH	<i>Housekeeping</i>	212581_x_at, 213453_x_at, 217398_x_at
GUSB	<i>Housekeeping</i>	202605_at
HPRT1	<i>Housekeeping</i>	202854_at, 1565446_at
HSP90AB1	<i>Housekeeping</i>	1557910_at, 200064_at, 214359_s_at
RPL13A	<i>Housekeeping</i>	200715_x_at, 200716_x_a, 210646_x_at, 211942_x_at, 212790_x_at
RPLP0	<i>Housekeeping</i>	201033_x_at, 208856_x_at, 211720_x_at, 211972_x_at, 214167_s_at
TFRC	<i>Housekeeping</i>	207332_s_at, 208691_at, 237214_at, 237215_s_at
UBC	<i>Housekeeping</i>	208980_s_at, 211296_x_at
TUBA1A	Estruturais	209118_s_at
TUBA1C	Estruturais	209251_x_at, 211750_x_at
TUBA4A	Estruturais	212242_at
TUBD1	Estruturais	210389_x_at, 221326_s_at, 231853_at
TUBA8	Estruturais	220069_at
TUBAL3	Estruturais	220310_at
TUBB	Estruturais	209026_x_at, 211714_x_at, 212320_at
DNAH2	Estruturais	215840_at, 239499_at
DNAH12	Estruturais	1563097_at, 243802_at
DNAH14	Estruturais	1567862_at, 242283_at
DNAH17	Estruturais	214229_at, 1564784_at
KIF1A	Estruturais	203849_s_at, 225482_at, 203850_s_at

KIF1B	Estruturais	209234_at, 226968_at
KIF2A	Estruturais	203086_at, 203087_s_at, 220699_s_at
KIF2B	Estruturais	223926_at
KIF22	Estruturais	202183_s_at, 216969_s_at
KIF23	Estruturais	204709_s_at
KIF24	Estruturais	220652_at
MYO1A	Estruturais	211916_s_at
MYO1B	Estruturais	212364_at, 212365_at
MYO1C	Estruturais	214656_x_at, 225080_at, 32811_at
MYH7	Estruturais	204737_s_at, 216265_x_at
MYH7B	Estruturais	215795_at, 233949_s_at
MYO3A	Estruturais	221400_at, 244364_at, 1569186_at
MYO3B	Estruturais	1552578_a_at, 1555257_a_at
CCNA1	Ciclo Celular	205899_at
CCNA2	Ciclo Celular	203418_at, 213226_at
CCNB1	Ciclo Celular	214710_s_at, 228729_at
CCNB2	Ciclo Celular	202705_at, 1560161_at
CCNB3	Ciclo Celular	231481_at
CCNC	Ciclo Celular	1569126_at, 201955_at
CCND1	Ciclo Celular	208711_s_at, 208712_at, 214019_at
CCND2	Ciclo Celular	200951_s_at, 200952_s_at, 200953_s_at
CCND3	Ciclo Celular	201700_at
CCNE1	Ciclo Celular	213523_at
CCNE2	Ciclo Celular	205034_at, 211814_s_at
CCNF	Ciclo Celular	204826_at, 204827_s_at
CCNG1	Ciclo Celular	208796_s_at
CCNG2	Ciclo Celular	1555056_at, 202769_at, 202770_s_at, 211559_s_at, 228081_at
CCNH	Ciclo Celular	204093_at
CCNI	Ciclo Celular	208656_s_at
CCNJ	Ciclo Celular	219470_x_at, 229091_s_at
CCNK	Ciclo Celular	219273_at, 225824_at
CCNO	Ciclo Celular	210021_s_at
CCNT1	Ciclo Celular	206967_at, 225493_at
CCNT2	Ciclo Celular	204645_at, 213743_at, 214638_s_at, 214638_s_at, 229184_at
CCNYL1	Ciclo Celular	227280_s_at, 228810_at
CCNYL2	Ciclo Celular	1569878_at
ADCK1	Aleatórios	227482_at
SRY	Aleatórios	237472_at
BF196209	Aleatórios	237628_at
SRRM4	Aleatórios	237828_at
Hs.196575	Aleatórios	237970_at
RPL35A	Aleatórios	238026_at
LOC100129617	Aleatórios	238086_at
SLC44A5	Aleatórios	1569112_at
IQGAP3	Aleatórios	1569062_s_at
Hs.473255	Aleatórios	1568907_at
SLC24A4	Aleatórios	1568922_at
DICER1-AS1	Aleatórios	229227_at
SHISA6	Aleatórios	229266_at
CLDN6	Aleatórios	237810_at
ABHD12B	Aleatórios	237974_at
RPL35A	Aleatórios	238026_at
CHEK1	Aleatórios	238075_at
GABRQ	Aleatórios	238123_at
TRIM46	Aleatórios	238147_at
Hs.522616	Aleatórios	238220_at
Hs.117210	Aleatórios	238255_at
AI806045	Aleatórios	238289_at

ANKRD29	Aleatórios	238332_at
SLC35B4	Aleatórios	238418_at
RBMS3	Aleatórios	238447_at
PRKAA2	Aleatórios	238489_at
TMEM25	Aleatórios	238514_at
AK098425	Aleatórios	238604_at

Os dados de expressão foram separados manualmente e para cada banco de dados foi criada uma tabela com os níveis de expressão das amostras para cada conjunto de genes separadamente.

4.6 Clusterização das amostras

As amostras foram clusterizadas utilizando o *software* SPSS por amostra comparando os diferentes conjuntos de genes, quanto a eficiência de separação das amostras de mesma linhagem. Além disso, os grupos de genes de pluripotência foram agrupados com os de autofagia, com o objetivo de identificar uma relação entre esses dois grupos (Figura 4).

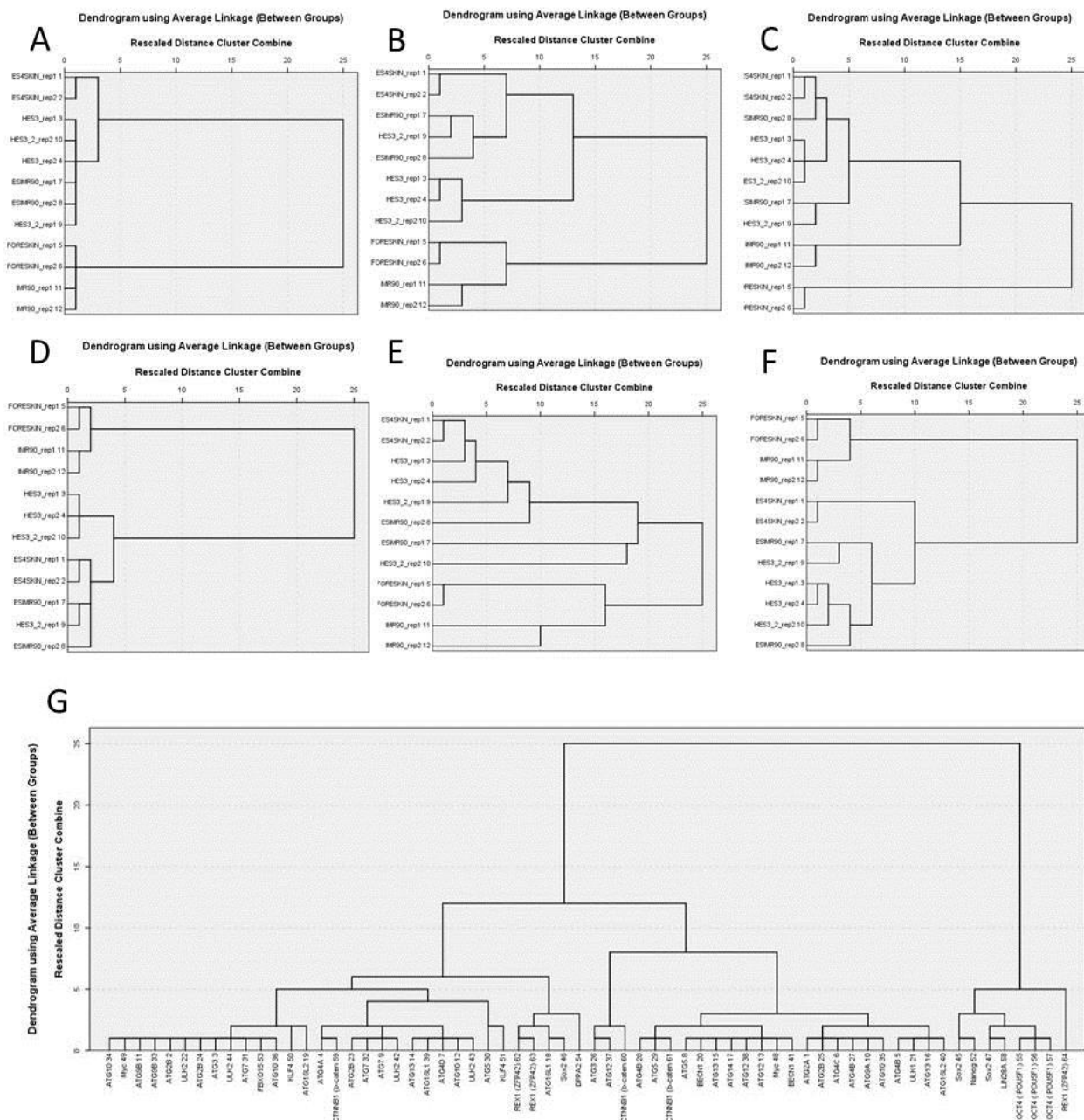


Figura 4. Exemplificação dos dendrogramas gerados a partir dos diferentes grupos de genes selecionados utilizando o GSE26455. A) Pluripotência, B) Autofagia, C) Ciclo Celular, D) Estruturais, E) Housekeeping, F) Aleatórios e G) Cluster dos genes de autofagia e de pluripotência.

4.7 Correlação de Pearson

As amostras foram agrupadas em três grupos diferentes: células somáticas, ESCs e iPSCs. Além disso, cada banco de dados foi separado dessa mesma forma. A análise de correlação dos genes foi realizada utilizando o software SPSS fazendo a correlação de Pearson com o agrupamento das amostras de mesma origem, por

similaridade. O ponto de corte utilizado foi 0,9 para similaridades e -0,9 para dissimilaridades.

5. Resultados

5.1 Obtenção dos dados

Um total de 12 bancos de dados de expressão gênica em microarranjo foram selecionados e feitos obtidos através do GEO (Tabela 3).

Tabela 3. Relação entre os bancos de dados, tipo de amostras utilizadas e número de amostras de cada banco.

Banco de Dados	Amostras	Número de amostras	Referência
GSE12390	Fibroblastos, ESCs e diferentes iPSCs.	21	Maherali et al., 2008
GSE12583	Fibroblastos, queratinócitos e iPSC derivadas de queratinócitos	9	Aasen et al., 2008
GSE16963	Fibroblastos, células do terceiro molar e iPSC	9	Oda et al., 2010
GSE18180	Células mesenquimais, ESCs e iPSC	3	Li et al., 2010
GSE23402	Fibroblastos, ESCs e iPSCs	42	Guenther et al., 2010
GSE26455	Células dermais, células de prepúcio, ESCs e iPSCs	12	Não publicado
GSE37896	Células adiposas, ESCs e iPSCs	8	Hu et al., 2013
GSE16654	Fibroblastos, ESCs e iPSCs	6	Chin & Lowri et al., 2009
GSE27186	Células de cordão umbilical, queratinócitos neonatais, iPSCs derivadas de células de cordão umbilical e de queratinócitos	8	Kim et al., 2011
GSE22392	Fibroblastos, ESCs e iPSCs	10	Chin et al., 2010
GSE9865	Fibroblastos, ESCs e iPSCs	13	Lowry et al., 2008
GSE48830	Fibroblastos dermais, ESCs, iPSC pré excisão e pós excisão	4	Awe et al., 2013

As amostras desses bancos foram extraídas e agrupadas em uma tabela com dados de expressão global utilizando a linguagem R. A partir desses dados, 214 sondas foram selecionadas correspondentes aos 114 genes de interesse e subdivididas em 6 grupos contendo os genes e seus respectivos dados de

expressão, gerando assim 7 tabelas por banco de dados, somando um total de 84 tabelas.

5.2 Clusterização das amostras

Cada conjunto de genes de bancos de dados individuais foi utilizado para fazer o agrupamento em *cluster* das amostras. Não foi possível determinar uma relação entre os grupos de genes e a separação de amostras. Nos agrupamentos envolvendo a clusterização de genes de autofagia e de pluripotência foi possível observar que alguns genes dos diferentes grupos se agrupavam.

5.3 Correlação dos dados

As análises de correlação de Pearson demonstraram relações entre os genes de autofagia e pluripotência quando agrupados. Em iPSC, c-MYC parece se correlacionar positivamente com ATG9B e ATG10, enquanto SOX2 se correlaciona com ATG13. Nas linhagens ESCs, percebe-se as mesmas correlações em c-MYC. SOX2 também parece se correlacionar com ATG13, mas também há uma correlação com ATG9A e ATG10 (Tabela 4).

Tabela 4. Dados brutos da correlação dos genes de autofagia com genes de pluripotência entre as amostras de ESCs, exemplificando o resultado da correlação.

	45: Sox2	46: Sox2	47: Sox2	48: Myc	49: Myc	50: KLF 4	51: KLF 4	52: Nanog	53: FBXO 15	54: DPPA 2	55: OCT4	56: OCT 4	57: OCT 4	58: LIN2 8	59: CTNN B1	60: CTNN B1	61: CTNN B1	62: REX 1	63: REX 1	64: REX1
1:ATG2A	,650	,565	,564	,625	-,472	,243	,583	,301	,127	,035	,746	,796	,731	,769	,577	,606	,221	,627	,451	,121
2:ATG2B	-,714	-,595	-,561	-,421	,295	-	-	,112	-,394	,321	-,444	-	-	-	-,235	-,330	-,149	-	-	,089
3:ATG3	-,446	-,319	-,194	-,024	-,106	,235	,118	,220	-,279	,406	-,022	-	-	-	,198	,184	-,009	-	,083	,228
4:ATG4A	,216	,420	,389	,576	-,720	,409	,537	,471	,029	,354	,284	,365	,386	,405	,501	,642	-,469	,399	,379	,065
5:ATG4B	,471	,238	,115	,183	-,142	-	,006	,321	-,222	,176	,689	,608	,544	,308	,401	,243	,451	,438	,365	,289
6:ATG4C	,287	,524	,639	,684	-,772	,519	,682	,280	,420	,056	,221	,313	,274	,610	,334	,572	-,421	,465	,428	,045
7:ATG4D	,014	,220	,101	,507	-,497	,443	,551	,450	-,245	,524	,320	,218	,197	,322	,743	,770	-,164	,341	,346	,121
8:ATG5	,379	,644	,648	,745	-,815	,588	,751	,343	,279	,020	,262	,399	,365	,669	,425	,676	-,526	,556	,482	,018
9:ATG7	,730	,846	,850	,680	-,940	,622	,741	,184	,559	-,148	,316	,551	,520	,795	,235	,502	-,367	,519	,413	-,075
10:ATG9A	,916	,843	,862	,529	-,669	,489	,619	,068	,575	-,375	,455	,709	,648	,815	,092	,336	-,119	,478	,318	-,104
11:ATG9B	-,709	-,816	-,808	-,742	1,000	-	-	-,389	-,431	-,053	-,496	-	-	-	-,437	-,645	,254	-	-	-,047
12:ATG10	,754	,911	,840	,815	-,854	,558	,813	,212	,452	-,166	,455	,715	,676	,936	,429	,690	-,403	,725	,531	-,046
13:ATG12	,484	,756	,591	,727	-,763	,512	,647	,148	,357	-,022	,150	,445	,482	,685	,337	,576	-,534	,502	,325	-,217
14:ATG13	,789	,910	,863	,700	-,902	,658	,790	,143	,619	-,221	,313	,625	,619	,854	,208	,493	-,447	,552	,404	-,145
15:ATG13	,879	,765	,820	,531	-,758	,438	,628	,207	,508	-,213	,572	,748	,665	,795	,196	,332	,061	,546	,425	,027
16:ATG13	,820	,926	,916	,776	-,920	,623	,827	,194	,574	-,205	,421	,696	,662	,927	,310	,580	-,358	,624	,454	-,101
17:ATG14	,084	,225	,339	,339	-,659	,525	,557	,306	,118	,306	,180	,086	-	,269	,353	,471	-,175	,215	,317	,165
18:ATG16L1	,120	-,139	-,003	-,371	,274	-	-	-,179	,301	-,417	-,145	-	-	-	-,599	-,690	,342	-	-	-,061
19:ATG16L2	,704	,559	,587	,118	-,326	,186	,173	-,277	,628	-,493	,151	,354	,275	,475	-,336	-,156	,090	,167	,044	-,151
20:BECN1	,741	,764	,725	,795	-,792	,422	,764	,416	,178	,092	,752	,866	,789	,892	,674	,776	-,008	,765	,592	,114
21:ULK1	,877	,758	,833	,579	-,801	,460	,652	,268	,473	-,122	,653	,768	,658	,810	,293	,435	,098	,536	,427	,038
22:ULK2	,537	,664	,685	,284	-,408	,462	,424	-,411	,779	-,728	-,230	,130	,125	,519	-,424	-,048	-,571	,077	-	-,464
23:ATG2B	,438	,546	,738	,499	-,776	,539	,654	,227	,506	-,099	,283	,368	,278	,606	,078	,312	-,317	,386	,370	,047

24:ATG2B	,420	,617	,670	,432	-,498	,549	,486	-,227	,662	-,540	-,149	,100	,036	,521	-,276	,101	-,613	,177	,075	-,289	
	45: Sox2	46: Sox2	47: Sox2	48: Myc	49: Myc	50: KLF 4	51: KLF 4	52: Nanog	53: FBXO 15	54: DPPA 2	55: OCT4	56: OCT 4	57: OCT 4	58: LIN2 8	59: CTNN B1	60: CTNN B1	61: CTNN B1	62: REX 1	63: REX 1	64: REX1	
25:ATG2B	-,169	-,143	,004	,118	-,389	-	,010	,647	-,223	,575	,249	,079	,082	-	,272	,159	,080	,106	,250	,292	
26:ATG3	,496	,719	,718	,848	-,820	,562	,861	,334	,307	,040	,437	,588	,547	,847	,596	,820	-,357	,693	,554	,037	
27:ATG4B	,868	,900	,819	,740	-,858	,494	,726	,249	,431	-,133	,548	,782	,741	,920	,409	,583	-,123	,684	,499	-,033	
28:ATG4B	,888	,826	,775	,663	-,743	,383	,636	,248	,405	-,113	,657	,849	,793	,888	,395	,515	,058	,666	,478	,018	
29:ATG5	,222	,347	,355	,579	-,604	,231	,372	,436	,119	,439	,419	,452	,464	,422	,432	,531	-,121	,361	,301	,059	
30:ATG5	,529	,775	,702	,809	-,813	,574	,807	,246	,307	-,064	,320	,531	,499	,801	,489	,744	-,477	,661	,514	-,029	
31:ATG7	-,321	-,306	-,431	-,061	-,109	-	-	,520	-,554	,762	,154	-	-	-	,428	,196	,226	-	,160	,298	
32:ATG7	,605	,813	,640	,670	-,766	,443	,523	,162	,459	-,097	,154	,496	,574	,685	,226	,471	-,579	,529	,366	-,141	
33:ATG9B	-,719	-,825	-,818	-,743	,999	-	-	-,381	-,434	-,038	-,496	-	-	-	-,440	-,652	,252	-	-	-,045	
34:ATG10	-,709	-,816	-,808	-,742	1,000	,614	,797	-,390	-,431	-,053	-,496	,670	,616	,829	-,437	-,644	,255	,642	,548	-,047	
35:ATG10	,565	,755	,799	,763	-,797	,635	,817	,208	,460	-,108	,382	,565	,512	,817	,313	,622	-,544	,520	,378	-,096	
36:ATG10	,455	,640	,582	,545	-,599	,335	,387	,120	,362	-,158	,072	,356	,405	,504	,065	,356	-,645	,330	,199	-,179	
37:ATG12	,701	,847	,704	,701	-,761	,604	,690	,000	,406	-,187	,281	,478	,399	,791	,305	,565	-,362	,498	,324	-,172	
38:ATG12	-,078	-,138	,190	-,202	-,130	,118	-	-,052	,278	-,097	-,153	-	-	-	-,405	-,291	,000	-	-	,019	
39:ATG16L1	,098	,222	,289	,275	-,634	,377	,331	,420	,028	,317	,160	,123	,078	,147	,182	,297	-,246	,143	,236	,101	
40:ATG16L2	-,066	-,400	-,331	-,643	,518	-	-	-,199	-,037	-,108	-,065	-	-	-	-,523	-,719	,558	-	-	,008	
41:BECN1	,107	,320	,305	,629	-,635	,455	,618	,466	-,142	,426	,410	,323	,251	,464	,756	,827	-,186	,501	,497	,206	
42:ULK2	,440	,636	,742	,691	-,792	,509	,651	,191	,441	-,108	,168	,332	,287	,630	,214	,509	-,477	,404	,317	-,085	
43:ULK2	,258	,421	,554	,394	-,429	,253	,279	-,025	,481	-,361	-,157	,081	,115	,330	-,236	,073	-,541	,074	-	-,279	
44:ULK2	-,336	-,560	-,509	-,649	,582	-	-	-,157	-,225	,010	-,195	-	-	-	-,487	-,702	,360	-	-	-,081	
						,398	,655					,372	,333	,639				,591	,481		

Além disso, o gene LIN28 aparece correlacionado com ATG10, ATG13 e ATG4B. Em células somáticas, apenas observou-se correlação entre c-MYC e ATG10. Quando às correlações negativas, ou seja, às dissimilaridades, c-MYC se correlacionou com ATG13 em iPSC, e nas linhagens ESCs esse mesmo gene se correlacionou com ATG7 e ATG13 (Tabela 5).

Tabela 5. Resumo dos resultados obtidos em análises de correlação entre os genes de pluripotência e autofagia dos diferentes grupos de células.

Similaridade	iPSC	ESC	Somáticas
c-MYC	ATG9B, ATG10	ATG9B, ATG10	ATG10
SOX2	ATG13	ATG9A, ATG10, ATG13	*
LIN28	*	ATG10, ATG13, ATG4B	*
Dissimilaridade			
c-MYC	ATG13	ATG7, ATG13	*

*Não houve correlação significativa > 0,9

6. Discussão

A possibilidade de gerar células com um grande potencial de diferenciação através da reprogramação celular tem se mostrado um grande avanço para a pesquisa biomédica básica e aplicada, como a terapia celular. A indução de pluripotência, originando as iPSCs, já é uma técnica consolidada na literatura. Entretanto, os mecanismos envolvidos na reprogramação celular ainda não foram completamente elucidados.

Nosso grupo propôs o estabelecimento de relações entre os principais genes envolvidos em processos de autofagia, pluripotência e diferenciação celular, a fim de melhorar o entendimento sobre estes processos e suas interações. As alterações no metabolismo energético das células submetidas a essas condições pode ser a chave para o entendimento da relação entre essas vias.

Estudos recentes têm mostrado que a reprogramação celular é caracterizada por uma transição de metabolismo oxidativo para glicólise anaeróbica, enquanto a diferenciação requer biogênese mitocondrial e a maturação de mecanismos oxidativos eficientes de produção de energia (FOLMES et al., 2011). Tal como as células cancerosas, as células-tronco embrionárias e as iPSCs exibem uma elevada taxa de utilização de glicose e produção de lactato, que faz da glicólise anaeróbia a principal fonte de ATP (PANOPOULOS & BELMONTE, 2011).

Somado a isto, a indução de autofagia mitocondrial, em conjunto com a inibição da biogênese mitocondrial (ZHANG et al., 2007), parece representar um mecanismo adaptativo fundamental para manter a homeostase de oxigênio sob condições de hipóxia. Esta adaptação metabólica parece ser necessária para evitar o aumento dos níveis de ROS e morte celular em culturas hipóxias (ZHANG et al., 2008). Assim, a manutenção do estado de pluripotência das células e processos autofágicos decorrentes de mudanças metabólicas na célula parecem estar fortemente correlacionados.

Os dados gerados neste trabalho mostram uma forte correlação ($>0,9$) entre o fator de pluripotência Sox2 e os genes ligados a autofagia ATG9A, ATG10 e ATG13 em ESCs. Em iPSCs, apenas se identificou uma correlação com ATG13. Tais achados sugerem que a reprogramação celular e a autofagia podem estar associadas. Corroborando parcialmente com esta hipótese, Cho et al., (2013) revelaram que a expressão de Sox2 em células cancerosas induz o aumento da expressão de ATG10, ATG3, ATG4a, ATG4D e ATG8b em cerca de 2-4 vezes. Em contraste, a expressão SOX2 foi associada com a diminuição da expressão de genes ATG12, ATG16L2 e ATG9B. O mesmo trabalho também verificou uma ligação putativa de Sox2 nos promotores de ATG10 e ATG12 abrigando 63% de identidade. Além disso, foi demonstrado que a super expressão induzida de Sox2 promove a formação de vacúolo, ativação lisossomal e induz o acúmulo de LC3.

É importante ressaltar que este estudo foi realizado utilizando bancos de dados de células somáticas, além de iPSC e ESC, que são caracterizadas pela expressão simultânea de diferentes fatores de pluripotência, impossibilitando que pudesse ter sido detectada a influência de cada um destes na expressão dos demais conjuntos de genes aqui analisados. Em adição, esse tipo de análise não permite saber a heterogeneidade da população celular, podendo haver a expressão de diferentes fatores em uma análise de célula única. Assim, essas análises possibilitam o conhecimento de um padrão geral nas populações celulares analisadas, não podendo determinar essa condição a células individuais.

Outro achado importante foi a correlação positiva de c-Myc com ATG9B e ATG10 em ESCs e iPSCs, mas apenas de ATG10 nas células somáticas, sugerindo a presença da coexpressão desses genes em todas as condições avaliadas. De mesmo modo, Lin28 foi correlacionado com os genes ATG10, ATG13 e ATG4B. Além disso, c-Myc também se correlacionou negativamente com ATG13 em iPSCs e com ATG7 e ATG13 em ESCs.

Entre as 31 proteínas do grupo ATG, 18 delas estão envolvidas na formação do autofagossomo, dentre elas ATG4B, ATG7, ATG9A, ATG9B, ATG10 e ATG13 (KABEYA et al., 2007; KLIONSKY et al., 2003; SUZUKI & OHSUMI, 2007), encontrados nos resultados da presente análise. Porém, esses genes parecem atuar em diferentes vias (Figura 5).

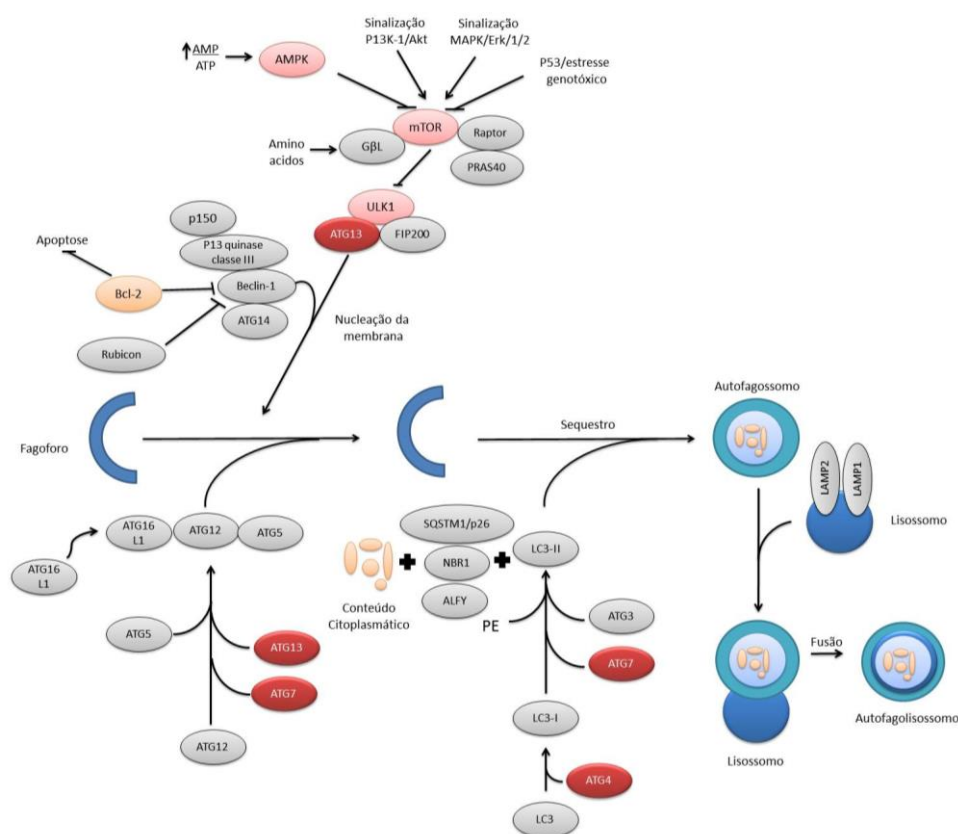


Figura 5. Vias de sinalização da autofagia. Em vermelho, destacam-se os genes que foram correlacionados com os genes de pluripotência neste estudo e seu papel em cada etapa da indução da autofagia. (Adaptado de AUTOPHAGY SIGNALING, 2012)

Os genes ATG controlam a formação do autofagossomo através dos complexos Atg12-Atg5 e LC3-II. Atg12 é conjugado com Atg5 numa reação ubiquitina-like que requer Atg7 e Atg10 (E1 e E2, como enzimas, respectivamente). O conjugado Atg12-Atg5 interage de modo não covalente com Atg16 para formar um complexo grande. LC3/Atg8 é clivado na sua extremidade C-terminal pela protease Atg4 para gerar o LC3-I citosólico. LC3-I é conjugado a fosfatidiletanolamina, também numa reação que requer *ubiquitina-like* Atg7 e Atg3 (E1 e E2, como enzimas, respectivamente). A forma lipidada da LC3, conhecida como LC3-II, é ligada à membrana do autofagossomo (AUTOPHAGY SIGNALING, 2012).

O ATG13 é outro fator de autofagia necessário para a formação do fagossomo, sendo ele um alvo da rota de sinalização da enzima TOR quinase. Esta enzima é responsável pela fosforilação de ATG13 e de ULK1 e pela regulação do complexo ATG13-ULK1-RB1CC1. Quando a TOR quinase está inativa, em condições de baixos níveis de nutrição celular, o ATG13 permanece desfosforilado

e, assim, possui alta afinidade por ATG1 e ATG17, realizando assim a indução da autofagia (GANLEY et al., 2009; MERCER et al., 2009).

Assim, os genes de autofagia aqui avaliados, com possível correlação com os genes de pluripotência, parecem ser essenciais para que essa via seja ativa e a autofagia seja induzida.

7. Conclusões e Perspectivas

Nossos resultados demonstraram uma forte correlação entre alguns genes de pluripotência e autofagia em ESCs e iPSCs, sugerindo uma relação entre essas vias em células pluripotentes. Os fatores de pluripotência SOX2, c-MYC e LIN28 parecem se correlacionar com alguns ATGs importantes na indução da autofagia.

Visando que nos processos de autofagia, pluripotência e diferenciação estão envolvidas muitas vias de sinalização, moléculas e fatores de transcrição, são necessárias mais análises para aprimorar o entendimento das interações entre esses grupos de genes e suas respectivas vias de sinalização.

O próximo passo deste estudo será analisar a ligação entre os genes de pluripotência e a ativação de promotores dos genes de autofagia através de análises do tipo *chip-seq*, confirmando a hipótese de correlação entre estes grupos apresentada neste trabalho.

Referências

AASEN, T.; RAYA, A.; BARRERO, M. J.; GARRETA, E.; CONSIGLIO, A.; GONZALEZ, F.; VASSENA, R.; BILIC, J.; PEKARIK, V.; TISCORNIA, G.; EDEL, M.; BOUE, S.; IZPISUA BELMONTE, J. C. Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes. **Nat Biotechnol**, v. 26, n. 11, p. 1276-1284, 2008.

AUTOPHAGY SIGNALING. 2012. **Cell Signaling Technology, Inc.** Disponível em <<http://www.cellsignal.com/reference/pathway/Autophagy.html>> Acesso em 28 nov. 2013.

AWE, J. P.; LEE, P. C.; RAMATHAL, C.; VEGA-CRESPO, A.; DURRUTHY-DURRUTHY, J.; COOPER, A.; KARUMBAYARAM, S.; LOWRY, W. E.; CLARK, A. T.; ZACK, J. A.; SEBASTIANO, V.; KOHN, D. B.; PYLE, A. D.; MARTIN, M. G.; LIPSHUTZ, G. S.; PHELPS, P. E.; PERA, R. A.; BYRNE, J. A. Generation and characterization of transgene-free human induced pluripotent stem cells and conversion to putative clinical-grade status. **Stem Cell Res Ther**, v. 4, n. 4, p. 87, 2013.

BILIC, J.; IZPISUA BELMONTE, J. C. Concise review: Induced pluripotent stem cells versus embryonic stem cells: close enough or yet too far apart? **Stem Cells**, v. 30, n. 1, p. 33-41, 2012.

BOYER, L. A.; LEE, T. I.; COLE, M. F.; JOHNSTONE, S. E.; LEVINE, S. S.; ZUCKER, J. P.; GUENTHER, M. G.; KUMAR, R. M.; MURRAY, H. L.; JENNER, R. G.; GIFFORD, D. K.; MELTON, D. A.; JAENISCH, R.; YOUNG, R. A. Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. **Cell**, v. 122, n. 6, p. 947-956, 2005.

BRAMBRINK, T.; FOREMAN, R.; WELSTEAD, G. G.; LENGNER, C. J.; WERNIG, M.; SUH, H.; JAENISCH, R. Sequential expression of pluripotency markers during

direct reprogramming of mouse somatic cells. **Cell Stem Cell**, v. 2, n. 2 p. 151-159, 2008.

BUGANIM, Y.; FADDAH, D. A.; CHENG, A. W.; ITSKOVICH, E.; MARKOULAKI, S.; GANZ, K.; KLEMM, S. L.; VAN OUDENAARDEN, A.; JAENISCH, R. Single-cell expression analyses during cellular reprogramming reveal an early stochastic and a late hierarchic phase. **Cell**, v. 150, n. 6, p. 1209-1222, 2012.

CHEN, C. T.; HSU, S. H.; WEI, Y. H. Upregulation of mitochondrial function and antioxidant defense in the differentiation of stem cells. **Biochim Biophys Acta**, v. 1800, n. 3, p. 257-263, 2010.

CHEN, C. T.; SHIH, Y. R.; KUO, T. K.; LEE, O. K.; WEI, Y. H. Coordinated changes of mitochondrial biogenesis and antioxidant enzymes during osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. **Stem Cells**, v. 26, n. 4, p. 960-968, 2008.

CHIN, M. H.; MASON, M. J.; XIE, W.; VOLINIA, S.; SINGER, M.; PETERSON, C.; AMBARTSUMYAN, G.; AIMIUWU, O.; RICHTER, L.; ZHANG, J.; KHVOROSTOV, I.; OTT, V.; GRUNSTEIN, M.; LAVON, N.; BENVENISTY, N.; CROCE, C. M.; CLARK, A. T.; BAXTER, T.; PYLE, A. D.; TEITELL, M. A.; PELEGRINI, M.; PLATH, K.; LOWRY, W. E. Induced pluripotent stem cells and embryonic stem cells are distinguished by gene expression signatures. **Cell Stem Cell**, v. 5, n. 1, p. 111-123, 2009.

CHIN, M. H.; PELLEGRINI, M.; PLATH, K.; LOWRY, W. E. Molecular analyses of human induced pluripotent stem cells and embryonic stem cells. **Cell Stem Cell**, v. 7, n. 2, p. 263-269, 2010.

CHO, Y. Y.; KIM, D. J.; LEE, H. S.; JEONG, C. H.; CHO, E. J.; KIM, M. O.; BYUN, S.; LEE, K. Y.; YAO, K.; CARPER, A.; LANGFALD, A.; BODE, A. M.; DONG, Z. Autophagy and cellular senescence mediated by Sox2 suppress malignancy of cancer cells. **PLoS One**, v. 8, n. 2, p. 57172, 2013.

CORCELLE, E.; DJERBI, N.; MARI, M.; NEBOUT, M.; FIORINI, C.; FENICHEL, P.; HOFMAN, P.; POUJEOL, P.; MOGRABI, B. Control of the autophagy maturation step by the MAPK ERK and p38: lessons from environmental carcinogens. **Autophagy**, v. 3, n. 1 p. 57-59, 2007.

COVELLO, K. L.; KEHLER, J.; YU, H.; GORDAN, J. D.; ARSHAM, A. M.; HU, C. J.; LABOSKY, P. A.; SIMON, M. C.; KEITH, B. HIF-2 alpha regulates Oct-4: effects of

hypoxia on stem cell function, embryonic development, and tumor growth. **Genes Dev**, v. 20, n. 5, p. 557-570, 2006.

DA SILVA MEIRELLES, L.; CHAGASTELLES, P. C.; NARDI, N. B. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. **Journal of Cell Science**, v. 119, p. 2204-2213, 2006.

DENKER, H. W. Potentiality of embryonic stem cells: an ethical problem even with alternative stem cell sources. **J Med Ethics**, v. 32, n. 11, p. 665-671, 2006.

EVANS, M. J.; KAUFMAN, M. H. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. **Nature**, v. 292, n. 5819, p. 154-156, 1981.

EZASHI, T.; DAS, P.; ROBERTS, R. M. Low O₂ tensions and the prevention of differentiation of hES cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 102, n. 13, p. 4783-4788, 2005.

FOLMES, C. D.; NELSON, T. J.; MARTINEZ-FERNANDEZ, A.; ARRELL, D. K.; LINDOR, J. Z.; DZEJA, P. P.; IKEDA, Y.; PEREZ-TERZIC, C.; & TERZIC, A. Somatic oxidative bioenergetics transitions into pluripotency-dependent glycolysis to facilitate nuclear reprogramming. **Cell Metab**, v. 14, n. 2, p. 264-271, 2011.

FOX, J.; ANDERSEN, R. Using the R statistical computing environment to teach social statistics courses. **Department of Sociology, McMaster University**. 2005.

FUKUDA, R.; ZHANG, H.; KIM, J. W.; SHIMODA, L.; DANG, C. V.; SEMENZA, G. L. HIF-1 regulates cytochrome oxidase subunits to optimize efficiency of respiration in hypoxic cells. **Cell**, v. 129, n. 1, p. 111-122, 2007.

GANLEY, I. G.; LAM DU, H.; WANG, J.; DING, X.; CHEN, S.; JIANG, X. ULK1.ATG13.FIP200 complex mediates mTOR signaling and is essential for autophagy. **J Biol Chem**, v. 284, n. 18, p.12297-12305, 2009.

GENEANNOT. **Weizmann Institute of Science**. Disponível em <<http://genecards.weizmann.ac.il/geneannot/index.shtml>> Acesso em 15 out. 2013

GENE EXPRESSION OMNIBUS. **The National Center for Biotechnology Information**. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>> Acesso em 2 out. 2013

GOLIPOUR, A.; DAVID, L.; LIU, Y.; JAYAKUMARAN, G.; HIRSCH, C. L.; TRCKA, D.; WRANA, J. L. A late transition in somatic cell reprogramming requires regulators distinct from the pluripotency network. **Cell Stem Cell**, v. 11, n. 6, p. 769-782, 2012.

GONZALEZ, F.; BOUE, S.; IZPISUA BELMONTE, J. C. Methods for making induced pluripotent stem cells: reprogramming a la carte. **Nat Rev Genet**, v. 12, n. 4, p. 231-242, 2011.

GORDAN, J. D.; THOMPSON, C. B.; SIMON, M. C. HIF and c-Myc: sibling rivals for control of cancer cell metabolism and proliferation. **Cancer Cell**, v. 12, n. 2, p. 108-113, 2007.

GUENTHER, M. G.; FRAMPTON, G. M.; SOLDNER, F.; HOCKEMEYER, D.; MITALIPOVA, M.; JAENISCH, R.; YOUNG, R. A. Chromatin structure and gene expression programs of human embryonic and induced pluripotent stem cells. **Cell Stem Cell**, v. 7, n. 2, p. 249-257, 2010.

HANNA, J.; SAHA, K.; PANDO, B.; VAN ZON, J.; LENGNER, C. J.; CREYGHTON, M. P.; VAN OUDENAARDEN, A.; JAENISCH, R. Direct cell reprogramming is a stochastic process amenable to acceleration. **Nature**, v. 462, n. 7273, p. 595-601, 2009.

HE, C.; KLIONSKY, D. J. Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. **Annu Rev Genet**, v. 43, p. 67-93, 2009.

HOFFMAN, L. M.; CARPENTER, M. K. Characterization and culture of human embryonic stem cells. **Nat Biotechnol**, v. 23, n. 6, p. 699-708, 2005.

HU, S.; WILSON, K. D.; GHOSH, Z.; HAN, L.; WANG, Y.; LAN, F.; RANSOHOFF, K. J.; BURRIDGE, P.; WU, J. C. MicroRNA-302 increases reprogramming efficiency via repression of NR2F2. **Stem Cells**, v. 31, n. 2, p. 259-268, 2013.

JOHNSON, S. C.; RABINOVITCH, P. S.; KAEBERLEIN, M. mTOR is a key modulator of ageing and age-related disease. **Nature**, v. 493, n. 7432, p. 338-345, 2013.

JOPLING, C.; BOUE, S.; IZPISUA BELMONTE, J. C. Dedifferentiation, transdifferentiation and reprogramming: three routes to regeneration. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 12, n. 2, p. 79-89, 2011.

JORDAN, B. R. Large-Scale Expression Measurement by Hybridization Methods: From High-Density Membranes to DNA Chips. **Journal of Biochemistry**, v. 124, n. 2, p. 251-258, 1998.

KABEYA, Y.; KAWAMATA, T.; SUZUKI, K.; OHSUMI, Y. Cis1/Atg31 is required for autophagosome formation in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 356, n. 2, p. 405-410, 2007.

KIM, J.; KUNDU, M.; VIOLLET, B.; GUAN, K. L. 2011. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. **Nat Cell Biol**, v. 13, n. 2, p. 132-141, 2011.

KIM, J. W.; TCHERNYSHYOV, I.; SEMENZA, G. L.; DANG, C. V. HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. **Cell Metab**, v. 3, n. 3, p. 177-185, 2006.

KIM, K.; ZHAO, R.; DOI, A.; NG, K.; UNTERNAEHRER, J.; CAHAN, P.; HUO, H.; LOH, Y. H.; ARYEE, M. J.; LENSCH, M. W.; LI, H.; COLLINS, J. J.; FEINBERG, A. P.; DALEY, G. Q. Donor cell type can influence the epigenome and differentiation potential of human induced pluripotent stem cells. **Nat Biotechnol**, v. 29, n. 12, p. 1117-1119, 2011.

KLIONSKY, D. J.; CREGG, J. M.; DUNN JR, W. A.; EMR, S. D.; SAKAI, Y.; SANDOVAL, I. V.; SIBIRNY, A.; SUBRAMANI, S.; THUMM, M.; VEENHUIS, M. A unified nomenclature for yeast autophagy-related genes. **Developmental cell**, v. 5, n. 4, p. 539-545, 2003.

KUNDU, M.; THOMPSON, C. B. Autophagy: basic principles and relevance to disease. **Annu Rev Pathol**, v. 3, p. 427-455, 2008.

KURELLA, M.; HSIAO, L.; YOSHIDA, T.; RANDALL, J. D.; CHOW, G.; SARANG, S. S.; JENSEN, R. V.; GULLANS, S. R. DNA Microarray Analysis of Complex Biologic Processes. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 12, p. 1072-1078, 2001.

LEEPER, N. J.; HUNTER, A. L.; COOKE, J. P. Stem cell therapy for vascular regeneration: adult, embryonic, and induced pluripotent stem cells. **Circulation**, v. 122, n. 5, p. 517-526, 2010.

LI, Y.; ZHAO, H.; LAN, F.; LEE, A.; CHEN, L.; LIN, C.; YAO, Y.; LI, L. Generation of human-induced pluripotent stem cells from gut mesentery-derived cells by ectopic expression of OCT4/SOX2/NANOG. **Cell Reprogram**, v. 12, n. 3, p. 237-247, 2010.

LOH, Y. H.; WU, Q.; CHEW, J. L.; VEGA, V. B.; ZHANG, W.; CHEN, X.; BOURQUE, G.; GEORGE, J.; LEONG, B.; LIU, J.; WONG, K. Y.; SUNG, K. W.; LEE, C. W.; ZHAO, X. D.; CHIU, K. P.; LIPOVICH, L.; KUZNETSOV, V. A.; ROBSON, P.; STANTON, L. W.; WEI, C. L.; RUAN, Y.; LIM, B.; NG, H. H. The Oct4 and Nanog transcription network regulates pluripotency in mouse embryonic stem cells. **Nat Genet**, v. 38, n. 4, p. 431-440, 2006.

LONERGAN, T.; BAVISTER, B.; BRENNER, C. Mitochondria in stem cells. **Mitochondrion**, v. 7, n. 5, p. 289-296, 2007.

LOWRY, W. E.; RICHTER, L.; YACHECHKO, R.; PYLE, A. D.; TCHIEU, J.; SRIDHARAN, R.; CLARK, A. T.; PLATH, K. Generation of human induced pluripotent stem cells from dermal fibroblasts. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 105, n. 8, p. 2883-2888, 2008.

MADONNA, R.; GORBE, A.; FERDINANDY, P.; DE CATERINA, R. Glucose metabolism, hyperosmotic stress, and reprogramming of somatic cells. **Mol Biotechnol**, v. 55, n. 2, p. 169-178, 2013.

MAHERALI, N.; AHFELDT, T.; RIGAMONTI, A.; UTIKAL, J.; COWAN, C.; HOCHEDLINGER, K. A high-efficiency system for the generation and study of human induced pluripotent stem cells. **Cell Stem Cell**, v. 3, n. 3, p. 340-345, 2008.

MAHERALI, N.; SRIDHARAN, R.; XIE, W.; UTIKAL, J.; EMINLI, S.; ARNOLD, K.; STADTFELD, M.; YACHECHKO, R.; TCHIEU, J.; JAENISCH, R.; PLATH, K.; HOCHEDLINGER, K. Directly reprogrammed fibroblasts show global epigenetic remodeling and widespread tissue contribution. **Cell Stem Cell**, v. 1, n. 1, p. 55-70, 2007.

MARSON, A.; LEVINE, S. S.; COLE, M. F.; FRAMPTON, G. M.; BRAMBRINK, T.; JOHNSTONE, S.; GUENTHER, M. G.; JOHNSTON, W. K.; WERNIG, M.; NEWMAN, J.; CALABRESE, J. M.; DENNIS, L. M.; VOLKERT, T. L.; GUPTA, S.; LOVE, J.; HANNETT, N.; SHARP, P. A.; BARTEL, D. P.; JAENISCH, R.; YOUNG, R. A. Connecting microRNA genes to the core transcriptional regulatory circuitry of embryonic stem cells. **Cell**, v. 134, n. 3, p. 521-533, 2008.

MARTIN, G. R. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 78, n. 12, p. 7634-7638, 1981.

MENENDEZ, P.; BUENO, C.; WANG, L.; BHATIA, M. Human Embryonic Stem Cells: Potential Tool for Achieving Immunotolerance? **Stem Cell Reviews**, v. 1, p. 151-158, 2005.

MERCER, C. A.; KALIAPPAN, A.; DENNIS, P. B. A novel, human Atg13 binding protein, Atg101, interacts with ULK1 and is essential for macroautophagy. **Autophagy**, v. 5, n. 5, p. 649-662, 2009.

MEYER, N.; PENN, L. Z. Reflecting on 25 years with MYC. **Nat Rev Cancer**, v. 8, n. 12, p. 976-990, 2008.

MIZUSHIMA, N.; YOSHIMORI, T.; OHSUMI, Y. The role of Atg proteins in autophagosome formation. **Annu Rev Cell Dev Biol**, v. 27, p. 107-132, 2011.

NICHOLS, J.; ZEVNIK, B.; ANASTASSIADIS, K.; NIWA, H.; KLEWE-NEBENIUS, D.; CHAMBERS, I.; SCHOLER, H.; SMITH, A. Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. **Cell**, v. 95, n. 3, p. 379-391, 1998.

ODA, Y.; YOSHIMURA, Y.; OHNISHI, H.; TADOKORO, M.; KATSUBE, Y.; SASAO, M.; KUBO, Y.; HATTORI, K.; SAITO, S.; HORIMOTO, K.; YUBA, S.; OHGUSHI, H. Induction of pluripotent stem cells from human third molar mesenchymal stromal cells. **J Biol Chem**, v. 285, n. 38, p. 29270-29278, 2010.

OKITA, K.; ICHISAKA, T.; YAMANAKA, S. 2007. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. **Nature**, 448(7151): 313 -317.

PANOPOULOS, A. D.; BELMONTE, J. C. I. Anaerobicizing into pluripotency. **Cell Metabolism**, v. 14, n. 2, p. 143-144, 2011

PANOPOULOS, A. D.; YANES, O.; RUIZ, S.; KIDA, Y. S.; DIEP, D.; TAUTENHAHN, R.; HERRERIAS, A.; BATCHELDER, E. M.; PLONGTHONGKUM, N.; LUTZ, M.; BERGGREN, W. T.; ZHANG, K.; EVANS, R. M.; SIUZDAK, G.; IZPISUA BELMONTE, J. C. The metabolome of induced pluripotent stem cells reveals metabolic changes occurring in somatic cell reprogramming. **Cell Res**, v. 22, n. 1, p. 168-177, 2012.

PAPAPETROU, E. P.; TOMISHIMA, M. J.; CHAMBERS, S. M.; MICA, Y.; REED, E.; MENON, J.; TABAR, V.; MO, Q.; STUDER, L.; SADELAIN, M. Stoichiometric and temporal requirements of Oct4, Sox2, Klf4, and c-Myc expression for efficient human iPSC induction and differentiation. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 106, n. 31, p. 12759-12764, 2009.

PARKER, G. C.; ACSADI, G.; BRENNER, C. A. Mitochondria: determinants of stem cell fate? **Stem Cells Dev**, v. 18, n. 6, p. 803-806, 2009.

PATEL, M.; YANG, S. Advances in reprogramming somatic cells to induced pluripotent stem cells. **Stem Cell Rev**, v. 6, n. 3, p. 367-380, 2010

PHANTHONG, P.; RAVEH-AMIT, H.; LI, T.; KITIYANANT, Y.; DINNYES, A. Is aging a barrier to reprogramming? Lessons from induced pluripotent stem cells. **Biogerontology**, v. 14, n. 6, p. 591-602, 2013

POLO, J. M.; ANDERSEN, E.; WALSH, R. M.; SCHWARZ, B. A.; NEFZGER, C. M.; LIM, S. M.; BORKENT, M.; APOSTOLOU, E.; ALAEI, S.; CLOUTIER, J.; BAR-NUR, O.; CHELOUFI, S.; STADTFELD, M.; FIGUEROA, M. E.; ROBINSON, D.; NATESAN, S.; MELNICK, A.; ZHU, J.; RAMASWAMY, S.; HOCHEDLINGER, K. A molecular roadmap of reprogramming somatic cells into iPS cells. **Cell**, v. 151, n. 7, p. 1617-1632, 2012.

PRIGIONE, A.; ADJAYE, J. Modulation of mitochondrial biogenesis and bioenergetic metabolism upon in vitro and in vivo differentiation of human ES and iPS cells. **Int J Dev Biol**, v. 54, p. 1729-1741, 2010.

RAIS, Y.; ZVIRAN, A., GEULA, S., GAFNI, O.; CHOMSKY, E.; VIUKOV, S.; MANSOUR, A. A.; CASPI, I.; KRUPALNIK, V.; ZERBIB, M.; MAZA, I.; MOR, N.; BARAN, D.; WEINBERGER, L.; JAITIN, D. A.; LARA-ASTIASO, D.; BLECHER-GONEN, R.; SHIPONY, Z.; MUKAMEL, Z.; HAGAI, T.; GILAD, S.; AMANN-ZALCENSTEIN, D.; TANAY, A.; AMIT, I.; NOVERSHTERN, N.; HANNA, J. H. 2013. Deterministic direct reprogramming of somatic cells to pluripotency. **Nature**, v. 502, p. 65-70, 2013

REUBINOFF, B. E.; PERA, M. F.; FONG, C. Y.; TROUNSON, A.; BONGSO, A. Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro. **Nat Biotechnol**, v. 18, n. 4, p. 399-404, 2000.

SHANWARE, N. P.; BRAY, K.; ABRAHAM, R. T. The PI3K, metabolic, and autophagy networks: interactive partners in cellular health and disease. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v. 53, p. 89-106, 2013.

SIGGINS, R. W.; ZHANG, P.; WELSH, D.; LECAPITAINE, N. J.; NELSON, S. Stem cells, phenotypic inversion, and differentiation. **Int J Clin Exp Med**, v. 1, n. 1, p. 2-21, 2008.

SMYTH, G. K. Limma: linear models for microarray data, **Bioinformatics and computational biology solutions using R and Bioconductor**, p. 397-420, 2005.

SON, E. Y.; ICHIDA, J. K., WAINGER, B. J., TOMA, J. S.; RAFUSE, V. F.; WOOLF, C. J.; EGGAN, K. Conversion of mouse and human fibroblasts into functional spinal motor neurons. **Cell Stem Cell**, v. 9, n. 3, p. 205-218, 2011.

SUZUKI, K.; OHSUMI, Y. Molecular machinery of autophagosome formation in yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. **FEBS letters**, v. 581, n. 11, p. 2156-2161, 2007.

SWENSON, E. S. Direct conversion of mouse fibroblasts to hepatocyte-like cells using forced expression of endodermal transcription factors. **Hepatology**, v. 55, n. 1, p. 316-318, 2012.

TAKAHASHI, K.; TANABE, K.; OHNUKI, M.; NARITA, M.; ICHISAKA, T.; TOMODA, K.; YAMANAKA, S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. **Cell**, v. 131, n. 5, p. 861-872, 2007

TAKAHASHI, K.; YAMANAKA, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. **Cell**, v. 126, n. 4, p. 663-676, 2006.

THE R PROJECT FOR STATISTICAL COMPUTING. Disponível em <<http://www.r-project.org/>> Acesso em 2 out. 2013

THOMSON, J. A. Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts. **Science**, v. 282, n. 5391, p. 1145-1147, 1998.

TOH, P. P.; LUO, S.; MENZIES, F. M.; RASKO, T.; WANKER, E. E.; RUBINSZTEIN, D. C. Myc inhibition impairs autophagosome formation. **Hum Mol Genet**. 2013.

VARUM, S.; MOMCILOVIC, O.; CASTRO, C.; BEN-YEHUDAH, A.; RAMALHO-SANTOS, J.; NAVARA, C. S. Enhancement of human embryonic stem cell pluripotency through inhibition of the mitochondrial respiratory chain. **Stem Cell Res**, v. 3, p. 142-156, 2009.

VARUM, S.; RODRIGUES, A. S.; MOURA, M. B.; MOMCILOVIC, O.; EASLEY, C. A. T.; RAMALHO-SANTOS, J.; VAN HOUTEN, B.; SCHATTEN, G. Energy metabolism in human pluripotent stem cells and their differentiated counterparts. **PLoS One**, v. 6, n. 6, 2011.

VATS, A.; TOLLEY, N. S.; BISHOP, A. E.; POLAC, J. M. Embryonic stem cells and tissue engineering: delivering stem cells to the clinic. **JOURNAL OF THE ROYAL SOCIETY OF MEDICINE**, v. 98, p. 346-350, 2005.

VESSONI, A. T.; FILIPPI-CHIELA, E. C.; MENCK, C. F.; LENZ, G. Autophagy and genomic integrity. **Cell Death Differ**, v. 20, n. 11, p. 1444-1454, 2013.

WANG, S.; XIA, P.; YE, B.; HUANG, G.; LIU, J.; FAN, Z. Transient Activation of Autophagy via Sox2-Mediated Suppression of mTOR Is an Important Early Step in Reprogramming to Pluripotency. **Cell Stem Cell**, v. 13, n. 5, p. 617-625, 2013.

WATT, F. M.; HOGAN, B. L. M. Out of Eden: Stem Cells and Their Niches. **Science**, v. 287, p. 1427-1430, 2000.

WERNIG, M.; MEISSNER, A.; FOREMAN, R.; BRAMBRINK, T.; KU, M.; HOCHEDLINGER, K.; BERNSTEIN, B. E.; JAENISCH, R. In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. **Nature**, v. 448, p. 318-324, 2007.

WU, Z.; IRIZARRY, R. 2005. Description of gcrma. **Bioconductor Vignettes**.

YAN, X.; QIN, H.; QU, C.; TUAN, R. S.; SHI, S.; HUANG, G. T. iPS cells reprogrammed from human mesenchymal-like stem/progenitor cells of dental tissue origin. **Stem Cells Dev**, v. 19, n. 4, p. 469-480, 2010.

YOSHIDA, Y.; TAKAHASHI, K.; OKITA, K.; ICHISAKA, T.; YAMANAKA, S. Hypoxia enhances the generation of induced pluripotent stem cells. **Cell Stem Cell**, v. 5, n. 3, p. 237-241, 2009

ZHANG, H.; BOSCH-MARCE, M.; SHIMODA, L. A.; TAN, Y. S.; BAEK, J. H.; WESLEY, J. B.; GONZALEZ, F. J.; SEMENZA, G. L. Mitochondrial autophagy is an HIF-1-dependent adaptive metabolic response to hypoxia. **J Biol Chem**, v. 283, n. 16, p. 0892-10903, 2008

ZHANG, Y.; QI, H.; TAYLOR, R.; XU, W.; LIU, L. F.; JIN, S. V. The role of autophagy in mitochondria maintenance: characterization of mitochondrial functions in autophagy-deficient *S. cerevisiae* strains. **Autophagy**, v. 3, n. 4, p. 337-346, 2007

ZHANG, Y.; SZUSTAKOWSKI, J.; SCHINKE, M. Bioinformatics analysis of microarray data, **Cardiovascular Genomics**: Springer. p 259-284, 2009.