

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz



INSTITUTO CARLOS CHAGAS

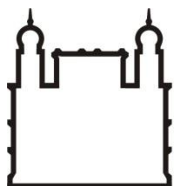
Doutorado em Biociências e Biotecnologia

**ESTUDO DA FUNÇÃO DOS GRÂNULOS QUE CONTÊM TIA E DOS
PROCESSING BODIES EM CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS HUMANAS.**

AXEL HELMUT RULF COFRÉ

CURITIBA – PARANÁ

2015



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz



INSTITUTO CARLOS CHAGAS

Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia

AXEL HELMUT RULF COFRÉ

ESTUDO DA FUNÇÃO DOS GRÂNULOS QUE CONTÊM TIA E DOS
PROCESSING BODIES EM CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS HUMANAS.

Tese de doutorado apresentada ao programa de pós-graduação do Instituto Carlos Chagas como pré-requisito para obtenção do título de Doutor em Biociências.

Orientadores: Dr. Alejandro Correa Dominguez

Dr. Bruno Dallagiovanna Muñiz

CURITIBA – PARANÁ

2015

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

C675 Cofré, Axel Helmut Rulf

Estudo da função dos grânulos que contêm TIA e dos *processing bodies* em células-tronco mesenquimais humanas / Axel Helmut Rulf Cofré. – Curitiba, 2015.

xvii, 147 f. : il. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Instituto Carlos Chagas, Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia, 2015.

Bibliografia: f. 103-113

1. *Processing bodies*. 2. Grânulos de estresse. 3. *Adipose derived stem cells*. 4. Diferenciação celular. I. Título.

CDD 616.02774

Ao meu avô “Lalo” (*In memoriam*) que sempre foi minha inspiração.

A minhas sobrinhas Manuela e Isabela

"Para fazer bem as coisas é necessário: primeiro, o amor, segundo, a técnica."

Antoni Gaudi (1852-1926)

AGRADECIMENTOS

Ao meu querido orientador Dr. Alejandro Correa Dominguez, por todos os incentivos e por toda a paciência no processo de construção desta tese de doutorado. Por todos os votos de confiança depositados que me fizeram crescer como pessoa e, principalmente, como cientista. Foi uma honra ter sido seu aluno e sou grato por todo o conhecimento adquirido.

Ao Dr. Bruno Dallagiovanna Muñiz, pelas perguntas capciosas que nos faz pensar se estamos realmente entendendo o nosso trabalho e nos ajuda a direcionar os próximos passos. Pelas ótimas conversas dentro e fora do laboratório. Agradeço a oportunidade que me deu em fazer parte do seu grupo de pesquisa e seu seletivo grupo de discussão de artigos.

A todos os colegas do laboratório: Anny, Alessandra, Ana Paula, Andressa, Addeli, Thamile, Crisciele, Beth, Natássia, Maria e, principalmente, ao Dr. Marco pela ótima amizade e à Patrícia pelas discussões científicas. Aos colegas Jaiesa, Giullia e Aline que já não mais fazem parte do laboratório, mas de alguma forma contribuíram com minha formação. Pela ajuda na realização de experimentos agradeço a Patricia, Marco e Crisciele que colaboraram com os ensaios de imunofluorescência e FISH.

A todos os pesquisadores do Instituto Carlos Chagas pelas contribuições em jornadas científicas.

A toda equipe de preparo de material do Instituto Carlos Chagas que prestam um serviço essencial para o desenvolvimento da ciência.

As plataformas de proteômica e microscopia pelo suporte no desenvolvimento desta tese.

A toda a equipe do programa de pós-graduação do ICC.

Às grandes amigas que fiz durante esses anos no Instituto e pretendo levar para a vida: Bruna, Carol, Sheila, Daisy, Mari Serpeloni, Mari Ferrarini e Saloe.

A toda equipe do laboratório de células-tronco da PUCPR não só pelas células cedidas para a realização deste trabalho, mas também pelos ótimos encontros científicos.

Aproveito o espaço para agradecer também aos órgãos de fomento que financiaram esta tese: Fundação Araucária, CNPq, CAPES, Ciência sem Fronteiras, FIOCRUZ e pelo espaço e oportunidades ao Instituto Carlos Chagas.

Ao Dr. Roy Parker, por ter me aceitado em seu laboratório para o doutorado sanduíche e todo o pessoal do laboratório: Sid, Saumya, Carolyn, Ross, Bri, Denise, David, Nick, Yuriko e Jenn. À Sarah pelas ótimas sobremesas. À Anne Webb por todo o apoio, não só quando cheguei, mas durante todo o período que estive lá. À grande amizade que construí com o Robert e por ter feito me sentir parte de sua família. Aos

amigos brasileiros Rodrigo Braz, Robinson, Fernanda e a linda pequena Akemi que conheci nos EUA e compartilhamos ótimos momentos.

Aos *Core facilities* de microscopia e cultura de células da Universidade do Colorado.

Aos meus grandes amigos Emanuel e Guilherme, obrigado pela amizade sincera e pelos momentos de boas cervejas, risadas e jogos.

À minha família que sempre me apoiou e me deu todo o amor. À minha irmã Inge, pelo apoio e carinho. A minha mãe Teresa, pelo amor incondicional e por ter me apoiado e incentivado desde o dia em que eu decidi estudar biologia. Ao meu pai Eduardo, por ter me ensinado e incentivado o meu lado criativo e a paixão por trabalhos manuais. Aos meus tios Lely e Vladimir e meus primos Igui, Gabi e Paula. À Gi e meus “irmãos” Matheus e Maressa por todo o carinho que sempre tiveram por mim e pelos ótimos momentos juntos. Ao meu irmão Hans, cunhada Marcia e as incríveis Manu e Isabela por todos os abraços, beijos e brincadeiras.

Às muitas amizades que construí durante todos esses anos, as novas e as velhas amizades. Sem amigos não somos nada então meu muito obrigado a todos que fazem parte da minha vida e são tão importante quando os que aqui estão citados.

O meu especial agradecimento a minha namorada Ana Luiza que durante esses anos de companheirismo e cumplicidade esteve do meu lado sempre, me apoiando e ajudando em todas as decisões. Pelos ótimos momentos de conversa e principalmente pelas risadas compartilhadas. Pelas incríveis viagens que realizamos e por todo amor. Muito obrigado, você faz parte da minha história. Também não poderia deixar de fora meus adoráveis sogros, Lisia e Antonio, pelos conselhos e acolhimento e carinho.

RESUMO

Messenger ribonucleoprotein particles (mRNPs) são complexos formados por RNA mensageiro (mRNA) e um *pool* de diferentes proteínas que se ligam diretamente ou indiretamente ao mRNA. Proteínas diferentes podem formar diferentes mRNPs com diferentes funções. Agregação de mRNPs formam grânulos que são visíveis ao microscópio. Dois desses grânulos comumente encontrados em células eucarióticas são os *processing bodies* (PB) e os grânulos de estresse (GE) possuem função fundamental na regulação pós-transcricional, mais especificamente, na degradação (PB) e na estocagem (PB e GE) do mRNA. Enquanto os PB são constitutivamente encontrados, GE são vistos somente em condições de estresse. TTP e RCK são componentes presentes em ambos os grânulos enquanto que TIA1 e TIAR são exclusivos de GE e DCP2 exclusivo de PB. *Human Adipocyte Derived Stem Cells* (ADSCs) são células-tronco adultas multipotentes com capacidade de autorrenovação e diferenciação em células de diversos tecidos. Desde que pouco se sabe sobre a função dos PB e dos GE durante a diferenciação das células-tronco, nosso objetivo é elucidar a dinâmica e função desses grânulos nestas células.

Foram utilizadas ADSCs derivadas de cirurgia bariátrica e lipoaspiração. Diversos componentes de PB e de GE foram analisados por Imunofluorescência após 1, 4, 7 e 12 dias de diferenciação adipogênica. Oligos de RNA de interferência (siRNA) específicos para RCK, DCP2, TTP, TIAR e TIA1 foram transfectados concomitantemente com a indução à diferenciação adipogênica e as culturas mantidas por 1, 4, 7 e 14 dias de diferenciação. A diferenciação foi mensurada por intensidade de fluorescência após marcação com AdipoRed.

GE são ausentes em ADSCs indiferenciadas e durante a diferenciação como determinado por imunomarcagem com TIAR que se localiza predominantemente no núcleo. Interessantemente imunomarcagem com TIA1/R mostrou que ADSCs possuem grande quantidade de grânulos contendo TIA1/R em células indiferenciadas e não estressadas. Sob estresse oxidativo há um aumento de PB em ADSCs e a formação de GE. Esses grânulos parecem variar de composição, uma vez que eIF4E é ausente e GE imunomarcados com eIF4B são mais perinucleares do que GE imunomarcados com TIAR. PB variam em número e tamanho em células diferenciadas. Notavelmente, em ADSCs possuem poucos PB e até mesmo ausente em algumas células, além disso, TIA1/R e PB significativamente aumentam após 24 horas de diferenciação e após 12 dias o número de PB é similar a células diferenciadas enquanto que os grânulos de TIA1/R praticamente desaparecem. siRNA de componentes essenciais de PB e GE em ADSCs indiferenciadas (tempo 0) mostrou que há um aumento significativo na diferenciação em adipócito após 4, 7 e 12 dias de diferenciação adipogênica. Interessantemente esse aumento se deu pela maturação do adipócito, *i.e.* tamanho da vesícula de lipídio e não pelo aumento da quantidade de células diferenciadas. Nossos dados mostram que PB estão em baixo número e que existem grânulos de TIA1/R citoplasmático nunca antes mostrados em ADSCs indiferenciadas. Ainda, esses grânulos aumentam durante a diferenciação e parecem exercer um papel importante na maturação dos adipócitos uma vez que ensaios de siRNA de componentes de PB e GE levam a uma diferenciação mais acelerada. Também, os GE são formados após indução a estresse oxidativo e esses grânulos são praticamente ausentes de eIF4E mostrando que a composição desses grânulos varia em relação a células diferenciadas.

Palavras chave: *Processing bodies*; grânulos de estresse; *Adipose Derived Stem Cells*; diferenciação celular.

ABSTRACT

Messenger ribonucleoprotein particles (mRNPs) are complexes formed by messenger RNAs (mRNAs) and a pool of different proteins bound directly or indirectly to the mRNA. Different proteins might form different mRNPs with different functions. Aggregations of mRNPs form granules that are visible to the microscope. Two types of granules commonly found in eukaryotic cells are the Processing Bodies (PB) and the Stress Granules (SG). They have essential roles on posttranscriptional regulation, more specifically on degradation (PB) and storage (PB and SG) of the mRNA. While PB are constitutively observed, SG are seen only during stress conditions. TTP and RCK are a component present in both granules. TIA1 and TIAR are exclusively SG. Human Adipocyte Derived Stem Cells (ADSCs) are adult multipotent stem cells with the capability of self-renewal and differentiation in several tissue cell types. Since cell differentiation induction is stressful for the cell and little is known about the role of those granules during stem cells proliferation and differentiation, our goal is to elucidate the dynamic and function of those granules in stem cells.

ADSCs were used. Multiple PB and SG protein components were analyzed by immunofluorescence after 1, 4, 7 and 12 days of adipogenic differentiation. Specific siRNA oligos for RCK, DCP2, TTP, TIAR and TIA1 were transfected and immediately induced to adipogenic differentiation for 24 hours, 4, 7 and 14 days of differentiation with specific adipogenic media. Differentiation was measured by fluorescence intensity after staining with AdipoRed.

SGs were absent in undifferentiated or differentiated ADSCs as determined by TIAR immunolabeling which localized mainly in the nucleus. Interestingly TIA1/R immunolabeling showed that ADSC have abundant TIA1/R granules on undifferentiated and unstressed cells. Under oxidative stress ADSC have an increase of PB and the formation of SGs. These SG may vary in composition since eIF4E is absent and eIF4B immunolabeled SGs are more perinuclear than TIAR immunolabeled SGs. PB varied in number and size on differentiated cells. Remarkably, in ADSC there is a very low number of PB and is even absent in some cells although, TIA1/R and PB significantly increases after 24 hour of differentiation and after 12 days the number of PB are similar to differentiated cells while TIA1/R almost disappears. siRNA of PB and SG essential components in undifferentiated ADSCs (time 0) showed that there is a significant increase of adipocyte differentiation after 4, 7 and 14 days of adipogenesis induction. Interestingly, this increase was due to adipocyte maturation, *i.e.* size of lipid vesicles, and not to the number of differentiated cells. Our data show that PB are in low number and, was never shown before that ADSCs have TIA1/R cytoplasmic granules in undifferentiated cells. There is an increase of PB and TIA1/R granules during differentiation and those granules seems to be important for late adipocyte maturation once siRNA of PB and SG components drives to an early differentiation. Also, SG are formed after oxidative stress induction and those granules are almost deprived of eIF4E showing that the composition of those granules may vary when comparing to differentiated cells.

Key Words: Processing bodies; stress granules; Adipose Derived Stem Cells; cell differentiation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1.	Estrutura do RNA mensageiro.....	20
Figura 1.2.	Formação do complexo de início de tradução.....	22
Figura 1.3.	<i>Internal Ribosomal Entry Sites</i> (IRES).....	23
Figura 1.4.	Via de degradação por miRNA.....	26
Figura 1.5.	Formação dos <i>Processing Bodies</i> (PB).....	27
Figura 1.6.	Formação do grânulo de estresse.....	30
Figura 1.7.	Ciclo do mRNA: da tradução ao PB e GE.....	31
Figura 1.8.	Características das células-tronco.	34
Figura 1.9.	Cascata de sinalização em células-tronco pluripotentes.....	36
Figura 1.10.	Esquema de diferenciação adipogênica.....	42
Figura 3.1.	Linha do tempo da diferenciação adipogênica.....	48
Figura 3.2 .	Mapa dos plasmídeos utilizados.....	52
Figura 4.1.	Distribuição de PB e proteínas de GE em células HeLa não estressadas.....	58
Figura 4.2.	Distribuição de PB e proteínas de GE em ADSCs-Lipo não estressadas.....	61
Figura 4.3.	.. Distribuição de TIA1/R e PB em ADSCs-Bariátrica não estressadas.....	65
Figura 4.4.	.. Distribuição de TIA1/R e PB em fibroblastos não estressados.....	66
Figura 4.5.	.. Distribuição de TIA1/R e PB em CTM-MO.....	66
Figura 4.6.	Distribuição de GE e PB em HeLa submetidas a estresse oxidativo.....	68
Figura 4.7.	.. Distribuição de GE e PB em ADSCs-Lipo submetidas a estresse oxidativo.....	70
Figura 4.8.	Distribuição de GE e PB em ADSC-Bariátrica durante estresse oxidativo.....	71

Figura 4.9.	Quantidade de PB por células em ADSC-Lipo, ADSC-Bariátrica e HeLa após indução ao estresse.....	72
Figura 4.10.	Distribuição de GE e PB em fibroblasto submetido a estresse oxidativo.....	72
Figura 4.11.	Grânulos de TIA1/R estão contidos em vesículas em ADSC-Lipo.....	73
Figura 4.12.	Grânulos de estresse possuem mRNA em HeLa.....	74
Figura 4.13.	Grânulos de TIA1/R possuem mRNA em ADSC-Bariátrica..	74
Figura 4.14.	ADSC-Lipo possuem grânulos de mRNA.....	75
Figura 4.15.	Grânulos de TIA1/R são dependentes de mRNA.....	75
Figura 4.16.	Grânulos de TIA são visíveis somente com anti-TIA1/R.....	76
Figura 4.17.	Transfecção de plasmídeos em ADSCs.....	77
Figura 4.18.	Expressão da proteína TIA1 recombinante em HeLa.....	78
Figura 4.19.	Anti-TIA1/R reconhece a proteína recombinante TIA1.....	79
Figura 4.20.	Quantificação de PB e grânulos de TIA1/R em ADSCs após 24 horas de diferenciação adipogênica.....	81
Figura 4.21.	A quantidade de grânulos de TIA1/R diminui e o número de PB aumenta ao longo da diferenciação.....	82
Figura 4.22.	Diferenciação adipogênica após tratamento com cicloheximida diminui acúmulo de lipídios.....	83
Figura 4.23.	Silenciamento de TIA e componentes de PB em ADSCs.....	85
Figura 4.24.	Silenciamento de RCK em ADSCs.....	86
Figura 4.25.	Silenciamento de TIAR em ADSCs.....	87
Figura 4.26.	Silenciamento de TIAR e RCK em ADSCs e diferenciação adipogênica.....	88
Figura 4.27.	Grânulos de TIA e PB estão envolvidos na diferenciação adipogênica.....	89
Figura 4.28.	A desmontagem de grânulos citoplasmáticos não é suficiente para induzir a diferenciação adipogênica sem adição dos fatores de diferenciação.....	90

Figura 4.29. O silenciamento em pré-adipócitos não foi suficiente para induzir as células à diferenciação adipogênica.....	91
Figura 5.1. Modelo do papel dos grânulos citoplásmicos em células-tronco estromais.....	103

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1.	Componentes de PB e GE.....	32
Tabela 1.2.	Fatores de indução a diferenciação celular <i>in vitro</i>	41
Tabela 3.1.	Informações ADSCs-Lipo.....	46
Tabela 3.2.	Anticorpos primários e secundários utilizados para IF e WB.....	50
Tabela 3.3.	Sequência dos alvos dos oligos de siRNA.....	55

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	Porcentagem
ADSC	Células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo
ATCC	Coleção Americana de Culturas e Depósitos (Do inglês, American Type Culture Collection)
AUG	códon de iniciação
oC	Grau Celsius
cap	Resíduo G metilado (7-metil G) na extremidade 5' do mRNA
CFP	Do inglês, cyan fluorescent protein
cm	Centímetro
CTM-MO	células-tronco mesenquimais derivadas de medula óssea
DCP1	Do inglês, mRNA-decapping enzyme 1
DCP2	Do inglês, mRNA-decapping enzyme 2
DMSO	Do inglês Dimethyl sulfoxide
DNA	Ácido Desoxirribonucleico (do inglês Deoxyribonucleic Acid)
dNTP	Desoxinucleotídeos trifosfatados
EDC3	Do inglês, Enhancer of mRNA-decapping protein 3
EDTA	Etileno-diamino tetra acetato de sódio
eIF	Fatores eucarióticos de início de tradução (Do inglês, eukariotic initiation factors)
EMCV	vírus da encefalomiocardite
et al	e colaboradores
FGF2	fator de crescimento de fibroblasto 2
FISH	Fluorescence in situ hybridization
FXR1	Do inglês, Fragile X mental retardation related-1
g	Grama
GCN2	Do inglês, general control nonderepressible 2 protein kinase
GDP	guanosina difosfato
GFP	Do inglês, Green Fluorescent Protein
GE	Grânulos de Estresse
GTP	guanosina trifosfato
HCV	Vírus da Hepatite C
HRI	Do inglês, heme-regulated inhibitor kinase
IF	Imunofluorescência
IgG	Imunoglobulina G
IPTG	Do inglês, isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside
IRES	Do inglês, Internal Ribosome Entry Sites
kDa	Do inglês, Kilodalton
L	Litro
LB	Meio Luria-Bertani
μ	Micro (x10 ⁻⁶)
μg	micrograma
μL	microlitro
μm	micrômetro
miRNAs	microRNAs
mg	miligrama
mL	mililitro
mM	milimolar

Met-tRNA ^{met}	tRNA da metionina
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
mRNP	Do inglês, Messenger Ribonucleic Acid-Protein complexes
N	Concentração normal ou normalidade
n	Nano (x10 ⁻⁹)
NaCl	Cloreto de sódio
ng	Nanograma
nm	nanômetros
nt	Nucleotídeo
ORF	Fase de leitura aberta (do inglês, Open Reading Frame)
PABP	Do inglês, Poli A binding protein
PBP2	Do inglês, Penicillin-Binding Protein 2
PB	Do inglês, Processing Bodies ou P Bodies
PBS	Tampão fosfato-salino (do inglês, Phosphate Buffered Saline solution)
PCR	Reação em cadeia da polimerase (do inglês, Polimerase Chain Reaction)
PERK	Do inglês, protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase
PFA	Paraformaldeído
pH	Potencial de hidrogênio
PKR	Do inglês, Protein Kinase C
PM	Peso molecular
Poli-A	Estrutura poliadenilada da extremidade 3' do mRNA
PRD	Do inglês, Prion Related Domain
PUC/PR	Pontifícia Universidade Católica do Paraná
q.s.p.	Quantidade suficiente para preencher
RBP	Proteínas ligadoras ao RNA (Do inglês, RNA-Binding Protein)
RISC	Do inglês, RNA-induced silencing complex
RFU	Do inglês, Relative Fluorescence Unit
RNA	Ácido ribonucleico
RNApol II	RNA Polimerase II
RNase	Ribonuclease
rpm	Rotação por minuto
RPS6	proteína ribossomal subunidade menor 6
RPS7	proteína ribossomal subunidade maior 7
RRM	Do inglês, RNA Recognition Motif
SDS	Dodecil sulfato de sódio (do inglês, Sodium Dodecil Sulfate)
SFB	Soro fetal bovino
siRNA	Do inglês, small interference RNA
snRNPs	Do inglês, small nuclear ribonucleoproteins
TA	Temperatura ambiente
TAE	Tampão tris-acetato-EDTA
TBS	Tris-Buffered Saline
TBS-T	TBS/0,05% Tween 20
TIA1	Proteína de antígeno intracelular de células T (Do inglês, T-cell Intracellular Antigen-1)
TIAR	Proteínas relacionadas à TIA-1 (Do inglês, TIA1-related proteins)

TE	Tampão Tris-EDTA
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
tRNA	RNA transportador
UTR	Região não traduzida (do inglês, Untranslated Region)
V	Volts
X-Gal	Do inglês, 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galacto-pyranoside
XRN1	exonuclease 5' 3'
YFP	Do inglês, yellow fluorescent protein

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	xii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xiii
1. INTRODUÇÃO	19
1.1 O RNA mensageiro no citoplasma: Início da tradução e grânulos de regulação pós-transcricional.....	19
1.1.1. Início da tradução.....	21
1.1.2 O ciclo do RNA mensageiro: Papel dos <i>Processing Bodies</i> e dos Grânulos de Estresse.....	23
1.2 Células-tronco.....	32
1.2.1 Breve Histórico das células-tronco.....	33
1.2.2 As Células-tronco pluripotentes.....	35
1.2.3 As células-tronco multipotentes.....	38
2. OBJETIVOS	44
2.1. Objetivos gerais.....	44
2.2. Objetivos específicos.....	44
3. MATERIAL E MÉTODOS	45
3.1 Cultura celular.....	45
3.2 Diferenciação adipogênica.....	47
3.3 Análise de proteínas por Western Blot.....	48
3.4 Estresse celular, tratamento com cicloheximida e RNase.....	49
3.5 Imunofluorescência.....	49
3.6 Fluorescence in situ hybridization (FISH).....	51
3.7 Microscopia e processamento de imagem.....	51
3.8 Contagem dos grânulos.....	51
3.9 Construção de plasmídeos.....	52
3.10 Transfecções de plasmídeos.....	53
3.11 Silenciamento gênico por pequenos RNAs de interferência (siRNA).....	54
3.12 siRNA e diferenciação adipogênica.....	55
3.13 Quantificação de diferenciação adipogênica.....	55
4. RESULTADOS	57

4.1 Em ADSCs proteínas de grânulos de estresse compõem grânulos citoplasmáticos em condições normais de cultura e possuem baixa quantidade de PB	57
4.2. Fibroblastos não possuem grânulos de TIA/R em células não estressadas ...	65
4.3 Células-tronco mesenquimais humanas derivadas de MO (CTM-MO) também possuem grânulos citoplasmáticos de TIA1/R em condições normais.....	66
4.4 Grânulos de estresse são formados em ADSCs-Lipo mas não em ADSCs-Bariátrica durante o estresse oxidativo	67
4.5 Alguns grânulos de TIA1/R estão contidos em vesículas	72
4.6 Grânulos de TIA1/R em ADSCs possuem mRNA.....	73
4.7 Grânulos de TIA são visíveis com anti-TIA1/R, mas não com anti-TIAR e anti-TIA1	76
4.8 É possível obter alta eficiência de transfecção em ADSCs somente com nucleotransfecção e não com lipídios catiônicos	77
4.9 Anti-TIA1/R reconhece, pelo menos, TIA1.....	78
4.10 Os PB e grânulos de TIA1/R em ADSC estão relacionados ao potencial de diferenciação.....	80
4.11 A quantidade de PB aumentam em ADSC durante as primeiras horas de diferenciação.....	80
4.12 Tratamento com cicloheximida diminui significativamente a diferenciação de ADSC em adipócitos	82
4.13 Silenciamento de alvos específicos de grânulos de TIA1/R e PB resulta em diferenciação prematura em adipócitos	84
4.13.1 siRNA em ADSCs diminui a quantidade de grânulos citoplasmáticos	84
4.13.2 O silenciamento de componentes de PB e de GE aumenta o acúmulo de lipídios em ADSC durante a diferenciação adipogênica	87
4.13.3 Somente a desmontagem dos grânulos não é suficiente para induzir a diferenciação adipogênica em ADSC	89
4.13.4 O silenciamento em pré-adipócitos não é capaz de induzir as células à diferenciação adipogênica.	90
5. DISCUSSÃO	92
6. CONCLUSÕES	104
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	105
ANEXOS.	116

1. INTRODUÇÃO

1.1 O RNA mensageiro no citoplasma: Início da tradução e grânulos de regulação pós-transcricional

Durante toda a “vida” de um RNA mensageiro (mRNA) diversos fatores (proteínas e RNAs) se ligam a este, formando complexos denominados *messenger ribonucleoprotein particles* (mRNPs). A formação dos mRNPs se inicia no núcleo e o destino do mRNA depende da combinação desses fatores. Por exemplo, uma vez no citoplasma, o mRNA pode se localizar em regiões específicas da célula e essa localização depende das proteínas que compõem os mRNPs. Em um trabalho realizado com embriões de *Drosophila* foram analisados 3.370 mRNAs e foi observado que 71% destes têm localização predeterminada (LÉCUYER et al., 2007). Como exemplo de mRNPs, temos o complexo necessário para dar início à tradução, formado pela ligação de *Poly(A)-Binding Protein* (PABP) à eIF4G, ambas unidas ao mRNA, sendo essencial para que o processo de tradução seja completo (TARUN et al., 1997).

Durante o estresse celular, a proteína TIA1 em combinação com outras proteínas, forma mRNPs de estocagem do mRNA que podem interagir com grânulos de degradação de mRNA (KEDERSHA; ANDERSON, 2007). Diversos são os destinos que um mRNA pode ter dependendo das proteínas a ele associadas. Para o entendimento de como ocorre a formação desses complexos é necessário o conhecimento da estrutura básica de um mRNA, bem como a maneira pelo qual as proteínas podem interagir com o RNA e também com outras proteínas por meio de domínios específicos.

O RNA mensageiro compõem aproximadamente 5% de todo o RNA de uma célula eucariótica. Durante o início da sua síntese, pela RNA Polimerase II (Pol II) no núcleo, é adicionado a 7-guanidina trifosfato denominado como *cap* na região 5´ do mRNA (SHATKIN, 1976). Logo, o mRNA é processado e há a remoção dos íntrons por *splicing*, seguido da clivagem e adição de uma cauda poliadenilada (PoliA) na região 3´ do mRNA, onde são adicionadas em torno de 150 adeninas. No citoplasma, a estrutura do mRNA maduro é dada pela presença do *cap* na região 5´, duas regiões não traduzida UTR (*untranslated region*), uma região codificante ORF (*open reading frame*) e a cauda PoliA na região 3´ (figura 1.1). Essa estrutura funciona como a “identidade” do mRNA.

De modo geral, o *cap* e a cauda PoliA conferem proteção contra a ação das ribonucleases; já as UTRs conferem sítios de ligação e formação de mRNPs (BENTLEY, 2014), sendo caracterizadas como as regiões do mRNA que mais sofrem ação de proteínas reguladoras. São às regiões UTRs onde as proteínas de início de tradução, transporte, degradação e outras se ligam para determinar o destino do mRNA (MIGNONE et al., 2002). O tamanho das regiões UTRs pode variar de algumas dezenas até várias centenas de nucleotídeos e essa regulação depende não só do tamanho da UTR, mas também da sua estrutura e sequência (GU et al., 2014; LEDDA et al., 2005).

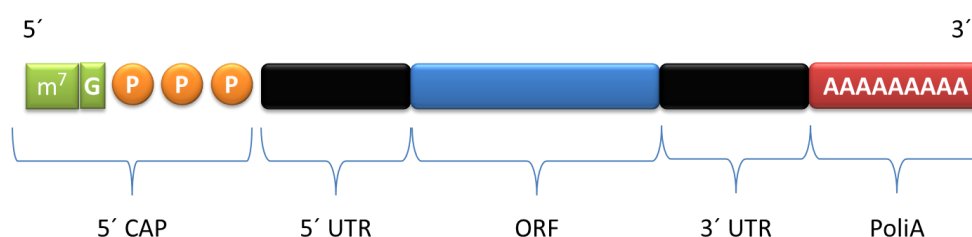


Figura 1.1: Estrutura do RNA mensageiro.

Fonte: Do autor

Legenda: No citoplasma, a estrutura do RNA mensageiro é composta por um *cap* na região 5', duas regiões UTRs: uma na região 5' e outra na 3', uma região de tradução ORF e a cauda PoliA na região 3'.

As proteínas ligadoras ao RNA ou as *RNA-Binding proteins* (RBPs) são proteínas que possuem em sua composição regiões de reconhecimento de RNA. Centenas de RBPs estão presentes na célula e a afinidade das RBPs por RNAs pode ser promíscua ou altamente específica. Por exemplo, PABP se liga a mais de mil mRNAs diferentes, enquanto que Penicillin-Binding Protein 2 (PBP2) se liga apenas a aproximadamente dez mRNAs. Algumas RBPs, como ACO1, tem grande preferência por mRNAs mitocondriais, estando relacionado a uma mesma via metabólica (HOGAN et al., 2008).

Existem diversos domínios em uma RBP que reconhecem RNA. O *RNA recognition motif* (RRM) é um dos mais abundantes e é uma região da proteína que reconhece e se liga a uma grande variedade de RNAs, com alta afinidade. Já foram identificadas mais de 3.500 proteínas com RRM e, em média, 44% das RBP possuem de dois a seis RRM, e estão presentes em todos os processos pós-transcricionais. Mais de 30 estruturas de RRM já foram identificadas e são formadas, geralmente, por regiões hidrofóbicas com estrutura de quatro folhas β antiparalelas e duas α hélices, contendo por volta de 90 aminoácidos que reconhecem quatro nucleotídeos. Além de RNAs, as RRM também podem reconhecer DNA e, até mesmo, intermediar

a interação com outras proteínas (revisado por (KENAN; QUERY; KEENE, 1991; MARIS; DOMINGUEZ; ALLAIN, 2005). Por exemplo, PABP tem afinidade pela região poliadenilada de todos os mRNAs e essa proteína possui quatro RRM's em sua porção N-terminal que reconhecem tanto o mRNA, como eIF4G (DEO et al., 1999; KÜHN; PIELER, 1996).

1.1.1. Início da tradução

O início da tradução é dado pela triagem do mRNA pelo ribossomo até o códon de iniciação (AUG), formando o ribossomo 80S seguido da síntese da proteína. Em eucariotos, essa triagem pode acontecer dependente ou independente de *cap*.

A via canônica da tradução é aquela dependente de *cap* e pode ser dividida em diversos estágios. Os *eukariotic initiation factors* (eIFs) são um grupo de fatores envolvidos no início da tradução. A primeira etapa desse processo é a formação do complexo ribossomal 43S que será responsável pela triagem do mRNA à procura do códon de iniciação AUG, códon de início da síntese da proteína. O tRNA da metionina (Met-tRNA^{met}) é um tRNA específico para o início da tradução e, juntamente com eIF2 e guanosina trifosfato (GTP), formam o complexo ternário. Esse complexo se liga a eIF3, eIF1, eIF1A e à subunidade ribossomal 40S para formar o complexo de pré-início 43S (figura 1.2 – etapa 1) (DEVER, 2002; KOZAK, 1991). O começo da montagem do complexo de iniciação se dá pela formação do complexo eIF4F (figura 1.2 – etapa 2). O eIF4E tem alta afinidade e se liga diretamente ao *cap* do mRNA e, juntamente com eIF4G e eIF4A, formam o complexo eIF4F. O eIF4A no complexo eIF4F é uma RNA helicase que tem como objetivo desfazer estruturas secundárias do mRNA na porção 5' UTR. Para que a sua atividade helicase seja estimulada é necessário o fator eIF4B ou eIF4H, que se liga diretamente a eIF4A (figura 1.2 – etapa 2) (ROGERS et al., 2001). A etapa seguinte é a circularização do mRNA onde eIF4G, presente no complexo eIF4F, interage diretamente com PABP (figura 1.2 – etapa 3) (CRAIG et al., 1998; WAKIYAMA; IMATAKA; SONENBERG, 2000). A PABP também se liga a eIF3 do complexo de pré-início 43S (MARTINEAU et al., 2008). A etapa seguinte é a triagem do mRNA pelo complexo 43S (figura 1.2 – etapa 4). A DHX29 se liga à subunidade ribossomal 40S no complexo 43S dando início a triagem no sentido 5' para 3' até o pareamento do códon com o anticódon na sequência nucleotídica AUG (HASHEM et al., 2013). O eIF1 no complexo 43S desempenha um papel importante no correto reconhecimento de AUG (MARTIN-MARCOS et al., 2013). Uma vez formando o pareamento do códon-anticódon, o complexo é denominado 48S.

Nesse momento, eIF5 e eIF5B hidrolisam GTP por guanosina difosfato (GDP) no fator eIF2 do complexo 48S (figura 1.2 – etapa 4) (PISAREVA; PISAREV, 2014). A última etapa do início da tradução é a formação do ribossomo 80S. O eIF5B auxilia na dissociação de eIF1, eIF1A, eIF3 e eIF2-GDP do ribossomo 40S (PESTOVA et al., 2000; UNBEHAUN et al., 2004) que, ao associar-se ao complexo 60S dissociado de eIF6, provoca a formação do complexo ribossomal 80S, dando-se início à síntese da proteína (figura 1.2 – etapa 5) (CECI et al., 2003).

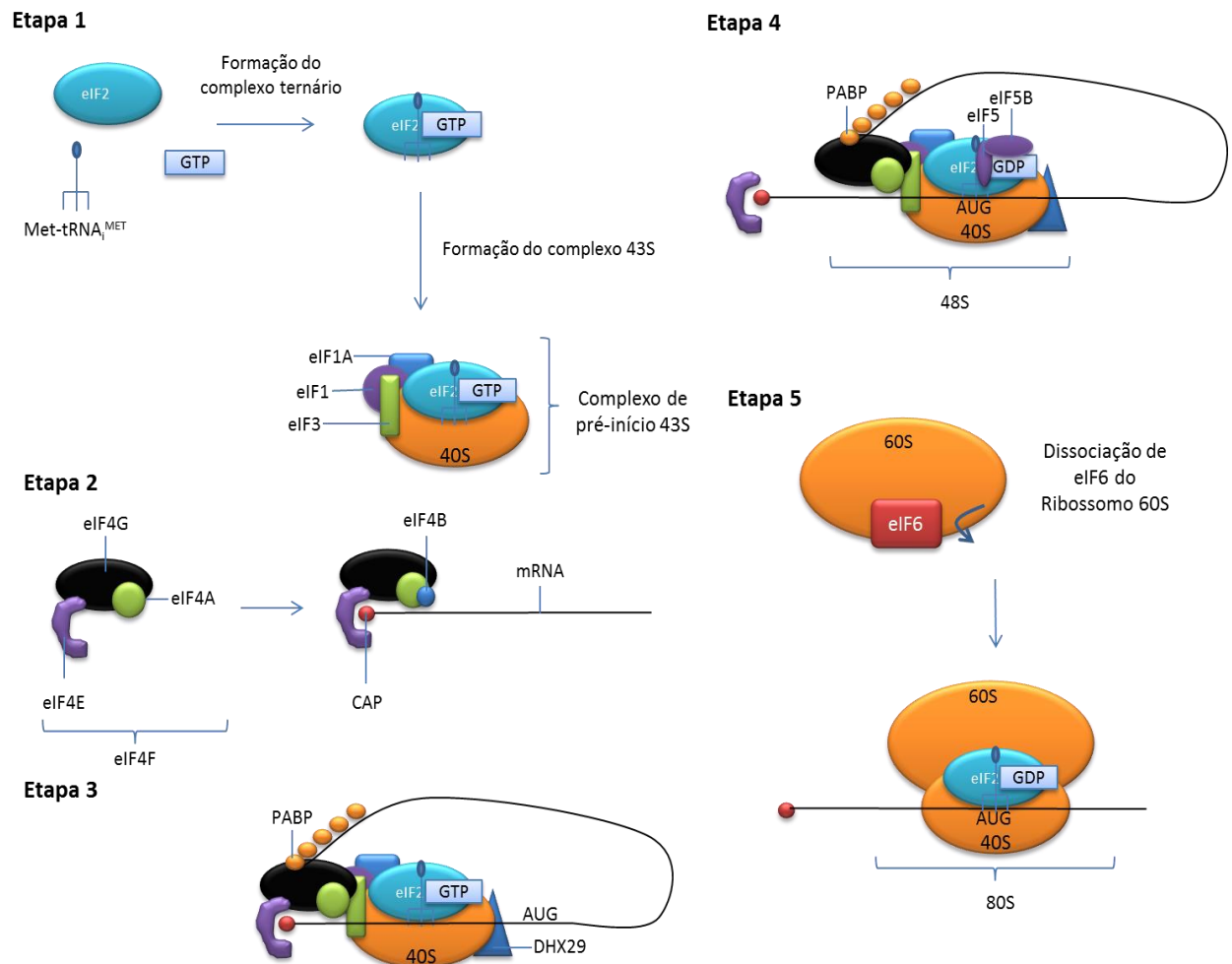


Figura 1.2: Formação do complexo de início de tradução.

Fonte: Do autor.

Legenda: A formação do complexo 43S ocorre pela junção de eIF2, GTP e Met-tRNA_i^{Met} (etapa 1). O início da formação do complexo de tradução se dá pela ligação de eIF4F ao *cap* (etapa 2) juntamente com o complexo 43S (etapa 3). Em seguida, ocorre a triagem do mRNA pelo complexo 43S até a sequência AUG, onde há a junção códon-anticódon formando o complexo 48S (etapa 4). A subunidade 40S com a 60S formam o ribossomo 80S que dá início à síntese proteica (etapa 5).

Em alguns casos, o ribossomo 80S pode ser formado independente do *cap*. O *Internal Ribosome Entry Sites* (IRES) é a via não canônica de início da tradução na qual o complexo 43S interage diretamente com estruturas secundárias no mRNA (figura 1.3) e que foram descritos primeiramente em vírus. O mRNA do Poliovírus não

tem *cap* e possui uma região 5' UTR excepcionalmente longa, rica em estruturas secundárias e com aproximadamente oito AUG “não conservados” a montante (mais próximo à extremidade 5') do códon AUG verdadeiro, que dá início à ORF. Devido a formações secundárias na 5' UTR, o ribossomo tem a capacidade de interagir diretamente com mRNA e iniciar a tradução, sem a necessidade das proteínas ligadoras ao *cap* (PELLETIER; SONENBERG, 1988). Diferentes vírus utilizam proteínas distintas para a tradução por IRES: o mRNA do vírus da hepatite C (HCV), por exemplo, necessita de eIF2 e eIF3 para que o ribossomo consiga se ligar ao mRNA (LUKAVSKY, 2009); já o vírus da encefalomiocardite (EMCV) precisa dos fatores eIF2, eIF3 e IF4G (PESTOVA; SHATSKY; HELLEN, 1996).

Alguns mRNAs da própria célula também podem ser traduzidos por IRES. A tradução de eIF4G durante infecção por Picornavírus é alternada entre tradução dependente de *cap* para IRES (GAN; RHOADS, 1996). Diversos outros mRNAs podem ser traduzidos por IRES, alguns exemplos são o fator de crescimento de fibroblasto 2 (FGF2) (VAGNER et al., 1995), fator de crescimento endotelial vascular (AKIRI et al., 1998), c-Myc (NANBRU et al., 1997) entre vários outros.

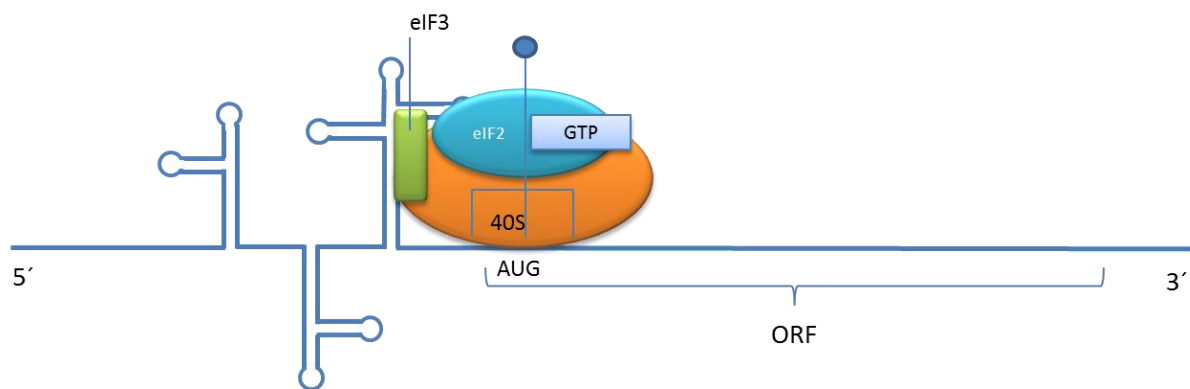


Figura 1.3: *Internal Ribosomal Entry Sites (IRES).*

Fonte: Do autor.

Legenda: Figura representativa do início da tradução por IRES. A triagem de alguns mRNAs pelo ribossomo 40S seguido da montagem do ribossomo 80S pode acontecer independente de *cap*, a partir de IRES. Estruturas secundárias no mRNA podem interagir diretamente com o ribossomo 40S e com alguns fatores de início da tradução próximos ao códon de início AUG.

1.1.2 O ciclo do RNA mensageiro: Papel dos *Processing Bodies* e dos Grânulos de Estresse

A expressão gênica em eucariotos é regulada em vários níveis incluindo a estocagem e degradação de mRNAs. O mRNA que está sendo traduzido pode passar para um estágio de estocagem e/ou degradação dependendo dos mRNPs a ele associados. *Processing bodies* (PB) e grânulos de estresse (GE) são um dos

principais sítios citoplasmáticos de estocagem e degradação do mRNA, em eucariotos.

No início da década de 90, estudos mostraram que o decapeamento (remoção do *cap*) e a desadenilação (remoção da cauda poliA) eram necessários para a degradação do mRNA (BEELMAN; PARKER, 1995). Pouco tempo depois, foi reportado que XRN1, uma exoribonuclease que está no sentido 5' para o 3', encontrava-se em sítios citoplasmáticos e que esses sítios, possivelmente, seriam locais de *turnover* ou degradação/reciclagem do mRNA e de outras moléculas (BASHKIROV et al., 1997). Foi observada, também, a presença de GW182, uma proteína envolvida na maquinaria de degradação do mRNA, em grânulos citoplasmáticos (EYSTATHIOY et al., 2002). Não demorou muito para mostrarem que essas proteínas estão presentes nos mesmos grânulos (EYSTATHIOY et al., 2003) e foram denominados *Processing Bodies* ou *P Bodies* (PB).

Os PB são grânulos resultante de agregação de mRNPs que estão constitutivamente presentes nas células e funcionam como centros de estocagem e de degradação do mRNA. Mais de 30 proteínas fazem parte dos PB e foi reportado que o *cap* dos mRNAs é fundamental para formação destes grânulos. O número e tamanho dos PB são proporcionais à quantidade de mRNAs não traduzidos. Experimentos realizados com leveduras mostraram que células privadas de glicose, o que reduz o número de mRNAs em processo de tradução, ex. em polissomos, apresentam maior número de PB em seu citoplasma. Quando tratadas com ciclohexamida, o que retêm os mRNAs em polissomos, ocorreu diminuição da formação desses grânulos. Isso mostrou que, possivelmente, os mRNAs saem da maquinaria de tradução e vão para os PB (TEIXEIRA et al., 2005). De fato, há uma troca dos mRNAs que estão nos polissomos para os PB e vice-versa (BRENGUES; TEIXEIRA; PARKER, 2005). Os PB não somente contêm mRNA como também são dependentes dele, visto que em leveduras o tratamento com RNase foi capaz de desmontar os PB. Nesses grânulos não há tradução, já que não possuem proteínas ribossomais (TEIXEIRA et al., 2005) e diversos trabalhos demonstraram que, além de processos biológicos da própria célula, os PB possuem importante função no ciclo replicativo de diversos vírus (revisado por: (LLOYD, 2013).

Apesar de a sua composição exata e a ordem com que as proteínas vão se associando para formar os PB são desconhecidas, é possível ressaltar alguns pontos

importantes e bem descritos de um PB, tais como; os componentes fundamentais na degradação do mRNA e a interação proteína-proteína para formar esses grânulos.

A reação de decapeamento é catalisada pela DCP2 com o auxílio do seu ativador DCP1 (DUNCKLEY; PARKER, 1999). Existem duas proteínas DCP1 em humanos: a DCP1a e a DCP1b, que compartilham 70% de homologia na porção N-terminal e 30% na proteína inteira (LYKKE-ANDERSEN, 2002). Tanto DCP1a como DCP1b interagem com DCP2 e participam na formação de PB (FENGER-GRØN et al., 2005). DCP2 possui na sua porção N-terminal uma região de interação com DCP1, além de um domínio MutT/Nudix que tem atividade decapeadora (SHE et al., 2008). Apesar da possibilidade da re-adição de *cap* em mRNAs já decapeados no citoplasma (SCHOENBERG; MAQUAT, 2009), é consenso que, uma vez removido o *cap* de um RNAm no interior de um PB, este mRNA será degradado. Apesar de DCP2 ser fundamental no decapeamento do mRNA, ela não é essencial para a formação do PB. Ensaios de depleção de DCP2 mostraram que, não só os PB continuam se formando sem a presença de DCP2, como também há um aumento no número desses grânulos (ANDREI; INGELFINGER; HEINTZMANN, 2005). O complexo Lsm1-7 envolvido no processo de degradação do mRNA também foi observado colocalizando com DCP2 e XRN1 (INGELFINGER et al., 2002). Apesar de DCP1 ser o ativador direto de DCP2, outras proteínas que fazem parte dos PB, tais como, RCK-p54, TTP e Hedls auxiliam e aumentam a atividade de DCP2 (FENGER-GRØN et al., 2005) indicando que o conjunto de diversas proteínas é necessário para atividade correta dos PB.

No processo de degradação do mRNA, antes da remoção do *cap* pela DCP2, há um encurtamento da cauda poli-A. Esse processo é conhecido como desadenilação que é a maior causa de degradação de mRNAs em eucariotos (CHEN; SHYU, 2011). A desadenilação também é um pré-requisito para a formação dos PB, tendo as desadelinases Pam2 e Pam3 do complexo CCR4/NOT como parte do encurtamento da cauda poli A (ZHENG et al., 2008).

Outro elemento envolvido na degradação do mRNA em PB é a maquinaria de microRNAs (miRNAs). Os miRNAs são pequenos RNAs não codificantes com tamanho entre 17 e 21 nucleotídeos que, ao parearem com o mRNA alvo, tem função de inibir a tradução ou disparar a degradação do mRNA (figura 1.4). Assim como o mRNA, o microRNA também é transcrito pela RNA Pol II e, ainda no núcleo, o pré-miRNA sofre ação da enzima *Drosha*, seguido de exportação para o citoplasma, por

exportina 5. No citoplasma, o miRNA é processado pela *Dicer* em fragmentos de aproximadamente 21 nucleotídeos, associa-se ao complexo *RISC* que proporciona a interação do miRNA com o mRNA alvo (figura 1.4) (revisado por: (HA; KIM, 2014). Proteínas argonautas e GW182 fazem parte do *RISC* que, por sua vez, fazem parte dos PB, atuando na degradação do mRNA nesses grânulos (LIU et al., 2005). Os miRNAs fazem parte dos PB mas não são exclusivos desses grânulos tendo também atividade funcional fora deles.

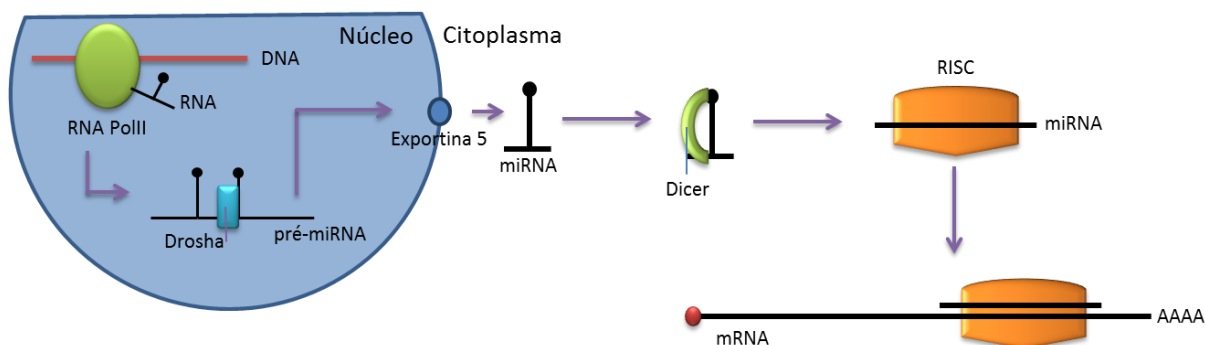


Figura 1.4: Via de degradação por miRNA.

Fonte: Do autor

Legenda: O pré-miRNA é transcrito pela RNA Pol II no núcleo e processado pela *Drosha*. No citoplasma, o miRNA é clivado pela *Dicer* em fragmentos de aproximadamente 21 nucleotídeos. Em seguida, associa-se ao complexo *RISC* e, por último, o miRNA se associa ao mRNA alvo por pareamento de complementaridade, fato que inibe sua tradução ou causa a clivagem do mRNA alvo.

Outro fator importante na formação de um PB é a agregação dos mRNPs em grânulos. No processo de formação dos grânulos são fundamentais as interações proteína-proteína. A proteína *Enhancer of mRNA-decapping protein 3* (EDC3) interage diretamente com DCP2, pelo domínio *Lsm* localizado na região C-terminal, e interage com ela mesma, pelo domínio *Yjef*, localizado em sua porção N-terminal. Dessa forma, EDC3 interage com outra EDC3 formando agregados. Quando a região de interação proteína-proteína de EDC3 é mutada, não há a formação de PB (DECKER; TEIXEIRA; PARKER, 2007). Outras proteínas componentes de PB também podem interagir consigo mesma, como a LSM4 que interage com ela mesma a partir de domínios tipo príon (*prion-like domain*) ou *Q/N-Rich domain* (REIJNS et al., 2008). Domínios tipo príon são regiões da proteína ricas em glutamina e asparagina com aproximadamente 80 aminoácidos, contendo em torno de 30 glutaminas, podendo variar de tamanho e composição. Em *Drosophila melanogaster*, mais de 3% das proteínas contêm domínios tipo príon (MICHELITSCH; WEISSMAN, 2000). Esses domínios estão envolvidos em uma série de processos biológicos como a formação de grânulos de estresse (GILKS et al., 2004), e em uma série de doenças como as neurodegenerativas (GITLER; SHORTER, 2011).

Além das proteínas mencionadas, diversas outras estão envolvidas na composição dos PB como eIF4E, eIF4E-T, TTP, RCK-p54 dentre outras (tabela 1.1). A composição exata dos PB é desconhecida e novas proteínas continuam sendo descritas como componentes desses grânulos.

Baseado nessas informações, a figura 1.5 descreve, resumidamente, o processo de formação de um PB e sua relação com a maquinaria de tradução e degradação do mRNA.

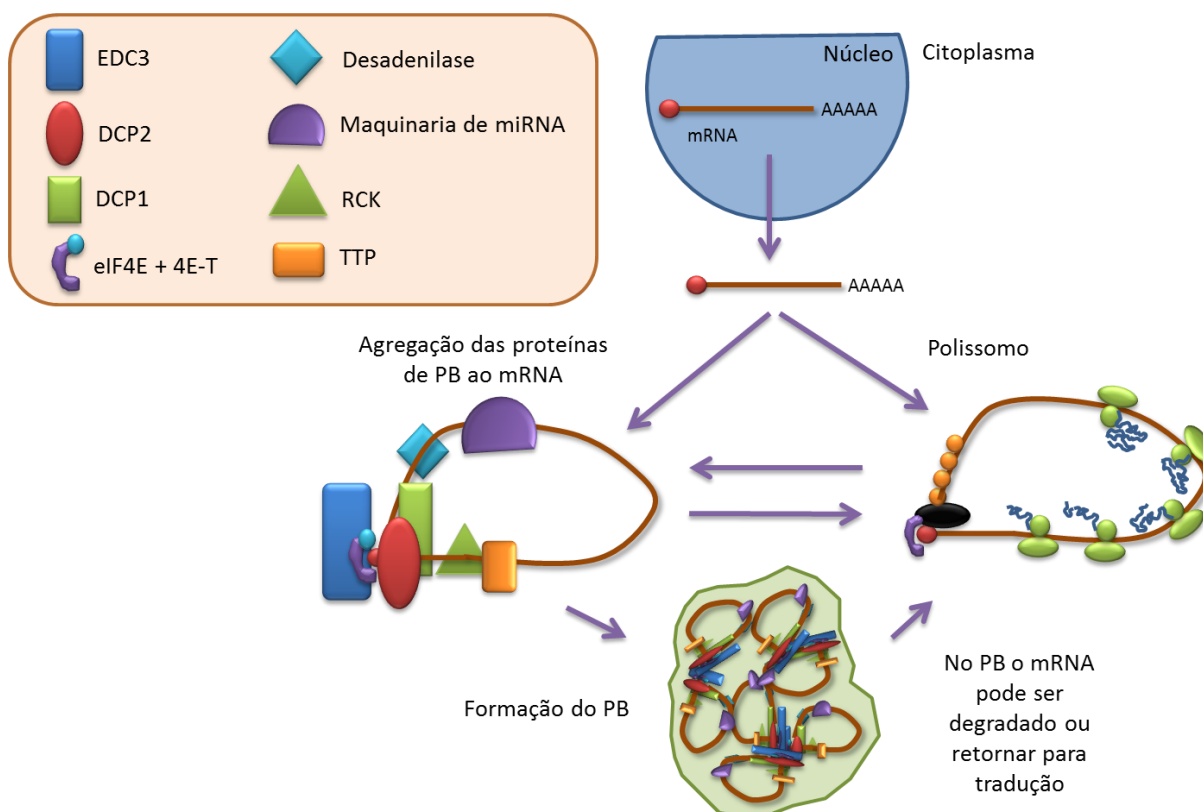


Figura 1.5: Formação dos *Processing Bodies* (PB).

Fonte: Do autor.

Legenda: Os PB são grânulos citoplasmáticos de degradação e estocagem do mRNA que são formados por agregados de proteínas e mRNAs. Proteínas relacionadas com a degradação do mRNA fazem parte da constituição desses grânulos. Como exemplo, estão a maquinaria de miRNA, proteínas decapeadoras como DCP1 e DCP2 e proteínas desadeniladoras. Muitas proteínas possuem domínios tipo príon responsáveis por essa interação proteína-proteína, formando, portanto, o grânulo. Uma vez no citoplasma, o mRNA pode ir para maquinaria de tradução nos polissomos e destes para o PB, ou ir direto para um PB. No PB, o mRNA pode ser degradado ou retornar para o polissomo para ser traduzido. Além das proteínas destacadas no esquema, dezenas de outras proteínas fazem parte desses grânulos.

Os PB além de terem intercâmbio direto com os polissomos, em condições de estresse, esses grânulos podem interagir com outros grânulos citoplasmáticos denominados grânulos de estresse (GE). Os PB não só interagem com GE como também compartilham diversas proteínas (tabela 1.1). A interação entre esses dois grânulos sugere que pode haver troca de mRNAs entre eles e que os mesmos mRNAs

podem estar tanto em PB, como em GE. De fato, foi demonstrado que os mesmos mRNAs podem ser encontrados em ambos os grânulos e que há a troca de mRNA entre eles (KEDERSHA et al., 2005). Outro fato interessante é que a formação de GE é dependente de um PB preexistente, mas os PB não são dependentes de GE (BUCHAN; MUHLRAD; PARKER, 2008). Foi observado em leveduras que, em resposta ao estresse celular, primeiro há um aumento na quantidade de PB e, em seguida, a formação dos GE a partir de PB preexistentes (BUCHAN; YOON; PARKER, 2011). Diferentemente dos PB, os GE estão presentes nas células transitoriamente durante o período de estresse celular, já que, assim que a célula se recupera do estresse, os mRNA nele contidos retornam aos polissomos, ou são enviados para degradação (KEDERSHA; ANDERSON, 2002).

Em contraste aos PB, os GE possuem maquinaria de início de tradução como eIF2 α , eIF4E, eIF4G, eIF3, eIF4A, PABP (BUCHAN; YOON; PARKER, 2011; KEDERSHA et al., 2002, 1999; KIMBALL et al., 2003) e até mesmo a subunidade ribossomal 40S (GROUŠL et al., 2009; KEDERSHA et al., 2002). GE não possuem maquinaria de degradação, dessa forma são grânulos apenas de estocagem de mRNAs (BUCHAN; YOON; PARKER, 2011; KIMBALL et al., 2003). Os GE são também dependentes de mRNA e possuem mRNAs não traduzidos (KEDERSHA et al., 2000). Estímulos como infecção viral, estresse oxidativo, estresse de retículo endoplasmático, privação de nutrientes, choque térmico entre outros, podem levar à formação de GE. Cada um desses estímulos ativam distintas kinases (PKR, PEKR, GCN2, HRI e Z-DNA) que, por sua vez, fosforilam eIF2 α , primeiro passo para a formação do GE (KEDERSHA et al., 2000, 2002; ROJAS; ARIAS; LOPEZ, 2010). Como mencionado anteriormente, eIF2 é pré-requisito para a síntese de proteína ao se ligar à Met-tRNA^{Met} na subunidade ribossomal 40S, para formar o complexo 43S. O eIF2 é formado por três diferentes subunidades (eIF2 α , eIF2 β e eIF2 γ). A subunidade eIF2 α possui uma serina na posição 51 que é passível de fosforilação e, ao ser fosforilado, eIF2 α bloqueia a troca de GDP-GTP e, conseqüentemente, a ligação do tRNA ao eIF2 que, por sua vez, não se liga ao ribossomo 40S, tendo como resultado a não formação do complexo 43S e a inibição da síntese proteica (PAVITT et al., 1998; SOKABE; FRASER, 2014). Apesar de ser consenso que a fosforilação de eIF2 α seja o gatilho para a formação de grânulos de estresse, já foi observado que o estresse com peróxido de hidrogênio pode induzir a formação de GE, de forma independente da fosforilação de eIF2 α (EMARA et al., 2012).

Assim como nos PB, mRNPs se agregam para formar os GE por meio da interação proteína-proteína. Domínios tipo príon já foram identificados em proteínas fundamentais para a montagem de GE, tais como TIA1 (T-cell internal antigen 1) e TIAR (TIA1-related protein). Em condições normais, TIA1 e TIAR são nucleares e participam do *splicing* de mRNAs (GUINER et al., 2001). TIA1 e TIAR possuem mais de 80% de homologia e ambas têm três domínios RRM (RRM1, RRM2 e RRM3), sendo que cada um desses domínios apresenta 79, 89 e 91% de identidade entre TIA1 e TIAR, além do fato de RRM3 ter alta afinidade e interação com mRNA. Na porção C-terminal destas proteínas há um domínio tipo príon (PRD) com 51% de identidade entre elas. Tanto TIA1 como TIAR possuem duas isoformas que apresentam aproximadamente 95% de identidade (GUINER et al., 2001; KEDERSHA; ANDERSON, 2002; KEDERSHA et al., 1999). Outro fator importante na formação de GE são os microtúbulos e estudos mostraram que a utilização de drogas que inibem a formação de microtúbulos também inibem a formação de GE. Entretanto, uma vez formados, os microtúbulos não são necessários para a manutenção do grânulo (BARTOLI; BISHOP; SAUNDERS, 2011).

Baseado nessas informações, a figura 1.6 representa, resumidamente, a formação de GE. Durante a primeira etapa de resposta ao estresse (no exemplo, estresse oxidativo) a kinase HRI fosforila eIF2 α , que reduz a disponibilidade de eIF2 α -GDP-tRNA^{met}. Em seguida, juntamente com a exportação de TIA1 e TIAR do núcleo para o citoplasma, ocorre a ligação de outras *binding proteins* ao mRNA, além das interações proteína-proteína que são responsáveis pela formação desses grânulos citoplasmáticos em resposta ao estresse.

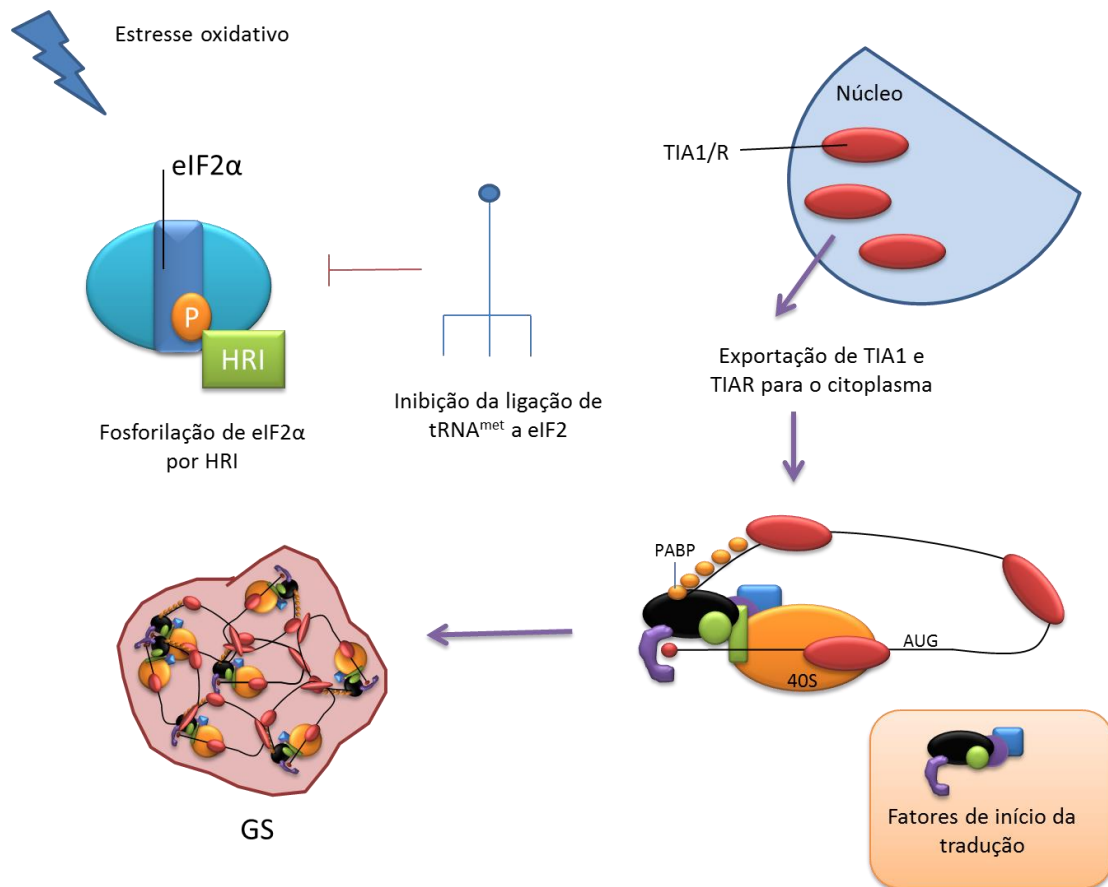


Figura 1.6: Formação do grânulo de estresse.

Fonte: Do autor.

Legenda: O GE é formado pela fosforilação de eIF2α que impede a ligação do tRNA à eIF2, prevenindo a formação do complexo 43S. TIA1 e TIAR são exportadas para o citoplasma onde se ligam ao mRNA pelos domínios RRM. A montagem em grânulo ocorre pela interação proteína-proteína das proteínas TIA e G3BP pelos domínios tipo príon. Diversos fatores incluindo os fatores de início da tradução e a subunidade ribossomal 40S fazem parte das proteínas que compõem os GE.

Em resumo, podemos estabelecer que o mRNA no citoplasma pode estar em dois estados: em tradução, quando o ribossomo 80S está sintetizando a proteína associado ao mRNA ou o mRNA pode estar em um estado de não-tradução ou “inatividade traducional”, sem a associação de ribossomos 80S. Esta última alternativa pode estar relacionada ao transporte, estocagem ou degradação do mRNA. Dois sítios importantes para a degradação e estocagem dos mRNAs são os PB e os GE, sendo que os GE são exclusivamente estruturas de estocagem. Os PB podem interagir fisicamente com GE e trocarem mRNA e, uma vez nesses grânulos, os mRNAs podem voltar a se associar ao ribossomo 80S e serem traduzidos, ou enviados para os PB para degradação. A figura 1.7 mostra a dinâmica entre a tradução, PB e GE.

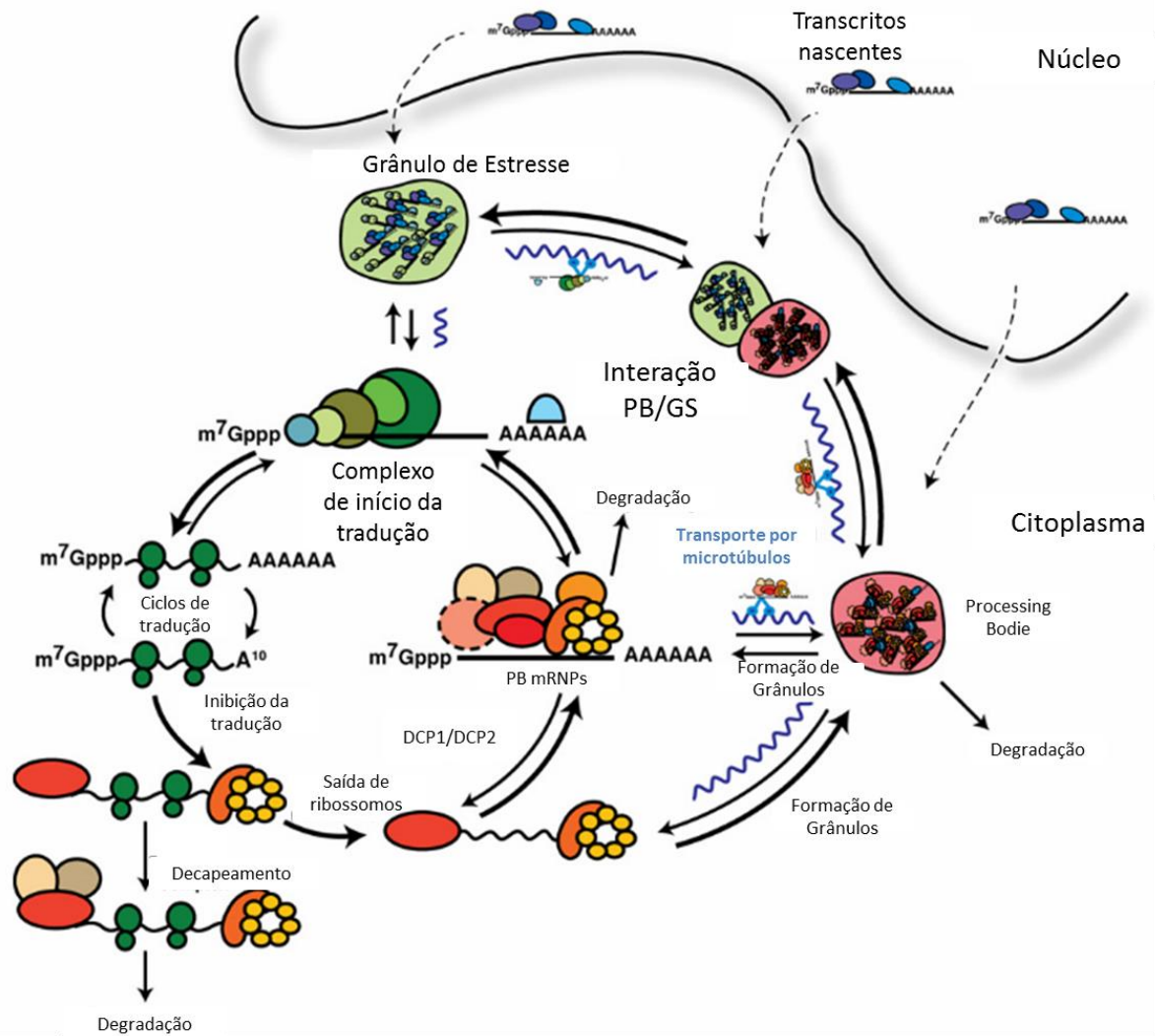


Figura 1.7. Ciclo do mRNA: da tradução ao PB e GE.

Fonte: Adaptada de Ross Buchan e Roy Parker; Eukaryotic Stress Granules: The Ins and Outs of Translation, Molecular Cell Review, 2009.

Legenda: O mRNA no citoplasma pode se associar a complexos de tradução para síntese de proteína que pode passar por ciclos de tradução. A tradução pode ser inibida e o mRNA degradado por decapeamento ou pode se desassociar de ribossomos e mRNPs de PB se ligarem ao mRNA formando PB. Os PB podem interagir com GE trocando mRNAs. Os mRNAs nascentes podem ir diretamente para PB ou GE e, desses grânulos, é possível o mRNA voltar a se associar à maquinaria de tradução para síntese proteica.

Tabela 1.1. Componentes de PB e GE. Exemplo de algumas proteínas presentes em PB e GE

Nome da proteína	Função	PB	GE
DCP1	Ativador de DCP2	X	
DCP2	Enzima decapeadora	X	
PAM2	Desadenilase	X	
PAM3	Desadenilase	X	
CCr4	Desadenilase	X	
EDC1	Ativador de decapeamento	X	
eIF4E-T	Repressor de tradução	X	
GW182	Função em miRNA	X	
Hedls	Ativador de decapeamento	X	
LSM1-7	Ativador de decapeamento	X	
eRF1	Terminador de tradução	X	
eRF4	Terminador de tradução	X	
Subunidade r40S	Tradução		X
DDX3/Ded1	RNA Helicase		X
eIF2 α	Início da tradução		X
eIF3	Início da tradução		X
eIF4A	Início da tradução		X
eIF4B	Início da tradução		X
eIF4G	Início da tradução		X
G3BP	Endonuclease		X
FXR1	Associado a poliribossomos		X
HuR	Proteína ligadora a elementos ricos em AU		X
TIA1/TIAR	Splicing		X
Proteínas argonautas	Atividade miRNA	X	X
RCK/p54	RNA Helicase	X	X
eIF4E	Início da tradução	X	X
Xrn1	Exonuclease	X	X
TTP	Proteína ligadora a elementos ricos em AU	X	X

1.2 Células-tronco

“O avanço em nosso conhecimento e entendimento das células-tronco tem fundamentalmente mudado a maneira que nós vemos a fisiologia e a biologia humana sem mencionar as doenças. Tem se tornado claro nos últimos anos que não somente nosso corpo é mais moldável do que se acreditava, mas o número e os tipos de células-tronco que desempenham um papel na geração e regeneração de tecidos humanos, de longe, ultrapassam as expectativas originais.” Sean Sanders, *Custom Publishing Editor* do periódico *Science*.

1.2.1 Breve Histórico das células-tronco

Células-tronco são células indiferenciadas, que não são especializadas e possuem duas características principais: a capacidade de autorrenovação e diferenciação (figura 1.8). A autorrenovação é o processo pelo qual a célula se divide para gerar células filhas e mantém o *pool* da população ao longo da vida. Isso requer não só que a célula entre em ciclo celular, mas que mantenha a capacidade de diferenciação. É um processo importante durante todo o desenvolvimento embrionário e para manutenção do tecido adulto (HE; NAKADA; MORRISON, 2009). A diferenciação é a característica que a célula-tronco tem em se transformar em diferentes tipos celulares funcionais (BECKER; MCCULLOCH; TILL, 1963; TILL; MCCULLOCH, 1980).

O termo células-tronco foi utilizado pela primeira vez em 1868, quando o biólogo alemão Ernst Haeckel descreveu que um organismo unicelular evolui para um organismo multicelular. Haeckel foi um dos principais defensores da teoria da evolução de Charles Darwin e na terceira edição do seu livro intitulado *Anthropogenie*, sugere o uso do termo células-tronco para ovos fertilizados (HAECKEL, 1873; RAGAN, 1997; RAMALHO-SANTOS; WILLENBRING, 2007). Em 1909, o hematólogo Alexander Maximow sugeriu a teoria de que as células sanguíneas eram procedentes de uma célula ancestral (MAXIMOW, 1909), dando indício de que uma célula sanguínea multipotente teria a capacidade de se diferenciar em outros tipos celulares. Juntamente com Maximow, outros pesquisadores também começaram a utilizar o termo células-tronco (RAMALHO-SANTOS; WILLENBRING, 2007).

Na década de 50, foi dado um salto importante no âmbito do estudo das células-tronco e da terapia celular. Nessa década, deu-se início a diversos trabalhos de transplante de medula óssea em murinos. Em 1957 foi publicado um trabalho com o primeiro transplante alogênico de medula óssea realizado em humano (THOMAS et al., 1957). O Dr. Thomas, responsável por este feito, foi agraciado com o prêmio Nobel de medicina de 1990 pelo seu trabalho em transplante de medula óssea.

Alguns anos depois, em 1963, os Drs. Andrew Becker, Ernest McCulloch e James Till mostraram que diferentes tipos de células do sangue são provenientes de um mesmo tipo celular, sugerindo assim a primeira evidência de uma célula-tronco sanguínea (BECKER; MCCULLOCH; TILL, 1963).

Ainda na década de 60, foi descoberto que as células da medula óssea possuem duas populações de células-tronco, as que se diferenciam em células do sangue e outra população que se diferencia em tipos celulares de outros tecidos, como osso, cartilagem e gordura (FRIEDENSTEIN; PIATETZKY-SHAPIRO; PETRAKOVA, 1966; PITTENGER et al., 1999). Anos mais tarde, essas células foram definidas como células-tronco mesenquimais (CAPLAN, 1991).

No começo da década de 80, trabalhos apresentados por dois grupos de pesquisa distintos mostraram que células derivadas de embriões de camundongo teriam a capacidade de se diferenciar em uma série de tipos celulares distintos. Essas células foram denominadas como células-tronco embrionárias (EVANS; KAUFMAN, 1981; MARTIN, 1981). Vinte anos mais tarde seria produzida a primeira linhagem de célula-tronco embrionária humana (THOMSON et al., 1998) e, em 2008, a pesquisadora brasileira Dra. Lygia da Veiga Pereira estabeleceu a primeira linhagem brasileira de células-tronco embrionárias, denominada BR-1 (FRAGA et al., 2011).

Outro marco importante foi o trabalho realizado por Yamanaka que, em 2006, mostrou que é possível reprogramar geneticamente células diferenciadas e induzi-las a uma condição semelhante às células-tronco embrionárias, conhecidas como células-tronco pluripotente induzidas (TAKAHASHI; YAMANAKA, 2006). Esse trabalho rendeu o prêmio Nobel de medicina de 2012 a Yamanaka.

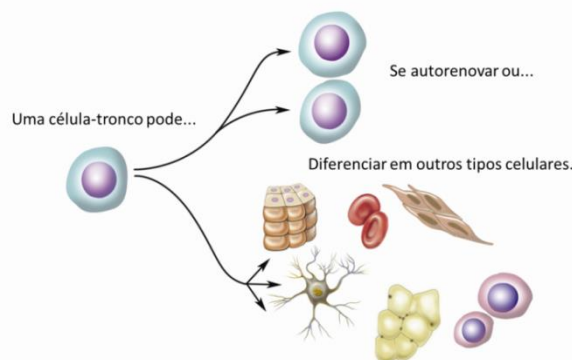


Figura 1.8 – Características das células-tronco.

Fonte: *National Academies. Stem Cell: Na overview of the Science and issue.*

Legenda: Uma célula-tronco tem a capacidade de se autorrenovar e de se diferenciar em diferentes tipos celulares. Figura adaptada de Catherine Twomey da *National Academies, Understanding Stem Cells: An overview of the Science and issue.*

As células-tronco podem ser divididas de acordo com a sua capacidade de diferenciação. As células-tronco totipotentes são células que têm a capacidade de originar um indivíduo completo, isto é, gerar todos os tecidos embrionários incluindo

seus anexos, como a placenta e cordão umbilical. Essas são células encontradas até a formação da mórula, constituída por 16 células após a fecundação (YU; THOMSON, 2008). As células-tronco pluripotentes são aquelas que têm a capacidade de se diferenciar em tipos celulares dos três folhetos embrionários (mesoderma, ectoderma e endoderma), mas não dão origem a nenhum anexo embrionário. As células-tronco embrionárias e as pluripotentes induzidas (IPSCs) são exemplos de células pluripotentes (MARTIN, 1981; TAKAHASHI; YAMANAKA, 2006). As células-tronco multipotentes podem se diferenciar em um número limitado de tipos celulares, sendo encontradas em diversos tecidos e são chamadas também de células-tronco do tipo adulta. Exemplos de multipotentes estão àquelas encontradas no cérebro que dão origem a diferentes tipos de células neuronais, as que estão presentes no estroma de tecidos, também conhecidas como células-tronco mesenquimais, e as que dão origem às células sanguíneas, chamadas de células-tronco hematopoiéticas (WAGERS; WEISSMAN, 2004). As células-tronco unipotentes, como o próprio nome indica, são aquelas que dão origem a um único tipo celular e são especializadas na reparação de tecidos, como as células satélite nos músculos, células da pele e as que dão origem as células germinativas (SEALE; ASAKURA; RUDNICKI, 2001; WATERS; RICHARDSON; JAHODA, 2007).

Os tipos celulares que vêm despertando maior interesse para aplicação na medicina ou que já são usados na terapia celular são as células-tronco pluripotentes e multipotentes. Por este motivo, será dada ênfase às células-tronco pluripotentes e aos mecanismos envolvidos na autorrenovação e manutenção da pluripotência, além das células-tronco multipotentes e os mecanismos moleculares envolvidos no seu processo de diferenciação.

1.2.2 As Células-tronco pluripotentes

As células-tronco embrionárias (CTE) são células-tronco pluripotentes obtidas da massa celular interna do blastocisto após fertilização *in vitro* (REUBINOFF et al., 2000; THOMSON et al., 1998). Essas células têm como características: a capacidade de se manterem indiferenciadas ilimitadamente (autorrenovação); de serem capazes de diferenciação em qualquer tipo celular originadas dos três folhetos embrionários (ectoderma, endoderma e mesoderma) e de formarem teratomas quando injetadas em camundongos (SHAMBLOTT et al., 1998). Essa capacidade ilimitada de autorrenovação se deve ao fato de que essas células possuem alta expressão da proteína telomerase, a qual é significativamente reduzida após a diferenciação

(ARMSTRONG et al., 2005). Quando em cultura, essas células formam colônias que, para serem mantidas, é necessária uma camada de células *alimentadoras*, representadas, geralmente, por fibroblastos de camundongo (EVANS; KAUFMAN, 1981; MARTIN, 1981).

Foi descrito que as células *alimentadoras* expressam alguns fatores que se ligam a receptores de superfície de membrana e desencadeiam uma cascata de sinalização que mantém a célula em um estado indiferenciado. Entre esses fatores estão: *Leukaemia Inhibitory Factor* (LIF), *Transforming growth factor beta* (TGF- β), *Fibroblast growth factor* (FGF) e *Bone Morphogenetic Protein* (BMP) (AMIT et al., 2000; SATO et al., 2003; YING et al., 2003). Após se ligarem aos seus receptores específicos de membrana, esses fatores desencadeiam a ativação de quinases que, por sua vez, ativarão a expressão gênica de fatores de transcrição. Por exemplo, BMPs são um grupo de proteínas da subfamília de TGF- β (CHEN; ZHAO; MUNDY, 2004), que, ao se ligarem ao receptor de BMP II, recrutam e fosforilam o receptor de BMP I. O receptor BMP I agora ativo, subsequentemente fosforila SMAD1/5/8 que forma um complexo com SMAD4 que se transloca para o núcleo, ativando a expressão gênica de fatores de transcrição específicos (figura 1.9)(SEBALD et al., 2004).

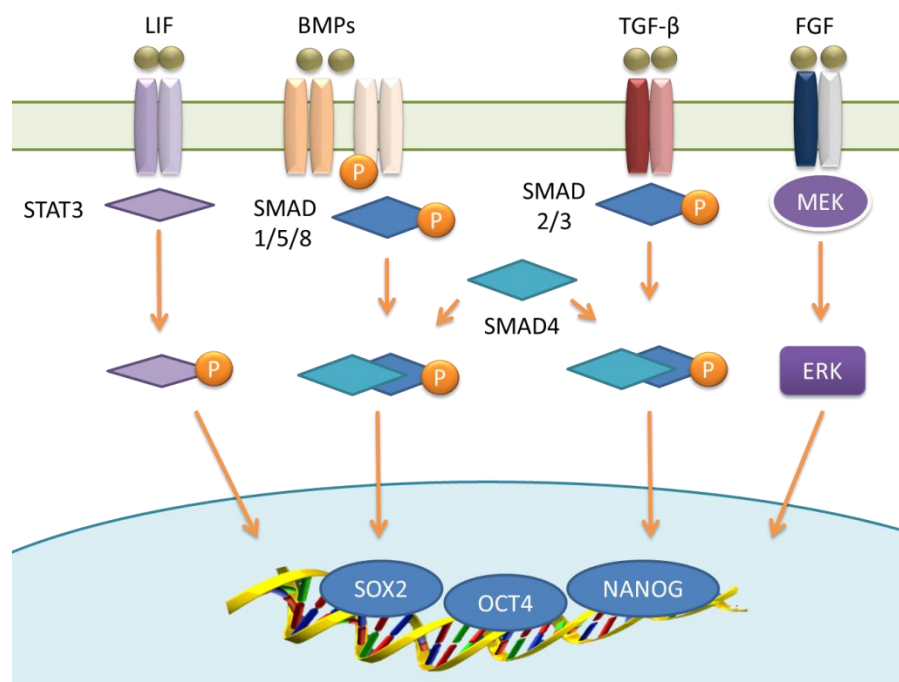


Figura 1.9. Cascata de sinalização em células-tronco pluripotentes.

Fonte: Do autor.

Legenda: Esquema simplificado da cascata de sinalização na manutenção da pluripotencialidade de células-tronco pluripotentes. LIF se liga ao receptor de membrana que, juntamente com outros fatores, fosforila STAT3 que é translocado. BMPs ativam a cascata de fosforilação formando o complexo SMAD1/5/8 com SMAD4 que é translocado para o núcleo. TGF- β recruta SMAD2 e SMAD3 que uma vez fosforilado, forma um complexo com SMAD4 sendo translocado para o núcleo. FGF se liga ao receptor de membrana e ativa diversas vias de sinalização incluindo a via ERK, que é translocado para o núcleo. Todos os fatores translocados para o núcleo interagem com promotores no DNA ativando a expressão de genes de pluripotência.

As CTEs possuem diversas proteínas de superfície de membrana que são utilizados como marcadores: à fosfatase alcalina, *stage-specific antigen-3* (SSEA3), SSA4, *tumor-recognition antigens 1-60* (TRA-1-60) e TRA-1-81, GCTM-2, domínio transmembrana AC133, laminina, entre outros (CARPENTER; ROSLER; RAO, 2003).

Além dos marcadores de superfície, as CTEs possuem mecanismos moleculares de manutenção da pluripotência que, em conjunto, mantêm as células em um estado indiferenciado. Dois fatores de transcrição, OCT4 e NANOG foram as primeiras proteínas identificadas como essenciais, tanto para o desenvolvimento embrionário, como para a manutenção de pluripotência (CHAMBERS et al., 2003; NICHOLS et al., 1998). Mais tarde, outro fator foi associado à pluripotência, Sox-2 (AVILION et al., 2003). Interessante, a regulação da expressão desses três fatores, OCT4, NANOG e Sox-2 é mediada por um *feedback* positivo onde um regula a expressão do outro em um complexo circuito regulatório (BOYER et al., 2005; LOH et al., 2006). Além desses fatores, outros também estão envolvidos e foram descritos na manutenção da pluripotencialidade (WANG et al., 2006). Esses fatores, juntos, formam uma complexa malha de regulação. Por exemplo, *spalt-like transcription factor4* (Sall4) se liga ao promotor *POU class 4 homeobox 1* (Pou4f1) regulando a expressão de OCT4 (ZHANG et al., 2006). Esses fatores não só interagem com o DNA ativando a expressão de outros genes, mas também há a interação de proteína-proteína e a maioria das proteínas são alvos de NANOG e OCT4 (WANG et al., 2006). Mecanismos de remodelamento do DNA e RNAs não codificantes como microRNAs são outros fatores essenciais expressos nas CTEs indiferenciadas (KLOOSTERMAN; PLASTERK, 2006; SANTOS; DEAN, 2004). O conjunto de interação entre todos esses fatores os torna responsáveis pela pluripotencialidade das CTEs.

Estudos recentes em reprogramação de células somáticas mostrou o papel fundamental desses fatores. As células-tronco pluripotente induzidas (IPSC) são células somáticas que, uma vez reprogramadas, adquirem características de células pluripotentes. Yamanaka publicou seu trabalho em 2006 onde, transduziu fibroblastos murinos com vetores lentivirais contendo fatores essenciais para a manutenção do

estado indiferenciado das CTEs. Os fatores de transcrição Oct-4, Sox2, Klf4 e c-Myc foram capazes de reprogramar a célula diferenciada em uma célula semelhante à CTEs. As iPSCs possuem as mesmas características das CTEs: capacidade de autorrenovação, possibilidade de se diferenciar em qualquer tipo celular dos três folhetos embrionários, são teratogênicas e necessitam de células *alimentadoras* para sua manutenção (TAKAHASHI; YAMANAKA, 2006; TAKAHASHI et al., 2007).

Desde a primeira publicação das iPSCs, em 2006, foram publicados mais de 890 artigos contendo no título ou no *abstract* o nome *Induced Pluripotent Stem Cells*, o que reflete uma média de um artigo publicado a cada três dias (consulta realizada no PubMed em dezembro de 2014). Diversos trabalhos vêm reproduzindo a técnica de Yamanaka utilizando diferentes fatores e em diferentes tipos celulares. Um dos fatores utilizados por Yamanaka é o C-Myc que é um fator de transcrição envolvido no ciclo celular, apoptose e é um oncogene relacionado com a progressão de diversos tipos de câncer, e, por estes motivos, c-Myc aumenta a tumorigênese dessas células. Assim, um dos objetivos da comunidade científica tem sido a produção de iPSCs sem utilizar c-Myc, visando que as células sejam menos, ou não tumorigênicas para poderem ser utilizadas na terapia celular. O próprio Yamanaka em 2008 produziu iPSCs a partir de fibroblastos de camundongo e de humanos sem a utilização do C-Myc (NAKAGAWA et al., 2008).

Além dos fatores de pluripotência, os miRNAs também estão envolvidos na pluripotencialidade dessas células (CARD et al., 2008; ZOVOILIS et al., 2009). Recentemente, foi mostrado que a expressão conjunta dos miRNA 302/367 em fibroblastos de camundongos e de humanos foi suficiente para reprogramar essas células em iPSC, sem a utilização dos fatores de Yamanaka (ANOKYE-DANSO et al., 2011).

Uma vez as células removidas das células *alimentadoras* e cultivadas em meio de cultura contendo outros fatores, as CTE e iPSCs irão se diferenciar em células especializadas de qualquer tecido dos três folhetos embrionários dependendo do meio de diferenciação utilizado (SMITH, 2001). Os métodos e mecanismos de diferenciação das células pluripotentes não serão abordados.

1.2.3 As células-tronco multipotentes

Como mencionado anteriormente, as células multipotente são aquelas que têm capacidade de diferenciação limitada quando comparadas com as totipotentes e

pluripotentes. Essas células podem se diferenciar em alguns tipos celulares e sua capacidade de diferenciação depende do seu tipo, por exemplo, no cérebro, as células-tronco neuronais dão origem aos neurônios, astrócitos e oligodendrócitos (KORNBLUM, 2007). As células-tronco hematopoiéticas, por sua vez, dão origem a todas as células do sangue (SEITA; WEISSMAN, 2010). Já as células-tronco mesenquimais de medula óssea podem se diferenciar em células de diversos tecidos como cartilaginoso, ósseo, muscular entre outros (PITTENGER et al., 1999).

Outro tipo de célula tronco multipotente são as células-tronco derivadas de tecido adiposo (ADCS). Essas células são de fácil obtenção, pois são retiradas do material descartado de cirurgias de lipoaspiração e de cirurgia bariátrica, além de serem células de fácil isolamento, cultivo e diferenciação (REBELATTO et al., 2008). Segundo a Sociedade Brasileira de Cirurgia Plástica, no ano de 2011, foram realizadas mais de 200 mil lipoaspirações, tornando o estudo dessas células mais interessante já que o material para obtenção dessas células é descartado. Além disso, ADSCs vem ganhando destaque na pesquisa de terapia celular, pois podem ser utilizadas em transplantes autólogos e alogênicos (GIMBLE; KATZ; BUNNELL, 2007).

As ADSCs foram isoladas pela primeira vez em 2001, por um grupo da universidade da Califórnia, nos Estados Unidos. As células foram obtidas de lipoaspiração e foi mostrada sua capacidade de diferenciação em diversos tipos celulares (ZUK et al., 2001). Primeiramente, foram descritas como células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo (LOCKE; WINDSOR; DUNBAR, 2009) mas o termo mesenquimais para definir as células derivadas de tecido-adiposo é cada vez menos utilizado. Em substituição a essa nomenclatura, atualmente elas são descritas como células-tronco estromais de tecido adiposo por possuírem marcadores do tecido estromal (BOURIN et al., 2013). Também são citadas somente como células-tronco derivadas de tecido adiposo.

Um conjunto de características foram estabelecidas pela sociedade internacional para terapia celular, como pré-requisitos para definir a célula-tronco mesenquimal (HORWITZ et al., 2005). Elas devem: ter aderência ao plástico quando mantidas em meio de cultura padrão; *in vitro*, devem ter capacidade de diferenciação em, pelo menos três linhagens, adipogênese, condrogênese e osteogênese e serem positivas ou negativas para marcadores de superfície específicos. Devem ser

negativas para os marcadores CD34, CD45, HLA-DR, CD14 e/ou CD11b e/ou CD79a e positivas para: CD73, CD90 e CD105.

Os mecanismos moleculares de diferenciação das células-tronco dependem do tipo celular em que ela irá se diferenciar e, *in vitro*, isso depende das condições de cultura (tabela 1.2). Por exemplo, a diferenciação osteogênica, para formação de osteoblasto, é induzida pela presença de dexometasona, ácido ascórbico e beta glicerol fosfato (JAISWAL; HAYNESWORTH; CAPLAN, 1997). Durante o início da diferenciação osteogênica, as células-tronco mudam morfológicamente, sua conformação fibroblastoide para uma conformação cuboide e secretam proteínas da matriz extracelular (MEC), principalmente colágeno do tipo I. Num estágio mais tardio, há o aumento da expressão de fosfatase alcalina e o acúmulo de cálcio (PITTENGER et al., 1999). Ao nível molecular, a diferenciação osteogênica é promovida por BMP2 e BMP6 (FRIEDMAN; LONG; HANKENSON, 2006). BMP2 promove a acetilação de *runt-related transcription factor 2* (Runx2), o principal fator de transcrição da osteogênese. Este fato resulta no aumento de Runx2 que, ao se ligar ao promotor de alguns genes específicos, promove a indução da expressão de genes de diferenciação em osteoblasto como *osterix* (Osx), colágeno do tipo 1 alfa-1 (Col1a1), *osteocalcin* (OC) e *bone sialo protein* (BSP) (VATER; KASTEN; STIEHLER, 2011).

A diferenciação adipogênica é dada pela adição dos fatores 1-metil-3-isobutilxantina, dexametasona, insulina e indometacina (tabela 1.2). A adipogênese pode ser dividida em dois estágios: a diferenciação das células-tronco em células progenitoras pré-adipócitos e a diferenciação dos pré-adipócitos em adipócitos. Morfológicamente, as células-tronco com características fibroblastoides assumem o formato esférico, com acúmulo de lipídios em vacúolos que podem ser corados com *OilRed O*, que são de fácil observação ao microscópio. Essa é uma das características que torna a diferenciação adipogênica um modelo de diferenciação atrativa para estudos básicos celulares e moleculares de células-tronco. Durante a diferenciação, as células secretam componentes da MEC como fibronectina, laminina e colágeno do tipo 1, 3, 4, 5 e 6 (KUBO et al., 2000). O glicocorticoide dexametasona induz o acúmulo de fatores de transcrição, incluindo *CCAAT/enhancer binding protein* (C/EBP) e *peroxisome proliferative-activated receptor-γ* (PPARγ) que são fatores fundamentais na diferenciação adipogênica (SHUGART; UMEK, 1997). O IBMX aumenta a atividade de dexametasona e bloqueia Runx2, fator de transcrição de diferenciação osteogênica (YANG et al., 2008). A insulina pode ser um dos fatores de indução mais importantes

desta diferenciação, promovendo o acúmulo de triglicerídeos através do fator Akt-TCS2-mTORC1 (ZHANG et al., 2009). A indometacina inibe a diferenciação em osteoblasto e promove o comprometimento da célula em diferenciação adipogênica, ligando-se a PPAR γ (LEHMANN et al., 1997).

Tabela 1.2. Fatores de indução a diferenciação celular *in vitro*.

Diferenciação	Fatores
Adipogênese	1-metil-3-isobutilxantina, Dexametasona, Insulina e indometacina
Condrogênese	Fator de transformação do crescimento (TGF- β)
Osteogênese	Dexametasona, β -Glicerol fosfato e Ascorbato

O mecanismo molecular da diferenciação adipogênica acontece em uma sequência de eventos bem definidos. O comprometimento celular começa com a ativação e acúmulo dos fatores de transcrição C/EBP- β e C/EBP- δ nas primeiras horas de indução (TANG; OTTO; LANE, 2003). Ambas C/EBPs estimulam a expressão de PPAR γ e C/EBP α (CAO; UMEK; MCKNIGHT, 1991; TONTONOZ et al., 1994) que, através de *feedback* positivo, regulam a expressão entre si (WU et al., 1999) e ativam a expressão de genes que irão manter a célula em um estado diferenciado. Entre esses genes estão *adipocyte-specific fatty acid binding protein* (aP2), *phosphoenolpyruvate carboxikinase* (PERCK), *glyphosate dehydrogenase*, *fatty acid synthase*, *insulin-sensitive glucose transporter 4* (GLUT-4) e receptores de insulina (ROSEN et al., 2000). A PPAR- γ pertence a uma família de receptores nucleares e possui duas isoformas: a PPAR- γ 1 e PPAR- γ 2. Ambas participam no processo de diferenciação adipogênica, sendo que PPAR- γ 1 seria expressa em um estágio mais precoce da diferenciação (figura 1.9) (SIERSBÆK; NIELSEN; MANDRUP, 2010).

Outros fatores também estão presentes na diferenciação adipogênica. *Kruppel-likefactor* (KLF) é uma família de proteínas envolvidas na proliferação, apoptose e diferenciação. A KLF15 é ativada por C/EBP- β e C/EBP- δ que, por sua vez, induz a ativação de *insuline-sensitive GLUT-4* (GRAY et al., 2002). A KLF6 inibe a expressão de *pre-adipocyte factor* (pref-1). A Pref-1 é importante para a manutenção da célula pré-diferenciada e a inibição da expressão dessa proteína permite que a célula entre em diferenciação de pré-adipócito em adipócito (LI et al., 2005). Nem todas as KLFs participam na indução da diferenciação, KLF2 e KLF7 são fatores anti-adipogênicos (KANAZAWA et al., 2005; WU et al., 2005). Diversos outros fatores também estão envolvidos na diferenciação adipogênica. A expressão de GATA2 e GATA3, por

exemplo, diminui durante a adipogênese e a superexpressão de GATA2 diminui a diferenciação adipogênica (TONG et al., 2005).

Os fatores de transcrição desempenham papel fundamental na diferenciação celular, independentemente do tipo de diferenciação. Cada fator ativa a transcrição de centenas de genes e os mesmos fatores podem desencadear a diferenciação em tipos celulares diferentes. As BMP-2, 4, 6, 7 e 9, por exemplo, desencadeiam a diferenciação adipogênica e osteogênica (KANG et al., 2009), sugerindo que outros níveis de regulação possam estar envolvidos no processo de diferenciação. De fato, um trabalho publicado recentemente pelo nosso grupo em que foi realizada análise de *ribosome profile* em ADSCs, foi observado que há uma extensa regulação pós-transcricional durante a diferenciação adipogênica (SPANGENBERG et al., 2013).

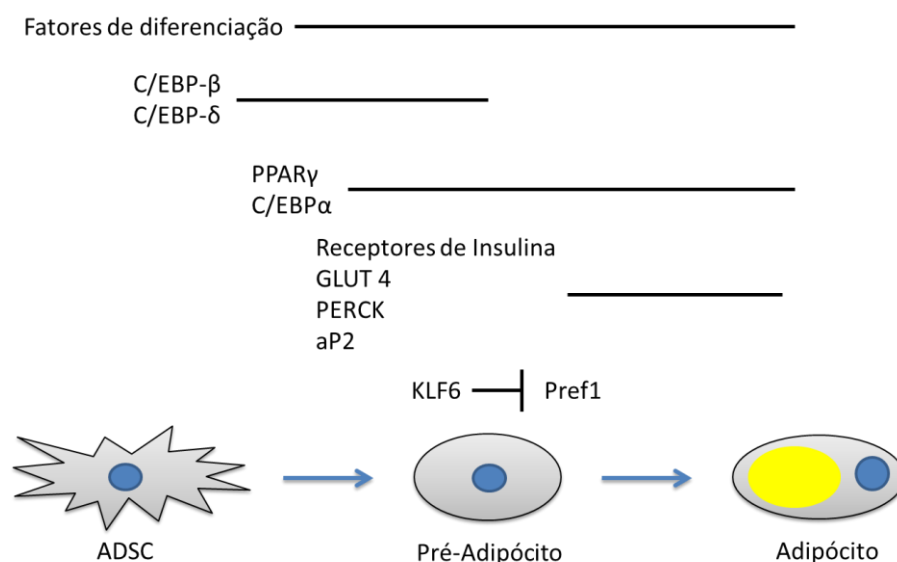


Figura 1.10: Esquema de diferenciação adipogênica.

Fonte: Do autor.

Legenda: Fatores de diferenciação ativam C/EBP-β e C/EBP-δ que acumulam na célula ativando os fatores de transcrição PPARγ e C/EBPα. Esses fatores ativam genes de diferenciação como Receptores de insulina, GLUT4, PERCK e aP2. KLF6 inibe a expressão de Pref1 que juntamente com os demais fatores induzem a diferenciação em adipócito.

Uma vez que os *Processing bodies* e os grânulos de estresse são sítios de regulação pós-transcricional e pouco se sabe sobre os mecanismos pós-transcricionais envolvidos na manutenção e diferenciação de células-tronco adultas, o estudo da dinâmica e função desses grânulos em células-tronco se torna interessante. De fato, em um estudo recente, foi mostrado que em células satélite musculares, que são células-tronco unipotentes, há o acúmulo do RNA mensageiro Myf5, responsável pela diferenciação miogênica, em grânulos citoplasmáticos

formados por proteínas de PB. O acúmulo acontece durante o estado indiferenciado das células satélite e, uma vez que a célula é estimulada para diferenciação, os grânulos são desmontados e os mRNAs deslocados para maquinaria de tradução, desencadeando a diferenciação celular (CRIST; MONTARRAS; BUCKINGHAM, 2012). A hipótese do nosso trabalho é a de que grânulos citoplasmáticos estão presente em células-tronco estromais e desempenham um papel importante na diferenciação dessas células.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos gerais.

Estudar a dinâmica dos grânulos citoplasmáticos que contém as proteínas TIA e dos *processing bodies* (PB) em células-tronco mesenquimais humanas durante o estresse oxidativo e a diferenciação adipogênica.

2.2. Objetivos específicos.

Estabelecer a cultura primária de células-tronco mesenquimais humanas, pré-adipócitos, fibroblastos humanos, pré-adipócitos humanos e a cultura da linhagem tumoral HeLa.

Identificar, em células-tronco mesenquimais em condições normais, estresse e diferenciação adipogênica a localização de proteínas que são componentes conhecidos de grânulos de estresse (GE) e de PB.

Determinar se os se os grânulos citoplasmáticos em ADSC possuem RNA mensageiro em sua composição se a montagem é dependente de mRNA.

Estabelecer a importância dos grânulos citoplasmáticos que contém as proteínas TIA e dos PB no potencial de manutenção das células-tronco mesenquimais e na diferenciação.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Cultura celular

Neste trabalho foram utilizadas culturas primárias de células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo (ADSC) isoladas de duas fontes diferentes, ADSC obtidas de cirurgia bariátrica e de lipoaspiração. Também foram utilizadas células de cultura primária de fibroblastos, cultura primária de células-tronco de medula óssea, cultura primária de pré-adipócito e células HeLa.

ADSCs-Bariátrica são células isoladas de tecido adiposo obtidas de cirurgia bariátrica. Essas células foram isoladas e caracterizadas pelo laboratório de terapia celular da PUC-PR. Brevemente, o isolamento realizado pelo grupo colaborador consistia em digestão enzimática utilizando-se 100 mL de tecido adiposo lavado com tampão fosfato-salina (PBS), seguido de digestão com 1 mg/mL de colagenase tipo 1 por 30 minutos a 37°C, sob agitação constante. Em seguida, foram realizadas duas filtragens de 100 µm e 40 µm, respectivamente. As células foram centrifugadas a 800 g por 10 minutos e, finalmente, plaqueadas em uma confluência de 1×10^5 células por centímetro quadrado (céls/cm²) em meio DMEM-F12 suplementado com 15% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de penicilina e estreptomicina. A caracterização das células foi realizada por análise de marcadores de superfície específicos (CD105 (SH2), CD90, CD166, CD29, CD14, CD34, CD45, CD73 (SH4), CD31, CD117) por citometria de fluxo e por diferenciação osteogênica, adipogênica e condrogênica (REBELATTO et al., 2008). Foram utilizadas células derivadas de sete doadores após assinatura do termo de consentimento. Desses, dois eram do sexo feminino, três masculinos e dois não identificados com idade entre 41 e 62 anos. Durante o desenvolvimento do trabalho essas células foram mantidas em meio DMEM-F12 (Gibco – 121000-046 e 21700-075)* suplementado com 15% SFB (Gibco–12657-029) e 1% de antibiótico (penicilina 100 µg/mL e estreptomicina 100 µg/mL).

ADSC-Lipo são células derivadas de tecido adiposo proveniente de lipoaspiração, adquiridas comercialmente (Lonza–PT5006). Foram utilizadas células de quatro doadores distintos (tabela 3.1) e mantidas em meio de cultura ADSC™ Growth Medium (Lonza – PT4505).

* Fabricante e número referencial de catálogo.

As células-tronco mesenquimais derivadas de medula óssea (CTM-MO) foram isoladas e caracterizadas pelo laboratório de células tronco da PUC-PR. O aspirado de medula óssea foi diluído em uma proporção 1:3 em meio IMDM e transferido para um tubo com Histopaque para isolamento das células mononucleares, seguido de duas lavagens com meio IMDM. As células foram então plaqueadas em uma densidade de 1×10^5 céls/cm² e cultivadas em meio IMDM suplementado com 15% de SFB e 1% de antibiótico (REBELATTO et al., 2008). Foram utilizadas células de dois doadores diferentes, mantidas em meio DMEM-F12 suplementado com 15% de SFB e 1% de antibiótico (penicilina 100 µg/mL e estreptomicina 100 µg/mL).

Tabela 3.1. Informações ADSCs-Lipo

Célula	Idade do doador	Gênero do doador	Lote
ADSC1	58	Mulher negra	320660
ADSC2	51	Homem caucasiano	IF4166
ADSC3	38	Mulher asiática	2F3051
ADSC4	40	Mulher caucasiana	353102

As células de cultura primária de pré-adipócitos foram adquiridos da Lonza (PT5005) e mantidas em meio de cultura próprio (Lonza – PT9502) que consiste em meio de cultura suplementado com 10% de SFB, 0,1% de gentamicina e 1% de L-Glutamina.

Os fibroblastos dermais de cultura primária foram adquiridos da ATCC (ATCC – PCS-201-012, lote 60213728) e foram mantidos em meio específico (ATCC – PCS-201-041) que consiste em meio de cultura suplementado com 10% de SFB, L-Glutamina, Insulina, ácido ascórbico, hemissuccinato de hidrocortisona e fator de crescimento de fibroblasto β (FGF- β). Durante a execução dos experimentos, o meio foi gradativamente substituído para meio DMEM-F12 e meio ADSC™ Growth Medium (Lonza – PT4505).

As células de cultura primária foram utilizadas entre as passagens 4 e 5 e plaqueadas na densidade de 1×10^5 céls/cm² para a realização dos experimentos.

Foram utilizadas também células HeLa da ATCC (ATCC - CCL-2). Essas células foram mantidas em meio DMEM-F12 suplementado com 10% de SFB e 1% de antibiótico (penicilina 100 µg/mL e estreptomicina 100 µg/mL) e 1×10^5 céls/cm² foram plaqueadas para a realização dos experimentos.

As células foram mantidas congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em criotubos contendo 1×10^6 células por tubo com 1 mL de solução com 90% de SFB e 10% de DMSO, até o momento de uso. Antes do descongelamento das células, 2 garrafas de 75 cm² foram mantidas por 30 minutos em estufa a 37°C/5% de CO₂ contendo 8 mL de meio de cultura, de acordo com o tipo celular que seria descongelado. Os criotubos foram retirados do nitrogênio e colocados em banho-maria por no máximo 2 minutos. As células eram removidas do criotubo e adicionadas a um tubo cônico contendo 5 mL de meio de cultura a 37°C seguido de centrifugação a 2.000 rpm por 5 minutos, a temperatura ambiente. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 4 mL de meio, dos quais 2 mL foram adicionados a cada garrafa de 75 cm² que já estava incubada na estufa. As células foram mantidas em estufa a 37°C/5% CO₂. Ao atingirem confluência de 80 a 90% as células foram lavadas uma vez com PBS e foi adicionado 1 mL de tripsina/EDTA às células e as garrafas retornadas a estufa. Quando aproximadamente 90% das células desprendiam da garrafa, estas eram transferidas para um tubo cônico contendo meio de cultura a 37°C e centrifugadas a 2.000 rpm por 5 minutos. O meio de cultura era removido e as células ressuspensas em meio para contagem, seguido de plaqueamento para a realização dos experimentos ou manutenção das células em cultura.

3.2 Diferenciação adipogênica

As células foram submetidas à diferenciação adipogênica utilizando meio de indução comercial *Hmscm esenchymal Stem Cell Adipogenic Differentiation Medium* (Lonza PT-3004) contendo meio de cultura específico com 10% de SFB e com os fatores IBMX, dexametasona, indometacina, L-glutamina, gentamicina e insulina recombinante humana, as concentrações não são fornecidas pelo fabricante. A figura 3.1 mostra como a diferenciação adipogênica foi conduzida. No dia -2 as células foram plaqueadas; nos dias zero e 6 foi adicionado meio de diferenciação adipogênica; nos dias 3 e 9 o meio foi substituído por meio de manutenção (*ADSC™ Growth Medium* ou *DMEM-F12*); nos dias 1, 4, 7 e 12 os experimentos de análise de diferenciação e imunofluorescência foram conduzidos.

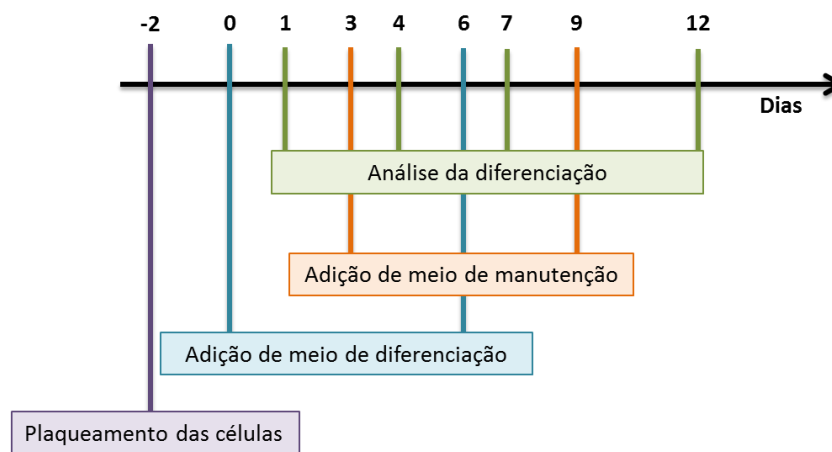


Figura 3.1 Linha do tempo da diferenciação adipogênica. Figura representativa do curso de diferenciação adipogênica. No dia -2 as células foram plaqueadas e nos dias 0 e 6 o meio foi substituído por meio de diferenciação adipogênica. Nos dias 3 e 9 o meio foi substituído por meio de manutenção e os experimentos de quantificação de diferenciação e imunofluorescência foram conduzidos após 1, 4, 7 e 12 dias de diferenciação.

3.3 Análise de proteínas por Western Blot

O ensaio de Western Blot (WB) foi realizado para análise dos níveis de expressão proteica. As células foram lavadas uma vez com PBS a 4°C e imediatamente foram adicionados 100 µL de tampão de lise (100 mM KCl; 5 mM MgCl₂; 20 mM Tris pH 7.5; 0,5% NP40; 1 mM DTT; Inibidor de protease) a cada poço de placa de 6 poços. As células foram desprendidas com rodo e transferidas para um microtubo para incubação em gelo por 30 minutos. Após centrifugação, o sobrenadante foi coletado e armazenado a -20°C até prosseguimento do WB.

A concentração de proteína foi medida pelo método de *Bradford* que consiste na intensidade da reação de *Coomassie Brilliant Blue G-250* com a proteína e medição por espectrofotômetro (BRADFORD, 1976). Foi adicionado ao lisado tampão de amostra (300 mM Tris-Cl pH 6.8, 10% β-mercapto-etanol, 10% SDS, 25% glicerol e azul de bromofenol) e mantidas por 5 minutos a 95°C para desnaturação das proteínas. Foram adicionados 30 µg de amostra em gel SDS-PAGE 10%. A corrida foi realizada a 100 V até a frente de migração sair do gel. As proteínas então foram transferidas do gel para uma membrana de nitrocelulose (GELife Science - 10600002) com voltagem constante de 60V por 3 horas a 4°C. Após a transferência, as membranas foram bloqueadas em solução de 5% de leite em pó desnatado diluídos em *Tris-Buffered Saline* (TBS) contendo 0,05% de Tween-20 por 60 minutos sob agitação constante. Após o bloqueio, a membrana foi lavada três vezes com TBS/0,05% Tween 20 (TBS-T) por 5 minutos. Em seguida, o anticorpo primário (tabela

3.2) foi diluído em solução de bloqueio e incubado com a membrana por 60 minutos sob agitação, seguido de três lavagens com TBS-T por 5 minutos. O anticorpo secundário conjugado com peroxidase HRP (tabela 3.2) foi diluído em solução de bloqueio e incubado por 60 minutos sob agitação. Após três lavagens com TBS-T por 5 minutos, as membranas foram incubadas com solução de revelação quimioluminescente ECL (Invitrogen - WP20005) seguido de exposição da membrana em filme fotográfico (Kodak) e revelação em solução de revelação e fixação.

3.4 Estresse celular, tratamento com cicloheximida e RNase

Para os ensaios de análise de grânulos de estresse, as células foram submetidas a estresse oxidativo com arsenito de sódio (Sigma Aldrich - 7784-46-5). As células foram plaqueadas 48 horas antes de cada experimento. O estresse se deu com a adição de solução de 0,5 mM de arsenito de sódio por 40 minutos em estufa a 37°C/5% de CO₂. Após incubação, o meio foi removido e as células foram lavadas duas vezes com PBS por 5 minutos e, logo em seguida, as células foram fixadas com paraformaldeído (PFA) 4% para análise por imunofluorescência, ou encaminhadas para lise e análise por WB.

O tratamento com cicloheximida foi realizado logo antes da indução adipogênica. As células foram tratadas com 0,1 mg/mL de cicloheximida (Sigma-Aldrich - C7698) por 10 minutos a 37°C/5% de CO₂. Em seguida, as células foram lavadas com PBS e meio de indução adipogênica foi adicionado.

O tratamento com RNase foi realizado 24 horas após o plaqueamento das células e consistiu em lavagem das células com PBS seguido de permeabilização com tampão contendo 0,5% de Triton-X100 e 10 µL/mL de inibidor de protease PMSF em PBS por 2 minutos. Em seguida as células foram tratadas com 10 mg/mL de RNase A (Sigma-Aldrich) por 5 minutos seguido de fixação com 4% de PFA para posterior ensaio de imunofluorescência.

3.5 Imunofluorescência

Os ensaios de imunofluorescência foram realizados em placas LabTek™ (Thermo – 154534) de 8 poços. A relação dos anticorpos utilizados consta na tabela 3.2. As células foram plaqueadas e, antes de fixação com PFA 4% por 10 minutos, as células foram lavadas uma vez com PBS. Após a fixação, as células foram lavadas três vezes com PBS por 5 minutos.

A permeabilização foi realizada com 0,5% de Triton X-100 em PBS por 10 minutos seguido de 3 lavagens com PBS por 5 minutos. O bloqueio foi realizado com 3% de BSA em PBS seguido de incubação do anticorpo primário (tabela 3.2) por 60 minutos e lavagem com PBS por três vezes de 5 minutos. O anticorpo secundário (tabela 3.2) foi incubado por 60 minutos seguido de três lavagens com PBS sendo a primeira por 5 minutos, a segunda por 30 minutos e a terceira por 5 minutos. As células foram montadas com meio de montagem contendo DAPI (Vector Lab – H1200) e seladas com lamínula para posterior análise ao microscópio.

Tabela 3.2. Anticorpos primários e secundários utilizados para IF e WB

Anticorpos primários	Aplicação	Diluição	Hospedeiro	Marca/Referência
TIA1	IF/WB	1:50/1:200	Cabra	SantaCruz/SC-1751
TIAR	IF/WB	1:800/1:2000	Coelho	CellSignaling/8509
TIA1/R	IF/WB	1:50/1:200	Coelho	SantaCruz/SC-28237
RCK	IF/WB	1:400/1:800	Coelho	MBL/PD009
DCP1a	IF	1:50	Camundongo	SantaCruz/SC-100706
TTP	IF/WB	1:100/1:400	Coelho	Abcam/ab33058
eIF4E	IF	1:400	Coelho	CellSignaling/9742
eIF4B	IF	1:600	Camundongo	SantaCruz/SC-376062
RPS6	IF	1:50	Camundongo	SantaCruz/SC-74459
RPSL7	IF	1:200	Coelho	CellSignaling/2403
eIF2 α	IF	1:200	Coelho	CellSignaling/9722
eIF2 α -Fosforilado	IF	1:200	Coelho	CellSignaling/3398
FXR1	IF	1:50	Cabra	SantaCruz/SC-10554
CD63	IF	1:200	Camundongo	Abcam/ab59479
Digoxigenina	IF	1:400	Camundongo	Abcam/ab420
PABP	IF	1:50	Camundongo	SantaCruz/SC-32318
Anticorpos secundários				
Coelho IgG-CFL 647	IF	1:400	Burro	SantaCruz/SC-362291
Camundongo IgG-CFL 405	IF	1:400	Burro	SantaCruz/SC-362248
Camundongo IgG-TR	IF	1:400	Cabra	SantaCruz/SC-2781
Cabra IgG-TexasRed	IF	1:400	Camundongo	SantaCruz/SC-3916
Coelho - Alexa 488	IF	1:600	Burro	Thermo
Coelho - Alexa 594	IF	1:600	Burro	Thermo
Coelho IgG-HRP	WB	1:2000	Cabra	Thermo/31460
Cabra IgG-HRP	WB	1:2000	Burro	SantaCruz/SC-2020

3.6 Fluorescence in situ hybridization (FISH)

A técnica de FISH foi realizada baseado em Serpeloni et al, 2011. Resumidamente, as células plaqueadas em Labtek foram fixadas com PFA 4% por 20 minutos e imediatamente permeabilizadas em tampão específico (0,2% triton em 2X SSPE (SSPE 20x: 3M NaCl; 0,2M tampão fosfato pH 7,4 e 20mM EDTA) por 20 minutos). Após sequência de lavagens, as células foram incubadas por 30 minutos a 30°C em tampão de hibridação (10% dextran, 2X SSPE, 35% formamida, 0,5% tRNA de levedura). Em seguida, as células foram incubadas por 3 minutos a 65°C em tampão de hibridação contendo 0,5 U/μL de RNase OUT e 1 ng/μL de oligoDT conjugado à digoxigenina. Imediatamente após incubação, as lâminas foram mantidas a 37°C/5% de CO₂ por 12 horas. As células foram submetidas à sequência de lavagens com tampão SSC (GIBCO) seguido de imunofluorescência utilizando anti-digoxigenina.

3.7 Microscopia e processamento de imagem

Foram utilizados quatro equipamentos de microscopia. Leica moledo DMI6000CS (Confocal), Leica modelo DMI6000B, Nikon A1R (Confocal), Olympus DeltaVision.

Para que as imagens fossem fidedignas entre os diferentes microscópios, as imagens foram analisadas utilizando o software ImageJ. As imagens foram adquiridas e salvas no formato de arquivo original de cada equipamento (ex.: arquivos com a extensão .dv arquivos provenientes do microscópio DeltaVision) e com auxílio de *plugins* específicos, as imagens puderam ser abertas no ImageJ e, dessa forma, excluindo as imagens obtidas em confocal, os tratamentos de brilho/contraste e sobreposição das imagens seguiu exatamente os mesmos parâmetros estabelecidos para a todas as imagens, independente do microscópio utilizado.

3.8 Contagem dos grânulos

Os grânulos de TIA1/R e PB foram contados manualmente utilizando o recurso *cell counter* no ImageJ. Foram contados grânulos de pelo menos 40 células por condição. A média de grânulos foi calculada pelo número total de grânulos, dividido pelo número de células contadas. Para análise estatística foram utilizados os métodos de teste t e *anova* utilizando o software Prism 5.0.

3.9 Construção de plasmídeos

O gene de TIA1 foi clonado em plasmídeos de expressão que contêm as proteínas *yellow fluorescence protein* (pEYFP-N1, Clontech) ou a *cyan fluorescence protein* (pECFP-N1, Clontech) (figura 3.2).

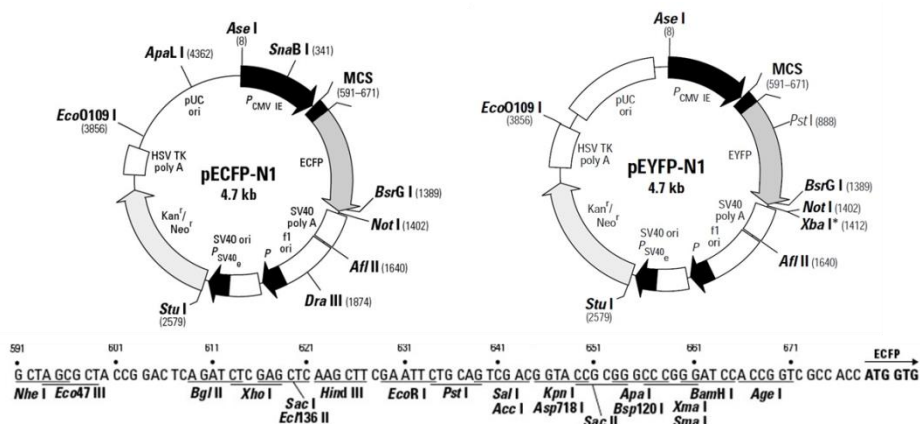


Figura 3.2 Mapa dos plasmídeos utilizados. Mapa dos plasmídeos de pECFP, pEYFP.

Primeiramente, foram desenhados iniciadores para a amplificação do gene TIA1 (*forward* 5' ATGAATTCTGAGGACGAGATGCCC 3' e *reverse* 5' ATGGGCCCTGGGTTTCATACCCTGCC 3'). A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi realizada utilizando tampão de PCR 1x; 2,5 mM de MgCl₂; 1,25 mM de dNTPs; 1 U de *taq* DNA polimerase e 10 pmol de cada iniciador, num volume final de 25 µL. A reação foi incubada em termociclador a 94°C por 5 minutos seguido de 30 ciclos de 94°C por 20 segundos; 60°C por 30 segundos e 72°C por 3 minutos, finalizado por uma última etapa de 72°C por 5 minutos. Após amplificação de TIA1, o produto foi aplicado em gel de agarose 1% seguido de corrida eletroforética a 80 V. A banda do gel correspondente ao produto de TIA1 foi removida do gel e o produto de PCR foi purificado com o kit *illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification* (GE HealthCare - 28-9034-70). O DNA de TIA1 purificado foi clonado em vetor pGEM-T Easy (Promega – A1360) de acordo com instruções do fabricante. Dez nanogramas de DNA foram misturados a 5 µL de 2x *Rapid Ligation Buffer*, 1 µL de T4 DNA ligase, 1 µL de pGEM-T e volume final completado para 10 µL de água DNase free seguido de incubação por 1 hora em temperatura ambiente.

A transformação do produto de ligação de TIA1 em pGEM-T (pGEM-T-TIA1) foi realizada em bactéria *E. coli* DH5α. Dois microlitros do produto de ligação foram misturados a 50 µL de DH5α seguido de incubação em gelo por 20 minutos. Em seguida, foi realizado choque-térmico por 40 segundos a 42°C e imediatamente

incubado por 2 minutos em gelo. Foram adicionados 950 mL de meio LB e a mistura foi incubada por 1 hora e 30 minutos a 37°C sob agitação. Finalmente, 100 µL da transformação foram adicionados a placas de LB ágar contendo ampicilina, IPTG e X-Gal e incubadas por 16 horas em estufa a 37°C. Foi realizado PCR das colônias brancas e, posteriormente, as colônias confirmadas positivas foram crescidas sob agitação em meio LB contendo ampicilina, durante 16 horas a 37°C. Foi realizada a lise das bactérias seguida de purificação do plasmídeo utilizando o kit de miniprep (QIAGEN – 27104), de acordo com instruções do fabricante. Uma vez tendo o plasmídeo purificado foi realizado a digestão enzimática do plasmídeo pGEM-T-TIA1 utilizando as enzimas de restrição Apal (*New England Biolabs*) a 25°C por 2 horas. Após o período de incubação foi adicionado a enzima de restrição EcoR1 (*New England Biolabs*) e incubado por mais 2 horas a 37°C. O produto da digestão foi aplicado em gel de agarose 1% seguido de purificação do DNA com kit *illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification* (GE HealthCare - 28-9034-70) para obtenção do gene de TIA1. Foi realizada a ligação de TIA1 aos plasmídeos pECFP e pEYFP previamente incubadas com as enzimas de restrição Apal e EcoR1. Uma vez realizada a ligação o produto foi transformado em *E. coli* DH5α, como descrito previamente.

Foram selecionadas 10 colônias de cada transformação e realizado PCR de colônia para confirmação da inserção de TIA1 ao plasmídeo. Uma vez confirmado por PCR de colônia foram selecionados 2 clones positivos que foram enviados para sequenciamento para confirmação da integridade do inserto.

3.10 Transfecções de plasmídeos

As transfecções foram realizadas com três lipídios catiônicos distintos, FuGENE HD, Oligofectamina e Lipofectamina 2000. Para FuGENE HD (Promega – E2311) 4 µg de plasmídeo foram adicionados a 100 µL de meio OptiMem (Invitrogen – 51985034) e incubado em temperatura ambiente por 5 minutos. Em seguida, foram adicionados 10 µL de FuGENE HD (Promega) e incubado por mais 20 minutos em temperatura ambiente. Após a incubação, o volume total foi adicionado ao poço da placa de 6 poços com células previamente plaqueadas contendo 0,9 mL de meio de cultura. Após 4 horas, o meio foi completado para 2 mL.

Para as transfecções com Oligofectamina (Invitrogen – 12252-011), 4 µL do reagente foram misturados a 12 µL de meio OptiMem. Em outro microtubo foram

misturados 4 µg de plasmídeo com 185 µL de meio OptiMem e, após 5 minutos de incubação a temperatura ambiente, as duas soluções foram misturadas e incubadas por mais 20 minutos a temperatura ambiente. Essa solução foi adicionada ao poço da placa de 6 poços com células previamente plaqueadas contendo 0,9 mL de meio de cultura. Após 4 horas, o meio foi completado para 2 mL.

As transfecções com Lipofectamina 2000 (Invitrogen - 11668019) foram realizadas misturando 4 µg de plasmídeo com 250 µL de OptiMem em um microtubo e, em outro microtubo, 10 µL de Lipofectamina 2000 com 240 µL de OptiMem e incubado por 5 minutos, a temperatura ambiente. Após o tempo de incubação, as soluções foram misturadas em um mesmo tubo e incubadas por mais 20 minutos a temperatura ambiente e adicionados ao poço da placa de 6 poços, com células previamente plaqueadas contendo 1,5 mL de meio de cultura.

Outro método de transfecção de plasmídeo utilizado foi a nucleotransfecção utilizando o Nucleofector™2b (Lonza - AAB-1001) que consiste em eletroporação com kits e métodos já pré-definidos. Utilizamos o kit Human MSC Nucleofector® (Lonza – VAPE-1001). Após tripsinização, $4-5 \times 10^5$ células foram misturados com 2 µg de plasmídeos e 100 µL de solução de transfecção e transferidos imediatamente para a cubeta. A eletroporação seguiu os métodos U-23 ou C-17, ambos recomendados para utilização em células-tronco mesenquimais. Após a eletroporação, as células foram adicionadas a uma placa de 6 poços, com meio pré-aquecido a 37°C e mantidas em cultura por 24 e 48 horas. Foi utilizado o plasmídeo pEGFP (Clontech) para os ensaios de padronização da transfecção.

3.11 Silenciamento gênico por pequenos RNAs de interferência (siRNA)

Para os ensaios de siRNA foi utilizado um mix de diferentes oligos (QIAGEN) específicos para o mRNA de TIA1, TIAR, DCP2, RCK, TTP (tabela 3.3) e um controle negativo *AllStars Negative Control siRNA* (QIAGEN - SI03650318) que consiste em um oligo de siRNA que não possui homologia com nenhum gene conhecido de mamífero (a sequência não é fornecida pelo fabricante). Para cada poço de placa de 96 poços, 50 nM de oligo de siRNA foram misturados a 2,5 µL de meio OptiMem e 2,5 µL de OptiMem foram misturados com 0,9 µL de X-Treme siRNA *transfection reagent* (Life – 04476093001). Após 5 minutos de incubação a temperatura ambiente, as duas soluções foram misturadas e incubadas a temperatura ambiente por 20 minutos. Em seguida, a solução foi adicionada ao poço contendo 45 µL de meio de cultura. As

células foram mantidas com o meio contendo a solução de transfecção por 24 horas antes de substituição por meio fresco.

Tabela 3.3. Sequência dos alvos dos oligos de siRNA

Alvo	Sequência do alvo (5´-3´)
TIA1R	UUGGGUGGUCGUCAAUCCGA
TIA1R	ACCAAUUGGGCCACUCGUAAA
TIA1	CACAACAAAUUGGCCAGUAUA
TIA1	AACGAUUUGGGAGGUAGUGAA
RCK	UCCGUGCAAGAGAGCAAGUUA
RCK	CCGAAUUGGCUUAUGCCGCAA
TTP	UAGCAUAUUUAAGGAGGCAA
TTP	UAGAAUCUUAUGUGCUGUGAA
DCP2	CUGGUUAUCAGAGUAAUGAA

3.12 siRNA e diferenciação adipogênica

Foi realizado experimento de diferenciação adipogênica juntamente com siRNA. Para isso, 48 horas após o plaqueamento das células, o meio de cultura foi substituído por meio de indução adipogênica (Lonza – PT3004) conforme descrito no item 3.2. A adição do meio de diferenciação foi realizada durante a segunda incubação da preparação da solução de transfecção dos oligos de siRNAs. Após os 20 minutos de incubação, a reação de transfecção foi adicionada ao poço e a placa mantida em estufa por 1, 4, 7 e 12 dias.

3.13 Quantificação de diferenciação adipogênica

A quantificação adipogênica foi mensurada de forma indireta pela intensidade de fluorescência. Após o período de diferenciação, a marcação dos adipócitos foi realizada com AdipoRed (Lonza – PT7009) que consiste em solução de corante vermelho Nilo otimizado para utilização de quantificação em larga escala.

Para quantificação com AdipoRed os experimentos foram realizados em placa de 96 poços. A placa foi retirada da estufa e mantida em temperatura ambiente por 10 minutos. O meio de cultura foi cuidadosamente removido e 200 µL de PBS foi adicionado ao poço para lavagem das células. Imediatamente após, o PBS foi removido e adicionado 200 µL de PBS e 5 µL de AdipoRed. Após 10 minutos de incubação a placa foi lida em leitor de fluorescência (TECAN Infinity 200) configurado para agitar a placa por 3 segundos, seguido de 9 leituras para cada poço em pontos

distintos. A leitura foi realizada em comprimento de onda de emissão/excitação de 485/572 nm.

Para plotagem dos dados, a média da RFU (*Relative Fluorescence Unit*) das 9 leituras de cada poço foi convertida em porcentagem em relação ao controle negativo do siRNA de cada intervalo de tempo. Dessa forma, os dados de dias diferentes puderam ser colocados em um mesmo gráfico já que a RFU de 4 e 12 dias de diferenciação é muito diferente, impossibilitando a comparação dos dados entre os dias com os dados brutos.

4. RESULTADOS

Os experimentos foram realizados com células-tronco derivadas de tecido adiposo (ADSC) de duas fontes distintas: ADSCs obtidas de cirurgia bariátrica (ADSCs-Bariátrica) e ADSCs obtidas de lipoaspiração (ADSCs-Lipo). Os grânulos de estresse (GE) e os P bodies (PB) foram caracterizados em condições normais de cultura, durante o estresse oxidativo e durante a diferenciação adipogênica. Em ADSC-Lipo foi realizado o silenciamento de componentes desses grânulos, seguido da indução à diferenciação adipogênica. Serão mostradas somente as fotos de sobreposições das imagens de Imunofluorescência e não cada canal independentemente.

As células utilizadas foram de doadores em condições clínicas distintas. As ADSCs-Bariátricas foram adquiridas de pessoas obesas que possuem um perfil inflamatório generalizado e, possivelmente, outras patologias, como diabetes e hipertensão (“Overweight, obesity, and health risk.”, 2000). As ADSC-Lipo, são de doadores em condição clínicas mais saudáveis, já que, segundo a sociedade brasileira de cirurgia plástica e a *american society of plastic surgeons*, alguns pré-requisitos são necessários para cirurgia, como uma série de exames médicos e físicos, além de não estarem em uso de medicamentos, álcool e fumo.

4.1 Em ADSCs proteínas de grânulos de estresse compõem grânulos citoplasmáticos em condições normais de cultura e possuem baixa quantidade de PB

Uma vez que os PB exercem uma função importante na regulação pós-transcricional em eucariotos, e que os GE não são formados em condições normais de cultura, foi questionado qual seria a distribuição destes grânulos em ADSCs em condições padrão de cultura.

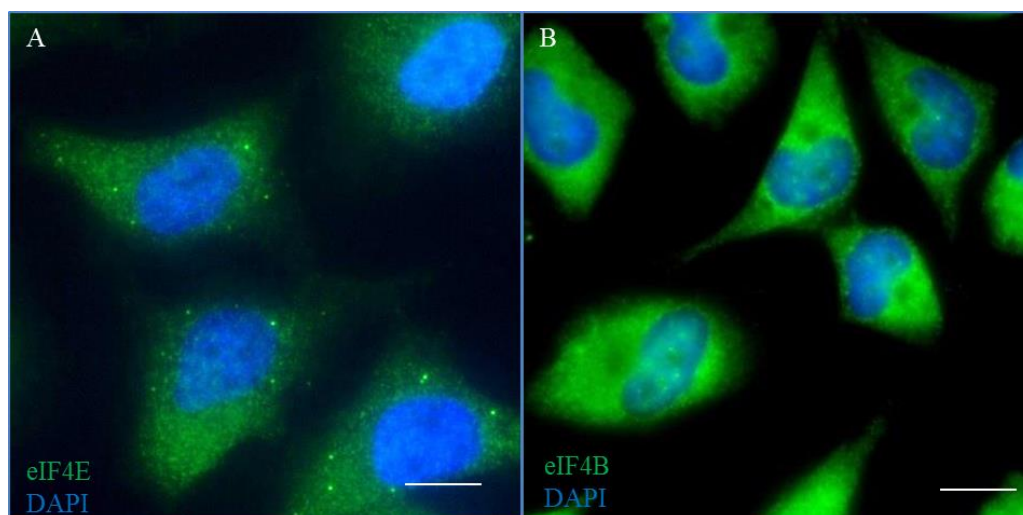
Para isso, foi realizado ensaio de imunofluorescência (IF). Foram selecionados doze anticorpos que reconhecem proteínas de grânulos citoplasmáticos e um anticorpo que reconhece uma proteína ausente tanto em PB quanto em GE, como controle negativo.

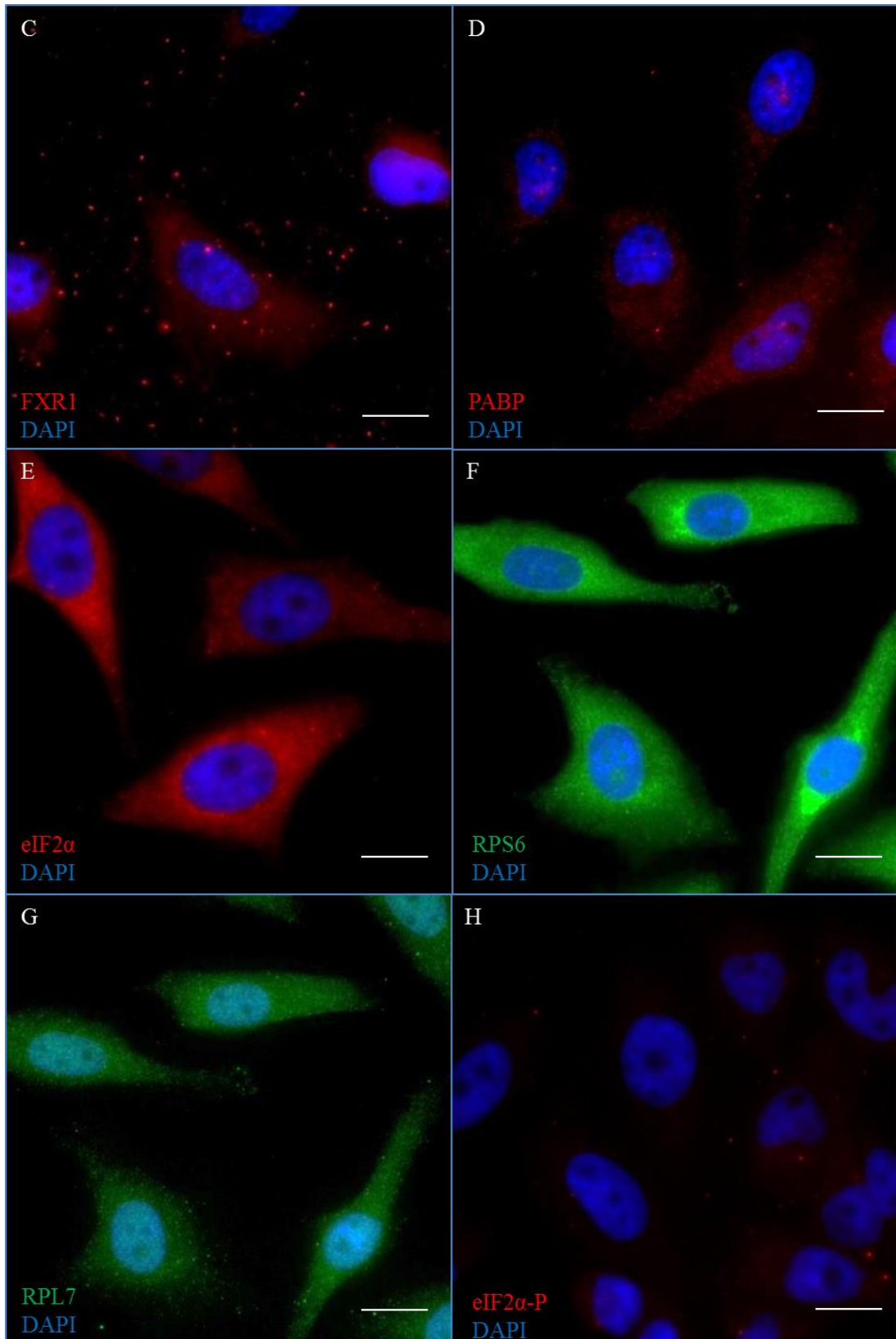
Primeiramente, foi validada a eficiência dos anticorpos em reconhecer proteínas de GE e de PB em células HeLa, que é uma linhagem celular utilizada e bem caracterizada para o estudo de grânulos citoplasmáticos. Células HeLa em condições normais não apresentam GE (KEDERSHA; ANDERSON, 2002). As

proteínas eIF4E, eIF4B, *Fragile X mental retardation related-1* (FXR1), PABP, eIF2 α , proteína ribossomal subunidade menor 6 (RPS6) e proteína ribossomal subunidade maior 7 (RPL7) aparecem dispersos no citoplasma (Figura 4.1 A-G). A FXR1 (figura 4.1 C) apresentou uma distribuição pontilhada dentro e fora dessas células e, ainda, estão em um plano focal diferente, indicando que se trata, provavelmente, de uma marcação inespecífica. Já eIF2 α -fosforilado tem baixa expressão nessas células (figura 4.1 H).

As proteínas TIA1 e TIAR são nucleares em condições não estressantes (ANDERSON; KEDERSHA, 2009). Foram selecionados três anticorpos que reconhecem a proteína TIA: um anticorpo que reconhece tanto TIA1 como TIAR (anti-TIA1/R) e outros dois específicos para cada proteína TIA (anti-TIAR e anti-TIA1). A distribuição da proteína TIA em células HeLa não estressadas foi principalmente nuclear (figura 4.1 I-K), com exceção da presença de alguns grânulos citoplasmáticos com anti-TIA1 em poucas células (figura 4.1 K).

Como marcadores de PB selecionamos RCK, TTP e DCP1a (figura 4.1 L-N). Foi possível observar a presença de PB distribuídos no citoplasma de células HeLa não estressadas. Os grânulos estavam presentes em todas as células e com média de 14 grânulos por célula (figura 4.1 O).





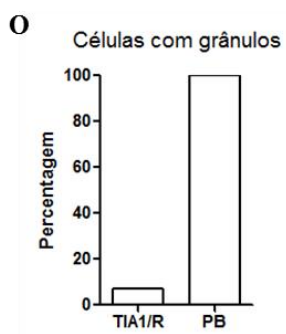
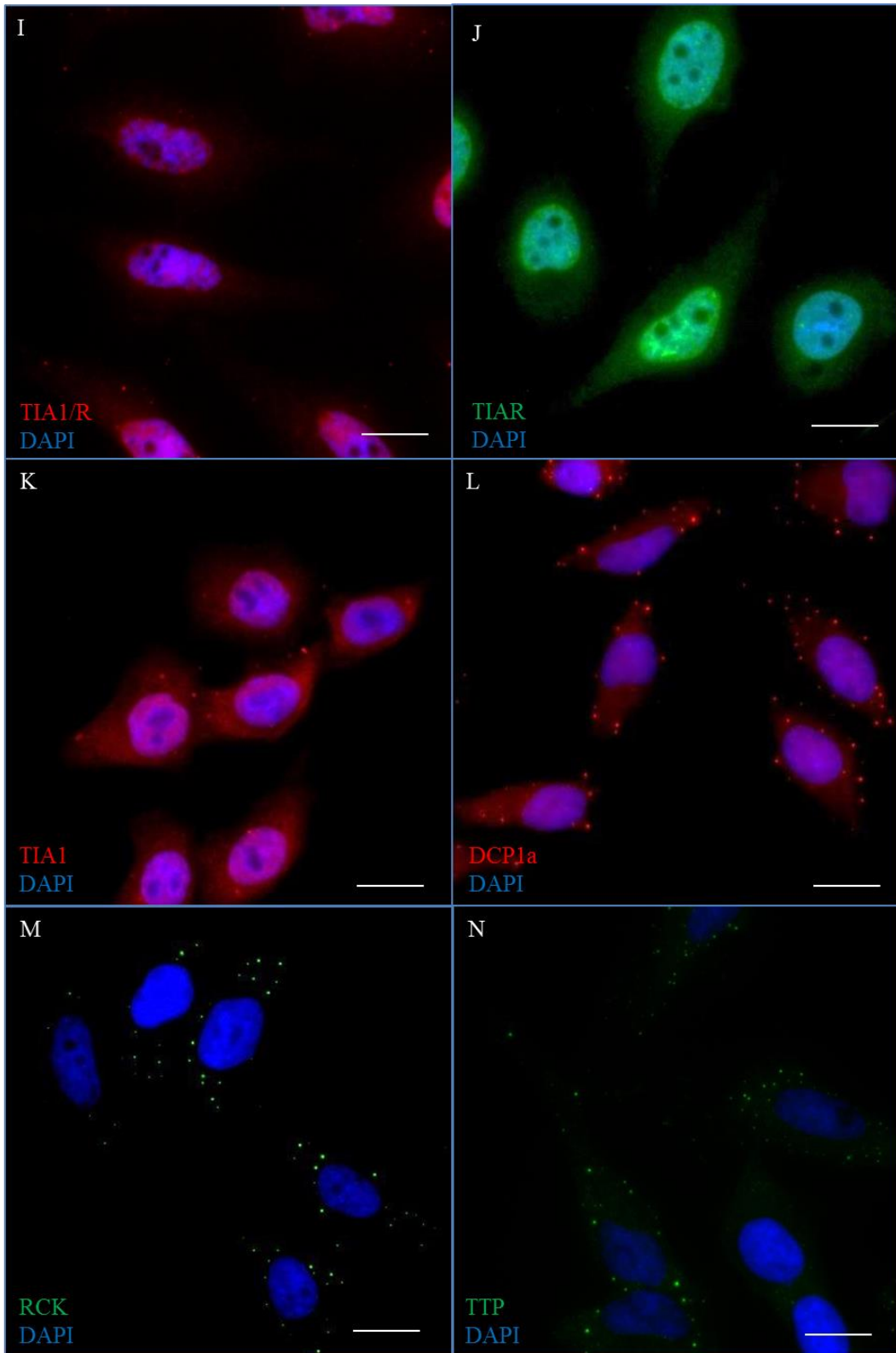


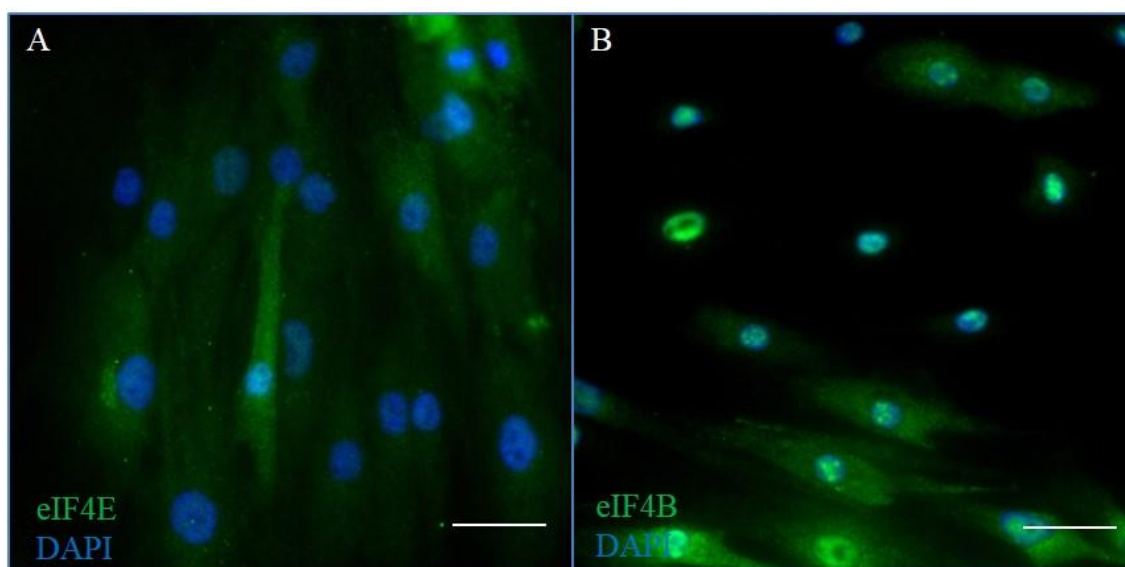
Figura 4.1: Distribuição de PB e proteínas de GE em células HeLa não estressadas.

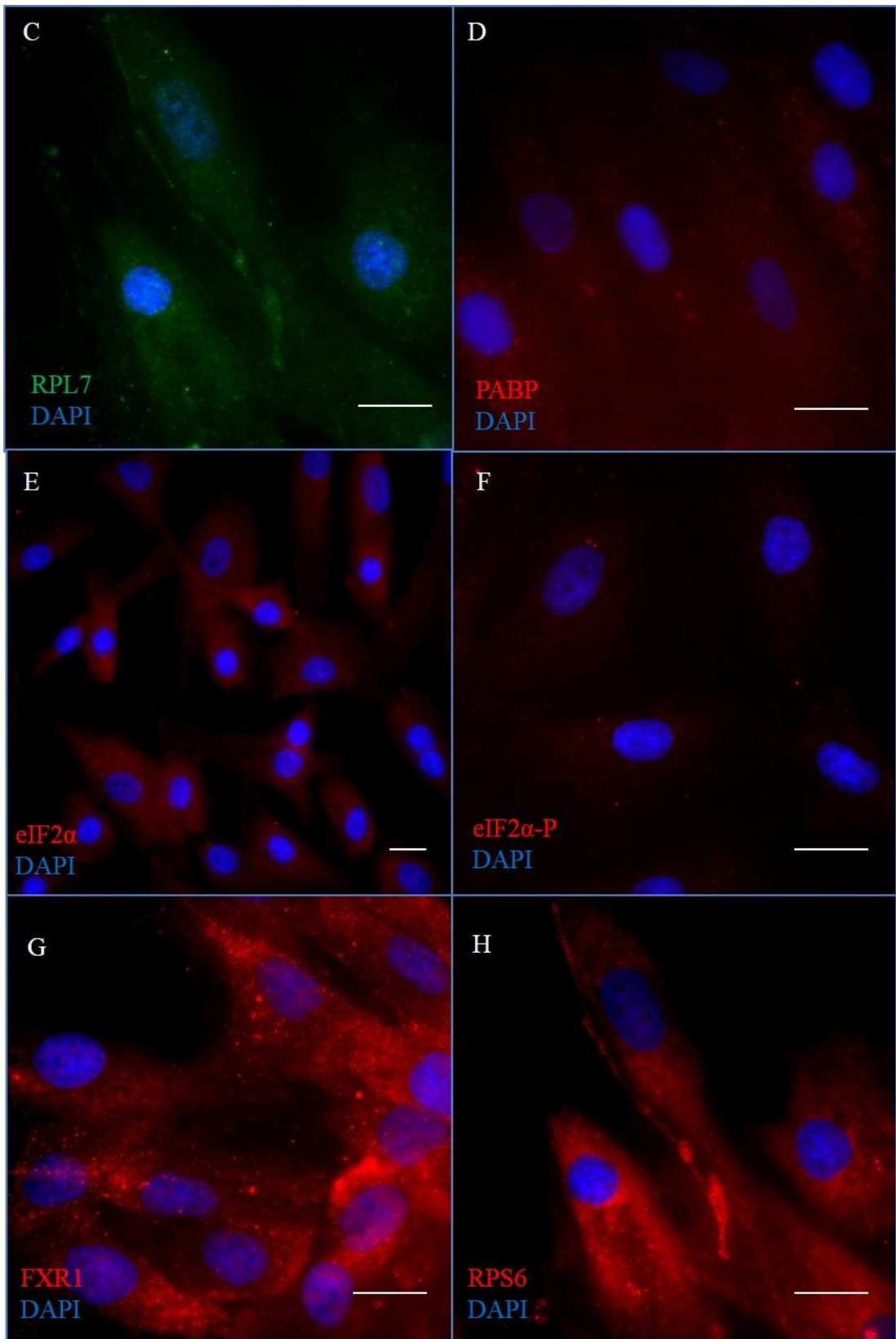
Fonte: Do autor.

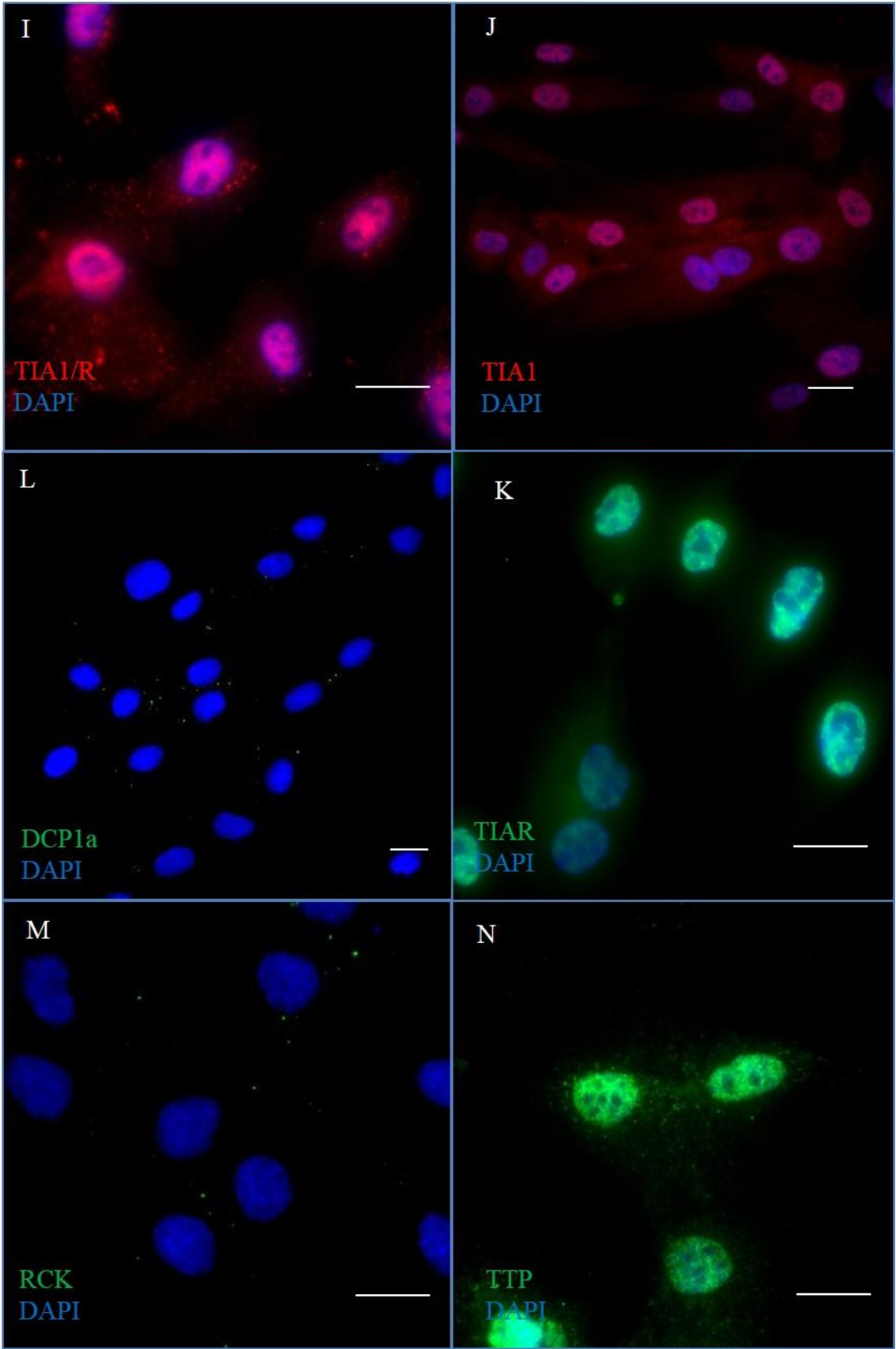
Legenda: Ensaio de IF mostrando a distribuição de proteínas de PB e GE em células HeLa. **A-G.** Distribuição dispersa no citoplasma das proteínas eIF4E, eIF4B, FXR1, PABP, eIF2 α , RPS6 e RPL7. **I-J.** As proteínas TIA1 e TIAR utilizando os anticorpos anti-TIA1/R e anti-TIAR aparecem predominantemente nuclear. **K.** A proteína TIA1 utilizando anticorpo anti-TIA1 aparece predominantemente nuclear com alguns pontos no citoplasma de algumas células. **L-N.** Os PB estão dispersos por todo o citoplasma. **O.** Percentagem de quantidade de células com grânulos. (TIA1/R 7%, PB 100%). $n=3$; Barra = 20 μ m

Um fato interessante foi a distribuição de PB e de proteínas de GE em ADSCs que não estão submetidas a estresse é distinta às células HeLa.

Em ADSC-Lipo a distribuição de eIF4E, EIF4B, RPL7, PABP e eIF2 α é dispersa no citoplasma (figura 4.2 A-E), e eIF2 α -fosforilado tem expressão muito baixa (figura 4.2 F), assim como nas células HeLa. Diferentemente do constatado em células HeLa, em ADSC-Lipo, cultivadas em condições normais, foi observado a presença de grânulos citoplasmáticos contendo FXR1, RPS6 e TIA1/R (figura 4.2 G - I). Apesar de não ter sido possível verificar a colocalização dos grânulos contendo essas proteínas, a distribuição em número desses grânulos é muito similar (figura 4.2 O). TIA1/R possui em média 22 grânulos por célula e 87% das células possuem grânulos (figura 4.2 O) com diâmetro médio de 0,9 μ m. Os grânulos estão dispersos por todo o citoplasma sem ter um padrão de localização específico. A presença de grânulos de TIA1/R em ADSC foi observada somente com o anticorpo anti-TIA1/R e não com os anticorpos anti-TIA1 e anti-TIAR (figura 4.2 J e K). O número de PB é muito reduzido e até mesmo ausente em muitas células (figura 4.2 L-O), tendo em média 1.968 ± 0.201 PB por célula e aproximadamente 10% das células não possuem esses grânulos (figura 4.2 O).







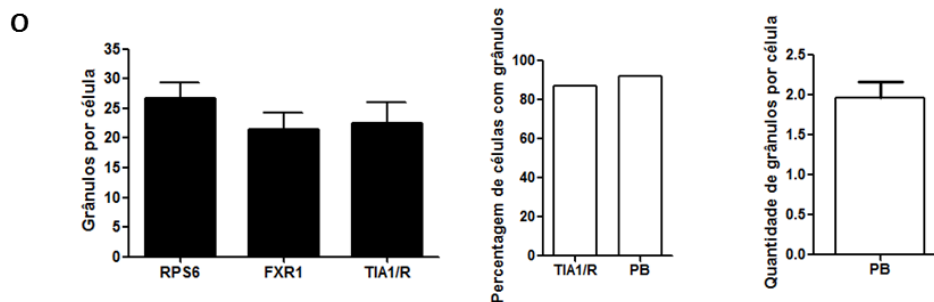


Figura 4.2: Distribuição de PB e proteínas de GE em ADSCs-Lipo não estressadas.

Fonte: Do autor

Legenda: **A-E** Ensaio de IF mostrou que as proteínas eIF4E, EIF4B, RPL7, PABP E eIF2 α possuem distribuição dispersa no citoplasma. **F.** eIF2 α fosforilado tem baixa expressão. **G-I.** ADSCs possuem grânulos de FXR1, RPS6 e TIA1/R citoplasmáticos. **J-K.** As proteínas TIA1 e TIAR utilizando os anticorpos anti-TIA1 e anti-TIAR têm distribuição dispersa no citoplasma e com expressão predominantemente nuclear. **L-N.** Há poucos PB em ADSCs estando até completamente ausente em algumas células. **O.** Quantificação dos grânulos. $n=4$; Barra = 50 μ m

Para avaliar a presença de grânulos em ADSCs-Bariátrica foram utilizados os anticorpos para TIA1/R, TIA1 e DCP1a. Essa bateria de anticorpos é suficiente para determinar se as mesmas particularidades observadas em ADSC-Lipo estariam presentes nas células originadas de cirurgia bariátrica. Assim como nas ADSCs-Lipo, foi observado que o citoplasma destas células contém grânulos de TIA1/R (figura 4.3 A) mas em maior quantidade (106.9 ± 10.19 grânulos por célula). O diâmetro médio desses grânulos é de 1,2 μ m e estão em 97% das células. Além de presente em grânulos, TIA1/R também aparece disperso no citoplasma e no núcleo dessas células.

ADSC-Bariátrica também possui número de PB é muito reduzido e até mesmo ausente em muitas células, tendo em média 4.575 ± 0.5573 PB por célula. Ensaio de colocalização utilizando microscopia confocal e anticorpos para as proteínas TIA1/R e DCP1a mostraram que grânulos contendo essas proteínas, em geral, são independentes em ADSC-Bariátrica e, em poucos casos, os grânulos estão parcialmente sobrepostos (figura 4.3 B e C).

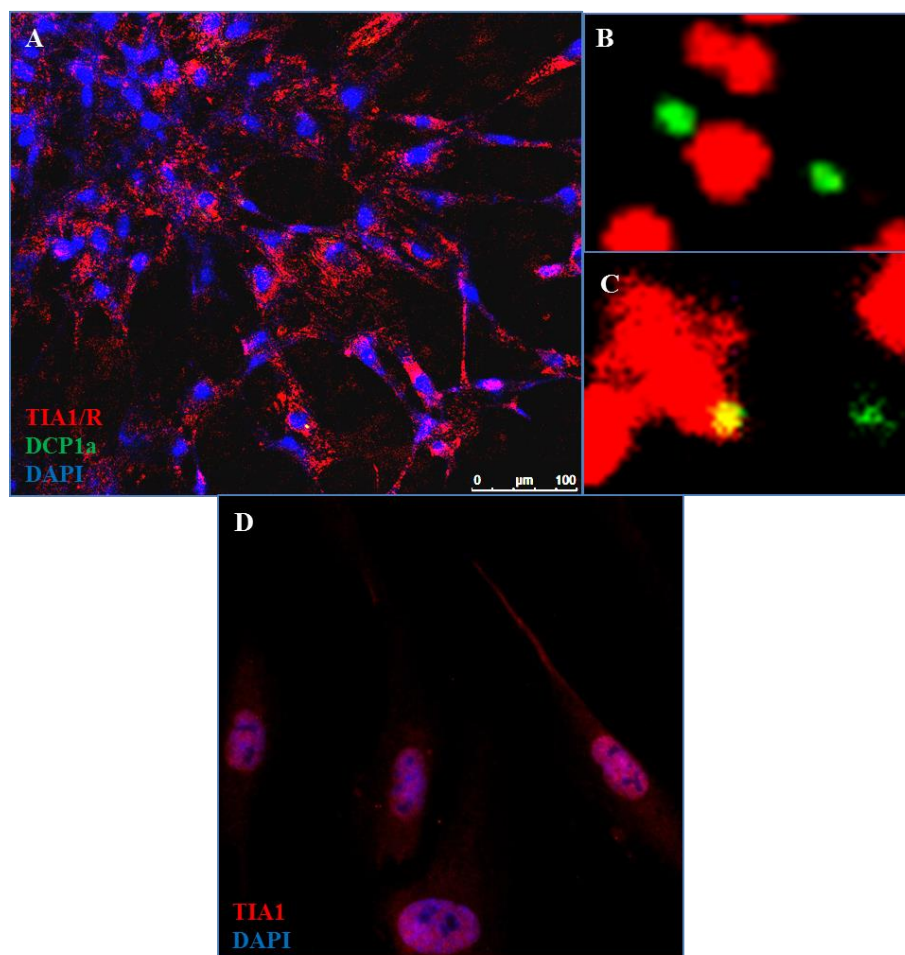


Figura 4.3: Distribuição de TIA1/R e PB em ADSCs-Bariátrica não estressadas.

Fonte: Do autor e Crisciele Kuligovski

Legenda: **A.** ADSCs-Bariátrica possuem grânulos de TIA1/R (vermelho) distribuídos no citoplasma e poucos de PB (verde). **B-C.** Alguns PB estão próximos aos grânulos de TIA1/R com pouca interação entre eles (amarelo). **D.** Não há grânulos de TIA1 citoplasmáticos em ADSCs-Bariátrica marcadas com anti-TIA1. *n*=5

4.2. Fibroblastos não possuem grânulos de TIA/R em células não estressadas

Fibroblastos são células fenotipicamente muito semelhantes às ADSCs. Os mesmo marcadores para determinar uma ADSCs são encontrados em fibroblastos. A diferença fundamental entre estes tipos celulares, que compartilham muitas vezes o mesmo nicho tecidual, é a capacidade de diferenciação. Os fibroblastos têm potencial de diferenciação muito reduzido e até mesmo ausente em relação às ADSCs (ALT et al., 2011; ZYCH et al., 2014).

Por esse motivo, foi realizado em fibroblastos ensaios de IF com anticorpos para as proteínas TIA1, TIA1/R e RCK para determinar se células fenotipicamente próximas às ADSCs teriam grânulos de TIA1/R. A TIA1/R foi localizada principalmente no núcleo de fibroblastos primários humanos (figura 4.4 A). Ainda, assim como TIA1,

não foram observados grânulos no citoplasma utilizando anti-TIA1/R (figura 4.4 B). Os PB estão presentes em todas as células distribuídos pelo citoplasma (figura 4.4 C).

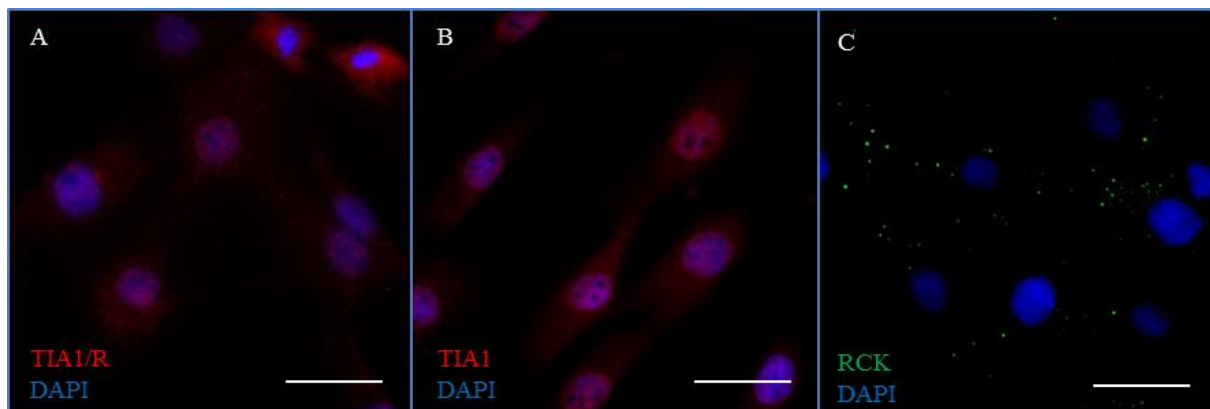


Figura 4.4. Distribuição de TIA1/R e PB em fibroblastos não estressados.

Fonte: Do autor

Legenda: A-B. Ensaio de IF em fibroblasto mostrando a distribuição de TIA1/R utilizando tanto o anticorpo anti-TIA1/R como anti-TIA1 aparece dispersa no citoplasma e predominantemente nuclear em fibroblastos. C. Os PB estão distribuídos em todas as células. $n=3$; Barra = 50 μm

4.3 Células-tronco mesenquimais humanas derivadas de MO (CTM-MO) também possuem grânulos citoplasmáticos de TIA1/R em condições normais

Para determinar se a presença dos grânulos de TIA1/R é uma condição exclusiva de ADSCs obtidas tanto de lipoaspiração como de bariátrica, analisamos células tronco mesenquimais derivadas de medula óssea. Foi realizado ensaio de IF utilizando anti-TIA1/R e anti-DCP1a. Assim como nas ADSCs, as CTM-MO também possuem grânulos de TIA1/R dispersos no citoplasma com a presença de poucos PB distribuídos no citoplasma (figura 4.5).

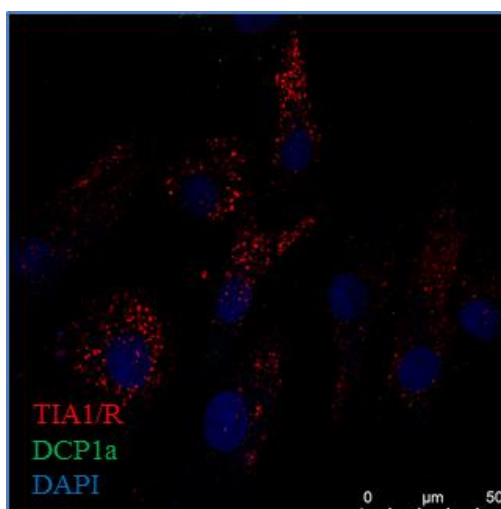


Figura 4.5. Distribuição de TIA1/R e PB em CTM-MO.

Fonte: Do autor.

Legenda: Ensaio de IF em células-tronco mesenquimais de medula óssea mostrando a presença de grânulos de TIA1/R (vermelho) distribuídos no citoplasma e com baixa incidência de PB (verde). $n=3$.

4.4 Grânulos de estresse são formados em ADSCs-Lipo mas não em ADSCs-Bariátrica durante o estresse oxidativo

Devido ao fato que as ADSCs têm grânulos citoplasmáticos em células não estressadas, e que esses grânulos possuem proteínas componentes de grânulos de estresse, foi analisado o comportamento dessas proteínas em ADSCs submetidas a estresse.

Para isso, foi analisada a formação de GE em células submetidas a estresse oxidativo, utilizando arsenito de sódio como indutor. Em células HeLa foi observado que as proteínas eIF4E, EIF4B, TIAR, TIA1, FXR1, PABP e RPS6 possuíam uma distribuição em grânulos após indução com arsenito (figura 4.6 A-H). Durante o estresse também foi notado o aumento citoplasmático de eIF2 α -fosforilado no citoplasma das células (figura 4.6 I e N), acompanhado da diminuição de eIF2 α (figura 4.6 J e N) e RPL7 (figura 4.6 K e N). Os PB foram evidenciados e, após indução ao estresse, tiveram seu número aumentado (de 13.00 ± 1.080 para 25.80 ± 1.158) (figura 4.6 L e M e figura 4.9).

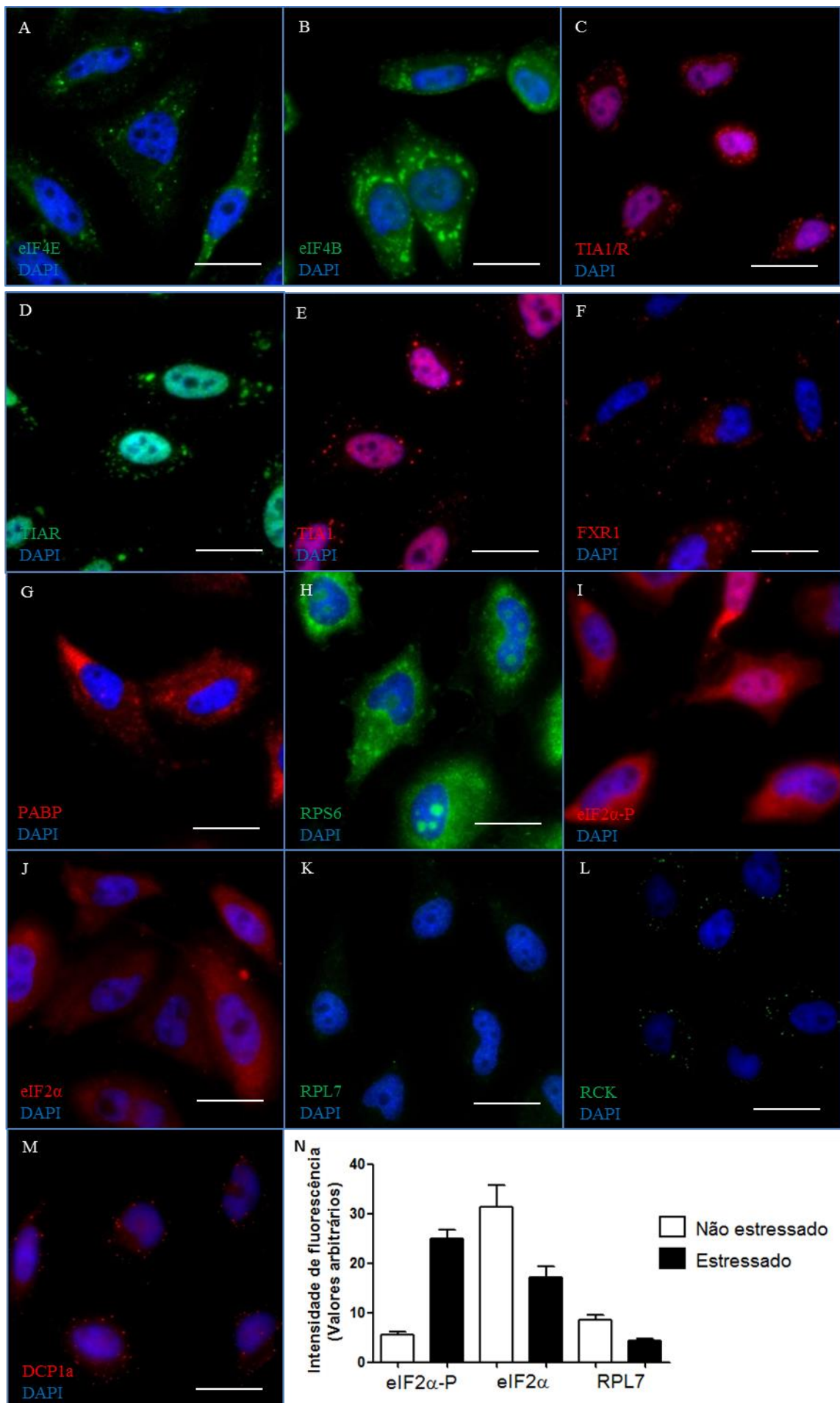
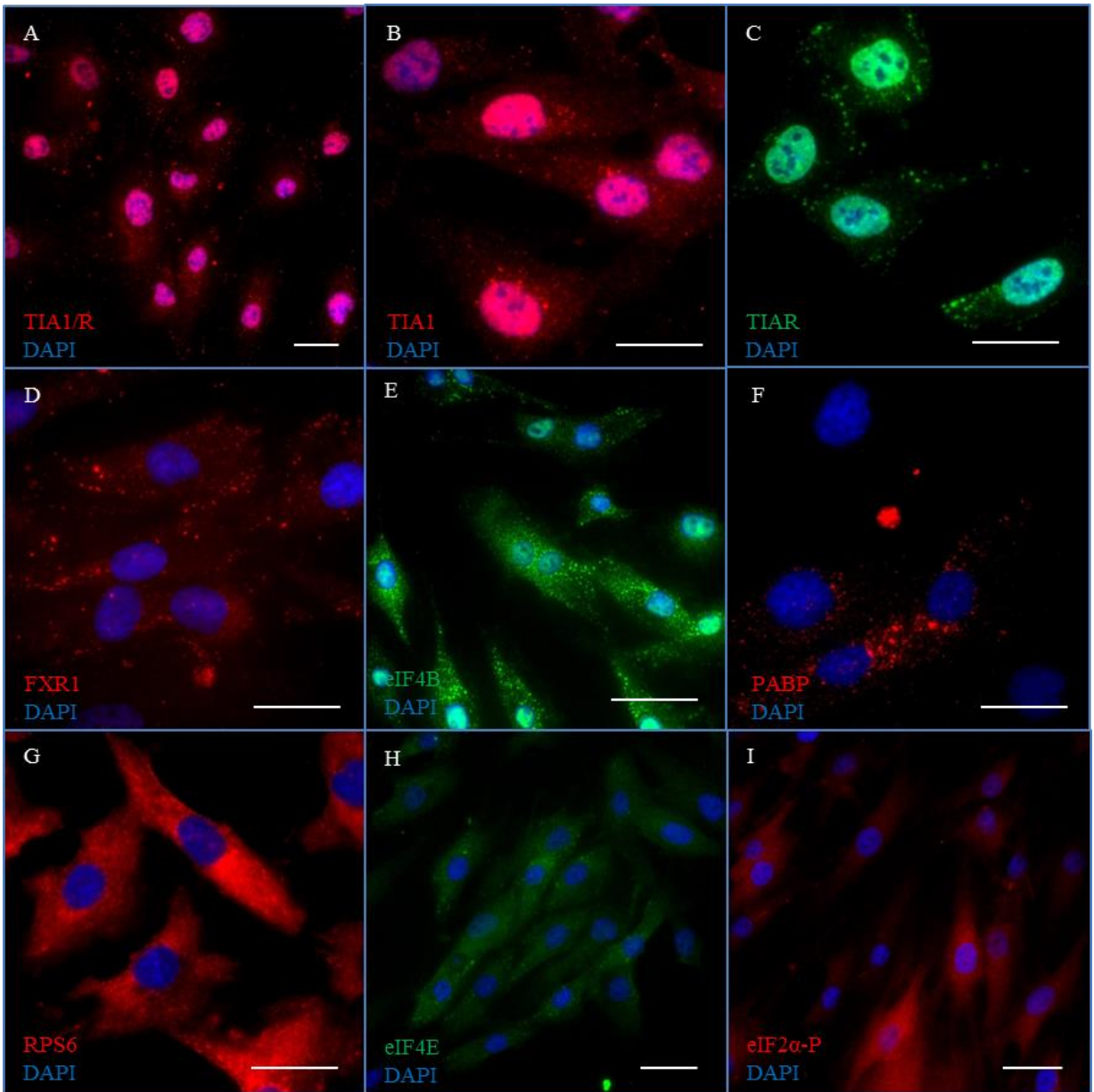


Figura 4.6. Distribuição de GE e PB em HeLa submetidas a estresse oxidativo.

Fonte: Do autor.

Legenda: Ensaio de IF em células HeLa submetidas a estresse oxidativo com 0,5 mM de arsenito de sódio por 40 minutos. **A-G** É possível observar a presença de GE formados com as proteínas eIF4E, EIF4B, TIA1/R, TIAR, TIA1, FXR1, PABP e RPS6. **I-K e N.** A expressão de eIF2 α fosforilado aumenta após a indução de estresse juntamente com adiminuição da expressão de eIF2 α e RPL7. $n=3$; Barra = 20 μ m.

Em ADSC-Lipo foi possível observar a formação de grânulos de estresse, mas estes têm composição diferente às células HeLa. TIA1/R, TIA1, TIAR, FXR1, eIF4B, PABP e RPS6 são componentes de GE em ADSC-Lipo (figura 4.6 A-G), mas não eIF4E (figura 4.7 H). Também foi observado um aumento da intensidade de fluorescência de eIF2 α -fosforilado no citoplasma (figura 4.7 I e N) acompanhado da diminuição de eIF2 α (figura 4.7 J e N) e RPL7 (figura 4.7 K e N). Grânulos de estresse formados por eIF4B, PABP e RPS6 são dispersos por todo o citoplasma e em grande quantidade. Curiosamente, GE formados por TIA e FXR1 estão predominantemente mais distantes do núcleo. No que se refere aos PB, foi observado um comportamento similar ao das células HeLa, ocorrendo aumento desses grânulos (de 1.968 ± 0.2011 para 18.00 ± 1.581) (figura 4.7 L e M e 4.9).



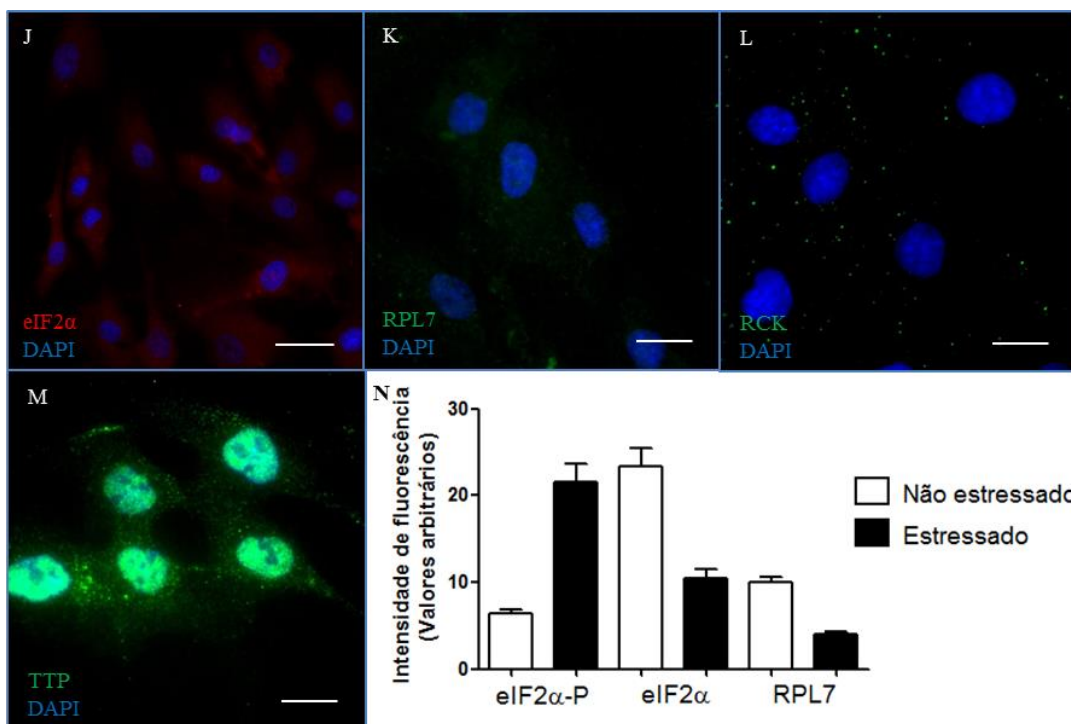


Figura 4.7. Distribuição de GE e PB em ADSCs-Lipo submetidas a estresse oxidativo.

Fonte: Do autor.

Legenda: Ensaio de IF em células HeLa submetidas a estresse oxidativo com 0,5 mM de arsenito de sódio por 40 minutos. **A-G.** Há a formação de GE em ADSCs-Lipo com as proteínas TIA1/R, TIA1, TIAR, FXR1, eIF4B, PABP e RPS6. **H.** eIF4E compõe apenas alguns GE em ADSC-Lipo sendo até ausente na maioria das células. **I-K e N.** A expressão de eIF2α fosforilado aumenta após a indução de estresse juntamente com adiminuição da expressão de eIF2α e RPL7. **L-M.** Durante o estresse oxidativo há um aumento na quantidade de PB em ADSC-Lipo. *n=4*; Barra = 20 μm.

Interessante e inesperadamente, em ADSC-Bariátrica, foi observado que os grânulos evidenciados pelo anti-TIA1/R foram significativamente reduzidos (figura 4.9) e a formação de grânulos de estresse é limitada, sendo até mesmo ausente em algumas células (figura 4.8). Nas ADSCs-Bariátrica também foi observado um aumento no número de PB após indução ao estresse (de 4.575 ± 0.5573 para 24.20 ± 4.236) (figura 4.8 e 4.9).

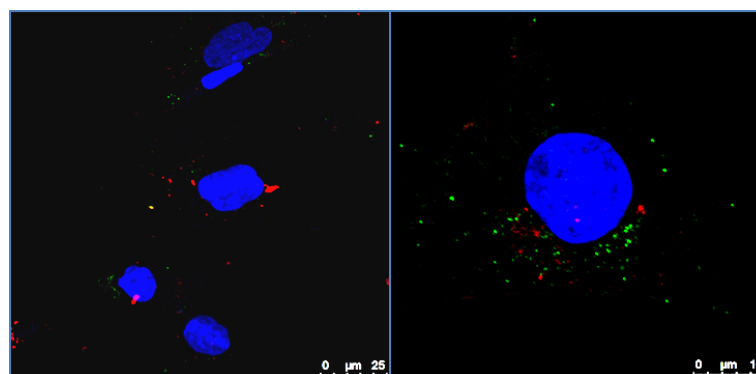


Figura 4.8. Distribuição de GE e PB em ADSC-Bariátrica durante estresse oxidativo.

Fonte: Do autor

Legenda: Ensaio de IF em ADSCs-Bariátrica submetidas a estresse oxidativo com 0,5 mM de arsenito de sódio por 40 minutos. Há a diminuição significativa de grânulos de TIA1/R (vermelho) em ADSC-Bariátrica após indução ao estresse, juntamente com aumento de PB utilizando DCP1a (verde). *n=3*

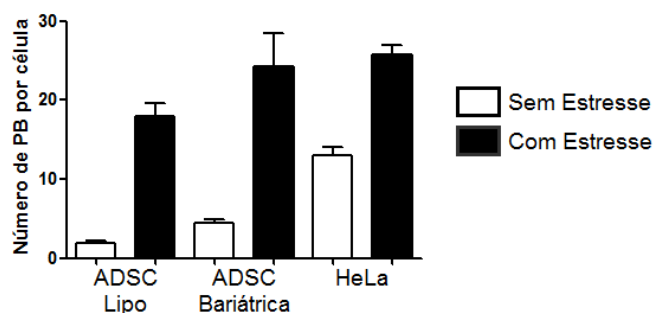


Figura 4.9. Quantidade de PB por células em ADSC-Lipo, ADSC-Bariátrica e HeLa após indução ao estresse.

Fonte: Do autor

Legenda: Após indução a estresse oxidativo há um aumento na quantidade de PB de $\pm 1,96$ para ± 18 em ADSC-Lipo; $\pm 4,97$ para $\pm 24,2$ em ADSC-Bariátrica e ± 13 para $\pm 28,5$ em HeLa. $n=3$.

Os fibroblastos humanos também foram submetidos ao estresse oxidativo e ensaio de IF revelaram a formação de GE e o aumento de PB do mesmo modo que foi observado em HeLa (figura 4.10).

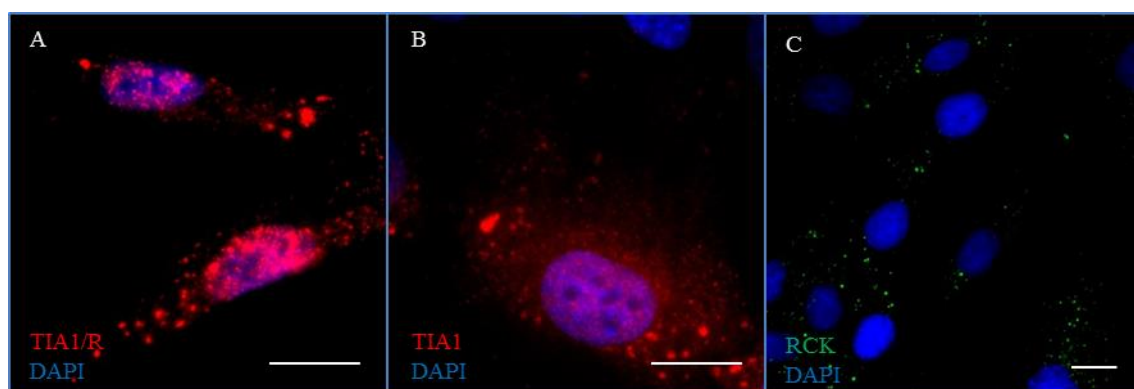


Figura 4.10. Distribuição de GE e PB em fibroblasto submetido a estresse oxidativo.

Fonte: Do autor

Legenda: Ensaio de IF em fibroblastos submetidos a estresse oxidativo com 0,5 mM de arsenito de sódio por 40 minutos. **A-B** Há a formação de GE em fibroblastos utilizando tanto anti-TIA1/R como TIA1. **C.** Há um aumento na quantidade de PB após indução a estresse. $n=3$; Barra = 20 μm .

4.5 Alguns grânulos de TIA1/R estão contidos em vesículas

Recentemente, o grupo de Camussi e colaboradores mostrou que as células-tronco mesenquimais produzem grande número de vesículas extracelulares (exossomos e microvesículas), e que um dos componentes proteicos dessas vesículas é TIA1/R. Dessa forma, foi analisada a possibilidade de que esses grânulos de TIA estivessem contidos em estruturas tipo exossomos. Para responder essa questão foram realizados ensaios de colocalização utilizando anti-TIA1/R e anti-CD-63. CD-63 é uma proteína membro da família *tetraspanine* e está presente na membrana de exossomos e lisossomos (DENZER et al., 2000; FUKUDA, 1991).

Alguns grânulos da cor amarela (verde - TIA1/R e vermelho – CD-63) foram

observados nas imagens sobrepostas indicando que, ao menos parcialmente, TIA1/R colocaliza com CD-63. Estas observações sugerem que uma porção das proteínas TIA1/R esteja contida em vesículas CD-63 positivas (figura 4.11).

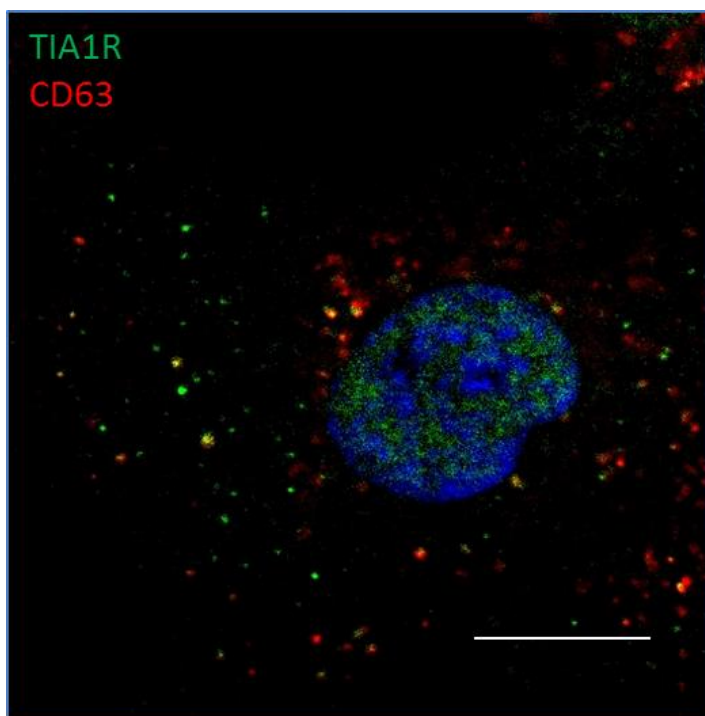


Figura 4.11. Grânulos de TIA1/R estão contidos em vesículas em ADSC-Lipo.

Fonte: Do autor

Legenda: Alguns grânulos de TIA1/R estão contidos em vesículas CD-63 positivas, proteína presente em exossomos e lisossomos. $n=2$ Barra = 20 μm . Imagem confocal.

4.6 Grânulos de TIA1/R em ADSCs possuem mRNA

Dentre as moléculas que compõem os grânulos citoplasmáticos o mRNA possui papel fundamental na formação e manutenção do grânulo (TEIXEIRA et al., 2005). Para determinar se os grânulos de TIA1/R em ADSC possuem mRNA foram realizados ensaios de FISH utilizando sondas oligo-dT para visualizar a grande maioria do mRNA dessas células.

Primeiramente, células HeLa submetidas ao estresse oxidativo com arsenito de sódio foram utilizadas como controle positivo. De fato, foi observado em HeLa a presença de mRNA em GE (figura 4.12 B).

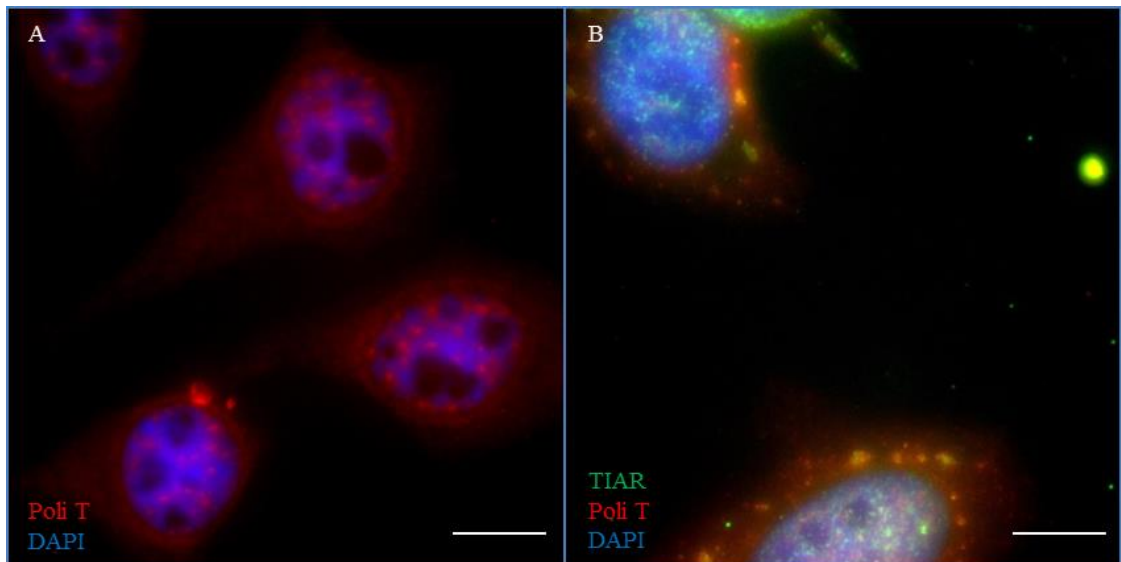


Figura 4.12. Grânulos de estresse possuem mRNA em HeLa.

Fonte: Do autor

Legenda: Ensaio de IF e FISH foi realizado em HeLa. O painel esquerdo (A) representa células HeLa em condições normais de cultura com mRNA disperso pelo citoplasma. No painel do lado direito (B) é possível observar a presença de mRNAs em GE (amarelo) em células HeLa após indução ao estresse. $n=2$; Barra = 20 μm .

Os ensaios de FISH revelaram que mRNA está presente em quantidades consideráveis nos grânulos de TIA1/R em ADSC-Bariátrica, em condições padrão de cultura. Além disso, foi observado que a grande maioria dos grânulos de TIA1/R possui mRNA, mas nem todos os grânulos de mRNA estão contidos em grânulos de TIA1/R (figura 4.13).

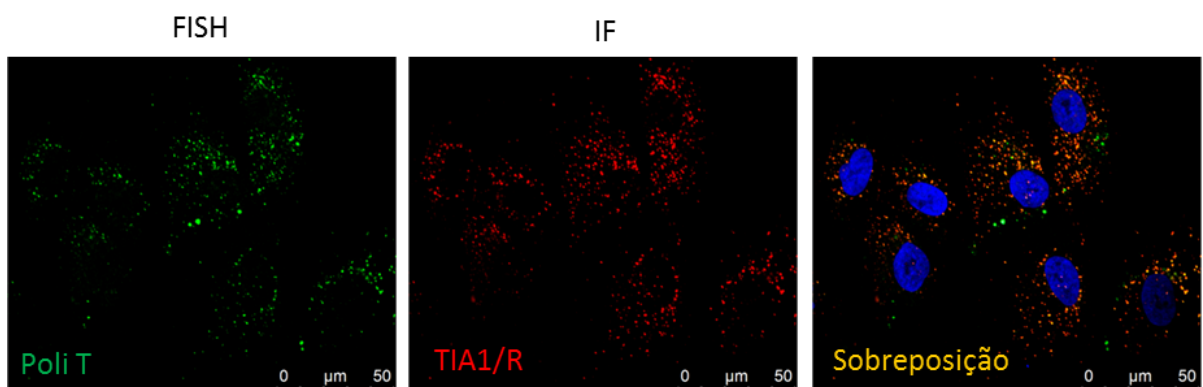


Figura 4.13. Grânulos de TIA1/R possuem mRNA em ADSC-Bariátrica.

Fonte: Patrícia Shigunov

Legenda: Ensaios de FISH revelaram que ADSC-Bariátrica possuem grânulos de mRNA (verde) em grânulos no citoplasma e que os grânulos de TIA1/R (vermelho) possuem mRNA em sua composição (amarelo). Imagem confocal.

Em ADSC-Lipo foi observado também a presença de grânulos contendo mRNA em condições padrão de cultura (figura 4.14A) e que após o estresse oxidativo, o mRNA está presente em grânulos de tamanho maior (figura 4.14B). Porém, a

visualização dos grânulos contendo mRNA foi mais evidente nas ADSCs-Bariátrica que nas ADSC-Lipo. Isto pode ser devido ao fato de que nas células isoladas de tecido adiposo proveniente de cirurgia bariátrica, o número de TIA1/R é cinco vezes maior. Além disso, os ensaios com ADSC-Bariátrica foi utilizando microscopia confocal.

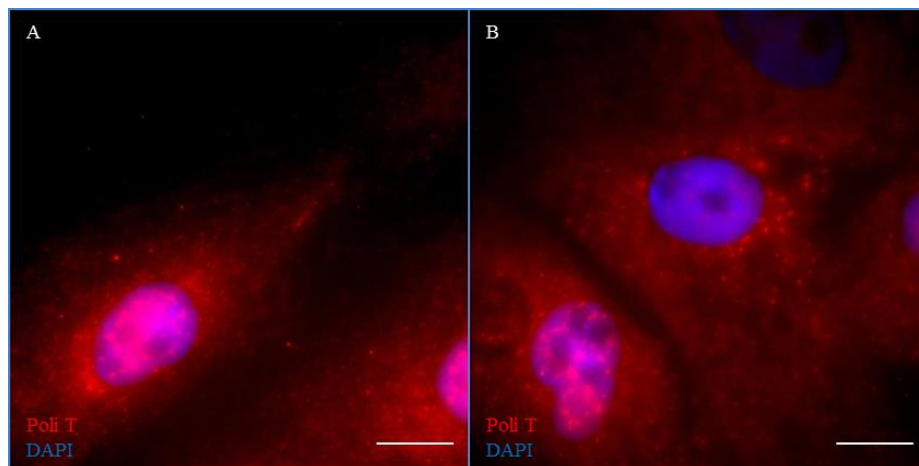


Figura 4.14. ADSC-Lipo possuem grânulos de mRNA.

Fonte: Do autor.

Legenda: Ensaios de FISH revelaram que **(A)** ADSC-Lipo possuem grânulos de mRNA (vermelho) citoplasmáticos em condições padrão de cultura e **(B)** quando submetidas a estresse o mRNA aparece em grânulos maiores. Barra = 20 µm

Os grânulos de TIA1/R não só contem mRNA como são dependentes dele para que os grânulos se mantenham formados. Tratamento com RNase A levaram a desmontagem dos grânulos de TIA1/R em ADSC-Bariátrica, indicando que esses grânulos são dependentes de mRNA (figura 4.15). A permeabilização celular para a realização do tratamento com RNase literalmente destrói as células o que dificulta encontrar um campo com diversas células impossibilitando uma análise mais precisa.

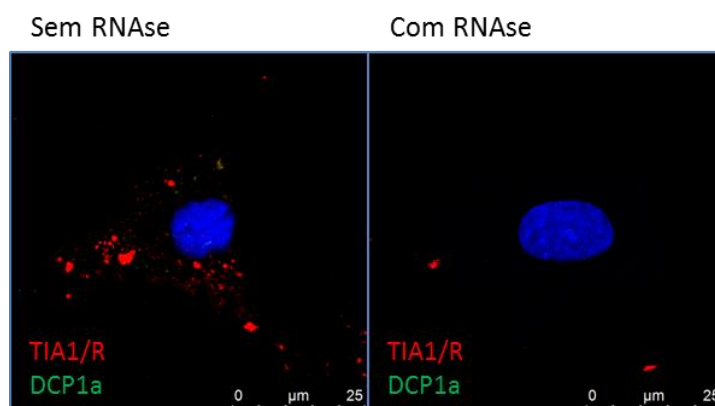


Figura 4.15. Grânulos de TIA1/R são dependentes de mRNA.

Fonte: Crisciele Kuligovski.

Legenda: Tratamento de ADSC-Bariátrica com RNase mostrou que os grânulos de TIA1/R são dependentes de mRNA uma vez que estes desapareceram após o tratamento. Imagem confocal.

4.7 Grânulos de TIA são visíveis com anti-TIA1/R, mas não com anti-TIAR e anti-TIA1

Considerando a peculiaridade dos grânulos de TIA1/R presentes nas células-tronco multipotentes, se faz necessário frisar que esses grânulos são visualizados exclusivamente com um dos anticorpos utilizados contra a proteína TIA. Para facilitar a comparação, a figura 16 mostra lado a lado as IFs realizadas para visualizar as proteínas TIA com os três anticorpos utilizados neste trabalho, em ADSC-Lipo, em condições de cultura não estressantes. Como já foi descrito acima, em ADSCs a presença de grânulos de TIA em condições normais de cultura está limitada ao anticorpo anti-TIA1/R da Santa Cruz Biotechnology (figura 4.16). Almejando esclarecer esta discordância, uma abordagem diferente foi realizada para determinar se esses grânulos de fato existiam, ou se tratava de um artefato de técnica e qualidade do anticorpo. Para tanto, foram construídos plasmídeos para expressar a proteína TIA1 fusionada com proteínas fluorescentes e, assim, determinar a localização dessa proteína.

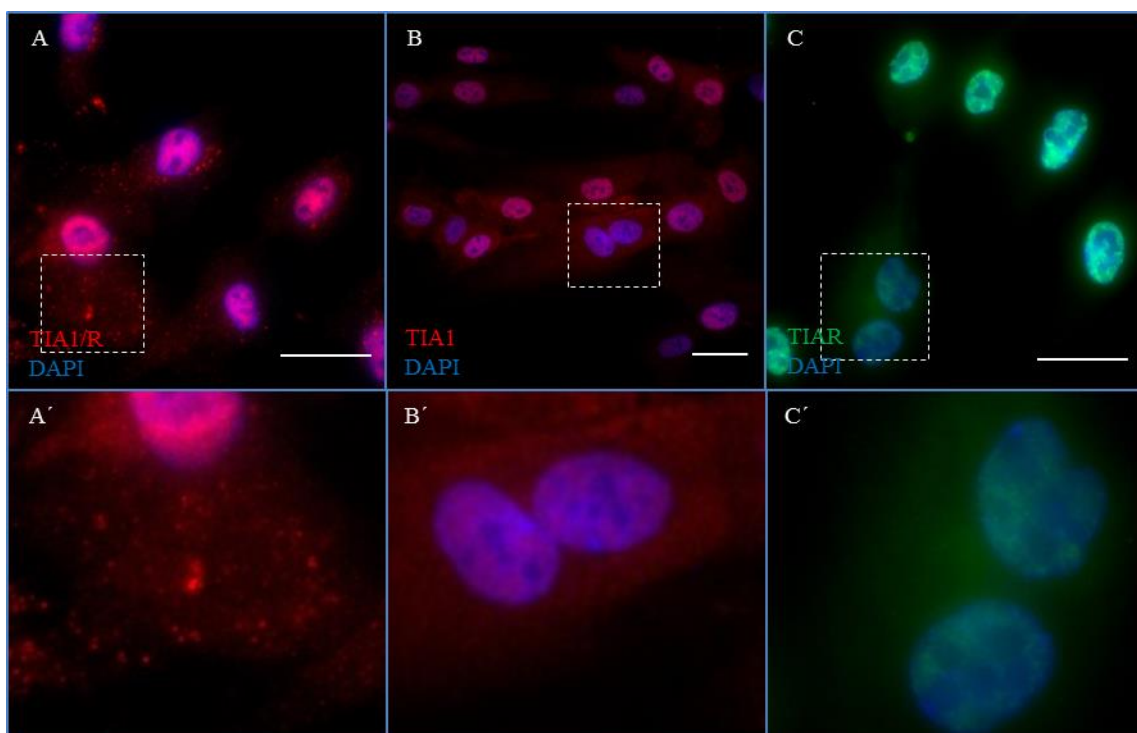


Figura 4.16. Grânulos de TIA são visíveis somente com anti-TIA1/R.

Fonte: Do autor.

Legenda: ADSCs possuem grânulos de TIA citoplasmáticos em células não estressadas. **A-A'**. A visualização desses grânulos está limitada à utilização do anticorpo anti-TIA1/R. **B-C**. Não é possível visualizar grânulos de TIA utilizando os anticorpos anti-TIA1 e anti-TIAR. As linhas pontilhadas no painel superior indicam a região aumentada representado no painel inferior. Barra = 50 µm

4.8 É possível obter alta eficiência de transfecção em ADSCs somente com nucleotransfecção e não com lipídios catiônicos

Antes de mostrar os resultados referentes à fusão de TIA com proteínas fluorescentes será considerada a padronização da transfecção de células-tronco adultas que são sabidamente alvos difíceis de serem transformados.

O plasmídeo de expressão pEGFP que contém a *Green Fluorescent Protein* (GFP) foi utilizado para verificar a eficiência de transfecção. Dois métodos de transfecção distintos foram empregados: um com lipídios catiônicos de três classes e/ou fabricantes distintos, e outro por transfecção direta do plasmídeo utilizando o eletroporador Nucleofector da Lonza.

Os lipídios catiônicos utilizados foram a Lipofectamina 2000, FugeneHD, e Oligofectamina. Após 24 horas de transfecção, as células foram analisadas por citometria de fluxo. Uma baixa quantidade de células positivas foi observada para os três reagentes testados. Com a Lipofectamina 2000 foi obtido 17% de células positivas para GFP, 8% com Oligofectamina e 16% com FugeneHD (figura 4.17).

A nucleotransfecção com Nucleofector é uma eletroporação com reagentes específicos e com condições já pré-determinados pelo fabricante. Duas configurações recomendadas pelo fabricante para células-tronco foram testados, o U23 e C17. O número de células positivas para GFP foi de até 85% com o método U23 e 60% com o método C17 (figura 4.17).

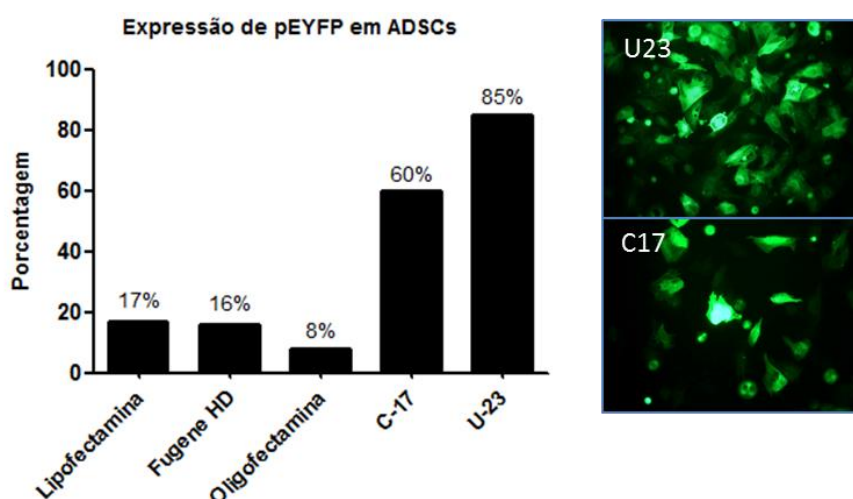


Figura 4.17. Transfecção de plasmídeos em ADSCs.

Fone: Do autor.

Legenda: Foi padronizada a transfecção de plasmídeos em ADSCs. Foram utilizados três lipídios catiônicos distintos, mas foi obtido no máximo 17% de células positivas para GFP. Foi obtido até 85% de transfecção utilizando eletroporação.

4.9 Anti-TIA1/R reconhece, pelo menos, TIA1.

Para determinarmos a localização da proteína TIA1 em ADSCs foi realizada a clonagem do gene de TIA1 fusionado com os genes de *Cyan Fluorescent Protein* (pCFP) ou *Yellow Fluorescent Protein* (pYFP). Todas as fusões foram realizadas na porção carboxi-terminal da proteína TIA1.

Após a clonagem de TIA1 em pGEM-T (pGEM-T-TIA1) foi feita a clonagem nos plasmídeos de expressão em eucariotos. A clonagem foi confirmada por digestão (figura 4.18 A) e foi realizado o sequenciamento para verificar se os plasmídeos estavam em fase correta de leitura.

Primeiramente, os plasmídeos foram transfectados em células HeLa a fim de verificar a funcionalidade do plasmídeo em expressar TIA1. A transfecção foi realizada com Lipofectamina 2000 e, após 24 horas, as células foram submetidas a estresse oxidativo e analisadas por microscopia de fluorescência. Foi possível observar a formação de grânulos de estresse não só nas células submetidas a estresse, mas também nas células controle (figura 4.18 B).

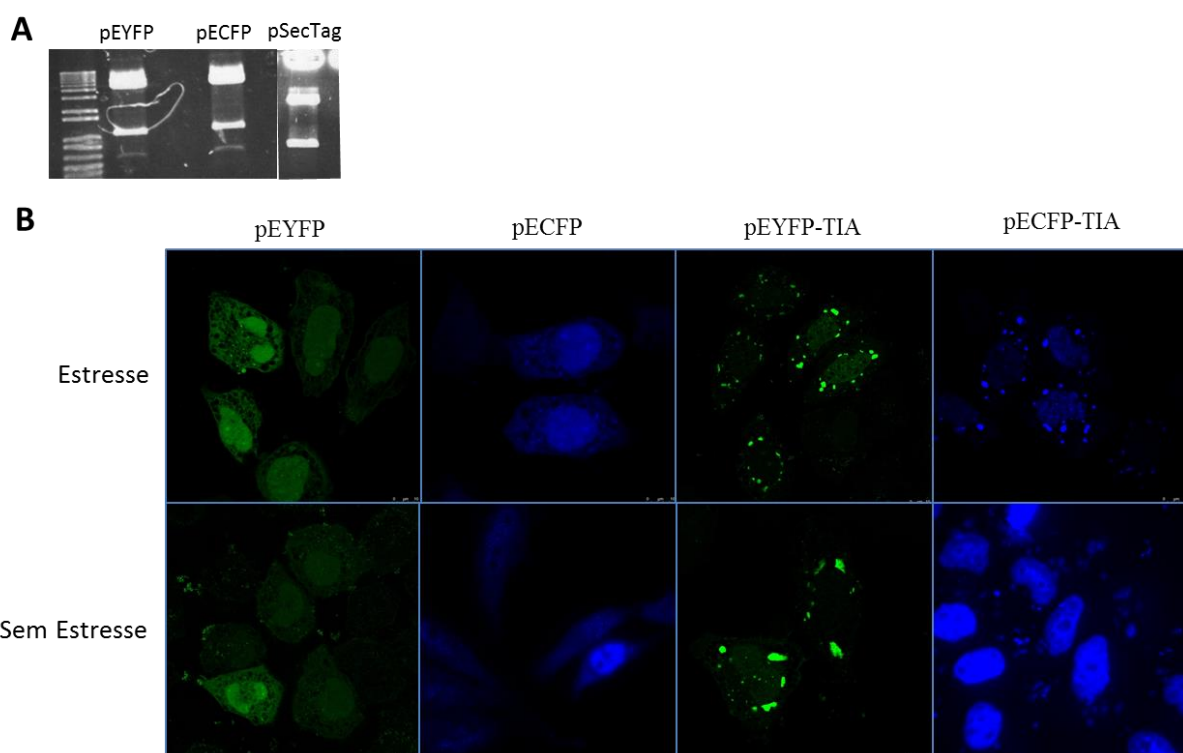


Figura 4.18. Expressão da proteína TIA1 recombinante em HeLa.

Fonte: Do autor.

Legenda: Após a fusão do gene de TIA1 com os genes para expressão de proteínas fluorescentes, os plasmídeos foram transfectados em HeLa. Foi observado que houve a formação de GE até mesmo nas células que não foram induzidas a estresse.

Foi realizada a transfecção dos plasmídeos em ADSCs-Bariátrica. Interessantemente, apesar de observados grânulos de TIA1 em células não estressadas, houve uma diminuição significativa desses grânulos no citoplasma (figura 4.19 B) em comparação com células não transfectadas (ver figura 4.2 I). Quando submetidas a estresse não foi observada a formação de GE típicos nessas células (figura 4.19 C). Juntamente com a transfecção do plasmídeo, foram realizados ensaio de imunofluorescência com o anticorpo TIA1/R, e foi observado que o anticorpo reconhece a proteína TIA1 recombinante (figura 4.19 B e C). Além disso, ensaios de Western Blot (WB) foram realizados e mostraram que, tanto o anticorpo anti-TIA1 como anti-TIA1/R, reconhecem a proteína do tamanho de aproximadamente 70 kDa, que corresponde a proteína TIA1 conjugada com YFP (figura 4.19 D faixa 4 e 6).

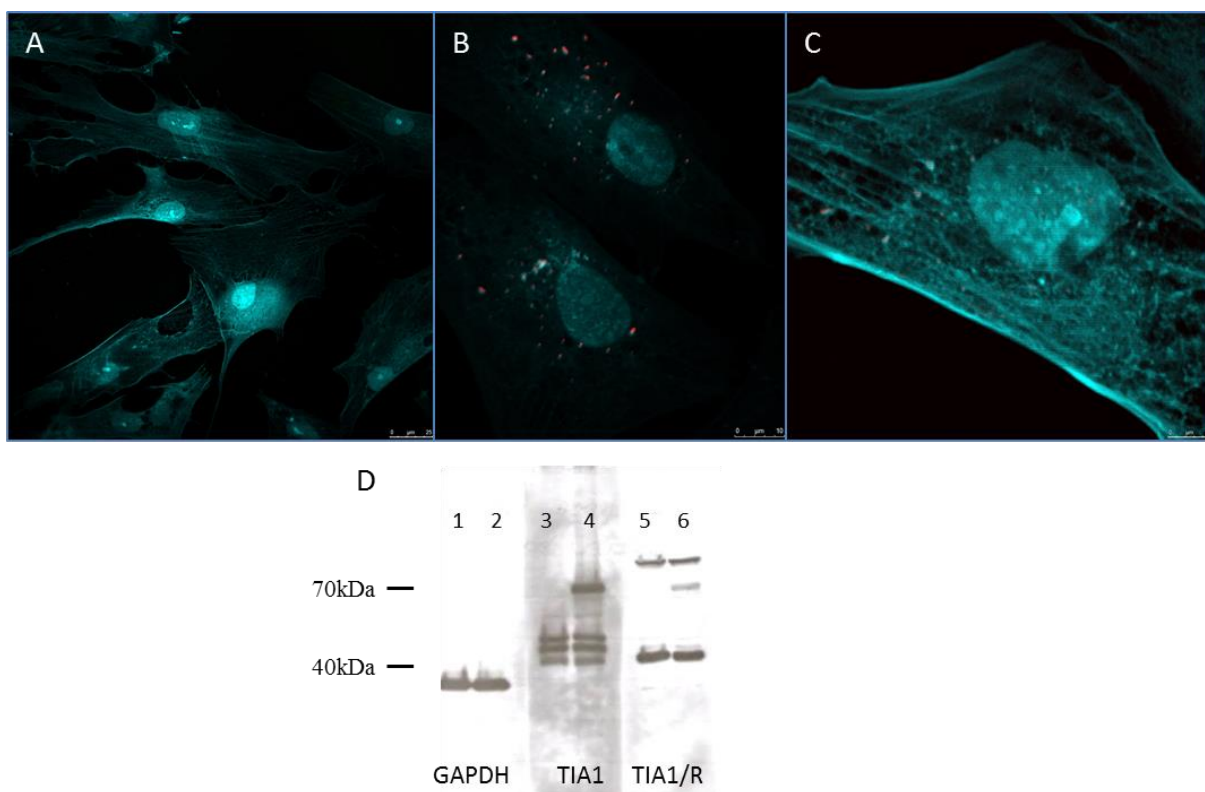


Figura 4.19. Anti-TIA1/R reconhece a proteína recombinante TIA1.

Fonte: Do autor.

Legenda: **A.** ADSC-Bariátrica transfectadas com pECFP-TIA1 e IF utilizando anti-TIA1/R mostrando a colocalização desses grânulos. **B e C.** ADSC-Bariátrica transfectadas com pECFP-TIA1 e IF utilizando anti-TIA1/R mostrando a colocalização desses grânulos. **D.** WB de ADSC-Bariátrica transfectadas com pEYFP-TIA utilizando os anticorpos anti-TIA1/R e anti-TIA1 indicando que ambos os anticorpos reconhecem a proteína TIA1 recombinante o que corresponde a banda de aproximadamente 70 kDa.

Apesar de ter sido observado a formação de grânulos de TIA1 em ADSC-Bariátrica e que esses grânulos diminuem quando submetidas ao estresse, assim como foi observado nos ensaios de imunofluorescência nessas células, não demos

continuidade com os experimentos com a proteína recombinante devido ao fato de células HeLa possuírem GE em condições padrão de cultura.

4.10 Os PB e grânulos de TIA1/R em ADSC estão relacionados ao potencial de diferenciação

Nos resultados anteriores foi mostrada a presença de grânulos de TIA1/R e baixo número ou ausência de PB em ADSCs. Considerando que células fenotipicamente muito semelhantes, mas que carecem do potencial de diferenciação, os fibroblastos, não apresentam esse arranjo particular de grânulos, a seguinte hipótese de trabalho foi levantada: os grânulos citoplasmáticos presentes nas células-tronco adultas estão relacionados ao potencial de diferenciação dessas células. Para responder a essa questão, três abordagens foram delineadas: ensaios de IF em ADSCs antes e após a diferenciação adipogênica; submissão das ADSCs à diferenciação após tratamento com drogas que desmontam os grânulos e, finalmente, ensaios de RNA de interferência para alguns componentes dos grânulos, em células submetidas à diferenciação.

4.11 A quantidade de PB aumentam em ADSC durante as primeiras horas de diferenciação

ADSCs-Lipo e ADSCs-Bariátrica possuem em média 22.60 ± 3.462 e 106.9 ± 10.19 grânulos de TIA/R por célula respectivamente. Após 24 horas de diferenciação adipogênica foi observado que em ADSC-Lipo, apesar de aumentar o número esses grânulos (31.50 ± 3.841) a diferença não é estatisticamente significativa (figura 4.20 A e C). Em ADSC-Bariátrica a quantidade desses grânulos se mantem praticamente inalterado (105.0 ± 10.72) (figura 4.20 C). Por outro lado, há um aumento significativo na quantidade de PB tanto em ADSC-Lipo (1.968 ± 0.2011 para 25.20 ± 1.744) (figura 4.20 B e C) como ADSC-Bariátrica (4.575 ± 0.5573 para 9.092 ± 1.259) (figura 4.20 C) após 24 horas de indução adipogênica.

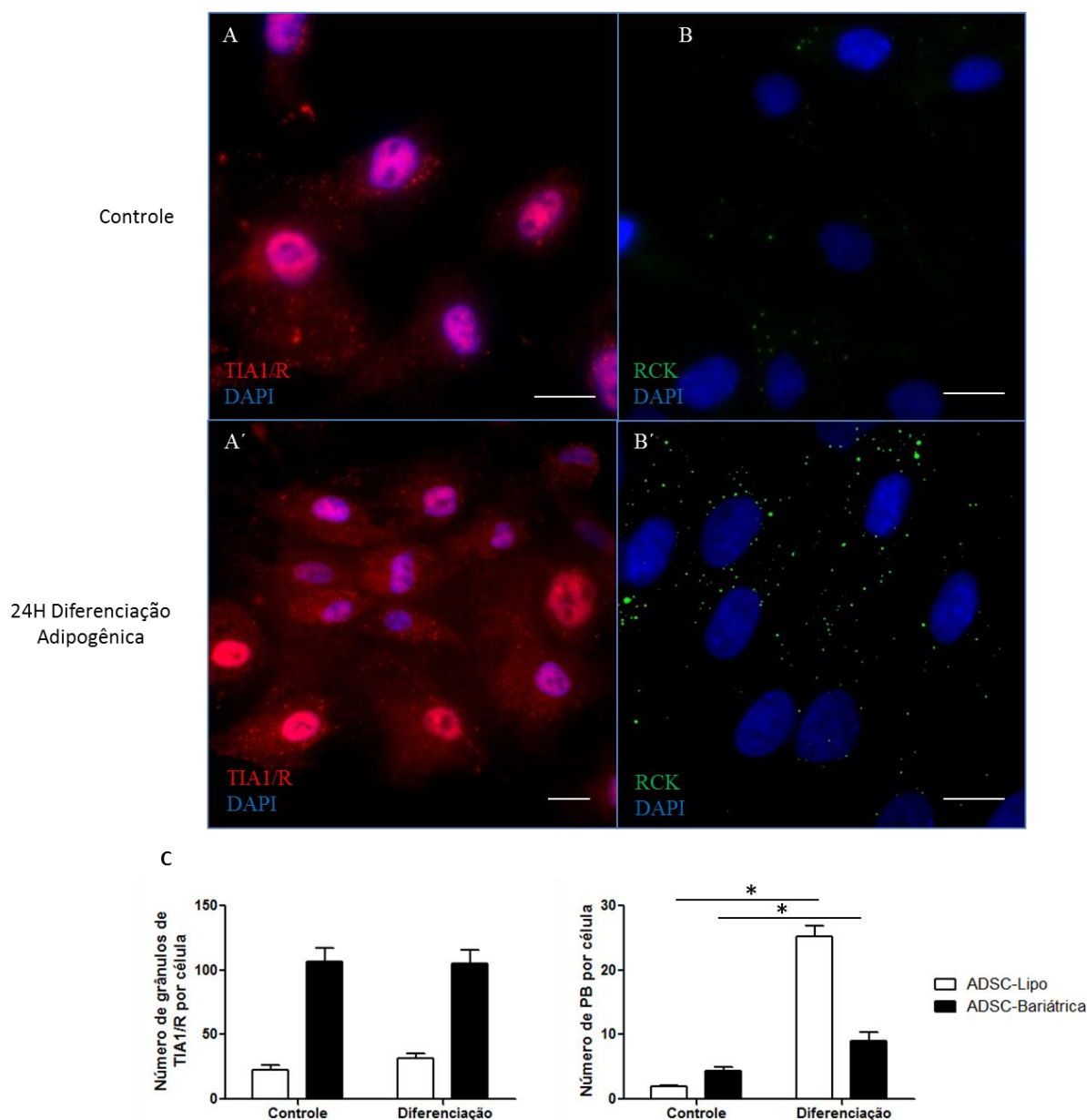


Figura 4.20. Quantificação de PB e grânulos de TIA1/R em ADSCs após 24 horas de diferenciação adipogênica.

Fonte: Do autor.

Legenda: ADSC foram induzidas à diferenciação adipogênica e, após 24 horas, foi realizado ensaio de IF. Não há um aumento significativo de grânulos de TIA1/R em ADSCs (**A e C**). A quantificação de PB revelou que tanto ADSC-Lipo (**B e C**) como ADSC Bariátrica (**C**) há um aumento significativo após 24 horas de indução a diferenciação adipogênica. Barra = 20 μ m. $p=0,05$.

Foi observado também que, tanto em ADSCs-Bariátrica como ADSC-Lipo, há um aumento na quantidade de PB nos primeiros dias de diferenciação adipogênica e, após 12 dias, a quantidade de grânulos se assemelha às células HeLa (figura 4.21 A). Durante a diferenciação foi observado também que os grânulos de TIA1/R diminuem e praticamente desaparecem após 14 dias de diferenciação (figura 4.21 B).

A figura 4.20 mostra ADSC-Bariátrica em condições normais com grande quantidade de grânulos de TIA1/R (figura 4.21 C) seguido da diminuição desses grânulos e aumento de PB após 7 e 14 dias de diferenciação (figura 4.21 D e E).

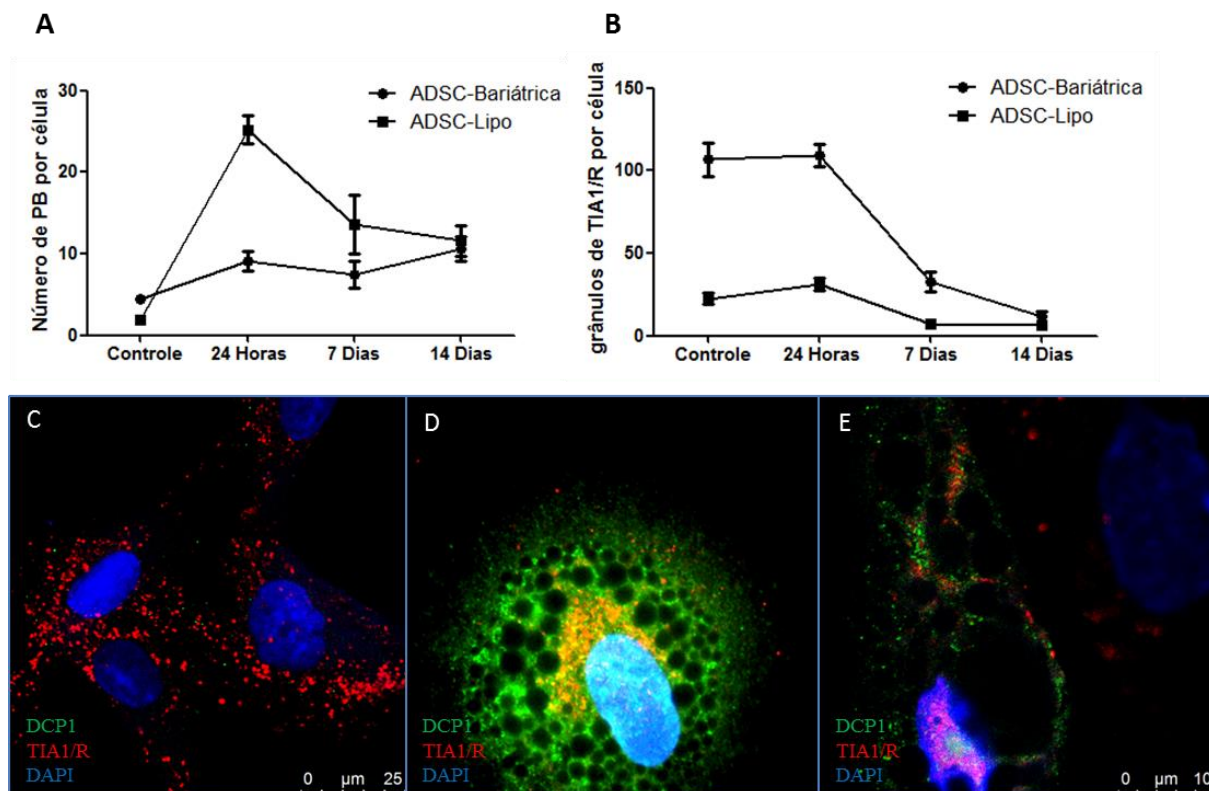


Figura 4.21. A quantidade de grânulos de TIA1/R diminui e o número de PB aumenta ao longo da diferenciação.

Fonte: Do autor.

Legenda: Há um aumento significativo de PB nas primeiras horas de diferenciação adipogênica em ADSC-Lipo(A) seguido de diminuição na quantidade de PB após 14 dias de diferenciação. Os grânulos de TIA1/R praticamente desapareceram após 14 dias de diferenciação em ADSC (B). (C). ADSC-Bariátrica sem indução à diferenciação e após 7 dias (D) e 14 dias (E) de diferenciação indicando a diminuição de grânulos de TIA1/R e aumento em número de PB.

4.12 Tratamento com cicloheximida diminui significativamente a diferenciação de ADSC em adipócitos

Após ter sido verificado que há um aumento de PB e de grânulos de TIA1/R após as primeiras horas de diferenciação adipogênica, indagamos se esses grânulos teriam algum papel importante para a diferenciação. Para responder essa questão, ADSCs-Bariátrica foram tratadas com cicloheximida, uma droga capaz de desmontar grânulos de estresse em células HeLa, uma vez que ela mantém o ribossomo associado ao mRNA, impedindo que o mRNA fique disponível e possa se associar aos GE(GILKS et al., 2004) . Primeiramente, foi mostrado que a cicloheximida também é capaz de desmontar grânulos de TIA em ADSC-Bariátrica (figura 4.22 A e

B). Esse dado indica que os grânulos de TIA1/R de ADSCs de alguma forma interagem com polissomos.

Após 1 hora de tratamento com a droga foi adicionado às células meio de diferenciação adipogênica e elas foram mantidas em cultura por 21 dias na ausência de cicloheximida. Foi observado que houve uma diminuição no acúmulo de lipídios nas células tratadas com cicloheximida (figura 4.22 C e D) e, além disso, a quantidade de células que entraram em diferenciação foi diminuída (figura 4.22 E). Devido ao fato de que a cicloheximida tem um efeito pleiotrópico sobre as células afetando a tradução e, assim, muitos outros processos celulares, partimos para uma terceira abordagem, a fim de determinar mais claramente a relação entre os grânulos e a diferenciação dessas células, utilizando como ferramenta, a técnica de RNA de interferência.

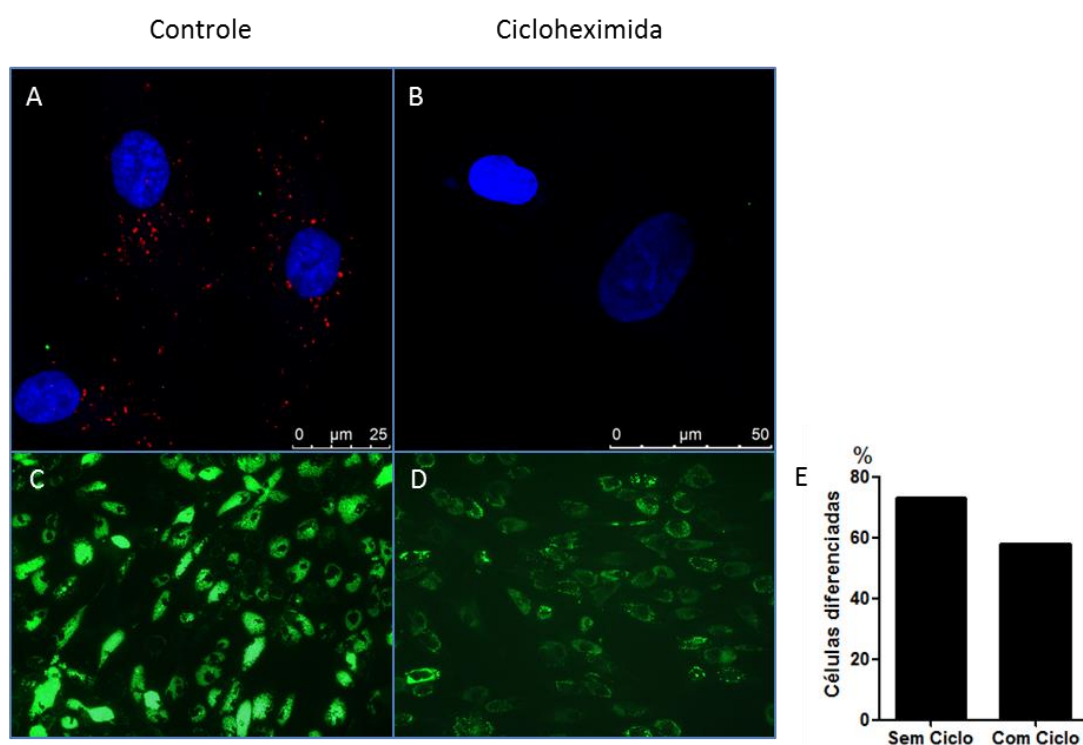


Figura 4.22. Diferenciação adipogênica após tratamento com cicloheximida diminui acúmulo de lipídios.

Fonte: Do autor.

Legenda: ADSCs foram tratadas com cicloheximida por uma hora, seguido de diferenciação adipogênica por 21 dias. **A.** ADSC-Bariátrica controle, sem tratamento com cicloheximida. Imagem confocal **B.** ADSC-Bariátrica após tratamento com cicloheximida. Os grânulos de TIA1/R desaparecem após o tratamento. Imagem confocal **C.** 21 dias de diferenciação adipogênica sem tratamento. **D.** 21 dias de diferenciação adipogênica após tratamento com cicloheximida. A quantidade de lipídios acumulados nas células diminui significativamente. **E.** A quantidade de células que entrou em diferenciação também diminuiu nas células tratadas com cicloheximida.

4.13 Silenciamento de alvos específicos de grânulos de TIA1/R e PB resulta em diferenciação prematura em adipócitos

Foi realizado silenciamento gênico por RNA de interferência (RNAi) de alvos específicos de PB e de TIA1/R, a fim de desmontar somente os grânulos de interesse.

A técnica de RNA de interferência baseia-se na biologia de microRNAs (ver figura 1.6) e consiste na transfecção de oligos de RNA sintéticos de aproximadamente 21 nucleotídeos que, uma vez no citoplasma e associado à maquinaria de miRNA, pode levar à degradação ou inibição do RNA mensageiro alvo (WILSON; DOUDNA, 2013).

Foram selecionados como alvos para o silenciamento gênico TIAR, TIA1, DCP2, RCK e TTP. Também foi feita a combinação dos oligos de TIA1 e TIAR e a combinação de TIAR com RCK e de DCP2 com RCK. Como controle negativo foi utilizado um oligo que não possui mRNA eucariótico como alvo.

4.13.1 siRNA em ADSCs diminui a quantidade de grânulos citoplasmáticos

O silenciamento dos mRNAs alvos em ADSC-Lipo foi realizado concomitantemente com a indução à diferenciação adipogênica. Após 24 horas de silenciamento foi verificado, por WB, a diminuição da expressão das proteínas e, por IF, a desmontagem dos grânulos. A figura 4.23 A mostra a diminuição da expressão das proteínas RCK (78%), TTP (68%), DCP2 (45%), TIA1 (21%), TIAR (74%), TIA1/R (38%). A normalização foi realizada em relação à expressão de HPRT e para a quantificação, o controle negativo foi utilizado como referência.

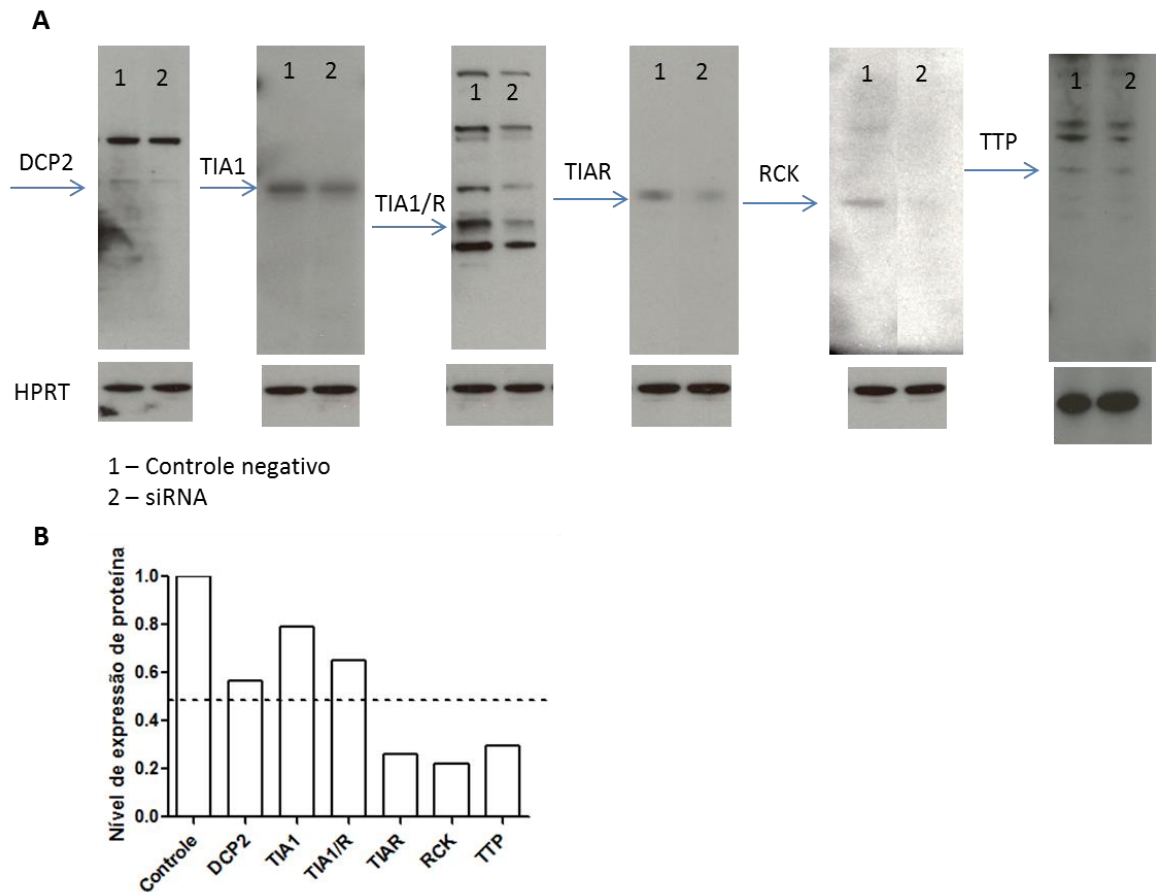


Figura 4.23. Silenciamento de TIA e componentes de PB em ADSCs.

Fonte: Do autor.

Legenda: **A.** Western Blot após 24 horas de transfecção dos diferentes siRNAs e 24 horas de diferenciação adipogênica. **B.** Quantificação do nível de expressão das proteínas de interesse. Há uma diminuição significativa de TIAR, RCK e TTP. A quantificação foi realizada com auxílio do software ImageJ.

Para os ensaios de IF foram utilizados siRNAs para TIAR e RCK que foram os alvos com diminuição proteica mais significativos. A avaliação do silenciamento para RCK foi realizado utilizando ADSCs transfectadas com siRNA para RCK e ADSCs transfectadas com o siRNA para o controle negativo. Foi verificado por IF os grânulos citoplasmáticos utilizando anti-RCK e anti-TIA1/R, a fim de observar se o silenciamento de RCK poderia afetar os grânulos de TIA1/R. Neste experimento não foi realizada a contagem de grânulos por célula e não foram avaliadas quantas células possuíam grânulos. As imagens revelam que há uma aparente diminuição de PB após 24 horas de silenciamento e diferenciação celular quando comparado com o controle negativo (figura 4.24 A e B) e que o siRNA para RCK parece não afetar os grânulos de TIA1/R (Figura 4.24 C).

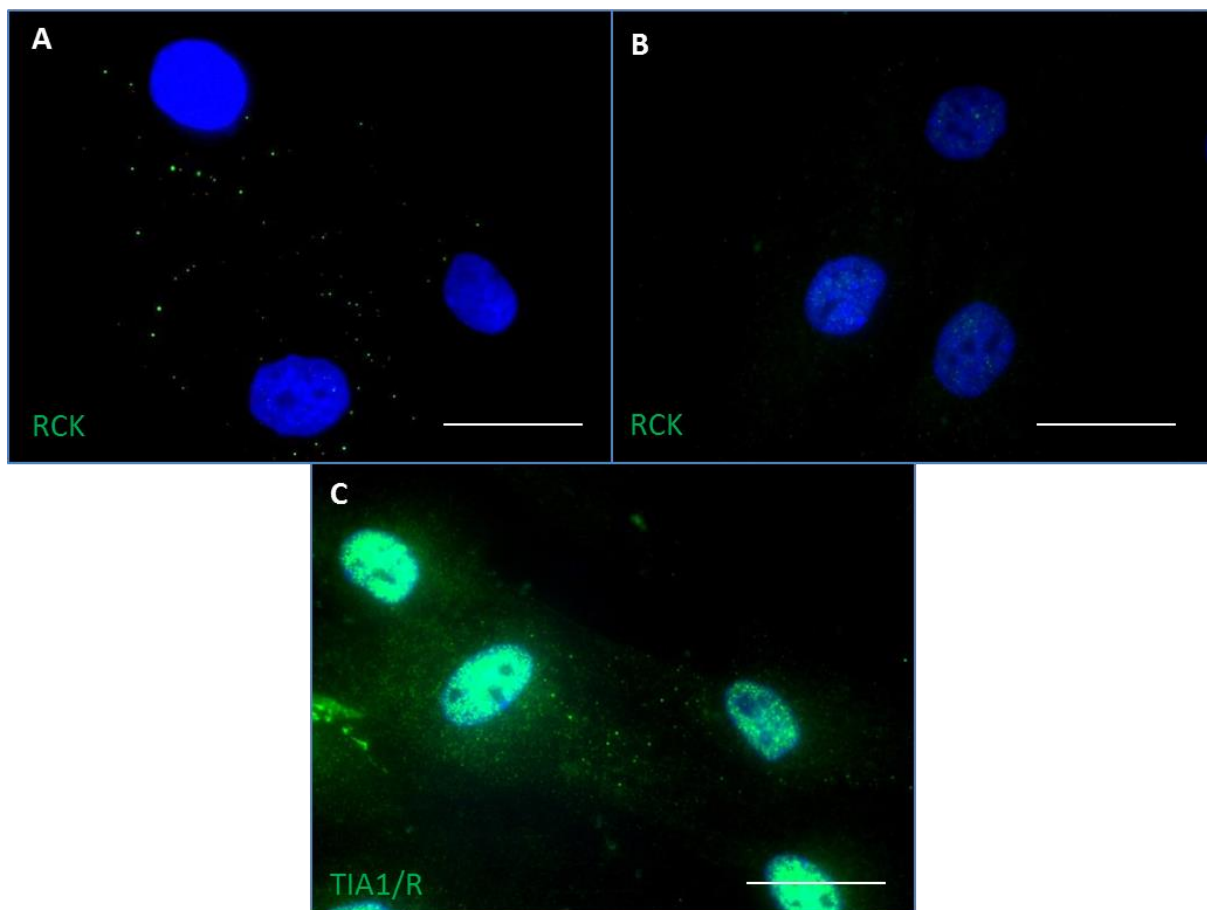


Figura 4.24. Silenciamento de RCK em ADSCs.

Fonte: Do autor.

Legenda: As células foram transfectadas com oligos de siRNA e concomitantemente foi realizada a indução a diferenciação adipogênica. Os ensaios de IF foram realizados após 24 horas da transfecção. **A.** ADSCs transfectadas com siRNA controle negativo e IF para RCK. **B.** ADSCs transfectadas com siRNA para RCK e IF para RCK, com nítida observação da diminuição na quantidade de PB. **C.** ADSCs transfectadas com siRNA para RCK e IF para TIA1/R. A desmontagem dos PB não afeta os grânulos de TIA1/R. Barra=50 μ m

Assim como no ensaio siRNA para RCK também foi realizado o silenciamento com siRNA para TIAR e IF utilizando anti-RCK e anti-TIA1/R. A fim de verificar se o silenciamento de TIAR poderia afetar os PB. O siRNA de TIAR não afetou os grânulos de RCK (figura 4.25 A). Apesar de não ter sido quantificado, o silenciamento de TIAR parece diminuir a quantidade global grânulos de TIA1/R quando comparado com o controle negativo, mas alguns grânulos permanecem remanescentes após o silenciamento (figura 4.25 B e C).

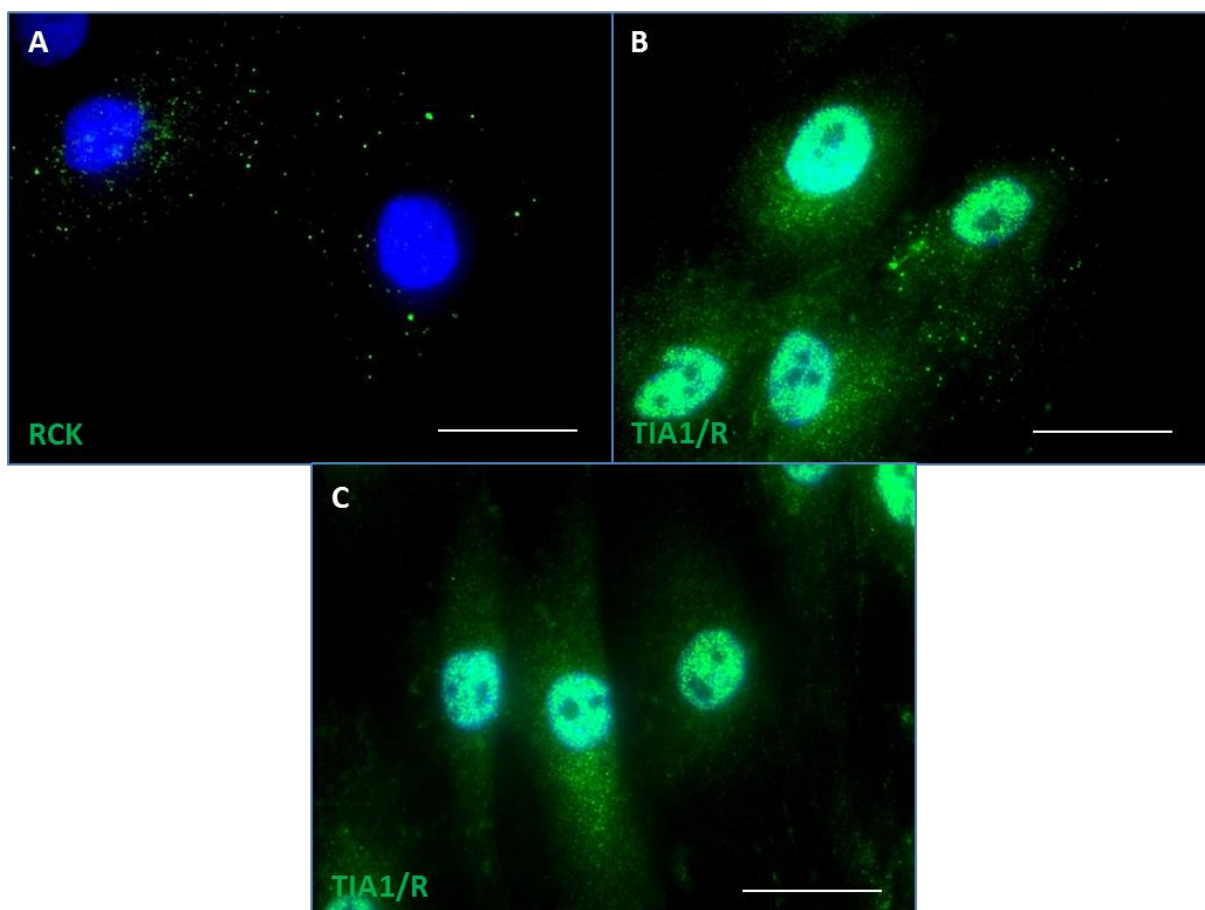


Figura 4.25. Silenciamento de TIAR em ADSCs.

Fonte: Do autor.

Legenda: As células foram transfectadas com oligos de siRNA e concomitantemente foi realizada a indução a diferenciação adipogênica. Os ensaios de IF foram realizados após 24 horas da transfecção **A.** ADSCs transfectadas com siRNA para TIAR e IF para RCK. O silenciamento de TIAR não afeta a constituição dos grânulos de RCK. **B.** ADSCs transfectadas com siRNA controle negativo e IF para TIA1/R. **C.** ADSCs transfectadas com siRNA para TIAR e IF para TIA1/R. O silenciamento de TIAR parece afetar globalmente os grânulos de TIA1/R apesar desses grânulos não desaparecerem por completo. Barra=50 µm

4.13.2 O silenciamento de componentes de PB e de GE aumenta o acúmulo de lipídios em ADSC durante a diferenciação adipogênica

Uma vez verificada a eficiência dos siRNAs em desmontar os grânulos foi questionado qual seria o efeito do silenciamento desses componentes na diferenciação. Para isso, ADSCs-Lipo foram transfectadas com siRNA para RCK e TIAR, concomitantemente com a indução da diferenciação adipogênica por 7 dias. Foi possível observar que houve um aumento de lipídios nas células silenciadas após 7 dias de diferenciação (figura 4.26 A-D) e que esse aumento está relacionado a um maior acúmulo de lipídios nas células que entram em diferenciação, já que a quantidade de células diferenciadas é o mesmo (figura 4.26 E).

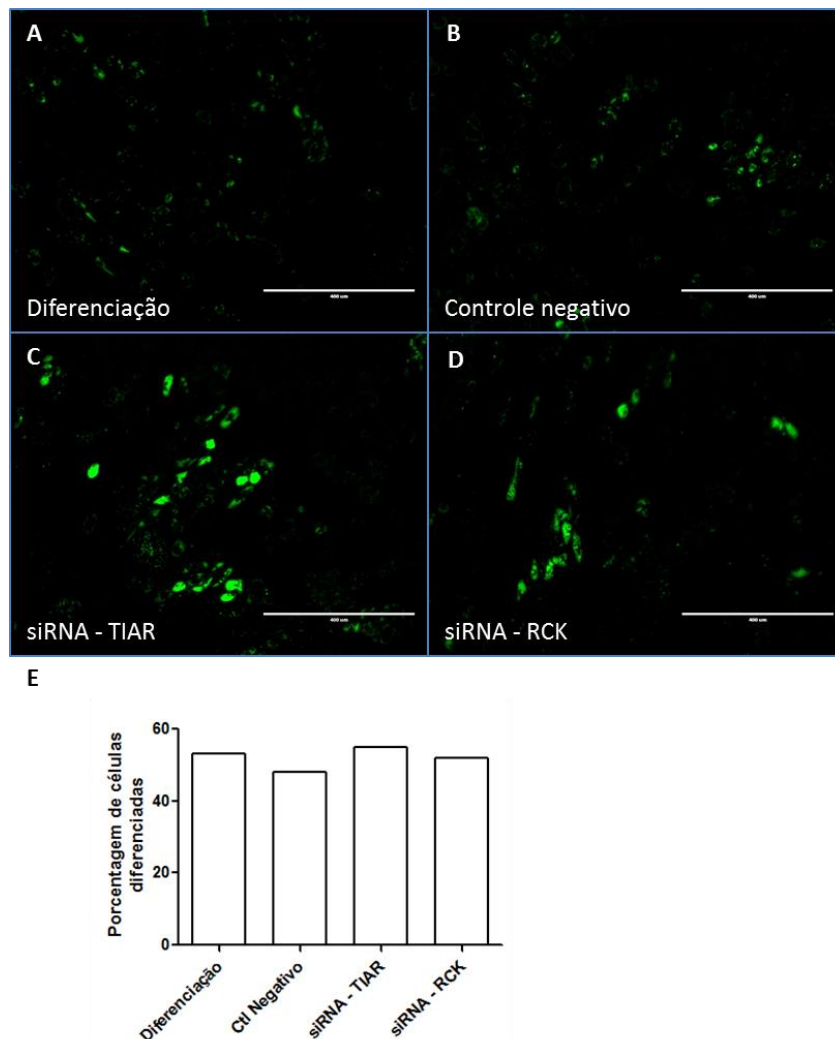


Figura 4.26. Silenciamento de TIAR e RCK em ADSCs e diferenciação adipogênica.

Fonte: Do autor.

Legenda: As ADSCs foram transfectadas com os siRNAs para TIAR e RCK, seguido de diferenciação adipogênica por 7 dias. **A.** Diferenciação adipogênica sem a utilização de siRNAs. **B.** Diferenciação adipogênica utilizando siRNA para o controle negativo. **C.** Diferenciação adipogênica e siRNA para TIAR. **D.** Diferenciação adipogênica e siRNA para RCK. **E.** Porcentagem de células que entraram em diferenciação. Foi considerado como célula diferenciada qualquer nível de acúmulo de lipídios. $n=3$. Barra = 400 μ m.

Em um segundo ensaio, em maior escala, foi realizada a indução adipogênica concomitantemente com o silenciamento dos demais mRNA alvos com os siRNAs selecionados (TIA1, TIAR, TIA1/R, RCK, DCP2, TTP e controle negativo). As células foram mantidas em cultura por 4, 7 e 12 dias e, após este período, as células foram marcadas com AdipoRed e a quantificação foi realizada por RFU (*Relative Fluorescence Unit*). Observamos que houve um aumento consistente na diferenciação nos primeiros quatro dias com os siRNAs para TIAR, RCK e TTP (figura 4.27 A) que se estendeu até o décimo segundo dia de diferenciação. Quando compilados os dados de todos os doadores, a diferença chega a 200% para os silenciamentos de TIAR e RCK, em relação ao controle negativo (figura 4.27 B).

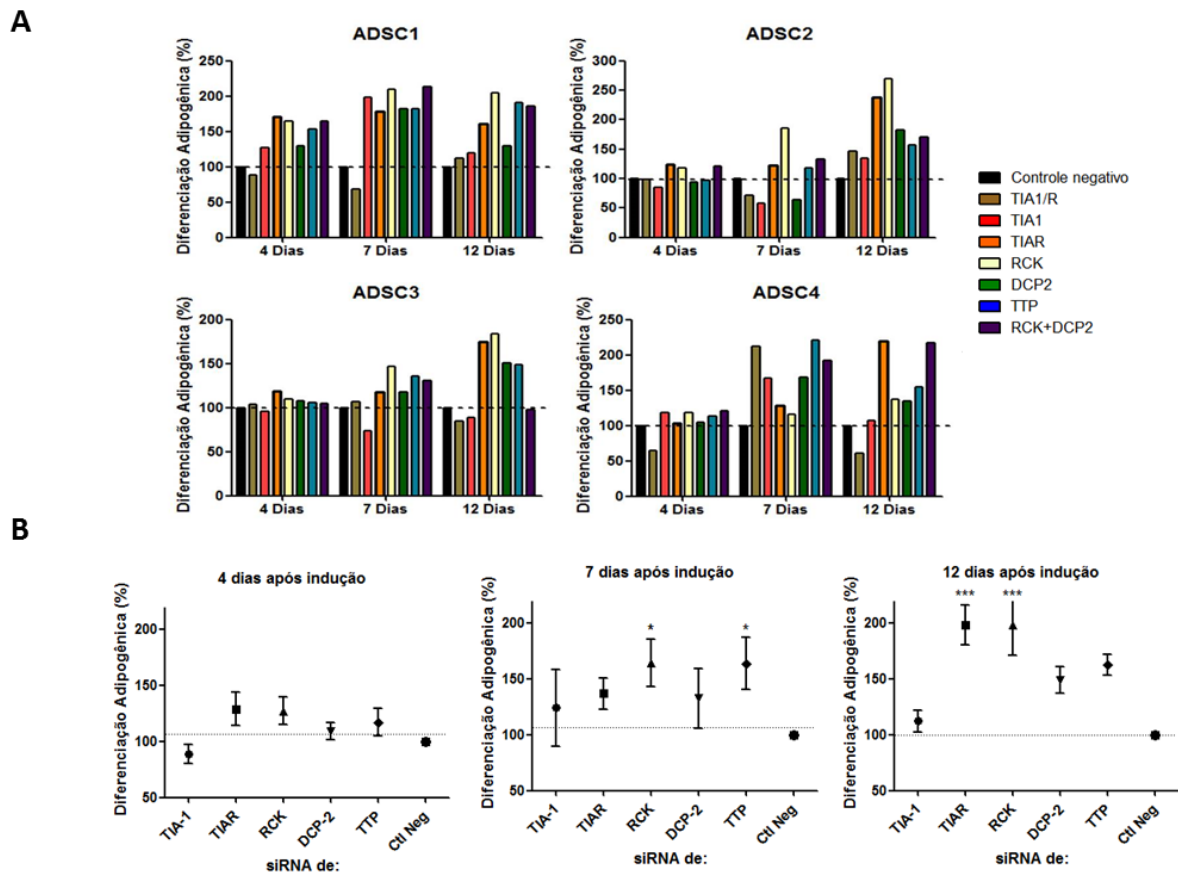


Figura 4.27. Grânulos de TIA e PB estão envolvidos na diferenciação adipogênica.

Fonte: Do autor.

Legenda: **A.** ADSC-Lipo foram induzidas à diferenciação adipogênica que foi realizada juntamente com siRNAs para os diferentes mRNA alvos e mantidas em cultura por 4, 7 e 12 dias. **A.** Silenciamentos para TIAR, RCK e TTP consistentemente aumentaram a diferenciação adipogênica em todos os doadores. **B.** Dados de todos os doadores compilados. Há um aumento de até 200% na diferenciação após 12 dias de diferenciação para TIAR e RCK. * $p=0.01$, ** $p<0,0001$

Nossos resultados indicam que os grânulos de TIA e os PB estão envolvidos no processo de diferenciação de ADSCs e que, quando esses grânulos não estão presentes nas células, há um aumento de até 200% na diferenciação. A partir disso foi questionado se somente a desmontagem dos grânulos seria suficiente para que as células entrassem em diferenciação *per se*.

4.13.3 Somente a desmontagem dos grânulos não é suficiente para induzir a diferenciação adipogênica em ADSC

Para responder se somente o silenciamento e a desmontagem dos grânulos seria capaz de induzir as células à diferenciação foi realizado o silenciamento dos mesmos alvos utilizando siRNAs e as células foram mantidas com meio de cultura sem a adição de meio de diferenciação. Como controles foram utilizados: ADSCs sem diferenciação e sem siRNA (Sem Dif.), ADSCs induzidas a diferenciação e sem

siRNAs (Ctl Dif.) e ADSCs sem indução a diferenciação e transfecção com controle negativo de siRNA (Ctl. Neg.). As ADSCs foram mantidas em cultura por 12 dias e a diferenciação foi mensurada por RFU. Observamos que somente a desmontagem dos grânulos não foi suficiente para que essas células entrassem em diferenciação (figura 4.28).

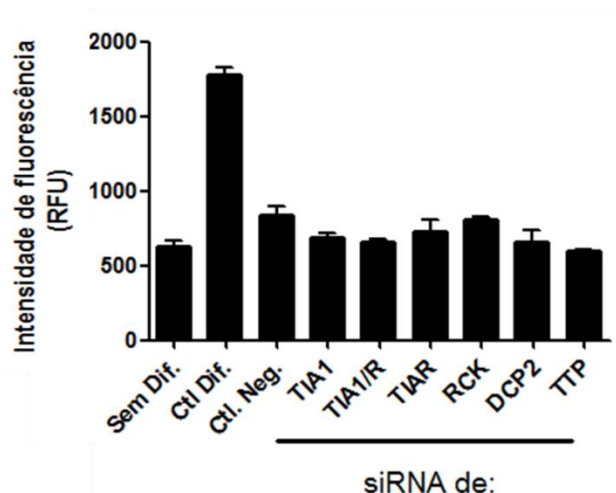


Figura 4.28. A desmontagem de grânulos citoplasmáticos não é suficiente para induzir a diferenciação adipogênica sem adição dos fatores de diferenciação.

Fonte: Do autor.

Legenda: Somente o silenciamento de componentes de PB e de grânulos de TIA não foi suficiente para induzir ADSCs à diferenciação adipogênica, sem que houvesse adição de meio de cultura contendo os fatores de indução adipogênica.

4.13.4 O silenciamento em pré-adipócitos não é capaz de induzir as células à diferenciação adipogênica.

Buckingham e colaboradores mostraram que grânulos de RCK estão presentes em células musculares pré-diferenciadas e esses grânulos estariam envolvidos no processo rápido de diferenciação dessas células em fibras musculares (CRIST; MONTARRAS; BUCKINGHAM, 2012). Também é sabido que durante as primeiras horas de diferenciação adipogênica a célula começa a se diferenciar em pré-adipócito para só então se diferenciar em adipócito (FINK; ZACHAR, 2011). Nossos resultados mostraram que após 24 horas de indução à diferenciação há um aumento significativo de PB e de grânulos de TIA1/R. Foi questionado se o papel dos grânulos estaria envolvido na diferenciação da célula pré-diferenciada. Para responder essa questão, pré-adipócitos foram transfectados com oligos de silenciamento para TIA1, TIAR, RCK, DCP2 e TTP e essas células foram mantidas em cultura sem indução a diferenciação por 21 dias. Como controle foram utilizadas as células sem transfecção

e induzidas a diferenciação as células transfectadas com oligos de siRNA de controle negativo sem indução a diferenciação. As células foram coradas com AdipoRed e análises foram realizadas em microscopia de fluorescência. Foi observado que o silenciamento desses grânulos não foi suficiente para induzir essas células a diferenciação (figura 30). Indicando que o estímulo de diferenciação é necessário para que a diferenciação ocorra tanto nas ADSCs como em células pré-diferenciadas e que a desmontagem dos grânulos não é o suficiente *per se* para induzir essas células a entrarem em diferenciação.

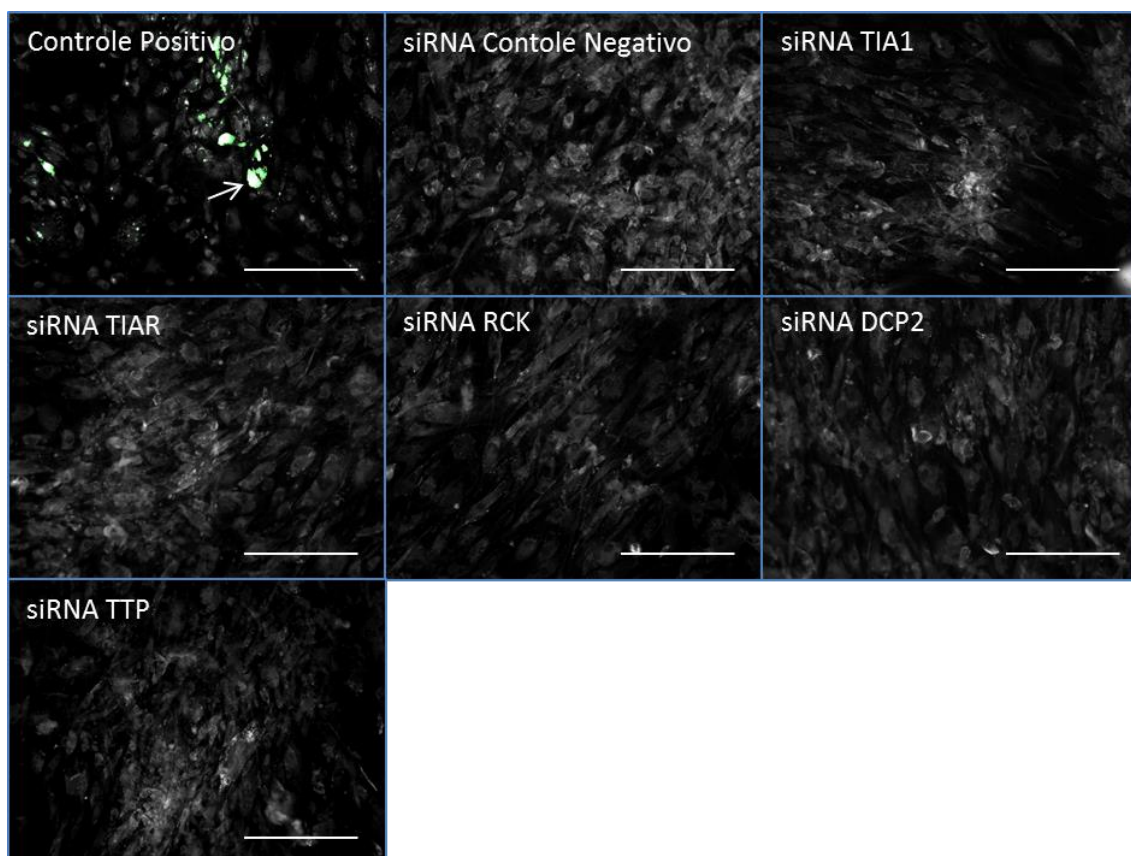


Figura 4.29. O silenciamento em pré-adipócitos não foi suficiente para induzir as células à diferenciação adipogênica.

Fonte: Do autor.

Legenda: Foi realizado RANi de componentes de PB e TIA e as células foram mantidas em cultura por 21 dias sem a adição de meio de diferenciação. Somente o silenciamento de não foi suficiente para induzir pré-adipócitos à diferenciação adipogênica, sem que houvesse adição de meio de cultura indutor de diferenciação. A seta indica uma célula diferenciada e corada com AdipoRed. $N=3$. Barra=400 μm .

5. DISCUSSÃO

O RNA mensageiro tem a função primordial de carregar a informação das ações que a célula vai exercer. Desde que o mRNA começa a ser transcrito no núcleo até se associar à maquinaria de tradução e, de fato, ser traduzido, há um longo caminho. O mRNA “maduro” está sujeito a diversos níveis de regulação como a exportação do núcleo para o citoplasma, transporte para locais específicos da célula, estocagem, tradução e degradação. Esses processos são controlados por conjuntos de proteínas específicas de regulação do mRNA que, associados a este, formam as *messenger ribonucleoprotein particles* (mRNPs) (MITCHELL; PARKER, 2014). Os mRNPs são um conjunto de proteínas ligadas ao mRNA que formam complexos que vão determinar o destino desse mRNA. Por sua vez, mRNPs estão agregados em estruturas mais complexas, os grânulos de mRNA. Dois desses complexos amplamente estudados são os *Processing bodies* (PB) e os grânulos de estresse (GE) (DECKER; PARKER, 2012).

Os PB são ausentes ou escassos em ADSCs indiferenciadas e GE são distintos a células diferenciadas.

A quantidade de PB em uma célula diferenciada é variada, mas é consenso que a expressão desses grânulos é constitutiva e presente, se não em todas, mas na grande maioria das células. Nossos resultados mostraram que ADSCs possuem baixa quantidade de PB por célula (1.968 ± 0.2011) e mais de 10% das células não possuem PB. Uma das funções de um PB é a degradação do mRNA que é dependente de diversas proteínas envolvidas na desestabilização do mRNA como a desadenilação (CHEN; SHYU, 2013), seguido do decapeamento pela DCP2 e degradação pela ribonuclease XRN1 no sentido 5' para o 3' (CHEN; SHYU, 2013). Além disso, os PB estão em constante “comunicação e intercâmbio” com os polissomos (BRENGUES; TEIXEIRA; PARKER, 2005) e a montagem da maioria dos grânulos depende dos mRNAs que deixam a maquinaria de tradução (BUCHAN; YOON; PARKER, 2011). Ensaio de incorporação de aminoácidos radioativos e de perfil polissomal, mostraram que ADSCs possuem baixa taxa de transcrição, quando comparado com outras células de mamíferos diferenciadas nas mesmas condições de cultura (SPANGENBERG et al., 2013). Dessa forma, pode se pensar que, como consequência de baixa tradução, poucos mRNAs provenientes de polissomos acabam ficando “disponíveis” e livres de ribossomos, o que poderia levar a uma baixa quantidade de PB.

Outra explicação plausível para o baixo número de PB em ADSCs é que os mRNAs são constantemente reciclados por outra maquinaria de degradação que não os PB. Apesar da maquinaria de miRNAs fazer parte dos PB essas proteínas têm atividade nucleolítica independente de estarem ou não nesses grânulos. O complexo RISC da maquinaria de miRNA é formado por diversas proteínas, entre elas as proteínas Argonautas (Ago). Em eucariotos, são encontradas quatro proteínas Argonautas diferentes e Ago2 é a única com atividade nucleolítica. O mRNA alvo ao ter total complementariedade com o miRNA é clivado e degradado (VALENCIA-SANCHEZ, 2006). Os exossomos de degradação são outros sítios de degradação do RNA e são formados por um complexo de várias exonucleases que degradam o mRNA no sentido 3' para 5', diferente da XRN1 encontrada em PB. Esses exossomos também são formados por RNAs helicases e estão presentes tanto no núcleo como no citoplasma, e participam da degradação não só de mRNAs, mas também de RNA ribossomal, *non-coding* RNAs e *small nuclear* RNAs (TOURRIÈRE; CHEBLI; TAZI, 2002).

Em relação aos grânulos de estresse, observamos dois fenômenos distintos. As ADSCs-Bariátricas, quando induzidas a estresse oxidativo, tiveram seus grânulos de TIA1/R desmontados e quase não houve a formação de grânulos de estresse. Já em ADSCs-Lipo houve a formação de grânulos de estresse, mas a composição desses grânulos é distinta das células diferenciadas, já que não possuem eIF4E.

Como mencionado anteriormente, o perfil polissomal das ADSCs-Bariátricas indica que estas células têm baixa atividade traducional (SPANGENBERG et al., 2013). Dessa forma, poucos mRNAs estariam disponíveis para se associarem a grânulos de estresse. A análise do perfil polissomal de ADSCs-Lipo realizado em nosso laboratório (Origa, C. comunicação pessoal) identificou que essas células também possuem baixo nível de tradução, com polissomos de picos relativamente baixos em relação a células diferenciadas. Entretanto, se comparamos os perfis polissomais das ADSCs das duas fontes, as ADSCs-Lipo mostraram uma atividade de tradução maior, provavelmente como mais mRNA engajados na tradução e, assim, mais mRNAs disponíveis para formar grânulos quando as células são submetidas ao estresse oxidativo.

Já o fato de ADSC-Lipo praticamente não possuírem eIF4E pode ser pelo estágio de formação do GE. A eIF4E é uma proteína que se liga ao *cap* e faz parte do

complexo eIF4F para formar o complexo de início da tradução (JACKSON; HELLEN; PESTOVA, 2010). Uma possibilidade é que o tipo de estresse causado possa formar GE com composição distinta em ADSCs-Lipo. De fato, isso é possível em *Saccharomyces cerevisiae*, por exemplo, pois o estresse induzido por choque-térmico leva à formação de GE contendo eIF3 (GROUSL et al., 2009), já células submetidas a estresse nutricional, formam GE que não contêm eIF3 (BUCHAN; MUHLRAD; PARKER, 2008).

ADSCs possuem grânulos citoplasmáticos compostos por proteínas de GE em células indiferenciadas e não submetidas a estresse

Em nossos resultados constatamos que em ADSCs indiferenciadas e não estressadas há grânulos citoplasmáticos contendo as proteínas FXR1, RPS6 e TIA1/R.

Além dos PB e GE, cuja função em células eucarióticas especializadas é vastamente conhecida (KEDERSHA; ANDERSON, 2007), outros grânulos de mRNA citoplasmáticos que compartilham componentes de PB e GE, importantes na biologia de células específicas, têm sido descritos e também estão envolvidos no processamento do mRNA. Os *neuronal granules* (NG) são grânulos citoplasmáticos encontrados em células neuronais responsáveis pelo transporte de mRNAs para locais específicos nos dendritos. Fazem parte da sua composição as proteínas Staufen, RCK, *Fragile X Mental Retardation Protein* (FMRP), proteínas ribossomais entre outras. Os NG carecem de eIF4E e eIF4G e não há tradução nesses grânulos, mas em resposta à atividade sináptica, os mRNAs contidos nesses grânulos são traduzidos (KIEBLER; BASSELL, 2006). Em *C. elegans*, o transporte de mRNAs em células neuronais também ocorre por grânulos citoplasmáticos semelhantes à PB e possuem em sua composição DCP1, FMRP, eIF4E entre outros (BARBEE et al., 2006). Outro tipo de grânulos, os *germ granules*, são grânulos citoplasmáticos de células germinativas e podem ser encontrados em diversos organismos como *C. elegans*, *Drosophila*, *Xenopus*, zebrafish, ratos e camundongos. Eles estão presentes durante o desenvolvimento de células germinativas e, em alguns casos, podem ser observados até a etapa de fecundação. Fazem parte da sua composição as proteínas decapeadoras, PABP, TIA1 entre outras (VORONINA et al., 2011). Assim, neste trabalho, temos descrito mais um tipo de grânulos específicos de, pelo menos, células-tronco estromais com alguns componentes compartilhados com GE. Ensaio de

proteômica, atualmente em andamento, determinarão se existem proteínas específicas presentes nestes grânulos.

Apesar de não termos verificado a colocalização dos grânulos citoplasmáticos contendo as proteínas FXR1, RPS6 e TIA1/R em ADSCs, vale ressaltar que, a distribuição em número entre eles é muito semelhante e já foi verificada, em eucariotos, a interação dessas proteínas, principalmente entre FXR1 e proteínas ribossomais (KHANDJIAN et al., 1996).

A proteína FXR1 está associada a grânulos de estresse e, conseqüentemente, com mRNAs não traduzidos (MAZROUI et al., 2002) e alterna entre polissomos e GE em células neuronais, durante o estresse oxidativo (KIM; DONG; WEILER, 2006). Elementos ricos em AU (ARE) são sítios de regulação pós-transcricional localizados na região 3' UTR. Vasudevan e Staitz (2007) mostraram que FXR1 em associação com Ago2, proteína da maquinaria de miRNA, estão envolvidos na ativação da transcrição de mRNAs que exclusivamente contêm AREs. Essa ativação ocorre durante a transição de células quiescentes para um estado proliferativo (VASUDEVAN; STEITZ, 2007). Esses dados indicam que FXR1 associada a proteínas ribossomais podem estar envolvidas tanto na repressão, como na ativação da tradução. Vale a pena ressaltar que, células-tronco mesenquimais, *in vitro*, são estimuladas a proliferar com a utilização de soro fetal bovino, enquanto que, *in vivo*, essas células estão em um estado quiescente (AUGELLO; KURTH; DE BARI, 2010). A presença dos grânulos contendo FXR1 e/ou RPS6 e/ou TIA1/R em ADSCs pode estar relacionada tanto com a tradução durante a ativação celular, como na repressão traducional. Foi realizada em nosso laboratório a tentativa de identificação desses grânulos *in situ*, mas a condição e textura do tecido adiposo impossibilitaram qualquer análise de imunofluorescência ou imunohistoquímica.

Sem dúvida, é indispensável a análise de colocalização entre essas proteínas para tentar identificar se, por acaso, trata-se de um mesmo grânulo ou de grânulos independentes, assim como verificar se há tradução nesses sítios. De qualquer modo, a identificação de grânulos em ADSCs é inédita e importante, uma vez que a comunidade científica tem bastante interesse na utilização destas células em terapia celular e pouco se sabe da sua biologia básica e, menos ainda, dos processos pós-transcricionais de manutenção e diferenciação dessas células.

Em ADSCs derivadas de cirurgia bariátrica e lipoaspiração e em células-tronco mesenquimais derivadas de medula óssea identificamos a presença de grânulos de TIA1/R e esses grânulos contêm mRNA e não colocalizam, significativamente, com RCK.

Curiosamente, somente o anticorpo contra as proteínas TIA1/R reconhece grânulos citoplasmáticos em ADSCs. Embora tenhamos mostrado que o anticorpo TIA1/R reconhece a proteína TIA1 recombinante, tanto por imunofluorescência como por WB, procuramos entender por que somente esse anticorpo reconhece os grânulos citoplasmáticos.

Na célula existem duas proteínas TIAs: a TIA1 e TIAR e, cada uma delas, possui duas isoformas distintas e todas possuem peso molecular muito semelhante (aproximadamente 43 kDa), o que impossibilita diferenciar claramente essas proteínas por WB. Neste trabalho, utilizamos três anticorpos distintos para a proteína TIA: anti-TIA1/R, anti-TIAR e anti-TIA1. O anti-TIA1/R é um anticorpo policlonal da Santa Cruz Biotechnology, produzido em coelho e que reconhece a porção N-terminal da proteína, mais especificamente entre os aminoácidos 70 e 140 e tem afinidade por ambas as proteínas TIA. Já o anti-TIAR é produzido pela *Cell Signaling*, é monoclonal também gerado em coelho e tem afinidade pela porção C-terminal da proteína TIAR. O anti-TIA1, produzido pela Santa Cruz Biotechnology, é policlonal gerado em cabra e reconhece a porção carboxi-terminal da proteína TIA1. Não se sabe exatamente qual a região ou qual isoforma da proteína que foi utilizada para a produção do anti-TIA1 e anti-TIAR já que essas informações não são fornecidas pelo fabricante. Uma primeira justificativa pode ser justamente a diferença de regiões da proteína que os anticorpos reconhecem. A estrutura tridimensional dos grânulos de TIA1/R pode manter a porção C-terminal inacessível ao anticorpo, tornando impossível sua visualização com anti-TIA1 e anti-TIAR. Outra possibilidade é que esses grânulos podem ser formados por alguma isoforma específica da proteína TIA. Ao realizarmos o alinhamento da sequência de aminoácidos e compararmos a sequência das proteínas TIA (realizado no ProteinBlast - NCBI) podemos verificar que a maior diferença entre as proteínas e isoformas está justamente na porção N-terminal, região que é reconhecida pelo anticorpo anti-TIA1/R.

Ainda, os grânulos de TIA1/R em ADSCs podem ser constituídos por isoformas ainda não descritas da proteína TIA, devido ao processamento pós-transcricional ou

pós-traducional. Isso também poderia justificar o fato desse anticorpo reconhecer bandas de distintos tamanhos nos ensaios de WB. De fato, a proteína TIA pode sofrer processamento pós-traducional, como já demonstrado em células T, onde a proteína TIA pode ser clivada em um fragmento de 15 kDa e que esse fragmento se encontra em associação a grânulos citoplasmáticos de células não estressadas (ANDERSON; NAGLER-ANDERSON, 1990). Procuramos anticorpos alternativos comerciais que reconheçam a porção C-terminal da proteína TIA, mas não há nenhum disponível. Mais estudos se fazem necessários para determinar exatamente o porquê somente de esse anticorpo reconhecer esses grânulos citoplasmáticos.

Nossos dados mostraram também que os grânulos de TIA1/R estão associados à mRNAs não traduzidos. Esses grânulos são dependentes de mRNA, uma vez que o tratamento com RNase desmontou essas estruturas. Além disso, vimos que alguns grânulos de TIA1/R colocalizam com CD63. A CD63 é uma proteína de membrana e pode ser encontrada em exossomo de exportação extracelular (STOORVOGEL et al., 2002). Esses exossomos, apesar de possuírem o mesmo nome, são diferentes daqueles de degradação de RNA mencionados anteriormente. Os exossomos são vesículas com diâmetro entre 30 e 100 nm formadas a partir do compartimento endossomal da célula e são secretados, se não por todas, mas de quase todos os tipos celulares. São enriquecidos com diversas proteínas, mRNAs, miRNAs e lipídios e sua composição é muito variada dependendo do tipo celular e o estado em que a célula se encontra (RAPOSO; STOORVOGEL, 2013). Recentemente, diversos trabalhos têm mostrado o papel dos exossomos em células-tronco na comunicação célula-célula (TETTA et al., 2013). Um trabalho interessante mostrou que células-tronco mesenquimais em condições de estresse secretam vesículas que contêm mRNA associados à proteína TIA1, juntamente com mRNAs e miRNAs (COLLINO et al., 2010). A proteína CD63 também está associada ao processo de autofagia e lisossomos (BAMPTON et al., 2005) e, Buchan e colaboradores (2013) mostraram que os grânulos de estresse são reciclados e enviados para degradação por autofagia (BUCHAN et al., 2013).

Nossos dados, juntamente com os dados discutidos acima, sugerem que os grânulos de TIA1/R em ADSCs indiferenciadas possam ter uma ou mais das funções listadas a seguir: 1) Os grânulos de TIA1/R podem atuar como um grânulo de estocagem de mRNAs não traduzidos. Alguns desses mRNAs podem estar associados à diferenciação das células-troco, uma vez que é possível encontrar

mRNAs responsáveis pela diferenciação em grânulos citoplasmáticos (CRIST; MONTARRAS; BUCKINGHAM, 2012). Ainda, dados preliminares de ribonômica por imunoprecipitação de TIA1/R, obtidos em nosso laboratório, mostraram RNAs ribossomais e RNAs de diferenciação associados à proteína TIA1/R. Esse resultado preliminar também pode explicar o baixo nível de tradução observado em ADSCs; 2) Os grânulos de TIA1/R podem estar envolvidos na exportação de mRNAs para o meio extracelular por exossomos em vesículas CD63 positivas; 3) Os grânulos de TIA1/R podem funcionar como “agentes” responsáveis pela triagem de mRNAs para determinar quais transcritos devem ser estocados, degradados ou secretados.

ADSC-Lipo vs ADSC-Bariátrica

Identificamos a presença de grânulos de TIA1/R em ADSC derivadas de cirurgia bariátrica e de lipoaspiração. A diferença na quantidade de grânulos entre essas células chega a ser de até 5 vezes. Acreditamos que essa diferença seja causada pela própria característica dessas células, já que são derivadas de pacientes em condições clínicas diferentes. As células derivadas de cirurgia bariátrica são provenientes de pacientes com obesidade mórbida. A obesidade está associada ao aumento significativo de macrófagos no estroma do tecido adiposo, em resposta ao estresse celular, devido ao acúmulo de gordura. Esse aumento de macrófagos leva a um processo inflamatório crônico causado pelo aumento de proteínas pró-inflamatórias na corrente sanguínea. O quadro clínico também pode evoluir para diabetes por conta da resistência a insulina, além de falência de órgãos devido ao acúmulo de gordura nos tecidos (PATEL; BURAS; BALASUBRAMANYAM, 2013). Os pacientes de lipoaspiração não passam por esse acúmulo excessivo de gordura e, provavelmente, não possuem um processo inflamatório crônico.

Mesmo em números de grânulos diferentes entre esses dois tipos celulares, o fato é que, em ambas as células, os grânulos de TIA1/R praticamente desaparecem durante a diferenciação adipogênica. Também encontramos os grânulos de TIA1/R em células-tronco mesenquimais derivadas de medula óssea e, ainda, estão ausentes em fibroblastos, indicando que esses grânulos são específicos de células-tronco mesenquimais e células-tronco estromais, apontando, assim, para uma possível função na característica mais importante dessas células: atividade parácrina e diferenciação.

Os grânulos citoplasmáticos estão envolvidos na maturação de adipócito durante a diferenciação

O comportamento dos PB e dos grânulos de TIA1/R durante a diferenciação adipogênica apresentou uma dinâmica interessante, um pouco diferente entre os tipos celulares, mas que culminou em células diferenciadas com um padrão de grânulos semelhante à maioria das células adultas de mamíferos. Nossos resultados mostraram que, após 24 horas de indução da diferenciação, há um aumento significativo na quantidade de PB em ADSC. Após 12 dias de indução, a célula já apresenta fenótipo de adipócito e há uma redução na quantidade de PB em relação a 24 horas de indução, mas há um aumento quando comparado com as células antes da indução. Além disso, os grânulos de TIA1/R diminuem gradativamente durante a diferenciação e praticamente desaparecem após 12 dias de indução.

A diferenciação adipogênica é um processo de múltiplos passos e diversos fatores já foram identificados como ativadores e repressores da adipogênese. Os fatores de transcrição C/EBP- β , C/EBP- δ , PPAR γ e C/EBP α são descritos como os principais fatores responsáveis pela diferenciação adipogênica (CAO; UMEK; MCKNIGHT, 1991; TONTONNOZ et al., 1994). Esses fatores ativam múltiplos genes relacionados à diferenciação em adipócitos e também genes que podem estar envolvidos na diferenciação de outras linhagens. A C/EBP α , por exemplo, está envolvida na diferenciação de adipócitos, de células dendríticas do sistema imune e de células CD34⁺ (CAMMENGA et al., 2003; ROSEN et al., 2002; WELNER et al., 2013). O fator PPAR γ além de estar envolvido na diferenciação adipogênica, também foi descrito como participante na diferenciação de macrófagos (MOORE et al., 2001; ROSEN et al., 1999). O fato é que não são os fatores isolados que irão determinar o destino da diferenciação celular, e sim, o conjunto de diversos fatores.

Além disso, a regulação pós-transcricional é um fator que não deve ser desconsiderado, uma vez que tem papel fundamental em determinar se o gene irá ou não ser traduzido em proteína. Neste âmbito, nosso laboratório, publicou recentemente um trabalho mostrando que há uma extensa regulação pós-transcricional durante a diferenciação adipogênica. Foram isolados tanto os mRNAs totais, como aqueles que estão associados a polissomos de ADSCs-Bariátricas. Para determinar quais mRNAs estariam sendo regulados em nível pós-transcricional, os dados de sequenciamento de RNA da fração total foram comparados com a fração

polissomal. Foi verificado que quase 60% dos genes sofrem algum tipo de regulação pós-transcricional (SPANGENBERG et al., 2013). Analisando os dados apresentados nas tabelas do material suplementar deste trabalho, foi possível determinar, por exemplo, que o mRNA da proteína *fatty acid binding protein 4* (FABP4), que é expressa exclusivamente em adipócitos, está presente na fração total de células não induzidas. Após três dias de indução adipogênica, o nível do transcrito de FABP4 é aumentado tanto na fração total, como na fração de mRNAs associados a polissomos (SPANGENBERG et al., 2013). Uma série de perguntas surgem destas observações: onde estão presentes esses mRNAs nas células não induzidas? Eles são rapidamente degradados? Estes são armazenados no citoplasma?

Outra evidência do papel da regulação pós-transcricional na diferenciação celular foi publicado recentemente por outro grupo. Os pesquisadores descobriram grânulos citoplasmáticos que contêm RCK em células satélites de músculo esquelético. Nesses grânulos, o mRNA do gene *Myf5*, responsável pela diferenciação da célula em fibra muscular, está associado ao miRNA-31. Uma vez que a célula é ativada e a diferenciação engatilhada, o miRNA se desassocia do mRNA *Myf5* que migra do grânulos de RCK para a maquinaria de tradução. Dessa forma, a célula rapidamente se diferencia em fibra muscular (CRIST; MONTARRAS; BUCKINGHAM, 2012).

Em ensaios de silenciamento gênico por RNA de interferência (RNAi), observamos que a desmontagem dos grânulos de TIA1/R e dos PB levam a um aumento no acúmulo de adipócitos. Isso acontece já nos primeiros dias de diferenciação e esse acúmulo se estende até o décimo segundo dia. Esses dados sugerem que, pelo menos durante a diferenciação adipogênica, esses grânulos estejam participando na regulação pós-transcricional de genes envolvidos na maturação do adipócito. O fato que nenhum dos ensaios de RNAi aboliu completamente os grânulos da célula, deixa em aberto a possibilidade de que os grânulos remanescentes sejam suficientes para auxiliar o disparo e, assim, o efeito observado foi apenas na maturação da célula em diferenciação.

Com a finalidade de desmontar todos os grânulos citoplasmáticos, realizamos um ensaio utilizando a droga cicloheximida. A cicloheximida “sequestra” os ribossomos ao mRNA impedindo a formação de PB e grânulos de estresse, além de desmontar os grânulos pré-existentes (KEDERSHA; ANDERSON, 2009). As ADSCs

foram tratadas com a droga e, após o tratamento, foi verificado que os grânulos haviam desaparecido. Dessa forma, as células foram submetidas à diferenciação adipogênica. Observamos que há uma redução expressiva no acúmulo de lipídios nas células tratadas com cicloheximida. Esse efeito contrário ao observado nos ensaios com RNAi pode ser devido ao fato de que a droga não só tem efeito nos PB e GE, mas também bloqueia completamente a tradução (SCHNEIDER-POETSCH et al., 2010). Esse efeito da droga pode impedir a tradução de mRNAs necessários para engatilhar a diferenciação, retardando o processo como um todo. Dessa forma, acreditamos que o efeito na diminuição da diferenciação adipogênica com cicloheximida tenha sido um efeito secundário da droga e não pela desmontagem dos grânulos.

Baseado nos experimentos realizados por Crist e colaboradores (2012) em células satélites, no qual mostram o papel de grânulos citoplasmáticos na diferenciação de células pré-diferenciadas, foi questionado se o papel dos grânulos citoplasmáticos não estaria relacionado ao processo de diferenciação de células pré-diferenciadas. Durante a diferenciação adipogênica, as células primeiramente se diferenciam em pré-adipócitos para depois se diferenciarem em adipócitos (TANG; LANE, 2012). Dessa forma, realizamos o silenciamento de componentes de PB e de TIA1/R em pré-adipócitos, a fim de verificar se o silenciamento seria suficiente para induzir as células à diferenciação adipogênica, sem a utilização de meio de indução. As células foram mantidas em cultura por 21 dias após o silenciamento, sem a adição de meio de diferenciação e verificamos que o RNAi de componentes de PB e de TIA não foi suficiente para induzir as células pré-diferenciadas a entrarem em diferenciação, uma vez que não houve mudança fenotípica dessas células. Apesar do silenciamento não ter surtido efeito na diferenciação, não podemos excluir o papel dos grânulos da diferenciação de pré-adipócitos, já que alguns pontos devem ser levantados. Primeiramente, já que não verificamos nestas células, se os grânulos são desmontados com o silenciamento e nem qual a distribuição desses grânulos durante a diferenciação. Outro fato a considerar é a presença de insulina no meio de diferenciação. A insulina é o agente responsável pela indução de acúmulo de triglicerídeos na célula para formar o adipócito (ZHANG et al., 2009) e, *in vitro*, são excluídos todos os fatores externos encontrados *in vivo*. Talvez a combinação de silenciamento com fatores de indução específicos possam levar as células à diferenciação.

A seguir, será sugerido um possível modelo que tenta conciliar os dados que já foram discutidos e o conjunto de resultados obtidos neste trabalho. Este modelo serve, ao mesmo tempo, como nova hipótese de trabalho e deixa implícito as perspectivas deste trabalho que caracteriza, pela primeira vez, grânulos de mRNA citoplásmicos em células-tronco estromais.

Modelo do papel dos grânulos citoplásmicos em células-tronco estromais:

Durante a manutenção do estado indiferenciado de ADSCs as células estão constantemente transcrevendo mRNAs responsáveis pela diferenciação em diversas linhagens, e também mRNAs ribossomais. Esses mRNAs são estocados em grânulos de TIA1/R. Os grânulos, além da função de estocagem de transcritos responsáveis pela diferenciação, regulam os níveis de proteínas ribossomais e, deste modo, de ribossomos das ADSCs. Por outro lado, os grânulos também têm função de carregar informações de manutenção do estado indiferenciado para células vizinhas, por meio de exossomos. Uma vez que o estímulo para diferenciação é recebido pela célula, os mRNAs ribossomais contidos nos grânulos de TIA1/R são rapidamente traduzidos e, assim, disponibilizando grande quantidade de ribossomos para atuarem na tradução. Além disso, os mRNAs responsáveis pela diferenciação correspondente ao estímulo recebido, deixam os grânulos de TIA1/R e são associados aos ribossomos para tradução. Os mRNAs responsáveis pela diferenciação de linhagem diferente daquela do estímulo recebido são enviados a PB para rápida degradação. Esse processo se mantém até a célula assumir características de célula diferenciada e, gradativamente, os grânulos de TIA1/R desaparecem na célula e a quantidade de PB torna-se basal, o que corresponde com o observado em células diferenciadas.

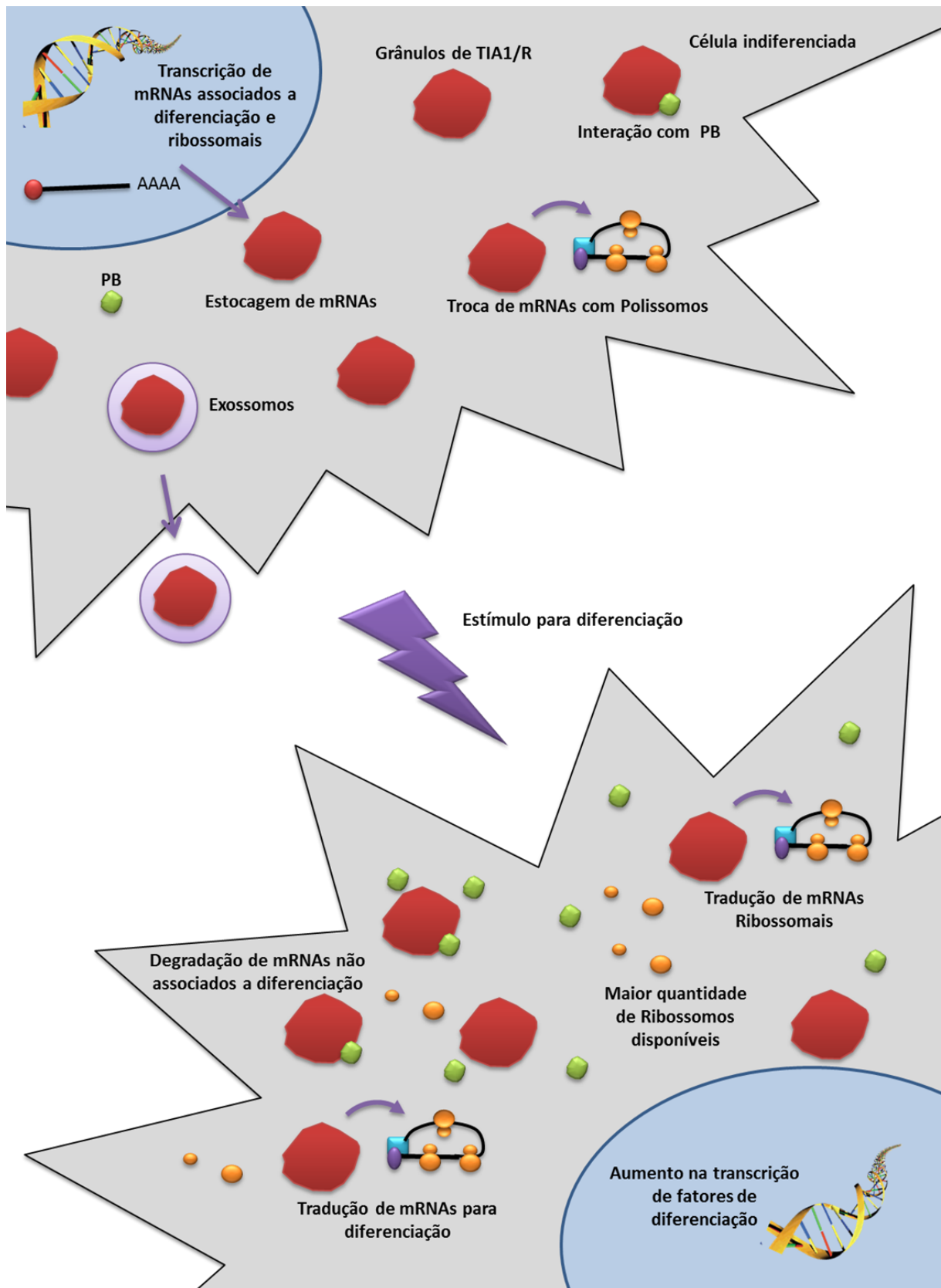


Figura 5.1. Modelo do papel dos grânulos citoplásmicos em células-tronco estomais.

Fonte: Do autor.

Legenda: ADSCs indiferenciadas acumulam mRNAs de ribossomos e de diferenciação em grânulos de TIA1/R. Os grânulos de TIA1/R podem ir para exossomos e serem secretados para o meio extracelular ou interagirem com PB e maquinaria de tradução. Durante a diferenciação há um aumento de PB e os mRNAs responsáveis pela diferenciação são traduzidos, assim como os mRNAs de ribossomos. Os mRNAs responsáveis pela diferenciação em outras linhagens são degradados em PB.

6. CONCLUSÕES

1. Células-tronco multipotente derivadas de tecido adiposo e de medula óssea possuem grânulos citoplasmáticos contendo a proteína TIA1/R em sua composição em células em condições padrão de cultura;
2. ADSCs-Lipo possuem, além dos grânulos de TIA1/R, grânulos contendo as proteínas RPS6 e FXR1;
3. Grânulos de TIA1/R em ADSCs-Bariátrica são maiores e 5 vezes mais abundantes em comparação com ADSC-Lipo;
4. ADSCs possuem baixa quantidade de *Processing bodies* em células em condições padrão de cultura sendo até ausente em algumas células;
5. Os grânulos de TIA1/R em ADSCs-Bariátrica induzidas a estresse celular são desmontados e apenas alguns grânulos de estresse são formados;
6. ADSCs-Lipo induzidas a estresse formam grânulos de estresse com composição distinta às células diferenciadas;
7. Há um aumento na quantidade de *Processing bodies* e grânulos de TIA1/R após 24 horas de indução adipogênica;
8. Após 12 dias de diferenciação adipogênica ADSCs apresentam quantidade de *Processing bodies* semelhantes a células diferenciadas e os grânulos de TIA1/R praticamente desaparecem;
9. Desmontagem dos grânulos com cicloheximida seguido de diferenciação adipogênica diminui significativamente o potencial de diferenciação de ADSCs;
10. Desmontagem dos PB por RNA de interferência e silenciamento gênico de TIAR levam ADSCs a um maior acúmulo de lipídios durante diferenciação adipogênica;
11. Os PB e grânulos de TIA1/R estão envolvidos na diferenciação de ADSCs, mas não são essenciais para manutenção das células indiferenciadas.
12. Silenciamento gênico de componentes de PB e de TIA não são suficientes para induzir células de pré-adipócitos a entrarem em diferenciação.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKIRI et al. Regulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) expression is mediated by internal initiation of translation and alternative initiation of transcription. **Oncogene**, v. 17, n. 2, p. 227-36, 1998.

ALT, E. et al. Fibroblasts share mesenchymal phenotypes with stem cells, but lack their differentiation and colony-forming potential. **Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization**, v. 103, n. 4, p. 197-208, 2011.

AMIT et al. Clonally derived human embryonic stem cell lines maintain pluripotency and proliferative potential for prolonged periods of culture. **Developmental biology**, v. 227, n. 2, p. 271-8, 2000.

ANDERSON; NAGLER-ANDERSON. A monoclonal antibody reactive with a 15-kDa cytoplasmic granule-associated protein defines a subpopulation of CD8+ T lymphocytes. 1990.

ANDERSON, P.; KEDERSHA, N. Stress granules. **Current biology : CB**, v. 19, n. 10, p. R397-8, 2009.

ANDREI; INGELFINGER; HEINTZMANN. A role for eIF4E and eIF4E-transporter in targeting mRNPs to mammalian processing bodies. 2005.

ANOKYE-DANSO, F. et al. Highly efficient miRNA-mediated reprogramming of mouse and human somatic cells to pluripotency. **Cell stem cell**, v. 8, n. 4, p. 376-88, 2011.

ARMSTRONG et al. Overexpression of telomerase confers growth advantage, stress resistance, and enhanced differentiation of ESCs toward the hematopoietic lineage. **Stem cells (Dayton, Ohio)**, v. 23, n. 4, p. 516-29, 2005.

AUGELLO, A.; KURTH, T.; BARI, C. Mesenchymal stem cells: a perspective from in vitro cultures to in vivo migration and niches. **European cells & materials**, v. 20, p. 121-33, 2009.

AVILION, A. et al. Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. **Genes & development**, v. 17, n. 1, p. 126-40, 2002.

BAMPTON, E. et al. The dynamics of autophagy visualized in live cells: from autophagosome formation to fusion with endo/lysosomes. **Autophagy**, v. 1, n. 1, p. 23-36, 2005.

BARBEE, S. et al. Staufen- and FMRP-containing neuronal RNPs are structurally and functionally related to somatic P bodies. **Neuron**, v. 52, n. 6, p. 997-1009, 2006.

BARTOLI, K.; BISHOP, D.; SAUNDERS, W. The Role of Molecular Microtubule Motors and the Microtubule Cytoskeleton in Stress Granule Dynamics. **International Journal of Cell Biology**, 2011.

BASHKIROV et al. A mouse cytoplasmic exoribonuclease (mXRN1p) with preference for G4 tetraplex substrates. **The Journal of cell biology**, v. 136, n. 4, p. 761-73, 1997.

BECKER; MCCULLOCH; TILL. Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells. **Nature**, v. 197, p. 452-4, 1963.

BEELMAN; PARKER. Degradation of mRNA in eukaryotes. **Cell**, v. 81, n. 2, p. 179-83, 1995.

BENTLEY. Coupling mRNA processing with transcription in time and space. 2014.

- BOURIN, P. et al. Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: a joint statement of the International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS) and the International Society for Cellular Therapy (ISCT). **Cytotherapy**, 2013.
- BOYER, L. et al. Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. **Cell**, v. 122, n. 6, p. 947-56, 2005.
- BRADFORD. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, p. 248-54, 1976.
- BRENGUES, M.; TEIXEIRA, D.; PARKER, R. Movement of Eukaryotic mRNAs Between Polysomes and Cytoplasmic Processing Bodies. **Science**, 2005.
- BUCHAN et al. Eukaryotic stress granules are cleared by autophagy and Cdc48/VCP function. **Cell**, v. 153, n. 7, p. 1461-74, 2013.
- BUCHAN; MUHLRAD, D.; PARKER, R. P bodies promote stress granule assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. **The Journal of cell biology**, v. 183, n. 3, p. 441-55, 2008.
- BUCHAN; YOON, J.-H.; PARKER, R. Stress-specific composition, assembly and kinetics of stress granules in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of cell science**, v. 124, n. Pt 2, p. 228-39, 2011.
- CAMMENGA, J. et al. Induction of C/EBPalpha activity alters gene expression and differentiation of human CD34+ cells. **Blood**, v. 101, n. 6, p. 2206-14, 2003.
- CAO; UMEK; MCKNIGHT. Regulated expression of three C/EBP isoforms during adipose conversion of 3T3-L1 cells. **Genes & development**, v. 5, n. 9, p. 1538-52, 1991.
- CAPLAN. Mesenchymal stem cells. **Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society**, v. 9, n. 5, p. 641-50, 1991.
- CARD, D. et al. Oct4/Sox2-regulated miR-302 targets cyclin D1 in human embryonic stem cells. **Molecular and cellular biology**, v. 28, n. 20, p. 6426-38, 2008.
- CARPENTER; ROSLER; RAO. Characterization and differentiation of human embryonic stem cells. **Cloning and stem cells**, v. 5, n. 1, p. 79-88, 2002.
- CECI, M. et al. Release of eIF6 (p27BBP) from the 60S subunit allows 80S ribosome assembly. **Nature**, 2003.
- CHAMBERS, I. et al. Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. **Cell**, v. 113, n. 5, p. 643-55, 2003.
- CHEN, C.-Y.; SHYU, A.-B. Mechanisms of deadenylation-dependent decay. **Wiley interdisciplinary reviews. RNA**, v. 2, n. 2, p. 167-83, 2010.
- CHEN, C.-Y.; SHYU, A.-B. Deadenylation and P-bodies. **Advances in experimental medicine and biology**, v. 768, p. 183-95, 2012.
- CHEN, D.; ZHAO, M.; MUNDY, G. Bone morphogenetic proteins. **Growth factors (Chur, Switzerland)**, v. 22, n. 4, p. 233-41, 2004.

- COLLINO, F. et al. Microvesicles Derived from Adult Human Bone Marrow and Tissue Specific Mesenchymal Stem Cells Shuttle Selected Pattern of miRNAs. **PLoS ONE**, v. 5, n. 7, p. e11803, 2010.
- CRAIG, A. et al. Interaction of polyadenylate-binding protein with the eIF4G homologue PAIP enhances translation. **Nature**, 1998.
- CRIST, C.; MONTARRAS, D.; BUCKINGHAM, M. Muscle Satellite Cells Are Primed for Myogenesis but Maintain Quiescence with Sequestration of Myf5 mRNA Targeted by microRNA-31 in mRNP Granules. **Cell Stem Cell**, v. 11, n. 1, p. 118-26, 2012.
- DECKER, C.; TEIXEIRA, D.; PARKER, R. Edc3p and a glutamine/asparagine-rich domain of Lsm4p function in processing body assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. **The Journal of cell biology**, v. 179, n. 3, p. 437-49, 2007.
- DECKER; PARKER. P-Bodies and Stress Granules: Possible Roles in the Control of Translation and mRNA Degradation. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, 2012.
- DENZER et al. Exosome: from internal vesicle of the multivesicular body to intercellular signaling device. **Journal of cell science**, v. 113 Pt 19, p. 3365-74, 2000.
- DEO et al. Recognition of polyadenylate RNA by the poly(A)-binding protein. **Cell**, v. 98, n. 6, p. 835-45, 1999.
- DEVER, T. Gene-specific regulation by general translation factors. **Cell**, v. 108, n. 4, p. 545-56, 2002.
- DUNCKLEY; PARKER. The DCP2 protein is required for mRNA decapping in *Saccharomyces cerevisiae* and contains a functional MutT motif. 1999.
- EMARA, M. et al. Hydrogen peroxide induces stress granule formation independent of eIF2 α phosphorylation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 2012.
- EVANS; KAUFMAN. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. **Nature**, v. 292, n. 5819, p. 154-6, 1981.
- EYSTATHIOY, T. et al. A phosphorylated cytoplasmic autoantigen, GW182, associates with a unique population of human mRNAs within novel cytoplasmic speckles. **Molecular biology of the cell**, v. 13, n. 4, p. 1338-51, 2002.
- EYSTATHIOY, T. et al. The GW182 protein colocalizes with mRNA degradation associated proteins hDcp1 and hLSm4 in cytoplasmic GW bodies. **RNA (New York, N.Y.)**, v. 9, n. 10, p. 1171-3, 2003.
- FENGER-GRØN, M. et al. Multiple processing body factors and the ARE binding protein TTP activate mRNA decapping. **Molecular cell**, v. 20, n. 6, p. 905-15, 2005.
- FINK, T.; ZACHAR, V. Adipogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 698, p. 243-51, 2010.
- FRAGA, A. et al. Establishment of a Brazilian line of human embryonic stem cells in defined medium: implications for cell therapy in an ethnically diverse population. **Cell transplantation**, v. 20, n. 3, p. 431-440, 2011.

- FRIEDENSTEIN; PIATETZKY-SHAPIRO; PETRAKOVA. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. **Journal of embryology and experimental morphology**, v. 16, n. 3, p. 381-90, 1966.
- FRIEDMAN, M.; LONG, M.; HANKENSON, K. Osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells is regulated by bone morphogenetic protein-6. **Journal of cellular biochemistry**, v. 98, n. 3, p. 538-54, 2006.
- FUKUDA. Lysosomal membrane glycoproteins. Structure, biosynthesis, and intracellular trafficking. **J Biol Chem**, v. 266, n. 32, p. 21327-21330, 1991.
- GAN; RHOADS. Internal initiation of translation directed by the 5'-untranslated region of the mRNA for eIF4G, a factor involved in the picornavirus-induced switch from cap-dependent to internal initiation. **The Journal of biological chemistry**, v. 271, n. 2, p. 623-6, 1996.
- GILKS, N. et al. Stress granule assembly is mediated by prion-like aggregation of TIA-1. **Molecular biology of the cell**, v. 15, n. 12, p. 5383-98, 2004.
- GIMBLE, J.; KATZ, A.; BUNNELL, B. Adipose-Derived Stem Cells for Regenerative Medicine. **Circulation Research**, 2007.
- GITLER, A.; SHORTER, J. RNA-binding proteins with prion-like domains in ALS and FTLD-U. **Prion**, 2011.
- GRAY, S. et al. The Krüppel-like factor KLF15 regulates the insulin-sensitive glucose transporter GLUT4. **The Journal of biological chemistry**, v. 277, n. 37, p. 34322-8, 2002.
- GROUSL, T. et al. Robust heat shock induces eIF2 α -phosphorylation-independent assembly of stress granules containing eIF3 and 40S ribosomal subunits in budding yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of cell science**, v. 122, n. Pt 12, p. 2078-2088, 2009.
- GROUŠL, T. et al. Robust heat shock induces eIF2 α -phosphorylation-independent assembly of stress granules containing eIF3 and 40S ribosomal subunits in budding yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Cell Science**, 2009.
- GU, W. et al. The role of RNA structure at 5' untranslated region in microRNA-mediated gene regulation. **RNA**, 2014.
- GUINER, C. et al. TIA-1 and TIAR Activate Splicing of Alternative Exons with Weak 5' Splice Sites followed by a U-rich Stretch on Their Own Pre-mRNAs. **Journal of Biological Chemistry**, 2001.
- HA, M.; KIM, N. Regulation of microRNA biogenesis. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, 2014.
- HAECKEL, E. *Natürliche Schöpfungsgeschichte*: 1. v. 1, 1873.
- HASHEM, Y. et al. Structure of the Mammalian Ribosomal 43S Preinitiation Complex Bound to the Scanning Factor DHX29. **Cell**, 2013.
- HE, S.; NAKADA, D.; MORRISON, S. Mechanisms of Stem Cell Self-Renewal. **Cell and Developmental Biology**, 2009.
- HOGAN et al. Diverse RNA-binding proteins interact with functionally related sets of RNAs, suggesting an extensive regulatory system. 2008.

- HORWITZ et al. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v. 7, n. 5, p. 393-5, 2004.
- INGELFINGER, D. et al. The human LSml-7 proteins colocalize with the mRNA-degrading enzymes Dcp1/2 and Xrnl in distinct cytoplasmic foci. **RNA (New York, N.Y.)**, v. 8, n. 12, p. 1489-501, 2002.
- JACKSON, R.; HELLEN, C.; PESTOVA, T. The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 11, n. 2, p. 113-27, 2010.
- JAISWAL; HAYNESWORTH; CAPLAN. Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro. 1997.
- KANAZAWA et al. Single nucleotide polymorphisms in the gene encoding Krüppel-like factor 7 are associated with type 2 diabetes. **Diabetologia**, v. 48, n. 7, p. 1315-1322, 2005.
- KANG, Q. et al. A comprehensive analysis of the dual roles of BMPs in regulating adipogenic and osteogenic differentiation of mesenchymal progenitor cells. **Stem cells and development**, v. 18, n. 4, p. 545-59, 2009.
- KEDERSHA et al. RNA-binding proteins TIA-1 and TIAR link the phosphorylation of eIF-2 alpha to the assembly of mammalian stress granules. **The Journal of cell biology**, v. 147, n. 7, p. 1431-42, 1999.
- KEDERSHA et al. Dynamic shuttling of TIA-1 accompanies the recruitment of mRNA to mammalian stress granules. **The Journal of cell biology**, v. 151, n. 6, p. 1257-68, 2000.
- KEDERSHA; ANDERSON. Stress granules: sites of mRNA triage that regulate mRNA stability and translatability. **Biochemical Society transactions**, v. 30, n. Pt 6, p. 963-9, 2002.
- KEDERSHA, N. et al. Evidence that ternary complex (eIF2-GTP-tRNA(i)(Met))-deficient preinitiation complexes are core constituents of mammalian stress granules. **Molecular biology of the cell**, v. 13, n. 1, p. 195-210, 2001.
- KEDERSHA, N. et al. Stress granules and processing bodies are dynamically linked sites of mRNP remodeling. **The Journal of cell biology**, v. 169, n. 6, p. 871-84, 2005.
- KEDERSHA, N.; ANDERSON, P. Mammalian stress granules and processing bodies. **Methods in enzymology**, v. 431, p. 61-81, 2006.
- KEDERSHA, N.; ANDERSON, P. Regulation of translation by stress granules and processing bodies. **Progress in molecular biology and translational science**, v. 90, p. 155-85, 2008.
- KENAN, D.; QUERY, C.; KEENE, J. RNA recognition: towards identifying determinants of specificity. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 16, p. 214-220, 1991.
- KHANDJIAN et al. The fragile X mental retardation protein is associated with ribosomes. **Nature genetics**, v. 12, n. 1, p. 91-3, 1995.
- KIEBLER, M.; BASSELL, G. Neuronal RNA granules: movers and makers. **Neuron**, v. 51, n. 6, p. 685-90, 2006.
- KIM; DONG; WEILER. Fragile X mental retardation protein shifts between polyribosomes and stress granules after neuronal injury by arsenite stress or in vivo hippocampal electrode 2006.

- KIMBALL, S. et al. Mammalian stress granules represent sites of accumulation of stalled translation initiation complexes. **American journal of physiology. Cell physiology**, v. 284, n. 2, p. C273-84, 2003.
- KLOOSTERMAN, W.; PLASTERK, R. The diverse functions of microRNAs in animal development and disease. **Developmental cell**, v. 11, n. 4, p. 441-50, 2006.
- KORNBLUM, H. Introduction to Neural Stem Cells. **Stroke**, 2007.
- KOZAK. Structural features in eukaryotic mRNAs that modulate the initiation of translation. **The Journal of biological chemistry**, v. 266, n. 30, p. 19867-70, 1991.
- KUBO et al. Organization of extracellular matrix components during differentiation of adipocytes in long-term culture. **In vitro cellular & developmental biology. Animal**, v. 36, n. 1, p. 38-44, 1999.
- KÜHN; PIELER. Xenopus poly(A) binding protein: functional domains in RNA binding and protein-protein interaction. **Journal of molecular biology**, v. 256, n. 1, p. 20-30, 1996.
- LEDDA, M. et al. Effect of 3'UTR length on the translational regulation of 5'-terminal oligopyrimidine mRNAs. **Gene**, v. 344, p. 213-20, 2005.
- LEHMANN et al. Peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma are activated by indomethacin and other non-steroidal anti-inflammatory drugs. **The Journal of biological chemistry**, v. 272, n. 6, p. 3406-10, 1997.
- LI, D. et al. Krüppel-like factor-6 promotes preadipocyte differentiation through histone deacetylase 3-dependent repression of DLK1. **The Journal of biological chemistry**, v. 280, n. 29, p. 26941-52, 2005.
- LIU, J. et al. MicroRNA-dependent localization of targeted mRNAs to mammalian P-bodies. **Nature cell biology**, v. 7, n. 7, p. 719-23, 2005.
- LLOYD, R. Regulation of stress granules and P-bodies during RNA virus infection. **Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA**, 2013.
- LOCKE, M.; WINDSOR, J.; DUNBAR, R. Human adipose-derived stem cells: isolation, characterization and applications in surgery. **ANZ Journal of Surgery**, 2009.
- LOH, Y.-H. et al. The Oct4 and Nanog transcription network regulates pluripotency in mouse embryonic stem cells. **Nature genetics**, v. 38, n. 4, p. 431-40, 2006.
- LUKAVSKY, P. Structure and function of HCV IRES domains. **Virus Research**, v. 139, n. 2, p. 166-171, 2009.
- LYKKE-ANDERSEN, J. Identification of a human decapping complex associated with hUpf proteins in nonsense-mediated decay. **Molecular and cellular biology**, v. 22, n. 23, p. 8114-21, 2002.
- LÉCUYER, E. et al. Global analysis of mRNA localization reveals a prominent role in organizing cellular architecture and function. **Cell**, v. 131, n. 1, p. 174-87, 2007.
- MARIS; DOMINGUEZ; ALLAIN, F. The RNA recognition motif, a plastic RNA-binding platform to regulate post-transcriptional gene expression. 2005.

- MARTIN. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 78, n. 12, p. 7634-8, 1981.
- MARTIN-MARCOS, P. et al. β -Hairpin Loop of Eukaryotic Initiation Factor 1 (eIF1) Mediates 40 S Ribosome Binding to Regulate Initiator tRNAMet Recruitment and Accuracy of AUG Selection in Vivo. **Journal of Biological Chemistry**, 2013.
- MARTINEAU, Y. et al. Poly(A)-binding protein-interacting protein 1 binds to eukaryotic translation initiation factor 3 to stimulate translation. **Molecular and cellular biology**, v. 28, n. 21, p. 6658-67, 2008.
- MAXIMOW, A. A. The Lymphocyte as a stem cell common to different blood elements in embryonic development and during the post-fetal life of mammals. **English translation: Cell Ther Transplant. 2009,1**, 1909.
- MAZROUI et al. Trapping of messenger RNA by Fragile X Mental Retardation protein into cytoplasmic granules induces translation repression. 2002.
- MICHELITSCH; WEISSMAN. A census of glutamine/asparagine-rich regions: implications for their conserved function and the prediction of novel prions. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 22, p. 11910-5, 2000.
- MIGNONE, F. et al. Untranslated regions of mRNAs. **Genome biology**, v. 3, n. 3, p. REVIEWS0004, 2001.
- MITCHELL, S.; PARKER, R. Principles and properties of eukaryotic mRNPs. **Molecular cell**, v. 54, n. 4, p. 547-58, 2014.
- MOORE, K. et al. The role of PPAR- γ in macrophage differentiation and cholesterol uptake. **Nature Medicine**, 2001.
- NAKAGAWA, M. et al. Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. **Nature biotechnology**, v. 26, n. 1, p. 101-6, 2007.
- NANBRU et al. Alternative translation of the proto-oncogene c-myc by an internal ribosome entry site. **The Journal of biological chemistry**, v. 272, n. 51, p. 32061-6, 1997.
- NICHOLS et al. Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. **Cell**, v. 95, n. 3, p. 379-91, 1998.
- ON THE AND OF OBESITY, N. Overweight, obesity, and health risk. **Archives of internal medicine**, v. 160, n. 7, p. 898-904, 2000.
- PATEL, P.; BURAS, E.; BALASUBRAMANYAM, A. The Role of the Immune System in Obesity and Insulin Resistance. **Journal of Obesity**, 2013.
- PAVITT et al. eIF2 independently binds two distinct eIF2B subcomplexes that catalyze and regulate guanine-nucleotide exchange. **Genes & development**, v. 12, n. 4, p. 514-26, 1998.
- PELLETIER; SONENBERG. Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA. **Nature**, v. 334, n. 6180, p. 320-5, 1988.
- PESTOVA et al. The joining of ribosomal subunits in eukaryotes requires eIF5B. **Nature**, v. 403, n. 6767, p. 332-5, 2000.

- PESTOVA; SHATSKY; HELLEN. Functional dissection of eukaryotic initiation factor 4F: the 4A subunit and the central domain of the 4G subunit are sufficient to mediate internal entry of 43S preinitiation complexes. **Molecular and cellular biology**, v. 16, n. 12, p. 6870-8, 1996.
- PISAREVA, V.; PISAREV, A. eIF5 and eIF5B together stimulate 48S initiation complex formation during ribosomal scanning. **Nucleic Acids Research**, 2014.
- PITTENGER et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. **Science (New York, N.Y.)**, v. 284, n. 5411, p. 143-7, 1999.
- PITTENGER et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. 1999.
- RAGAN. A Third Kingdom of eukaryotic life: History of an idea: ISEP president's address. 1997.
- RAMALHO-SANTOS, M.; WILLENBRING, H. On the Origin of the Term "Stem Cell". **Cell Stem Cell**, 2007.
- RAPOSO, G.; STOOORVOGEL, W. Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. **The Journal of Cell Biology**, 2013.
- REBELATTO et al. Dissimilar differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, and adipose tissue. **Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.)**, v. 233, n. 7, p. 901-13, 2008.
- REIJNS, M. et al. A role for Q/N-rich aggregation-prone regions in P-body localization. **Journal of Cell Science**, 2008.
- REUBINOFF et al. Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro. **Nature biotechnology**, v. 18, n. 4, p. 399-404, 2000.
- ROGERS, G. et al. Modulation of the Helicase Activity of eIF4A by eIF4B, eIF4H, and eIF4F. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 33, p. 30914-22, 2001.
- ROJAS; ARIAS; LOPEZ. Protein Kinase R Is Responsible for the Phosphorylation of eIF2 in Rotavirus Infection. **Journal of Virology**, v. 84, n. 20, p. 10457-10466, 2010.
- ROSEN et al. PPAR gamma is required for the differentiation of adipose tissue in vivo and in vitro. **Molecular cell**, v. 4, n. 4, p. 611-7, 1999.
- ROSEN et al. Transcriptional regulation of adipogenesis. **Genes & development**, v. 14, n. 11, p. 1293-307, 2000.
- ROSEN, E. et al. C/EBPalpha induces adipogenesis through PPARgamma: a unified pathway. **Genes & development**, v. 16, n. 1, p. 22-6, 2001.
- SANTOS, F.; DEAN, W. Epigenetic reprogramming during early development in mammals. **Reproduction**, v. 127, n. 6, p. 643-651, 2004.
- SATO, N. et al. Molecular signature of human embryonic stem cells and its comparison with the mouse. **Developmental biology**, v. 260, n. 2, p. 404-13, 2003.
- SCHNEIDER-POETSCH, T. et al. Inhibition of eukaryotic translation elongation by cycloheximide and lactimidomycin. **Nature Chemical Biology**, 2010.
- SCHOENBERG, D.; MAQUAT, L. Re-capping the message. **Trends in biochemical sciences**, v. 34, n. 9, p. 435-442, 2009.

SEALE; ASAKURA; RUDNICKI. The Potential of Muscle Stem Cells. **Developmental Cell**, 2001.

SEBALD, W. et al. Molecular recognition in bone morphogenetic protein (BMP)/receptor interaction. **Biological chemistry**, v. 385, n. 8, p. 697-710, 2004.

SEITA, J.; WEISSMAN, I. Hematopoietic stem cell: self-renewal versus differentiation. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine**, 2010.

SHAMBLOTT et al. Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 23, p. 13726-31, 1998.

SHATKIN. Capping of eucaryotic mRNAs. **Cell**, v. 9, n. 4, p. 645-653, 1976.

SHE, M. et al. Structural Basis of Dcp2 Recognition and Activation by Dcp1. **Molecular Cell**, v. 29, n. 3, p. 337-349, 2008.

SHUGART; UMEK. Dexamethasone signaling is required to establish the postmitotic state of adipocyte development. **Cell growth & differentiation : the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research**, v. 8, n. 10, p. 1091-8, 1997.

SIERSBÆK, R.; NIELSEN, R.; MANDRUP, S. PPAR γ in adipocyte differentiation and metabolism – Novel insights from genome-wide studies. **FEBS Letters**, 2010.

SMITH. Embryo-derived stem cells: of mice and men. **Annual review of cell and developmental biology**, v. 17, p. 435-62, 2000.

SOKABE, M.; FRASER, C. Human Eukaryotic Initiation Factor 2 (eIF2)-GTP-Met-tRNAⁱ Ternary Complex and eIF3 Stabilize the 43S Preinitiation Complex. **Journal of Biological Chemistry**, 2014.

SPANGENBERG, L. et al. Polysome profiling shows extensive posttranscriptional regulation during human adipocyte stem cell differentiation into adipocytes. **Stem cell research**, v. 11, n. 2, p. 902-12, 2013.

STOORVOGEL, W. et al. The Biogenesis and Functions of Exosomes. **Traffic**, v. 3, n. 5, p. 321-330, 2002.

TAKAHASHI, K. et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. **Cell**, v. 131, n. 5, p. 861-72, 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. 663-76, 2006.

TANG, Q.; LANE. Adipogenesis: from stem cell to adipocyte. **Annual review of biochemistry**, v. 81, p. 715-36, 2011.

TANG, Q.-Q.; OTTO, T.; LANE. CCAAT/enhancer-binding protein beta is required for mitotic clonal expansion during adipogenesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 3, p. 850-5, 2003.

TARUN et al. Translation initiation factor eIF4G mediates in vitro poly(A) tail-dependent translation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, n. 17, p. 9046-51, 1997.

- TEIXEIRA, D. et al. Processing bodies require RNA for assembly and contain nontranslating mRNAs. **RNA (New York, N.Y.)**, v. 11, n. 4, p. 371-82, 2005.
- TETTA, C. et al. Extracellular vesicles as an emerging mechanism of cell-to-cell communication. **Endocrine**, v. 44, n. 1, p. 11-9, 2013.
- THO et al. Intravenous infusion of bone marrow in patients receiving radiation and chemotherapy. **The New England journal of medicine**, v. 257, n. 11, p. 491-6, 1957.
- THOMSON et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. **Science (New York, N.Y.)**, v. 282, n. 5391, p. 1145-7, 1998.
- TILL; MCCULLOCH. Hemopoietic stem cell differentiation. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer**, v. 605, n. 4, p. 431-459, 1980.
- TONG, Q. et al. Interaction between GATA and the C/EBP family of transcription factors is critical in GATA-mediated suppression of adipocyte differentiation. **Molecular and cellular biology**, v. 25, n. 2, p. 706-15, 2004.
- TONTONOZ et al. mPPAR gamma 2: tissue-specific regulator of an adipocyte enhancer. **Genes & development**, v. 8, n. 10, p. 1224-34, 1994.
- TOURRIÈRE, H.; CHEBLI, K.; TAZI, J. mRNA degradation machines in eukaryotic cells. **Biochimie**, v. 84, n. 8, p. 821-837, 2002.
- UNBEHAUN, A. et al. Release of initiation factors from 48S complexes during ribosomal subunit joining and the link between establishment of codon-anticodon base-pairing and hydrolysis of eIF2-bound GTP. **Genes & development**, v. 18, n. 24, p. 3078-93, 2004.
- VAGNER et al. Alternative translation of human fibroblast growth factor 2 mRNA occurs by internal entry of ribosomes. **Molecular and cellular biology**, v. 15, n. 1, p. 35-44, 1994.
- VALENCIA-SANCHEZ. Control of translation and mRNA degradation by miRNAs and siRNAs. **Genes & Development**, v. 20, n. 5, p. 515-524, 2006.
- VASUDEVAN, S.; STEITZ, J. AU-Rich-Element-Mediated Upregulation of Translation by FXR1 and Argonaute 2. **Cell**, 2007.
- VATER; KASTEN; STIEHLER. Culture media for the differentiation of mesenchymal stromal cells. 2011.
- VORONINA, E. et al. RNA granules in germ cells. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 3, n. 12, 2011.
- WAGERS, A.; WEISSMAN, I. Plasticity of Adult Stem Cells. **Cell**, 2004.
- WAKIYAMA; IMATAKA; SONENBERG. Interaction of eIF4G with poly(A)-binding protein stimulates translation and is critical for Xenopus oocyte maturation. **Current biology : CB**, v. 10, n. 18, p. 1147-50, 2000.
- WANG, J. et al. A protein interaction network for pluripotency of embryonic stem cells. **Nature**, v. 444, n. 7117, p. 364-8, 2006.
- WATERS, J.; RICHARDSON, G.; JAHODA, C. Hair follicle stem cells. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, 2007.

- WELNER, R. et al. C/EBP α is required for development of dendritic cell progenitors. **Blood**, v. 121, n. 20, p. 4073-81, 2013.
- WILSON, R.; DOUDNA, J. Molecular Mechanisms of RNA Interference. **Annual Review of Biophysics**, v. 42, n. 1, p. 217-239, 2013.
- WU et al. Cross-regulation of C/EBP alpha and PPAR gamma controls the transcriptional pathway of adipogenesis and insulin sensitivity. **Molecular cell**, v. 3, n. 2, p. 151-8, 1999.
- WU, J. et al. The KLF2 transcription factor does not affect the formation of preadipocytes but inhibits their differentiation into adipocytes. **Biochemistry**, v. 44, n. 33, p. 11098-105, 2005.
- YANG, D.-C. et al. cAMP/PKA regulates osteogenesis, adipogenesis and ratio of RANKL/OPG mRNA expression in mesenchymal stem cells by suppressing leptin. **PloS one**, v. 3, n. 2, p. e1540, 2007.
- YING, Q. et al. BMP induction of Id proteins suppresses differentiation and sustains embryonic stem cell self-renewal in collaboration with STAT3. **Cell**, v. 115, n. 3, p. 281-92, 2003.
- YU; THOMSON. Pluripotent stem cell lines. **Genes & Development**, 2008.
- ZHANG, H. et al. Insulin stimulates adipogenesis through the Akt-TSC2-mTORC1 pathway. **PloS one**, v. 4, n. 7, p. e6189, 2008.
- ZHANG, J. et al. Sall4 modulates embryonic stem cell pluripotency and early embryonic development by the transcriptional regulation of Pou5f1. **Nature cell biology**, v. 8, n. 10, p. 1114-23, 2006.
- ZHENG, D. et al. Deadenylation is prerequisite for P-body formation and mRNA decay in mammalian cells. **The Journal of cell biology**, v. 182, n. 1, p. 89-101, 2008.
- ZOVOILIS, A. et al. Members of the miR-290 cluster modulate in vitro differentiation of mouse embryonic stem cells. **Differentiation**, 2009.
- ZUK et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. **Tissue engineering**, v. 7, n. 2, p. 211-28, 2001.
- ZYCH, J. et al. Polysome profiling shows the identity of human adipose-derived stromal/stem cells in detail and clearly distinguishes them from dermal fibroblasts. **Stem cells and development**, v. 23, n. 22, p. 2791-802, 2014.

ANEXOS.

Artigos publicados como colaborador durante o doutorado.

Lysozyme-Triggered Epidermal Growth Factor Release from Bacterial Cellulose Membranes Controlled by Smart Nanostructured Films

GUILHERME FADEL PICHETH,^{1,2} MARIA RITA SIERAKOWSKI,¹ MARCO AURELIO WOEHL,¹ LUCY ONO,³ AXEL RULF COFRÉ,⁴ LUANA PASETTI VANIN,¹ ROBERTO PONTAROLO,² RILTON ALVES DE FREITAS¹

¹Biopol, Chemistry Department, Federal University of Paraná, Curitiba 81531-980, Paraná, Brazil

²CEB, Pharmacy Department, Federal University of Paraná, Curitiba 80210-170, Paraná, Brazil

³Yasuyoshi Hayashi Microbiology Laboratory, Basic Pathology Department, Federal University of Paraná, Curitiba 81531-990, Paraná, Brazil

⁴ICC, Fiocruz, Curitiba 81350-010, Paraná, Brazil

Received 22 May 2014; revised 23 July 2014; accepted 22 September 2014

Published online 10 October 2014 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com). DOI 10.1002/jps.24205

ABSTRACT: A novel wound-dressing biodevice, sensitive to lysozyme, an enzyme commonly found at infected skin wounds, was assembled by the layer-by-layer deposition of nanopolymeric chitosan and alginate films onto oxidized bacterial cellulose membranes incorporated with epidermal growth factor (EGF). Distinct EGF release profiles were obtained according to specific stimuli caused by infection. In *in vitro* conditions simulating noninfected wounds, the EGF rate and burst release effect were reduced by three deposited layers (M_t/M_∞ of 0.25 at 3 h) in a process dependent on the porosity of the compact chitosan–alginate complex. The importance of the organized structure was revealed when an infected wound was simulated by adding lysozyme to the release medium, thus inducing the formation of a loosely polyelectrolyte architecture that caused rapid EGF diffusion (M_t/M_∞ of 0.75 at 30 min). The results indicate that the nanopolymeric layers were capable of slowly releasing EGF as required for normal wound repair and rapidly undergoing architectural transitions that allow the diffusion of massive amounts of drug to enhance the process of re-epithelialization. In summary, the proposed system comprises the roles of both wound dressing and local delivery mechanism to recognize infections and respond with a burst of EGF release. © 2014 Wiley Periodicals, Inc. and the American Pharmacists Association *J Pharm Sci* 103:3958–3965, 2014

Keywords: bacterial cellulose; layer-by-layer; chitosan; alginate; nanotechnology; wound dressing; mathematical model; sustained release; *in vitro* models; protein delivery

INTRODUCTION

Local delivery of healing agents, such as growth factors (GFs), strives to induce faster and more effective skin repair. The reconstruction of wounded skin often requires occlusion of the damaged area to accelerate the process of re-epithelialization, avoid infections, and reduce exudates and local pain.¹ Although occlusive dressings are widely utilized in the treatment of burns and chronic wounds,² few systems are capable of simultaneously protecting the skin against infections and releasing bioactive drugs in a sustainable fashion. Therefore, the development of sensitive materials for sustained drug release as well as controlled cell proliferation, migration, and differentiation³ represents a fundamental advance in current regenerative medicine.

Among the most successful wound dressings, bacterial cellulose (BC) membranes accelerate the process of tissue repair in chronic wounds, skin burns, and bones.⁴ BC produced by *Gluconobacter xylinus* was first introduced as an ideal wound dressing material because of its high *in vivo* biocompatibility and unique microfibrillar structure that provides flexibility,

high water retention capability, and gas exchange.⁵ Additionally, BC membranes maintain a physical barrier that reduces pain and bacterial infection and allows drug transfer into the wounded region.⁶ For all of these characteristics, BC is utilized in several biomedical applications, such as microblood vessels, bone and cartilage tridimensional grafts, and burn treatment.²

Novel strategies for damaged skin treatment include the utilization of molecules with the capability to induce faster re-epithelialization.⁷ This family of molecules is represented by GFs, which are signaling peptides that show great potential to accelerate the wound healing process with their ability to induce cells to proliferate and establish a new matrix in the wounded gap.⁸ Among the key regulators of keratinocyte proliferation at the injury edge, epidermal GF (EGF) acts as a motogen and a mitogen in the epidermis to ensure wound closure.⁹

Although EGF is widely utilized in epithelial wound repair, its rapid hydrolysis by proteolytic enzymes requires a controlled release according to the lesion type, phase, and/or the coadministration of anti-proteolytic agents. Additionally, GF concentrations fluctuate according to lesion characteristics: chronic and infected wounds present increased amounts of metalloproteinases that diminish GF bioavailability at the injury bed¹⁰ and demand higher amounts of EGF for optimal treatment. Nevertheless, in venous and diabetic ulcers, GFs are trapped within fibrin cuffs and become unavailable for tissue repair¹¹;

Correspondence to: Rilton Alves de Freitas (Telephone: +55-41-3361-3260; Fax: +55-41-3361-3186; E-mail: rilton@ufpr.br, rilton@quimica.ufpr.br)

This article contains supplementary material available from the authors upon request or via the Internet at <http://wileylibrary.com>.

Journal of Pharmaceutical Sciences, Vol. 103, 3958–3965 (2014)

© 2014 Wiley Periodicals, Inc. and the American Pharmacists Association

therefore, exogenous EGF is needed to ensure wound closure. In summary, delivery of EGF with distinct release rates is required to enhance skin repair in wounds that are susceptible to and incur infection. Although many release systems succeed in delivering EGF, few are capable of altering the amounts of drug diffused instantaneously according to tissue requirements.

In this study, we report the development and characterization of a novel nanoengineered biodevice for “smart” sustained release of an EGF-mimicking peptide at damaged skin areas that are either noninfected or infected. This novel sensitive delivery system is based on thin and flexible oxidized BC (OBC) membranes coated with nanopolymeric layers through a spray-assisted layer-by-layer (sLbL) technique¹² and composed of oppositely charged polyelectrolytes: chitosan, a linear polysaccharide composed of *N*-acetyl-D-glucosamine and D-glucosamine bonded via β -(1 \rightarrow 4) linkages that presents naturally antimicrobial and hemostatic activities¹³; and alginate, a copolymer of (1 \rightarrow 4) linked β -D-mannuronic acid and α -L-guluronic acid.¹⁴

MATERIALS AND METHODS

Chemicals

Chitosan was obtained from Purifarma (São Paulo, Brazil). Acetic acid, alginate, sodium hydroxide, 2,2,6,6-tetramethylpiperidyl-1-oxyl (TEMPO), hydrochloric acid, sodium bromide, sodium hypochlorite, rhodamine B isothiocyanate (RITC), fluorescein isothiocyanate, Dulbecco’s modified Eagle medium, amphotericin B, Bacto agar, enrofloxacin, penicillin G potassium, and lysozyme from chicken egg white (96,381 U/mg) were obtained from Sigma Chemical Company (St. Louis, Missouri). The EGF-mimicking peptide was purchased from Caregen, Company (Kunpo, Republic of Korea). Ultrapure water was obtained from a MilliQ system using 0.45- μ m cellulose ester filtration membranes from Millipore Company (Billerica, Massachusetts). BC membranes were kindly donated by Bionext® (São José dos Pinhais, Brazil).

Chitosan was previously purified¹⁵ and solubilized in 0.5 mol/L acetic acid at fixed concentrations of 1 mg/mL. The degree of deacetylation of the chitosan was 82.3%, the weight average molar mass (M_w) was 87.8×10^3 g/mol, and the ζ -potential was $+14 \pm 5.2$ mV at pH 4.5. Alginate was solubilized in ultrapure water for 24 h and used without further purification at 1 mg/mL. The M_w of alginate was 92.0×10^3 g/mol and the ζ -potential was -20 ± 6.1 mV at pH 8.0 (Supporting Information 1.1).

Oxidation of BC Membranes

The BC membranes were oxidized according to a protocol described in Sierakowski et al.¹⁶ (Supporting Information 1.2).

Attenuated Total Reflection-Fourier Transform Infrared Spectroscopy

Infrared spectra were recorded with a VERTEX 70 FT-IR spectrometer (Bruker Company, Billerica, Massachusetts) equipped with an attenuated total reflection (ATR) accessory. All spectra were obtained from a total of 16 scans with a resolution of 4 cm^{-1} in the range of 400–4000 cm^{-1} .

X-Ray Photoelectron Spectroscopy

X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) analyses were performed using a commercial system (VG Microtech ESCA 3000,

Sussex, UK) equipped with Al K α radiation sources with a base pressure in the experimental chamber lower than 10^{-9} mbar. The spectra were obtained at a takeoff angle of 45° using a hemispherical energy analyzer with an overall energy resolution of approximately 0.8 eV. The binding energy scales were referenced by setting the C–C component of the C1s signal at 285.0 eV.¹⁷ The XPS analyses were performed by assuming core level spectra with Gaussian line shapes after standard Shirley background subtraction.

sLbL Deposition

Polymer deposition on TEMPO-modified membranes was performed using spray methodology.¹⁸ The samples were immobilized in a glass stand and nebulized with an air-propellant device (AIR-BOY; Carl Roth, Lauterbourg, Bas-Rhin, France) containing solutions of chitosan (1 mg/mL pH 4.5) and alginate (1 mg/mL pH 8.0) in an alternating fashion for 2 s interspersed with a washing step with ultrapure water for 3 s. The membranes were coated with up to four polymeric layers and dried in an oven at 37°C for 24 h.

Atomic Force Microscopy

Atomic force microscopy (AFM) analyses were performed in air using an Agilent microscope (Agilent Technologies, Santa Clara, California) and Pico Image software (Agilent Technologies). Images were obtained in tapping mode with Vistaprobes® (Nanoscience Instruments, Inc., Phoenix, Arizona) silicon tips (nominal spring constant of 48 N/m and resonance frequency of ~ 180 kHz) by scanning three distinct areas of $4 \times 4 \mu\text{m}^2$ on each sample. All membrane images were collected after 24 h of drying at 37°C. The data were analyzed with Gwyddion Software (Czech Metrology Institute, Brno, Morávia, Czech Republic).

In Vitro Cytotoxicity Assay

The cytotoxicity of the membranes was evaluated using the agar overlay assay¹⁹ (Supporting Information 1.3).

Confocal Fluorescence Microscopy

Fluorescein isothiocyanate-labeled EGF and RITC-labeled chitosan were prepared following protocols described by Clayton et al.²⁰ and Ma et al.,²¹ respectively (Supporting Information 1.4).

In Vitro Drug Release

The dry OBC membranes were cut into round shapes with a diameter of 1.5 cm (1.5 ± 0.4 mg) and left to swell in 2000 $\mu\text{g/mL}$ EGF-mimicking peptide solution at 22°C for 48 h. Afterwards, the OBC membranes were dried in an oven at 37°C for 24 h and coated by sLbL as described in section *sLbL Deposition*.

The *in vitro* drug release experiments were performed in 20-mL flasks containing 10 mL of 0.1 mol/L phosphate-buffered saline (PBS) buffer at 37°C (pH 5.5/sodium azide 200 ppm as a preservative)²² with or without lysozyme (10,000 U/mL),²³ under constant stirring. At each sampling time point, 2 mL were withdrawn and immediately replaced with fresh medium. The release experiments were repeated in triplicate for each sample. The released amounts of EGF were analyzed by high-performance liquid chromatography (HPLC) in a Shimadzu Prominence LC-20AT/CBM-20A (Kyoto, Kansai, Japan) with a C18 column (Symmetry®) and UV detector at 210 nm. The mobile phase was composed of 60% (v/v) acetonitrile and 40%

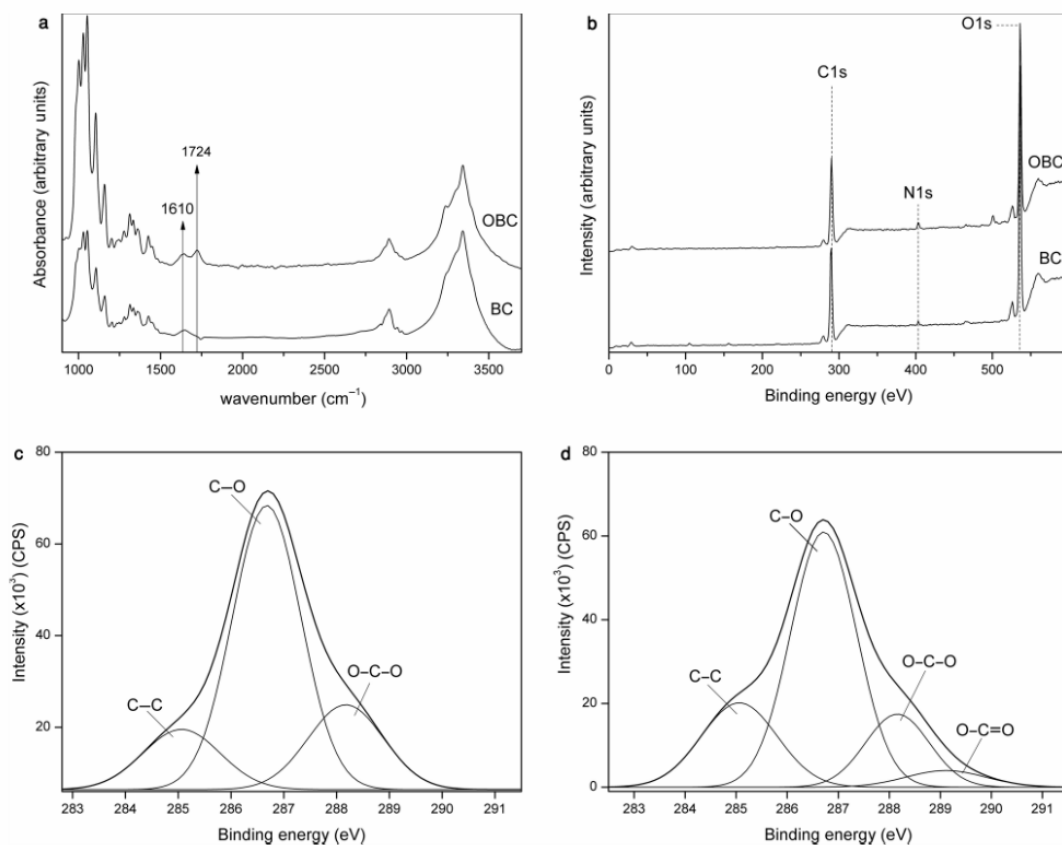


Figure 1. Spectra from ATR-FTIR (a), low-resolution XPS (b), and high-resolution XPS of BC membranes before (c) and after (d) the oxidative reaction.

water-containing trifluoroacetic acid 0.125% (v/v), at a flow rate of 1 mL/min. The furnace was maintained at 40°C (Supporting Information 1.5).

Statistical Analysis

Differences among the EGF release profiles were tested with one-way ANOVA corrected for multiple comparison test with Tukey HSD test. The *p* values of less than 0.05 were considered statistically significant. The program Statistica for Windows version 8.0 (StatSoft Inc., Tulsa, Oklahoma) was used for analysis.

RESULTS AND DISCUSSION

TEMPO-Mediated BC Membrane Modification

The development of LbL films strongly depends on the presence of interfacial charged groups to provide an electrostatic potential that generates effective attraction between oppositely charged species.¹² Because BC possesses limited induced surface-charged groups and, therefore, is unable to anchor large amounts of polyelectrolytes, it was modified by a TEMPO-

mediated reaction that selectively inserts carboxylic groups, mainly at C6 in cellulose.

The ATR-FTIR spectra (Fig. 1a) of the BC membrane exhibited a broad band at 3500 cm^{-1} , because of the presence of chain structure OH groups, and a strong signal at 1051 cm^{-1} , attributed to the C–O–C stretching of the pyranose ring.²⁴ After the TEMPO-mediated reaction, structural modification was confirmed by the presence of a band at 1610 cm^{-1} corresponding to a stretching frequency of carboxyl groups in their ionized form and a band at 1724 cm^{-1} corresponding to a stretching frequency of carboxyl groups in their acidic form.²⁵

The presence of carboxylic groups after the oxidative process was also evaluated by XPS: the low-resolution spectra (Fig. 1b) verified that the surfaces were clean and presented characteristic features of cellulose after the oxidative procedure.²⁶ The C1s high-resolution spectra of BC and oxidized BC are presented in Figures 1c and 1d, respectively. The membranes that underwent the oxidative process presented a signal intensity of 4.5% relative to carboxylic groups (O–C=O) at 289.1 eV, as observed by Fras et al.,¹⁷ whereas the untreated membranes exhibited no signal at the same binding energy, confirming the surface modification. The XPS analysis was performed in three distinct regions of the BC membrane and a variation of 0.3% was

found. Additionally, the FTIR data exclude the possibility that the carboxyl group peak is an inhomogeneous charging artifact. Other methodologies to quantify carboxylic groups, as titration methodology, would quantify the carboxylic groups both at interface and into the most deep cellulosic fibers.

The FTIR results (Fig. 1a) showed that the oxidation process also modified a certain extent of the membrane's interior as already observed by Frasci et al.¹⁷ and Wu et al.²⁷ After the TEMPO-mediated carboxylation, increased solubility and chain detachment are expected in the dynamic reactive medium, as already discussed by Wu et al.,²⁷ leading to small amounts of carboxyl content at the membrane's interface. In addition, decreased signal intensity at 288.1 eV (from 20.8% to 16%) was obtained after the reaction.¹⁷ As previously noted by DiFlavio et al.,²⁸ oxidation caused the C–O contribution (286.6 eV) to reduce—63.9% for untreated and 57.6% for oxidized samples—because of the conversion of primary alcohols to carboxylic groups. Moreover, according to Johansson and Campbell,²⁹ air-exposed surfaces are highly susceptible to contamination by carbonaceous materials at nonpredictable levels, explaining the increase at 285.0 eV (C–C) from 15.1% to 21.9% after the oxidative process.

sLbL Deposition

The spray-assisted layer-by-layer technique provides fast deposition of mass-transfer-limiting barriers with controllable properties and thickness based on the electrostatic attractions between oppositely charged materials.¹⁸ Therefore, sLbL is a suitable technique to preserve the macromolecular structure and properties (e.g., flexibility, porosity, and high surface area) of OBC and allow the adsorption of conformable and interfacial layers to control drug diffusibility.¹⁸

Before the sLbL process, OBC membranes were loaded with the EGF-mimicking peptide and subsequently coated with several polyelectrolyte layers. The adsorption of the first chitosan layer as well as the presence of EGF in cellulosic microfibrils was assessed by confocal fluorescence microscopy. Although the OBC membranes exhibited only 4.5% of carboxyl groups at the interface, a rate also previously found,¹⁷ the stability of the first chitosan layer was confirmed by fluorescence microscopy that revealed polymer deposition onto OBC fibers after the washing procedures (Supporting Information 1A). The results showed that chitosan remained anchored at the oxidized fiber surfaces, confirming the interaction with OBC.

For cellulose–protein interaction, the images showed that the EGF was accumulated at the top and within the cellulosic microfibrils, in a time-consuming process (Supporting Information 1B). The EGF adsorption by OBC or BC membranes was possible because of its microfibrillar network structure, high surface area, and porosity, as already discussed by Martins et al.³⁰ Also, EGF is negatively charged at physiological conditions (pI of 6.5–6.8), exhibiting strong electrostatic interactions with the chitosan layer, as observed in the release experiments.

Atomic force microscopy images (Fig. 2) of OBC membranes submitted to the first layer of chitosan showed smooth deposits that followed the surface topography, mainly because of the strong attraction between the positively charged amine groups of chitosan and the negatively charged carboxyl groups on the OBC surface. The influence of cellulose oxidation on chitosan adsorption was evaluated in a previous work,³¹ which observed

that oxidized cellulose was able to anchor greater amounts of chitosan than unmodified cellulose.

As for the membranes coated with thicker films (two to four layers), the results revealed intense agglomerates, disorganized nodular structures on top of cellulosic fibers, and an increase of root mean square (RMS) roughness values, mostly related to the intense attraction between chitosan and alginate chains.³⁰ Therefore, the assembly of a membrane-derived delivery system was demonstrated by the gradual surface covering of OBC with polyelectrolytes.

In Vitro Cytotoxicity

Although BC is considered a highly biocompatible material,⁵ few reports discuss the toxicity of TEMPO-mediated oxidation. Therefore, to verify whether OBC and the polyelectrolyte layers might induce any cellular toxicity, samples with zero, one, and two coatings (interfacial layers are either of chitosan or alginate) were evaluated by the agar overlay assay¹⁹ (Supporting Information 2). The results showed that, apart from the positive control, no other sample caused inhibition of L929 cell growth. Therefore, the sLbL OBC membranes caused no toxic effects as assessed by this model and are adequate for safe use in wounded regions.

In Vitro EGF Release and Mathematical Modeling

The *in vitro* experimental setup evaluated the system's performance under common conditions for wounded epidermis. According to Schneider et al.³² during the healing process, a temporal acidosis (with a pH range of 4–6) is observed. Such mechanism inhibits the growth of many pathogenic bacteria, which require more alkaline environments for successful colonization³³ and is produced by several contributing factors (e.g., lactic acid secretion, higher oxygen demand, and increased pCO₂). Therefore, the medium was maintained at a pH of 5.5, and infected and noninfected wound conditions were simulated according to the presence of lysozyme.²³ A total amount of 200 µg of EGF-mimicking peptide was incorporated into the OBC membrane after 48 h of swelling.

Figure 3a exhibits the experimental release profile without lysozyme, simulating a noninfectious delivery medium. The results display the capability of the nanopolymeric films to reduce the burst effect and sustain drug diffusion after three coats of polymer deposition, as required for longstanding chronic wound treatments. Although all coated samples exhibited a decrease in the total amount of cumulative EGF release compared with uncoated membranes (until $t = 3$ h), an initial burst release was observed for samples having one and two polymeric layers. The burst effect was only minimized for the membranes having three or four layers, revealing the importance of the number of diffusional barriers to control drug release.

The experimental data of the EGF release profiles were analyzed by the Weibull model Eq. (1).^{34,35}

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 1 - \exp \left[- \left(\frac{t}{\tau} \right)^b \right], \quad (1)$$

where M_t/M_∞ is the fraction of released EGF, τ defines a scale parameter representing the time to release 63.2% of the drug, and b is an indicator of drug transport through polymeric layers.³⁶ The solid lines represent the fitted experimental data

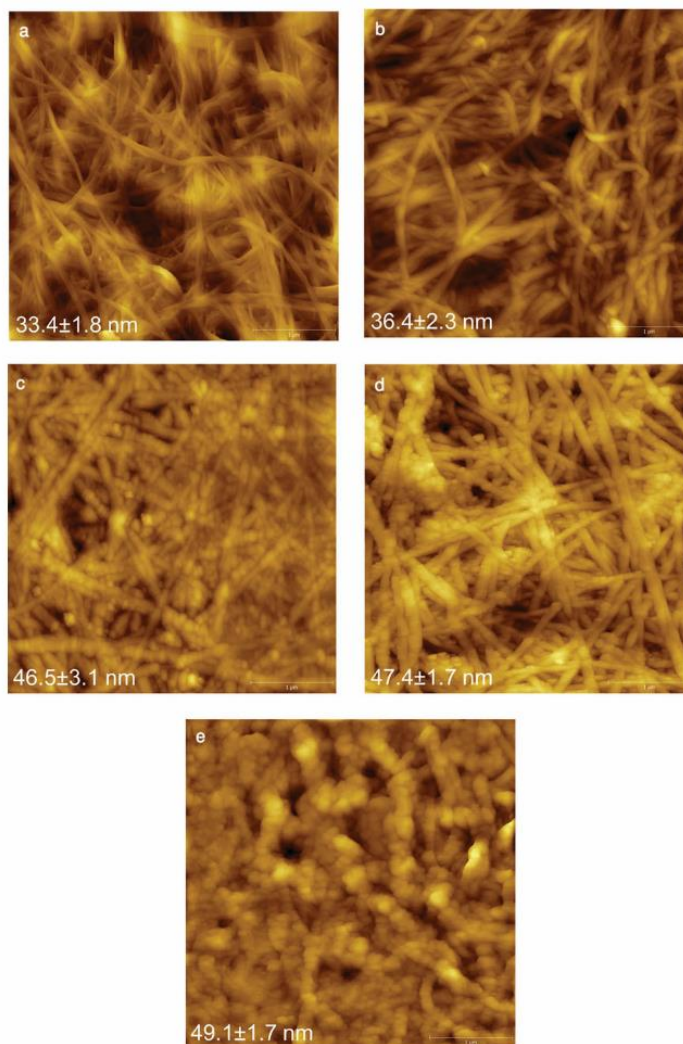


Figure 2. Atomic force microscopy images ($4 \times 4 \mu\text{m}^2$ tapping mode) of oxidized BC membranes (a) covered with one (b), two (c), three (d), and four (e) polymeric layers by sLbL deposition. The RMS values for roughness are indicated for each sample.

for EGF release from Figures 3a and 3b. The fitting parameters are described in Table 1.

Samples submitted to dissolution experiments in the medium without lysozyme exhibited b values within the range of 0.36–0.69, therefore demonstrating that Fickian diffusion dominates the release process. Consequently, the EGF release is related to the electrostatic interactions performed between EGF–chitosan and chitosan–alginate, the number of diffusional barriers and swelling. All membranes coated with a last deposit of chitosan (one and three layers) exhibited reduced EGF release rates because of the formation of a more continuous and less porous structure because of chitosan's solubility in acid conditions (pH 5.5). Instead, samples coated with an interfacial

barrier of alginate (two and four layers) exhibited higher fractions of released EGF when compared with membranes having chitosan as last deposited layer. As demonstrated by Martins et al.,³⁰ negatively charged alginate (pKa 4.5) chains have the ability to overcompensate and invert the positive charge of chitosan (pKa 6.5), thus reducing the availability of chitosan's NH_3^+ groups and consequently the polymer charge and solubility. Therefore, the presence of interfacial alginate induces a structural rearrangement to a more static and porous architecture that leads to increased EGF diffusion from the OBC membrane.

The number of deposited barriers also displayed higher EGF retention by reducing the system's porosity¹⁸ as observed for the

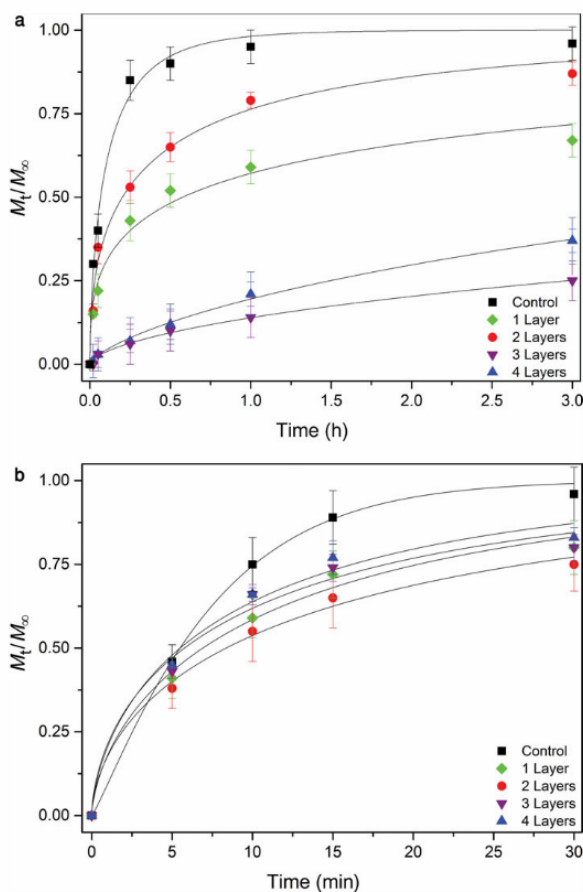


Figure 3. Experimental EGF release profiles in 0.1 mol/L PBS buffer, pH 5.5 without enzyme (a) and containing lysozyme (10,000 U/mL) (b). Samples are represented with symbols for uncoated (■), one (◆), two (●), three (▼), and four (▲) layers.

Table 1. Values of b , τ , and r^2 for Samples Submitted to Release Experiments in the 0.1 mol/L PBS Buffer pH 5.5 Dissolution Medium Containing and Without Lysozyme

Sample	PBS			PBS + 10,000 U/mL Lysozyme		
	b	r^2	τ (h)	b	r^2	τ (min)
Control	0.65	0.990	0.11	1.13	0.997	7.5
One layer	0.36	0.986	1.57	0.65	0.986	12.2
Two layers	0.45	0.977	0.45	0.60	0.979	15.5
Three layers	0.60	0.995	23.8	0.60	0.990	10.6
Four layers	0.69	0.993	8.86	0.64	0.993	9.7

membranes coated with three and four layers—without significant difference between each other until $t = 1$ h (Suppl. Table S1). In such samples, the relaxation of the complex chitosan-alginate might also affect the EGF release besides the diffusion process as already observed by Tapia et al.³⁷

In a second experiment, lysozyme was added to the dissolution medium to evaluate the response of the OBC system

at elevated enzyme levels, such as those commonly found in infected wounds.²³ Lysozyme is an *N*-acetylmuramide glycanhydrolase that hydrolyzes the glycosidic linkages between the *N*-acetylmuramic acid and *N*-acetylglucosamine residues of the bacterial cell wall peptidoglycan³⁸ and is the main enzyme that degrades chitosan in the OBC–sLbL system, leading to different kinetic profiles.

In the lysozyme-containing medium, EGF release is mainly characterized by diffusion as the structural organization is rapidly lost. Figure 3b shows the release profiles in the presence of 10,000 U/mL of lysozyme, a condition compatible with infected tissues, as reported by Hasmann et al.²³ After a few minutes of exposure to the medium, the sLbL architecture of all samples was damaged because of chitosan hydrolysis, leading to looser and more porous polyelectrolyte structures that were weakly anchored to the cellulosic fibers. According to the kinetic fitting data (Table 1), the process of drug release was dominated by Fickian diffusion without significant difference between all samples (Suppl. Table S2). As a result, a burst release of EGF, characterized by a steep slope at short time intervals, was observed.

The polymeric structure disruption was also revealed by AFM images. Samples coated with four layers were withdrawn from the medium after 1 h of dissolution, dried for 24 h at 37°C and analyzed. The results indicated that the membranes submitted to normal wounded skin conditions (0.1 mol/L PBS buffer, pH 5.5) presented polymer agglomerates covering a great extent of the fiber length, thereby acting as barriers to drug diffusion (Fig. 4a). However, the samples placed in the medium containing lysozyme revealed only small polymer deposits in isolated areas, facilitating the release of EGF (Fig. 4b).

In summary, infection in wounded regions, indicated by the presence of lysozyme, promptly leads to massive drug release to counteract the local absence of EGF. In noninfected injuries, the smart OBC–sLbL system will deliver EGF slowly, as normally required by the tissue. In real conditions, the presence of pathogens producing inhibitors of lysozyme may partially affect the lysozyme activity in wounds. However, considering that high levels of lysozyme are found in infected wounds,²³ that lysozyme inhibitors apparently are not actively secreted in the wound fluid,³⁹ and that wound fluids are very complex matrixes, we suggest that even in the presence of bacterial species able to minimize the enzymatic action, enough lysozyme activity would be available for proper membrane response.

CONCLUSION

We report the assembly of a protein delivery system on thin and flexible oxidized BC wound dressings with the potential to simultaneously protect skin injuries and release EGF. In addition, the proposed system presents a “smart” mechanism that generates burst drug release because of architectural transitions induced by the presence of lysozyme. Increased therapeutic effects might be achieved at the treatment of several cutaneous wounds.

ACKNOWLEDGMENTS

We acknowledge the Brazilian funding agencies CNPq (Conselho Nacional de Pesquisa), the REUNI program, and Rede

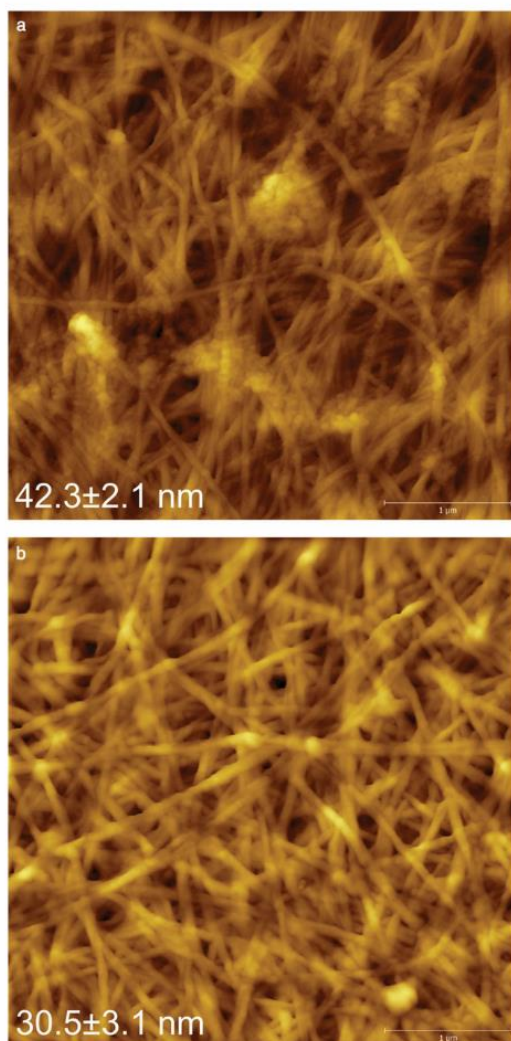


Figure 4. Atomic force microscopy images ($4 \times 4 \mu\text{m}^2$, tapping mode) of oxidized BC membranes coated with four polymeric layers withdrawn from the (a) dissolution medium (PBS 0.1 mol/L, pH 5.5) and (b) dissolution medium containing lysozyme (10,000 U/mL) after 1 h. The RMS values of rugosity are indicated for each sample.

Nanobiotec/Capes-Brazil for financial support. We are grateful to Dr. Wido Hewig Schreiner (Department of Physics of UFPR) for the XPS analysis, to Dr. Alejandro Correa Dominguez (ICC, Fiocruz) for the fluorescence experiments, to Cleverton Pirich for skillful help with data treatment, to Dr. Geraldo Picheth for statistical analysis, and to Bionext® for kindly donating all membrane samples.

REFERENCES

1. Alvarez OM, Mertz PM, Eaglstein WH. 1983. The effect of occlusive dressings on collagen-synthesis and re-epithelialization in superficial wounds. *J Surg Res* 35(2):142–148.
2. Czaja W, Krystynowicz A, Bielecki S, Brown RM. 2006. Microbial cellulose—The natural power to heal wounds. *Biomaterials* 27(2):145–151.
3. Lucchesi C, Ferreira BMP, Duek EAR, Santos AR, Joazeiro PP. 2008. Increased response of Vero cells to PHBV matrices treated by plasma. *J Mater Sci Mater Med* 19(2):635–643.
4. Fontana JD, Desouza AM, Fontana CK, Torriani IL, Moreschi JC, Gallotti BJ, Desouza SJ, Narcisco GP, Bichara JA, Farah LFX. 1990. Acetobacter cellulose pellicle as a temporary skin substitute. *Appl Biochem Biotechnol* 24–25:253–264.
5. Helenius G, Backdahl H, Bodin A, Nannmark U, Gatenholm P, Risberg B. 2006. In vivo biocompatibility of bacterial cellulose. *J Biomed Mater Res A* 76A(2):431–438.
6. Sokolnicki AM, Fisher RJ, Harrah TP, Kaplan DL. 2006. Permeability of bacterial cellulose membranes. *J Membr Sci* 272(1–2):15–27.
7. Johnson NR, Wang YD. 2013. Controlled delivery of heparin-binding EGF-like growth factor yields fast and comprehensive wound healing. *J Control Release* 166(2):124–129.
8. Kondo T, Ishida Y. 2010. Molecular pathology of wound healing. *Forensic Sci Int* 203(1–3):93–98.
9. Martin P. 1997. Wound healing—Aiming for perfect skin regeneration. *Science* 276(5309):75–81.
10. Bennett NT, Schultz GS. 1993. Growth factors and wound healing: Part II. Role in normal and chronic wound healing. *Am J Surg* 166(1):74–81.
11. Robson MC. 1997. The role of growth factors in the healing of chronic wounds. *Wound Repair Regen* 5(1):12–17.
12. Decher G. 1997. Fuzzy nanoassemblies: Toward layered polymeric multicomposites. *Science* 277(5330):1232–1237.
13. Da Roz AL, Leite FL, Pereira LV, Nascente PAP, Zucolotto V, Oliveira ON, Carvalho AJF. 2010. Adsorption of chitosan on spin-coated cellulose films. *Carbohydr Polymers* 80(1):65–70.
14. Lee KY, Mooney DJ. 2012. Alginate: Properties and biomedical applications. *Prog Polym Sci* 37(1):106–126.
15. Recillas M, Silva LL, Peniche C, Goycoolea FM, Rinaudo M, Arguelles-Monal WM. 2009. Thermoresponsive behavior of chitosan-g-N-isopropylacrylamide copolymer solutions. *Biomacromolecules* 10(6):1633–1641.
16. Sierakowski MR, Milas M, Desbrieres J, Rinaudo M. 2000. Specific modifications of galactomannans. *Carbohydr Polym* 42(1):51–57.
17. Fras L, Johansson LS, Stenius P, Laine L, Stana-Kleinschek K, Ribitsch V. 2005. Analysis of the oxidation of cellulose fibres by titration and XPS. *Colloids Surface A Physicochem Eng Asp* 260(1–3):101–108.
18. Krogman KC, Lowery JL, Zacharia NS, Rutledge GC, Hammond PT. 2009. Spraying asymmetry into functional membranes layer-by-layer. *Nat Mater* 8(6):512–518.
19. Zange R, Kissel T. 1997. Comparative in vitro biocompatibility testing of polycyanoacrylates and poly(D,L-lactide-co-glycolide) using different mouse fibroblast (L929) biocompatibility test models. *Eur J Pharm Biopharm* 44(2):149–157.
20. Clayton AHA, Walker F, Orchard SG, Henderson C, Fuchs D, Rothacker J, Nice EC, Burgess AW. 2005. Ligand-induced dimer-tetramer transition during the activation of the cell surface epidermal growth factor receptor—A multidimensional microscopy analysis. *J Biol Chem* 280(34):30392–30399.
21. Ma O, Lavertu M, Sun J, Nguyen S, Buschmann MD, Winnik FM, Hoemann CD. 2008. Precise derivatization of structurally distinct chitosans with rhodamine B isothiocyanate. *Carbohydr Polym* 72(4):616–624.
22. Varghese MC, Balin AK, Carter DM, Caldwell D. 1986. Local environment of chronic wounds under synthetic dressings. *Arch Dermatol* 122(1):52–57.
23. Hasmann A, Wehrschuetz-Sigl E, Kanzler G, Gewessler U, Hulla E, Schneider KP, Binder B, Schintler M, Guebitz GM. 2011. Novel peptidoglycan-based diagnostic devices for detection of wound infection. *Diagn Microbiol Infect Dis* 71(1):12–23.

24. Lima GD, Sierakowski MR, Faria-Tischer PCS, Tischer CA. 2011. Characterisation of bacterial cellulose partly acetylated by dimethylacetamide/lithium chloride. *Mat Sci Eng C Mater* 31(2):190–197.
25. Max JJ, Chapados C. 2004. Infrared spectroscopy of aqueous carboxylic acids: Comparison between different acids and their salts. *J Phys Chem A* 108(16):3324–3337.
26. Mitchell R, Carr CM, Parfitt M, Vickerman JC, Jones C. 2005. Surface chemical analysis of raw cotton fibres and associated materials. *Cellulose* 12(6):629–639.
27. Wu YD, He JM, Cheng WL, Gu HB, Guo ZH, Gao S, Huang YD. 2012. Oxidized regenerated cellulose-based hemostat with microscopically gradient structure. *Carbohydr Polym* 88(3):1023–1032.
28. DiFlavio JL, Pelton R, Leduc M, Champ S, Essig M, Frechen T. 2007. The role of mild TEMPO-NaBr-NaClO oxidation on the wet adhesion of regenerated cellulose membranes with polyvinylamine. *Cellulose* 14(3):257–268.
29. Johansson LS, Campbell JM. 2004. Reproducible XPS on biopolymers: Cellulose studies. *Surf Interface Anal* 36(8):1018–1022.
30. Martins GV, Mano JF, Alves NM. 2010. Nanostructured self-assembled films containing chitosan fabricated at neutral pH. *Carbohydr Polym* 80(2):570–573.
31. Picheth G, Sierakowski M, Woehl M, Pirich C, Schreiner W, Pontarolo R, Freitas R. 2014. Characterisation of ultra-thin films of oxidised bacterial cellulose for enhanced anchoring and build-up of polyelectrolyte multilayers. *Colloid Polym Sci* 292(1):97–105.
32. Schneider LA, Korber A, Grabbe S, Dissemond J. 2007. Influence of pH on wound-healing: A new perspective for wound-therapy? *Arch Dermatol Res* 298(9):413–420.
33. Valero A, Perez-Rodriguez F, Carrasco E, Fuentes-Alventosa JM, Garcia-Gimeno RM, Zurera G. 2009. Modelling the growth boundaries of *Staphylococcus aureus*: Effect of temperature, pH and water activity. *Int J Food Microbiol* 133(1–2):186–194.
34. Papadopoulou V, Kosmidis K, Vlachou M, Macheras P. 2006. On the use of the Weibull function for the discernment of drug release mechanisms. *Int J Pharm* 309(1–2):44–50.
35. Hadjitheodorou A, Kalosakas G. 2013. Quantifying diffusion-controlled drug release from spherical devices using Monte Carlo simulations. *Mat Sci Eng C Mater* 33(2):763–768.
36. Kosmidis K, Macheras P. 2008. Monte Carlo simulations of drug release from matrices with periodic layers of high and low diffusivity. *Int J Pharm* 354(1–2):111–116.
37. Tapia C, Corbalan V, Costa E, Gai MN, Yazdani-Pedram M. 2005. Study of the release mechanism of diltiazem hydrochloride from matrices based on chitosan–alginate and chitosan–carrageenan mixtures. *Biomacromolecules* 6(5):2389–2395.
38. Salton MR. 1961. The anatomy of bacterial surface. *Bacteriol Rev* 25(2):77–99.
39. Deckers D, Masschalck B, Aertsen A, Callewaert L, Van Tiggelen CGM, Atanassova M, Michiels CW. 2004. Periplasmic lysozyme inhibitor contributes to lysozyme resistance in *Escherichia coli*. *Cell Mol Life Sci* 61(10):1229–1237.

Polysome Profiling Shows the Identity of Human Adipose-Derived Stromal/Stem Cells in Detail and Clearly Distinguishes Them from Dermal Fibroblasts

Jaiesa Zych,¹ Lucia Spangenberg,² Marco A. Stimamiglio,¹ Ana Paula R. Abud,¹ Patrícia Shigunov,¹ Fabricio Marchini,¹ Crisciele Kuligovski,¹ Axel R. Cofré,¹ Andressa V. Schittini,¹ Alessandra M. Aguiar,¹ Alexandra Senegaglia,³ Paulo R.S. Brofman,³ Samuel Goldenberg,¹ Bruno Dallagiovanna,¹ Hugo Naya,² and Alejandro Correa¹

Although fibroblasts and multipotent stromal/stem cells, including adipose-derived stromal cells (ADSCs), have been extensively studied, they cannot be clearly distinguished from each other. We, therefore, investigated the cellular and molecular characteristics of ADSCs and fibroblasts. ADSCs and fibroblasts share several morphological similarities and surface markers, but were clearly found to be different types of cells. Contrary to previous reports, fibroblasts were not able to differentiate into adipocytes, osteoblasts, or chondrocytes. Polysome-bound mRNA profiling revealed that ~1,547 genes were differentially expressed (DE) in the two cell types; the genes were related to cell adhesion, the extracellular matrix, differentiation, and proliferation. These findings were confirmed by functional analyses showing that ADSCs had a greater adhesion capacity than fibroblasts; the proliferation rate of fibroblasts was also higher than that of ADSCs. Importantly, 185 DE genes were integral to the plasma membrane and, thus, candidate markers for ADSC isolation and manipulation. We also observed that an established marker of fibroblasts and ADSCs, CD105, was overexpressed in ADSCs at both mRNA and protein levels. CD105 expression seemed to be related to differentiation capacity, at least for adipogenesis. This study shows that ADSCs and fibroblasts are distinct cell types. These findings should be taken into account when using these two cell types in basic and therapeutic studies.

Introduction

MULTIPOTENT STROMAL/STEM CELLS (MSCs), including adipose-derived stromal cells (ADSCs), and fibroblasts not only share a similar morphology but also they both proliferate well and express many of the same cell surface markers. Fibroblasts usually express high levels of MSC markers and do not express hematopoietic markers [1–3]. Currently, the best approach to distinguishing between MSCs and fibroblasts is based on the analysis of their functional properties. MSCs self-renew and retain a multipotent differentiation capacity, whereas fibroblasts seem to display only limited, or no such, multipotent differentiation [2], although there is controversy in the literature over this issue. Indeed, it has been suggested that fibroblasts are able to differentiate [1,3–7] and could be used in cell therapy [8]. Recently, Blasi et al. [3] reported that fibroblasts may differentiate but lack anti-inflammatory and angiogenic capacity. Recent studies comparing MSCs and fibroblasts, however,

indicate that fibroblasts have no differentiation capacity [2,9]. Thus, a more detailed and rigorous comparative analysis of ADSCs and fibroblasts is needed to document the identity of these cell types and to determine the multipotent differentiation capacity of fibroblasts, if any. Functional genomics studies using total mRNA and miRNA have established an MSC-specific molecular signature consisting of only 64 genes and 21 miRNAs: the expression of these genes is at least 10-fold higher and that of the miRNAs is 2-fold higher in MSCs than in fibroblasts [9].

Several studies have shown that MSCs are probably promiscuous transcribers [10–13] and, as previously stated, MSCs seem to be multi-differentiated cells at the molecular level, because they usually express markers and regulators of various differentiated cell lineages [14]. Most attempts to determine the mRNA profile of self-renewing cells have used total RNA for high throughput analyses [15,16]. Studies comparing mRNA and protein levels in eukaryotes indicate that, although transcript levels correlate with protein synthesis,

¹Instituto Carlos Chagas, Fiocruz-Paraná, Curitiba, Brazil.

²Unidad de Bioinformática, Institut Pasteur Montevideo, Montevideo, Uruguay.

³Núcleo de Tecnologia Celular, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, Brazil.

the strength of the correlation is low, suggesting a high degree of post-transcriptional regulation (reviewed by Keene [17]). These various findings suggest that studies using the total population of transcripts do not necessarily represent the identity of these cells faithfully.

In this work, we show that fibroblasts do not differentiate or differentiate only very poorly. We conducted mRNA profiling analyses and identify ~1,547 transcripts isolated from polysomal fractions (ie, associated with the translation machinery) that are differentially expressed (DE) between the two cell types. Thus, we describe 20 times more DE transcripts than previously reported. These transcripts are related to cell adhesion, the extracellular matrix, and differentiation. Functional assays confirmed our findings and clearly show that fibroblasts are a terminally differentiated cell type, but which are probably difficult to isolate with a high degree of purity. Thus, we demonstrate that dermal fibroblasts and ADSCs are functionally and molecularly different entities.

Materials and Methods

Cell culture

Tissue samples were obtained, and stem cells were isolated as previously described [10]. All samples were collected after informed consent had been obtained, in accordance with guidelines for research involving human subjects, and with the approval of the Ethics Committee of Fundação Oswaldo Cruz, Brazil (approval number 419/07). ADSCs were cultured in DMEM/F12 medium (Gibco Invitrogen), with 10% fetal calf serum (FCS; Gibco Invitrogen), 100 U/mL penicillin, and 100 µg/mL streptomycin (Sigma-Aldrich). The cell isolation protocols resulted in a population highly enriched (>95%) in adult MSCs, as defined by Dominici et al. [18]. Normal human adult dermal fibroblasts were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC PCS-201-012) and were cultured in fibroblast growth basal medium, with 7.5 mM L-glutamine, 5 ng/mL rhFGF, 5 µg/mL recombinant human insulin, 1 µg/mL hydrocortisone, 50 µg/mL ascorbic acid, and 2% fetal bovine serum (all from ATCC). As required for the purposes of comparison, the different cell types were cultured in DMEM/F12 medium, with 10% FCS (Gibco Invitrogen), 100 U/mL penicillin, and 100 µg/mL streptomycin (Sigma-Aldrich). All cultures were maintained at 37°C, in a humidified atmosphere containing 5% CO₂. The culture medium was changed every 3 or 4 days.

Phenotypic characterization by flow cytometry

Surface proteins on ADSC and fibroblasts were detected by cytofluorometry as previously described [10] with modifications. Three samples of each cell type, between the third and fifth passages, were first incubated with purified mouse IgG (used to block Fc receptors), and then incubated with anti-CD90-FITC, anti-CD105-PE, anti-CD73-APC, anti-CD45-FITC, anti-CD34-PE, anti-HLA-DR-APC, anti-CD31-FITC, anti-CD117-PE, anti-CD19-FITC or anti-CD200-APC mAb, or to the corresponding IgG matched negative controls. For the detection of intracellular keratins, cells were incubated for 30 min, after the fixation/permeabilization process, with unconjugated primary mouse-specific antibodies: anti-KRT18

or anti-KRT19. Cell samples were then stained with an anti-mouse secondary antibody conjugate to Alexa Fluor 488. Cell fixation and permeabilization was performed with a commercial kit according to the manufacturer's instructions (Cytofix/Cytoperm Kit; BD Biosciences). The samples were subsequently analyzed using an FACSCanto II apparatus (Becton Dickinson). A cell gate excluding cell debris and nonviable cells was determined using forward and side scatter (SSC) parameters, and was confirmed in some experiments by propidium iodide staining and immediate analysis of unfixed cells. Analyses were done after recording at least 10,000 events for each sample. Results are expressed as percentages of fluorescence-positive cells (% cell+) and mean fluorescence intensity (MFI).

Differentiation into mesenchymal lineages

The capacity of ADSCs and fibroblasts to differentiate into adipocytes, osteoblasts, and chondroblasts was assessed.

For adipogenic differentiation, cultures were treated with hMSC Adipogenic Differentiation Bullet Kit (Lonza), in accordance with the manufacturer's instructions. Briefly, cells were grown in mesenchymal stem cell growth medium (MSCGM) until they reached confluence. At 100% confluence, three cycles of induction/maintenance were performed. Each cycle consisted of feeding cells with supplemented adipogenic induction medium (dexamethasone, indomethacin, human insulin, and IBMX) and culture for 3 days followed by 1–3 days of culture in supplemented adipogenic maintenance medium (human insulin). After completion of the three cycles, cells were cultured for an additional 7 days in adipogenic maintenance medium. Control cells were cultured only in adipogenesis maintenance medium. Oil Red O staining was used to visualize the accumulation of cytoplasmic triglycerides in the cells. Briefly, the cells were washed in phosphate buffered saline (PBS), fixed with 4% paraformaldehyde for 30 min, and incubated for 30 min with 0.5% Oil Red O solution (Sigma-Aldrich).

Osteogenic differentiation was induced with the hMSC Osteogenic Differentiation Bullet Kit (Lonza), in accordance with the manufacturer's instructions. Briefly, cells were grown in MSCGM medium until 60%–70% confluence. After that, the growth medium was replaced by supplemented osteogenic induction medium (dexamethasone, ascorbate, and β-glycerophosphate), which was changed twice a week for 21 days. Control cells were maintained in MSCGM medium. To determine the degree of osteogenic differentiation and calcium deposition, the culture was stained with Alizarin Red S (Sigma-Aldrich). Briefly, the cells were washed in PBS, fixed with 4% paraformaldehyde for 30 min, and incubated for 30 min with 2% Alizarin Red S solution, pH 4.2.

Micromass cultures and hMSC Chondrogenic Differentiation Bullet Kit (Lonza) were used to promote chondrogenic differentiation, in accordance with the manufacturer's instructions. Briefly, 2.5×10^5 cells were washed in incomplete chondrogenic induction medium (dexamethasone, ascorbate, ITS+ supplement, sodium pyruvate, and proline) and finally centrifuged in complete chondrogenic induction medium [incomplete chondrogenic induction medium plus transforming growth factor-β3 (TGF-β3)] at 150 g for 5 min to form a pellet. Micromass cells were fed twice a week for 21 days. Chondrogenesis was visualized by toluidine blue staining.

Briefly, the cells were washed in PBS, fixed with 10% formaldehyde for 1 h, dehydrated in serial ethanol dilutions, and embedded in paraffin blocks. Sections (4 µm thick) of the paraffin blocks were stained with toluidine blue solution (Sigma-Aldrich) for histological analysis to demonstrate the presence of intracellular matrix mucopolysaccharides.

The stained cells were examined and photographed under inverted Nikon Eclipse TE300 or Eclipse E600 microscopes.

Quantification of adipocyte differentiation by Nile Red staining

Cells were washed with PBS, fixed by incubation with 4% paraformaldehyde for 10 min, and washed again with PBS. They were then stained with a solution of Nile Red (Sigma-Aldrich), prepared immediately before use by diluting 1,000-fold a stock solution (1 mg/mL of Nile Red dissolved in dimethylsulfoxide) in PBS, for 30 min at 4°C. The cells were washed with PBS and stained with DAPI for 20 min, washed again with PBS, and photographed. Ten images of random fields were obtained at a magnification of two hundred with Nikon Eclipse TE300 fluorescence microscope. The area in pixels per nucleus was determined using ImageJ software (National Institutes of Health).

Sucrose density gradient separation and RNA purification

Polysomal fractions from hADSC and fibroblast cultures at 50% to 60% confluence were prepared according to [19]. In brief, cells were treated with 0.1 mg/mL cycloheximide (Sigma-Aldrich) for 10 min at 37°C, removed from the culture flasks with a cell scraper, and resuspended in 0.1 mg/mL cycloheximide in PBS. The suspension was centrifuged (2,000 g for 5 min), and the resulting pellet was washed twice with 0.1 mg/mL cycloheximide in PBS. The cells were lysed by incubation for 10 min on ice with polysome buffer (15 mM Tris-HCl pH 7.4, 1% Triton X-100, 15 mM MgCl₂, 0.3 M NaCl, 0.1 µg/mL cycloheximide, and 1 mg/mL heparin), and the cell lysate was centrifuged at 12,000 g for 10 min at 4°C. The supernatant was carefully isolated, loaded onto 10% to 50% sucrose gradients, and centrifuged at 39,000 rpm (HIMAC CP80WX HITACHI) for 160 min at 4°C. The sucrose gradient was fractionated with the ISCO gradient fractionation system (ISCO Model 160 gradient former), connected to a UV detector to monitor the absorbance at 275 nm, and the polysome profile was recorded. The polysomal RNA fractions were extracted by a standard Trizol (Invitrogen) RNA isolation protocol.

cDNA library construction and RNA sequencing

Polysome-associated RNA samples were amplified using the Amino Alkyl Message Amp II aRNA Amplification Kit (Ambion), to generate templates for SOLiD libraries. The cDNA libraries were prepared with the SOLiD Whole Transcriptome Analysis Kit (Applied Biosystems), and the purified products were evaluated with an Agilent Bioanalyzer (Agilent). Library molecules were subjected to clonal amplification according to the SOLiD Full-Scale Template Bead preparation protocol and sequenced with the SOLiD4 System (Applied Biosystems).

RNA sequencing data analysis

RNA sequencing (RNA-seq) data analysis was performed as previously described [19]. In brief, NGSQC [20] software was used for quality control analysis of sequencing data. Various quality indicators were explored visually for each sample (distribution of colors per sample/tile, genomic hit count per sample with different numbers of mismatches, sequencing read density, and mean quality values for each sample). All samples passed the quality control filters. Mapping and counting were performed with the R package Rsread [21]. Hierarchical clustering of the samples (log of counts plus one) was performed to evaluate biological variability. Each sample was normalized to one million reads to account for library size. We also conducted a correspondence analysis (COA), involving a dimension reduction method, to the matrix of counts, to explore associations between variables. COA allows samples and genes to be visualized simultaneously, revealing associations between them: Genes, or samples, lying close to each other tend to behave similarly.

For the comparison of fibroblasts with ADSCs, we analyzed only those genes with counts of more than 1 per million. Genes DE between cell types were identified with the edge R bioconductor package [22]. This set of genes was used for gene ontology (GO) term analysis with the Gene Ontology enrichment anaLysis and visualizAtion tool (Gorilla: <http://cbl-gorilla.cs.technion.ac.il/>), a web server that identifies enriched GO terms in long lists of genes. Gorilla results were then visualized using the REVIGO software (REVIGO: <http://revigo.irb.hr/>), which summarizes long lists of GO terms with respective significance values by removing redundancy in terms.

Reverse transcription-polymerase chain reaction and western blotting

RT-PCR and quantitative polymerase chain reaction (qPCR) were performed as previously described [10]. The glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*) transcript was used as an internal control. Amplifications were performed with cells from different experiments, with technical triplicates. Student's *t*-test was used to assess the significance of differences between the cell populations. The gene ID, sequence of primers, number of cycles, amplicon size, and annealing temperature are indicated in Supplementary Table S1 (Supplementary Data are available online at www.liebertpub.com/scd). We considered *P* values < 0.05 statistically significant.

Western blotting (WB) was performed as previously described [11].

NanoLC-MS/MS analysis

Peptide mixtures from two samples (~7 × 10⁵ cells/sample) were separated by online RP nanoscale capillary LC (nanoLC) and analyzed by ESI MS/MS. The experiments were performed with an Ultra ID Plus (Eksigent) system connected to the LTQ-Orbitrap XL ETD mass spectrometer equipped with a nano-electrospray ion source (Thermo Scientific). Peptides were chromatographically separated in a 15-cm fused silica emitter (75 µm inner diameter) packed in-house with reversed-phase ReproSil-Pur C18-AQ 3 µm resin (Dr. Maisch GmbH).

Peptide mixtures were injected onto the column at a flow rate of 250 nL/min and subsequently eluted at a flow rate of

250 nL/min from 5% to 40% ACN in 0.1% formic acid over 180 min. The mass spectrometer was operated in data-dependent mode to switch automatically between MS and MS/MS (MS2) acquisition. Survey full-scan MS spectra (at 350–1,650 m/z range) were acquired in the Orbitrap analyzer with resolution $R=60,000$ at m/z 400 (after accumulation to a target value of 1,000,000 in the linear ion trap). The ten most intense ions were sequentially isolated and fragmented in the linear ion trap using collision-induced dissociation at a target value of 10,000. Former target ions selected for MS/MS were dynamically excluded for 90 s. Total cycle time was ~ 3 s. The general mass spectrometric conditions were spray voltage, 2.3 kV; no sheath and auxiliary gas flow; ion transfer tube temperature, 100°C; collision gas pressure, 1.3 mTorr; and normalized collision energy using wide-band activation mode 35% for MS2. Ion selection thresholds were 250 counts for MS2. An activation $q=0.25$ and activation time of 30 ms were applied for MS2 acquisitions. The “lock mass” option was enabled in all full scans to improve mass accuracy for precursor ions [23].

Proteomic data analysis

The MaxQuant platform (version 1.3.0.5) [24], which includes the algorithm Andromeda [25] for database searching, was used for Peaklist picking, and protein identification, quantification, and validation. Default parameters of the software were used for all analysis steps, unless stated otherwise. Proteins were searched against a “decoy database” prepared by reversing the sequence of each entry of the human protein sequence database [containing 87,061 protein sequences, downloaded in March 29, 2010 from IPI protein database (version 3.68)] and appending them to the forward sequences. This database was complemented with frequently observed contaminants (porcine trypsin, *Achromobacter lyticus* lysyl endopeptidase, and human keratins) and their reversed sequences. Search parameters specified an MS tolerance of 7 ppm, an MS/MS tolerance of 0.5 Da, and full trypsin specificity, allowing for approximately two missed cleavages. Carbamidomethylation of cysteine was set as a fixed modification, and oxidation of methionines and N-terminal acetylation (protein) were allowed as variable modifications.

For validation of the identifications, a minimum peptide length of six amino acids and two peptides per protein were required. In addition, a posterior error probability threshold of 0.01 was applied at both peptide and protein levels.

Bromodeoxyuridine proliferation assay

The proliferation assay was performed according to [26]. In brief, fibroblasts and ADSCs at 70% confluence were incubated with 100 μ M bromodeoxyuridine (BrdU; Invitrogen) for 24 h. The cells were detached with trypsin and fixed by incubation with 100% ethanol for 30 min on ice. The samples were centrifuged, and the cell pellet was resuspended in 100 μ L of distilled water, heated for 5 min at 95°C, and rapidly chilled in an ice-water bath. The cells were incubated with an Alexa Fluor 488-conjugated anti-BrdU antibody (Invitrogen) for 30 min at room temperature. An FACSCanto II flow cytometer (BD Bioscience) and Flow Jo software (Tree Star) were used for quantitative analyses of BrdU-labeled cells.

Cell adhesion assay

ADSCs and fibroblasts were tested for adhesion to 24-well culture plates for 20 and 40 min at 37°C as follows. The cells were first washed and then added to the wells at a concentration of 2.5×10^4 cells per well in 500 μ L DMEM/F12 medium (Gibco Invitrogen) supplemented with 10% FCS. After the adhesion period (20 or 40 min), the plates were maintained for 5 min of incubation under shaking (100 rpm) and nonadherent cells were removed by washing thrice with ice-cold PBS. Adherent cells were fixed (100% ethanol for 5 min) and stained (2% toluidine blue for 15 min) for counting. Four wells for each cell type (three ADSC and three fibroblast samples) were analyzed and photographed for counting labeled cells with the ImageJ software (National Institutes of Health). Five representative fields from each well were used to calculate mean values.

ADSC and fibroblast cell sorting

Cytofluorometry was used for detection and separation of ADSC and fibroblast populations. A mixed sample of each cell type, between the fourth and fifth passages, was first incubated with anti-CD105-PE mAb, and subsequently sorted using an FACSAria II apparatus (Becton Dickinson). A cell gate discriminating between low and high CD105-PE fluorescence intensity was determined to separate cell populations. Doublets were excluded from the cell population using a sequential gating strategy relative to width versus height on SSC and forward scatter (FSC) dot plots. Finally, weak (CD151⁺) and bright (CD151⁺⁺) CD105-positive cells were selected and sorted using the cell sorter’s purity option at a rate of 2,500 events per second. Sorted populations were reanalyzed (5×10^3 events recorded) for purity and viability, and 4×10^5 cells of each population were culture expanded for immunophenotyping and cell differentiation assays.

Statistical analysis of functional assays

Statistical significance was determined by Student’s t -test using GraphPad Prism software. Values of $P < 0.05$ were considered significant. Data are expressed as means \pm standard deviation.

Results

The expression of cell-surface antigens proposed by Dominici et al. [18] as a minimal set for stromal/stem cell characterization was evaluated by flow cytometry in three biological samples of ADSCs and three technical samples of dermal fibroblast at passage P5 (Fig. 1A). With one exception, the two types of cells displayed similar immunophenotypes for the markers analyzed. Cells were uniformly positive for the membrane glycoprotein CD90 and the surface enzyme ecto 5' nucleotidase CD73. No detectable contamination by hematopoietic or endothelial cells was observed, as flow cytometry analysis was negative for CD19, CD31, CD34, CD45, CD117, and HLA-DR. More than 95% of the cells in both cell populations expressed the endoglin receptor CD105; however, the MFI was significantly higher for ADSCs than for fibroblasts (Fig. 1A).

Cells at passage P5 were compared for their multilineage differentiation plasticity by *in vitro* assays: specifically,

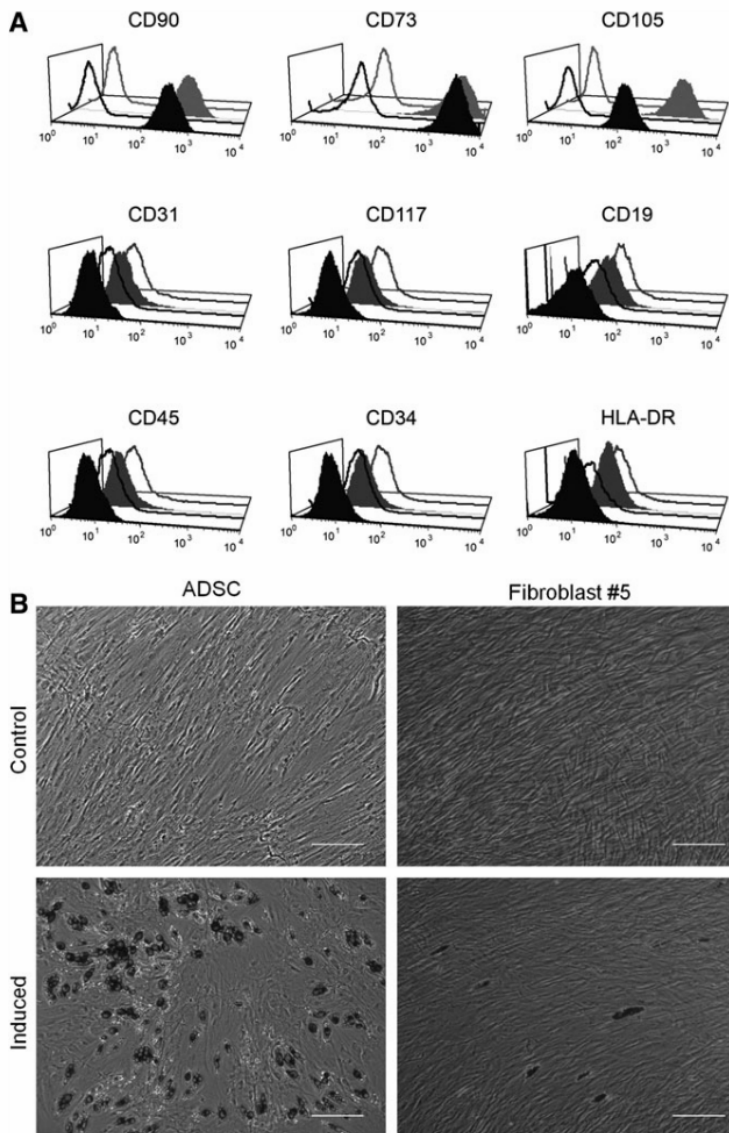


FIG. 1. Immune and functional phenotypes of ADSCs and fibroblasts. **(A)** Analysis of immune phenotypes by flow cytometry. ADSCs (gray lines) and fibroblasts (black lines) were labeled with antibodies against the indicated antigens, and analyzed by flow cytometry. Representative histograms are displayed. Isotype controls are shown as empty lines/areas, and the solid histograms indicate reactivity with the antibody. **(B)** Differentiation of ADSCs and fibroblasts. Both cell types at passage P5 were incubated for 21 days in the presence of specific agents inducing differentiation into adipocytes. Differentiation into the adipocyte lineage was demonstrated by staining with Oil Red O. Untreated control cultures without adipogenic differentiation stimuli are shown on the upper line of photographs. The scale bar indicates 200 μ m. ADSCs, adipose-derived stromal cells.

differentiation to adipocytes, osteoblasts, and chondrocytes was studied. We used the presence of lipid-rich vacuoles stained with Oil Red O to analyze adipogenic induction on day 21. ADSCs presented large cells with cytoplasmic lipid-rich vacuoles; fibroblasts displayed very few differentiating cells, and they had smaller lipid droplets than those observed in ADSCs (Fig. 1B). Osteogenic differentiation was assessed by using Alizarin Red S to stain the mineralized extracellular matrix after 21 days of induction. Differentiation of ADSCs was easily detected. No differentiation was observed in the induced fibroblast cultures (Supplementary Fig. S1A). Similar results were obtained for the chondrogenic differentiation assays. ADSCs formed aggregates that became detached, floating in suspension in the culture. Sections of the aggregates stained with Toluidine Blue

showed cuboidal cells and chondrocyte-like lacunae. Fibroblast differentiation was minimal or undetectable (Supplementary Fig. S1B). Untreated control cultures, which were growing in standard medium without adipogenic, osteogenic, or chondrogenic differentiation stimuli, did not exhibit spontaneous adipocyte (Fig. 1B and Supplementary Fig. S1) or osteoblast or chondroblast formation after 21 days of cultivation.

In the culture conditions used, the mean doubling time of fibroblasts is 18–24 h, and the cells were sub-cultured approximately every 3 days; thus, fibroblasts at passage P10–11 had undergone more than 30 population doublings. Consequently, fibroblasts at P10 are considered at a presenescence stage [27]. Since no evident signs of senescence were visible at P11, the adipogenic differentiation potential of fibroblasts

at this passage was tested and compared with that of fibroblasts at P5. Surprisingly, there was a higher proportion of differentiated cells at P11 (Supplementary Fig. S2).

For a more detailed characterization of both cell lineages, gene expression patterns in each cell type were determined by studying mRNA associated with the translation machinery. The polysomes of ADSCs and fibroblasts were profiled by ultracentrifugation of cytoplasmic extracts onto sucrose density gradients (10%–50%) containing cycloheximide. Starting with extracts obtained from the same number of cells, the translation activity (measured as the height of polysome peaks) was lower in ADSCs than in fibroblasts (Fig. 2A). Polysome-associated mRNAs were isolated from the corresponding gradient fractions, and the mRNA fractions of ADSCs and fibroblasts were analyzed by RNA sequencing (RNA-Seq) using the SOLiD4 platform. The total number of reads obtained for each sample is shown in the Supplementary Data (Supplementary Table S2). The reads of all samples were mapped onto the reference genome (Hg19; NCBI Build 37.64), yielding a mean mapping percentage of ~55%. To decrease ambiguity, the analyses were limited to reads mapping to a unique position in the

genome. Hierarchical clustering and COA grouped the samples according to cell lineage (ADSCs and fibroblasts), rather than donor, indicating that the cell-specific polysomal RNA populations are intrinsically more characteristic than donor particularities (Fig. 2B).

A total of 17,340 protein-coding transcripts were sequenced. Most transcripts (15,776) were detected in both ADSC and fibroblast polysomes, albeit with different levels of expression. Nevertheless, a substantial number of transcripts were exclusively found in only one or the other RNA population: 924 in fibroblast and 640 in ADSCs. Since polysomal-associated mRNA was used in this study, it was expected that most of the proteins identified in a proteomic data set of ADSCs would be represented in the mRNA population. To test whether this was the case, proteins from ADSCs from two samples were identified by LC-MS/MS and the results were compared with those the RNA-Seq data for the same ADSC donors. A total of 297 proteins were identified with at least two peptides in one of the ADSC samples (Supplementary Table S3) and, as expected, more than 85% of them were represented with at least five tags (after normalization) in each of the three biological samples

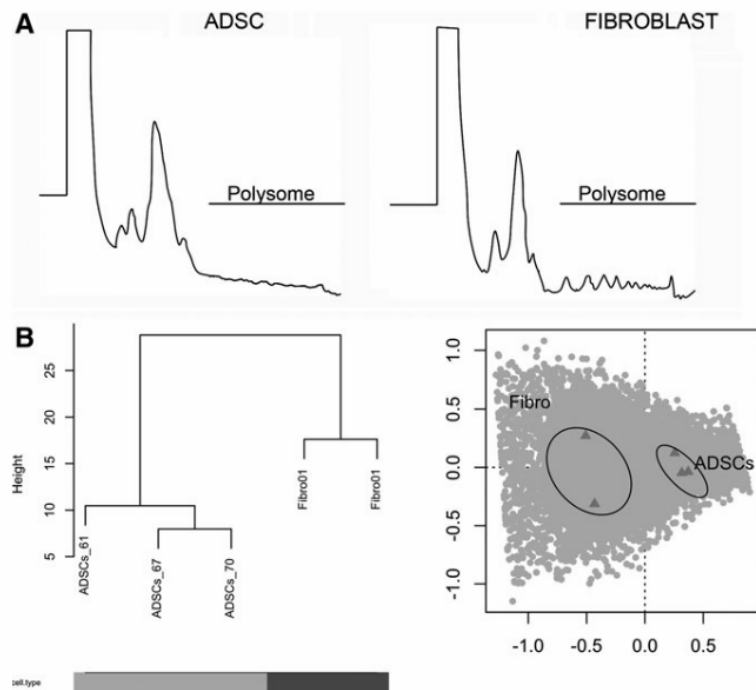


FIG. 2. Polysome profiles and internal consistency of RNA sequencing data. **(A)** Polysome profile analysis of ADSCs (*left*) and fibroblasts (*right*) obtained by fractionation of cytoplasmic extracts in sucrose gradients 10%–50%. **(B)** Hierarchical clustering and correspondence analysis (COA) showing the internal consistency of the data. *Left panel:* dissimilarity-based (*bottom-up*) hierarchical clustering was performed on the log-transformed counts of genes for the various samples. Initially, each object is assigned to its own cluster and then the algorithm proceeds iteratively, at each stage joining the two most similar clusters, according to some distance measure (in this case, a complete linkage approach), continuing until there is one single cluster. The process is visualized as a dendrogram: the first branching event separates fibroblast (Fibro) from ADSC samples. The numbers of the samples correspond to the donors. The height axis represents the distance between each branching event. Cell type accounted for the largest proportions of the variance in both analyses, evidence of the consistency of the experiments. *Right panel:* COA with the samples. The x-axis represents the first component (that explaining the most variance 69.1%), and the y-axis represents the second component (representing 17.7% of the variance).

analyzed by RNA-Seq. Moreover, of the 42 proteins (15%) not found in the RNA-Seq data, 10 were histone transcripts that lack poly-A tails and, thus, could not be detected by the RNA-Seq method used in this work.

The DE genes were identified by paired comparisons (fibroblasts vs. ADSCs) using the R package edgeR. We found 1,115 and 1,547 DE protein-coding genes in the polysomal fractions with false discovery rate (FDR) 0.0001 and <0.001, respectively (Supplementary Table S4). At these FDR values, most of the genes (>98%) showed logFC values >2 or <-2.

We confirmed the sequencing data at the mRNA level by qPCR of five genes: *CAMK2N1*, fibroblast specific; *RPL10A*, *TMSB10*, and *ARPC2*, equally expressed between the two cell types; *SCRGI*, ADSC specific. All five genes analyzed using the polysomal fractions confirmed our RNA-seq data (Supplementary Table S5, compare the third and fourth column). In addition, the nonpolysomal fraction was also used in qPCR with the same set of primers for calculating the translation efficiency (TE) of the five selected transcripts, that is, the ratio between the normalized qPCR data obtained from the polysomal versus the nonpolysomal fraction. The three genes equally expressed in both cell types showed a very similar TE for each transcript analyzed and the ratios between TEs of each cell type for each transcript (TE fibroblasts/TE ADSCs) were close to 1. The transcript of the gene *CAMK2N1* that is over-represented in fibroblasts showed a TE 4.5 times higher in these cells than in ADSCs. Interestingly, the transcript over-represented in the polysomal fraction of ADSCs also showed a TE 4.8 times higher in fibroblasts than in ADSCs (Supplementary Table S5).

The DE genes in the polysomal fraction were analyzed in greater detail: several of the surface markers previously described to be present in both fibroblasts and ADSCs (for

example, the activated leukocyte cell adhesion molecule CD166, the β 1-integrin CD29, and the hyaluronate receptor CD44) were absent from the DE list (Supplementary Table S6), providing further validation of our results. To test our experimental approach as a tool to predict DE proteins between ADSCs and fibroblasts, we analyzed the expression of three proteins: one surface protein, CD200, upregulated in ADSCs and two cytoskeleton proteins, keratin (KRT) 18 upregulated in ADSCs and KRT 19 upregulated in fibroblasts. All three proteins confirmed our sequencing results by either western blot or flow cytometry (Supplementary Fig. S3). It is interesting to note that the same percentage of cells was positive for KRT18 in both types of cells; however, the MFI was twice higher in ADSCs than in fibroblasts. Two GO analyses were performed, one for the genes upregulated in fibroblasts and one for the genes upregulated in ADSC. A target gene list and a background list were considered for these analyses: the target list corresponds to DE genes with FDR<0.0001, and the background list included all 17,340 genes identified in this study. GOrilla identified 10,942 genes associated with a GO term. GOs with $P < E-9$ were extracted and used for REVIGO analysis and visualization. Sixteen over-represented GO terms were identified for ADSCs ($P < 1.9E-7$), and most are related to processes such as cell adhesion, cell signaling, multicellular organism processes, and developmental processes (Fig. 3A). Thirty-seven terms were found to be over-represented in the analysis of the polysomal fraction of fibroblasts; these GO terms were similar to each other, and refer to cell cycle processes and proliferation (Fig. 3B).

Three different approaches were used to confirm these findings. First, the RNA-Seq data was compared with the proteomic data published by Kim et al. [28]. All the transcripts

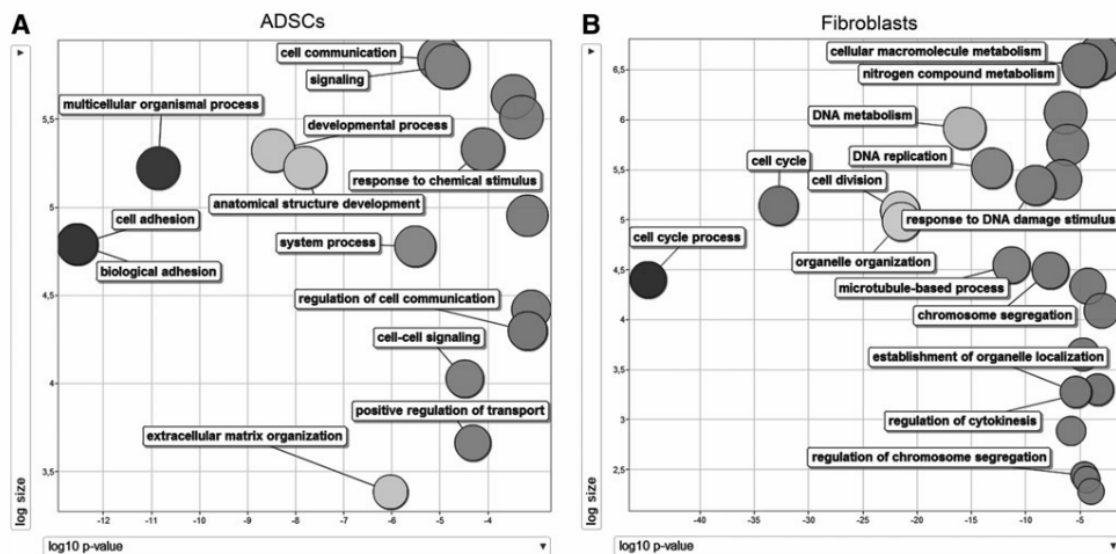


FIG. 3. GO analyses, one for the genes upregulated in ADSCs (A) and one for the genes upregulated in fibroblasts (B). REVIGO visualization of the GO analyses performed with GOrilla is shown. For these analyses, a target gene list and a background list were used: the target list is composed of genes represented with FDR < 0.0001; the background list included all the 17,340 genes identified in this study. The log₁₀ of the P value of each GO after REVIGO analyses is plotted on the x-axis, and the log₁₀ of the size of GOs is plotted on the y-axis. FDR, false discovery rate; GO, gene ontology.

represented with at least five normalized tags in each sample of ADSCs were compared with proteins in Kim's data with at least two spectra. Of the 188 proteins present in undifferentiated ADSCs, 165 (~88%) were found to be DE by our RNA-Seq analysis. Second, differential expression was confirmed by reverse transcriptase-quantitative polymerase chain reaction with five selected transcripts (Supplementary Table S5) and by WB/cytometry of three proteins encoded by DE genes (see above and Supplementary Fig. S3). Lastly, some of the over-represented GO processes for each cell type were analyzed by functional assays. The proliferation of ADSCs was compared with that of dermal fibroblasts by studying BrdU incorporation at passage P5. Under exactly the same culture conditions (medium, temperature/CO₂, confluence, and passage), fibroblasts showed significantly higher proliferation values than ADSCs: ~20% more cells incorporated BrdU after 24 h of culture (Fig. 4A). In addition, the numbers of adherent cells after 20, 40, and 60 min of culture was determined by counting the number of nonadherent cells in the culture and subtraction from the total number. At 20 min, significantly more ADSCs than fibroblasts adhered to the plastic plates (Fig. 4B). This difference was maintained, but not statistically significant, after 40 min (Fig. 4B), and no difference was observed after 60 min of culture (data not shown). These results are in agreement with the results from the GO analysis for biological process terms obtained from RNA-Seq. Unfortunately, the number of proteins identified by the proteomic analysis was insufficient to obtain significant results in a GO analysis.

We analyzed the GO of cellular component terms: the terms associated with ADSCs concentrate mainly at the plasma membrane and extracellular location (Supplementary Fig. S4). For example, CD200 has a LogFC of 6.1 in ADSCs with an FDR = 5.73E-14. In addition, the endoglin protein CD105, a well-defined surface marker for ADSCs and also for fibroblasts, is significantly overexpressed in ADSCs (LogFC = 2.6). This result was confirmed by flow cytometry (Fig. 1): more than 95% of the cells of both lineages were positive for CD105; however, the level of expression was significantly higher in ADSCs than in fibroblasts (LogFC = 3.7, Supplementary Table S7). We tested whether this difference would be sufficient to distinguish fibroblasts from ADSCs in a mixed population and whether it correlated with differentiation capacity. We, therefore, conducted a cell sorting assay with a mixed sample of ADSCs and fibroblasts. The mixed sample was stained with anti-CD105-PE mAb and, in an FSC versus FL2 dot plot, weakly and strongly CD105-positive cell populations were gated (Fig. 5A). There was an overlap between the CD105 expression by the two cell types impeding the definition of an unambiguous boundary between ADSC and fibroblast populations. We, therefore, established a cell gate dividing the total CD105-positive population into two equal halves (Fig. 5A). The percentages of CD105⁺⁺ and CD105⁺ cells in each cell population before mixing are shown in Fig. 5B and C, respectively. A total of 4×10^5 cells of CD105⁺⁺ and CD105⁺ cell populations were collected. By reference to the parental mixed cell population, their percentages were 92.3% and 95.6%, respectively, indicating sorting purity of more than 90% (Fig. 5D). We then subjected sorted cells to induction of adipocyte differentiation to evaluate whether these isolated populations, based on CD105 expression,

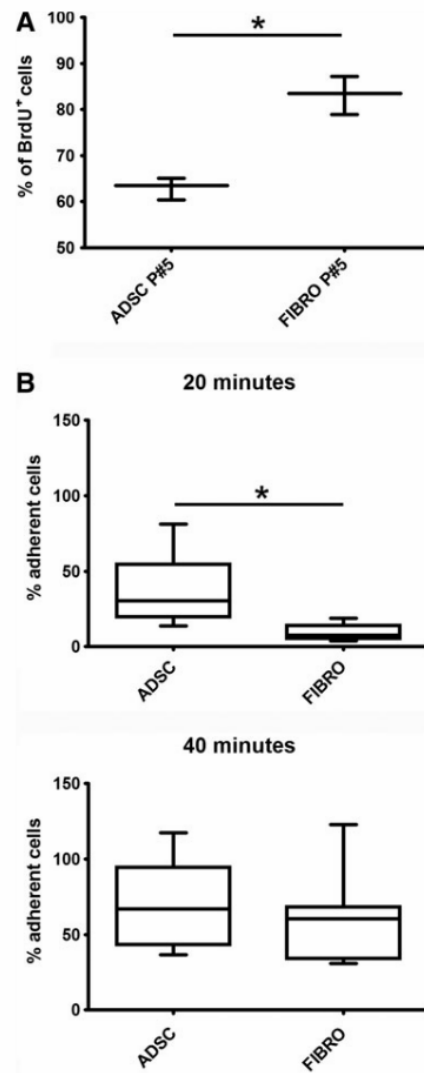


FIG. 4. Comparison between ADSC and fibroblast proliferation and adhesion. (A) Proliferation was assessed by BrdU incorporation over 24 h. The mean numbers of BrdU-positive cells for three donors of ADSCs and for technical triplicates of fibroblasts. BrdU, bromodeoxyuridine. (B) Adhesion assay. Number of adherent cells after 20 and 40 min in culture was evaluated by counting the number of nonadherent cells in the culture and subtracting. * $P < 0.05$.

display the same differentiation potential as ADSCs and fibroblasts. Sorted strongly and weakly CD105-positive populations showed, as expected, differentiation patterns resembling those exhibited by induced ADSCs and fibroblasts, respectively (Fig. 5E). The presence of rare cells with cytoplasmic lipids among induced CD105⁺ cells could be attributed to two phenomena: a small number of differentiating cells with small intracellular lipid droplets as observed among induced fibroblast; and the overlap between the two cell types as concerns CD105-positive events.

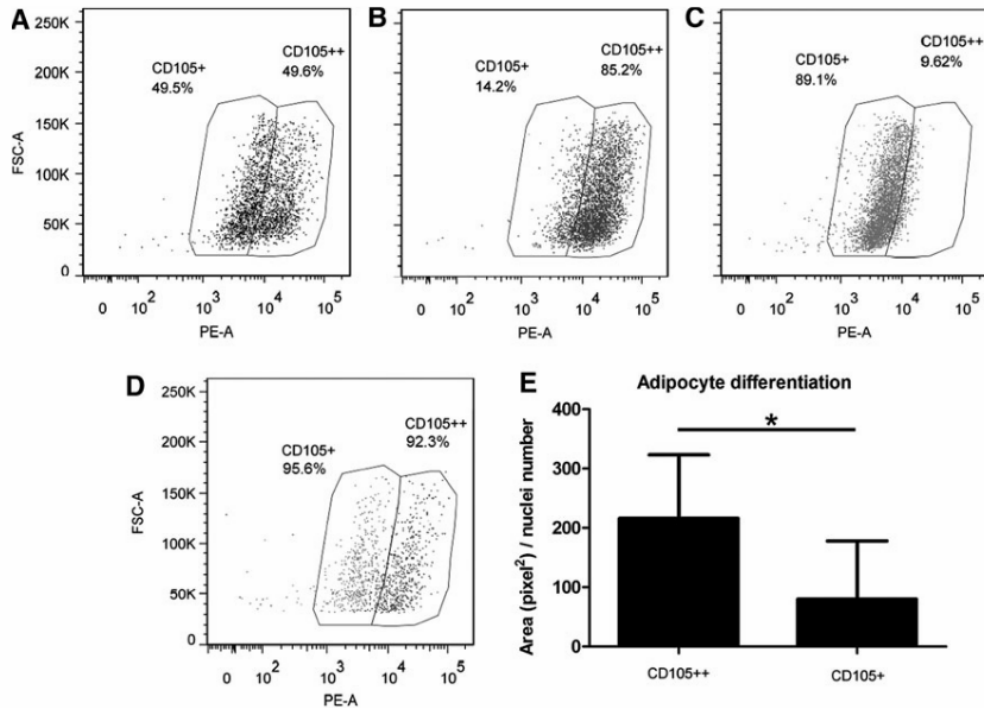


FIG. 5. Isolation and differentiation of weakly and strongly CD105-positive cells from a mixed population of ADSCs and fibroblasts. (A) Representative FSC and FL2 plot of the 1:1 mixed sample of ADSCs and fibroblasts. CD105 expression by (B) ADSCs and (C) fibroblasts before sorting. (D) Representative overlay dot plot of sorted CD105⁺ and CD105⁺⁺ cells. The percentages shown are according to the gating strategy defined in (A) and are referenced to the parental mixed cell population. (E) Sorted CD105⁺ and CD105⁺⁺ cells induced to differentiate into adipocytes. Columns represent the quantification of Nile Red stained area in pixel² per nuclei number. The significance of differences between mean values was evaluated with Student's *t*-test. **P* < 0.05. FSC-A, forward scatter pulse area; PE-A, phycoerythrin area.

There were 183 genes, other than *CD105* and *CD200*, corresponding to the “integral to plasma membrane” GO term. This means that there are more than a hundred putative cell surface markers that could be evaluated as tools or markers for ADSCs purification/manipulation (Supplementary Fig. S4 and Supplementary Table S8).

Discussion

We report data demonstrating that ADSCs and fibroblasts are different types of cells, despite sharing several morphological similarities and surface markers. They differ on the basis of hundreds of DE genes, as evaluated by the analyses of mRNAs associated with the translation machinery. We also show that, contradicting repeated previous suggestions [1,3–7], fibroblasts are not able to differentiate into adipocytes, osteoblasts, or chondrocytes. We believe that the residual differentiation previously described was due to the fact that it is very difficult to obtain pure populations of dermal fibroblasts, as also suggested by Lennon et al. [29]. Thus, any differentiating “fibroblasts” observed at passage P11 may be the consequence of contaminating MSCs overgrowing the culture, as the fibroblasts themselves reach senescence, resulting in greater differentiation.

There is extensive post-transcriptional regulation in mammals and particularly in stem cells [30,31]; as a result, correlations between total mRNA and protein levels, although positive, are low, ranging from $r=0.2$ to 0.4 [19,32]. This is an important issue when analyzing mRNA levels in cells. Indeed, the RNAs associated with polysomes represent the cellular phenotype more faithfully than analyses of total mRNA; unfortunately, total mRNA is still widely used in most stem cell studies. Moreover, it has been observed in ADSCs differentiation assays that control cultures without differentiation inducers express several genes at the mRNA level, specific for diverse lineages such as cardiomyocytes, osteoblasts, adipocytes, and chondrocytes [10,33]. In addition, promiscuous gene expression has been suggested or shown by others in MSCs, including ADSCs [13], and also in other stem cell populations [12,34,35]; these observations clearly indicate that total mRNA populations do not provide a good molecular representation of ADSCs.

It is well established that the TE of a particular mRNA could be quantified by measuring the ratio of polysomal and nonpolysomal abundance of that mRNA. The ratio will be high in case of over-representation and low in case of under-representation in a particular condition [36,37]. The mentioned correlation was observed for four out of five genes analyzed by qPCR: *CAMK2N1*, *RPL10A*, *TMSB10*, and

ARPC2 (Supplementary Table S5). This was not true for the transcript of the *SCRGI* gene, over-represented in ADSCs, as the TE was higher in fibroblasts than in ADSCs. However, the amount of transcript in the nonpolysomal fraction of ADSCs is 620 times higher than in fibroblasts (ADSCs=80.72; Fibroblasts=0.13), resulting in the over-representation observed in the polysomal fraction of ADSCs. It is important to point out that this work is comparing TEs obtained from two different kinds of cells and not from the same type of cells in two different conditions as has been the case in previous publications. Anyhow, this result is in accordance with recently published data showing the extent of post-transcriptional regulation in adult stem cells [19]. We could speculate, for example, that most of the *SCRGI* mRNA present in the cell might be stored in ribonucleoprotein complexes present in the cytoplasm and a small portion access polysomes for translation.

To our knowledge, the proliferation rate of fibroblasts and ADSCs has not been considered at all when comparing these two types of cells. Here, we demonstrate that proliferation-related mRNA are better represented in the polysomal fraction of fibroblasts than ADSCs and, accordingly, under the same culture conditions at early passages (P3–5) the fibroblast proliferation rate is higher than that of ADSCs.

ADSCs adhered better than fibroblasts to a plastic surface during the first 20 min of our assay, in agreement with some of the GOs over-represented in ADSCs. Indeed, a subpopulation of MSCs derived from human bone marrow cells that exhibited enhanced adhesive and multipotent capacities has been recently identified by Bolontrade et al. [38]. It would be interesting to determine whether a subpopulation of this type also exists in ADSCs and whether it is responsible for the difference to fibroblasts in adherence.

Other functional genomics studies using MSCs under standard culture conditions, that is, without differentiation inducers, and considering total mRNA for transcriptome analyses [9,39] were only able to find a few dozen MSC-specific genes to establish a molecular signature for these cells. Conversely, the approach we used successfully identified several hundred DE genes, specific to each cell type, even under stringent criteria (FDR < 0.0001). More importantly, 185 genes encoded products integral to the plasma membrane; these gene products are, therefore, candidate, easily accessible markers for ADSC isolation and manipulation. One of these genes was identified as CD200, previously detected in stromal/stem cells isolated from bone marrow, adipose tissue, and Wharton's jelly. It seems that this molecule and its receptor (CD200R, only present in myeloid-lineage cells) are responsible for two-way communication between MSCs and T-lymphocytes [40] and, probably, participate in mesenchymal stromal/stem cell immunosuppressant activity [41].

Previously, some markers were shown to distinguish MSCs from fibroblasts [40]. The expression level of *CD166*, *CD106*, integrin alpha 11, and insulin-like growth factor-2 was significantly higher in MSCs than in fibroblasts; while that of *CD9*, matrix metalloproteinase (MMP) 1, and *MMP3* was significantly lower. *CD146* was expressed only in MSCs. We had similar results for integrin alpha 11, *MMP3*, and *CD146*. The other few genes were absent in our list of DE genes (Supplementary Table S4). This might be explained, because these authors have used cells from a different source (bone marrow-derived mesenchymal stem

cells) whereas we have used a very stringent set of conditions to select the DE genes; they have used total mRNA instead of mRNA associated to the translation machinery (polysomal fraction).

Halfon et al. [40] have also showed that some markers were regulated with passage: CD106, integrin alpha 11, and CD146 were downregulated in P6 of MSCs, and CD9 was upregulated; whereas other commonly used MSC markers, including CD105, did not change. This is something important to be taken into account when looking for new and solid MSC markers. We show that the established marker of fibroblasts and ADSCs, CD105, is overexpressed in ADSCs: this was demonstrated at the mRNA level by deep sequencing and at the protein level by flow cytometry. CD105 expression level seems to be related to differentiation capacity, at least for adipogenesis. A CD105⁺⁺-enriched population differentiated thrice more than a CD105⁺-enriched population. Accordingly, it has been shown that downregulation of CD105 is associated with multilineage differentiation in human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells [41]. CD105, also known as endoglin, is a type I integral membrane glycoprotein. It is abundant on proliferating cells and has been identified as an accessory receptor for TGF- β [42]. Nevertheless, it remains to be established whether CD105 is directly involved in multipotency. In conclusion, the work presented here demonstrates that ADSCs and fibroblasts are distinct cell types. Although they share various morphological and immunophenotypic similarities, there are vast differences between them in terms of gene expression and functionality/biological dynamics. These findings may be relevant for any applications of these two cell types in both basic and therapeutic studies.

Acknowledgments

This work was supported by grants from Ministério da Saúde and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico—CNPq, FIOCRUZ-Pasteur Research Program, and Fundação Araucária. L.S. received fellowship from ANII (Agencia Nacional de Investigación e Innovación, Uruguay); S.G., J.Z., and B.D. from CNPq; P.S. from FIOCRUZ; and A.C. from Fundação Araucária.

Author Disclosure Statement

No competing financial interests exist.

References

1. Lorenz K, M Sicker, E Schmelzer, T Rupf, J Salvetter, M Schulz-Siegmund and A Bader. (2008). Multilineage differentiation potential of human dermal skin-derived fibroblasts. *Exp Dermatol* 17:925–932.
2. Alt E, Y Yan, S Gehmert, YH Song, A Altman, S Gehmert, D Vykoukal and X Bai. (2011). Fibroblasts share mesenchymal phenotypes with stem cells, but lack their differentiation and colony-forming potential. *Biol Cell* 103:197–208.
3. Blasi A, C Martino, L Balducci, M Saldarelli, A Soletti, SE Navone, L Canzi, S Cristini, G Invernici, EA Parati and G Alessandri. (2011). Dermal fibroblasts display similar phenotypic and differentiation capacity to fat-derived mesenchymal stem cells, but differ in anti-inflammatory and angiogenic potential. *Vasc Cell* 3:5.
4. Brohem CA, CM de Carvalho, CL Radoski, FC Santi, MC Baptista, BB Swinka, AUC de, LR de Araujo, RM Graf, IH

- Feferman and M Lorencini. (2013). Comparison between fibroblasts and mesenchymal stem cells derived from dermal and adipose tissue. *Int J Cosmet Sci* 35:448–457.
5. Lysy PA, F Smets, C Sibille, M Najimi and EM Sokal. (2007). Human skin fibroblasts: From mesodermal to hepatocyte-like differentiation. *Hepatology* 46:1574–1585.
 6. Huang HI, SK Chen, QD Ling, CC Chien, HT Liu and SH Chan. (2010). Multilineage differentiation potential of fibroblast-like stromal cells derived from human skin. *Tissue Eng Part A* 16:1491–1501.
 7. Haniffa MA, XN Wang, U Holtick, M Rae, JD Isaacs, AM Dickinson, CM Hilkens and MP Collin. (2007). Adult human fibroblasts are potent immunoregulatory cells and functionally equivalent to mesenchymal stem cells. *J Immunol* 179:1595–1604.
 8. Osonoi M, O Iwanuma, A Kikuchi and S Abe. (2011). Fibroblasts have plasticity and potential utility for cell therapy. *Hum Cell* 24:30–34.
 9. Bae S, JH Ahn, CW Park, HK Son, KS Kim, NK Lim, CJ Jeon and H Kim. (2009). Gene and microRNA expression signatures of human mesenchymal stromal cells in comparison to fibroblasts. *Cell Tissue Res* 335:565–573.
 10. Rebelatto CK, AM Aguiar, MP Moretao, AC Senegaglia, P Hansen, F Barchiki, J Oliveira, J Martins, C Kuligovski, et al. (2008). Dissimilar differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, and adipose tissue. *Exp Biol Med* (Maywood) 233:901–913.
 11. Shigunov P, J Sotelo-Silveira, C Kuligovski, AM de Aguiar, CK Rebelatto, JA Moutinho, PS Brofman, MA Krieger, S Goldenberg, et al. (2012). PUMILIO-2 is involved in the positive regulation of cellular proliferation in human adipose-derived stem cells. *Stem Cells Dev* 21:217–227.
 12. Tondreau T, L Lagneaux, M Dejeneffe, M Massy, C Mortier, A Delforge and D Bron. (2004). Bone marrow-derived mesenchymal stem cells already express specific neural proteins before any differentiation. *Differentiation* 72:319–326.
 13. Zipori D. (2004). Mesenchymal stem cells: harnessing cell plasticity to tissue and organ repair. *Blood Cells Mol Dis* 33:211–215.
 14. Jiang Y, B Vaessen, T Lenvik, M Blackstad, M Reyes and CM Verfaillie. (2002). Multipotent progenitor cells can be isolated from postnatal murine bone marrow, muscle, and brain. *Exp Hematol* 30:896–904.
 15. Menssen A, T Haupt, M Sitterger, B Delorme, P Charbord and J Ringe. (2011). Differential gene expression profiling of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells during adipogenic development. *BMC Genomics* 12:461.
 16. Jeong JA, KM Ko, S Bae, CJ Jeon, GY Koh and H Kim. (2007). Genome-wide differential gene expression profiling of human bone marrow stromal cells. *Stem Cells* 25:994–1002.
 17. Keene JD. (2007). RNA regulons: coordination of post-transcriptional events. *Nat Rev Genet* 8:533–543.
 18. Dominici M, K Le Blanc, I Mueller, I Slaper-Cortenbach, F Marini, D Krause, R Deans, A Keating, D Prockop and E Horwitz. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytherapy* 8:315–317.
 19. Spangenberg L, P Shigunov, AP Abud, AR Cofre, MA Stimamiglio, C Kuligovski, J Zych, AV Schittini, AD Costa, et al. (2013). Polysome profiling shows extensive posttranscriptional regulation during human adipocyte stem cell differentiation into adipocytes. *Stem Cell Res* 11:902–912.
 20. Dai M, RC Thompson, C Maher, R Contreras-Galindo, MH Kaplan, DM Markovitz, G Omenn and F Meng. (2010). NGSQC: cross-platform quality analysis pipeline for deep sequencing data. *BMC Genomics* 11 Suppl 4:S7.
 21. Liao Y, GK Smyth and W Shi. (2013). The subread aligner: fast, accurate and scalable read mapping by seed-and-vote. *Nucleic Acid Res* 41:e108.
 22. Robinson MD, DJ McCarthy and GK Smyth. (2010). edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* 26:139–140.
 23. Olsen JV, B Blagoev, F Gnäd, B Macek, C Kumar, P Mortensen and M Mann. (2006). Global, in vivo, and site-specific phosphorylation dynamics in signaling networks. *Cell* 127:635–648.
 24. Cox J and M Mann. (2008). MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nat Biotechnol* 26:1367–1372.
 25. Cox J, N Neuhauser, A Michalski, RA Scheltema, JV Olsen and M Mann. (2011). Andromeda: a peptide search engine integrated into the MaxQuant environment. *J Proteome Res* 10:1794–1805.
 26. Zych J, MA Stimamiglio, AC Senegaglia, PR Brofman, B Dallagiovanna, S Goldenberg and A Correa. (2013). The epigenetic modifiers 5-aza-2'-deoxycytidine and trichostatin A influence adipocyte differentiation in human mesenchymal stem cells. *Braz J Med Biol Res* 46:405–416.
 27. Makpol S, A Zainuddin, KH Chua, YA Yusof and WZ Ngah. (2012). Gamma-tocotrienol modulation of senescence-associated gene expression prevents cellular aging in human diploid fibroblasts. *Clinics (Sao Paulo)* 67:135–143.
 28. Kim J, YS Choi, S Lim, K Yea, JH Yoon, DJ Jun, SH Ha, JW Kim, JH Kim, et al. (2010). Comparative analysis of the secretory proteome of human adipose stromal vascular fraction cells during adipogenesis. *Proteomics* 10:394–405.
 29. Lennon DP, SE Haynesworth, DM Arm, MA Baber and AI Caplan. (2000). Dilution of human mesenchymal stem cells with dermal fibroblasts and the effects on in vitro and in vivo osteochondrogenesis. *Dev Dyn* 219:50–62.
 30. Cheung TH and TA Rando. (2013). Molecular regulation of stem cell quiescence. *Nat Rev Mol Cell Biol* 14:329–340.
 31. Mathieu J and H Ruohola-Baker. (2013). Regulation of stem cell populations by microRNAs. *Adv Exp Med Biol* 786:329–351.
 32. Miranda HC, RH Herai, CH Thome, GG Gomes, RA Panepucci, MD Orellana, DT Covas, AR Muotri, LJ Greene and VM Faca. (2012). A quantitative proteomic and transcriptomic comparison of human mesenchymal stem cells from bone marrow and umbilical cord vein. *Proteomics* 12:2607–2617.
 33. Rebelatto CK, AM Aguiar, AC Senegaglia, CM Aita, P Hansen, F Barchiki, C Kuligovski, M Olandoski, JA Moutinho, et al. (2009). Expression of cardiac function genes in adult stem cells is increased by treatment with nitric oxide agents. *Biochem Biophys Res Commun* 378:456–461.
 34. Miyamoto T, H Iwasaki, B Reizis, M Ye, T Graf, IL Weissman and K Akashi. (2002). Myeloid or lymphoid promiscuity as a critical step in hematopoietic lineage commitment. *Dev Cell* 3:137–147.
 35. Parekkadan B, AL Fletcher, M Li, MY Tjota, A Bellemare-Pelletier, JM Milwid, JW Lee, ML Yarmush and SJ Turley. (2012). Aire controls mesenchymal stem cell-mediated suppression in chronic colitis. *Mol Ther* 20:178–186.
 36. Davidson LA, N Wang, I Ivanov, J Goldsby, JR Lupton and RS Chapkin. (2009). Identification of actively translated

- mRNA transcripts in a rat model of early-stage colon carcinogenesis. *Cancer Prev Res (Phila)* 2:984–994.
37. Thomas JD and GJ Johannes. (2007). Identification of mRNAs that continue to associate with polysomes during hypoxia. *RNA* 13:1116–1131.
 38. Bolontrade MF, L Sganga, E Piaggio, DL Viale, MA Sorrentino, A Robinson, G Sevlever, MG Garcia, G Mazzolini and OL Podhajcer. (2012). A specific subpopulation of mesenchymal stromal cell carriers overrides melanoma resistance to an oncolytic adenovirus. *Stem Cells Dev* 21: 2689–2702.
 39. Jaager K, S Islam, P Zajac, S Linnarsson and T Neuman. (2012). RNA-seq analysis reveals different dynamics of differentiation of human dermis- and adipose-derived stromal stem cells. *PLoS One* 7:e38833.
 40. Najjar M, G Raicevic, F Jebbawi, C De Bruyn, N Meuleman, D Bron, M Toungouz and L Lagneaux. (2012). Characterization and functionality of the CD200-CD200R system during mesenchymal stromal cell interactions with T-lymphocytes. *Immunol Lett* 146:50–56.
 41. Pietila M, S Lehtonen, E Tuovinen, K Lahteenmaki, S Laitinen, HV Leskela, A Natynki, J Pesala, K Nordstrom and P Lehenkari. (2012). CD200 positive human mesenchymal stem cells suppress TNF-alpha secretion from CD200 receptor positive macrophage-like cells. *PLoS One* 7:e31671.
 42. Cheifetz S, T Bellon, C Cales, S Vera, C Bernabeu, J Massague and M Letarte. (1992). Endoglin is a component of the transforming growth factor-beta receptor system in Human endothelial cells. *J Biol Chem* 267:19027-19030.

Address correspondence to:

*Dr. Alejandro Correa
 Instituto Carlos Chagas, Fiocruz-Paraná
 Rua Professor Algacyr Munhoz Mader, 3775
 Curitiba
 PR 81350-010
 Brazil*

E-mail: alejandro@tecpar.br

Received for publication October 22, 2013

Accepted after revision June 20, 2014

Prepublished on Liebert Instant Online XXXX XX, XXXX



Polysome profiling shows extensive posttranscriptional regulation during human adipocyte stem cell differentiation into adipocytes

Lucia Spangenberg^{b,1}, Patricia Shigunov^{a,1}, Ana Paula R. Abud^a, Axel R. Cofré^a, Marco A. Stimamiglio^a, Crisciele Kuligovski^a, Jaiesa Zych^a, Andressa V. Schittini^a, Alexandre Dias Tavares Costa^a, Carmen K. Rebelatto^c, Paulo R.S. Brofman^c, Samuel Goldenberg^a, Alejandro Correa^a, Hugo Naya^b, Bruno Dallagiovanna^{a,*}

^a Instituto Carlos Chagas, Fiocruz-Paraná, Rua Professor Algacyr Munhoz Mader, 3775, Curitiba-PR 81350-010, Brazil

^b Unidad de Bioinformática, Institut Pasteur Montevideo, Matajojo 2020, Montevideo 11400, Uruguay

^c Núcleo de Tecnologia Celular, Pontificia Universidade Católica do Paraná, Rua Imaculada Conceição, 1155, Curitiba-PR 80215-901, Brazil

Received 22 December 2012; received in revised form 29 May 2013; accepted 2 June 2013
Available online 10 June 2013

Abstract Adipocyte stem cells (hASCs) can proliferate and self-renew and, due to their multipotent nature, they can differentiate into several tissue-specific lineages, making them ideal candidates for use in cell therapy. Most attempts to determine the mRNA profile of self-renewing or differentiating stem cells have made use of total RNA for gene expression analysis. Several lines of evidence suggest that self-renewal and differentiation are also dependent on the control of protein synthesis by posttranscriptional regulation controlled gene expression in hASCs. We focused on the initial steps of differentiation and isolated both the total mRNA fraction and the subpopulation of mRNAs associated with translating ribosomes. We observed that adipogenesis is committed in the first days of induction and three days appears as the minimum time of induction necessary for efficient differentiation. RNA-seq analysis showed that a significant percentage of regulated mRNAs were posttranscriptionally controlled. Part of this regulation involves massive changes in transcript untranslated regions (UTR) length, with differential extension/reduction of the 3'UTR after induction. A slight correlation can be observed between the expression levels of differentially expressed genes and the 3'UTR length. When we considered association to polysomes, this correlation values increased. Changes in the half lives were related to the extension of the 3'UTR, with longer UTRs mainly stabilizing the transcripts. Thus, changes in the length of these extensions may be associated with changes in the ability to associate with polysomes or in half-life.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

* Corresponding author. Fax: +55 41 33163267.

E-mail address: brunod@tecpa.br (B. Dallagiovanna).

¹ Both authors contributed equally to this work.

Introduction

Human adipose tissue-derived stromal cells (hASC) are readily isolated from the pools of cells resident in the vascular stroma of adipose tissue. ASCs proliferate and self-renew and, due to their multipotent nature, they can differentiate at least in vitro into several tissue-specific lineages, including the chondrogenic, osteogenic, adipogenic and myogenic lineages (De Ugarte et al., 2003; Gimble et al., 2007). Adipose tissue is ubiquitous and large quantities are easily accessible with minimal invasion procedures (Baer and Geiger, 2012). These characteristics make these cells ideal candidates for use in cell therapy. An understanding of the biological process committing the cell to differentiation into a specific cell type is essential for the successful repair of injured tissue.

Cytokines, growth factors and extracellular matrix components in the microenvironment determine stem cell fate, by regulating the switch from self-renewal to differentiation (Kratchmarova et al., 2005). However, the downstream effectors and the gene regulatory networks controlling these processes remain unclear. Gene expression profiling has provided insight into the molecular pathways involved in ASC self-renewal and differentiation (Ivanova et al., 2002; Song et al., 2006). Genome-wide analyses based on microarray hybridization and, more recently, next generation sequencing, have been carried out to assess the global expression of gene networks.

Most attempts to determine the mRNA profile of self-renewing or differentiating cells have made use of total RNA for hybridization to microarrays or RNA-Seq analysis (Jeong et al., 2007a; Menssen et al., 2011). High-throughput analyses in eukaryotes comparing mRNA and protein levels have indicated that there is no direct correlation between transcript levels and protein synthesis, suggesting a high degree of posttranscriptional regulation in eukaryote cells (Washburn et al., 2003; Keene, 2007; Tebaldi et al., 2012). This hampers the classical transcriptome-based approach to investigate controlled expression in differentiating cells. Protein abundance can be controlled and refined through the regulation of gene expression at various complementary levels. Several lines of evidence from different organisms suggest that stem cell self-renewal and differentiation are also dependent on the control of protein synthesis by posttranscriptional mechanisms (Keene, 2007; Sampath et al., 2008; Haston et al., 2009; Kolle et al., 2011). The analysis of the mRNA fraction associated to polysomes has been used as a strategy to analyze posttranscriptional mechanisms involved in the control of translation (Fromm-Dornieden et al., 2012). This posttranscriptional regulation is mediated by various molecules, such as microRNAs, noncoding RNAs and RNA binding proteins. *Trans*-acting factors recognize and bind sequences or structural elements, mostly in the untranslated regions (UTRs) of mRNAs (Mittal et al., 2009; Bar et al., 2008; Keene, 2010). Posttranscriptional control may be mediated by, amongst other things, modifications to mRNA stability or by the inhibition of transcript association with translating ribosomes.

We used adipogenic differentiation as a model, to investigate the extent to which posttranscriptional regulation controlled gene expression in hASCs. We focused on the initial steps of cell differentiation and isolated both the total mRNA fraction and the subpopulation of mRNAs associated

with translating ribosomes. RNA-seq analysis showed that a significant percentage of regulated mRNAs were controlled both at the translational level and by changes to their half lives. Part of this regulation is associated with differential extension/reduction of the 3'UTR after induction.

Materials and methods

Isolation, culture, and differentiation of hASCs

Stem cells were obtained from adipose tissue from obese human donors (two males and one female, ages: 41, 52, 23). All samples were isolated, collected after informed consent had been obtained, in accordance with guidelines for research involving human subjects, and with the approval of the Ethics Committee of Fundação Oswaldo Cruz, Brazil (approval number 419/07). hASCs were isolated, cultured and characterized as previously described (Rebelatto et al., 2008). Briefly, 100 ml of adipose tissue was washed with sterile phosphate-buffered saline (PBS) (Gibco Invitrogen). A one-step digestion by 1 mg/ml collagenase type I (Invitrogen) was performed for 30 min at 37 °C during permanent shaking and was followed by filtration through first a 100- and then 40- μ m mesh filter (BD FALCON, BD Biosciences Discovery Labware, Bedford, MA, USA). The cell suspension was centrifuged at 800 g for 10 min, and contaminating erythrocytes were removed by erythrocyte lysis buffer, pH 7.3. The cells were washed and then cultivated at a density of 1×10^5 cells/cm² in T75 culture flasks in DMEM-F12 (Gibco Invitrogen) supplemented with 10% FCS, penicillin (100 units/ml), and streptomycin (100 μ g/ml). The medium was changed 2 days after the initial plating. The culture medium was then replaced twice each week. ASCs were subcultured after the cultures had reached 80% to 90% confluence; cells were detached by treatment with 0.25% trypsin/EDTA (Invitrogen) and were replated as passage-1 cells (the process was then continued). The characterization of the cells has been done following the minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells as determined by the International Society for Cellular Therapy (Dominici et al., 2006). All tests were performed with cell cultures at passages 3 to 5. For adipogenic differentiation, hASCs were treated with hMSC Adipogenic Differentiation Bullet Kit (Lonza), in accordance with the manufacturer's instructions. Briefly, adipogenic differentiation was induced by 6 day cycles of induction/maintenance during 21 days. Induction medium contained the adipogenic inducers insulin, dexamethasone, indomethacin and IBMX; maintenance medium contained insulin. The medium was changed every 3 days. The degree of adipogenic differentiation was determined by assessing the cytoplasmic accumulation of triglycerides by staining with Oil Red O or Nile Red (Sigma-Aldrich), as described by Rebelatto et al. (2008). We also performed reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) to estimate the amount of adipocyte-specific fatty acid-binding protein 4 (FABP4) mRNA. A list of the primers used is provided in Supporting Information Table S1.

Sucrose density gradient separation and RNA purification

Polysomal fractions were prepared with a modified version of the procedure described by Holetz et al. (2007). In brief,

hASC cultures at 50 to 60% confluence were treated with 0.1 mg/ml cycloheximide (Sigma-Aldrich) for 10 min at 37 °C. The cells were removed from the culture flasks with a cell scraper and resuspended in 0.1 mg/ml cycloheximide in PBS. The suspension was centrifuged (2000 ×g for 5 min) and the resulting pellet was washed twice with 0.1 mg/ml cycloheximide in PBS. The cells were lysed by incubation for 10 min on ice with polysome buffer (15 mM Tris-HCl pH 7.4, 1% Triton X-100, 15 mM MgCl₂, 0.3 M NaCl, 0.1 μg/ml cycloheximide, 1 mg/ml heparin). The cell lysate was centrifuged at 12,000 ×g for 10 min at 4 °C. The supernatant was carefully isolated, loaded onto 10% to 50% sucrose gradients and centrifuged at 39,000 rpm (SW40 rotor, HIMAC CP80WX HITACHI) for 160 min at 4 °C. The sucrose gradient was fractionated with the ISCO gradient fractionation system (ISCO Model 160 gradient former), connected to a UV detector for the monitoring of absorbance at 275 nm, and the polysome profile was recorded. The total and polysomal RNA fractions were extracted by a standard Trizol (Invitrogen) RNA isolation protocol.

cDNA library construction and RNA sequencing (RNA-Seq)

We subjected total and polysome-associated RNA samples to amplification with the Amino Allyl Message Amp II aRNA Amplification Kit (Ambion), to provide a template for SOLiD libraries. The cDNA libraries were prepared with the SOLiD Whole Transcriptome Analysis Kit and the purified products were evaluated with an Agilent Bioanalyzer (Agilent). Library molecules were subjected to clonal amplification according to the SOLiD Full-Scale Template Bead preparation protocol and sequenced with the SOLiD4 System (Applied Biosystems).

Data analysis

Quality control analysis was performed on the sequencing data, with NGSQC (Dai et al., 2010) software. Various quality parameters were explored visually for each sample (distribution of colors per sample/tile, genomic hit count per sample with different numbers of mismatches, sequencing read density and a quality score based on the mean values of the preceding values for each sample). All samples passed the quality control filter. Mapping and counting were performed with the R package Rsubread (Liao et al., 2013). Hierarchical clustering of the samples (log of counts plus one) was performed, to evaluate biological variability. Each sample was normalized to one million reads to account for library size. We also conducted a correspondence analysis (COA), a dimension reduction method, to the matrix of counts, to explore associations between variables. In COA it is possible to visualize samples and genes simultaneously, revealing associations between them. Genes, or samples, lying close to each other tend to behave similarly.

For the comparison of induced stem cells with undifferentiated stem cells we retained only those genes with counts of more than 1 per million in at least three conditions. In comparisons between induced stem cells and undifferentiated cells differentially expressed (DE) genes were identified with the edgeR bioconductor package (Robinson et al.,

2010). This set of genes was used for GO term analysis with the goseq bioconductor package (Young et al., 2010).

The analysis of 3'UTR extension/shortening was performed according to the approach presented by Kolle et al. (2011), basically a sliding window of length *w* starting from last exon runs through the 3'UTR region (in steps of length *s*), each time determining expression of the window. If expression decays more than 50% the sliding stops and the 3'UTR ends. The parameters used in this case: *w* = 100 and *s* = 50. The analysis was restricted to the DE genes. A comparative analysis with proteomic data was performed against the murine data set of Molina et al. (2009). They have studied the proteomics of adipocyte differentiation on 3T3-L1 murine preadipocytes in four different time points (days 1, 3, 5 and 7) and determined differentially expressed genes on two sets of proteins, nuclear and secreted ones. The protein levels of both sets of genes were compared with the respective logFC determined by our differential expression analysis (in both cases polysomal and total RNA). Pearson correlation test was performed and significant results with the secreted protein set were obtained. Raw data has been submitted to the ArrayExpress repository under accession number E-MTAB-1366.

RT-qPCR

RT-PCR and real-time quantitative PCR (qPCR) were performed as previously described (Rebelatto et al., 2008). Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) transcript was used as internal control. Experiments were performed with cells from at least three donors, with technical triplicates. Student's *t*-test was used to assess the significance of differences between the cell populations. We considered *p*-values < 0.05 to be statistically significant.

Reduced glutathione (GSH) determination

Cells were washed twice in PBS and centrifuged at low speed. Pelleted cells were suspended in lysis buffer (15 mM Tris-HCl, 15 mM MgCl₂, 300 mM NaCl, 1% Triton X-100; pH 7.4) and placed on ice for 10 min. Cell lysate was centrifuged at 12,000 ×g for 10 min and the supernatant was used to determine the level of reduced GSH. An aliquot (150 μl) of the supernatant was added to the reaction medium (25 μl of 3 mM DTNB [5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid)] plus 125 μl of methanol) and absorbance was determined at 412 nm on a microplate reader (BioTek®). We calculated the concentration of reduced GSH, using the molar extinction coefficient of DTNB in solution ($\epsilon = 13,600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Results are expressed in μM GSH per 5×10^5 cells. All results are expressed as means ± SEM. The significance of the differences observed was evaluated by ANOVA, with Tukey's post hoc test. *p* < 0.01 and *p* < 0.05 were considered statistically significant. Raw data is shown in the Supplemental material Dataset S3.

Estimation of mRNA decay rates

For the measurement of mRNA stability, transcription was blocked by adding actinomycin D (Sigma) to the medium at a concentration of 10 mg/ml. The mean relative transcript levels estimated by RT-qPCR at each time point after the addition of Act D were used to estimate the half-life of the

transcript from a first-order decay model, according to the equation, $\gamma = \beta_0 e^{\beta_1 t} + \varepsilon$, where γ is the mean relative amount of mRNA at time t after the addition of Act D, β_0 is the initial quantity, β_1 is a decay parameter related to half-life ($t_{1/2} = \pm \ln 2 / \beta_1$) and ε is an error term (Sharova et al., 2009).

Results

Adipogenesis is committed in the first days of induction

We characterized the patterns of gene expression involved in the initial steps of adipogenesis. All accepted protocols use at least three days of strong induction to promote differentiation into adipocytes so we allowed hASCs to differentiate in vitro in the presence of adipogenic induction media for 72 h. All the experiments described were performed with at least three samples of hASCs from different donors, all used in early passages. After three days of in vitro differentiation, the cells displayed no clear change in phenotype or accumulation of lipids in the cytoplasm (Supporting information Figs. S1A, B). The cells were collected for isolation of total and polysomal RNA. The hASCs had a polysome profile typical of cells with low levels of translation activity, with low concentrations of polysome complexes present throughout the gradient. In the first few days of adipogenesis, the cells displayed no

significant change in overall polysome profile (Supporting information Figs. S1C, D).

We isolated polysome-associated mRNAs from the gradient fractions corresponding to polysomes. The total and polysomal mRNA fractions of hASCs were analyzed by RNA-Seq, with the SOLiD4 system. In both cases, we compared time points 0 and 72 h after adipogenic induction. The total number of reads obtained for each sample is shown in Supporting information Table S2. The reads of all samples were mapped onto the reference genome (Hg19; NCBI Build 37.64), yielding a mean mapping percentage of approximately 54%. Hierarchical clustering shows that samples cluster first as a function of conditions (control, induced) and then by RNA fraction, rather than by donor, indicating that total and polysomal RNA populations are intrinsically more characteristic than donor "idiosyncrasy" (Fig. 1A). Correspondence Analysis (COA) produced similar results (Fig. 1B), with the first axis separating samples according to fraction and the second by conditions. Most transcripts were detected in both fractions (though with different levels of expression) while a significant number of transcripts were only present in one of the RNA populations. This could reflect the existence of regulatory mechanisms which modulate the efficiency of association with polysomes (Fig. 1C). We filtered out genes with very low counts, reducing the number of genes retrieved to just over 15,000 per comparison (see Array Express E-MTAB-1366 and Supporting information Table S2). Furthermore, we identified the differentially expressed (DE) genes using this reduced set

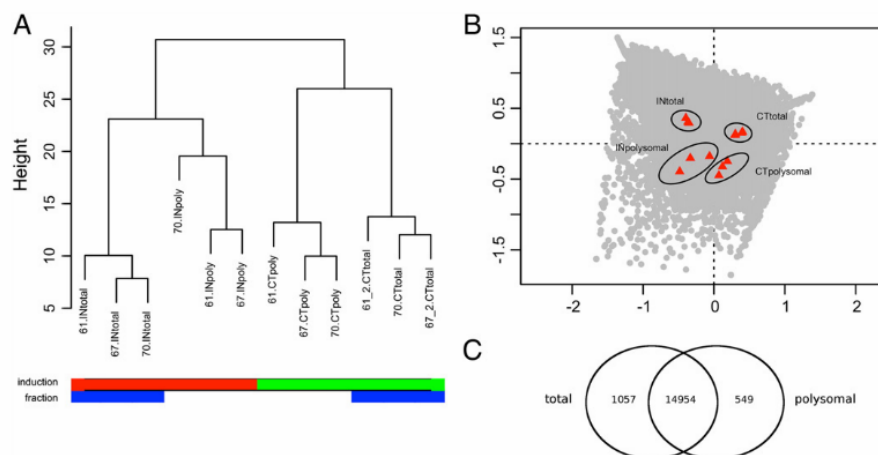


Figure 1 Results of hierarchical clustering and correspondence analysis showing the internal consistency of the data. (A): A dissimilarity based (bottom-up) hierarchical clustering was performed on the log-transformed counts of genes for the various samples. Initially, each object is assigned to its own cluster and then the algorithm proceeds iteratively, at each stage joining the two most similar clusters, according to some distance measure (in this case, complete linkage approach), continuing until there is one single cluster. The process is visualized as a dendrogram: the first branching event separates control (CT) from induced (IN) samples (IN left, CT right). Subsequent branching events group the samples according to the RNA fraction ("poly" and "total"). The numbers of the samples (61, 67 and 70) correspond to the donors. The height axis represents the distance between each branching event. Condition and fraction accounted for the largest proportions of the variance in both analyses, highlighting the consistency of the experiments. (B): Correspondence analysis (COA) on the samples. The x-axis represents the first component (the one explaining the most variance 43.43%) and the y-axis the second component (representing 29.91% of the variance). Fraction (polysomal and total) appears to be represented in the y-axis and the culture conditions (CT and IN) in the x-axis. Four groups of samples are represented on the reduced (two-dimensional) space. They correspond to the four RNA populations: CT-polysomal, CT-total, IN-polysomal, IN-total. (C): Venn diagram showing the overlap between the genes detected in both conditions: polysomal and total RNA populations. 14,954 genes are common to both sets.

(edgeR, paired comparisons). We compared the control and induced states, for the polysomal RNA fraction and for total RNA. We identified 2918 DE genes in total RNA and 780 DE genes in the polysomal fraction (FDR 0.001; Supporting information Datasets S1 and S2). Gene expression values (logFC) of both RNA fractions show Spearman correlation value of 0.62 (Supporting information Fig. S2). The relative efficiency of association with polysomes was also determined in both control and induced cells (Supporting information Table S3).

Differential expression was confirmed by RT-qPCR on selected transcripts (Supporting information Fig. S3). To also confirm the differential association with polysomes we performed sucrose density fractionation of polysomes. The presence of the selected transcripts in the RNA populations present in polysomes, monosomes and ribosome-free pooled fractions was analyzed by RT-qPCR. Differential expression was associated with a shift in the association of mRNAs with the different ribosome fractions for almost all transcripts tested but one (Supporting information Fig. S4).

More detailed analysis of the DE genes in the polysomal fraction showed a strong upregulation of adipogenesis-related genes after three days of induction. Key transcriptional regulators of the onset of adipogenesis, such as PPAR γ , KLF15 and CEBP α , showed an increase of several fold in their transcript levels (Supporting information Dataset S2). We also detected the expression of lipid metabolism-related genes and genes of the insulin response network encoding growth factors, receptors and binding proteins. These results suggest that adipogenesis is already triggered in the first few days of induction. Standard protocols are based on continuous or alternate induction, with the medium changed every three days and differentiation allowed to occur for up to 21 days. We tested our hypothesis, by inducing the cells for only three days and then allowing them to complete differentiation without further induction. The cells differentiated fully, but their fitness differed from that of cells induced for a continuous period of 21 days, and this difference was not the same for all considered donors (Fig. 2A). This raised questions about the true minimum period of stimuli required for the commitment of the cells to differentiation. Induction kinetics

showed that three days was the critical time for the induction of efficient adipogenesis, although some degree of differentiation was observed with shorter induction times (Supporting information Table S4).

We observed the upregulation mainly in the polysomal RNA fraction of several genes involved in glutathione homeostasis in the cell. It has been reported that GSH decrement results in enhanced C/EBP β activation, which is a key event in the first phase of adipogenesis, resulting in the activation of downstream PPAR γ and a more rapid acquirement of adipose phenotype in 3T3-L1 cells (Vigilanza et al., 2011). For the confirmation of these results, we measured GSH levels in both control and induced cells. We found that differentiating cells contained 30% less GSH than non-induced cells (Fig. 2B).

Polysome associated mRNAs show extensive posttranscriptional regulation

GO analysis was performed using DE genes on the polysomal and total fractions (Fig. 3). Most of the GO terms underrepresented in both fractions were involved in nucleic acid metabolism and nuclear functions (Supporting information Tables S5, S6 and S7).

We obtained 18 overrepresented GO terms (FDR 0.001) in the analysis of DE genes in the total fraction. Most of these terms are related to proteins from the extracellular space and plasma membrane, with functions involved in cell adhesion, cell signaling, receptor activity and extracellular matrix proteins.

We also obtained 18 overrepresented terms in the analysis of polysomal fraction samples. Some of the GO terms obtained were similar to those for the total fraction (e.g. receptor activity, Figs. 3A, B), whereas several others were specific to the polysomal samples (oxidoreductase activity, Fig. 3A). Furthermore, some terms for which changes in mRNA levels were observed in the total fraction (genes encoding ribosomal or actin cytoskeleton proteins) showed no difference when polysomal RNA fraction was analyzed. In particular, no difference in polysome association was observed for transcripts encoding proteins involved in the development of the nervous system and in cell differentiation, despite the increase in the

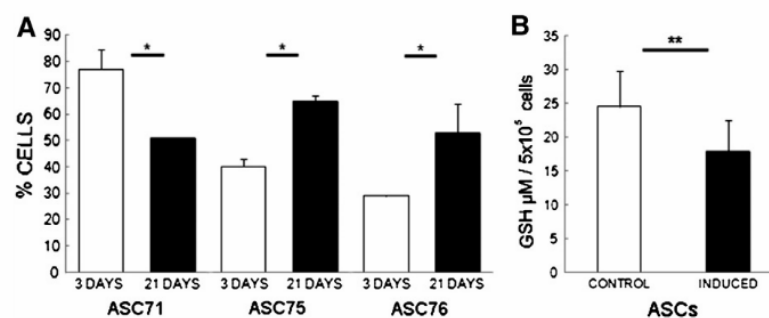


Figure 2 Morphological and metabolic changes during the differentiation process. (A): Differentiation potential analysis of ASCs: cells were maintained in differentiation-inducing conditions for 3 (white) or 21 days (black) and allowed to complete adipogenesis. Columns represent the percentage of differentiated cells in the cultures after 21 days. (B): Reduced glutathione (GSH) concentration in the induced cells (black column) was 30% lower than that in the control group (white column). The data shown are from three independent experiments carried out with ASCs from three donors. The results are expressed as means \pm SD. The significance of differences between mean values was evaluated by a two-way analysis of variance (ANOVA) followed by a Tukey test. p values ≤ 0.01 and ≤ 0.05 were considered statistically significant.

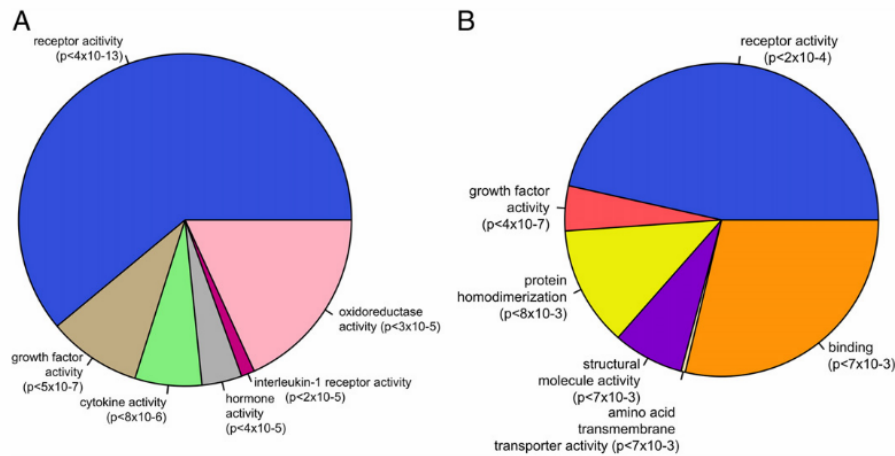


Figure 3 GO analysis of two sets of differentially expressed genes: IN vs CT in the polysomal RNA fraction (A) and IN vs CT in total RNA (B). Only overrepresented Molecular Function (MF) GO terms are shown in each pie chart in (A) and (B). For each over represented MF GO term its corresponding adjusted p-values are shown.

levels of transcripts for these proteins in the total fraction. To confirm our results we compared our data with previously published proteomic data. Proteomic analysis of human ASCs undergoing adipogenesis showed the differential expression of receptors and membrane proteins (Jeong et al., 2007b) and proteins related to oxido-reductase activity and oxidative stress response (Kim et al., 2010; Kheterpal et al., 2011). Moreover, we performed correlation analysis with the proteomic data of Molina et al. (2009) who presented a quantitative analysis (SILAC) of adipogenesis in murine 3T3-L1 cells. Molina's experiment determined protein expression levels during adipocyte differentiation at four time points (days 1, 3, 5 and 7) and for two sets of proteins: nuclear (280) and secreted (147) proteins. After determining the corresponding human orthologs we retrieved our logFC values of the comparison of IN wrt CT in the polysomal RNA fraction. No significant correlation was observed for the nuclear proteins set correlation values were not significant in each of the time points. This was expected as since we have observed a downregulation of nuclear proteins in our assays. However, the set of secreted proteins is highly correlated to our data for almost every time point and the correlation is also statistically significant (Supplementary information Fig. S5A). To further confirm our results, protein expression was also measured by western blot with protein extracts from control (CT) and induced (IN) cells. The amount of IGFBP2 protein was clearly increased in induced cells corroborating the differential expression of the insulin signaling pathway after induction. As mentioned previously, many transcripts that showed differential expression in the total fraction but not in their association with polysomes showed no changes when protein levels were analyzed (Supporting information Fig. S5B). These findings suggest that posttranscriptional mechanisms may have a key role in the control of gene expression during adipogenesis.

We compared differential expression between the total and polysomal RNA fractions, to assess the degree of posttranscriptional regulation, by an approach similar to that used by Lundberg et al. (2010). Using the differential expression values shown in Datasets S1 and S2, we compared

the samples in the polysomal and total RNA fractions, using a cutoff value of $|\logFC| > 1.5$. Fig. 4A shows logFC values obtained from the comparison of induced vs. control samples of the polysomal fraction against the logFC values obtained from the comparison of total RNA samples. Most of the genes identified displayed no change in expression level during differentiation (87.65%). However, 5.25% of the transcripts displayed changes in both RNA fractions, and another 5.45% of the transcripts displayed changes in steady-state RNA levels with no change in the amount of transcript associated with translating ribosomes. Finally, 1.66% of the transcripts displayed differential mobilization to the polysomes during cell differentiation. If restricted only to changing genes (in either fraction), almost half of the genes showed differential expression in both conditions (about 43%), about 13% were DE only in the polysomal fraction and about 44% were DE only in the total fraction (Fig. 4B). Our results demonstrate the existence of posttranscriptional mechanisms regulating the association of mRNAs with translating ribosomes, irrespectively of a change in steady-state levels. Hence, we observe an extensive posttranscriptional regulation during the initial steps of adipogenesis.

Cell differentiation involves massive changes in transcript UTR length

Recent studies have reported that the transcripts expressed in human and murine embryonic stem cells have alternative 3'UTRs (Kolle et al., 2011; Ji et al., 2009). It has been suggested that the 3'UTRs of mRNAs increase in length with the progression of embryonic development in mouse embryonic stem cells (Ji et al., 2009). We considered the reads mapped onto putative extended 3'UTR to detect possible changes during the induction of adipogenesis. We found that the differentially expressed genes displayed changes in the length of their 3'UTRs during this process. By contrast to the findings in mouse cells, we observed both lengthening and shortening of the 3'UTRs of these transcripts (Dataset S4).

The 3'UTRs of mRNAs potentially contain *cis*-acting elements for the posttranscriptional regulation of gene expression. Thus,

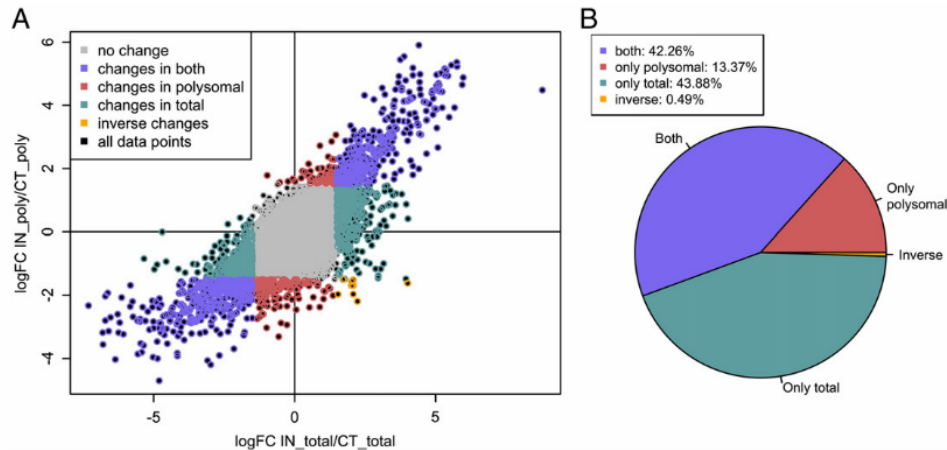


Figure 4 Differential association of mRNAs to polysomes: (A): LogFC values from different RNA fractions were compared. The logFC values (IN vs. CT) for the polysomal fraction (y-axis) were plotted against the logFC values for the total RNA fraction (x-axis). The data points are colored according to the change in the fractions. Genes displaying changes only in the polysomal fraction include genes with a $|\logFC|$ of at least 1.5 ($|\logFC| > 1.5$) and genes with a $|\logFC| < 1.5$ in the total fraction (light red). Changes in the total RNA fraction were associated with a $|\logFC| > 1.5$ and of $|\logFC| < 1.5$ in the polysomal fraction (light green). Genes displaying changes in expression in both sets of conditions had high (or low) values of logFC (greater than 1.5/lower than -1.5) in both RNA fractions (violet). Inverse changes included genes with high logFC values ($\logFC > 1.5$) in the total fraction and low values ($\logFC < 1.5$) in the polysomal fraction, or vice versa (orange). (B): The pie chart on the right shows the percentages of genes displaying changes in expression in each of the four categories: change only in the polysomal fraction, change only in the total RNA fraction, concordant changes in the two fractions, discordant changes in the two fractions. Only the changing genes are considered.

changes in the length of these extensions may be associated with changes in the ability to associate with polysomes or in half-life. A slight correlation can be observed between the logFC of DE genes (total fraction) and the difference of 3'UTR length in control and induced samples. The correlation values are 0.28, 0.29, and 0.22 for donors 67, 61 and 70, respectively (Supporting information Table S8A). When we considered association to polysomes, these correlation values increase, 0.32, 0.35 and 0.25 respectively (Supporting information Table S8B). We also looked for a biological relationship between the different subsets of transcripts grouped by extension/shortening of the UTR and up or downregulation. Interestingly, we observed that the subset of downregulated transcripts presenting a longer 3'UTR after induction was related to the response to unfolded proteins and stress (Supplementary information Table S9).

We investigated the relationship between changes in UTR length and mRNA stability, by measuring the steady-state levels of the transcripts in control and induced cells. We focused on two examples, one extension (FABP4) and one shortening (WNT2) of transcript 3'UTRs which are differentiation markers or regulators of adipogenesis (Figs. 5A,D). Treatment of the cells with actinomycin D revealed changes in the half lives of these transcripts, which were directly related to the extension of the UTR in the two situations analyzed, with longer UTRs stabilizing the transcripts (Figs. 5 and S6). The results are summarized in Supporting information Table S10.

Discussion

Posttranscriptional regulation mechanisms are now considered to play a key role in the control of gene expression.

Regulation occurs mainly through the modulation of mRNA half life or the formation of a translational initiation complex, allowing the assembly of translating polysomes (Keene, 2007).

We used adipogenesis as a cell differentiation model to study the regulation of gene expression in hASCs. The identification of mRNAs associated with polysomes could provide us with a clearer idea of which genes are actually translated into proteins in differentiating cells. By deep sequencing, we showed that adipogenesis had been triggered at the molecular level after three days of induction, although the cells did not yet display any clear phenotypic changes. Analysis of polysome associated mRNAs in the first hours of differentiation of 3T3 pre-adipocytes showed the upregulation of a discrete number of genes, mainly related with the overall control of translation (Fromm-Dornieden et al., 2012). We demonstrated, after three days of adipogenic induction, an upregulation of the expression of networks of genes involved in adipocyte differentiation (Menssen et al., 2011). Three days was identified as the minimum induction time required for the initiation of adipogenesis, as shorter induction times resulted in lower percentages of mature adipocytes. Moreover, no additional induction was required to achieve differentiation, suggesting that the cells can sustain their own differentiation, once committed. Differentiating hASCs contain high levels of expression of prolactin (PRL) (See Dataset S2). Studies with murine preadipocytes have demonstrated that fetal bovine serum (FBS), which is known to contain large amounts of prolactin (Ginsburg and Vonderhaar, 1995), is required for the efficient induction of adipogenesis and that PRL can replace FBS in the differentiation of the 3T3-L1 preadipocyte cell line (Stewart et al., 2004). PRL has also been shown to act as an adipogenesis-enhancing hormone,

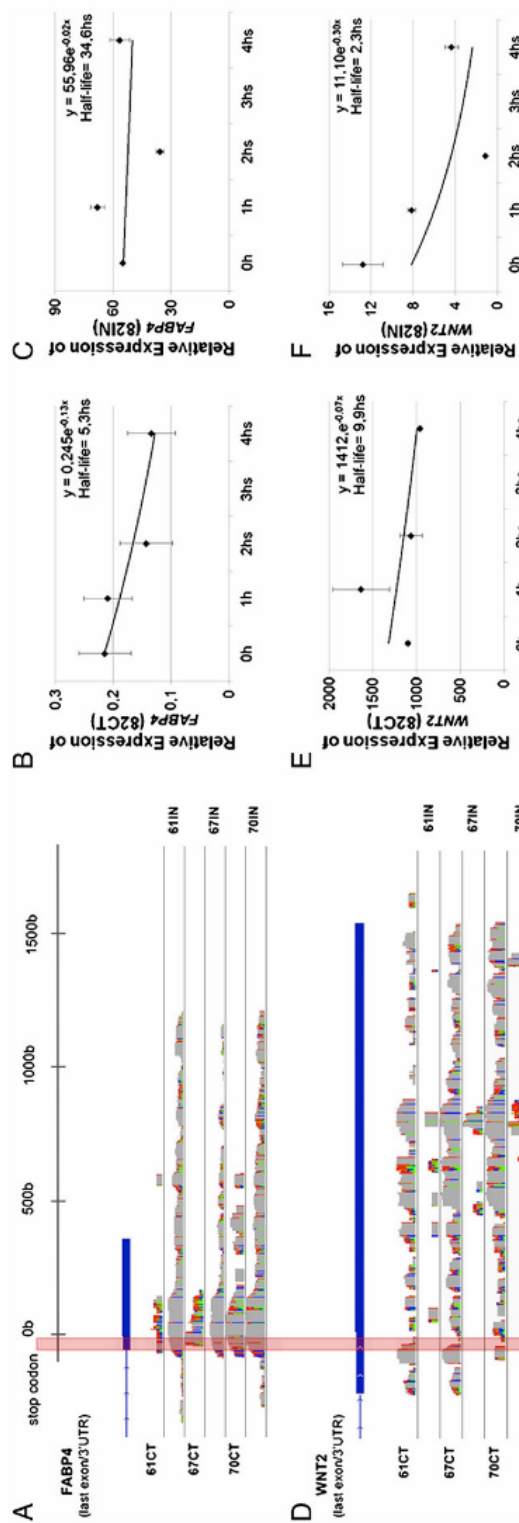


Figure 5 The coverage vectors of the 3'UTR of two genes and the half-life of the mRNA. (A): Six samples (3 CT and 3 IN) are represented as coverage vectors (log-scaled) for the *FABP4* gene. Only experiments using polysomal RNA were considered. The induced and control samples are interspersed (e.g. 61 CT and 61 IN). Induced samples of show an extension the 3'UTR (~1 kb). The red vertical bar shows the stop codon, the horizontal blue bars represent the last portion of the gene structure (last exon and 3'UTRs). (D): Same analysis for the *WNT2* gene. In this case, induced samples show a shortening of the 3'UTR, whereas control samples have a longer 3'UTR. (B-C, E-F): Half-life of *FABP4* and *WNT2* mRNAs in control (CT) and induced (IN) hASCs. hASCs were treated with Act-D for various periods, to block mRNA synthesis. Total RNA isolation, cDNA generation and real-time PCR amplification were performed as described in the text. The values shown are means \pm SD of *FABP4* and *WNT2* RNA copy number per μ g of total RNA, from two independent experiments carried out in triplicate.

enhancing the expression of the key transcriptional regulators of adipogenesis, C/EBP β and PPAR γ (Nanbu-Wakao et al., 2000). Interestingly, for bone marrow stromal cells, the induction of adipogenesis causes a dose-dependent increase in prolactin receptor expression, suggesting a role for prolactin and its receptor in adipocyte differentiation (McAveney et al., 1996). Studies in knockout mice have shown that an absence of PRLR signaling compromises the growth and differentiation of brown adipose tissue and that immortalized PRLR knockout preadipocytes do not differentiate into mature adipocytes, this defect being reversed by the reintroduction of PRLR (Viengchareun et al., 2008). Moreover, the production of PRL mRNA and protein increases markedly during the early differentiation of primary human preadipocytes (Hugo et al., 2006).

Clustering analysis of the total and polysomal RNA fractions showed these two fractions to be clearly different, regardless of donor origin. GO analysis revealed enrichment in different terms in the two populations. Nucleic acid metabolism-related genes were clearly downregulated in both fractions. As this category includes genes encoding regulatory proteins, further studies are required to understand the impact of this negative control on MSC differentiation. Genes encoding membrane-related and receptor proteins were upregulated in both RNA populations, suggesting that the principal changes in MSC biology during differentiation are related to the response to external stimuli and signaling.

A comparison of the total RNA and polysome-associated fractions provides a global estimate of the degree of posttranscriptional regulation, at least in terms of the control of translation initiation (Halbeisen and Gerber, 2009). Almost 60% of the differentially expressed genes showed some kind of posttranscriptional regulation. In most cases, this regulation counterbalances fluctuations in total RNA levels. Thus, transcripts increasing or decreasing in abundance in the cell are recruited to polysomes in equal amounts in differentiating cells. It was also observed a subset of transcripts that, although overexpressed in both fractions, showed a higher fold change in the polysomal RNA fraction. This has been described as a mechanism of homodirectional co-regulatory mechanism resulting in the amplification or potentiation of the positive control of gene expression (Preiss et al., 2003). However, there is a subpopulation of mRNAs that is regulated solely at the translational level.

Specific groups of related genes were found to display differential expression mostly in the polysomal fraction. In particular, oxidative stress response genes and a family of genes encoding proteins involved in the response to changes in the levels of reduced glutathione (GSH), such as glutathione peroxidases (GPxs) (Brigelius-Flohe, 1999), aldo-keto reductases (Barski et al., 2008) and metallothioneins (Nielsen et al., 2007), displayed expression patterns of this type. Oxidative stress may occur as a result of adipogenic differentiation or lipid metabolism, and the upregulation of these genes may contribute to a protective response. GPxs are involved in various reactions, such as the reduction of organic hydroperoxides (ROOH) by GSH conjugation (Arteel and Sies, 2001). We found that the concentration of reduced glutathione (GSH) was 30% lower in induced than in control cells. This higher level of activity of enzymes involved in GSH homeostasis may counteract the higher ROS concentrations in differentiated cells (Yang et al., 2012).

Posttranscriptional regulation is usually mediated by the interaction of *trans*-acting factors with the UTR regions. Thus, 3'UTRs appear to play a key role in posttranscriptional regulation, as the spatial platform bearing the sequence or structural elements in *cis* that are targeted by regulatory factors (Mignone et al., 2002). Specific modulations of UTR length in tissues have been reported, based on either the use of different polyadenylation signals or alternative splicing (Zhang et al., 2005). The length of 3'UTRs has been shown to differ between embryonic stem cells and somatic cells, in both humans and mice. In human embryonic stem cells, some transcripts have 3'UTRs several kilobases longer than the reported length (Kolle et al., 2011). Proliferating cells produce mRNAs with shorter UTRs, which have longer half-lives. It has been suggested that transcripts may be stabilized by the loss of miRNA binding sites, which usually downregulate gene expression (Sandberg et al., 2008). By contrast, in murine stem cells, the UTRs of tissue-specific transcripts increase in length following cell commitment. This extension results from the use of distal polyadenylation sites and results in an increase in the half life of the mRNA, by an unknown mechanism (Ji et al., 2009). Moreover, in brown and white adipose tissues, Ptitsyn and Gimble (2007) reported the existence of oscillatory patterns of expression of SOCS3 and JAK transcripts. Shorter and longer transcripts oscillate in opposite phases. These transcripts were generated by alternative polyadenylation in response to circadian rhythms. The relationship between alternative polyadenylation, circadian rhythms and posttranscriptional regulation mechanisms like mRNA decay needs to be determined. Nocturnin, a circadian deadenylase, enhances adipogenesis via interaction with PPAR- γ and could be a possible link between these mechanisms (Green et al., 2007; Kawai et al., 2010). However, we didn't detect Nocturnin among the DE genes which are in accordance with previous results showing that Nocturnin is not upregulated by insulin induction in bone-marrow stem cells (Kawai et al., 2010). We observed a shortening of some 3'UTRs and an extension of others following the induction of cell differentiation. Even though we recognize the limitations of our approach to estimate the actual length of the 3'UTR (biased wrt gene expression, no estimation of sampling "holes", arbitrary parameters) we obtain a first overview of the situation; many 3'UTRs are changing sizes, in both directions (extension/shortening). We found some hints supporting that the length of the UTR is directly related to the stability of the mRNA and to enhanced association to polysomes. As reported for mouse stem cells, we found a bias towards longer 3'UTRs resulting in more stable transcripts though this is not a general rule. A preliminary analysis of the alternative UTRs strongly suggests that they resulted from differential polyadenylation. Epigenetic mechanisms as histone acetylation could be involved in the choice or selection for alternative polyadenylation sites resulting in new 3'UTRs that could also regulate transcription. In 3T3 preadipocytes the 3'UTR of C/EBP β acts as a strong enhancer element as a result of differential histone acetylation (Zhang et al., 2012). In chondrocytes, the 3'UTR of the Col2A1 gene is also a potent enhancer factor. It interacts with the promoter region through gene looping resulting in upregulation of gene expression (Jash et al., 2012). The mechanisms involved in the selection of alternative polyadenylation sites remain to be identified. It seems likely that extension of the 3'UTRs results in the

presence of new and additional regulatory elements, both positive and negative in effect.

Conclusions

Our results show that extensive posttranscriptional regulation occurs during the adipogenic differentiation of hASCs. Analysis of polysome associated transcripts showed that adipogenesis is committed after three days of induction. Differentially expressed transcripts showed either shortening or extension of their 3'UTRs. This modification in the extension of the 3'UTRs could be associated to mechanisms acting on both RNA stability and translation. The coordination of different levels of regulation ensures the efficient and correct differentiation of stem cells, and an elucidation of these mechanisms is required for an adequate understanding of the determination of stem cell fate.

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.scr.2013.06.002>.

Acknowledgments

This work was supported by grants from *Ministério da Saúde* and *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico* – CNPq, *FIOCRUZ-Pasteur Research Program* and *Fundação Araucária*. L.S. received fellowship from ANII (Agencia Nacional de Investigación e Innovación, Uruguay); S.G., J.Z. and B.D. from CNPq, P.S., A.C. and M.A.S. from FIOCRUZ.

References

- Arteel, G.E., Sies, H., 2001. The biochemistry of selenium and the glutathione system. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 10, 153–158.
- Baer, P.C., Geiger, H., 2012. Adipose-derived mesenchymal stromal/stem cells: tissue localization, characterization, and heterogeneity. *Stem Cells Int.* 2012, 812693.
- Bar, M., Wyman, S.K., Fritz, B.R., Qi, J., Garg, K.S., Parkin, R.K., Kroh, E.M., Bendoraite, A., Mitchell, P.S., Nelson, A.M., Ruzzo, W.L., Ware, C., Radich, J.P., Gentleman, R., Ruohola-Baker, H., Tewari, M., 2008. MicroRNA discovery and profiling in human embryonic stem cells by deep sequencing of small RNA libraries. *Stem Cells* 26, 2496–2505.
- Barski, O.A., Tipparaju, S.M., Bhatnagar, A., 2008. The aldo-keto reductase superfamily and its role in drug metabolism and detoxification. *Drug Metab. Rev.* 40, 553–624.
- Brigelius-Flohe, R., 1999. Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. *Free Radic. Biol. Med.* 27, 951–965.
- Dai, M., Thompson, R.C., Maher, C., Contreras-Galindo, R., Kaplan, M.H., Markovitz, D.M., Omenn, G., Meng, F., 2010. NGSQC: cross-platform quality analysis pipeline for deep sequencing data. *BMC Genomics* 11 (Suppl. 4), S7.
- De Ugarte, D.A., Morizono, K., Elbarbary, A., Alfonso, Z., Zuk, P.A., Zhu, M., Drago, J.L., Ashjian, P., Thomas, B., Benhaim, P., Chen, I., Fraser, J., Hedrick, M.H., 2003. Comparison of multi-lineage cells from human adipose tissue and bone marrow. *Cells Tissues Organs* 174, 101–109.
- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, A., Prockop, D., Horwitz, E., 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8, 315–317.
- Fromm-Dornieden, C., von der Heyde, S., Lytvchenko, O., Salinas-Riester, G., Brenig, B., Beissbarth, T., Baumgartner, B.G., 2012. Novel polysome messages and changes in translational activity appear after induction of adipogenesis in 3T3–L1 cells. *BMC Mol. Biol.* 13, 9.
- Gimble, J.M., Katz, A.J., Bunnell, B.A., 2007. Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. *Circ. Res.* 100, 1249–1260.
- Ginsburg, E., Vonderhaar, B.K., 1995. Prolactin synthesis and secretion by human breast cancer cells. *Cancer Res.* 55, 2591–2595.
- Green, C.B., Douris, N., Kojima, S., Strayer, C.A., Fogerty, J., Lourim, D., Keller, S.R., Besharse, J.C., 2007. Loss of Nocturnin, a circadian deadenylase, confers resistance to hepatic steatosis and diet-induced obesity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 9888–9893.
- Halbeisen, R.E., Gerber, A.P., 2009. Stress-dependent coordination of transcriptome and translome in yeast. *PLoS Biol.* 7, e1000105.
- Haston, K.M., Tung, J.Y., Reijo Pera, R.A., 2009. *Dazl* functions in maintenance of pluripotency and genetic and epigenetic programs of differentiation in mouse primordial germ cells in vivo and in vitro. *PLoS One* 4, e5654.
- Holetz, F.B., Correa, A., Avila, A.R., Nakamura, C.V., Krieger, M.A., Goldenberg, S., 2007. Evidence of P-body-like structures in *Trypanosoma cruzi*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 356, 1062–1067.
- Hugo, E.R., Brandebourg, T.D., Comstock, C.E., Gersin, K.S., Sussman, J.J., Ben-Jonathan, N., 2006. LS14: a novel human adipocyte cell line that produces prolactin. *Endocrinology* 147, 306–313.
- Ivanova, N.B., Dimos, J.T., Schaniel, C., Hackney, J.A., Moore, K.A., Lemischka, I.R., 2002. A stem cell molecular signature. *Science* 298, 601–604.
- Jash, A., Yun, K., Sahoo, A., So, J.S., Im, S.H., 2012. Looping mediated interaction between the promoter and 3' UTR regulates type II collagen expression in chondrocytes. *PLoS One* 7, e40828.
- Jeong, J.A., Ko, K.M., Bae, S., Jeon, C.J., Koh, G.Y., Kim, H., 2007a. Genome-wide differential gene expression profiling of human bone marrow stromal cells. *Stem Cells* 25, 994–1002.
- Jeong, J.A., Ko, K.M., Park, H.S., Lee, J., Jang, C., Jeon, C.J., Koh, G.Y., Kim, H., 2007b. Membrane proteomic analysis of human mesenchymal stromal cells during adipogenesis. *Proteomics* 7, 4181–4191.
- Ji, Z., Lee, J.Y., Pan, Z., Jiang, B., Tian, B., 2009. Progressive lengthening of 3' untranslated regions of mRNAs by alternative polyadenylation during mouse embryonic development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 7028–7033.
- Kawai, M., Green, C.B., Lecka-Czernik, B., Douris, N., Gilbert, M.R., Kojima, S., Ackert-Bicknell, C., Garg, N., Horowitz, M.C., Adamo, M.L., Clemmons, D.R., Rosen, C.J., 2010. A circadian-regulated gene, Nocturnin, promotes adipogenesis by stimulating PPAR-gamma nuclear translocation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 10508–10513.
- Keene, J.D., 2007. RNA regulons: coordination of post-transcriptional events. *Nat. Rev. Genet.* 8, 533–543.
- Keene, J.D., 2010. The global dynamics of RNA stability orchestrates responses to cellular activation. *BMC Biol.* 8, 95.
- Kheterpal, I., Ku, G., Coleman, L., Yu, G., Ptitsyn, A.A., Floyd, Z.E., Gimble, J.M., 2011. Proteome of human subcutaneous adipose tissue stromal vascular fraction cells versus mature adipocytes based on DIGE. *J. Proteome Res.* 10, 1519–1527.
- Kim, J., Choi, Y.S., Lim, S., Yea, K., Yoon, J.H., Jun, D.J., Ha, S.H., Kim, J.W., Kim, J.H., Suh, P.G., Ryu, S.H., Lee, T.G., 2010. Comparative analysis of the secretory proteome of human adipose stromal vascular fraction cells during adipogenesis. *Proteomics* 10, 394–405.
- Kolle, G., Shepherd, J.L., Gardiner, B., Kassahn, K.S., Cloonan, N., Wood, D.L., Nourbakhsh, E., Taylor, D.F., Wani, S., Chy, H.S., Zhou, Q., McKernan, K., Kuersten, S., Laslett, A.L., Grimmond,

- S.M., 2011. Deep-transcriptome and ribonome sequencing redefines the molecular networks of pluripotency and the extracellular space in human embryonic stem cells. *Genome Res.* 21, 2014–2025.
- Kratchmarova, I., Blagoev, B., Haack-Sorensen, M., Kassem, M., Mann, M., 2005. Mechanism of divergent growth factor effects in mesenchymal stem cell differentiation. *Science* 308, 1472–1477.
- Liao, Y., Smith, G.K., Shi, W., 2013. The Subread aligner: fast, accurate and scalable read mapping by seed-and-vote. *Nucleic Acids Res.* 41 (10), e108.
- Lundberg, E., Fagerberg, L., Klevebring, D., Matic, I., Geiger, T., Cox, J., Algenas, C., Lundberg, J., Mann, M., Uhlen, M., 2010. Defining the transcriptome and proteome in three functionally different human cell lines. *Mol. Syst. Biol.* 6, 450.
- McAveney, K.M., Gimble, J.M., Yu-Lee, L., 1996. Prolactin receptor expression during adipocyte differentiation of bone marrow stroma. *Endocrinology* 137, 5723–5726.
- Menssen, A., Haupt, T., Sittlinger, M., Delorme, B., Charbord, P., Ringe, J., 2011. Differential gene expression profiling of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells during adipogenic development. *BMC Genomics* 12, 461.
- Mignone, F., Gissi, C., Liuni, S., Pesole, G., 2002. Untranslated regions of mRNAs. *Genome Biol.* 3 (REVIEWS0004).
- Mittal, N., Roy, N., Babu, M.M., Janga, S.C., 2009. Dissecting the expression dynamics of RNA-binding proteins in posttranscriptional regulatory networks. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 20300–20305.
- Molina, H., Yang, Y., Ruch, T., Kim, J.W., Mortensen, P., Otto, T., Nalli, A., Tang, Q.Q., Lane, M.D., Chaerkady, R., Pandey, A., 2009. Temporal profiling of the adipocyte proteome during differentiation using a five-plex SILAC based strategy. *J. Proteome Res.* 8, 48–58.
- Nambu-Wakao, R., Fujitani, Y., Masuho, Y., Muramatu, M., Wakao, H., 2000. Prolactin enhances CCAAT enhancer-binding protein-beta (C/EBP beta) and peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma) messenger RNA expression and stimulates adipogenic conversion of NIH-3 T3 cells. *Mol. Endocrinol.* 14, 307–316.
- Nielsen, A.E., Bohr, A., Penkova, M., 2007. The balance between life and death of cells: roles of metallothioneins. *Biomark. Insights* 1, 99–111.
- Preiss, T., Baron-Benhamou, J., Ansoerge, W., Hentze, M.W., 2003. Homodirectional changes in transcriptome composition and mRNA translation induced by rapamycin and heat shock. *Nat. Struct. Biol.* 10, 1039–1047.
- Ptitsyn, A.A., Gimble, J.M., 2007. Analysis of circadian pattern reveals tissue-specific alternative transcription in leptin signaling pathway. *BMC Bioinformatics* 8 (Suppl. 7), S15.
- Rebelatto, C.K., Aguiar, A.M., Moretao, M.P., Senegaglia, A.C., Hansen, P., Barchiki, F., Oliveira, J., Martins, J., Kuligowski, C., Mansur, F., Christofis, A., Amaral, V.F., Brofman, P.S., Goldenberg, S., Nakao, L.S., Correa, A., 2008. Dissimilar differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, and adipose tissue. *Exp. Biol. Med.* (Maywood) 233, 901–913.
- Robinson, M.D., McCarthy, D.J., Smyth, G.K., 2010. edgeR: a bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* 26, 139–140.
- Sampath, P., Pritchard, D.K., Pabon, L., Reinecke, H., Schwartz, S.M., Morris, D.R., Murry, C.E., 2008. A hierarchical network controls protein translation during murine embryonic stem cell self-renewal and differentiation. *Cell Stem Cell* 2, 448–460.
- Sandberg, R., Neilson, J.R., Sarma, A., Sharp, P.A., Burge, C.B., 2008. Proliferating cells express mRNAs with shortened 3′ untranslated regions and fewer microRNA target sites. *Science* 320, 1643–1647.
- Sharova, L.V., Sharov, A.A., Nedozov, T., Piao, Y., Shaik, N., Ko, M.S., 2009. Database for mRNA half-life of 19 977 genes obtained by DNA microarray analysis of pluripotent and differentiating mouse embryonic stem cells. *DNA Res.* 16, 45–58.
- Song, L., Webb, N.E., Song, Y., Tuan, R.S., 2006. Identification and functional analysis of candidate genes regulating mesenchymal stem cell self-renewal and multipotency. *Stem Cells* 24, 1707–1718.
- Stewart, W.C., Baugh Jr., J.E., Floyd, Z.E., Stephens, J.M., 2004. STAT 5 activators can replace the requirement of FBS in the adipogenesis of 3 T3-L1 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 324, 355–359.
- Tebaldi, T., Re, A., Viero, G., Pegoretti, I., Passerini, A., Blanzieri, E., Quattrone, A., 2012. Widespread uncoupling between transcriptome and translome variations after a stimulus in mammalian cells. *BMC Genomics* 13, 220.
- Viangchareun, S., Servel, N., Feve, B., Freemark, M., Lombes, M., Binart, N., 2008. Prolactin receptor signaling is essential for perinatal brown adipocyte function: a role for insulin-like growth factor-2. *PLoS One* 3, e1535.
- Vigilanza, P., Aquilano, K., Baldelli, S., Rotilio, G., Ciriolo, M.R., 2011. Modulation of intracellular glutathione affects adipogenesis in 3T3-L1 cells. *J. Cell. Physiol.* 226, 2016–2024.
- Washburn, M.P., Koller, A., Oshiro, G., Ulaszek, R.R., Plouffe, D., Deciu, C., Winzler, E., Yates III, J.R., 2003. Protein pathway and complex clustering of correlated mRNA and protein expression analyses in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 3107–3112.
- Yang, S.R., Rahman, I., Trosko, J.E., Kang, K.S., 2012. Oxidative stress-induced biomarkers for stem cell-based chemical screening. *Prev. Med.* 54, S42–S49 (Suppl.).
- Young, M.D., Wakefield, M.J., Smyth, G.K., Oshlack, A., 2010. Gene ontology analysis for RNA-seq: accounting for selection bias. *Genome Biol.* 11, R14.
- Zhang, H., Lee, J.Y., Tian, B., 2005. Biased alternative polyadenylation in human tissues. *Genome Biol.* 6, R100.
- Zhang, Q., Ramllee, M.K., Brunmeir, R., Villanueva, C.J., Halperin, D., Xu, F., 2012. Dynamic and distinct histone modifications modulate the expression of key adipogenesis regulatory genes. *Cell Cycle* 11, 4310–4322.