

Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**

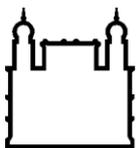
**INSTITUTO CARLOS CHAGAS**  
**Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia**

**IDENTIFICAÇÃO DE MICRORNAS ASSOCIADOS AOS POLISSOMOS DURANTE  
A DIFERENCIAÇÃO ADIPOGÊNICA DAS CÉLULAS-TRONCO DERIVADAS DO  
TECIDO ADIPOSEO HUMANO**

**ANA CAROLINA ORIGA ALVES**

**CURITIBA/PR**

**2014**



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**

**INSTITUTO CARLOS CHAGAS**  
**Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia**

**ANA CAROLINA ORIGA ALVES**

**IDENTIFICAÇÃO DE MICRORNAS ASSOCIADOS AOS POLISSOMOS DURANTE  
A DIFERENCIAÇÃO ADIPOGÊNICA DAS CÉLULAS-TRONCO DERIVADAS DO  
TECIDO ADIPOSEO**

Dissertação apresentada ao Instituto Carlos Chagas como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biociências e Biotecnologia

**Orientador (es):** Prof. Dr. Bruno Dallagiovanna  
Prof. Dr. Hugo Naya

**CURITIBA/PR**

2014

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

A474 Alves, Ana Carolina Origa

Identificação de microRNAs associados aos polissomos durante a diferenciação adipogênica das células-tronco derivadas do tecido adiposo / Ana Carolina Origa Alves. – Curitiba, 2014.

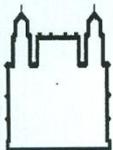
xiii, 85 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Carlos Chagas, Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia, 2014.

Bibliografia: f. 64-84

1. MicroRNAs. 2. Regulação pós-transcricional. 3. Polissomos. 4. Células-tronco de tecido adiposo. 5. Diferenciação adipogênica. I. Título.

CDD 572.88



Ministério da Saúde  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
Instituto Carlos Chagas  
Coordenação Curso de Pós-Graduação em Biociências e  
Biotecnologia



Ata da Sessão Pública de exame de dissertação para obtenção do grau de **Mestre** em  
Biociências e Biotecnologia.

Aos 06 dias do mês de março de dois mil e quatorze, às nove horas e trinta minutos, nas dependências do Instituto Carlos Chagas/Fiocruz Paraná, reuniu-se a Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia, composta pelos Professores: Dr. Fabricio Kleryton Marchini, Dr. Luiz Gustavo Morello e Dra. Carmen Rebelatto, com a finalidade de julgar a dissertação do(a) candidato(a) **Ana Carolina Origa Alves**, intitulada: **"IDENTIFICAÇÃO DE MICRORNAS ASSOCIADOS AOS POLISSOMOS DURANTE A DIFERENCIAÇÃO CELULAR EM CÉLULAS-TRONCO DERIVADAS DE TECIDO ADIPOSEO"**, para obtenção do grau de Mestre em Biociências e Biotecnologia. O(a) candidato(a) teve até 45 (quarenta e cinco) minutos para a apresentação, e cada examinador teve um tempo máximo de arguição de 30 (trinta) minutos, seguido de 30 (trinta) minutos para resposta do(a) candidato(a) ou de 60 (sessenta) minutos quando houve diálogo na arguição. O desenvolvimento dos trabalhos seguiu o roteiro de sessão de defesa, estabelecido pela Coordenação do Programa, com abertura, condução e encerramento da sessão solene de defesa feito pelo Presidente **Dr. Fabricio Kleryton Marchini**. Após haver analisado o referido trabalho e arguido o(a) candidato(a), os membros da banca examinadora deliberaram pela *aprovação* ".....", habilitando-o(a) ao título de Mestre em Biociências e Biotecnologia, condicionada à implementação das correções sugeridas pelos membros da Banca Examinadora e ao cumprimento integral das exigências estabelecidas no Regimento Interno deste Programa de Pós-Graduação.

*Fabricio Marchini*

**Prof. Dr. Fabricio Kleryton Marchini**  
ICC / FIOCRUZ

*Luiz Gustavo Morello*

**Prof. Dr. Luiz Gustavo Morello**  
ICC / FIOCRUZ

*Carmen L. K. Rebelatto*

**Prof. Dra. Carmen Rebelatto**  
PUC / PR

CONFERIDO COM O ORIGINAL  
*AMM*  
**Andrea de Mesquita Hartke**  
Analista de Gestão em Saúde  
Matr. SIAPE 1699775  
Instituto Carlos Chagas - Fiocruz PR

Instituto Carlos Chagas – ICC – Fiocruz - PR  
Rua Prof. Algacyr Munhoz Mader, 3775 – CIC  
CEP 81350 010 – Curitiba – Paraná – Brasil. Tel: +55 41 3316-3230

## AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Osvaldo e Edna, por todo amor, carinho, apoio e paciência. Pela presença e suporte oferecido, que me permitiu chegar até aqui. A minha irmã Amanda, por ter se tornado minha companheira, ouvinte paciente e amiga.

Aos meus sempre presentes preferidos Laís, Maria Rosa, Fabiano, Fernanda, Tiago pela companhia, conselhos e apoio. Ao Marcos, pelo cuidado, preocupação, sinceridade e, principalmente, paciência. As minhas amigas Carla, Liliane, Gisele, Luana, Fabi e Priscyla que apesar da distância sabem que nada mudou.

Ao meu orientador Bruno, pelo apoio profissional e pessoal, por pensar na formação completa dos alunos, pela grande ajuda no desenvolvimento do projeto, no estímulo à pesquisa e na discussão de temas além do projeto. À Fabíola por toda a ajuda na bancada e nas discussões em todos os momentos em que precisei. À Patrícia pela grande ajuda com técnicas e análise de resultados. As minhas companheiras de mestrado, Anny, Eliza e Bruna, por todas as discussões e apoio psicológico. A a-mi-ga Bruna, novamente, por acompanhar passo a passo o andamento do projeto, pela ajuda com a microscopia, e pelos planos. À Ana Luiza e ao Christian pelo acompanhamento e ideias nas jornadas de pós-graduação. Aos demais pesquisadores e colegas do ICC, Alejandro, Marco, Addeli, Alessandra, Ana Paula, Andressa, Anny, Axel, Beth, Crisciele, Eloise, Jaiesa, Saloe e Thamile pela ajuda com os artigos, apresentações e também pelos momentos de descontração.

À Lucía Spangenberg e ao Hugo Naya, da Unidad de Bioinformática do Institut Pasteur de Montevideo, pela fundamental ajuda com a análise dos dados.

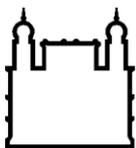
Ao pessoal do preparo, Nilson, Silvio, Sibelli, Tânia e Vanessa, pelo preparo de soluções e material.

Ao grupo do Laboratório Experimental de Cultivo Celular da PUC-PR pelo isolamento e purificação das células utilizadas neste trabalho.

Aos funcionários do Instituto Carlos Chagas pela ajuda na formação acadêmica e apoio no desenvolvimento dos projetos.

Às instituições que apoiaram financeiramente, Fiocruz, Fundação Araucária, CNPq e CAPES.

Enfim, a todos que me ajudaram de alguma forma a realizar este projeto, muito obrigada!!



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**

## **INSTITUTO CARLOS CHAGAS**

### **IDENTIFICAÇÃO DE MICRORNAS ASSOCIADOS AOS POLISSOMOS DURANTE A DIFERENCIAÇÃO ADIPOGÊNICA DAS CÉLULAS-TRONCO DERIVADAS DO TECIDO ADIPOSEO**

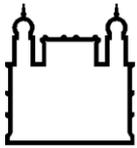
#### **RESUMO**

#### **DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Ana Carolina Origa Alves**

Células-tronco (CT) são células autorrenováveis e não especializadas, com o potencial de diferenciação multidirecional. Células-tronco de tecido adiposo (CT-TA) são um tipo de células-tronco adultas multipotentes, de fácil isolamento e cultura. Nos últimos anos, CT-TA têm mostrado grande potencial para engenharia de tecidos e terapias baseadas em células. Apesar do interesse em aplicações clínicas deste tipo de célula, os mecanismos moleculares fundamentais a sua autorrenovação e diferenciação ainda não foram completamente elucidados. miRNAs são pequenos RNAs não-codificadores, com 21-25 nucleotídeos de comprimento, que tem se mostrado como importantes reguladores da expressão gênica em nível pós-transcricional. miRNAs podem atuar por meio de clivagem direta de mRNAs alvo ou através da repressão da tradução, dependendo da complementaridade entre o mRNA e a sequência do miRNA. Perfis de miRNAs de CT adultas sugerem que estes pequenos reguladores podem contribuir para as propriedades intrínsecas das CT. Para entender melhor os mecanismos de ação dos miRNAs em CT-TA, miRNAs associados ao polissomos de CT-TA foram isolados durante a diferenciação celular. Procurando miRNAs reguladores das etapas iniciais de diferenciação ou envolvidos na autorrenovação de CT, as culturas de células foram induzidas a diferenciação adipogênica durante 72 h. O lisado celular foi submetido à ultracentrifugação em gradiente de sacarose para separar monossomos, polissomos e fração livre de ribossomos. O RNA total associado aos ribossomos foi extraído, os fragmentos de RNA (<200 nt) foram enriquecidos e a seleção de tamanho de fragmentos de RNA apropriados ocorreu durante a preparação das amostras para o sequenciamento em larga escala. As amostras foram sequenciadas utilizando a plataforma SOLiD™, e as frações polissomais de culturas Não Induzida e 72h de indução foram comparadas e dezesseis miRNAs foram identificados. miRNAs encontrados em um trabalho prévio do grupo foram adicionados a esses dados, e sete miRNAs (hsa-miR-29b-1-5p, hsa-miR-29c-5, hsa-miR-30c-5p, hsa-miR-143-5p, hsa-miR-210-3p, hsa-miR-210-5p e hsa-miR-6775-5p) foram testados por RT-qPCR para confirmar a expressão diferencial, sendo que um deles (hsa-miR-210-5p) mostrou diferença estatisticamente significativa.

Palavras-chave: microRNAs. Regulação pós-transcricional. Polissomos. Células-tronco de tecido adiposo. Diferenciação adipogênica.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO CARLOS CHAGAS

### IDENTIFICATION OF POLYSOME-ASSOCIATED MICRORNAS DURING CELL DIFFERENTIATION OF STEM CELL DERIVED OF ADIPOSE TISSUE

#### ABSTRACT

#### DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**Ana Carolina Origa Alves**

Stem cells (SC) are self-renewing and non-specialized cells with the potential of multi-directional differentiation. Adipose Stem Cell (ADSC) is a type of multipotent adult stem cell, easy to isolate and culture. In the past few years, hADSCs have shown great potential for tissue engineering and cell-based therapies. Despite the interest in clinical applications of this kind of cell, the molecular mechanisms underlying their self-renewal and differentiation have yet to be fully elucidated. miRNAs are small noncoding RNAs, 21-25 nucleotides in length, that have been shown to be important regulators of posttranscriptional gene expression. miRNAs can act through direct cleavage of target mRNAs or through translational repression, depending of complementary pairing between the mRNA and miRNA sequence. miRNA profile of adult SCs suggests that these small regulators can contribute to the intrinsic properties of SCs. To better understand the mechanisms of action of miRNAs in hADSCs, we isolate miRNAs associated to polysomes of hADSC during cellular differentiation. Looking for miRNAs regulators of early steps of differentiation or involved in ADSC self-renewing, cell cultures were induced to adipogenic differentiation for 72 h. The cell lysate was submitted to ultracentrifugation on a sucrose gradient to separate monosomes, polysomes and the fraction free of ribosomes. The total RNA associated to ribosomes was extracted and the RNA fragments (<200 nt) were enriched and the size selection of appropriate RNA fragments occurred during the preparation of samples for deep sequencing. The samples were sequenced using SOLiD™ platform, and polysomal fraction of cell cultures non induced and 72h of induction were compared and sixteen miRNAs were identified. miRNAs found in a previous work of our group were added to these data and seven miRNAs (hsa-miR-29b-1-5p, hsa-miR-29c-5, hsa-miR-30c-5p, hsa-miR-143-5p, hsa-miR-210-3p, hsa-miR-210-5p e hsa-miR-6775-5p) were tested by RT-qPCR to confirm differential expression, and one of them (hsa-miR-210-5p) showed statistical significant difference.

Keywords: microRNAs. Posttranscriptional regulation. Polysomes. Adipose stem cells. Adipogenic differentiation.

## LISTA DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| Figura 1.1 – Células-tronco diferem quanto a sua potencialidade.....  | 14 |
| Figura 1.2 - Potencial multipotente das células-tronco mesenquimais.....  | 16 |
| Figura 1.3 – Envolvimento dos miRNAs nos processos de autorrenovação e diferenciação de células-tronco.....               | 19 |
| Figura 1.4 – Biogênese dos microRNAs.....   | 23 |
| Figura 5.1 – Padronização da extração de pequenos RNAs associados aos polissomos.....                                     | 39 |
| Figura 5. 2 - Padronização da purificação de miRNAs.....  | 41 |
| Figura 5.3 – Perfis polissomais, de células submetidas à raspagem, gerados pelo fracionador de gradientes ISCO.....       | 41 |
| Figura 5.4 – Quantificação das frações monossomal e polissomal.....   | 42 |
| Figura 5.5 – Fração polissomal NI submetida ao sistema fracionador flashPAGE™ .....                                       | 43 |
| Figura 5.6 – Avaliação da extração de pequenos RNAs total com mirVana™.....   | 44 |
| Figura 5. 7 – Avaliação da extração de pequenos RNAs total com TRIzol®.....   | 45 |
| Figura 5.8 - Perfis polissomais, de culturas tripsinizadas, gerados pelo fracionador de gradientes ISCO.....              | 47 |
| Figura 5.9 – Perfil polissomal gerado pelo fracionamento manual dos gradientes de sacarose.....                           | 48 |
| Figura 5.10 – CTMs induzidas à diferenciação adipogênica por 72h.....   | 49 |
| Figura 5.11 – Diferenciação adipogênica de CTMs por 14 dias.....  | 50 |
| Figura 5.12 – Pré-purificação dos pequenos RNAs pelo método de extração do gel de poliacrilamida.....                     | 53 |
| Figura 5.13 – microRNAs expressos em CTMs.....  | 59 |
| Figura 5.14 – Expressão de miRNAs livres ou associados aos ribossomos em CTMs submetidas à diferenciação adipogênica..... | 60 |
| Figura 5.15 – Funções relacionadas aos miRNAs expressos de CTMs.....  | 64 |

## LISTA DE QUADROS

|   |    |
|---|----|
| Quadro 4.1 – Oligonucleotídeos Foward iniciadores utilizados na qPCR.....                                     | 37 |
| Quadro 5.1 – Quantificação dos RNAs menores que 200 nt enriquecidos com mirVana.....                          | 51 |
| Quadro 5.2 – Quantificação do material resultante da amplificação do cDNA (banda B) utilizando Qubit.....     | 52 |
| Quadro 5.3 – Quantificação do material resultante da amplificação do cDNA (banda A e C) utilizando Qubit..... | 53 |
| Quadro 5.4 – Quantificação do material resultante da amplificação do cDNA (banda B) utilizando Qubit.....     | 54 |
| Quadro 5.5 – Dados obtidos do sequenciamento das frações associadas aos polissomos (lâmina 1).....            | 56 |
| Quadro 5.6 – Dados obtidos do sequenciamento das frações associadas aos polissomos (lâmina 2).....            | 57 |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|                 |   |
|-----------------|---|
| ADSC            | - Adipose Stem Cell   |
| ATP             | - Adenosina Trifosfato (Adenosine Triphosphate)                                 |
| Ago             | - Argonauta   |
| antimiR         | - antimiRNA   |
| cDNA            | - Ácido Desoxirribonucléico Complementar (Complementary Desoxiribonucleic Acid) |
| CO <sub>2</sub> | - Gás carbônico ou Dióxido de carbono   |
| CT              | - Células-tronco  |
| CT-TA           | - Células-tronco de Tecido Adiposo  |
| CTA             | - Células-tronco Adultas  |
| CTE             | - Células-tronco Embrionárias   |
| CTM             | - Células-tronco Mesenquimal  |
| CTM-TA          | - Células-tronco Mesenquimal de Tecido Adiposo                                  |
| DAPI            | - 4,6-diamidino-2-fenilindol  |
| DMEM:F12        | - Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12                       |
| DGCR8           | - DiGeorge Critical Region 8  |
| EDTA            | - Ácido Etilenodiaminotetracético   |
| Exp5            | - Exportina-5   |
| Gorilla         | - Gene Ontology enrichment analysis visualization tool                          |
| HCl             | - Ácido Clorídrico  |
| IBMX            | - 3-isobutil-1-metilxantina   |
| iPSC            | - Célula-tronco de pluripotência induzida                                       |
| MCI             | - Massa Celular Interna   |
| miRNA           | - microRNA  |
| mRNA            | - Ácido Ribonucléico mensageiro (messenger Ribonucleic Acid)                    |
| NaOH            | - Hidróxido de sódio  |
| nt              | - Nucleotídeo   |
| p               | - Passagem  |
| PACT            | - Protein Activator of PKB  |
| PAZ             | - PIWI-Argonaute-Zwille   |
| PBS             | - Solução Salina Fosfatada (Phosphated Buffer Solution)                         |
| PF              | - Paraformaldeído   |
| PIWI            | - P-element-induced Wimpy Testes  |
| pre-miRNA       | - microRNA precursor  |
| pri-miRNA       | - microRNA primário   |
| qPCR            | - PCR quantitativo (quantitative Polymerase Chain Reaction)                     |
| RBD-            | - Proteína de ligação ao RNA (RNA Binding Protein)                              |
| REVIGO          | - Reduce Visualize Gene Ontology  |
| RISC            | - Complexo de silenciamento induzido por RNA (RNA-Induced Silencing Complex)    |
| RLC             | - Complexo de Carregamento de RISC (RISC Loading Complex)                       |
| RNA             | - Ácido Ribonucléico (Ribonucleic Acid)   |
| RNase           | - Ribonuclease  |
| SFB             | - Soro Fetal Bovino   |
| SC              | - Stem Cell   |
| TA              | - Tecido Adiposo  |
| TNF             | - Fator de Necrose Tumoral (Tumour Necrosis Factor)                             |
| TRBP            | - Tar RNA Binding Protein   |

|      |  |
|------|--|
| Tris | - Hidroximetil aminometano (Hydroxymethyl aminomethane)        |
| tRNA | - Ácido Ribonucléico transportador (transfer Ribonucleic Acid) |
| UV   | - Ultravioleta   |
| VN   | - Vermelho Nilo  |

## LISTA DE SÍMBOLOS

|                 |   |
|-----------------|---|
| %               | - percentual  |
| cm <sup>2</sup> | - centímetro quadrado   |
| h               | - hora(s)   |
| kb              | - 1000 nucleotídeos em RNA ou 1000 pares de nucleotídeos em DNA |
| M               | - molar ou mol/L  |
| mg/ml           | - miligrama por mililitro                                       |
| min             | - minuto(s)   |
| mA              | - miliampère  |
| ml              | - mililitro   |
| mM              | - milimolar   |
| ng              | - nanograma   |
| nM              | - nanomolar   |
| °C              | - graus Celsius   |
| p               | - significância   |
| pb              | - pares de base   |
| pg              | - picograma   |
| pH              | - potencial hidrogeniônico                                      |
| rpm             | - rotações por minutos  |
| s               | - segundo(s)  |
| U/ml            | - unidades por mililitro  |
| U/μl            | - unidades por microlitro                                       |
| UV              | - Ultravioleta  |
| μg              | - micrograma  |
| μl              | - microlitro  |
| μm              | - micrômetro  |
| μM              | - micromolar  |
| V               | - Volt  |
| x g             | - multiplicação pela aceleração gravitacional                   |
| ®               | - marca registrada  |
| ™               | - trademark   |

## SUMÁRIO

|   |    |
|---|----|
| <b>1. INTRODUÇÃO</b> .....  | 14 |
| 1.1. CÉLULAS-TRONCO .....   | 14 |
| 1.2. MicroRNAs EM CÉLULAS-TRONCO .....  | 18 |
| 1.3. MicroRNAs.....   | 21 |
| <b>2. JUSTIFICATIVA</b> .....   | 28 |
| <b>3. OBJETIVOS</b> .....   | 30 |
| 3.1. OBJETIVO GERAL.....  | 30 |
| 3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....  | 30 |
| <b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....  | 30 |
| 4.1. OBTENÇÃO E CULTIVO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DO<br>TECIDO ADIPOSEO .....  | 31 |
| 4.2. DIFERENCIAÇÃO ADIPOGÊNICA .....  | 32 |
| 4.2.1. Indução adipogênica <i>in vitro</i> .....  | 32 |
| 4.2.2. Marcação dos lóculos lipídicos.....  | 32 |
| 4.2.3. Quantificação das células marcadas com Vermelho Nilo.....  | 33 |
| 4.3. ISOLAMENTO DOS PEQUENOS RNAs ASSOCIADOS AOS<br>RIBOSSOMOS.....   | 33 |
| 4.3.1. Gradiente de densidade .....   | 33 |
| 4.3.2. Extração de RNA .....  | 34 |
| 4.3.3. Isolamento de pequenos RNAs com mirVana™ .....   | 34 |
| 4.3.4. Isolamento de pequenos RNAs por purificação em gel de poliacrilamida....   | 35 |
| 4.4. SEQUENCIAMENTO EM LARGA ESCALA DE PEQUENOS RNAs.....   | 35 |
| 4.4.2. Preparação da biblioteca para sequenciamento .....   | 35 |
| 4.5. ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE miRNAs POR PCR QUANTITATIVA.....   | 36 |
| 4.5.1. Reação de adição de cauda poli-A .....   | 36 |
| 4.5.2. Síntese do DNA complementar.....   | 36 |
| 4.5.3. qPCR.....  | 37 |
| 4.5.4. Análise do tamanho dos miRNAs expressos .....  | 37 |
| <b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....  | 38 |
| 5.1. PADRONIZAÇÃO.....  | 38 |
| 5.1.1. Isolamento e enriquecimento de pequenos RNAs associados aos polissomos<br>provenientes células obtidas por raspagem celular..... | 38 |

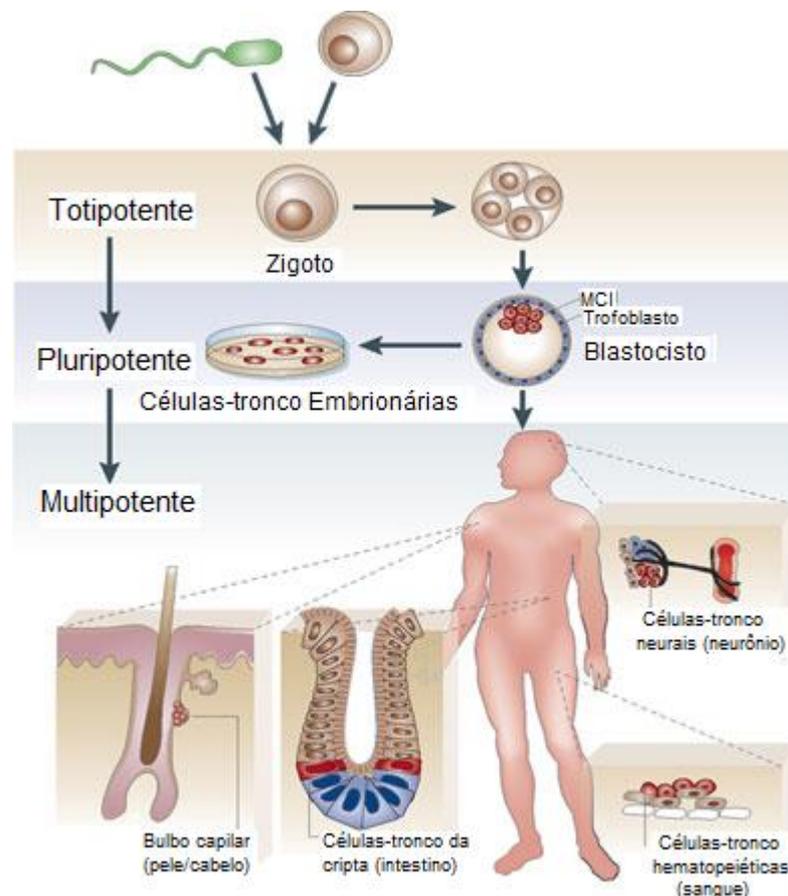
|           |  |           |
|-----------|--|-----------|
| 5.1.2     | Isolamento e enriquecimento de pequenos RNAs associados aos polissomos provenientes células obtidas por tripsinização celular..... | 45        |
| 5.2       | IDENTIFICAÇÃO DE MIRNAS NA DIFERENCIAÇÃO CELULAR .....   | 48        |
| 5.2.1     | Modelo de diferenciação celular: adipogênese .....   | 48        |
| 5.2.2     | Preparação das amostras para o sequenciamento em larga escala.....   | 51        |
| 5.2.3     | Sequenciamento em larga escala de pequenos RNAs associados aos polissomos .....  | 54        |
| 5.2.4     | Seleção de miRNAs para análise da expressão diferencial por qPCR .....   | 58        |
| 5.2.5     | Avaliação dos alvos de miRNAs encontrados em CTM .....   | 62        |
| <b>6.</b> | <b>CONCLUSÃO</b> .....   | <b>65</b> |
| <b>7.</b> | <b>REFERÊNCIAS</b> .....   | <b>66</b> |
| <b>8.</b> | <b>ANEXO</b> .....   | <b>85</b> |

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. CÉLULAS-TRONCO

Células-tronco (CT) são células não especializadas, autorrenováveis e que podem originar múltiplos tipos celulares de todos os tecidos do organismo (PASSIER e MUMMERY, 2003). A CT pode se dividir assimetricamente para produzir duas células-filhas com diferentes destinos: uma célula permanece com o potencial de célula-tronco e irá manter a população de células-tronco, enquanto a outra se torna um progenitor comprometido com a diferenciação (WATT e HOGAN, 2000).

As CT podem ser derivadas do embrião, constituindo as chamadas células-tronco totipotentes e as células-tronco embrionárias (CTE), ou do adulto, estas duas últimas chamadas de células-tronco adultas (CTA) ou somáticas (**Figura 1.1**).



**Figura 1.1 – Células-tronco diferem quanto a sua potencialidade.** Células-tronco Totipotentes são encontradas nas primeiras divisões celulares após a fecundação, na fase de mórula. CTE podem ser obtidas da massa celular interna (MCI) de blastocistos, e são consideradas pluripotentes, ou seja, são capazes de originar todos os tipos celulares do organismo, exceto anexos embrionários. Já as CTA são consideradas multipotentes, pois sua capacidade de diferenciação é mais restrita, estão presentes como reservas nos órgãos e tecidos, como sangue, intestino, cabelo, tecido nervoso, entre outros.

Fonte: Adaptado de ECKFELDT *et al.*, 2005.

Células-tronco Totipotentes são encontradas nas primeiras divisões celulares após a fecundação, na fase de mórula, essas células são capazes de originar todos os tipos celulares, incluindo os anexos embrionários.

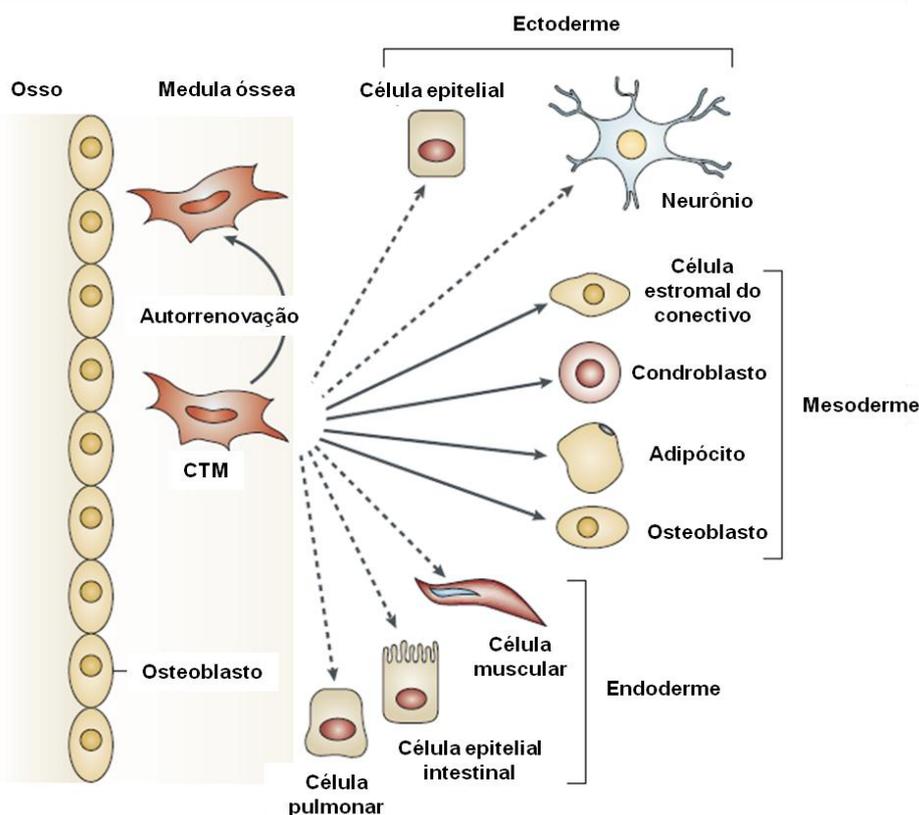
As CTE são derivadas da massa celular interna do blastocisto (THOMSON *et al.*, 1998). Essas células possuem a vantagem de ser pluripotentes, ou seja, são capazes de formar todos os tipos celulares do embrião e tecidos do corpo, exceto anexos embrionários. Porém, apresentam restrições éticas e a possibilidade de formação de teratomas pós-transplante (TROUNSON, 2002). Para eliminar questões éticas e possíveis rejeições, as células-tronco de pluripotência induzida, ou iPSC (*Induced Pluripotent Stem Cells*), tornaram-se uma opção interessante para a terapia celular, pois podem ser obtidas do próprio paciente. Takahashi e Yamanaka induziram a reprogramação de células adultas após a introdução de quatro fatores de transcrição na cultura: Oct3/4, Sox2, c-Myc e Klf4 (TAKAHASHI e YAMANAKA, 2006; TAKAHASHI *et al.*, 2007). Embora apresentem a vantagem do potencial pluripotente, iPSC já foram descritas como genomicamente instáveis, o que as torna um potencial formador de tumor (BUGANIM *et al.*, 2013).

As CTA apresentam uma capacidade mais restrita de diferenciação e são consideradas multipotentes. Estas células existem para assegurar que quando as células nos tecidos naturalmente expirem, elas possam ser eficientemente substituídas para proporcionar o balanço fisiológico no organismo. Além disso, servem como células de reserva para tecidos adultos comprometidos ou danificados que requerem regeneração, reparo ou expansão mais extensos (CAPLAN e DENNIS, 2006). Assim como as iPSC, as CTA não apresentam problemas éticos, pois podem ser obtidas de tecidos adultos e podem ser transplantadas de forma autóloga, contudo, diferente das iPSC, apresentam baixo potencial teratogênico, fazendo delas ferramentas atraentes para terapia celular.

Entre as diferentes populações de CTA estão as chamadas células-tronco mesenquimais (CTM). Este termo foi usado pela primeira vez para se referir a um hipotético precursor pós-natal, multipotente e autorrenovável derivado a partir de uma CTM embrionária inicial, com função na manutenção dos tecidos esqueléticos ou reparo de tecido no adulto (NOMBELA-ARRIETA *et al.*, 2011). As CTM estariam na parte superior da hierarquia das células mesenquimais e o progresso através de estágios distintos de diferenciação daria origem a tecidos funcionalmente maduros (CAPLAN, 1991).

CTM constituem uma população heterogênea de células que proliferam *in vitro*, aderentes ao plástico, fibroblastóides, com formato fusiforme. Estas células apresentam inibição do crescimento ao atingir a confluência, levando à necessidade de duas ou três passagens sucessivas para se obter grande quantidade de CTM altamente enriquecidas, com ausência de outros tipos celulares. Após várias trocas do meio de cultura e passagens, a maior parte das células contaminantes (por exemplo, células hematopoiéticas) é removida e a heterogeneidade remanescente da cultura diminui progressivamente (BYDLOWSKI *et al.*, 2009).

Já foi relatada a diferenciação *in vitro* de CTM em células das linhagens ectodérmica e endodérmica (**Figura 1.2**), porém isso poderia ser um artefato da cultura de células, ou até mesmo das condições de indução, em vez de representar um potencial intrínseco de diferenciação *in vivo* (DA SILVA MEIRELLES e NARDI, 2009). Contudo, Taran e colaboradores já relataram o potencial *in vivo* de diferenciação ectodérmica dessas células (TARAN *et al.*, 2011).



**Figura 1.2 - Potencial multipotente das células-tronco mesenquimais.** CTM podem ser obtidas de diversas fontes, como medula óssea e tecido adiposo, e são capazes de se diferenciar em células da linhagem mesodermal (setas sólidas), como adipócitos, osteoblastos e condroblastos. A diferenciação em células das linhagens endodermal e ectodermal (setas pontilhadas) ainda é controversa.  
 FONTE: Adaptado de UCCELLI *et al.*, 2008.

CTM derivadas de vários tecidos apresentam diferenças significativas na morfologia, potencial de diferenciação e expressão gênica, mesmo sob condições

idênticas de cultura (PANEPUCCI *et al.*, 2004; LEE *et al.*, 2004; KALTZ *et al.*, 2010). Em humanos, CTM e células semelhantes às CTM foram identificadas em vários tecidos, não só no indivíduo adulto (medula óssea, sangue, tecido adiposo, pele, dente decidual, músculo esquelético), como no feto (líquido amniótico, placenta) (BYDLOWSKI *et al.*, 2009). Em órgãos adultos, células com características de CTM foram associadas à vasculatura (CORSELLI *et al.*, 2010; SORRELL e CAPLAN, 2010). Evidências de tal associação surgiram a partir de observações iniciais que pericitos, que são definidos pela sua localização perivascular e morfologia, exibem características de CTM (HIRSCHI *et al.*, 1996). Culturas derivadas de pericitos são semelhantes às culturas de CTM em termos de morfologia, expressão de antígenos de superfície e potencial de diferenciação (FARRINGTON-ROCK *et al.*, 2004; DOHERTY *et al.*, 2004; COLLET *et al.*, 2005).

Populações de CTM não apresentam marcadores de superfície únicos, sendo que a classificação é feita com base em características morfológicas, em um conjunto de moléculas de superfície e no potencial de diferenciação em 3 linhagens mesodermiais. Estes marcadores de superfície são específicos somente em um contexto particular ou são redundantemente expressos em outras células (DA SILVA MEIRELLES *et al.*, 2008). Para diminuir a discrepância entre os resultados obtidos com CT de diferentes fontes e isoladas com diferentes metodologias, em 2006, a Sociedade Internacional para Terapia Celular propôs três critérios para definir as CTM (para os laboratórios baseados na investigação científica e de estudos pré-clínicos): 1) aderência ao plástico, quando mantidas em condições padrão de cultura usando frascos de cultura de tecidos; 2) expressão de antígenos específicos de superfície avaliado por citometria de fluxo,  $\geq 95\%$  da população deve expressar CD105, CD73 e CD90. Além disso, essas células devem ter baixa expressão dos marcadores ( $\leq 2\%$ ) CD45, CD34, CD14 ou CD11b, CD79a ou CD19 e HLA de classe II; 3) potencial de diferenciação multipotente, as células devem ser capazes de diferenciar em osteoblastos, adipócitos e condroblastos sob condições padrão de diferenciação *in vitro* (DOMINICI *et al.*, 2006).

A multipotencialidade das CTM, seu fácil isolamento e cultura, bem como seu alto potencial expansivo em cultura fazem destas células uma ferramenta terapêutica atraente capaz de ter um papel importante em uma ampla gama de aplicações clínicas no contexto das terapias celular e gênica (MINGUELL *et al.*, 2001).

Embora a ideia inicial tenha sido utilizar as CTM como fonte para terapias de reposição celular, suas atividades imunomoduladoras e tróficas têm profundo potencial de impacto terapêutico (BONFIELD *et al.*, 2010).

Estudos pré-clínicos com CTM demonstraram que ocorre recuperação funcional após injeção destas células mesmo sem diferenciação significativa em fenótipos apropriados para o tecido (BERARDI *et al.*, 2011). Hoje é aceito que as CTM estimulam a recuperação do ambiente e regeneração por meio da secreção de inúmeros fatores (WAGNER *et al.*, 2009). Os efeitos parácrinos gerados pelas CTM podem ser diversos, como: anti-apoptóticos, angiogênicos, de apoio ao crescimento e diferenciação de CT locais e células progenitoras, antifibrótico, imunomodulatório e quimiotático (DA SILVA e NARDI, 2009).

A migração preferencial para locais da lesão quando infundidas em modelos animais de lesão é conhecido do efeito quimiotático. Essa propriedade pode ser atribuída à expressão de fatores de crescimento, quimiocinas e receptores de matriz extracelular na superfície das CTM (DA SILVA MEIRELLES e NARDI, 2009). No caso de isquemia tecidual ou danos graves, CTM podem ser atraídas para o local (pela presença de  $INF\gamma$  e  $TNF\alpha$ ) e ali secretam fatores bioativos que auxiliam troficamente o processo de reparo e regeneração (CAPLAN e DENNIS, 2006).

A constatação de que estas células cultivadas têm propriedades imunomoduladoras vem de experimentos em que as células inibiram a proliferação de células T, B e NK *in vitro* (DA SILVA MEIRELLES e NARDI, 2009). Os produtos de secreção das CTM em locais de lesão reprimem fortemente a vigilância imunológica e inibem a destruição mediada por células B e células T no local da lesão. Esta imunoproteção serve para proteger o tecido de perder sua "tolerância" e, portanto, elimina questões de autoimunidade. Esta proposição leva a inferir que defeitos nestas capacidades imunomoduladoras das CTM podem resultar em doenças como a esclerose múltipla ou diabetes tipo I (DA SILVA MEIRELLES *et al.*, 2008).

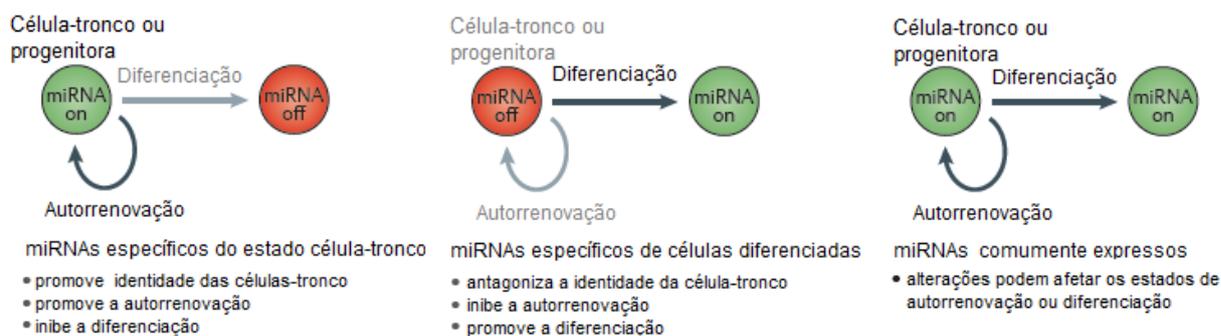
## 1.2. MicroRNAS NAS CÉLULAS-TRONCO

Várias vias de sinalização estão envolvidas no destino celular das células-tronco (CT), tanto mecanismos intercelulares como intracelulares. Mecanismos intracelulares incluem expressão gênica diferencial que pode ser controlada em

diversos níveis como: epigenética, transcrição, pós-transcrição, tradução e pós-tradução (GANGARAJU e LIN, 2009).

A importância da regulação pós-transcricional para a manutenção da pluripotência e capacidade de diferenciação de CTE foi sugerida após a deleção da enzima Dicer, essencial no processamento e maturação de microRNAs (miRNAs) (MURCHINSON *et al.*, 2005; KANELLOPOULOU *et al.*, 2005). CTE mutantes para essa enzima apresentam problemas na diferenciação, contudo, o fenótipo original pode ser reestabelecido quando a atividade de Dicer é recuperada (KANELLOPOULOU *et al.*, 2005).

Diversos estudos já demonstraram que as CTE e as células diferenciadas possuem perfis diferentes de miRNAs, o que contribui para suas diferentes propriedades características (**Figura 1.3**) (HOUBAVIY *et al.*, 2003; SUH *et al.*, 2004; BAR *et al.*, 2008; MORIN *et al.*, 2008; STADLER *et al.*, 2010).



**Figura 1.3 – Envolvimento dos miRNAs nos processos de autorrenovação e diferenciação das células-tronco.** Perfis de miRNAs, obtidos a partir de sequenciamento em larga escala, revelam que CT e células diferenciadas possuem populações diferentes de miRNAs. Em alguns casos os miRNAs são exclusivos de um dos estados, mas também pode ocorrer apenas diferença nos níveis de expressão entre os estados de autorrenovação e diferenciação. FONTE: Adaptado de SUN e LAI, 2013.

miRNAs estão envolvidos na autorrenovação e diferenciação das CT, afetando componentes que decidem o destino da célula, como os fatores de transcrição Oct4, Sox2, Nanog e Klf4 (TAY *et al.*, 2008; XU *et al.*, 2009). O miR-145, por exemplo, reprime diretamente Oct4, Sox2 e Klf4, inibindo a autorrenovação e induzindo a diferenciação das CTE em linhagens ectodérmicas e mesodérmicas (XU *et al.*, 2009). Já o miR-302-367 pode indiretamente induzir a expressão de Oct4, Sox2 e Nanog, por reduzir a expressão de genes de desenvolvimento (LIN *et al.*, 2011; ANOKYE-DANSO *et al.*, 2012). Além disso, Marson e colaboradores, 2008, demonstraram que miRNAs também podem ser ativados por Oct4, Sox2 e Nanog, sugerindo um *loop* autoregulatório em células pluripotentes (MARSON *et al.*, 2008).

O *cluster* miR-302-367, também está envolvido no processo de autorrenovação das CTE (BARROSO-DELJESUS *et al.*, 2008; MARSON *et al.*, 2008). A expressão desses miRNAs é aumentada em CTE, diminui após a diferenciação da célula, e é indetectável em células somáticas. A re-expressão do *cluster* miR-302-367 é suficiente para reprogramar células somáticas humanas e de camundongos ao estado pluripotente, confirmando o papel desses miRNAs na manutenção da autorrenovação das CTE (ANOKYE-DANSO *et al.*, 2011). Outros trabalhos também já relataram que a transfecção dos miRNAs miméticos maduros (miR-200c, miR-302, miR-369), ou a inibição dos miRNAs com antimRNAs (let-7), também levam à desdiferenciação de células somáticas, induzindo a proliferação das células e expressão de genes relacionados à pluripotência (MELTON *et al.*, 2010; MIYOSHI *et al.*, 2011).

Enquanto alguns miRNAs parecem estar envolvidos com a pluripotência, outros miRNAs estão diretamente associados a diferenciação das CTE em direção à linhagens especializadas (MATHIEU E RUOHOLA-BAKER, 2013). Os miRNAs miR-1 e miR-133 são essenciais para a diferenciação em cardiomiócitos, e o miR-9 promove a diferenciação em progenitores neurais (TAKAYA *et al.*, 2009; ZHAO *et al.*, 2009).

Embora diversos trabalhos já tenham relatado a associação dos miRNAs à autorrenovação de CTE, há menos evidências do envolvimento dos miRNAs na autorrenovação das CTA (CHOI *et al.*, 2013). Já foi observado que o padrão de expressão dos miRNAs em CTE e CTA é diferente. miRNAs associados a pluripotência, como miR-302a-b-c-d e miR-200c estão ausentes nas CTM (GOFF *et al.*, 2008; LAKSHMIPATHY *et al.*, 2007). Todavia, Guo e colaboradores, 2011, reuniram evidências da função dos miRNAs na diferenciação e autorrenovação das CTM (GUO *et al.*, 2011).

CTA residem em um microambiente, chamado nicho, que regula o balanço entre autorrenovação, diferenciação e quiescência (MATHIEU e RUOHOLA-BAKER, 2013). miRNAs são importantes na manutenção e diferenciação das populações das CTA, conseqüentemente, reguladores da homeostase dos tecidos (MATHIEU e RUOHOLA-BAKER, 2013).

Embora a quantidade de miRNAs associados à autorrenovação das CTA seja pequena, muitos miRNAs já foram associados aos diferentes tipos celulares, terminalmente diferenciados ou em diferenciação. Vários exemplos já foram relatados em células sanguíneas, musculares, neurais, cardíacas, adiposas, ósseas,

entre outras (GANGARAJU e LIN, 2009; ORTEGA *et al.*, 2010; VASILATOU *et al.*, 2010; SMALL e OLSON, 2011; VAN ROOIJ e OLSON, 2012; HILTON *et al.*, 2013; SUN e LAI, 2013).

Diversos miRNAs têm níveis de expressão muito baixos em CT os quais aumentam durante a diferenciação, sendo que em outros casos o contrário também pode ocorrer e os níveis de miRNAs encontram-se diminuídos após a diferenciação. O uso dessas informações pode ser valioso no contexto da terapia celular e no tratamento das doenças. A manipulação da expressão dos miRNAs pode aumentar a quantidade de células de interesse produzidas em cultura, já que pode regular os processos de autorrenovação e senescência das células.

A regulação da expressão dos miRNAs tem se mostrado promissora também no campo de terapia contra o câncer. Alguns miRNAs encontram-se aumentados em células cancerígenas, o uso de antimiRs, oligonucleotídeos miRNA antisense, demonstraram ter um papel interessante quando pensado como terapia gênica, pois podem inibir a ação do miRNA alvo (ZHU *et al.*, 2007; GARCHOW *et al.*, 2011). Dessa forma, onco-miRNAs poderiam ser alvos deste tipo de tratamento. Em outros casos de câncer, miRNAs estão regulados negativamente, e o reestabelecimento da expressão pode ser uma alternativa de terapia, para esses casos, miRNAs miméticos sintéticos tem um forte potencial como ferramenta.

Embora ensaios terapêuticos dos miRNAs miméticos ou vetores de expressão em modelos de animais tenham relatado suprimir o crescimento do tumor (ESQUELA-KERSCHER *et al.*, 2008; KOTA *et al.*, 2009), o sistema de entrega ideal, com as características de alta eficiência de transfecção, baixa toxicidade celular, proteção dos miRNAs da degradação e entrega específica para o tecido permanecem um desafio (YU *et al.*, 2012).

Por serem grandes reguladores da expressão gênica, o controle dos seus níveis oferece uma infinidade de alvos de estudo pensando em terapia celular e gênica. Embora os efeitos secundários da terapia com miRNA possa ser uma expressão gênica alterada, já que múltiplos genes podem ser afetados de uma vez, isso não descarta a ampla gama de vantagens que podem ser obtidas.

### 1.3. MicroRNAS

MicroRNAs (miRNAs) são pequenos RNAs não-codificadores reguladores da expressão gênica, são complementares a determinadas regiões do RNA mensageiro

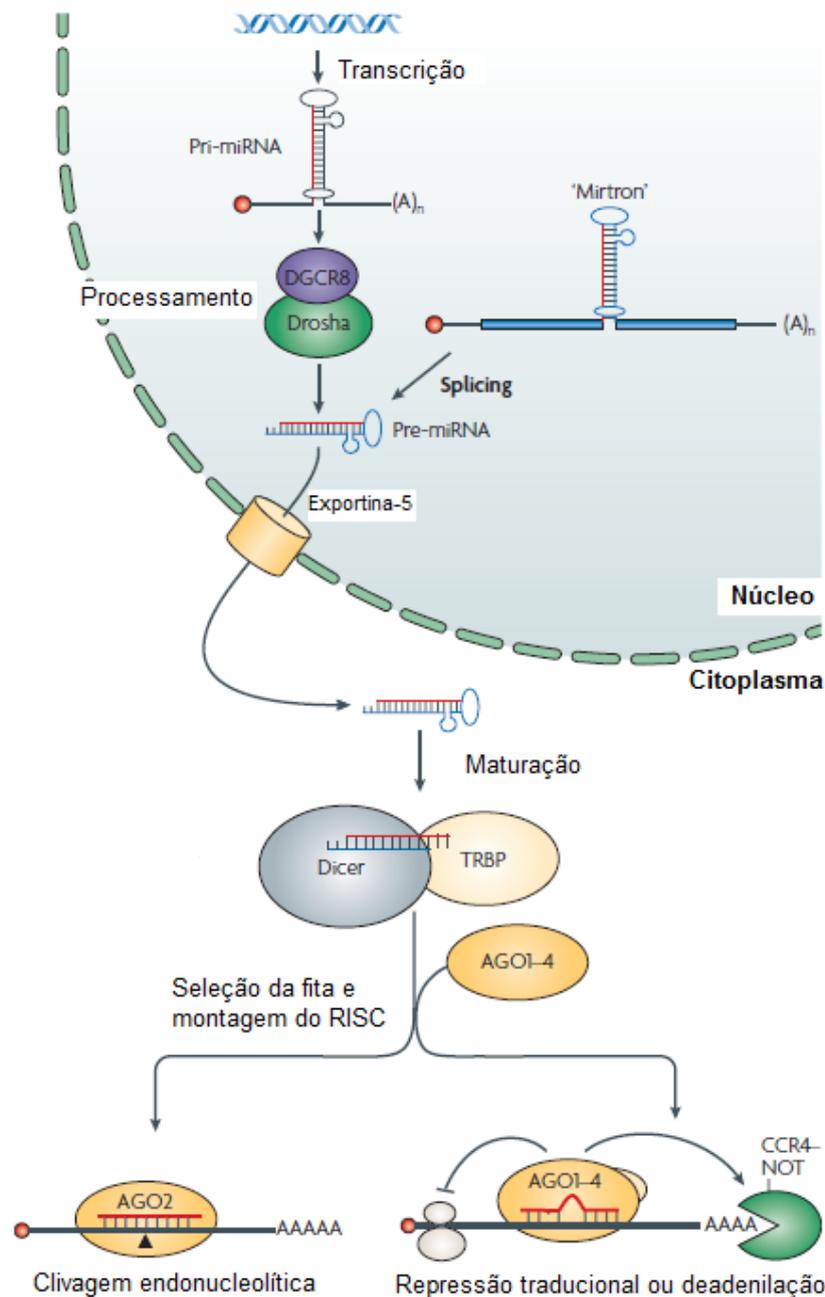
(mRNA) e exercem sua função por meio do bloqueio da tradução e/ou degradação dos mRNAs alvos (**Figura 1.4**) (AMBROS, 2004; BARTEL, 2004; BARTEL, 2009). Foram descobertos em *Caenorhabditis elegans* como reguladores da determinação do destino celular, pelo pareamento entre lin-4 e o mRNA lin-14 durante o desenvolvimento (LEE *et al.*, 1993; WIGHTMAN *et al.*, 1993). Desde então, miRNAs foram relacionados a diversos processos celulares, tanto fisiológicos como patológicos, incluindo desenvolvimento embrionário, proliferação celular, apoptose, diferenciação celular, entre outros (LÜ *et al.*, 2005; BRENNECKE *et al.*, 2003; DOSTIE *et al.*, 2003; CHEN *et al.*, 2004).

Devido ao seu pequeno tamanho, aproximadamente 22 nt, um miRNAs pode ter como alvo diversos mRNAs, e um mRNA pode ser alvo de vários miRNAs (ZHOU *et al.*, 2013). Pressões seletivas durante a evolução parecem ter mantido o pareamento entre miRNAs e mais da metade dos genes codificadores de proteínas (BRENNECKE *et al.*, 2005; FRIEDMAN *et al.*, 2009), sugerindo que esses pequenos riboreguladores controlam a expressão da maioria das proteínas humanas (BARTEL *et al.*, 2004). miRNAs são fortemente regulados para permitir a modelagem da expressão gênica de uma maneira tecido específica e restrita temporalmente, apropriada para o desenvolvimento da estrutura do organismo e crescimento (YATES *et al.*, 2013). Devido à importância desses pequenos RNAs reguladores na manutenção da homeostasia do organismo, falhas nesse mecanismo são responsáveis pelo desenvolvimento de doenças como o câncer.

Muitos miRNAs são encontrados agrupados (*clusters*) e transcritos de forma policistrônica (LEE *et al.*, 2002). Esses miRNAs agrupados estão frequentemente relacionados uns aos outros, sugerindo que o agrupamento seja resultado de uma duplicação evolucionária, contudo nem todos os miRNAs de um mesmo *cluster* são relacionados (KIM *et al.*, 2006).

Genes dos miRNAs são transcritos pela RNA polimerase II, e em alguns casos pela RNA polimerase III, em transcritos primários de miRNAs (pri-miRNA) (CAI *et al.*, 2004; LEE *et al.*, 2004; BORCHERT, *et al.*, 2006). De forma semelhante aos RNAs mensageiros, são poliadenilados e capeados (CAI *et al.*, 2004; LEE *et al.*, 2004). Pri-miRNAs de animais possuem tipicamente um tronco, um laço (*loop*) e longas sequências flanqueadoras. miRNAs são encontrados geralmente em três regiões genômicas: íntrons de genes codificadores de proteínas e não-codificadores, éxons de genes não-codificadores e regiões intergênicas (LAGOS-QUINTANA, 2001; RODRIGUEZ *et al.*, 2004; KIM *et al.*, 2006; SHUKLA *et al.*, 2011).

Para miRNAs que se originam de íntrons, o splicing não é requerido para sua produção e o processo de produção de pri-miRNAs em miRNAs precursores (pre-miRNAs) não afeta a produção do mRNA hospedeiro (KIM *et al.*, 2007).



**Figura 1.4 – Biogênese dos microRNAs.** Genes dos miRNAs são transcritos pela RNA polimerase II em transcritos primários de miRNAs (pri-miRNA), de forma semelhante aos mRNAs, são poliadenilados e capeados. São processados inicialmente no núcleo pelo complexo Drosha e DGCR8, dando origem aos miRNAs precursores (pre-miRNAs). Quando o RNA resultante de splicing já é semelhante ao pre-miRNA a etapa de processamento nuclear não é realizada. Os pre-miRNAs são reconhecidos pela Exportina-5 e exportados para o citoplasma, onde sofrem a segunda etapa de processamento. A clivagem pela enzima Dicer gera pequenos RNAs dupla fita de aproximadamente 22 nt, que serão reconhecidos pela proteína Ago e, então, a dupla fita é desfeita. A proteína AGO é o componente principal do RISC, complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC), responsável por direcionar o miRNA ao alvo. miRNAs podem induzir o bloqueio da tradução ou recrutar elementos que levam a degradação do mRNA, dependendo do grau de complementaridade entre as duas moléculas.

FONTE: Adaptado de FILIPOWICZ *et al.*, 2008.

A geração de miRNAs maduros envolve processamento nuclear e citoplasmático (LEE *et al.* 2002) por ribonucleases III que reconhecem RNAs dupla-fita. O miRNA primário é clivado pelo complexo microprocessador nuclear formado pela RNase III Drosha (LEE, *et al.*, 2003). Drosha forma dois tipos diferentes de complexos, um pequeno complexo microprocessador que contém apenas Drosha e a proteína DGCR8 (*DiGeorge critical region 8*), responsável por processar a maioria dos pri-miRNAs, e um complexo maior que contém RNA helicases, proteínas ligadoras de RNA dupla fita, ribonucleoproteínas nucleares heterogêneas e proteínas da família do sarcoma de Ewing (GREGORY *et al.*, 2004). Os dois domínios RNase da Drosha clivam os braços 5' e 3' do pri-miRNA, deixando 2 nt protuberantes na extremidade 3'. Já a DGCR8 interage diretamente e estabiliza o pri-miRNA e tem grande importância na determinação do sítio de clivagem específico (HAN *et al.*, 2004; HAN *et al.*, 2006).

Drosha retira um ou mais pre-miRNAs do pri-miRNAs (LEE *et al.*, 2003, DENLI *et al.*, 2004, GREGORY *et al.*, 2004). Contudo, o processamento de pri-miRNAs em pre-miRNA mediado por Drosha não é obrigatório, miRNAs derivados de íntrons podem ser liberados do transcrito hospedeiro após o *splicing*. Se o íntron resultante da ação da maquinaria de *splicing* tem o tamanho apropriado para formar o *hairpin* e parecer um pre-miRNA, a etapa de processamento pela Drosha é dispensada e o término do processamento é realizado pela Dicer no citoplasma (OKAMURA *et al.*, 2007, RUBY *et al.*, 2007). Esses miRNAs são chamados de mirtrons e foram descobertos em várias espécies, incluindo *D. melanogaster* e *C. elegans* e mamíferos (OKAMURA *et al.*, 2007, RUBY *et al.*, 2007, BEREZIKOV *et al.*, 2007)

Os pre-miRNAs são exportados para o citoplasma pela Exportina-5 (Exp5), em um processo dependente de Ran-GTP (YI *et al.*, 2003; LUND *et al.*, 2004; BOHNSACK *et al.*, 2004). O tamanho definido do tronco dupla fita e os nucleotídeos protuberantes na extremidade 3' do miRNA, produzidos pela clivagem da Drosha, são importantes para o sucesso da ligação da Exp5, garantindo a exportação apenas de pre-miRNAs processados corretamente (ZENG e CULLEN, 2004; LUND e DAHLBERG, 2006; OKADA *et al.*, 2009).

A maquinaria efetora da via de miRNA é conhecida como complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC - *RNA-Induced Silencing Complex*). O processamento citoplasmático do miRNA e a montagem do RISC são mediados pelo complexo de carregamento de RISC (RLC - *RISC loading complex*). RLC é um

complexo multiproteico composto pela RNase Dicer, as proteínas com domínios ligadores de RNA dupla fita TRPB (*Tar RNA Binding Protein*) e PACT (*Protein Activator of PKB*), e o componente cerne Argonata-2 (Ago2), a qual também medeia os efeitos do RISC nos mRNAs alvo (GREGORY *et al.*, 2005, HAASE *et al.*, 2005, LEE *et al.*, 2006, MACRAE *et al.*, 2008, CHENDRIMADA *et al.*, 2005). O pre-miRNA exportado só se junta ao RLC após a formação do complexo ternário Dicer, TRBP e Ago2 (GREGORY *et al.*, 2005, MANIATAKI e MOURELATOS, 2005).

A RNase III Dicer cliva o *loop* dos pre-miRNAs e gera um miRNA duplex com dois nucleotídeos protuberantes em cada final 3' (GRISHOK *et al.*, 2001; HUTVÁGNER *et al.*, 2001). As proteínas parceiras, TRBP e PACT, não são essenciais para a clivagem do pre-miRNA mediada por Dicer (HAASE *et al.*, 2005; LEE *et al.*, 2006), mas aumentam a especificidade ao substrato (LEE e DOUDNA, 2012, FUKUNAGA *et al.*, 2012). Além disso, podem alterar a posição da clivagem mediada por Dicer dentro do pre-miRNA, gerando isoformas de miRNA (isomiRs) (LEE e DOUDNA, 2012, FUKUNAGA *et al.*, 2012).

Após a clivagem mediada pela Dicer, a enzima e suas parceiras se dissociam do duplex de miRNA. Em princípio, o duplex de miRNA poderia dar origem a dois miRNAs diferentes. Entretanto, apenas uma fita é predominantemente incorporada ao RISC, fita funcional, a qual guia o complexo aos mRNAs alvo; a fita passageira (ou estrela) é subsequentemente degradada (SCHWARZ *et al.*, 2003). Esta assimetria funcional depende, principalmente, da estabilidade termodinâmica dos pares de bases nas duas extremidades do duplex: a fita com o par de base menos estável na extremidade 5' é carregada no RISC (KHVOROVA *et al.*, 2003). Outros mecanismos parecem influenciar na escolha da fita líder pela AGO, como: nucleotídeos das extremidades e as proteínas parceiras da AGO, TRPB e PACT (NOLAND e DOUDNA, 2013). Pouco se sabe sobre o processo de seleção de fitas em mamíferos, embora várias helicases tenham sido associadas à via de miRNA, uma helicase universal responsável pela abertura da fita não foi identificada (WINTER *et al.*, 2009).

A proteína AGO é o componente principal do RISC, é a responsável por direcionar o miRNA ao alvo. AGOs são constituídas por quatro domínios: N-terminal, PAZ (*PIWI-Argonaute-Zwille*), MID e PIWI (*P-element-induced wimpy testes*) (JINEK e DOUDNA, 2009). O domínio PAZ reconhece os nucleotídeos pendentes deixados na extremidade 3' pelas enzimas Drosha e Dicer durante o processamento, dessa forma, os miRNAs e os siRNAs podem ser diferenciados de RNAs resultantes da

degradação (SONG *et al.*, 2003; LINGEL *et al.*, 2004; MA, 2004). A extremidade 5' é ancorada pelos domínios MID e PIWI (MA *et al.*, 2005; PARKER *et al.*, 2005; FRANK *et al.*, 2010). O domínio PIWI é capaz de se dobrar em uma estrutura análoga ao domínio catalítico da RNase H e, dessa forma, ele é o responsável pela atividade *slicer* da AGO2 (SONG *et al.*, 2004).

Humanos possuem oito Argonautas, sendo quatro Argonauta-like e quatro Piwi-like (HUTVAGNER e SIMARD, 2008). Algumas AGOs perderam a atividade catalítica, porém participam de mecanismos regulatórios que não requerem clivagem. Apenas a AGO2 é capaz de clivar o mRNA alvo, contudo, as quatro proteínas AGOs são capazes de carregar a pequena dupla fita de RNA (MEISTER *et al.*, 2004; LIU *et al.*, 2004; SONG *et al.*, 2004;).

O maior determinante para a ligação de AGO ao seu mRNA alvo é um domínio de 6-8 nucleotídeos no final 5' do miRNA, conhecida como região *seed* (AMERES e ZAMORE, 2013). Devido a pequena quantidade de nucleotídeos dessa região, mais da metade de todos os genes codificadores de proteínas em mamíferos são regulados por miRNAs, e centenas de outros mRNAs parecem ter seleção negativa para evitar pareamento com miRNAs presentes na mesma célula (FARH *et al.*, 2005; LEWIS *et al.*, 2005; FRIEDMAN *et al.*, 2009).

Em plantas, a maioria dos miRNAs são complementares ao alvo e desencadeiam a clivagem dos mRNAs, todavia, alguns estudos já relataram miRNAs que bloqueiam a tradução (TANG *et al.*, 2003; BRODERSEN, *et al.*, 2008; LANET *et al.*, 2009; PASQUINELLI *et al.*, 2012). Já em mamíferos, o oposto ocorre, poucos miRNAs possuem complementaridade suficiente para direcionar a clivagem do alvo por AGO2 (YEKTA *et al.*, 2004; KARGINOV *et al.*, 2010; PASQUINELLI *et al.*, 2012). A complementaridade parcial não permite a clivagem do alvo mesmo quando o miRNA está associado a AGO2, que é a única AGO com atividade catalítica. Todavia, estudos anteriores demonstram que miRNAs de animais tipicamente desencadeiam a destruição do mRNA ligado, portanto, outro mecanismo de degradação deve estar envolvido (LIM *et al.*, 2005; WU *et al.*, 2006; BAEK *et al.*, 2008, SELBACH *et al.*, 2008; GUO *et al.*, 2010).

Estudos de perfil de ribossomos (*ribosome profiling*) reforçaram a visão de que a maior parte da redução na abundância de proteínas observadas durante a repressão mediada por miRNA refletem do decaimento de mRNA, no entanto, uma pequena fração, 11-16%, parece derivar a partir do bloqueio na tradução (GUO *et al.*, 2010). Embora a destruição de mRNA seja mutuamente exclusiva à repressão

traducional, estudos em *Danio rerio* (zebrafish) e em *D. melanogaster* sugerem que miRNAs inicialmente reprimem tradução dos mRNAs e posteriormente desencadeiam o decaimento do mRNA (BAZZINI *et al.*, 2012; DJURANOVIC *et al.*, 2012), talvez em resposta ao bloqueio da tradução em vez de qualquer propriedade específica dos miRNAs ou das proteínas AGO (AMERES e ZAMORE, 2013).

O pareamento miRNA-mRNA geralmente ocorre nas regiões 3'UTR dos mRNAs, porém não é restrito a elas, outras regiões do mRNA e do próprio gene já foram descritas como alvo, incluindo promotor, 5'UTR e regiões codificadoras (OROM *et al.*, 2008; PLACE *et al.*, 2008; TAY *et al.*, 2008; CHI *et al.*, 2009; LEE *et al.*, 2009; HAFNER *et al.*, 2010).

miRNAs geralmente são reguladores negativos da expressão gênica, mas também podem estar relacionados a ativação gênica. Frequentemente o mecanismo de ativação é indireto, por meio da repressão de um repressor, levando ao aumento da expressão de um transcrito específico (PLACE *et al.*, 2008; AMERES e ZAMORE, 2013). Esse mecanismo ocorre com o miR-373, que induz a expressão gênica se ligando ao promotor da E-caderina e competindo com o ligação do repressor (PLACE *et al.*, 2008). Uma forma mais incomum e direta de ativação gênica por miRNAs foi descrita após parada do ciclo celular. Mediante privação de soro, o miR-369-3 se liga a um elemento rico em AU na 3' UTR do gene que codifica o fator de necrose tumoral (TNF – *tumour necrosis factor*). O miR-369-3 normalmente dirige repressão, mas, nessas condições, parece promover tradução (VASUDEVAN *et al.*, 2007, VASUDEVAN e STEITZ, 2007). Um fenômeno similar também tem sido observado para a ativação da tradução de genes de proteínas ribossomais em camundongos (OROM *et al.*, 2008).

## 2. JUSTIFICATIVA

CTM têm sido foco de diversos estudos no campo das terapias baseadas em células para diversas doenças. CTM são capazes de se diferenciar em diversos tipos celulares, além disso, são facilmente isoladas, cultivadas e expandidas *in vitro* (PASSIER e MUMMERY, 2003; MINGUELL *et al.*, 2001). Sabe-se que as CT são células autorrenováveis e capazes de se diferenciar. Essa característica pode ser controlada em diversos níveis como: epigenética, transcrição, tradução e pós-tradução (GANGARAJU e LIN, 2009).

Para melhor entender os mecanismos de diferenciação celular, ou manutenção do estado não especializado das CT, é necessário compreender os mecanismos de regulação da expressão gênica nessas células. Nas últimas décadas, microRNAs (miRNAs) têm sido alvo de diversos estudos na área de regulação da expressão gênica, já que tem um papel importante na regulação pós-transcricional e traducional de centenas de alvos.

O sequenciamento em larga escala permite que a abundância relativa de cada miRNA seja estimada, revelando miRNAs que atingem níveis de expressão relativamente altos e, portanto, podem ser relevantes em determinados processos. Estudos recentes demonstram que células progenitoras e células diferenciadas apresentam perfis de expressão de miRNAs distintos (ORTEGA *et al.*, 2010; GUO *et al.*, 2011; ZARAGOSI *et al.*, 2011); além disso, esses resultados sugerem que as CT têm perfis de expressão de miRNA que podem explicar, ou contribuir para, as propriedades intrínsecas de autorrenovação e pluripotência das CT (LIU *et al.*, 2009; SCHOOLMEESTERS *et al.*, 2009; GUO *et al.*, 2011).

Apesar de grandes avanços na descoberta de novos miRNAs, pouco se sabe sobre os mecanismos de ação dos miRNAs nas CTM. Estudos prévios do nosso grupo (SPANGENBERG *et al.*, 2013) demonstraram que CTA de tecido adiposo (CTA-TA) são reguladas pós-transcricionalmente de forma importante durante a diferenciação celular. Esse estudo demonstrou que a população de mRNA total é diferente da população de mRNA associada aos polissomos, ou seja, mRNAs que estão sendo efetivamente traduzidos, salientando que há regulação entre a transcrição e a tradução. Além disso, o trabalho enfatizou que há variação no tamanho da 3' UTR dos mRNAs após a indução à diferenciação. Regiões UTR são importantes reguladores da estabilidade de mRNAs, já que são alvos de proteínas de ligação ao RNA (*RBD – RNA Binding Protein*) e miRNAs, por exemplo.

Dados da literatura informam que os miRNAs, além de cossedimentarem com polissomos, estão associados fisicamente a eles (KIM *et al.*, 2004; NELSON *et al.*, 2004; MARONEY *et al.*, 2006). miRNAs associados aos monossomos ou polissomos dão indícios de que o mecanismo de ação desses miRNAs se dá por meio do bloqueio da tradução.

Levando em consideração dados da literatura e estudos prévios realizados no Laboratório de Biologia Básica de Células-tronco (LABCET) do Instituto Carlos Chagas – Fiocruz/PR (ICC-Fiocuz-PR), estudos adicionais são necessários para melhor compreensão do estado indiferenciado das CTM, bem como quais vias e mecanismos estão envolvidos na diferenciação.

Este trabalho avaliou a presença de miRNAs associados aos polissomos no início da diferenciação das CTA-TA, utilizando adipogênese como modelo. Também no trabalho anterior, foi relatado que três dias de indução é suficiente para comprometer as CTA-TA com a adipogênese (SPANGENBERG *et al.*, 2013). Este tempo ainda pode ser considerado inicial, já que o processo de diferenciação adipogênica dura entre 14 e 21 dias. Já a escolha de um subgrupo de miRNAs, associados aos polissomos, nos dá um indício do mecanismo de ação desses miRNAs.

Sabendo que parte de algumas vias de diferenciação ou manutenção da autorrenovação são comuns em diversos tipos celulares, futuramente, pretende-se aplicar os resultados obtidos neste trabalho a outros modelos de diferenciação das CT ou progenitoras, em condrócitos, osteócitos e cardiomiócitos, visando à terapia gênica e/ou celular.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. OBJETIVO GERAL**

Identificar e caracterizar miRNAs associados aos polissomos diferencialmente expressos durante a diferenciação adipogênica, visando o possível envolvimento de miRNAs destes na regulação da tradução das CTM humanas.

#### **3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Purificar a fração contendo pequenos RNAs associados aos polissomos;
- Identificar pequenos RNAs obtidos por sequenciamento em larga escala;
- Identificar miRNAs diferencialmente expressos;
- Selecionar miRNAs para identificação de alvos e redes gênicas;

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. OBTENÇÃO E CULTIVO DAS CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DO TECIDO ADIPOSEO

As amostras de tecido adiposo foram coletadas no Instituto de Medicina e Cirurgia do Paraná, de doadores submetidos à cirurgia bariátrica seguida de dermolipectomia na região abdominal, com idades entre 30 e 50 anos. As amostras foram obtidas do tecido adiposo, após consentimento do doador, de acordo com normas para pesquisa envolvendo seres humanos e com a aprovação do Comitê de Ética da Fundação Oswaldo Cruz (número de aprovação 419/07, **ANEXO**). As CTM foram isoladas, cultivadas e caracterizadas, como previamente descrito, e fornecidas pelo Núcleo de Tecnologia Celular da PUCPR (REBELATTO *et al.*, 2008).

Para isolar as CTM, 100 ml de tecido adiposo foi lavado com solução salina estéril para remover resíduos contaminantes e hemácias. Em seguida o material foi digerido com 1 mg/ml de colagenase tipo I (Invitrogen) por 30 min a 37 °C sob agitação permanente, seguido pela filtração, com um filtro de 100 µm (BD Biosciences), para eliminar os fragmentos não digeridos. A suspensão de células foi centrifugada a 800 x g durante 10 minutos, e eritrócitos contaminantes foram removidos pelo tampão de lise de eritrócito, pH 7,3. A suspensão de células foi novamente filtrada com filtro de 40 µm, lavadas e depois cultivadas a uma densidade de  $1 \times 10^5$  células/cm<sup>2</sup> em garrafas de cultura de 75 cm<sup>2</sup> contendo *Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12* (DMEM/F12, Gibco) suplementado com 10 % de soro fetal bovino (SFB, Gibco), 100 U/ml penicilina (Gibco) e 100 µg/ml estreptomicina (Gibco). O meio foi trocado 3-4 dias após o plaqueamento inicial, e depois 2 vezes por semana até as culturas atingirem 80 % a 90 % de confluência. Para expansão, as CTM foram desprendidas das garrafas de cultura após o tratamento com 0,25 % de tripsina/EDTA (Invitrogen) e novamente plaqueadas (passagem, p, 1). A manutenção das culturas foi feita em estufa de atmosfera úmida, com 5 % CO<sub>2</sub>, a 37 °C (HEPA Class 100, Thermo Scientific) e as trocas de meio foram realizadas a cada 2-3 dias. Ao atingirem 80 a 90% de confluência as culturas foram novamente dissociadas e replaqueadas, como descrito anteriormente, até que o número ideal de células fosse atingido (p 5-6).

Para a caracterização imunofenotípica, as CTM foram avaliadas por citometria de fluxo (*FACS Calibur, BD Biosciences*). As células foram positivas para CD105, CD90, CD73, CD166, CD29 e CD44; negativas para marcadores de linhagem hematopoética, incluindo CD14, CD45 e CD31 e a porcentagem de CD34 foi de  $2,16\% \pm 2,48$  (REBELATTO, AGUIAR *et al.*, 2008). Também foram capazes de diferenciar nas três linhagens mesodermis, atendendo os critérios mínimos exigidos para caracterização das CTM (DOMINICI, LE BLANC *et al.*, 2006).

## 4.2. DIFERENCIAÇÃO ADIPOGÊNICA

### 4.2.1. Indução adipogênica *in vitro*

Para a indução adipogênica por 72 horas (h), as células foram cultivadas até atingirem uma confluência de aproximadamente 50 %, utilizando meio indutor não comercial chamado DIII. Este meio consistiu em meio de cultivo suplementado, como descrito em 4.1, acrescido de 1  $\mu\text{M}$  de dexametasona (Sigma), 500  $\mu\text{M}$  de 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX, Sigma), 1  $\mu\text{g/mL}$  de insulina (Sigma) e 200  $\mu\text{M}$  de indometacina (Sigma). Os controles (condição sem indução) foram cultivados apenas com meio de cultivo suplementado.

Para o processo completo de diferenciação adipogênica, culturas de CTM foram induzidas à adipogênese após atingirem confluência de 90-100 %. O meio foi trocado duas vezes por semana e o período de indução utilizado foi de 14 dias.

### 4.2.2. Marcação dos lóculos lipídicos

O Vermelho Nilo (VN) é um marcador fluorescente lipídico caracterizado por uma mudança da emissão do vermelho ao amarelo de acordo com o grau de hidrofobicidade dos lipídios. Lipídios polares, por exemplo, fosfolipídios, são marcados em vermelho enquanto lipídios neutros como colesterol esterificado e triacilglicerídios, que estão presentes em gotas lipídicas, são marcados em amarelo. Em soluções aquosas, a fluorescência é totalmente inibida (GREENSPAN e FOWLER, 1985).

As culturas foram lavadas com solução salina fosfatada (PBS - *phosphate buffered saline*) e fixadas com solução de Paraformaldeído (PF) 4 % à temperatura ambiente por 10 min. Após duas lavagens com PBS, as células foram marcadas

com uma solução de VN por 30 min a 4 °C. A solução de VN foi preparada imediatamente antes do uso diluindo-se mil vezes em PBS uma solução-estoque que consistia de 1 mg/ml de VN dissolvido em Dimetilsulfóxido ou sulfóxido de dimetilo (DMSO, Sigma). Em seguida, as culturas foram lavadas duas vezes com PBS e marcadas com DAPI diluído em PBS por 20-30 min. Novamente foram realizadas três lavagens com PBS e as culturas armazenadas a 4°C, se necessário.

As imagens das culturas induzidas foram obtidas utilizando o microscópio invertido (Eclipse TS300, Nikon).

#### 4.2.3. Quantificação das células marcadas com Vermelho Nilo

Dez imagens de campos aleatórios (aumento de 200X) de culturas marcadas com Vermelho Nilo e DAPI foram obtidas utilizando o microscópio invertido NIKON ECLIPSE TE300. O total de células de cada uma das dez imagens foi determinado, distinguindo-se entre células diferenciadas e não diferenciadas. Calculou-se, então, a porcentagem de células diferenciadas nas culturas induzidas.

### 4.3. ISOLAMENTO DOS PEQUENOS RNAs ASSOCIADOS AOS RIBOSSOMOS

#### 4.3.1. Gradiente de densidade

A obtenção do perfil polissomal das CTM-TA foi realizada inicialmente de acordo com o método publicado por Holetz *et al.*, 2007 e Spangenberg *et al.*, 2013. CTM-TA cultivadas até 60 a 80 % de confluência foram tratadas com 0,1 mg/ml de cicloheximida (Sigma-Aldrich) por 10 min a 37 °C. As células foram removidas das garrafas de cultivo com raspador de células (*cell scraper*) ou por meio de tripsinização. As células foram resuspensas em 0,1 mg/ml de cicloheximida em PBS e centrifugadas, duas vezes, a 2000 x g por 5 min para lavagem. As células foram incubadas por 10 min no gelo com tampão polissomal (15 mM Tris-HCl pH 7,4, 1% Triton X-100, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,3 M NaCl, 0,1 µg/ml cycloheximida, 1 mg/ml heparina e RNase Out 40 U/µl) para lise celular.

Após a lise das células, o material foi centrifugado a 12.000 x g por 10 min para sedimentação dos núcleos e restos celulares. O sobrenadante foi depositado cuidadosamente em um gradiente de densidade, constituído de sacarose de 10 a 50

% e submetido à ultracentrifugação a 39.000 rpm por 2 h a 4 °C (rotor SW40, HIMAC CP80WX HITACHI).

O gradiente de sacarose foi fracionado com sistema fracionador de gradiente ISCO (ISCO Model 160 Gradient former) ou manualmente. O fracionador ISCO é conectado a um detector de Ultravioleta (UV) para o monitoramento da absorvância em 275 nm e registro do perfil polissomal. Quando coletado manualmente, cada uma das frações (250 µl) foi dosada no espectrofotômetro ND-1000 (NanoDrop®) e os dados foram plotados para geração do perfil polissomal. As frações foram caracterizadas em: livres de ribossomos, associadas aos monossomos ou associadas aos polissomos.

#### 4.3.2 Extração de RNA

Os RNAs das frações livre de ribossomos, associados aos monossomos e associados aos polissomos foram extraídos com TRIzol® (Invitrogen) e enriquecidos com mirVana™ (Ambion), para que houvesse isolamento dos RNAs menores que 200 nt.

Após adição do TRIzol®, o material ficou à temperatura ambiente por 5 min e, em seguida foi adicionado clorofórmio para nova incubação do material à temperatura ambiente por 5 min. Para separar a fase aquosa, o material foi centrifugado a 2.880 rpm por 15 min a 4 °C. No experimento 1, após a coleta da fase aquosa, 0,5 ml de álcool isopropílico foi adicionado para cada 1 ml de TRIzol® inicial, esse material foi incubado por 16 h e centrifugado a 12.000 x g por 10 min. O *pellet* de RNA foi lavado com etanol 80 %, e após o descarte desse, o material foi incubado a 65 °C para completa eliminação do etanol. Nos demais experimentos, a adição de álcool isopropílico à fase aquosa foi substituída pela adição de 2,5 volumes de Etanol absoluto, 10% de acetato de sódio 3M pH 5,2 e GlycoBlue™ (Ambion). O RNA foi armazenado a 20 °C por, pelo menos, 16 h e, então, centrifugado a 13.000 x g a 4 °C por 30 min. O material foi lavado com etanol 80 % e incubado a 65 °C para remoção dos resquícios de álcool.

#### 4.3.3 Isolamento de pequenos RNAs com mirVana™

O enriquecimento dos pequenos RNAs com mirVana™ foi realizada de acordo com as instruções do fabricante. Este tipo de extração combina extração

orgânica com extração de fase sólida, onde os RNAs ficam retidos à coluna de vidro. O material resultante da extração com RNA TRIzol® foi resuspenso em tampão *Lysis binding*, que estabiliza o RNA e inativa RNases, em seguida foi adicionado o *Homogenate Additive* e ácido Fenol:Clorofórmio. Após a retirada da fase aquosa foi adicionado 1/3 do volume de etanol absoluto e adicionado no primeiro filtro. Ao material filtrado foi adicionado 2/3 do volume de etanol absoluto, que foi submetido ao segundo filtro, onde os RNAs menores que 200 nt ficam retidos. Para finalizar, o RNA é lavado com 3 soluções de lavagem e recuperado em solução de eluição.

#### 4.3.4 Isolamento de pequenos RNAs por purificação em gel de poliacrilamida

Em alternativa ao uso do mirVana™, o material resultante da extração com TRIzol® foi resolvido em gel de poliacrilamida 6% TBE-uréia com 1 mm de espessura, *NOVEX® pre-cast gel* (Invitrogen). A eletroforese ocorreu a 80 V e 320 mA por aproximadamente 40 min, ao final, o gel foi marcado com Sybr® Gold (Life Technologies) e observado à luz UV.

A banda de aproximadamente 20 nt foi coletada e macerada por centrifugação a 10.000 x g por 2 min. Em seguida foi acrescentada água livre de RNases e o material foi incubado por 10 min a 70 °C. A amostra foi adicionada a um filtro e centrifugada a 12.000 x g por 5 min para remoção da acrilamida. O material filtrado foi precipitado como descrito em **4.3.2**.

### 4.4 SEQUENCIAMENTO EM LARGA ESCALA DE PEQUENOS RNAS

#### 4.4.2 Preparação da biblioteca para sequenciamento

Para preparação das amostras para o sequenciamento na plataforma SOLiD™ foram utilizados 100-500 ng de amostra. O material foi incubado com o mix de adaptadores SOLiD™ e solução de hibridização a 65 °C por 10 min e 16 °C por 5 min. Então, foi adicionado o tampão de ligação 2x e o mix de enzimas de ligação à amostra, que foi incubada por 16 h a 16 °C.

O material hibridizado foi retrotranscrito utilizando o kit *SOLiD™ Total RNA-Seq* de acordo com as instruções do fabricante. O cDNA resultante foi purificado utilizando o kit *Mini Elute PCR Purification* (Qiagen) e os cDNAs foram submetidos à eletroforese em *Novex® pre-cast gel*. Os cDNAs de tamanho apropriado (60-85 nt)

foram excisados do gel e divididos em quatro fragmentos (bandas A, B, C e D). As amostras foram amplificadas utilizando o kit *SOLiD™ Total RNA-Seq* e, por ser uma biblioteca multiplex, também foi utilizado o kit *SOLiD™ RNA Barcoding* para substituir primer 3' do kit *SOLiD™ Total RNA-Seq*. O programa utilizado para amplificação consiste em manter as amostras a 95 °C por 5 min, 18 ciclos de amplificação (95 °C 30 seg, 62 °C 30 seg, 72 °C 30 seg) e, finalmente, 72 °C a 7 min. O produto da PCR foi purificado de acordo com as instruções do fabricante utilizando *PureLink® Micro Kit Column* (Invitrogen) e quantificados com *Qubit® dsDNA HS Assay Kit*.

#### 4.4.3 Análise dos dados obtidos por sequenciamento

Primeiramente os adaptadores foram retirados com o programa conhecido como *cutadapt*. Depois os RNAs de tamanho correto foram mapeados contra os miRNAs maduros do miRBase com o programa Bowtie. Então, para fazer análise da expressão diferencial foi utilizado o *edgeR*, um pacote de R.

### 4.5 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE miRNAs POR PCR QUANTITATIVA

#### 4.5.1 Reação de adição de cauda poli-A

Para a reação de adição de cauda poli-A na porção 3' de cada molécula de miRNA maduro, 1 µg de material, preparado de acordo com os itens **4.3.1** e **4.3.2**, foi incubado com os reagentes do kit *Affinity Acript RT* (Agilent), *E. coli poly A polymerase* (PAP), Buffer EPAP, ATP e água livre de RNase. As amostras foram incubadas a 37 °C por 30 min e, em seguida, a 95°C por 5 min para finalizar o processo.

#### 4.5.2 Síntese do DNA complementar

Após a reação de adição de cauda poli-A, o RNA poliadenilado foi usado como molde para a síntese do DNA complementar (cDNA), utilizando *Buffer RT*, dNTP, oligonucleotídeo adaptador, *ART Block* e água livre de RNases. Além desses componentes, foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores *forward* (F), que são a sequência do próprio miRNA (**Quadro 4.1**). O oligonucleotídeo *forward* é o que

permite amplificação específica do alvo de interesse. O material é incubado a 55 °C por 5 min, em seguida submetido a 25 °C por 15 min, depois a 42 °C por 30 min e, por fim, a 95 °C por 5 min para finalizar a transcrição reversa.

| miRNA        | Sequência Foward (5'-3')  |
|--------------|---------------------------|
| miR-29b-1-5p | GCTGGTTTCATATGGTGGTTTAGA  |
| miR-29c-5p   | TGACCGATTTCTCCTGGTGTTTC   |
| miR-30c-5p   | TGTAAACATCCTACACTCTCAGC   |
| miR-143-5p   | GGTGCAGTGCTGCATCTCTGGT    |
| miR-210-3p   | CTGTGCGTGTGACAGCGGCTGA    |
| miR-210-5p   | AGCCCCTGCCACCGCACACTG     |
| miR-6775-5p  | TCGGGGCATGGGGGAGGGAGGCTGG |

**QUADRO 4.1** – Oligonucleotídeos Foward iniciadores utilizados na qPCR

#### 4.5.3 qPCR

O processo de padronização da PCR quantitativa (qPCR) de miRNAs no nosso grupo foi realizado por Roberge e colaboradores (ROBERGE *et al.*, 2013). Utilizou-se a mistura *master mix SYBR Green* (Applied Biosystems), oligonucleotídeo F (**Quadro 4.1**), oligonucleotídeo R (componente do kit *Affinity Acript RT*) e água. As amostras foram feitas em triplicata biológica e técnica (7500 Real Time PCR System, software 7500 System SDS). As condições de PCRs incluíram uma etapa inicial de desnaturação a 95 °C por 2 min, seguida por 55 ciclos de 95 °C por 15 s, 60 °C por 30 s e 72 °C por 30 s para extensão. Para finalizar, etapa de dissociação, 95 °C por 15 s, 60 °C por 1 min, 95 °C por 15 s e 60 °C por 15 s. A quantidade relativa foi calculada com base na quantidade numa curva padrão, determinada por uma amostra positiva para os miRNAs testados, diluídas em uma série de 5 diluições.

#### 4.5.4 Análise do tamanho dos miRNAs expressos

Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 3 %. As bandas de miRNAs obtidas, visualizadas por marcação com brometo de etídio e fotografadas com o transiluminador (L-Pix, Loccus Biotecnologia), foram comparadas aos marcadores de 25 pb (Invitrogen) e 1 kb (Invitrogen).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 PADRONIZAÇÃO

#### 5.1.1 Isolamento e enriquecimento de pequenos RNAs associados aos polissomos provenientes de células obtidas por raspagem celular

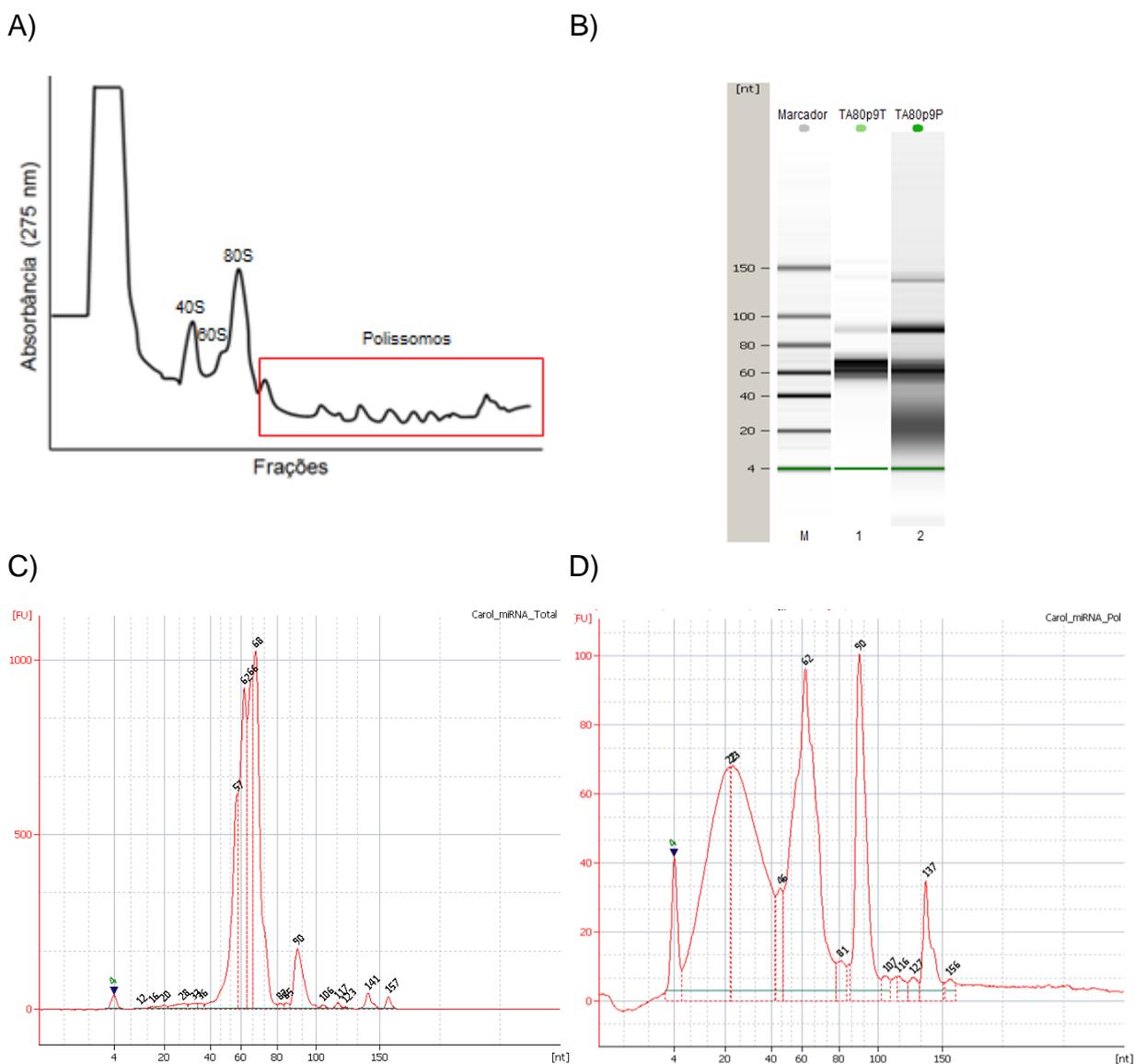
Para realizar o isolamento de pequenos RNAs associados aos polissomos, CTM-TA foram cultivadas e expandidas até atingirem  $3,4 \times 10^6$  células inicial. Estudos anteriores realizados no Laboratório de Biologia Básica de Células-tronco (LABCET), ICC-Fiocruz-PR (dados não publicados) demonstraram que para o isolamento de RNAs mensageiros (mRNAs) associados aos polissomos, doze garrafas de cultivo de  $150 \text{ cm}^2$  foram suficientes para adquirir a quantidade de material necessária para o sequenciamento em larga escala, sendo metade das garrafas para cada condição (indução e não indução adipogênica). A padronização do número de células por experimento não pôde ser realizada pelo número de células, pois para a retirada das células das garrafas de cultivo, o método de raspagem celular foi utilizado, sendo assim, algumas células se soltam em grupos, impossibilitando a contagem com câmara de Neubauer.

Sabe-se que a quantidade de pequenos RNAs na célula é menor que a quantidade de mRNAs, desta forma, a primeira etapa a ser padronizada foi a quantidade de garrafas que seriam utilizadas para cada condição. Para isso, utilizaram-se inicialmente sete garrafas de  $150 \text{ cm}^2$  com  $3,8 \times 10^5$  células por garrafa para a realização do perfil polissomal, e duas garrafas de  $150 \text{ cm}^2$  para extração de RNA total. As células foram expandidas até atingirem 40 % de confluência e então desprendidas das garrafas com raspador de células (*cell scraper*) para a realização da lise celular com tampão polissomal, ou extração do RNA total, e demais etapas. Núcleos e restos celulares foram sedimentados e descartados e o sobrenadante foi isolado e depositado sobre o gradiente de densidade. Neste primeiro experimento apenas a condição não induzida foi avaliada e o perfil polissomal foi gerado pelo fracionador de gradientes ISCO (ISCO Model 160 Gradient former) (**Figura 5.1 A**).

O fracionador ISCO separa os gradientes em pequenas frações de 500  $\mu\text{l}$ . De acordo com o perfil gerado, as frações de 500  $\mu\text{l}$  foram reunidas em uma fração

maior chamada fração polissomal (4,5-7 ml). A extração do RNA, e retirada da sacarose, dos RNAs associados aos polissomos foi feita com TRIzol e clorofórmio.

Para o isolamento e enriquecimento dos RNAs menores que 200 nt, ou extração do RNA total, as amostras foram tratadas com mirVana™ (Ambion). Para a avaliação do tamanho e integridade do material, as amostras foram submetidas à eletroforese em capilar na plataforma 2100 Bioanalyzer (Agilent) (**Figura 5.1 B-D**).



**Figura 5.1 – Padronização da extração de pequenos RNAs associados aos polissomos.** A) Perfil polissomal gerado pelo fracionador de gradientes ISCO, paciente TA80p6. B) Gel virtual das amostras de pequenos RNAs extraídos de RNA total (1) e RNAs associados aos polissomos (2). C) Distribuição dos pequenos RNAs de diferentes tamanhos no gel virtual da amostra de RNA total. D) Distribuição dos pequenos RNAs de diferentes tamanhos da amostra de RNA polissomal.

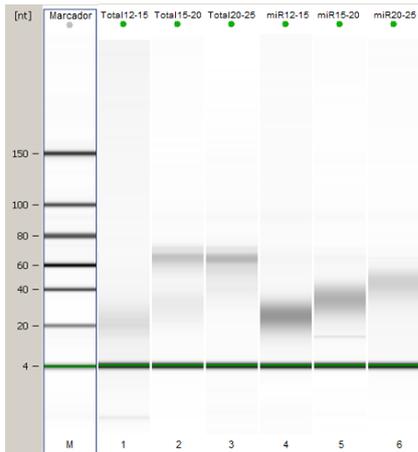
É possível observar que os RNAs entre 60 e 90 nt estão mais enriquecidos que os RNAs de aproximadamente 20 nt, principalmente na amostra de pequenos RNAs total (**Figura 5.1 C**). Estes RNAs são, possivelmente, RNAs transportadores (tRNAs), que possuem entre 74 e 95 nt, e RNAs resultantes de degradação.

Para o enriquecimento dos miRNAs, os fragmentos de até 200 nt foram submetidos a purificação no sistema fracionador flashPAGE™ (Life technologies). Este sistema consiste em uma eletroforese que pode ser parada em diferentes tempos para a coleta do material, assim, os RNAs de diferentes tamanhos podem ser purificados de acordo com o tempo de parada. Foram utilizados seis tempos de parada: 8, 10, 12, 15, 20 e 25 min. Para testar a eficiência de purificação dos fragmentos de aproximadamente 20 nt, as amostras submetidas ao fracionamento também foram avaliadas na plataforma 2100 Bioanalyzer **(Figura 5.2 A)**. Observou-se que os RNAs de aproximadamente 20 nt foram coletados entre 12 e 15 minutos de eletroforese **(Figura 5.2 B e C)**, contudo, a quantidade de material obtida não foi satisfatória **(Figura 5.2 A)**.

Para aumentar o rendimento no isolamento de miRNAs, o número de garrafas de cultivo de 150 cm<sup>2</sup> foi alterado para vinte por experimento, sendo dezesseis garrafas para a realização do perfil polissomal e quatro para extração de RNA total. Foram utilizadas entre 3,5 e 8,0x10<sup>6</sup> células no total, 1,7 a 4,0x10<sup>5</sup> células por garrafa, esse número foi atingido na quinta ou sexta passagem (p) de células. As células foram mantidas em DMEM/F12+15%SFB até atingirem uma confluência de 40-50% e, então, metade das garrafas (dez) foi induzida à adipogênese com meio DIII. A indução ocorreu por 72 horas e esta condição foi chamada de Indução 72h. O restante das garrafas teve apenas o meio DMEM/F12+15%SFB repostado, esta condição recebeu o nome de Não Indução (NI).

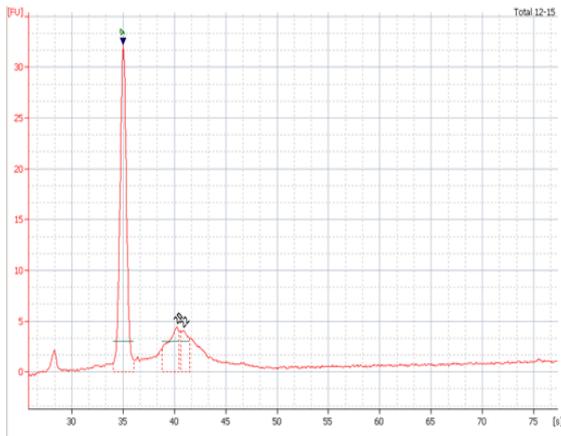
Em cada condição, duas garrafas foram utilizadas para extração de pequenos RNAs total com mirVana™ (Ambion) e as demais foram tratadas com tampão polissomal para a recuperação dos polissomos. Observou-se que os perfis polissomais das duas condições são similares **(Figura 5.3)**, assim como suas quantificações **(Figura 5.4)**. Neste experimento além do RNA total e da fração polissomal, a fração monossomal também foi recolhida para posterior comparação à fração polissomal. Como no experimento anterior, a extração do RNA foi feita com TRIzol e clorofórmio, e o enriquecimento dos RNAs menores que 200 nt com mirVana™. Os materiais foram submetidos à eletroforese em capilar na plataforma 2100 Bioanalyzer (Agilent) para avaliação do tamanho, integridade e quantificação **(Figura 5.4)**.

A)

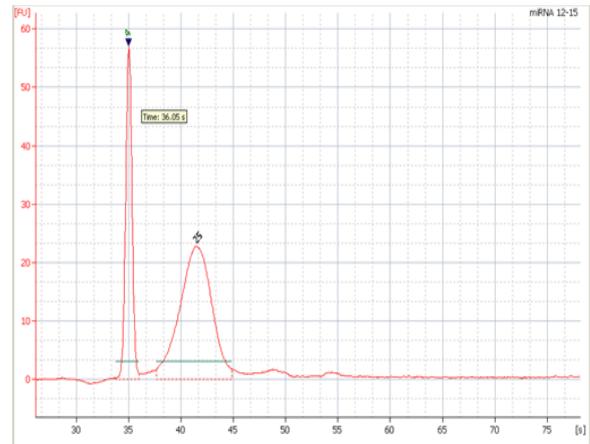


|   | Amostra                | Concentração (pg) |
|---|------------------------|-------------------|
| 1 | RNA total (12-15)      | 3774              |
| 2 | RNA total (15-20)      | 3031              |
| 3 | RNA total (20-25)      | 2538              |
| 4 | RNA polissomal (12-15) | 17049             |
| 5 | RNA polissomal (15-20) | 10216             |
| 6 | RNA polissomal (20-25) | 3307              |

B)

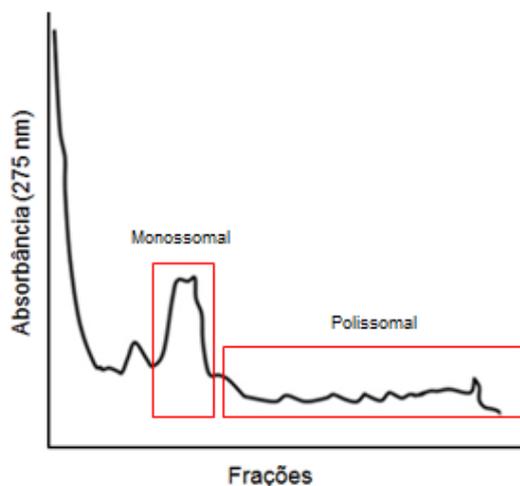


C)

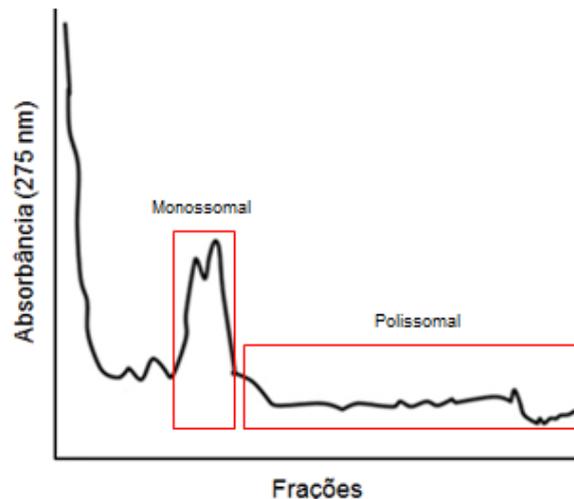


**Figura 5. 2 - Padronização da purificação de miRNAs.** A) Gel virtual das amostras de pequenos RNAs submetidas ao fracionamento e suas respectivas concentrações. B) Distribuição dos RNAs de aproximadamente 20 nt da amostra de RNA total no gel virtual, tempo de coleta entre 12 e 15 min. C) Distribuição dos RNAs de aproximadamente 20 nt da amostra de RNA polissomal no gel virtual, tempo de coleta entre 12 e 15 min.

A)

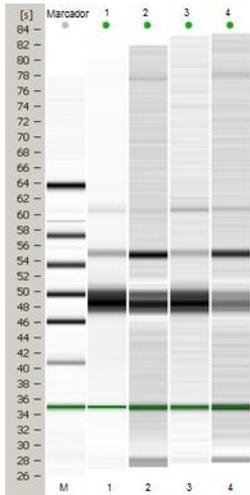


B)



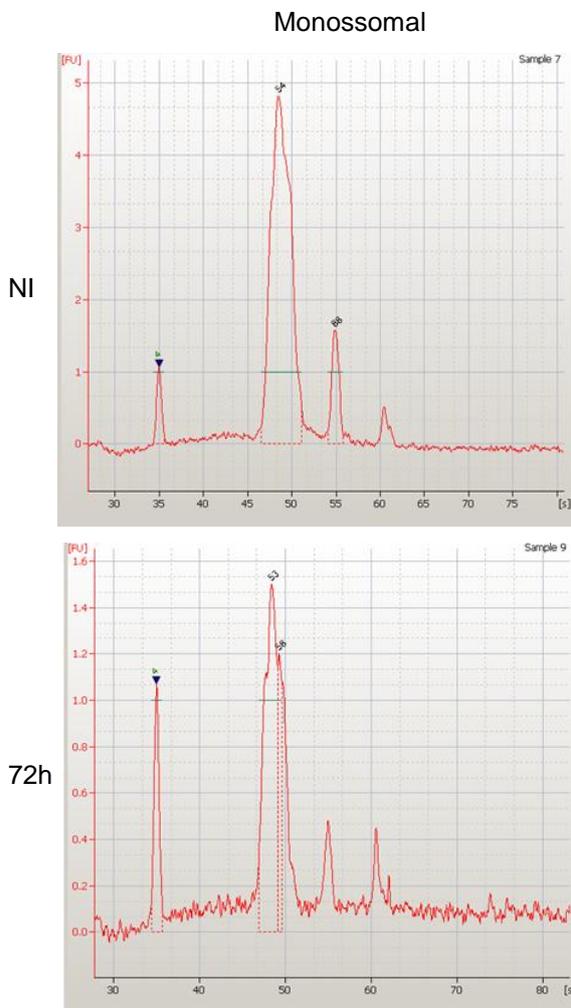
**Figura 5.3 – Perfis polissomais, de células submetidas à raspagem, gerados pelo fracionador de gradientes ISCO.** A) Perfil polissomal Não Indução. B) Perfil polissomal Indução 72h. Células provenientes do doador TA81p6.

A)

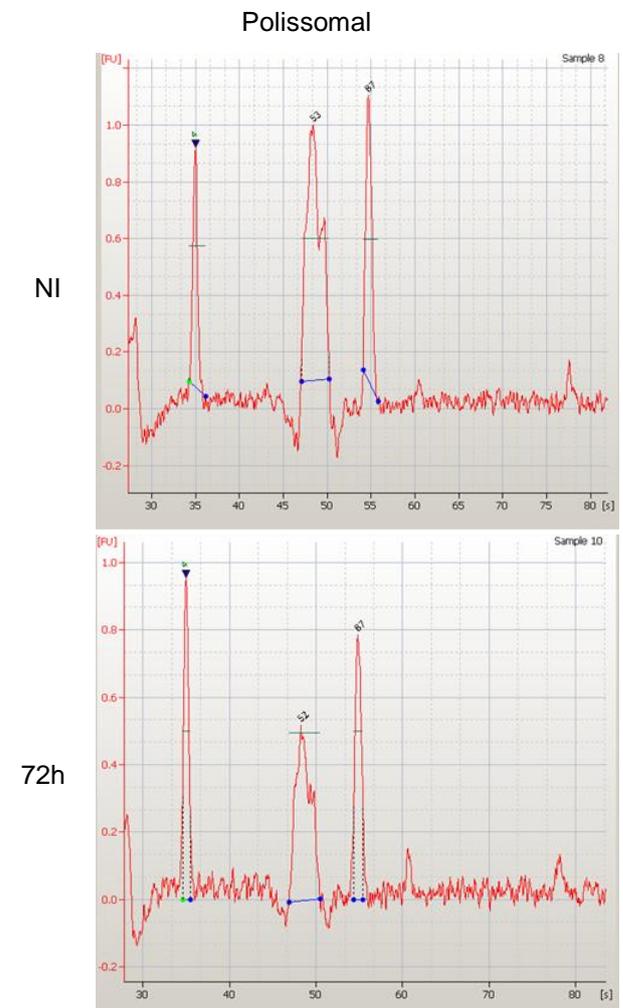


|   | Amostra             | Concentração (ng) |
|---|---------------------|-------------------|
| 1 | RNA monossomal NI   | 651               |
| 2 | RNA polissomal NI   | 436               |
| 3 | RNA monossomal 72 h | 328               |
| 4 | RNA polissomal 72h  | 353               |

B)

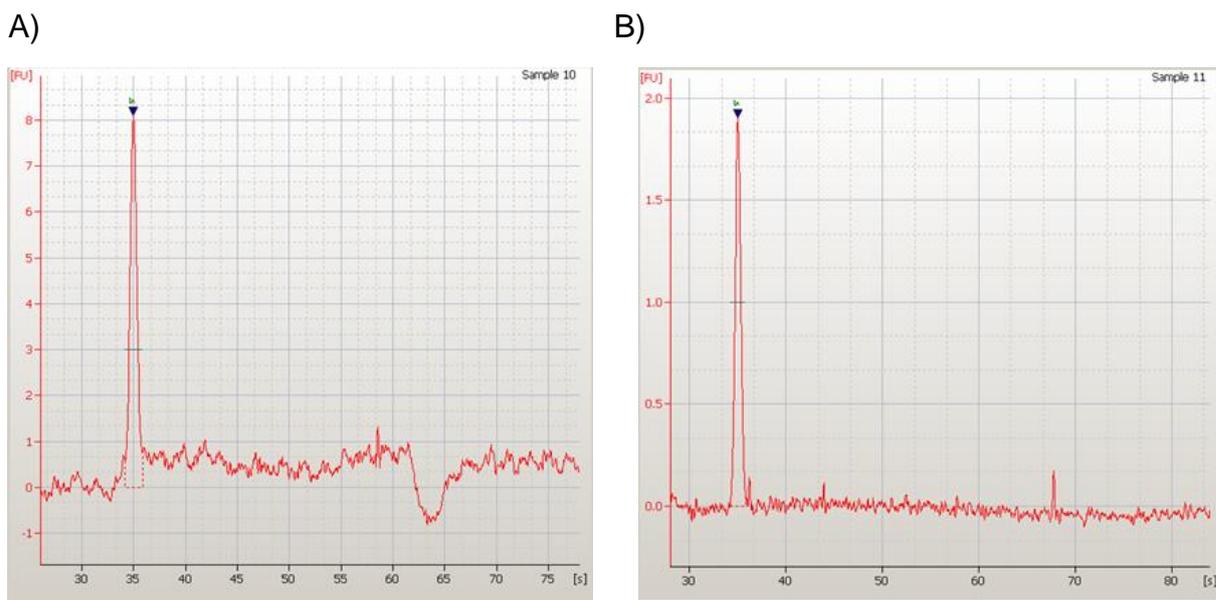


C)



**Figura 5.4 – Quantificação das frações monossomal e polissomal.** Células provenientes do doador TA81p6. A) Gel virtual das amostras de pequenos RNAs associados aos monossomos situação NI (1), polissomos situação NI (2), monossomos situação 72h (3), polissomos situação 72h (4) e suas respectivas concentrações. B) Quadrante superior esquerdo distribuição de tamanho dos RNAs da fração monossomal não induzida à adipogênese, quadrante inferior esquerdo distribuição de tamanho dos RNAs da fração monossomal induzida à diferenciação por 72h. C) Quadrante superior direito distribuição de tamanho dos RNAs da fração polissomal não induzida à adipogênese, quadrante inferior direito distribuição de tamanho dos RNAs da fração polissomal induzida à diferenciação por 72h.

A amostra de RNA polissomal NI foi submetida ao sistema fracionador flashPAGE™ para purificação dos fragmentos de aproximadamente 20 nt. Foi observado que assim como no experimento 1 (**Figura 5.2**), quase todo o material foi perdido durante a purificação, a partir de 436 ng iniciais restaram apenas 8 ng após a purificação (**Figura 5.5 A**). Na **Figura 5.5 B** é possível observar que o perfil da água gerado pelo Bioanalyzer é similar ao da amostra, não reconhecendo nenhum pico além do marcador (4 nt).



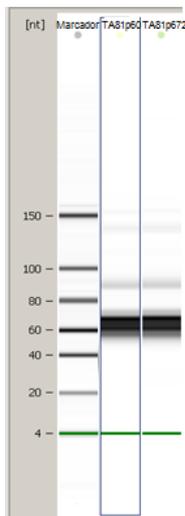
**Figura 5.5 – Fração polissomal NI submetida ao sistema fracionador flashPAGE™.** A) RNAs de aproximadamente 20 nt recuperados da fração 12-15 min. B) Água submetida à avaliação no Bioanalyzer.

Embora a quantidade de pequenos RNAs total obtida a partir da extração com mirVana™ tenha sido satisfatória (**Figura 5.6**), a quantidade de miRNAs detectada pelo equipamento foi muito baixa, aproximadamente 14 ng de RNA da condição NI e 29 ng para a condição 72h. Sabendo que a quantidade ideal para o sequenciamento é de 100 ng, foram necessárias alterações no protocolo para aumentar a quantidade de material isolado.

A quantidade de garrafas de 150 cm<sup>2</sup> utilizadas por condição para extração de pequenos RNAs total aumentou para quatro e a extração do RNA total passou a ser feita com TRIzol®, em vez de mirVana™. A **Figura 5.7** ilustra o perfil gerado por este tipo de extração quando o material é submetido à plataforma 2100 Bioanalyzer, bem como a quantificação da amostra. Pode-se perceber que a banda referente aos 20 nt ainda não pode ser visualizada no gel virtual, possivelmente devido a grande quantidade de RNAs de aproximadamente 80 nt que mascara os demais materiais.

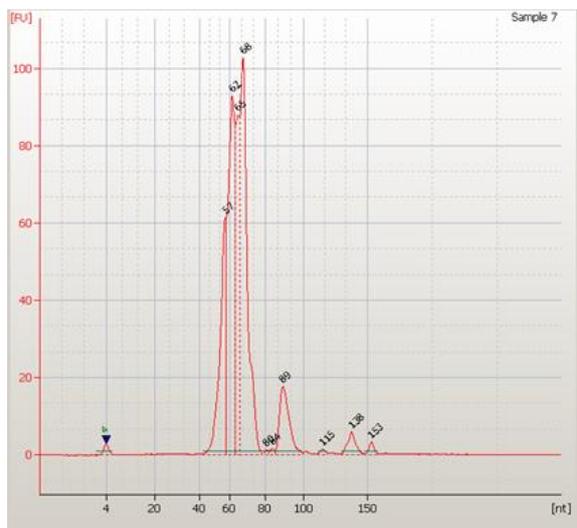
Embora a porcentagem de miRNAs em relação ao total de pequenos RNAs tenha sido pequena, a concentração de miRNAs obtida por esse método de extração, e pelo aumento na quantidade de garrafas, foi mais eficiente, aproximadamente 89 ng.

A)

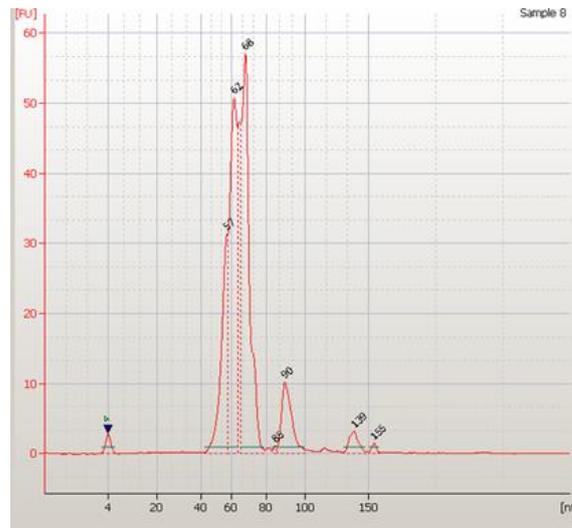


|   | Amostra       | Concentração (ng) |
|---|---------------|-------------------|
| 1 | RNA total NI  | 1844              |
| 2 | RNA total 72h | 991               |

B)

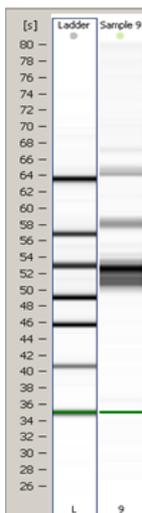


C)

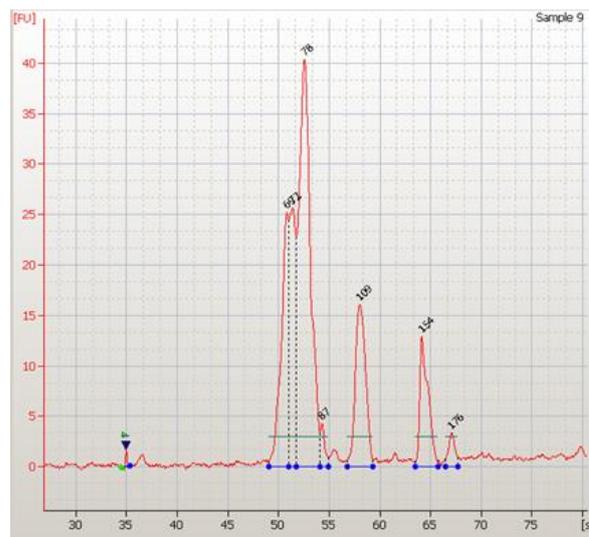


**Figura 5.6 – Avaliação da extração de pequenos RNAs total com mirVana™.** A) Gel virtual e quantificação do RNA total do paciente TA81p6 condição NI B) Não induzido à adipogênese, C) Induzido à diferenciação por 72h.

A)



B)



|   |              | Concentração (ng) |
|---|--------------|-------------------|
| 1 | RNA total NI | 3432              |

**Figura 5. 7 – Avaliação da extração de pequenos RNAs total com TRIzol®.** A) Gel virtual e quantificação RNA total do paciente TA81p6 condição NI. B) Perfil gerado pelos RNAs de diferentes tamanhos.

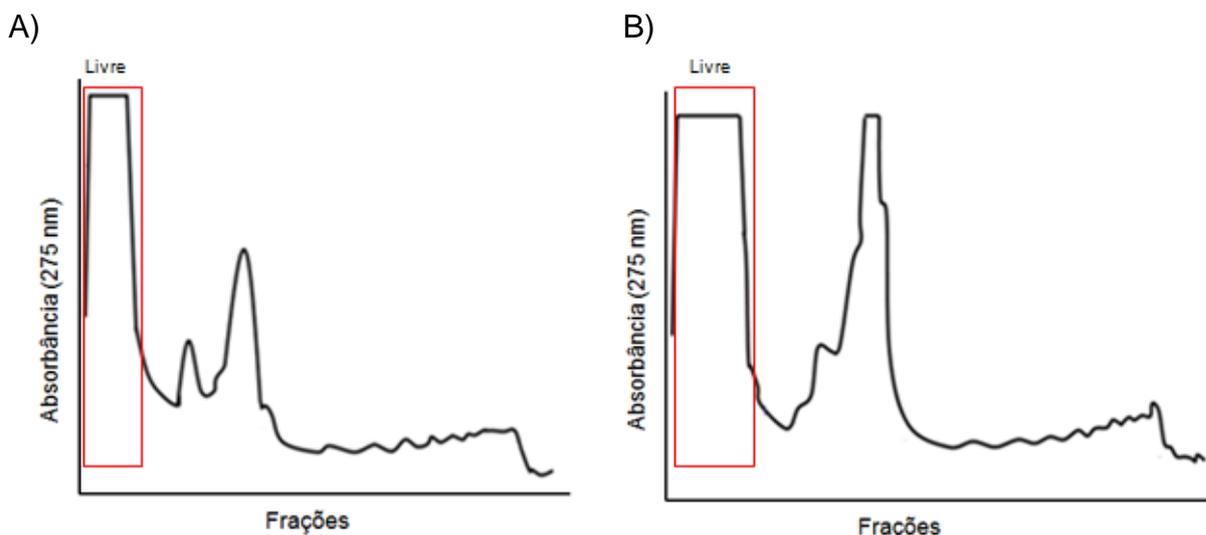
### 5.1.2 Isolamento e enriquecimento de pequenos RNAs associados aos polissomos provenientes de células obtidas por tripsinização celular

Sabendo da necessidade de aumentar a quantidade final de miRNAs, o método de raspagem de células das garrafas de cultivo foi substituído pela tripsinização celular. Levando em consideração o fato de que a tripsinização solta a células individualmente, e a raspagem das células é mais propensa à formação de grupos de células, as células passaram a ser contadas, incluindo um novo passo de controle do experimento: a quantidade final de células. A partir deste ponto foi estabelecido o número ideal de células para se trabalhar por experimento, entre 3 e  $6 \times 10^6$  células por condição.

Na tentativa de aumentar a eficiência dos experimentos, uma nova fração foi incluída: fração livre de ribossomos. Esta nova fração substituiu a extração de pequenos RNAs total com TRIzol, tendo em mente que o objetivo é comparar miRNAs associados e não associados aos polissomos, a ideia inicial não foi alterada. Com a eliminação da extração de RNA total, duas garrafas foram adicionadas a cada experimento, aumentando a quantidade de células para geração do perfil polissomal. Lembrando que, oito garrafas por condição (Não Indução e Indução 72h) não foram suficientes para extrair quantidades satisfatórias de RNAs

associados aos ribossomos e que a quantidade ideal para extrair pequenos RNAs total seria de aproximadamente quatro garrafas de 150 cm<sup>2</sup> por condição, o número de passagens para se obter a quantidade ideal de células para montar os experimentos teria de ser maior. Estudos anteriores do nosso grupo demonstram que com o aumento das passagens há diminuição no potencial de diferenciação das CTM (dados não publicados), podendo prejudicar os resultados. Trabalhar com a fração livre de ribossomos também permite a comparação direta entre as frações que contém miRNAs associados ou não aos ribossomos dentro de um experimento com as mesmas condições (ultracentrifugação, separação das frações do gradiente de sacarose, extração do RNA total com TRIzol® e, finalmente, purificação e enriquecimento dos RNAs menores que 200 nt).

A purificação dos miRNAs pelo fracionamento com flashPAGE™ também foi eliminada, pois em todos os testes realizados a quantidade de material recuperada foi muito pequena (menos de 10 ng). Dessa forma, optou-se por fazer uma purificação dos pequenos RNAs apenas durante a preparação do material para entrada na plataforma de sequenciamento. Na **Figura 5.8 C** pode-se notar o aumento na quantidade de material obtida com o novo protocolo para extração de pequenos RNAs associados aos polissomos.

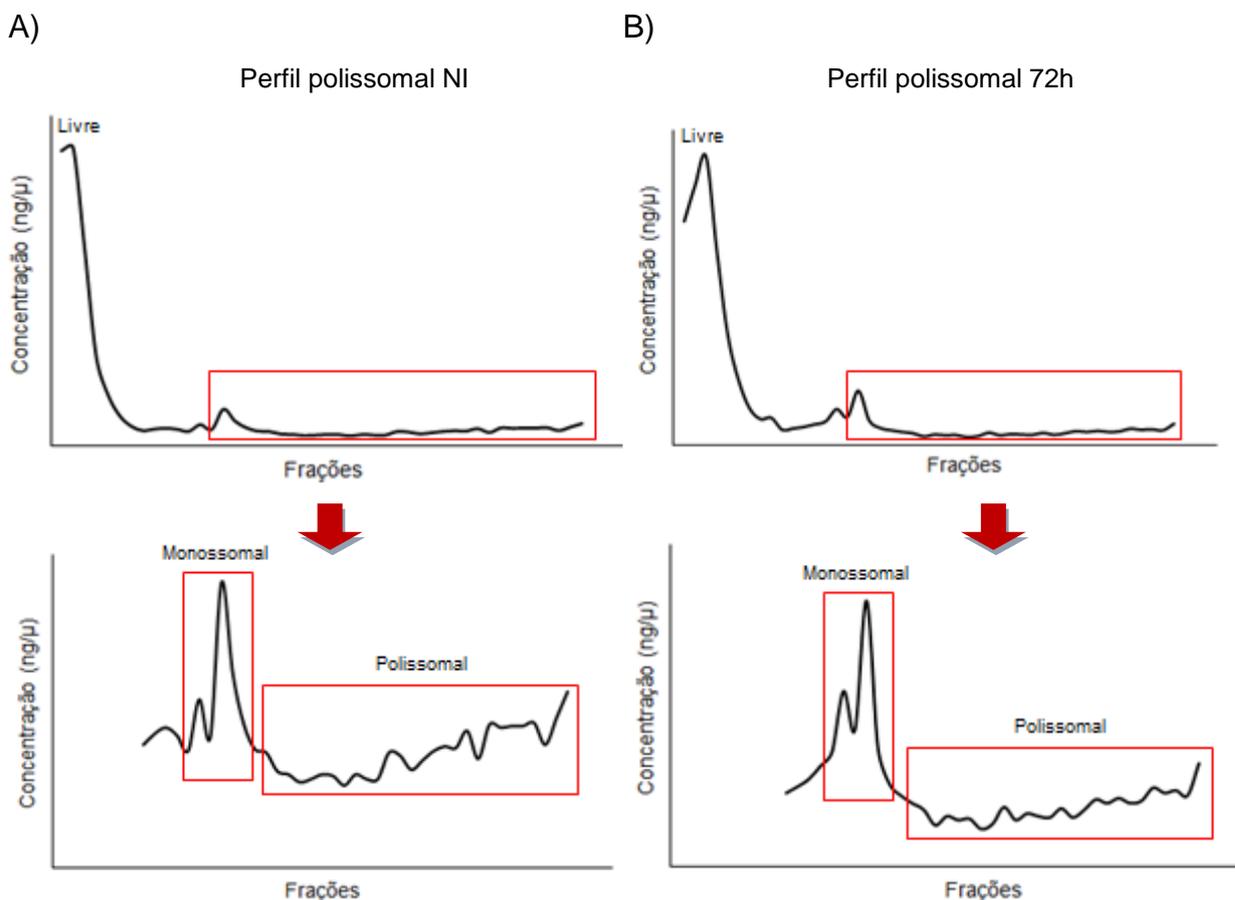


C)

| Amostra               | Concentração (ng) |
|-----------------------|-------------------|
| Fração livre NI       | 965               |
| Fração monossomal NI  | 250               |
| Fração polissomal NI  | 555               |
| Fração livre 72h      | 660               |
| Fração monossomal 72h | 355               |
| Fração polissomal 72h | 610               |

**Figura 5.8 - Perfis polissomais, de culturas tripsinizadas, gerados pelo fracionador de gradientes ISCO.** Estes dados foram gerados a partir do material do doador TA72p5. A) Perfil polissomal Não Indução. Em destaque a fração de RNAs não associados aos ribossomos. B) Perfil polissomal Indução 72h. C) Concentração de RNAs com menos de 200 nt. Dosagem realizada pelo espectrofotômetro ND-1000 (NanoDrop).

A última etapa que sofreu modificação envolve a coleta das frações do gradiente de densidade composto por sacarose. Após a ultracentrifugação, o gradiente de sacarose foi coletado manualmente, cada uma das frações de 250 µl foi dosada no espectrofotômetro ND-1000 (NanoDrop®) e os dados foram plotados para geração do perfil polissomal (**Figura 5.9 A e B**). Percebe-se que perfil gerado pela coleta manual é muito semelhante ao perfil gerado pelo fracionador ISCO (**Figura 5.1 e 5.2**).



**Figura 5.9 – Perfil polissomal gerado pelo fracionamento manual dos gradientes de sacarose.** Material obtido do doador TA86p5. A) Perfil polissomal da condição Não Indução. B) Perfil polissomal da condição Indução 72h. Os gráficos da posição inferior dos gráficos A e B representam apenas as frações monossomal e polissomal em aumento.

## 5.2 IDENTIFICAÇÃO DE microRNAS NA DIFERENCIAÇÃO CELULAR

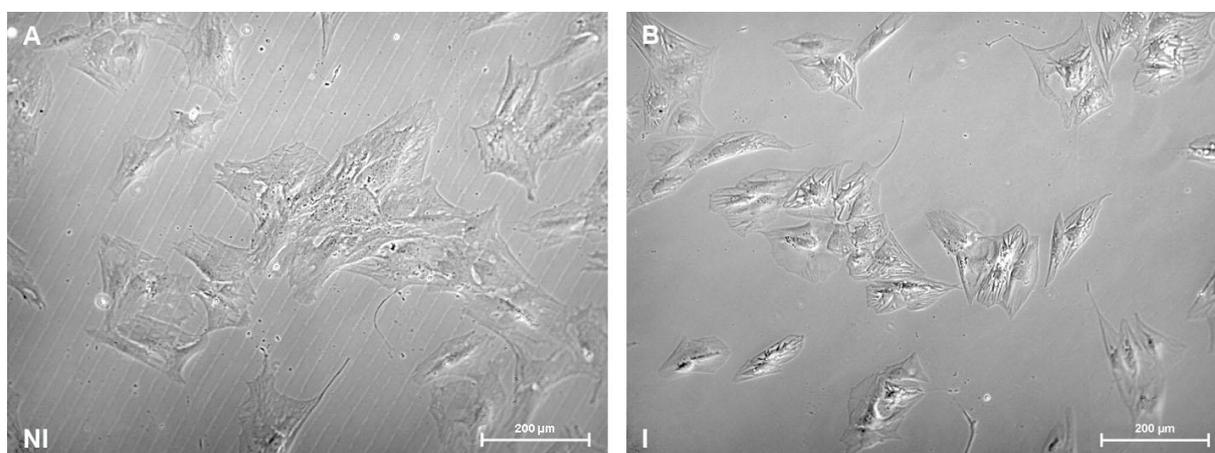
### 5.2.1 Modelo de diferenciação celular: adipogênese

CTM podem ser diferenciadas em diversos tipos celulares, como já descrito no tópico 1.1, contudo, nem todos os tipos de diferenciação são quantificáveis e podem ser acompanhados. A diferenciação adipogênica oferece uma grande vantagem quanto a isso, pois, após a coloração, pode ser realizada uma quantificação relativa da diferenciação, por meio da medida de absorbância do corante ou quantificação da fluorescência emitida pelas células coradas, ou ainda, por meio da contagem das células diferenciadas e não diferenciadas pode ser feita uma quantificação absoluta da porcentagem de células diferenciadas. Outra grande vantagem de utilizar a adipogênese como modelo é que o processo de diferenciação pode ser acompanhado facilmente em microscópios ópticos mesmo sem coloração.

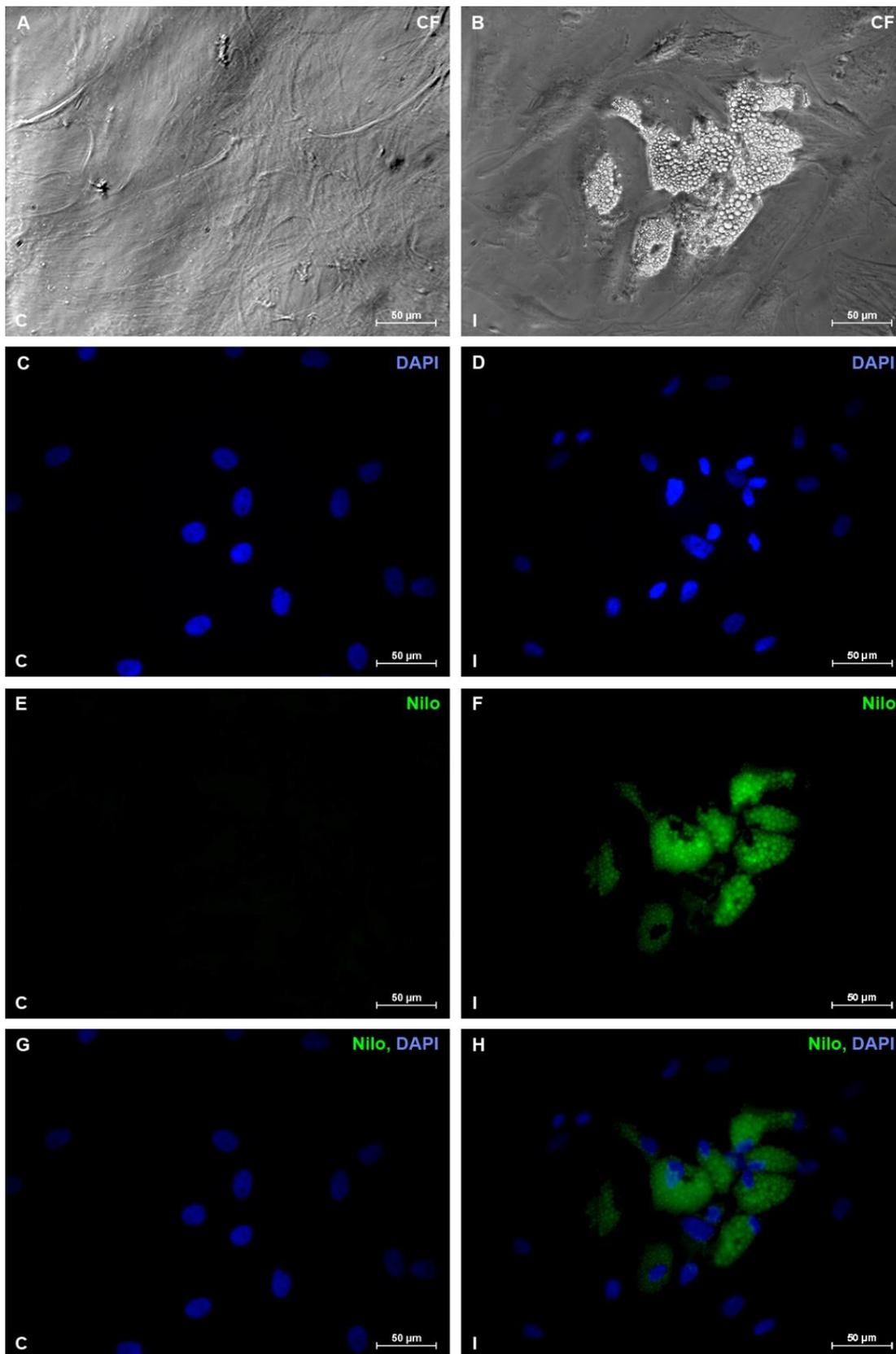
Tendo em vista que o objetivo do projeto, que é isolar miRNAs envolvidos na manutenção da autorrenovação das CTM, ou envolvidos com o comprometimento e manutenção das células com a diferenciação, foi decidido avaliar um tempo inicial de diferenciação. O processo de formação de adipócitos dura entre 14 e 21 dias, dependendo do meio de diferenciação utilizado. Com o meio utilizado neste trabalho, DIII, o tempo é de 14 dias. Trabalhos prévios do laboratório demonstram que 72h de indução à adipogênese são suficientes para comprometer CTM, e mantê-las comprometidas à adipócitos (SPANGENBERG *et al.*, 2013).

Durante este curto período de indução, pouca mudança morfológica é observada nas CTM, quando comparadas ao controle. Neste ponto ainda não há presença de vesículas lipídicas, porém há grande mudança na expressão gênica destas células, como descrito anteriormente por Spangenberg e colaboradores, 2013 (**Figura 5.10**).

Para o controle da porcentagem de diferenciação adipogênica, algumas culturas foram mantidas sob indução até o final do processo (14 dias). Após a coloração, é possível visualizar as gotículas lipídicas coradas em verde (**Figura 5.11**). Por meio do método de quantificação absoluta (contagem celular) é possível inferir que, em média, as culturas diferenciaram cerca de 50%.



**Figura 5.10 – CTM induzidas à diferenciação adipogênica por 72h.** CTM, paciente TA86p4, visualizadas em contraste de fase. A) CTM não submetidas à diferenciação adipogênica. B) CTM induzidas à adipogênese por 72h.



**Figura 5.11 – Diferenciação adipogênica de CTM por 14 dias.** CTM, TA 84, foram submetidas à diferenciação com meio DIII e coradas com Vermelho Nilo. A) CTM não submetidas à adipogênese visualizadas em contraste de fase. B) CTM submetidas à adipogênese visualizadas em contraste de fase. C) Núcleos das CTMs não submetidas à adipogênese corados com DAPI. D) Núcleos das CTM submetidas à adipogênese corados com DAPI. E) CTM não induzidas à adipogênese em microscopia de fluorescência. F) CTMs induzidas à adipogênese em microscopia de fluorescência é possível visualizar as gotículas lipídicas dos adipócitos em verde. G) Sobreposição das imagens dos núcleos e CTMs não induzidas à adipogênese. H) Sobreposição das imagens dos núcleos e adipócitos provenientes de CTM induzidas.

Para avaliar os efeitos dos miRNAs encontrados neste trabalho, descritos a seguir, no processo de diferenciação adipogênica, as CTM poderão ser tratadas com antimRNAs ou miRNAs miméticos, que diminuem ou aumentam a concentração dos miRNAs na célula, respectivamente. Após o tratamento, as células poderão ser induzidas à adipogênese e avaliadas quanto ao seu potencial de diferenciação.

### 5.2.2 Preparação das amostras para o sequenciamento em larga escala

CTM foram expandidas até  $3,5-8,0 \times 10^6$  células no total, e cultivadas em 20 garrafas de  $150 \text{ cm}^2$  com  $1,7$  a  $4,0 \times 10^5$  células por garrafa, esse número foi atingido na quinta ou sexta p de células. Metade das garrafas foi induzida à adipogênese por 72h (condição Indução 72h), enquanto a outra metade continuou sendo tratada com as mesmas condições da expansão (condição Não Indução). As células foram tripsinizadas após atingirem entre 40 e 50 % de confluência, e foram obtidas de 3 a  $6 \times 10^6$  células por condição. Como já descrito em **5.1**, o lisado celular foi submetido a um gradiente de densidade composto por sacarose e suas frações foram coletadas manualmente para geração do perfil polissomal (**Figura 5.9 A e B**). Os RNAs das frações livre de ribossomos, associados aos monossomos e polissomos foram extraídos com TRIzol® e os RNAs menores que 200 nt foram enriquecidos com mirVana™, como descrito em **5.1.2**.

Trabalhou-se com o material em quadriplicata biológica e a quantidade de RNA obtida após a purificação com mirVana™ foi submetida ao sequenciamento (**Quadro 5.1**).

| Amostra  | Livre | Monossomal | Polissomal |
|----------|-------|------------|------------|
| TA86 NI  | 2340  | 590        | 1180       |
| TA86 72h | 1260  | 340        | 940        |
| TA87 NI  | 1490  | 400        | 230        |
| TA87 72h | 730   | 500        | 280        |
| TA84 NI  | 4650  | 950        | 1670       |
| TA84 72h | 3790  | 1060       | 830        |
| TA74 NI  | 4470  | 810        | 1480       |
| TA74 72h | 2900  | 1100       | 1020       |

**QUADRO 5.1** – Quantificação dos RNAs menores que 200 nt enriquecidos com mirVana. Concentração total de RNA obtido (em ng).

Para preparação das amostras para o sequenciamento em larga escala foram utilizados inicialmente 100 ng de amostra. O cDNA resultante foi submetido à eletroforese e os fragmentos de tamanho apropriado foram excisados do gel e divididos em quatro fragmentos (bandas A, B, C e D). O material de uma das bandas resultantes (banda B) foi amplificado e quantificado com *Qubit® dsDNA HS Assay Kit*. Algumas amostras estavam em baixa concentração e não foram detectadas pelo método (**Quadro 5.2**).

|    | <b>Amostra</b>             | <b>Concentração (ng/μl)</b> |
|----|----------------------------|-----------------------------|
| 1  | TA74 NI fração livre       | 1900                        |
| 2  | TA74 NI fração monossomal  | 167                         |
| 3  | TA74 NI fração polissomal  | 67                          |
| 4  | TA74 72h fração livre      | 192                         |
| 5  | TA74 72h fração monossomal | 10500                       |
| 6  | TA74 72h fração polissomal | 245                         |
| 7  | TA84 NI fração livre       | 351                         |
| 8  | TA84 NI fração monossomal  | 138                         |
| 9  | TA84 NI fração polissomal  | 82                          |
| 10 | TA84 72h fração livre      | -                           |
| 11 | TA84 72h fração monossomal | -                           |
| 12 | TA84 72h fração polissomal | -                           |
| 13 | TA86 NI fração livre       | -                           |
| 14 | TA86 NI fração monossomal  | 90                          |
| 15 | TA86 NI fração polissomal  | -                           |
| 16 | TA86 72h fração livre      | -                           |
| 17 | TA86 72h fração monossomal | -                           |
| 18 | TA86 72h fração polissomal | -                           |
| 19 | TA87 NI fração livre       | 433                         |
| 20 | TA87 NI fração monossomal  | -                           |
| 21 | TA87 NI fração livre       | -                           |
| 22 | TA87 72h fração livre      | -                           |
| 23 | TA87 72h fração monossomal | -                           |
| 24 | TA87 72h fração polissomal | -                           |

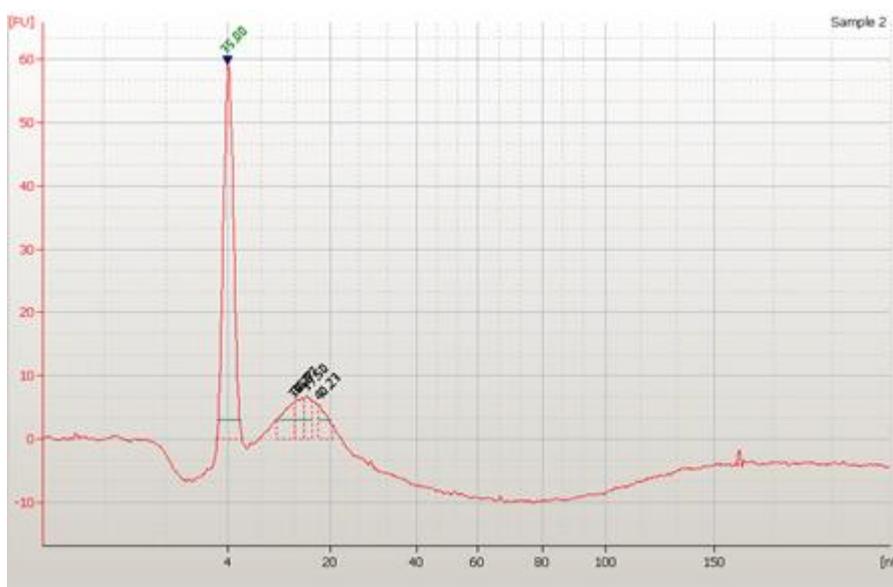
**QUADRO 5.2** - Quantificação do material resultante da amplificação do cDNA (banda B) utilizando Qubit.

Na tentativa de completar todas as amostras de um paciente, TA84, as PCRs do paciente foram repetidas, desta vez utilizando o material das bandas A e C. Porém, a amostra TA84 72h Polissomal ainda não pode ser detectada pelo método de quantificação (**Quadro 5.3**).

|    | <b>Amostra</b>             | <b>Concentração (ng/μl)</b> |
|----|----------------------------|-----------------------------|
| 11 | TA84 NI fração polissomal  | 100                         |
| 12 | TA84 72h fração livre      | 391                         |
| 11 | TA84 72h fração monossomal | 70                          |
| 12 | TA84 72h fração polissomal | -                           |

**QUADRO 5.3** - Quantificação do material resultante da amplificação do cDNA (banda A e C) utilizando Qubit.

Tendo em mente que mesmo com a repetição das PCRs talvez nem todos os materiais pudessem ser quantificados, a preparação de amostras foi reiniciada. Talvez devido a grande quantidade de amostra de RNAs de pequeno tamanho, como tRNAs, em relação à pequena quantidade de miRNAs (**Figura 5.7**), tenha sido prejudicial à ligação dos adaptadores aos miRNAs, esses servem como *primers* das reações de transcrição reversa e amplificação por PCR, o que prejudicaria estas etapas. Na tentativa de aumentar a eficiência de ligação dos adaptadores, uma pré-purificação foi realizada com uma das amostras (TA84 NI polissomal), para obtenção apenas de microRNAs, utilizando 500 ng de material. A amostra foi submetida à eletroforese em gel de agarose a banda de aproximadamente 25 nt foi excisada do gel. Após a purificação do RNA, a quantidade de material obtida foi de aproximadamente 5 ng, segundo a quantificação pela plataforma 2100 Bioanalyzer (**Figura 5.12**). Devido à pequena quantidade de material obtida, a pré-purificação foi descartada.



**Figura 5.12** – Pré-purificação dos pequenos RNAs pelo método de extração do gel de poli-acrilamida. Quantificação da amostra TA84 NI polissomal por 2100 Bioanalyzer.

Sendo assim, a nova preparação das amostras foi iniciada apenas aumentando a quantidade de material de 100 ng para 500 ng. A amostra TA87 não pôde ser repetida, pois não havia quantidade suficiente de material das frações monossomal e polissomal, as demais amostras foram repetidas e todas foram detectadas na dosagem, as quantificações estão demonstradas no **Quadro 5.4**. A biblioteca submetida ao sequenciamento possuía, então, amostras de três pacientes, TA74, TA84 e TA86, na concentração de 50 pg/µl.

|    | <b>Amostra</b>             | <b>Concentração (ng/µl)</b> |
|----|----------------------------|-----------------------------|
| 9  | TA84 72h fração monossomal | 95                          |
| 10 | TA84 72h fração polissomal | 82                          |
| 14 | TA86 NI fração monossomal  | 68                          |
| 15 | TA86 NI fração polissomal  | 113                         |
| 16 | TA86 72h fração livre      | 69                          |
| 17 | TA86 72h fração monossomal | 145                         |
| 18 | TA86 72h fração polissomal | 58                          |

**QUADRO 5.4** - Quantificação do material resultante da amplificação do cDNA (banda B) utilizando Qubit.

### 5.2.3 Sequenciamento em larga escala de pequenos RNAs associados aos polissomos

O sequenciamento dos microRNAs foi realizado utilizando a plataforma SOLiD e os dados obtidos foram enviados a Unidade de Bioinformática do Instituto Pasteur Montevideo para análise. O objetivo das análises foi identificar novos miRNAs e miRNAs diferencialmente expressos entre as condições Não Indução e Indução 72h, nas frações livre de ribossomos e associado aos polissomos, associado aos monossomos e associado aos polissomos. O primeiro passo foi avaliar os miRNAs associados aos polissomos, que poderiam indicar miRNAs reguladores dos processos de elongação da tradução. Durante as análises verificou-se que vários fragmentos da biblioteca eram contaminantes e muitos outros apresentavam apenas sequências de adaptadores unidas. Nos **Quadros 5.5 e 5.6** pode-se observar a grande quantidade de *reads* obtidas para as amostras de RNAs associados aos polissomos, porém, a quantidade de miRNAs com adaptadores, tamanhos corretos e que mapeiam correspondem a aproximadamente 4% do total

de *reads*. Como já comentado, talvez a grande quantidade de amostra, em relação à pequena quantidade de miRNAs, tenha favorecido a ligação dos adaptadores aos contaminantes ou entre eles, pois no caso dos miRNAs não associados aos ribossomos (condição livre), é possível observar que aproximadamente 42% das *reads* apresentam tamanho correto e podem ser mapeadas. É esperado que na fração livre de ribossomos se encontre a maior quantidade e variedade de miRNAs, pois comparado ao total de miRNAs da célula é possível que nem todos estejam ativamente regulando o processo de tradução naquele momento. Além disso, mesmo os miRNAs que estão ativamente regulando a tradução podem ter algumas moléculas não associadas aos ribossomos, já que o processo da tradução é dinâmico e há constante montagem e desmontagem dos complexos polissomais.

Os dados das amostras de RNAs associados aos polissomos foram mapeados contra as sequências do banco de dados miRBase. Foram encontrados 16 miRNAs expressos: hsa-miR-1254, hsa-miR-1912, hsa-miR-197-5p, hsa-miR-3199, hsa-miR-328-5p, hsa-miR-4459, hsa-miR-4469, hsa-miR-4700-3p, hsa-miR-665, hsa-miR-6763-5p, hsa-miR-6775-5p, hsa-miR-6836-3p, hsa-miR-6858-5p, hsa-miR-8069, hsa-miR-8072. Dentre eles, quatro microRNAs (hsa-miR-3199, hsa-miR-4469, hsa-miR-6858-5p, hsa-miR-8072) foram encontrados mais expressos na condição 72h de indução.

| <b>Amostra</b> | <b>Condição</b> | <b># do total de reads</b> | <b># reads com adaptador</b> | <b># reads com tamanho correto (13-23bs)</b> | <b>% de reads com adaptador</b> | <b># reads mapeadas</b> | <b>Único* e só hsa</b> |
|----------------|-----------------|----------------------------|------------------------------|--|---------------------------------|-------------------------|------------------------|
| 1              | NI_livre        | 111214948                  | 17027885                     | 8980211                                      | 52,73826432                     | 294785                  | 38711                  |
| 2              | NI_mono         | 4540456                    | 512791                       | 32256  | 6,290282006                     | 1827                    | 43                     |
| 3              | NI_poli         | 11361990                   | 1854391                      | 165359                                       | 8,917159326                     | 1612                    | 681                    |
| 4              | 72h_livre       | 17846297                   | 2845701                      | 1654766                                      | 58,14967911                     |                         | 5317                   |
| 5              | 72h_mono        | 36905318                   | 1644317                      | 127379                                       | 7,746620633                     |                         | 197                    |
| 6              | 72h_poli        | 13502589                   | 1549288                      | 84476  | 5,45256918                      | 520                     | 177                    |
| 7              | NI_livre        | 20671207                   | 2503532                      | 1478796                                      | 59,06838818                     | 9772                    | 3345                   |
| 8              | NI_mono         | 14220187                   | 1812264                      | 164268                                       | 9,064242296                     |                         | 1619                   |
| 9              | NI_poli         | 11215971                   | 1486441                      | 172185                                       | 11,58370901                     | 1681                    | 606                    |
| 10             | 72h_livre       | 22708882                   | 2480896                      | 975944                                       | 39,33836807                     |                         | 2475                   |
| 11             | 72h_mono        | 20774686                   | 3091390                      | 32047  | 1,036653415                     |                         | 0                      |
| 12             | 72h_poli        | 21270367                   | 3567235                      | 32356  | 0,907033038                     | 424                     | 96                     |
| 13             | NI_livre        | 21790131                   | 2762916                      | 1117743                                      | 40,45519299                     |                         | 2385                   |
| 14             | NI_mono         | 13685132                   | 1373624                      | 14390  | 1,04759381                      |                         | 4                      |
| 15             | NI_poli         | 18089939                   | 2789352                      | 32106  | 1,151020022                     | 278                     | 54                     |
| 16             | 72h_livre       | 21189455                   | 2648956                      | 359520                                       | 13,57213936                     |                         | 458                    |
| 17             | 72h_mono        | 3291459                    | 82593                        | 2752   | 3,332001501                     |                         | 0                      |
| 18             | 72h_poli        | 19842195                   | 3170686                      | 30354  | 0,957332262                     | 48                      | 6                      |

**QUADRO 5.5** - Dados obtidos do sequenciamento das frações associadas aos polissomos (lâmina 1).

| <b>Amostra</b> | <b>Condição</b> | <b># do total de reads</b> | <b># reads com adaptador</b> | <b># reads com tamanho correto (13-23bs)</b> | <b>% de reads com adaptador</b> | <b># reads mapeadas</b> |
|----------------|-----------------|----------------------------|------------------------------|--|---------------------------------|-------------------------|
| 1              | NI_livre        |                            | 16840297                     | 8593969                                      | 51,03217004                     |                         |
| 2              | NI_mono         |                            | 504562                       | 30444  | 6,033748082                     |                         |
| 3              | NI_poli         | 10680416                   | 1878428                      | 150436                                       | 8,008611456                     | 1280                    |
| 4              | 72h_livre       |                            | 2865916                      | 1623670                                      | 56,65448673                     |                         |
| 5              | 72h_mono        |                            | 1756659                      | 132277                                       | 7,530032864                     |                         |
| 6              | 72h_poli        | 12986676                   | 1584898                      | 80455  | 5,076351917                     | 397                     |
| 7              | NI_livre        |                            | 2480805                      | 1408922                                      | 56,79293616                     | 8882                    |
| 8              | NI_mono         |                            | 1850443                      | 143010                                       | 7,728419627                     |                         |
| 9              | NI_poli         | 10538596                   | 1568598                      | 162059                                       | 10,33145522                     | 1095                    |
| 10             | NI_livre        |                            | 2635122                      | 955253                                       | 36,25080736                     |                         |
| 11             | 72h_mono        |                            | 3092533                      | 28056  | 0,907217482                     |                         |
| 12             | 72h_poli        | 19991278                   | 3627174                      | 27982  | 0,771454581                     | 421                     |
| 13             | NI_livre        |                            | 3371069                      | 1050757                                      | 31,16984553                     | 3697                    |
| 14             | NI_mono         |                            | 1405411                      | 13540  | 0,963419242                     |                         |
| 15             | NI_poli         | 17138598                   | 2793835                      | 28689  | 1,026868086                     | 156                     |
| 16             | 72h_livre       |                            | 2636524                      | 341818                                       | 12,96472173                     |                         |
| 17             | 72h_mono        |                            | 82593                        | 2170   | 2,6273413                       |                         |
| 18             | 72h_poli        | 19237502                   | 3182247                      | 28426  | 0,893268184                     | 48                      |

**QUADRO 5.6** – Dados obtidos do sequenciamento das frações associadas aos polissomos (lâmina 2).

Para saber se o problema foi durante o isolamento das amostras ou preparação da biblioteca de sequenciamento, quatro miRNAs (miR-31, miR-20a, miR199-b, miR-17), já identificados em CTM em outro trabalho realizado pelo grupo (ROBERGE *et al.*, 2013), porém não identificados no sequenciamento, foram testados por RT-qPCR. Utilizando as frações livres de ribossomos e associados aos ribossomos, ambos da situação Não Indução, observou-se que houve amplificação dos miRNAs da fração livre de ribossomos (dados não mostrados). Este resultado sugere que o problema encontrado nos resultados do sequenciamento podem ter ocorrido durante a preparação da biblioteca de sequenciamento, e não da amostra, já que os miRNAs estão presentes nas CTM, porém não puderam ser identificados por meio do sequenciamento.

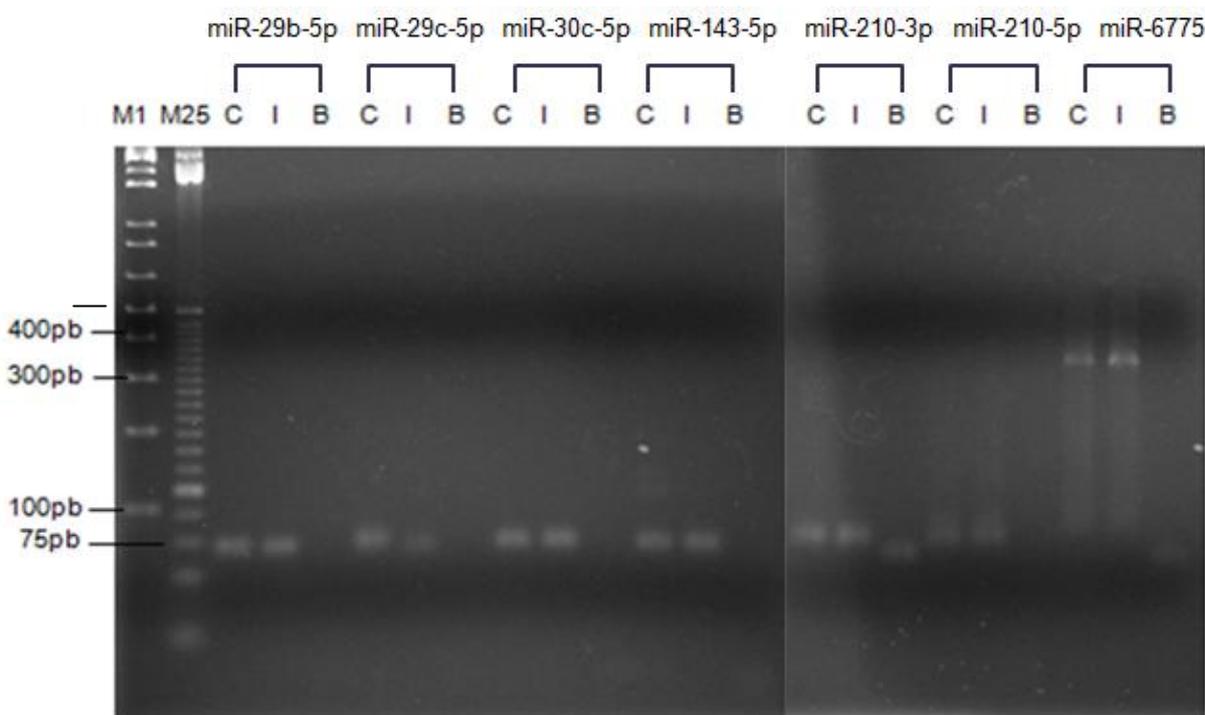
#### 5.2.4 Seleção de miRNAs para análise da expressão diferencial por RT-qPCR

Devido à pequena quantidade de *reads* viáveis, com adaptador, tamanho correto e mapeadas, dados de outro trabalho do grupo, Spangenberg *et al.*, 2013, foram adicionados a este. A pesquisa anterior também utilizou as condições 0 h e 72 h de indução adipogênica e RNAs associados aos polissomos, embora apenas mRNAs tenham sido o foco do trabalho, quando os dados obtidos do sequenciamento foram mapeados, alguns miRNAs também foram detectados. Foram selecionados para confirmação da expressão diferencial através de RT-PCR quantitativa (RT-qPCR) os miRNAs: hsa-miR-29b-1-5p, hsa-miR-29c-5p, hsa-miR-30c-5p, hsa-miR-143-5p, hsa-miR-210-3p, hsa-miR-210-5p e hsa-miR-6775-5p.

Para confirmação da presença dos miRNAs selecionados em CTM por RT-qPCR, os miRNAs foram submetidos à reação de poliadenilação, síntese de cDNA e, finalmente, à qPCR. O material utilizado nesta confirmação foi RNA total extraído com TRIzol®, desta forma são eliminadas etapas nas quais os miRNAs poderiam ser perdidos como a geração, e purificação das frações, do perfil polissomal e o enriquecimento dos miRNAs com mirVana™.

A cauda poli-A adicionada na reação de poliadenilação é de aproximadamente 45 resíduos de adeninas, sendo assim, o tamanho esperado dos miRNAs é de aproximadamente 70 nt. Dos sete miRNAs selecionados, seis se expressaram do tamanho correto e apenas um (hsa-miR-6775) se expressou de um tamanho acima do esperado (**Figura 5.13**). Embora o hsa-miR-210-3p tenha se

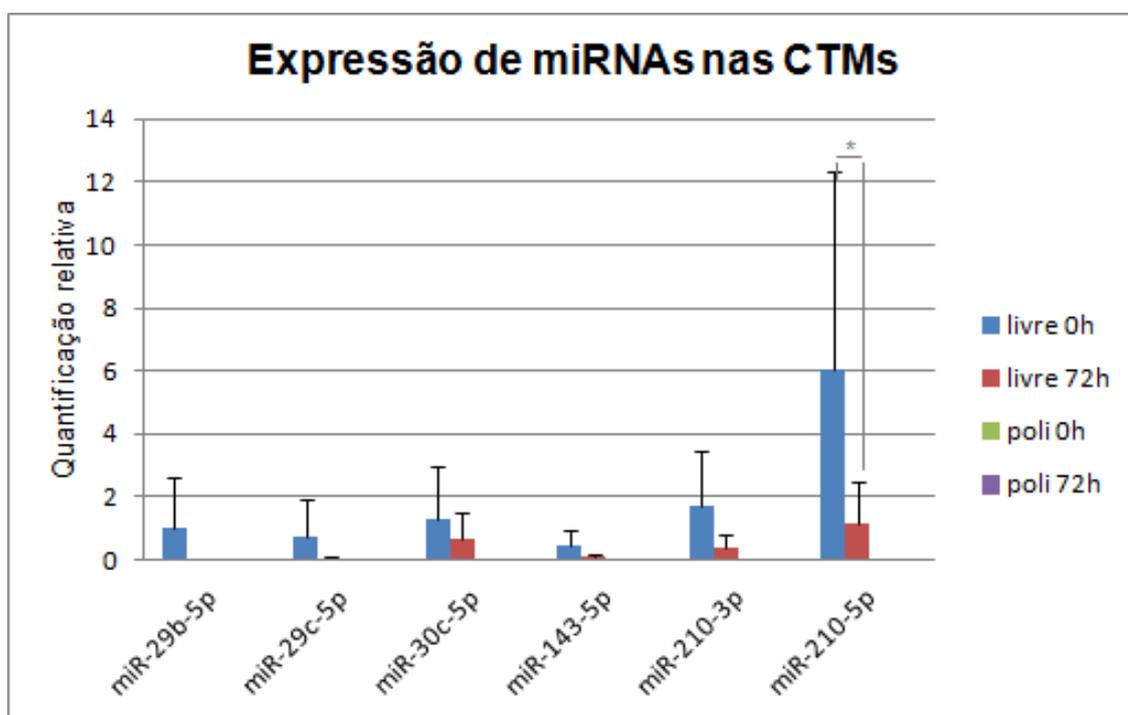
expressado nas condições NI e 72h, também houve amplificação da água. Para tentar resolver os problemas encontrados na expressão dos miRNAs hsa-miR-210-3p e hsa-miR-6775 e tornar a expressão mais específica, a temperatura de anelamento foi elevada de 60 °C para 65°C, contudo o mesmo perfil foi observado. No caso do hsa-miR-210-3p, o iniciador F pode conter algum contaminante, pois a amplificação na amostra da água é de tamanho diferente das amostras contendo cDNA, além disso, o uso da mesma água como branco para todas as demais amostras elimina a contaminação da água.



**Figura 5.13 – microRNAs expressos em CTM.** Os miRNAs foram amplificados e resolvidos em gel de agarose 3%. O cDNA de CTM foi sintetizados a partir de RNA submetidos à reação de adição da cauda poli-A com enzima *Poly-A polimerase*. Como controle negativo, a reação de PCR foi realizada na ausência de cDNA. M1 – Marcador 1kb Plus ladder (Invitrogen), M25 – Marcador 25pb ladder (Invitrogen), C – Não indução I – 72h indução adipogênica, B- branco.

Os miRNAs expressos no RNA total, e do tamanho correto, foram testados nas frações livre de ribossomos e associados aos ribossomos, tanto na condição NI quanto na condição 72h (**Figura 5.14**). A quantificação é relativa à curva da reação de qPCR e não há normalização, já que até o momento não se conhecem normalizadores para as condições avaliadas neste trabalho, ou seja, miRNAs associados aos ribossomos. Embora todos os miRNAs tenham sido encontrados mais expressos na situação NI, apenas o hsa-miR-210-5p apresentou diferença significativa quando as frações livre de ribossomos NI e 72h foram comparadas. Não foi detectada expressão de miRNAs associados aos polissomos, possivelmente

devido à pequena quantidade de material nesta fração, o método pode não ter sido sensível o suficiente para detectá-lo. Nesta fração era esperada uma pequena quantidade de material, mas devido às etapas de coleta dos gradientes de densidade, precipitação do RNA e síntese do cDNA o material pode ter sido perdido. Outra possibilidade é que o material esteja presente da amostra, porém devido aos resquícios de sacarose do gradiente de densidade a detecção não tenha sido possível. Avaliações realizadas no nosso grupo de pesquisa indicam que a razão da absorvância em 260/230 nm, de mRNAs purificados de gradientes de sacarose, é baixa e que talvez essa seja a razão para a falha na detecção de mRNAs por RT-qPCR. Apesar disso, materiais em grandes quantidades puderam ser detectados. A baixa razão da absorvância em 260/280 sugerem contaminação por TRIzol® e proteínas, e em 260/230 outros tipos de contaminantes copurificados. Observa-se que materiais obtidos de gradientes de sacarose aparentam ser viscosos, como a sacarose, o que leva a suposição que esse seria o possível contaminante. Para melhorar a purificação é possível aumentar a relação TRIzol®/sacarose e avaliar novamente a relação 260/230. Uma alternativa para detectar os miRNAs associados os polissomos pode ser realizar *Northern Blot* do material, pois a etapa de cDNA, uma das etapas de preparação para a RT-qPCR, será eliminada.



**Figura 5.14 – Expressão de miRNAs livres ou associados aos ribossomos nas CTM submetidas à diferenciação adipogênica.** São demonstrados os valores das médias das triplicatas técnicas e biológicas da quantificação relativa à curva do experimento. Teste realizado: ANOVA. Significativo (\*) para  $p < 0,01$ .

Os miRNAs encontrados neste trabalho já foram encontrados em outras pesquisas, principalmente na área do câncer. O nível do miR-29b foi encontrado diminuído em osteosarcomas, enquanto os níveis de miR-29b-1\* e miR-29c foram encontrados elevados em células do câncer de bexiga (XU *et al.*, 2013; ZHANG *et al.*, 2013). O miR-29c já foi associados a outros tipos de câncer, como o colorretal, melanoma e também à supressão de tumor (NGUYEN *et al.*, 2011; BAE *et al.*, 2013; YANG *et al.*, 2013). Embora estes resultados sejam inicialmente controversos, sabe-se que um único miRNA pode regular diversos alvos, sendo assim, os resultados sugerem que os múltiplos alvos do miR-29c nas diferentes células cancerígenas com expressão alterada podem ter efeitos diferentes nos diversos tipos de tumores, como oncogene ou como supressor de tumor. Já o miR-143 já foi encontrado em câncer de próstata, pulmão e mama, por exemplo (KOJIMA *et al.*, 2013; WU *et al.*, 2013; NG *et al.*, 2013; ZHANG *et al.*, 2013). Além disso, Gits e colaboradores, 2013, descreveram o miR-143 como potencial biomarcador diagnóstico para câncer de pulmão (GITS *et al.*, 2013). O último miRNA encontrado neste trabalho, miR-210, também já foi associado ao câncer, como o de pulmão e o osteosarcoma (CAI *et al.*, 2013; GROSSO *et al.*, 2013).

Muitas outras funções já foram atribuídas aos miRNAs encontrados neste estudo, o miR-29b já foi descrito como potencializador da osteogênese, encontrando-se regulado positivamente durante a diferenciação (LI *et al.*, 2009; TROMPETER *et al.*, 2013). Osteogênese e adipogênese têm sido descritas como processos inversos (MARK *et al.*, 2014), quando um processo é ativado o outro é inibido, sendo assim, a menor expressão do miR-29b após a indução adipogênica corrobora com os dados já publicados.

Os miRNAs miR-30c, miR-143 e miR-210 já foram associados de forma direta à produção de lipídeos ou diferenciação adipogênica. O aumento na expressão de miR-30 reduz a síntese lipídica em camundongos (SOH *et al.*, 2013). Neste trabalho o miR-30c encontrou-se mais expresso na condição NI, após a indução sua expressão diminuiu, possivelmente liberando da regulação os alvos responsáveis pela síntese lipídica e diferenciação adipogênica. Já o miR-143 foi descrito como regulador da adipogênese através da modulação da sinalização de MAP2k5-ERK5, além de suprimir a osteogênese por regular Osterix, um fator de transcrição essencial para a diferenciação osteogênica (CHEN *et al.*, 2014; LI *et al.*, 2014). Com relação ao miR-210, a diminuição de sua expressão foi relacionada à diminuição da adipogênese e obesidade (ORTEGA *et al.*, 2010; QIN *et al.*, 2010). Os dados obtidos

neste trabalho não corroboram com os trabalhos citados, pois demonstram que este miRNA está aumentado na condição não indução e diminuído após a indução, possivelmente liberando da regulação os alvos responsáveis pela diferenciação adipogênica, assim como acontece com o miR-30c. O aumento da expressão do miR-210, através da transfecção com miRNAs miméticos, após a indução adipogênica poderá confirmar as evidências.

Além das funções da diferenciação celular, o miRNA miR-29b já foi associado à regulação da fibrose cardíaca. O tratamento com antagonismos, que diminui a quantidade de miRNAs, leva ao excesso de fibrose (ABONNEC *et al.*, 2013). O infarto do miocárdio leva a perda da função cardíaca, devido à morte de cardiomiócitos e substituição por fibroblastos, desta forma, a possibilidade de controlar a formação de fibrose é promissora no contexto da terapia gênica e celular. Outras funções já descritas para o miR-210 incluem: indução de hipóxia celular, inibição da apoptose e regulação da proliferação e migração de CTA (CHAN *et al.*, 2012; KIM *et al.*, 2013; QIU *et al.*, 2013). O estudo dos miRNAs como reguladores da proliferação das CT abre a possibilidade para manipulação desse processo, por exemplo ao aumentar a proliferação mais células poderiam ser obtidas em menos tempo de cultura, tornando seu uso na terapia celular mais vantajoso.

#### 5.2.5 Avaliação dos alvos de miRNAs expressos nas CTM

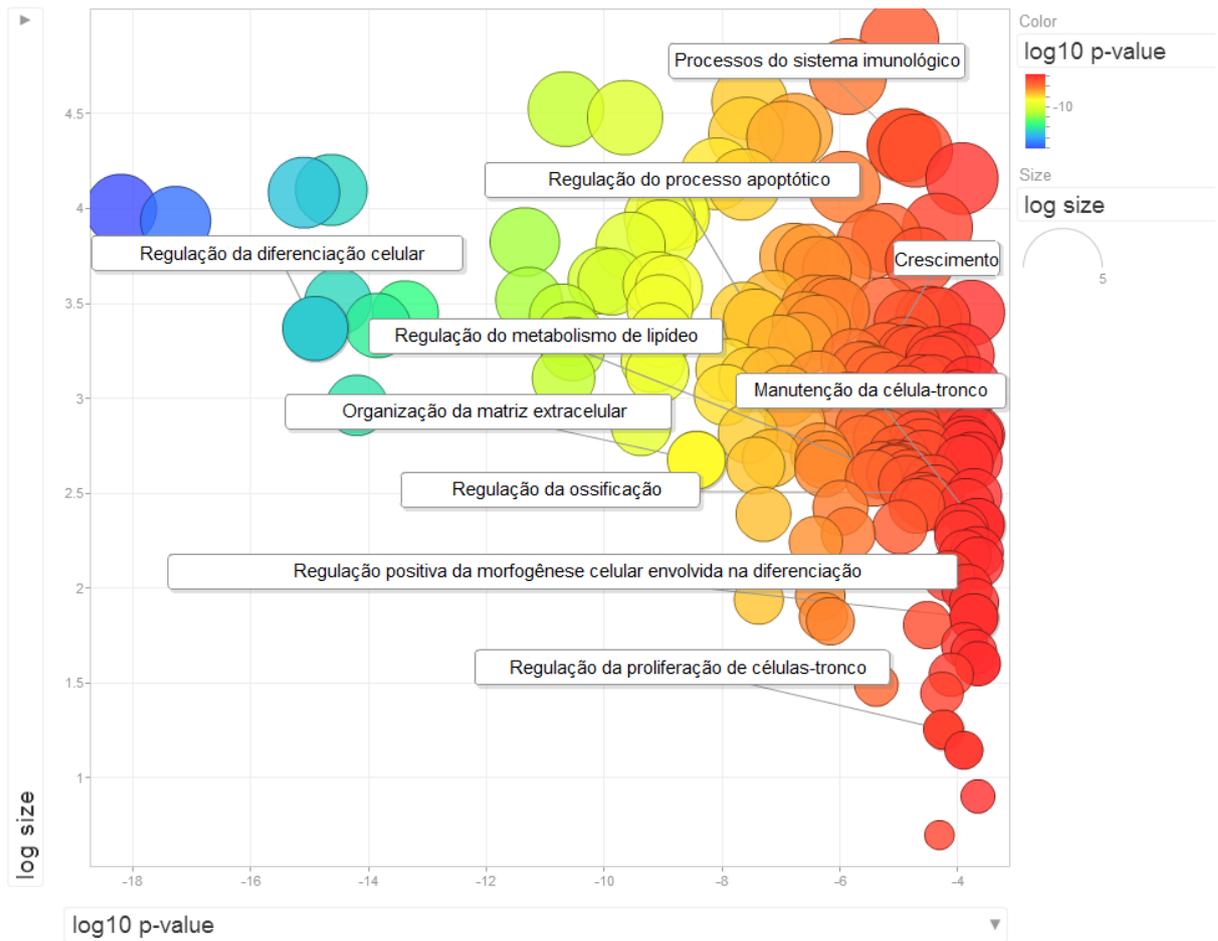
Como descrito em 1.2, miRNAs são grandes reguladores da expressão gênica, envolvidos em diversas vias que controlam processos fundamentais da célula. Como comentado anteriormente, um único miRNA pode ter como alvo centenas de mRNAs e um mRNA pode ser alvo de diferentes miRNAs. Em Spangenberg e colaboradores, 2013, foram avaliados apenas mRNAs associados aos polissomos diferencialmente expressos entre as condições NI e 72h. No presente trabalho encontramos 140 genes diferencialmente expressos, sendo que, 48 deles também codificam miRNAs. As análises mostraram que estes 48 genes de miRNAs são capazes de regular 127 genes, do total de 140, confirmando que poucos miRNAs podem afetar centenas de alvos podendo formar uma complexa rede regulatória.

Muitos estudos tem relatado diferentes perfis de miRNAs nos diferentes tipos celulares, logo, regulando diferentes alvos. Grande parte dos alvos é predita por bioinformática, por ferramentas como o TargetMiner, miRDB, TarBase,

microRNA.org e TargetScan. Porém, em CTM pouco se sabe sobre os alvos de miRNAs, principalmente envolvidos com a regulação da autorrenovação e diferenciação.

Utilizando o banco de dados do miRBase e ferramentas de predição, os miRNAs hsa-miR-29b-1-5p, hsa-miR-29c-5, hsa-miR-30c-5p, hsa-miR-143-5p, hsa-miR-210-3p e hsa-miR-210-5p, tiveram seus alvos, tanto preditos quanto validados, listados. Para que a relação de alvos fosse mais confiável foi feita uma intersecção dos alvos relatados pelas ferramentas TargetMiner, miRDB, TarBase, microRNA.org e TargetScan. Sabendo que a função desses alvos é, muitas vezes, integrada, uma ferramenta para geração de *Gene Ontology* (GO), *Gene Ontology enrichment analysis visualization* tool (GORilla), foi utilizada. Como *background* para comparação, uma lista contendo todos os genes expressos nas CTM nas condições trabalhadas (NI, 72h, fração polissomal) foi utilizada (SPANGENBERG *et al.*, 2013). A interação dos alvos individuais foi convertida em funções, como regulação da diferenciação celular, proliferação, adesão, apoptose, angiogênese, resposta ao estresse, comunicação celular, regulação da diferenciação osteoblástica e ossificação, resposta a lipídeo e regulação do processo de metabolismo de lipídeos são alguns exemplos das funções relacionadas. Como já comentado, osteogênese e adipogênese são processos contrários, dessa forma, é plausível que ambas as funções tenha sido encontradas, já que apenas a presença dos alvos é levada em conta pela ferramenta, não a quantidade expressa. Para melhor visualização das funções e da probabilidade estatística destas interações (*p value*), a ferramenta *Reduce Visualize Gene Ontology* (REVIGO) foi utilizada (**Figura 5.15**).

Estudos diminuindo ou aumentando a expressão de miRNAs e posterior avaliação da quantidade desses alvos, bem como alteração na expressão destes alvos, podem indicar qual a real função realizada pelos miRNAs nestas células. Além disso, para a geração de uma rede de integração de alvos mais confiável, o ideal seria avaliar os alvos de todos os miRNAs presentes em determinada condição. Para que isso seja possível, um novo sequenciamento será realizado. Desta vez as amostras serão preparadas de forma similar ao que foi descrito em **5.2.2**, porém não haverá enriquecimento com miRvana™, pois acredita-se que esta etapa de purificação possa ter sido prejudicial à preparação do material. A preparação irá começar com 1 µg de RNA, embora mais contaminantes possam ser encontrados, a possibilidade de encontrar miRNAs também pode ser maior, já que menos etapas de purificação e de possíveis perdas de miRNAs serão realizadas.



**Figura 5.15 – Funções relacionadas aos miRNAs expressos das CTM.** A intersecção dos alvos dos miRNAs hsa-miR-29b-1-5p, hsa-miR-29c-5, hsa-miR-30c-5p, hsa-miR-143-5p, hsa-miR-210-3p e hsa-miR-210-5p, foram por meio através das ferramentas GOrilla e REVIGO contra um *background* de todos os genes encontrados nas condições NI e 72h.

## 6. CONCLUSÃO

miRNAs associados aos ribossomos e não associados foram identificados em CTM-TA submetidas à diferenciação adipogênica. Visando o envolvimento dos miRNAs com o comprometimento das CTM com determinadas linhagens, as células foram induzidas à diferenciação por 72 h. O modelo utilizado foi a diferenciação adipogênica, sabendo que é um processo que dura entre 14 e 21 dias, dependendo do protocolo utilizado, 72 h de indução ainda pode ser considerado um tempo inicial, como observado por Spangenberg e colaboradores, 2013.

Embora o objetivo tenha sido identificar miRNAs responsáveis pela autorrenovação ou comprometimento das CTM com a diferenciação, ainda não foi possível concluir se os miRNAs encontrados apresentam esta função. Contudo, é possível inferir que há relação entre estes miRNAs e a diferenciação, pois a análise dos alvos revelou que a diferenciação pode ser uma das funções. Testes futuros utilizando miRNAs miméticos ou antimirs, que aumentam ou diminuem a concentração de miRNAs na célula, respectivamente, poderão nos indicar a função destes pequenos RNAs identificados. Além disso, outros modelos de diferenciação poderão ser testados, já que é possível que os mecanismos reguladores do início da diferenciação, ou desligamento da autorrenovação, sejam comuns a outros modelos.

Devido à pequena quantidade de miRNAs identificados, será necessário um novo sequenciamento para fornecer dados mais confiáveis de expressão dos miRNAs nas condições testadas. Além disso, o perfil mais completo de expressão poderá ser utilizado para avaliar a interação dos alvos de maneira mais ampla, indicando vias que podem estar ativas durante o processo inicial da diferenciação.

## REFERÊNCIAS

AMBROS, V. **The functions of animal microRNAs**. *Nature*, v. 431, p. 350-355, 2004.

AMERES, S. L.; ZAMORE, P. D. **Diversifying microRNA sequence and function**. *Molecular Cell Biology*, v. 14, p. 475-487, 2013.

ANOKYE-DANSO, F.; TRIVEDI, C. M.; JUHR, D.; GUPTA, M.; CUI, Z.; TIAN, Y.; ZHANG, Y.; YANG, W.; GRUBER, P. J.; EPSTEIN, J. A.; MORRISEY, E. E. **Highly efficient miRNA-mediated reprogramming of mouse and human somatic cells to pluripotency**. *Cell Stem Cell* v. 8, p. 376–388, 2011.

ANOKYE-DANSO, F.; SNITOW, M.; MORRISEY, E. E. **How microRNAs facilitate reprogramming to pluripotency**. *J Cell Sci.*, v. 125, p. 4179-4187, 2012.

BAE, H. J.; NOH, J. H.; KIM, J. K.; EUN, J. W.; JUNG, K. H.; KIM, M. G.; CHANG, Y. G.; SHEN, Q.; KIM, S. J.; PARK, W. S.; LEE, J. Y.; NAM, S. W. **MicroRNA-29c functions as a tumor suppressor by direct targeting oncogenic SIRT1 in hepatocellular carcinoma**. *Oncogene*, In press.

BAEK, D.; VILLÉN, J.; SHIN, C.; CAMARGO, F. D.; GYGI, S. P.; BARTEL, D. P. **The impact of microRNAs on protein output**. *Nature*, v. 455, p. 64–71, 2008.

BALLARINO, M.; PAGANO, F.; GIRARDI, E.; MORLANDO, M.; CACCHIARELLI, D.; MARCHIONI, M.; PROUDFOOT, N. J.; BOZZONI, I. **Coupled RNA processing and transcription of intergenic primary microRNAs**. *Mol. Cell. Biol.*, v. 29, p. 5632–5638, 2009.

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. **MicroRNA discovery and profiling in human embryonic stem cells by deep sequencing of small RNA libraries**. *Stem Cells*, v. 26, n.10, p. 2496–2505, 2008.

BARROSO-DELJESUS, A.; ROMERO-LÓPEZ, C.; LUCENA-AGUILAR, G.; MELEN, G. J.; SANCHEZ, L.; LIGERO, G.; BERZAL-HERRANZ, A.; MENENDEZ, P. **Embryonic stem cell-specific miR302-367 cluster: human gene structure and functional characterization of its core promoter**. *Mol. Cell Biol.*, v. 28, p. 6609-6619, 2008.

BARTEL, D. P. **MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function.** Cell, v. 116, p. 281-297, 2004.

BARTEL, D. P. **MicroRNAs: Target Recognition and regulatory functions.** Cell, v. 136, p. 215-233, 2009.

BAZZINI, A. A.; LEE, M. T.; GIRALDEZ, A. J. **Ribosome profiling shows that miR-430 reduces translation before causing mRNA decay in zebrafish.** Science v. 336, p. 233–237, 2012.

BERARDI, G. R.; REBELATTO, C. K.; TAVARES, H. F.; INGBERMAN, M.; SHIGUNOV, P.; BARCHIKI, F.; AGUIAR, A. M.; MIYAGUE, N. I.; FRANCISCO, J. C.; CORREA, A.; SENEGAGLIA, A. C.; SUSS, P. H.; MOUTINHO, J. A.; SOTOMAIOR, V. S.; NAKAO, L. S.; BROFMAN, P. S. **Transplantation of SNAP-treated adipose tissue-derived stem cells improves cardiac function and induces neovascularization after myocardium infarct in rats.** Exp Mol Pathol. v. 90, n. 2, p. 149-56, 2011.

BEREZIKOV, E.; CHUNG, W. J.; WILLIS, J.; CUPPEN, E.; LAI, E. C. **Mammalian mirtron genes.** Mol. Cell, v. 28, p. 328–336, 2007.

BIANCO, P. **Back to the Future: Moving Beyond “Mesenchymal Stem Cells”.** Journal of Cellular Biochemistry v. 112, p. 1713–1721, 2011.

BOHNSACK, M. T.; CZAPLINSKI, K.; GORLICH, D. **Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs.** RNA, v. 10, p. 185–191, 2004.

BONFIELD, T.; NOLAN M. T.; LENNON, D. P.; CAPLAN, A. I. **Defining human mesenchymal stem cell efficacy in vivo.** Journal of Inflammation v. 7, n. 51, 2010.

BORCHERT, G. M.; LANIER, W.; DAVIDSON, B. L. **RNA polymerase III transcribes human microRNAs.** Nature Struct. Mol. Biol., v. 13, p. 1097–1101, 2006.

BRENNECKE, J.; HIPFNER, D. R.; STARK, A.; RUSSELL, R. B.; COHEN, S. M. **bantam encodes a developmentally regulated microRNA that controls cell proliferation and regulates the proapoptotic gene hid in *Drosophila*.** Cell, v. 113, p. 25-36, 2003.

BRENNECKE, J.; STARK, A.; RUSSELL, R. B.; COHEN, S. M. **Principles of MicroRNA–Target Recognition.** Plos Biology, v. 3, n. 3, e85, 2005.

BRODERSEN, P.; SAKVARELIDZE-ACHARD, L.; BRUUN-RASMUSSEN, M.; DUNOYER, P.; YAMAMOTO, Y. Y.; SIEBURTH, L.; VOINNET, O. **Widespread translational inhibition by plant miRNAs and siRNAs.** *Science* v. 320, p. 1185–1190, 2008.

BUGANIM, Y.; FADDAH, D. A.; JAENISCH, R. **Mechanisms and models of somatic cell reprogramming.** *Nat Rev Genet.*, v. 14, p. 427-439, 2013.

BYDLOWSKI, S.; DEBES, A.; MASELLI, L.; JANZ, F. **Características biológicas das células-tronco mesenquimais.** *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* v. 31, p. 25-35, 2009.

CAI, X.; HAGEDORN, C. H.; CULLEN, B. R. **Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs.** *RNA*, v. 10, p. 1957–1966, 2004.

CAI, H.; LIN, L.; CAI, H.; TANG, M.; WANG, Z. **Prognostic evaluation of microRNA-210 expression in pediatric osteosarcoma.** *Med Oncol.* v.30, n.2, p. 499, 2013.

CAPLAN, A. I. **Mesenchymal stem cells.** *J Orthop Res.* v. 9, n. 5, p. 641-50, 1991.

CAPLAN, A. I.; DENNIS J. E. **Mesenchymal Stem Cells as Trophic Mediators.** *Journal of Cellular Biochemistry* v. 98, p. 1076–1084, 2006.

CHAN, Y. C.; BANERJEE, J.; CHOI, S. Y.; SEN, C. K. **miR-210: the master hypoxamir.** *Microcirculation*, v. 19, n. 3, p. 215-23, 2012.

CHEN, C. Z.; LI, L.; LODISH, H. F.; BARTEL, DP. **MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation.** *Science*, v. 303, n. 5654, p. 83-86, 2004.

CHEN, L.; HOU, J.; YE, L.; CHEN, Y.; CUI, J.; TIAN, W.; LI, C.; LIU, L. **MicroRNA-143 Regulates Adipogenesis by Modulating the MAP2K5-ERK5 Signaling.** *Sci Rep.* v. 4, p. 3819, 2014.

CHEN, Q.; SHOU, P.; ZHANG, L.; XU, C.; ZHENG, C.; HAN, Y.; LI, W.; HUANG, Y.; ZHANG, X.; SHAO, C.; ROBERTS, AI.; RABSON, A. B.; REN, G.; ZHANG, Y.; WANG, Y.; DENHARDT, D. T.; SHI, Y. **An osteopontin-integrin interaction plays a critical role in directing adipogenesis and osteogenesis by mesenchymal stem cells.** *Stem Cells*, v. 32, n. 2, p. 327-337, 2014.

CHENDRIMADA, T. P.; GREGORY, R. I.; KUMARASWAMY, E.; NORMAN, J.; COOCH, N.; NISHIKURA, K.; SHIEKHATTAR, R. **TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing.** Nature, v. 436, p. 740–744, 2005.

CHI, S. W.; ZANG, J. B.; MELE, A.; DARNELL, R. B. **Argonaute HITS-CLIP decodes microRNA-mRNA interaction maps.** Nature, v. 460, p. 479-486.

CHOI, E.; CHOI, E.; HWANG, K. **MicroRNAs as novel regulators of stem cell fate.** World Journal of Stem Cells, v. 5, n. 4, p. 172-187, 2013.

COLLETT, G. D.; CANFIELD, A. E. **Angiogenesis and pericytes in the initiation of ectopic calcification.** Circ. Res. v. 96, p. 930–938, 2005.

CORSELLI, M.; CHEN, C. W.; CRISAN, M.; LAZZARI, L.; PEULT, B. **Perivascular ancestors of adult multipotent stem cells.** Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. v. 30, p. 1104–1109, 2010.

DA SILVA MEIRELLES, L.; CAPLAN, A. I.; NARDI, N. B. **In Search of the in vivo Identity of Mesenchymal Stem Cells.** Stem Cells. v.26, n. 9, p. 2287-99, 2008.

DA SILVA MEIRELLES, L.; NARDI, N. B. **Methodology, biology and clinical applications of mesenchymal stem cells.** Front Biosci (Landmark Ed), v. 14, p. 4281-9428, 2009.

DENLI, A. M.; TOPS, B. B.; PLASTERK, R. H.; KETTING, R. F.; HANNON, G. J. **Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex.** Nature, v. 432, p. 231–235, 2004.

DJURANOVIC, S.; NAHVI, A.; GREEN, R. **miRNA-mediated gene silencing by translational repression followed by mRNA deadenylation and decay.** Science v. 336, p. 237–240, 2012.

DOHERTY, M. J.; ASHTON, B. A.; WALSH, S.; BERESFORD, J. N.; GRANT, M. E.; CANFIELD, A. E. **Vascular pericytes express osteogenic potential *in vitro* and *in vivo*.** J. Bone Miner. Res. v. 13, p. 828–838, 1998.

DOMINICI, M.; LE BLANC, K.; MUELLER, I.; SLAPER-CORTENBACH, I.; MARINI, F.; KRAUSE, D.; DEANS, R.; KEATING, A; PROCKOP, D. J.; HORWITZ, E. **Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells.** The International

Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, v. 8, n. 4, p. 315-7, 2006.

DOSTIE, J.; MOURELATOS, Z.; YANG, M.; SHARMA, A.; DREYFUSS, G. **Numerous microRNPs in neuronal cells containing novel microRNAs**. *RNA*, v. 9, n. 2, p. 180-186, 2003.

ECKFELDT, C.; MENDENHALL, E. E. M.; VERFAILLIE, C.M. **The molecular repertoire of the 'almighty' stem cell**. *Nature Reviews Mol. Cell. Bio.*, v.6, p. 726-737, 2005.

ESQUELA-KERSCHER, A.; TRANG, P.; WIGGINS, J. F.; PATRAWALA, L.; CHENG, A.; FORD, L.; WEIDHAAS, J. B.; BROWN, D.; BADER, A. G.; SLACK, F. J. **The let-7 microRNA reduces tumor growth in mouse models of lung cancer**. *Cell Cycle*, v. 7, p. 759–764, 2008.

FARH, K. K.; GRIMSON, A.; JAN, C.; LEWIS, B. P.; JOHNSTON, W. K.; LIM, L. P.; BURGE, C. B.; BARTEL, D. P. **The widespread impact of mammalian microRNAs on mRNA repression and evolution**. *Science*, v. 310, p. 1817–1821, 2005.

FARRINGTON-ROCK, C.; CROFTS, N. J.; DOHERTY, M. J.; ASHTON, B. A.; GRIFFIN-JONES, C.; CANFIELD, A. E. **Chondrogenic and adipogenic potential of microvascular pericytes**. *Circulation* v. 110, p. 2226–2232, 2004.

FRANK, F.; SONENBERG, N.; NAGAR B. **Structural basis for 5'-nucleotide base-specific recognition of guide RNA by human AGO2**. *Nature*, v. 465, p. 818–822, 2010.

FILIPOWICZ, WITOLD; BHATTACHARYYA, S. N.; SONENBERG, N. **Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight?** *Nature Reviews Genetics*, v. 9, p. 102- 114, 2008.

FRIEDMAN, R. C.; FARH, K. K.; BURGE, C. B.; BARTEL, D. P. **Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs**. *Genome Res.*, v. 19, p. 92–105, 2009.

FUKUNAGA, R.; HAN, B. W.; HUNG, J. H.; XU, J.; WENG, Z.; ZAMORE, P. D. **Dicer partner proteins tune the length of mature miRNAs in flies and mammals**. *Cell*, v. 151, p. 533–546, 2012.

GANGARAJU, V. K.; LIN, H. **MicroRNAs: key regulators of stem cells.** Nature Reviews Mol Cell Bio, v. 10, p. 116-125, 2009.

GARCHOW, B. G.; BARTULOS ENCINAS, O.; LEUNG, Y. T.; TSAO, P. Y.; EISENBERG, R. A.; CARICCHIO, R.; OBAD, S.; PETRI, A.; KAUPPINEN, S.; KIRIAKIDOU, M. **Silencing of microRNA- 21 in vivo ameliorates autoimmune splenomegaly in lupus mice.** EMBO Mol. Med., v. 3, 605–615, 2011.

GITS, C. M.; VAN KUIJK, P. F.; JONKERS, M. B.; BOERSMA, A. W.; SMID, M.; VAN IJCKEN, W. F.; COINDRE, J. M.; CHIBON, F.; VERHOEF, C.; MATHIJSEN, R. H.; DEN BAKKER, M. A.; VERWEIJ, J.; SLEIJFER, S.; WIEMER, E. A. **MicroRNA expression profiles distinguish liposarcoma subtypes and implicate miR-145 and miR-451 as tumor suppressors.** Int J Cancer., in press.

GOFF, L. A.; BOUCHER S.; RICUPERO, C. L. FENSTERMACHER, S.; SWERDEL, M.; CHASE, L. G.; ADAMS, C. C.; CHESNUT, J.; LAKSHMIPATHY, U.; HART, R. P. **Differentiating human multipotent mesenchymal stromal cells regulate microRNAs: prediction of microRNA regulation by PDGF during osteogenesis.** Exp Hematol, v. 36, p. 1354-1369, 2008.

GREENSPAN, P.; FOWLER, S. D. **Spectrofluorometric studies of the lipid probe, Nile red.** Journal of Lipid Research, v. 26, n. 7, p. 781-9, 1985.

GREGORY, R. I.; AMUTHAN, G.; CHENDRIMADA, T.; DORATOTAJ, B.; COOCH, N.; SHIEKHATTAR, R. **The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs.** Nature, v. 432, p. 235–240, 2004.

GREGORY, R. I.; CHENDRIMADA, T. P.; COOCH, N.; SHIEKHATTAR, R. **Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing.** Cell, v. 123, p. 631–640, 2005.

GRISHOK, A.; PASQUINELLI, A. E.; CONTE, D.; LI, N.; PARRISH, S.; HA, I.; BAILLIE, D. L.; FIRE, A.; RUVKUN, G.; MELLO, C. C. **Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control *C. elegans* developmental timing.** Cell, v.106, p. 23–34, 2001.

GROSSO, S.; DOYEN, J.; PARKS, S. K.; BERTERO, T.; PAYE, A.; CARDINAUD, B.; GOUNON, P.; LACAS-GERVAIS, S.; NOËL, A.; POUYSSÉGUR, J.; BARBRY, P.; MAZURE, N. M.; MARI, B. **MiR-210 promotes a hypoxic phenotype and increases radioresistance in human lung cancer cell lines.** Cell Death Dis., v. 14;4, p. e544, 2013.

GUO, H., INGOLIA, N. T., WEISSMAN, J. S.; BARTEL, D. P. **Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels.** Nature, v. 466, p. 835–840, 2010.

GUO, L.; ZHAO, R. C. H.; WU, Y. **The role of microRNAs in self-renewal and differentiation of mesenchymal stem cells.** Experimental Hematology, v. 39, p. 608-616, 2011.

HAASE, A. D.; JASKIEWICZ, L.; ZHANG, H.; LAINÉ, S.; SACK, R.; GATIGNOL, A.; FILIPOWICZ, W. **TRBP, a regulator of cellular PKR and HIV-1 virus expression, interacts with Dicer and functions in RNA silencing.** EMBO Rep., v. 6, p. 961–967, 2005.

HAFNER, M.; LANDTHALER, M.; BURGER, L.; KHORSHID, M.; HAUSSER, J.; BERNINGER, P.; ROTHBALLER, A.; ASCANO, M. JR.; JUNGKAMP, A. C.; MUNSCHAUER, M.; ULRICH, A.; WARDLE, G. S.; DEWELL S, ZAVOLAN M.; TUSCHL, T. **Transcriptome-wide identification of RNA-binding protein and microRNA target sites by PAR-CLIP.** Cell, v. 141, p. 129-141, 2010.

HAN, J.; LEE, Y.; YEOM, K.; KIM, Y.; JIN, H.; KIM, N. **The Drosha–DGCR8 complex in primary microRNA processing.** Genes & Development., v. 18, p. 3016–3027, 2004.

HAN, J.; LEE, Y.; YEOM, K. H.; NAM, J. W.; HEO, I.; RHEE, J. K.; SOHN, S. Y.; CHO, Y.; ZHANG, B. T.; KIM, V. N. **Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha–DGCR8 complex.** Cell, v. 125, p. 887–901, 2006.

HART, M.; NOLTE, E.; WACH, S.; SZCZYRBA, J.; TAUBERT, H.; RAU, T.; HARTMANN, A.; GRASSER, F. A.; WULLICH, B. **Comparative microRNA profiling of prostate carcinomas with increasing tumor stage by deep-sequencing.** Mol Cancer Res. in press.

HILTON, C.; NEVILLE, M. J.; KARPE, F. **MicroRNAs in adipose tissue: their role in adipogenesis and obesity.** International Journal of Obesity, v. 37, p. 325-332, 2013.

HIRSCHI, K. K.; D'AMORE, P. A. **Pericytes in the microvasculature.** Cardiovasc. Res., v. 32, p. 687–698, 1996.

HOLETZ, F. B.; CORREA, A.; AVILA, A. R.; NAKAMURA, C. V.; KRIEGER, M. A.; GOLDENBERG, S. **Evidence of P-body-like structures in *Trypanosoma***

**cruzi**. Biochemical and biophysical research communications v. 356, n. 4, p. 1062-1067, 2007.

HOUBAVIY, H. B.; MURRAY, M. F.; SHARP, P. A. **Embryonic stem cell-specific microRNAs**. Dev Cell, v. 5, n. 2, p. 351–358, 2003.

HUTVAGNER, G.; MCLACHLAN, J.; PASQUINELLI, A. E.; BÁLINT, E.; TUSCHL, T.; ZAMORE, P. D. **A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA**. Science, v. 293, p. 834–838, 2001.

HUTVAGNER, G.; SIMARD, M. **Argonaute proteins: key players in RNA silencing**. Nature, v. 9, p. 22-32, 2008.

JINEK, M.; DOUDNA, J. A. **A three-dimensional view of the molecular machinery of RNA interference**. Nature, v. 457, p. 405-412, 2009.

KALTZ, N.; RINGE, J.; HOLZWARTH, C.; CHARBORD, P.; NIEMEYER, M.; JACOBS, V. R.; PESCHEL, C.; HÄUPL, T.; OOSTENDORP, R. A. **Novel markers of mesenchymal stem cells defined by genome-wide gene expression analysis of stromal cells from different sources**. Exp. Cell Res., v. 316, p. 2609–2617, 2010.

KANELLOPOULOU, C.; MULJO, S. A.; KUNG, A. L.; GANESAN, S.; DRAPKIN, R.; JENUWEIN, T.; LIVINGSTON, D. M.; RAJEWSKY, K. **Dicer-deficient mouse embryonic stem cells are defective in differentiation and centromeric silencing**. Genes Dev., v. 19, p. 489-501, 2005.

KARGINOV, F. V.; CHELOUFI, S.; CHONG, M. M.; STARK, A.; SMITH, A. D.; HANNON, G. J. **Diverse endonucleolytic cleavage sites in the mammalian transcriptome depend upon microRNAs, Drosha, and additional nucleases**. Mol. Cell, v. 38, p. 781–788, 2010.

KATAOKA, N.; FUJITA, M.; OHNO, M. **Functional association of the microprocessor complex with the spliceosome**. Mol. Cell. Biol., v. 29, p. 3243–3254, 2009.

KHVOROVA, A.; REYNOLDS, A.; JAYASENA, S. D. **Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias**. Cell, v. 115, p. 209–216, 2003.

KIM, J.; KRICHEVSKY, A.; GRAD, Y.; HAYES, G.D.; KOSIK, K. S.; CHURCH, G.M.; RUVKUN, G. **Identification of many microRNAs that copurify with polyribosomes in mammalian neurons**. PNAS, v. 101, n. 1, 2004.

KIM, V. N.; NAM, J. **Genomics of microRNAs**. *TRENDS in Genetics*, v. 22, p. 165-173, 2006.

KIM, Y. K.; KIM, V. N. **Processing of intronic microRNAs**. *EMBO Journal*, v. 26, p. 775–83, 2007.

KIM, J. H.; PARK, S. G.; SONG, S. Y.; KIM, J. K.; SUNG, J.H. **Reactive oxygen species-responsive miR-210 regulates proliferation and migration of adipose-derived stem cells via PTPN2**. *Cell Death Dis.*, v.4, p. e588, 2013.

KOJIMA, S.; ENOKIDA, H.; YOSHINO, H.; ITESAKO, T.; CHIYOMARU, T.; KINOSHITA, T.; FUSE, M.; NISHIKAWA, R.; GOTO, Y.; NAYA, Y.; NAKAGAWA, M.; SEKI, N. **The tumor-suppressive microRNA-143/145 cluster inhibits cell migration and invasion by targeting GOLM1 in prostate cancer**. *J Hum Genet*. In press.

KOTA, J.; CHIVUKULA, R. R.; O'DONNELL, K. A.; WENTZEL, E. A., MONTGOMERY, C. L.; HWANG, H. W.; CHANG, T. C.; VIVEKANANDAN, P.; TORBENSON, M.; CLARK, K. R.; MENDELL, J. R.; MENDELL, J. T. **Therapeutic microRNA delivery suppresses tumorigenesis in a murine liver cancer model**. *Cell*, v. 137, p. 1005–1017, 2009.

LAGOS-QUINTANA, M. RAUHUT R, LENDECKEL W, TUSCHL T. **Identification of novel genes coding for small expressed RNAs**. *Science*, v. 294, p. 853-858, 2001.

LAKSHMIPATHY U.; LOVE, B.; GOFF, A.; JÖRNSTEN, R.; GRAICHEN, R.; HART, R. P.; CHESNUT, J. D. **MicroRNA expression pattern of undifferentiated and differentiated human embryonic stem cells**. *Stem Cells Dev*, v. 16, p. 1003-1016, 2007.

LANET, E.; DELANNOY, E.; SORMANI, R.; FLORIS, M.; BRODERSEN, P.; CRÉTÉ, P.; VOINNET, O.; ROBAGLIA, C. **Biochemical evidence for translational repression by Arabidopsis microRNAs**. *Plant Cell*, v. 21, p. 1762–1768, 2009.

LEE, R. C.; FEINBAUM, R. L.; AMBROS, V. **The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14***. *Cell*, v; 75, p. 843–854, 1993.

LEE, Y.; JEON, K.; LEE, J.; KIM, S.; LIM, N. **MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization.** EMBO Journal, v. 21, n. 17, p. 4663-4670, 2002.

LEE, Y.; AHN, C.; HAN, J.; CHOI, H.; KIM, J.; YIM, J.; LEE, J.; PROVOST, P.; RÅDMARK, O.; KIM, S.; KIM, V. N. **The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing.** Nature, v. 425, p. 415–419, 2003.

LEE, R. H.; KIM, B.; CHOI, I.; KIM, H.; CHOI, H. S.; SUH, K.; BAE, Y. C.; JUNG, J. S. **Characterization and expression analysis of mesenchymal stem cells from human bone marrow and adipose tissue.** Cell Physiol. Biochem., v. 14, p. 311–324, 2004.

LEE, Y.; KIM, M.; HAN, J.; YEOM, K. H.; LEE, S.; BAEK, S. H.; KIM, V. N. **MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II.** EMBO Journal, v. 23, p. 4051–4060, 2004.

LEE, Y.; HUR, I.; PARK, S. Y.; KIM, Y. K.; SUH, M. R.; KIM, V. N. **The role of PACT in the RNA silencing pathway.** EMBO Journal, v. 25, p. 522–532, 2006.

LEE, I.; AJAY, S. S.; YOON, J. I.; KIM, H. S.; HONG, S. H.; KIM, N. H.; DHANASEKARAN, S. M.; CHINNAIYAN, A. M.; ATHEY, B. D. **New class of microRNA targets containing simultaneous 5'-UTR and 3'-UTR interaction sites.** Genome Res, v. 19, p. 1175–83, 2009.

LEE, H. Y.; DOUDNA, J. A. **TRBP alters human precursor microRNA processing in vitro.** RNA, v.18, p. 2012–2019, 2012.

LEWIS, B. P.; BURGE, C. B.; BARTEL, D. P. **Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets.** Cell, v. 120, p. 15–20, 2005.

LI, E.; ZHANG, J.; YUAN, T.; M. A. B. **miR-143 suppresses osteogenic differentiation by targeting Osterix.** Mol Cell Biochem. In press.

LINGEL, A; SIMON, B.; IZAURRALDE, E.; SATTLER, M. **Nucleic acid 3'-end recognition by the Argonaute2 PAZ domain.** Nat Struct Mol Biol., v.11, n. 6, p. 576-577, 2004.

LIN, S. L.; CHANG, D. C.; LIN, C. H.; YING, S. Y.; LEU, D.; WU, D. T. **Regulation of somatic cell reprogramming through inducible mir-302 expression.** Nucleic Acids Res., v. 39, p. 1054-1065, 2011.

LIM, L. P.; LIM, L. P.; LAU, N. C.; GARRETT-ENGELE, P.; GRIMSON, A.; SCHELTER, J. M.; CASTLE, J.; BARTEL, D. P.; LINSLEY, P. S.; JOHNSON, J. M. **Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs.** *Nature*, v. 433, p. 769–773, 2005.

LIU, J.; CARMELL, M. A.; RIVAS, F. V.; MARSDEN, C. G.; THOMSON, J. M.; SONG, J.; HAMMOND, S. M.; JOSHUA-TOR, L.; HANNON, G. J. **Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi.** *Science*, v. 305, p. 1437–1441, 2004

LIU, S.; FU, R.; YU, H.; LI, K.; TSAI, C.; SHYU, W.; LIN, S. **MicroRNAs regulation modulated self-renewal and lineage differentiation of stem cells.** *Cell Transplantation*, v. 18, p. 1039-1045, 2009.

LÜ, J.; QIAN, J.; CHEN, F.; TANG, X.; LI, C.; CARDOSO, W. V. **Differential expression of components of the microRNA machinery during mouse organogenesis.** *Biochem Biophys Res Commun*, v. 334, n 2, p. 319-323, 2005.

LUND, E.; GUTTINGER, S.; CALADO, A.; DAHLBERG, J. E.; KUTAY, U. **Nuclear export of microRNA precursors.** *Science*, v. 303, p. 95–98, 2004.

LUND, E.; DAHLBERG, J. E. **Substrate selectivity of exportin 5 and Dicer in the biogenesis of microRNAs.** *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, v. 71, p. 59–66, 2006.

MA, J.; YE, K.; PATEL, D. J. **Structural basis for overhang-specific small interfering RNA recognition by the PAZ domain.** *Nature*, v. 429, p. 318-322, 2004.

MA, J. B.; YUAN, Y. R.; MEISTER, G.; PEI, Y.; TUSCHL, T.; PATEL, D. J. **Structural basis for 59-end-specific recognition of guide RNA by the *A. fulgidus* Piwi protein.** *Nature*, v. 434, p. 666–670, 2005.

MACRAE, I. J.; MA, E.; ZHOU, M.; ROBINSON, C. V. E DOUDNA, J. A. ***In vitro* reconstitution of the human RISC-loading complex.** *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, v. 105, p. 512–517, 2008.

MANIATAKI, E.; MOURELATOS, Z. **A human, ATP-independent, RISC assembly machine fueled by pre-miRNA.** *Genes Dev.*, v. 19, p. 2979–2990, 2005.

MARONEY, P.A.; YU, Y.; FISHER, J.; NILSEN, T.W. **Evidence that microRNAs are associated with translating messenger RNAs in human cells.** Nature Structural & Molecular Biology, v. 13, n. 12, 2006.

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

MATHIEU, J.; RUOHOLA-BAKER, H. **Regulation of Stem Cell Populations by microRNAs.** Adv Exp Med Biol., v. 786, p. 329-5, 2013.

MEISTER, G.; LANDTHALER, M.; PATKANIOWSKA, A.; DORSETT, Y.; TENG, G.; TUSCHL, T. **Human Argonaute2 Mediates RNA Cleavage Targeted by miRNAs and siRNAs.** Mol Cell, v. 15, p. 185–197, 2004.

MELTON, C.; JUDSON, R. L.; BLELLOCH, R. **Opposing microRNA families regulate self-renewal in mouse embryonic stem cells.** Nature, v. 463, p. 621-626, 2010.

MINGUELL, J.; ERICES, A.; CONGET, P. **Mesenchymal Stem Cells.** Exp Biol Med, v. 226, n. 6, p. 507-520, 2001.

MIYOSHI, N.; ISHII, H.; NAGANO, H.; HARAGUCHI, N.; DEWI, D. L.; KANO, Y.; NISHIKAWA, S.; TANEMURA, M.; MIMORI, K.; TANAKA, F.; SAITO, T.; NISHIMURA, J.; TAKEMASA, I.; MIZUSHIMA, T.; IKEDA, M.; YAMAMOTO, H.; SEKIMOTO, M.; DOKI, Y. MORI, M. **Reprogramming of mouse and human cells to pluripotency using mature microRNAs.** Cell Stem Cell, v. 8, p. 633-638, 2011.

MORIN, R. D.; O'CONNOR, M. D.; GRIFFITH, M.; KUCHENBAUER, F.; DELANEY, A.; PRABHU, A. L.; ZHAO, Y.; MCDONALD, H.; ZENG, T.; HIRST, M.; EAVES, C. J.; MARRA, M. A. **Application of massively parallel sequencing to microRNA profiling and discovery in human embryonic stem cells.** Genome Res., v. 18, p. 610-621, 2008.

MURCHISON, E. P.; PARTRIDGE, J. F.; TAM, O. H.; CHELOUFI, S.; HANNON, G. J. **Characterization of Dicer-deficient murine embryonic stem cells.** PNAS, v. 102, n. 34, p. 12135-12140, 2005.

NELSON, P.T.; HATZIGEORGIU, A. G.; MOURELATOS, Z. **miRNP:mRNA association in polyribosomes in human neuronal cell line.** RNA 10(3):387-394, 2004.

NG, E. K.; LI, R.; SHIN, V. Y.; SIU, J. M.; MA, E. S.; KWONG, A. **MicroRNA-143 is downregulated in breast cancer and regulates DNA methyltransferases 3A in breast cancer cells.** Tumour Biol. In press.

NGUYEN, T.; KUO, C.; NICHOLL, M. B.; SIM, M. S.; TURNER, R. R; MORTON D. L.; HOON, D. S. **Downregulation of microRNA-29c is associated with hypermethylation of tumor-related genes and disease outcome in cutaneous melanoma.** Epigenetics, v. 6, n. 3, p. 388-394, 2011.

NOLAND, C. L.; DOUDNA, J. A. **Multiple sensors ensure guide strand selection in human RNAi pathways.** RNA, v.19, p. 639-648, 2013.

NOMBELA-ARRIETA, C.; RITZ, J.; SILBERSTEIN, L. E. **The elusive nature and function of mesenchymal stem cells.** Nature Reviews Mol. Cell. Bio. v. 12, p. 126-131, 2011.

NUTTALL, M. E.; SHAH F.; SINGH, V.; THOMAS-PORCH, CAASY; FRAZIER T.; GIMBLE, J. M. **Adipocytes and the Regulation of Bone Remodeling: A Balancing.** Act. Calcif Tissue Int., v. 94, p. 78–87, 2014.

OKADA, C.; YAMASHITA, E.; LEE, S. J.; SHIBATA, S.; KATAHIRA, J.; NAKAGAWA, A.; YONEDA, Y.; TSUKIHARA, T. **A high-resolution structure of the pre-microRNA nuclear export machinery.** Science, v. 326, p.1275-1279, 2009.

OKAMURA, K.; HAGEN, J. W.; DUAN, H.; TYLER, D. M.; LAI, E. C. **The mirtron pathway generates microRNA-class regulatory RNAs in Drosophila.** Cell, v. 130, p. 89–100, 2007.

OROM, U. A.; NIELSEN, F. C.; LUND, A. H. **MicroRNA-10a binds the 5'UTR of ribosomal protein mRNAs and enhances their translation.** Mol. Cell, v. 30, p. 460–471, 2008.

ORTEGA, F. J.; MORENO-NAVARRETE, J. M.; PARDO, G.; SABATER, M.; HUMMEL, M.; FERRER, A.; RODRIGUEZ-HERMOSA, J. I.; RUIZ, B.; RICART, W.; PERAL, B.; FERNÁNDEZ-REAL, J. M. **MiRNA expression profile of human subcutaneous adipose and during adipocyte differentiation.** PLoS One, v. 5, n. 2, p. e9022, 2010.

PANEPUCCI, R. A.; SIUFI, J. L.; SILVA, W. A. JR.; PROTO-SIQUIERA, R.; NEDER, L.; ORELLANA, M.; ROCHA, V.; COVAS, D. T.; ZAGO, M. A. **Comparison of gene expression of umbilical cord vein and bone marrow-derived mesenchymal stem cells.** Stem Cells, v. 22, p. 1263–1278, 2004.

PARKER, J. S.; ROE, S. M.; BARFORD, D. **Structural insights into mRNA recognition from a PIWI domain-siRNA guide complex.** Nature, v. 434, p. 663–666, 2005.

PASQUINELLI, A. E. **MicroRNAs and their targets: reconigition and an emerging reciprocal relationship.** Nature Reviews, v. 13, p. 271-282, 2012.

PASSIER, R.; MUMMERY, C. **Origin and use of embryonic and adult stem cells in differentiation and tissue repair.** Cardiovascular Research, v. 58, p. 324–335, 2003.

PLACE, R. F.; LI, L. C.; POOKOT, D.; NOONAN, E. J.; DAHIYA, R. **MicroRNA-373 induces expression of genes with complementary promoter sequences.** PNAS, v. 105, p. 1608–13, 2008.

QIU, J.; ZHOU, X. Y.; ZHOU, X. G.; CHENG, R.; LIU, H. Y.; LI, Y. **Neuroprotective effects of microRNA-210 against oxygen-glucose deprivation through inhibition of apoptosis in PC12 cells.** Mol Med Rep., v. 7(6), p. 1955-1959, 2013.

REBELATTO, C. K.; AGUIAR, A. M.; MORETÃO, M. P.; SENEGAGLIA, A. C.; HANSEN, P.; BARCHIKI, F.; OLIVEIRA, J.; MARTINS, J.; KULIGOVSKI, C.; MANSUR, F.; CHRISTOFIS, A.; AMARAL, V. F.; BROFMAN, P. S.; GOLDENBERG, S.; NAKAO, L. S.; CORREA, A. **Dissimilar differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, and adipose tissue.** Experimental Biology and Medicine, v. 233, n. 7, p. 901-13, 2008.

ROBERGE L.; ORIGA-ALVES, A. C.; DALLAGIOVANNA B.; SHIGUNOV, P. **Inibição da via de sinalização Hedgehog com ciclopamina afeta a expressão de miR-20a e miR-31.** Journal of Biotechnology and Biodiversity, v. 4, n. 4, 2013.

RODRIGUEZ, A.; GRIFFITHS-JONES, S.; ASHURST, J. L.; BRADLEY, A. **Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units.** Genome Res., v. 14, p. 1902-1910, 2004.

RUBY, J. G.; JAN, C. H.; BARTEL, D. P. **Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing.** Nature, v. 448, p. 83–86, 2007.

SCHMITT, M. J.; PHILIPPIDOU, D.; REINSBACH, S. E.; MARGUE, C.; WIENECKE-BALDACCHINO, A.; NASHAN, D.; BEHRMANN, I.; KREIS, S. **Interferon- $\gamma$ -induced activation of Signal Transducer and Activator of Transcription 1 (STAT1) up-regulates the tumor suppressing microRNA-29 family in melanoma cells.** Cell Commun Signal., v. 10, n. 1, p. 41, 2012.

SCHOOLMEESTERS, A.; EKLUND, T.; LEAKE, D.; VERMEULEN, A.; SMITH, Q.; ALDRED, S.F.; FEDOROV, Y. **Functional profiling reveals critical role for miRNA in differentiation of human mesenchymal stem cells.** Plos One, v. 4, n.5, p. e5605, 2009.

SCHWARZ, D. S. HUTVÁGNER G, DU T, XU Z, ARONIN N, ZAMORE PD. **Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex.** Cell, v. 115, p. 199–208, 2003.

SELBACH, M.; SCHWANHÄUSSER, B.; THIERFELDER, N.; FANG, Z.; KHANIN, R.; RAJEWSKY, N. **Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs.** Nature, v. 455, p. 58–63, 2008.

SHUKLA, G. C.; SINGH, J. BARIK, S. **MicroRNAs: Processing, Maturation, Target Recognition and Regulatory Functions.** Mol Cell Pharmacol v. 3, n. 3, p. 83-92, 2011.

SMALL, E. M.; OLSON, E. N. **Pervasive roles of microRNAs in cardiovascular biology.** Nature, v. 469, p. 336-341, 2011.

SONG, J. J.; LIU, J.; TOLIA, N. H.; SCHNEIDERMAN, J.; SMITH, S. K.; MARTIENSSEN, R. A.; HANNON, G. J.; JOSHUA-TOR, L. **The crystal structure of the Argonaute2 PAZ domain reveals an RNA binding motif in RNAi effector complexes.** Nat Struct Biol., v. 10, n. 12, p. 1026-1032, 2003.

SONG, J.; SMITH, S. K.; HANNON, G. J.; JOSHUA-TOR, L. **Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity.** Science, v. 305, p. 1434–1437, 2004.

SORRELL, J. M.; CAPLAN, A. I. **Topical delivery of mesenchymal stem cells and their function in wounds.** Stem Cell Research & Therapy, v. 1, p. 30, 2010.

SPANGENBERG, L.; SHIGUNOV, P; ABUD A. P.; COFRÉ A. R.;STIMAMIGLIO M. A.; KULIGOVSKI C.; ZYCH J.; SCHITTINI A. V.; COSTA A. D.; REBELATTO C. K.; BROFMAN P. R.; GOLDENBERG S.; CORREA A.; NAYA H.; DALLAGIOVANNA B. **Polysome profiling shows extensive posttranscriptional regulation during**

**human adipocyte stem cell differentiation into adipocytes.** Stem Cell Res., v. 11, n. 2, p. 902-12, 2013.

STADLER, B.; IVANOVSKA, I.; MEHTA, K.; SONG, S.; NELSON, A.; TAN, Y.; MATHIEU, J.; DARBY, C.; BLAU, C. A.; WARE, C.; PETERS, G.; MILLER, D. G.; SHEN, L.; CLEARY, M. A.; RUOHOLA-BAKER, H. **Characterization of microRNAs involved in embryonic stem cell states.** Stem Cells Dev., v. 19, n. 7, p. 935–950, 2010.

STARK, A.; BRENNECKE, J.; BUSHATI, N.; RUSSELL, R. B.; COHEN, S. M. **Animal microRNAs confer robustness to gene expression and have a significant impact on 3'UTR evolution.** Cell, v. 123, p. 1133–1146, 2005.

SUH, M. R.; LEE, Y.; KIM, J. Y.; KIM, S. K.; MOON, S. H.; LEE, J. Y.; CHA, K. Y.; CHUNG, H. M.; YOON, S.; MOON, S. Y.; KIM, V. N.; KIM, K. S. **Human embryonic stem cells express a unique set of microRNAs.** Dev Biol v., 270, p. 488-498, 2004.

SUN, K.; LAI, E. C. **Adult-specific functions of animal microRNAs.** Nature Reviews Genetics, v. 14, p. 535-548, 2013.

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

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

TAKAYA, T.; ONO, K.; KAWAMURA, T.; TAKANABE, R. KAICHI, S.; MORIMOTO, T.; WADA, H.; KITA, T.; SHIMATSU, A.; HASEGAWA, K. **MicroRNA-1 and MicroRNA-133 in spontaneous myocardial differentiation of mouse embryonic stem cells.** Circ J Off J Jpn Circ Soc, v. 73, n. 8, p. 1492–1497, 2009.

TANG, G.; REINHART, B. J.; BARTEL, D. P.; ZAMORE, P. D. **A biochemical framework for RNA silencing in plants.** Genes Dev., v. 17, p. 49–63, 2003.

TARAN, R.; MAMIDI, M. K.; SINGH, G.; DUTTA, S.; PARHAR, I. S.; JOHN, J. P.; BHONDE, R.; PAL, R.; DAS, A. K. **In vitro and in vivo neurogenic potential of mesenchymal stem cells isolated from different sources.** J Biosci. V. 39, n. 1, p. 157-169, 2014.

TAY, Y.; ZHANG, J.; THOMSON, A. M.; LIM, B.; RIGOUTSOS, I. **MicroRNAs to Nanog, Oct4 and Sox2 coding regions modulate embryonic stem cell differentiation.** Nature, v. 455, p. 1124–8, 2008

THOMSON, J. A.; ITSKOVITZ-ELDOR, J.; SHAPIRO, S. S.; WAKNITZ, M. A.; SWIERGIEL, J. J.; MARSHALL, V. S.; JONES, J. M. **Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts.** Science, v. 282, p. 1145–1147, 1998.

TROMPETER, H. I.; DREESEN, J.; HERMANN, E.; IWANIUK, K. M.; HAFNER, M.; RENWICK, N, TUSCHL, T.; WERNET, P. **MicroRNAs miR-26a, miR-26b, and miR-29b accelerate osteogenic differentiation of unrestricted somatic stem cells from human cord blood.** BMC Genomics, v. 14, p. 111, 2013.

TROUNSON, A. **Human embryonic stem cells: mother of all cell and tissue types.** Reprod Biomed, v. 4, n. 1, p. 58-63, 2002.

UCCELLI, A.; MORETTA L.; PISTOIA, V. **Mesenchymal stem cells in health and disease.** Nature Reviews Immunol., v. 8, p. 726- 736, 2008.

VAN ROOIJ, E.; OLSON, E. N. **MicroRNA therapeutics for cardiovascular disease: opportunities and obstacles.** Nature Reviews Drug Discov, v. 11, p. 860-872, 2012.

VASILATOU, D.; PAPAGEORGIOU, S.; PAPPA V.; PAPAGEORGIOU, E.; DERVENOULAS, J. **The role of microRNAs in normal and malignant hematopoiesis.** Eur J Haematol., v. 84, n. 1, p. 1–16, 2010.

VASUDEVAN, S.; TONG, Y.; STEITZ, J. A. **Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation.** Science, v. 318, p. 1931–1934, 2007.

VASUDEVAN, S.; STEITZ, J. A. **AU-rich-element-mediated upregulation of translation by FXR1 and Argonaute 2.** Cell, v. 128, p. 1105–1118, 2007.

XU, F.; ZHANG, Q.; CHENG, W.; ZHANG, Z.; WANG, J.; GE, J. **Effect of miR-29b-1\* and miR-29c knockdown on cell growth of the bladder cancer cell line T24.** J Int Med Res., v. 41, n. 6, p. 1803-10, 2013.

XU, N.; PAPAGIANNAKOPOULOS, T.; PAN, G.; THOMSON, J. A.; KOSIK, K. S. **MicroRNA-145 regulates OCT4, SOX2, and KLF4 and represses pluripotency in human embryonic stem cells.** Cell, v. 137, p. 647–658, 2009.

WAGNER, J.; KEAN, T.; YOUNG, R.; DENNIS J. E.; CAPLAN A. I. **OPTIMIZING mesenchymal stem cell-based therapeutics**. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 20, p. 531–536, 2009.

WAGERS, J. e WEISSMAN, I. **Plasticity of Adult Stem Cells**. *Cell*, v. 116, p. 639-648, 2004.

WATT, F. M.; HOGAN, B. L. M. **Out of Eden: stem cells and their niches**. *Science*. v. 287, n. 5457, p. 1427-30, 2000.

WIGHTMAN, B.; HA, I; RUVKUN, G. **Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans***. *Cell*, v: 75, p. 855–862, 1993

WINTER, J.; JUNG, S.; KELLER, S.; GREGORY, R. I.; DIEDERICHS, S. **Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation**. *Nature Cell Biology*, v.11, p. 228-234, 2009.

WU, D.; HUANG, P.; WANG, L.; ZHOU, Y.; PAN, H.; QU, P. **MicroRNA-143 inhibits cell migration and invasion by targeting matrix metalloproteinase 13 in prostate cancer**. *Mol Med Rep.*, v. 8, n. 2, p. 626-630, 2013.

WU, L.; FAN, J.; BELASCO, J. G. **MicroRNAs direct rapid deadenylation of mRNA**. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, v. 103, p. 4034–4039, 2006.

YANG, I. P.; TSAI, H. L.; HUANG, C. W.; HUANG, M. Y.; HOU, M. F.; JUO, S. H.; WANG, J. Y. **The functional significance of microRNA-29c in patients with colorectal cancer: a potential circulating biomarker for predicting early relapse**. *PLoS One*, v. 8, n. 6, p. e66842, 2013.

YATES, L. A.; NORBURY, C. J.; GILBERT, R. J. C. **The long and the short of microRNA**. *Cell*, v. 153, p. 516-519, 2013.

YEKTA, S.; SHIH, I.; BARTEL, D. P. **MicroRNA-Directed Cleavage of *HOXB8* mRNA**. *Science*, v. 304, p. 594-596, 2004.

YI, R.; QIN, Y.; MACARA, I. G.; CULLEN, B. R. **Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs**. *Genes Dev.*, v. 17, p. 3011–3016, 2003.

Yu, Z.; LI, Y.; FAN, H.; LIU, Z.; PESTEL, R. G. **miRNAs regulate stem cell self-renewal and differentiation.** *Frontiers in Genetics*, v. 3, n. 191, p. 1-5, 2012.

ZARAGOSI, E.; WDZIEKONSKI, B.; LE BRIGAND, K.; VILLAGEOIS, P.; MARJ, B.; WALDMANN, R.; DANI, C.; BARBRY, P. **Small RNA sequencing reveals miR-642a-3p as a novel adipocyte specific microRNA and miR-30 as a key regulator of human adipogenesis.** *Genome Biology*, v. 12, p. R64, 2011.

ZENG, Y.; CULLEN, B. R. **Structural requirements for pre-microRNA binding and nuclear export by Exportin 5.** *Nucleic Acids Res.*, v. 32, p. 4776–4785, 2004.

ZENG XL, ZHANG SY, ZHENG JF, YUAN H, WANG Y. **Altered miR-143 and miR-150 expressions in peripheral blood mononuclear cells for diagnosis of non-small cell lung cancer.** *Chin Med J (Engl)*, v. 126, n. 23, p. 4510-4516, 2013.

ZHANG, W.; QIAN, J. X.; YI, H. L.; YANG, Z. D.; WANG, C. F.; CHEN, J. Y.; WEI, X. Z.; FU, Q.; MA, H. **The microRNA-29 plays a central role in osteosarcoma pathogenesis and progression.** *Mol Biol (Mosk)*, v. 46, n. 4, p. 622-627, 2012.

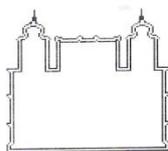
ZHANG N, SU Y, XU L. **Targeting PKC $\epsilon$  by miR-143 regulates cell apoptosis in lung cancer.** *FEBS Lett.*, v. 587, n. 22, p. 3661-3667, 2013.

ZHAO, C.; SUN, G.; LI, S.; SHI, Y. **A feedback regulatory loop involving microRNA-9 and nuclear receptor TLX in neural stem cell fate determination.** *Nat Struct Mol Biol*, v. 16, n. 4, p. 365–371, 2009.

ZHOU, P.; XU, W.; PENG, X.; LUO, Z.; XING, Q.; CHEN, X.; HOU, C.; LIANG, W.; ZHOU, J.; WU, X.; SONGYANG, Z.; JIANG, S. **Large-scale screens of miRNA-mRNA interactions unveiled that the 3'UTR of a gene is target by multiple miRNAs.** *Plos One*, v. 8, n. 7, p. e68204, 2013.

ZHU, S.; SI, M. L.; MO, Y. Y. **microRNA-21 targets the tumor suppressor gene tropomyosin I (TPM1).** *J. Biol. Chem.*, v. 282, p. 14328-14336, 2007.

## ANEXO



Ministério da Saúde  
Fundação Oswaldo Cruz  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA-CEP/FIOCRUZ

Rio de Janeiro, 22 de agosto de 2011.

PARECER

**Título do Projeto:** “Caracterização celular e molecular do potencial de diferenciação de células tronco mesenquimais adultas: aplicação em terapias celulares do sistema cardiovascular”

**Protocolo CEP:** 419/07

**Pesquisador Responsável:** Samuel Goldenberg

**Instituição:** ICC – Instituto Carlos Chagas/Fiocruz/PR

Foram apresentados e submetidos à apreciação do CEP/FIOCRUZ o relatório de atividades, adendo e documentos atualizados ao projeto original do projeto supra mencionado, ambos APROVADOS.

Patrícia T. Bozza

Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos  
Fundação Oswaldo Cruz