

Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

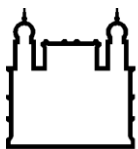
INSTITUTO CARLOS CHAGAS
Mestrado em Biociências e Biotecnologia

RIBOSOME PROFILING: APLICAÇÃO NO ESTUDO DO PROCESSO DE
DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO OBTIDAS
DE TECIDO ADIPOSEO HUMANO

BRUNA HILZENDEGER MARCON

CURITIBA/PR

2014



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO CARLOS CHAGAS
Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia

BRUNA HILZENDEGER MARCON

RIBOSOME PROFILING: APLICAÇÃO NO ESTUDO DO PROCESSO DE
DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO OBTIDAS DE
TECIDO ADIPOSEO HUMANO

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

Orientadores: Dr. Bruno Dallagiovanna

Dra. Fabíola Barbieri Holetz

CURITIBA/PR

2014

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

M321 Marcon, Bruna Hilzendeger

Ribosome profiling: aplicação no estudo do processo de diferenciação de células-tronco obtidas de tecido adiposo humano / Bruna Hilzendeger Marcon. – Curitiba, 2014.

xvi, 108 f.: il. ; 30 cm.

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

Bibliografia: f. 100-107

1. Células-tronco adultas. 2. Diferenciação. 3. *Ribosome profiling*. 4. Regulação pós-transcricional. I. Título.

CDD 616.02774



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



Instituto Carlos Chagas

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

Aos 11 dias do mês de abril de dois mil e quatorze, às nove horas, 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. Stênio Fragoso, Dr. Helisson Faoro e Dra. Maria Ana Duhagon, com a finalidade de julgar a dissertação do(a) candidato(a) **Bruna Hilzendeger Marcon**, intitulada: "**RIBOSOME PROFILING: APLICAÇÃO NO ESTUDO DO PROCESSO DE DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO ADULTAS**", sob a orientação do Dr. **Bruno Dallagiovanna** e Dra. **Fabiola Barbieri Holetz**, 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. Stênio Fragoso**. Após haver analisado o referido trabalho e arguido o(a) candidato(a), os membros da banca examinadora deliberaram pela:

Aprovação da tese por unanimidade

Aprovação somente após satisfazer as exigências de modificações no prazo fixado pela banca (não superior a noventa dias).

Reprovação da tese

Na forma regulamentar foi lavrada a presente ata que é abaixo assinada pelos membros da banca, na ordem acima determinada, e pelo(a) candidato(a).


Prof. Dr. Stênio Fragoso
ICC/FIOCRUZ

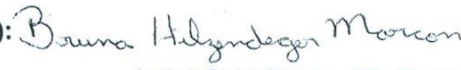

Prof. Dr. Helisson Faoro
UFPR


Prof. Dra. Maria Ana Duhagon
Universidade da República /Uruguai

Curitiba, 11 de abril de 2014


Conferido com o original

Karin Goebel
Analista de Gestão em Saúde
Matrícula SIAPE 1956267
Instituto Carlos Chagas - Fiocruz PR

Candidato(a): 

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

A todos aqueles que, por tantas vezes, tiveram que abrir mão
da filha, irmã, tia, amiga ou namorada para que
este trabalho pudesse se concretizar

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Bruno, agradeço pela oportunidade de ser sua aluna e por ter confiado a mim este projeto. Agradeço pelo apoio, pela capacidade mágica de transformar tristeza e desânimo em risadas, por ter suportado com bom humor os meus chilikues e, principalmente, pelo incentivo ao longo desta árdua caminhada. Obrigada pelo cuidado e carinho com a nossa formação, que foi certamente muito além do que este trabalho.

À minha coorientadora, Fabíola, por ter me recebido de braços abertos não apenas como sua aluna, mas também como mais uma das suas filhas da área científica. Obrigada por todo carinho, amizade e atenção ao longo destes dois anos. Você e o Bruno são e sempre serão para mim modelos do que é paixão pela ciência. Espero poder tê-los sempre ao meu lado.

Aos demais pesquisadores do grupo, Marco e Alejandro, obrigada por me receberem tão bem na equipe, por todo o conhecimento compartilhado e pelo respeito, amizade e compreensão nestes dois anos.

Aos amigos do laboratório, Addeli, Alessandra, Ana Paula, Andressa, Anny, Axel, Beth, Crisciele, Jaiesa, Patrícia, Thamille, muito obrigada por toda ajuda durante a realização deste trabalho, pelo incentivo nos momentos de desânimo e por todas as conversas compartilhadas dentro e fora do laboratório. Em especial, agradeço à Carol, por estar comigo em cada passo deste trabalho. Pela companhia nos bons e maus momentos (proporção 1:1000), pela ajuda com as centenas de garrafas tripsinizadas (de verdade, centenas), os gradientes falhos e os géis que deslocavam e levavam embora todo o trabalho de um mês. Obrigada por compartilhar comigo tanta coisa e ser minha grande a-mi-ga!

A toda equipe do Instituto Carlos Chagas, em especial ao pessoal do preparo, da TI e das Plataformas Tecnológicas, muito obrigada pelo apoio nesta caminhada e por me proporcionarem um ambiente de trabalho tão completo e agradável. Ao pesquisador Maurílio, pelo apoio e compreensão no desenvolvimento deste trabalho.

À equipe do Núcleo de Tecnologia Celular, da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUC-PR), pelo apoio e pelo fornecimento de células que permitiram a realização deste projeto.

À equipe da plataforma de sequenciamento da Universidade Federal do Paraná, pela ajuda com a análise das amostras.

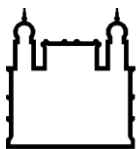
Aos colaboradores e amigos do Uruguai, Jose Sotelo-Silveira e Guillermo Eastman, pelo apoio no desenvolvimento deste trabalho, pela paciência com a minha habilidade zero

em informática e, principalmente, por terem me ajudado a descobrir as maravilhas escondidas nos arquivos até então indecifráveis do sequenciamento.

Aos meus pais, Antônio e Goretti, eu agradeço não apenas pelos últimos dois anos, mas pela vida inteira. Por cada refeição preparada, roupa lavada, abraço compartilhado, sorriso doado e, principalmente, por serem o modelo de força e perseverança que vocês são. À minha irmã, Fernanda, minha eterna mãe II, por ter aberto as portas para mim na vinda para Curitiba e por ter sempre cuidado tanto de mim. Ao meu irmão, Eduardo, serei eternamente grata por ter me apresentado à Biologia e me apoiado em cada passo desta caminhada. À minha sobrinha linda, Joana, por ser este serzinho maravilhoso que não tem ideia do que significa *ribosome profiling*, mas que contribuiu tanto para este trabalho simplesmente por existir. À minha prima, Aline, por ter feito a ponte Estados Unidos-Londrina-Curitiba que permitiu que eu chegasse ao Instituto e por fazer parte de tantos momentos especiais da minha vida. Aos cunhados Mel, Wagner, Dani, Rodrigo e Ana Paula, pelo carinho e apoio. Aos meus sogros, Antônio Carlos e Letícia, por me receberem com tanto amor e carinho na sua família.

Ao meu namorado, Diego, pelo carinho e compreensão durante todo o desenvolvimento deste trabalho. Pela paciência com o meu mau humor quando os experimentos não funcionavam (e não foram raras vezes), pelas palavras de apoio e incentivo quando eu estava desanimada e pelo abraço sempre carinhoso quando eu chegava cansada. Amo você.

À Rede de Plataformas Tecnológicas PDTIS e às instituições de apoio financeiro, Fiocruz, Fundação Araucária, CNPq e Capes.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO CARLOS CHAGAS

RIBOSOME PROFILING: APLICAÇÃO NO ESTUDO DO PROCESSO DE DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO OBTIDAS DE TECIDO ADIPOSEO HUMANO

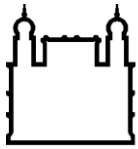
RESUMO

Dissertação de Mestrado

Bruna Hilzendeger Marcon

As células-tronco (CTs) caracterizam-se por possuírem a capacidade de se autorrenovar e de dar origem a um ou mais tipos celulares diferenciados. Nos últimos anos, diversos trabalhos mostraram a existência de CTs em tecidos adultos, tornando-as uma alternativa interessante para uso em terapias celulares. Contudo, para melhor utilizar as CTs, é preciso primeiramente compreender como ocorre a diferenciação em um tipo celular específico e, principalmente, como é regulada a expressão gênica durante este processo. Em 2009, Ingolia e colaboradores apresentaram uma nova técnica conhecida como *ribosome profiling*, a qual consiste no isolamento e sequenciamento em larga escala dos fragmentos de RNA associados e protegidos pelos ribossomos, os quais têm um tamanho aproximado de 30 nucleotídeos (conhecido com *footprint* ribossomal). Ao mapear as sequências obtidas, é possível obter informações não apenas sobre quais sequências estão sendo traduzidas, mas também sobre a cinética da tradução e sua extensiva rede de regulação. Assim, o objetivo deste trabalho foi aplicar a técnica de *ribosome profiling* ao estudo do processo de diferenciação de CTs adultas. Como modelo de estudo, foram utilizadas CTs obtidas de tecido adiposo antes ($t=0$) e após a indução para diferenciação adipogênica por 3 dias ($t=72h$). O primeiro passo do trabalho foi a adaptação do protocolo de *ribosome profiling* para o estudo de CTs adultas, o qual consiste na lise celular, digestão do lisado com uma RNA nuclease (a qual irá degradar o RNA exposto, preservando os fragmentos protegidos pelo ribossomo), ultracentrifugação do homogenato sobre colchão de sacarose 1 M para sedimentação dos ribossomos, extração de RNA e isolamento dos fragmentos de 30 nucleotídeos. Também foi feita extração do RNA poliA. As amostras foram sequenciadas (SOLiD™) e os dados obtidos foram triados e mapeados contra um banco de dados de RNAm, utilizando-se a ferramenta CLC Genomics Workbench. Foram identificados mais de 8.000 transcritos para as amostras de *ribosome profiling* e mais de 17.000 para as de poliA. Ao calcular o *fold change* entre as condições $t=0$ e $t=72h$, foi possível verificar que mais de 50% dos genes foram detectados como diferencialmente expressos apenas por *ribosome profiling*. Observou-se que genes relacionados com vias de diferenciação adipogênica e de metabolismo de lipídeos encontravam-se regulados positivamente em ambas as amostras de RNA. Por outro lado, observou-se que vias de regulação do citoesqueleto de actina e de adesão focal estavam reguladas negativamente apenas nas amostras de *ribosome profiling*. Isso é interessante, uma vez que a inibição destas vias já foi descrita como importante para o processo de adipogênese. Além disso, foi observada uma forte redução na eficiência de tradução de genes relacionados com a tradução após 72 horas de indução para diferenciação. Os resultados obtidos no presente trabalho reforçam as evidências de que os mecanismos de regulação pós-transcricionais e traducionais têm um papel muito importante na regulação da diferenciação celular de CTs, sendo que a técnica de *ribosome profiling* permitiu obter informações mais detalhadas de como este processo pode estar acontecendo.

Palavras-chave: Células-tronco adultas, diferenciação, *ribosome profiling*, regulação pós-transcricional



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO CARLOS CHAGAS

RIBOSOME PROFILING: APPLICATION TO THE STUDY OF HUMAN ADIPOSE TISSUE-DERIVED STEM CELLS DIFFERENTIATION PROCESS

ABSTRACT

Dissertação de Mestrado

Bruna Hilzendeger Marcon

Stem cells (SC) are characterized by their capacity of both self-renewing and giving rise to new differentiated cells. SC are found in adult tissues, which are considered a putative source for cell therapy. However, little is known about the mechanisms involved in the trigger of SCs differentiation into a specific cell type. Understanding adult SCs differentiation process is a fundamental step to better use and to take advantage of their potential. In 2009, Ingolia and collaborators presented a new methodology of transcriptome analysis named ribosome profiling, which consists on the isolation and deep-sequencing of the mRNA fragments enclosed by ribosomes. When lysed cells are submitted to nuclease digestion, unprotected mRNA is degraded, while fragments within ribosomes are preserved and have a known footprint of 30 nucleotides. Sequencing these ribosome-protected fragments results in a high-precision measurement of *in vivo* translation, providing precise information about translation kinetics and its extensive regulation. The objective of this work was to apply the ribosome profiling methodology to the study of adipogenic differentiation in adult SCs. SCs were isolated from human adipose tissue from three donors and were cultured in a control medium (t=0) and induced to adipogenic differentiation for 72 hours (t=72h). The first step was to adapt and optimize the ribosome profiling protocol to the SC model, which consists in cell lysis, cell lysate digestion by nuclease (to degrade unprotected RNA, preserving ribosome-protected fragments), ultracentrifugation over a 1M sucrose cushion to pellet ribosomes, RNA extraction and 30 nucleotides fragments isolation. poliA RNA was also isolated. Samples were submitted to deep-sequencing (SOLiD™) and the reads obtained were trimmed and mapped onto the reference mRNA database using the CLC Genomics Workbench. Over 8000 transcripts were identified in ribosome profiling samples and over 17000 in poliA samples. Fold change analysis between t=0 and t=72h of both RNA samples showed that differential expression of more than 50% of the genes was identified only by ribosome profiling. Pathways related to adipogenesis and lipid metabolism were upregulated in both RNA samples. However, regulation of the actin cytoskeleton and focal adhesion proteins were downregulated only in ribosome profiling samples. Interestingly, downregulation of these pathways was already described as an important phenomenon to cell adipogenesis. Besides, we observed a strong reduction of translational efficiency of genes involved in translation at t=72h. Our results reinforce previous data, suggesting that posttranscriptional and translational regulation play a fundamental role in the regulation of SC differentiation process and that ribosome profiling is an important tool to better understand this process.

Keywords: Adult stem cells, differentiation, ribosome profiling, post-transcriptional regulation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1.	Os diferentes tipos de CTs	18
Figura 1.2.	Vias de decaimento de RNA em células de mamíferos	26
Figura 1.3.	Análise da expressão gênica diferencial de CTs derivadas de tecido adiposo durante adipogênese por RNA total e polissomal	30
Figura 1.4.	Esquematização do protocolo de <i>ribosome profiling</i>	31
Figura 1.5.	Dados obtidos por <i>ribosome profiling</i>	32
Figura 4.1.	Esquematização do preparo da biblioteca de cDNA para sequenciamento .	44
Figura 4.2.	PCR de emulsão	45
Figura 4.3.	Princípio de sequenciamento da plataforma SOLiD™	47
Figura 5.1.	Eletroforese em gel de agarose (1%) mostrando o RNA obtido após lise de CTs derivadas de tecido adiposo com diferentes tampões	52
Figura 5.2.	Eletroforese do RNA obtido a partir de diferentes protocolos de digestão com Benzonase® através do sistema Agilent 2100 Bioanalyzer	54
Figura 5.3.	Eletroforese através do sistema Agilent 2100 Bioanalyzer do RNA fracionado pelo sistema flashPAGE	55
Figura 5.4.	Separação dos fragmentos de 30 nucleotídeos por eletroforese em gel de acrilamida-uréia (6%)	56
Figura 5.5.	Morfologia das células não-induzidas e induzidas para diferenciação adipogênica por três dias	57
Figura 5.6.	Morfologia e marcação com vermelho Nilo das células não-induzidas e induzidas para diferenciação adipogênica por 14 dias	58
Figura 5.7.	<i>Ribosome profiling</i> de CTs obtidas de tecido adiposo induzidas para diferenciação adipogênica (t=72 h) e não induzidas (t=0), TA84	59
Figura 5.8.	<i>Ribosome profiling</i> de CTs obtidas de tecido adiposo induzidas para diferenciação adipogênica (t=72 horas) e não induzidas (t=0), TA85	60
Figura 5.9.	<i>Ribosome profiling</i> de CTs obtidas de tecido adiposo induzidas para diferenciação adipogênica (t=72h) e não induzidas (t=0), TA86	61
Figura 5.10.	Efeito do <i>trimming</i> na qualidade e no tamanho das sequências de poliA e de <i>ribosome profiling</i>	66
Figura 5.11.	Boxplot do número de leituras antes e após a normalização (DESeq)	68

Figura 5.12.	Mapeamento das leituras obtidas por poliA e por <i>ribosome profiling</i> sobre o transcrito de actina B	69
Figura 5.13.	Comparação das listas de genes identificados para cada uma das amostras de RNA (poliA e <i>ribosome profiling</i>)	70
Figura 5.14.	Comparação das listas de genes identificados em cada uma das amostras de RNA para cada uma das condições	71
Figura 5.15.	Genes regulados positivamente e negativamente após três dias de indução para adipogênese	71
Figura 5.16.	Ativação da via de sinalização PPAR após 72 horas de indução para diferenciação adipogênica em poliA e em <i>ribosome profiling</i>	73
Figura 5.17.	Mapeamento das <i>footprints</i> ribossomais nos transcrito de KLF2	78
Figura 5.18.	Regulação das vias de regulação do citoesqueleto de actina e de adesão focal em t=72h	82
Figura 5.19.	Regulação da eficiência traducional de proteínas ribossomais	83
Figura 5.20.	Mapeamento das <i>footprints</i> ribossomais no transcrito de RPL30	84

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1.	Soluções de lise	38
Tabela 4.2.	Condições para aplicação da endonuclease	39
Tabela 4.3.	Réplicas biológicas e técnicas para cada uma das amostras de RNA	48
Tabela 4.4.	Relação entre valor PHRED e probabilidade de erro na determinação de uma base	48
Tabela 5.1.	Quantificação por espectrofotometria (NanoDrop®) do RNA obtido após lise de CTs obtidas de tecido adiposo com diferentes tampões	52
Tabela 5.2.	Número de células utilizado para extração do RNA total e quantificação de RNA total e poliA recuperados	62
Tabela 5.3.	Quantidade de RNA obtido para cada amostra para o preparo do sequenciamento, sequência identificadora inserida e concentração de DNA após RT-PCR	63
Tabela 5.4.	Número de leituras obtido para cada uma das amostras através do sequenciamento na plataforma SOLiD™	64
Tabela 5.5.	Número e percentual de sequências que sofreram <i>trimming</i> em cada uma das etapas realizadas (remoção de adaptadores, filtragem de tamanho e de qualidade) e que restaram ao final do processo	65
Tabela 5.6.	Mapeamento contra RNAr	67
Tabela 5.7.	Mapeamento contra RNAm	68
Tabela 5.8.	Filtragem de transcritos	69
Tabela 5.9.	Análise pelo banco de dados KEGG dos genes regulados positivamente após 72h de diferenciação adipogênica para cada uma das amostras de RNA	73
Tabela 5.10.	Análise pelo banco de dados GOrilla dos genes envolvidos em processos metabólicos regulados positivamente após 72h de diferenciação adipogênica para cada uma das amostras de RNA	74
Tabela 5.11.	Análise pelo banco de dados KEGG dos genes regulados negativamente após 72h de diferenciação adipogênica para cada uma das amostras de RNA	75
Tabela 5.12.	Análise pelo banco de dados GOrilla dos genes envolvidos em processos metabólicos regulados negativamente após 72h de diferenciação adipogênica para cada uma das amostras de RNA	77

- Tabela 5.13.** Análise pelo banco de dados KEGG dos genes que tiveram eficiência traducional aumentada ($\log_2 \geq 1$) ou reduzida ($\log_2 \leq -1$) após 72h de diferenciação adipogênica para cada uma das amostras de RNA **79**
- Tabela 5.14.** Análise pelo banco de dados GOrilla dos genes que tiveram eficiência traducional aumentada ($\log_2 \geq 1$) ou reduzida ($\log_2 \leq -1$) após 72h de diferenciação adipogênica para cada uma das amostras de RNA **80**

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BSS-CMF	solução salina balanceada, sem sais de cálcio e magnésio
cDNA	ácido desoxidorribonucleico complementar
CO₂	dióxido de carbono
CT	célula-tronco
D/S	desvio padrão por soma
dUTP	deoxiuridina trifosfato
DAPI	4'6' diamidino-2-fenilindol dihidroclorido
DAVID	Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery
DMEM-F12	Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> (ácido desoxirribonucleico)
DTT	ditiotreitól
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
EGF	<i>epidermal growth factor</i> (fator de crescimento epidermal)
FASP	<i>filter-aided sample preparation</i> (preparação de amostra auxiliado por filtração)
FC	<i>fold change</i>
FGF	<i>fibroblast growth factor</i> (fator de crescimento de fibroblastos)
GOrilla	Gene Ontology enRIchment anaLysis and visuaLizAtion tool
HCl	ácido clorídrico
HGF	<i>hepatocyte growth factor</i> (fator de crescimento de hepatócitos)
IAA	iodoacetamida
IBMX	3-isobutil 1-metilxantina
IGF	<i>insulin-like growth factor</i> (fator de crescimento semelhante à insulina)
iPSC	<i>induced pluripotent stem cell</i> (célula-tronco pluripotente induzida)
lincRNA	<i>large intergenic non-coding RNA</i> (ácido ribonucleico não codificante intergênico longo)
MgCl₂	cloreto de magnésio

miRISC	<i>RNA-induced silencing complex</i> (complexo de silenciamento induzido por RNA)
miRNA	microRNA
NaCl	cloreto de sódio
NMD	<i>nonsense-mediated decay</i> (decaimento mediado por falta de sentido)
nt	nucleotídeo
Nº	número
ORF	<i>open read frame</i> (quadro de leitura)
uORF	<i>upstream open read frame</i> (quadro de leitura à montante)
PBS	solução salina tamponada por fosfato
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (reação em cadeia da polimerase)
PDGF	<i>platelet-derived growth factor</i> (fator de crescimento derivado de plaquetas)
PPAR	<i>peroxisome proliferator-activated receptors</i> (receptores ativados por proliferador de peroxissomos)
RBP	<i>RNA binding protein</i> (proteína de ligação ao RNA)
RNA	<i>ribonucleic acid</i> (ácido ribonucleico)
RNA_m	ácido ribonucleico mensageiro
RNA_r	ácido ribonucleico ribossomal
RNA_t	ácido ribonucleico transportador
RP	<i>ribosome profiling</i>
RT	reação de transcrição reversa
SDS	dodecil sulfato de sódio
SFB	soro fetal bovino
SILAC	<i>stable isotope labelling by amino acids in cell culture</i> (marcação com isótopo estável por aminoácidos em cultura celular)
SMD	<i>Staufen1-mediated decay</i> (decaimento mediado por Staufen1)
TGF	<i>transforming growth factor</i> (fator de crescimento de transformação)
UTR	<i>untranslated region</i> (região não traduzida)
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i> (fator de crescimento endotelial vascular)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
1.1. As células-tronco	17
1.1.1. Os principais tipos de CTs	17
1.1.2. As CTs obtidas de tecido adiposo	19
1.1.3. Diferenciação de CTs	21
1.2. Estudo da regulação da expressão gênica	23
1.2.1. Transcrição	23
1.2.2. Elementos de ligação ao RNA e estabilidade	23
1.2.3. Tradução e modificações pós-traducionais	27
1.3. Ferramentas de análise de expressão gênica	28
2. JUSTIFICATIVA	34
3. OBJETIVOS	35
3.1. Objetivo geral	35
3.2. Objetivos específicos	35
3.2.1. Estabelecer o protocolo de <i>ribosome profiling</i> aplicado ao estudo de CTs obtidas de tecido adiposo	35
3.2.2. Análise do tradutoma de CTs obtidas de tecido adiposo durante a diferenciação adipogênica por <i>ribosome profiling</i>	35
4. MATERIAL E MÉTODOS	36
4.1. Modelo de estudo	36
4.1.1. Isolamento das CTs de tecido adiposo humano	36
4.1.2. Cultivo das CTs obtidas de tecido adiposo e indução para diferenciação adipogênica	37
4.1.3. Marcação com vermelho Nilo	37
4.2. Padronização da metodologia de <i>ribosome profiling</i> para CTs obtidas de tecido adiposo	38
4.2.1. Lise celular	38

4.2.2. Digestão com endonuclease	39
4.2.3. Isolamento dos fragmentos de 30 nucleotídeos	39
4.3. Aplicação do protocolo de <i>ribosome profiling</i> e isolamento do RNA poliA de CTs obtidas de tecido adiposo	40
4.3.1. Aplicação do protocolo de <i>ribosome profiling</i> ao estudo de CTs obtidas de tecido adiposo	40
4.3.2. Extração do RNA total e isolamento de RNA poliA	42
4.4. Preparo das amostras de RNA poliA e de <i>ribosome profiling</i> para sequenciamento	42
4.4.1. Construção da biblioteca de DNA e realização da PCR de emulsão	42
4.4.2. Sequenciamento na plataforma SOLiD™	45
4.5. Triagem dos resultados obtidos por sequenciamento	48
4.6. Análise dos resultados obtidos por sequenciamento	49
4.7. Preparo das amostras para análise por proteômica	50
5. RESULTADOS	52
5.1. Padronização do processo de <i>ribosome profiling</i> para CTs obtidas de tecido adiposo	52
5.1.1. Lise celular	52
5.1.2. Digestão com endonuclease	53
5.1.3. Isolamento dos fragmentos de 30 nucleotídeos	54
5.2. Controle da capacidade de diferenciação	56
5.3. Aplicação do protocolo de <i>ribosome profiling</i> ao estudo de CTs obtidas de tecido adiposo	59
5.4. Extração do RNA total e isolamento do RNA poliA das amostras de CTs obtidas de tecido adiposo	61
5.5. Preparo das amostras de RNA poliA e de <i>ribosome profiling</i> para sequenciamento	62
5.5.1. Construção da biblioteca de DNA e realização da PCR de emulsão	62
5.5.2. Sequenciamento na plataforma SOLiD™	63

5.6.	Triagem e processamento dos resultados obtidos no sequenciamento	64
5.6.1.	Trimming e mapeamento contra RNAr	64
5.6.2.	Mapeamento contra RNAm e normalização dos dados	67
5.7.	Análise dos resultados obtidos por sequenciamento	69
5.7.1.	Análise de ontologia gênica – Genes regulados positivamente	72
5.7.2.	Análise de ontologia gênica – Genes regulados negativamente	75
5.7.3.	Eficiência traducional	78
5.8.	Análise por <i>ribosome profiling</i> de genes e vias regulados traducionalmente ...	81
5.8.1.	Regulação das vias de sinalização de adesão focal e do citoesqueleto de actina	81
5.8.2.	Regulação de diferentes vias e sistemas relacionados à tradução	83
5.9.	Preparo de amostras para análise por proteômica	84
6.	DISCUSSÃO	85
6.1.	Padronização do protocolo de <i>ribosome profiling</i>	85
6.2.	Aplicação do protocolo de <i>ribosome profiling</i> ao estudo de CTs obtidas de tecido adiposo	86
6.2.1.	Análise do sequenciamento	87
6.2.2.	<i>Footprints</i> ribossomais de CTs humanas obtidas de tecido adiposo	88
6.2.3.	Contaminação com RNAr	89
6.2.4.	Mapeamento contra RNAm	90
6.3.	Análise da regulação da expressão gênica por <i>ribosome profiling</i>	93
6.3.1.	Diferenciação adipogênica de CTs obtidas de tecido adiposo	93
6.3.2.	Indução para diferenciação adipogênica leva à regulação do citoesqueleto de actina e de adesão celular	94
6.3.3.	Após 72 horas de indução para diferenciação adipogênica, as células apresentam queda na eficiência traducional de genes relacionados à tradução	95
7.	CONCLUSÕES	99
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	100

1. INTRODUÇÃO

1.1. As células-tronco

As células-tronco (CTs) caracterizam-se por possuírem a capacidade de se autorrenovar e de dar origem a um ou mais tipos celulares diferenciados (Spangrude *et al.*, 1988; Weissman, 2000; Fuchs e Chen, 2013). De acordo com seu potencial de diferenciação, as CTs podem ser classificadas em: totipotentes, as quais possuem a capacidade de formar todos os tipos de tecidos embrionários e extra-embrionários; pluripotentes, que podem formar todos os tipos celulares embrionários; multipotentes, as quais dão origem a um determinado grupo de linhagens celulares; oligopotentes, com capacidade de formar uma gama mais restrita de linhagens celulares; e unipotentes, as quais formam apenas um tipo de células maduras (Wagers e Weissman, 2004).

1.1.1. Os principais tipos de CTs

Existem três tipos principais de CTs: as embrionárias, as induzidas e as adultas. Em mamíferos, as CTs embrionárias são células pluripotentes obtidas a partir de embriões na fase de blastocisto (Figura 1.1 A). Nesta fase, o embrião é formado por uma camada externa chamada de trofoectoderme, a qual irá formar os anexos embrionários, e uma massa celular interna, que dará origem ao embrião. É a partir da massa celular interna que são obtidas as CTs embrionárias, as quais são capazes de dar origem a todos os tecidos do organismo (Sherman, 1975; Fuchs e Segre, 2000). A pluripotencialidade das CTs embrionárias as torna uma alternativa interessante na busca por tratamentos para diversas doenças humanas, como modelo de estudo na busca por novas drogas, além da possibilidade de auxiliar em pesquisas sobre defeitos de nascimento, infertilidade e perdas gestacionais (Thomson *et al.*, 1998). Contudo, a utilização de CTs embrionárias ainda esbarra no problema da rejeição tecidual (Takahashi e Yamanaka, 2006) e do risco de formação de tumores, devido à sua alta capacidade de proliferação e diferenciação (Ben-David *et al.*, 2012).

Em 2006, os pesquisadores Kazutoshi Takahashi e Shinaya Yamanaka apresentaram uma nova fonte para obtenção de CTs pluripotentes (Figura 1.1 B). Através do uso de quatro fatores de transcrição (Oct3/4, Sox2, c-Myc e Klf-4), foi obtida uma linhagem pluripotente a partir de células adultas diferenciadas, chamadas CTs pluripotentes induzidas (*induced pluripotent stem cells*, iPSCs) (Takahashi e Yamanaka, 2006). Neste primeiro trabalho, foram utilizados fibroblastos embrionários e adultos de camundongo como fonte de células

diferenciadas. Mas, em 2007, o mesmo grupo obteve iPSCs a partir de células adultas humanas (Takahashi *et al.*, 2007). Assim, a pluripotencialidade das iPSCs e o fato de serem geradas a partir de células adultas levantaram a possibilidade de regeneração de todos os tecidos do organismo a partir de células somáticas do próprio paciente (Yamanaka, 2009; Li *et al.*, 2013). Em cultura, também já foi observado que as iPSCs possuem a capacidade de dar origem a trofoblastos, o que é interessante para estudos sobre o desenvolvimento dos anexos embrionários (Mali *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2013 b). Contudo, a baixa eficiência de reprogramação das células adultas e o risco de formação de teratoma ainda são alguns dos problemas enfrentados (Takahashi *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2013). O método clássico de reprogramação envolve o uso de retrovírus ou lentivírus, que são responsáveis pela inserção dos genes de reprogramação no DNA de células somáticas (Takahashi e Yamanaka, 2006; Takahashi *et al.*, 2007). Embora estes transgenes sejam silenciados, a possibilidade de reativação destes fatores leva a um aumento considerável do risco de formação de teratoma, principalmente devido à reativação de c-Myc (Okita *et al.*, 2007). Além disso, como o genoma possui múltiplos sítios de integração, os transgenes podem ser inseridos dentro de outros genes, levando à sua ativação (Yamanaka, 2009). Mas, diversos grupos vêm avançando nesta área, principalmente através da busca por alternativas ao uso de retrovírus para inserção dos fatores de reprogramação (Yoshioka *et al.*, 2013).

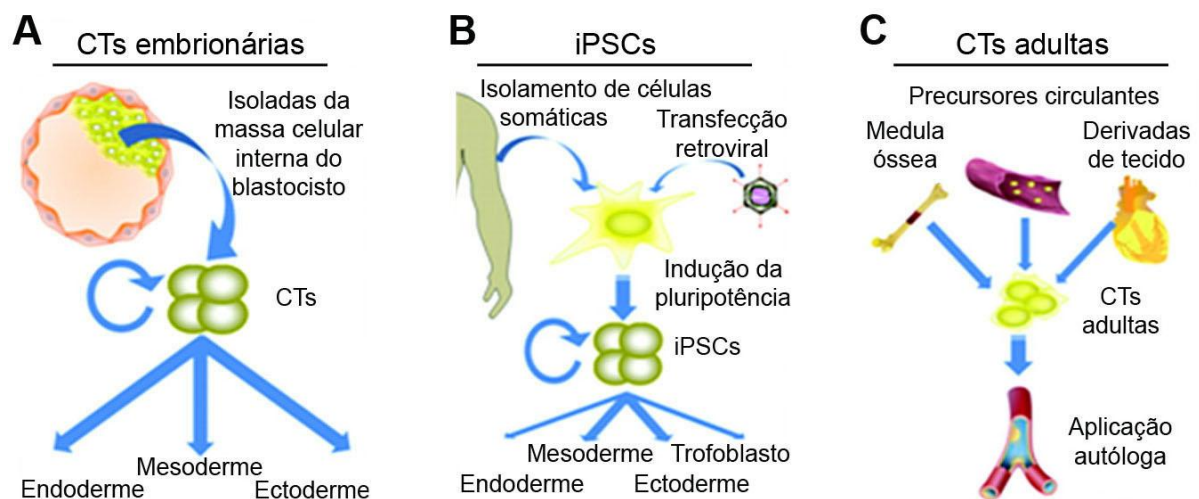


Figura 1.1. Os diferentes tipos de CTs. Existem três tipos principais de CTs. As embrionárias (A) são obtidas a partir da massa celular interna do blastocisto e são pluripotentes, podendo dar origem a todos os tecidos do organismo. Outra forma de obter células pluripotentes é através da reprogramação de células somáticas diferenciadas, as iPSCs (B). No esquema, está representado um dos métodos clássicos de reprogramação celular, através do uso de retrovírus. Já as CTs adultas (C), obtidas a partir de tecidos adultos, são multipotentes e permitem a aplicação autóloga (adaptado de Leeper *et al.*, 2010).

Além das células pluripotentes (embrionárias ou induzidas), nas últimas décadas, uma nova fonte de CTs tem sido estudada: os tecidos adultos (Figura 1.1 C). Diversos trabalhos

demonstraram a existência de CTs em diferentes tecidos adultos, como medula óssea (Spangrude *et al.*, 1988), sangue de cordão umbilical (Erices *et al.*, 2000), tecido adiposo (Zuk *et al.*, 2002), polpa dentária (Gronthos *et al.*, 2000), pele e folículos pilosos (Blanpain *et al.*, 2004; Wong *et al.*, 2006). As CTs adultas são células quiescentes capazes de responder a sinais do meio ambiente em que se encontram e manter sua autorrenovação, dando origem a novas CTs, ou entrar em um processo de diferenciação. Elas constituem um verdadeiro reservatório e promovem a regeneração tecidual quando necessário, possuindo um papel fundamental na homeostase do organismo (Fuchs e Segre, 2000). Na maioria dos tecidos, a capacidade de autorrenovação das CTs está diretamente relacionada com a capacidade de regeneração do tecido. Quando esta capacidade de autorrenovação das CTs é esgotada, seja por senescência natural, seja por danos físicos ou genéticos, em geral, inicia-se um processo de atrofia ou envelhecimento tecidual (Fuchs e Chen, 2013).

Por outro lado, diversos trabalhos demonstraram que algumas CTs adultas possuem a capacidade de dar origem não apenas aos fenótipos do próprio tecido onde se encontram, mas também a outros tipos celulares, um fenômeno conhecido como transdiferenciação (Erices *et al.*, 2000; Wagers e Weissman, 2004; Wong *et al.*, 2006; Rebelatto *et al.*, 2008). Esta capacidade das CTs adultas de darem origem a diversos tipos celulares as tornou uma alternativa interessante na busca por novas fontes de material para uso em futuras terapias de regeneração (Fuchs e Segre, 2000; Weissman, 2000; Signer e Morrison, 2013). Uma das principais vantagens do uso de CTs adultas é a possibilidade de realização de transplantes autólogos, evitando o risco de rejeição (Slack, 2001). Quanto à potencialidade, as CTs embrionárias e as iPSCs caracterizam-se por possuírem uma maior gama de fenótipos do que as adultas, o que seria interessante para terapia celular, pois aumentaria a diversidade de tecidos que poderiam ser regenerados. Por outro lado, a menor capacidade de diferenciação (menor potencialidade) e de proliferação das CTs adultas faz com que o risco de formação de tumores seja menor, fazendo com que a aplicação destas células em terapias seja considerada mais segura (revisado por Herberts *et al.*, 2011).

1.1.2. As CTs obtidas de tecido adiposo

O tecido adiposo é um tipo de tecido conjuntivo formado a partir da mesoderme que possui diferentes funções no organismo adulto, como reserva energética, preenchimento, proteção térmica e mecânica, além de participar do sistema endócrino, com a secreção de diferentes citocinas e fatores de crescimento (Trayhurn e Beattie, 2001). Em trabalho publicado em 2001, Zuk e colaboradores demonstraram a existência de células multipotentes

no tecido adiposo, as quais poderiam ser facilmente isoladas a partir de lipoaspirados. Estas células, que possuíam uma morfologia fibroblastóide, puderam ser expandidas *in vitro*, mantidas em cultivo por um longo período de tempo e possuíam a capacidade de dar origem às linhagens condrogênica, osteogênica, adipogênica e miogênica (Zuk *et al.*, 2001). Embora estes resultados sugerissem a presença de CTs no tecido adiposo, ainda havia dúvidas sobre se esta multipotencialidade não se devia à presença de múltiplos progenitores no tecido ou mesmo de CTs de outros tecidos (como de sangue periférico). Mas, em 2002, o mesmo grupo realizou ensaios de clonagem que corroboraram a hipótese de existência de CTs multipotentes, capazes de dar origem a pelo menos três linhagens mesodermis (osteogênica, condrogênica e adipogênica) (Zuk *et al.*, 2002). Estudos subsequentes demonstraram que, além da capacidade de se diferenciar em uma variedade de fenótipos celulares, as CTs obtidas de tecido adiposo também podem desempenhar um papel parácrino, através da secreção de citocinas (Baer e Geiger, 2012), como fatores angiogênicos e antiapoptóticos (Rehman *et al.*, 2004), fator de crescimento de hepatócitos (*hepatocyte growth factor*, HGF), fatores hematopoiéticos e pró-inflamatórios (Kilroy *et al.*, 2007), aumentando ainda mais o seu potencial de uso.

Embora o processo de isolamento das CTs de tecido adiposo tenha sido relativamente bem estabelecido, sua localização *in situ* ainda não pôde ser precisamente determinada. Os diferentes estudos realizados apontam para uma localização perivascular, onde as CTs coexistiriam com células endoteliais e pericitos (Baer e Geiger, 2012). Uma das dificuldades encontradas é a falta de um marcador único para identificar esta população. Acredita-se que esta dificuldade se deva a dois motivos principais: (1) à existência de subpopulações de CTs no tecido adiposo e (2) ao fato de que as CTs isoladas mudam seu perfil de expressão proteica durante o cultivo *in vitro* (Varma *et al.*, 2007; Baer e Geiger, 2012). Quanto ao primeiro ponto, diferentes estudos apontam que a população de CTs obtida do tecido adiposo é, sim, heterogênea, podendo haver a presença de outras CTs com menor potencialidade, de subpopulações de progenitores e mesmo a presença de células diferenciadas, como células de músculo liso e pericitos. Esta heterogeneidade, entretanto, pode ser reduzida ao longo das passagens de cultivo (Baer e Geiger, 2012). Quanto ao segundo ponto, em estudo publicado em 2007, Varma e colaboradores demonstraram que, logo após o isolamento, as CTs derivadas de tecido adiposo são positivas para CD34 (fortemente), CD117 e HLA-DR, mas apresentam baixa expressão de CD105 e, especialmente, CD166. Mas, após passagem por um período de cultivo, foi detectada uma queda na expressão de CD34 e CD117 e aumento nas de CD105 e CD166 (Varma *et al.*, 2007). O tempo de cultivo parece ser importante para reduzir a heterogeneidade da população celular isolada do tecido adiposo (Baer e Geiger, 2012),

sendo que, após 2 ou 3 passagens, as células apresentam um perfil de expressão mais homogêneo, sendo positivas para CD10, CD13, CD29, CD44, CD49e, CD73, CD90, CD105 e CD166, e negativas para CD11b, CD14, CD31 e HLA-DR (Gronthos *et al.*, 2001).

Como modelo de estudo, as CTs obtidas de tecido adiposo possuem algumas vantagens. Primeiramente, elas são obtidas com relativa facilidade, podendo ser isoladas de material que é normalmente descartado em cirurgias que envolvem dermolipectomia. A lipossucção é um procedimento bem tolerado e seguro, através do qual uma grande quantidade de CTs pode ser obtida (Rebelatto *et al.*, 2008; Baer e Geiger, 2012). O processo de isolamento desta população celular também é considerado bastante simples e eficiente. De maneira geral, o tecido adiposo é digerido enzimaticamente, submetido a centrifugações e incubado com soluções salinas para lise de células sanguíneas, sendo que o critério final para obtenção das CTs é sua capacidade de adesão ao plástico (Zuk *et al.*, 2001; Rebelatto *et al.*, 2008; Baer e Geiger, 2012). A eficiência de isolamento destas células chega a 100%, enquanto que outras fontes, como o sangue de cordão umbilical, têm eficiência de cerca de 30% (Rebelatto *et al.*, 2008). As condições de cultivo também seguem os padrões básicos tanto em relação aos meios de cultura utilizados quanto à manipulação do material (Zuk *et al.*, 2001; Zuk *et al.*, 2002; Rebelatto *et al.*, 2008).

Nos últimos anos, vários grupos vêm explorando diferentes possibilidades de aplicação das CTs derivadas de tecido adiposo através da análise do seu potencial de diferenciação e de sua atividade parácrina (Rehman *et al.*, 2004; Kilroy *et al.*, 2007; Rebelatto *et al.*, 2008; Rajashekhar *et al.*, 2014). Em alguns estudos preliminares *in vivo*, já foram identificados efeitos positivos da aplicação de CTs derivadas de tecido adiposo no tratamento de doenças, como retinopatia causada por diabete (Rajashekhar *et al.*, 2014) e na revascularização e recuperação de membros que sofreram isquemia (Bura *et al.*, 2014). Assim, como perspectiva para uso em futuras terapias celulares, as CTs obtidas de tecido adiposo representam de fato uma alternativa interessante, uma vez que são obtidas com relativa facilidade e em grande quantidade, são capazes de originar diferentes fenótipos celulares, possuem atividade parácrina, permitem a realização de transplantes autólogos e não envolvem problemas éticos (Zuk *et al.*, 2001; Baer e Geiger, 2012).

1.1.3. Diferenciação de CTs

Para dar origem a diferentes fenótipos, as CTs passam por um processo conhecido como diferenciação celular, durante o qual ocorre uma série de mudanças no perfil de expressão de proteínas em resposta a estímulos recebidos. *In vitro*, o comprometimento

das CTs com uma linhagem celular está, portanto, fortemente influenciado pelo meio de cultura utilizado (Liu *et al.*, 2009; Augello e De Bari, 2010). Assim, diversos trabalhos exploraram o uso de diferentes composições a fim de obter a diferenciação de CTs nos mais diversos fenótipos (Pittenger *et al.*, 1999; Augello e De Bari, 2010). Um dos principais elementos utilizados são os fatores de crescimento, como IGF (*insulin-like growth factor*, fator de crescimento semelhante à insulina), FGFs (*fibroblast growth factors*, fator de crescimento de fibroblasto), EGF (*epidermal growth factor*, fator de crescimento epidermal), PDGF (*platelet-derived growth factor*, fator de crescimento derivado de plaquetas), VEGF (*vascular endothelial growth factor*, fator de crescimento endotelial vascular) e a superfamília do TGF- β (*transforming growth factor- β* , fator de crescimento de transformação β). Estes fatores atuam como sinais regulatórios que interagem com vias de transdução de sinal específicas, as quais controlam fatores de transcrição da célula (revisado por Liu *et al.*, 2009). Além dos fatores de crescimento, outras substâncias têm papéis críticos na determinação do comprometimento das CTs com uma linhagem celular. Por exemplo, a incubação de CTs adultas de origem mesodermal (como é o caso das derivadas de tecido adiposo) com dexametasona, insulina, 3-isobutil 1-metilxantina e indometacina leva à adipogênese. Após este tratamento, as células acumulam vacúolos ricos em lipídeos (típicos de adipócitos) e expressam genes característicos como PPAR γ (*peroxisome proliferator-activated receptors*, receptores ativados por proliferador de peroxissomos), lipase de lipoproteína, proteína de ligação a ácido graxo aP2, além de um amplo espectro de genes associados ao metabolismo de lipídeos (Pittenger *et al.*, 1999; Liu *et al.* 2007).

O processo de diferenciação também pode ser estimulado pela interação da célula com a matriz extracelular. Além de servir como arcabouço estrutural, a matriz extracelular participa da regulação de muitos aspectos do comportamento celular, como proliferação, crescimento, sobrevivência, modificações morfológicas, migração e diferenciação (Daley *et al.*, 2008). Para CTs adultas de origem mesodermal, por exemplo, o uso de matrizes mais rígidas ou que permitem que a célula adquira uma morfologia mais alongada favorece a osteogênese; enquanto que composições mais flexíveis ou que permitem uma morfologia mais arredondada estimulam o processo adipogênico (McBeath *et al.*, 2004; Engler *et al.*, 2006).

Contudo, apesar de já serem conhecidos diversos meios de cultura e matrizes capazes de promover a diferenciação das CTs, para fazer um melhor uso destas células em terapias celulares e engenharia de tecidos, é importante entender os mecanismos celulares e moleculares que conduzem o comprometimento inicial e o processo de diferenciação (Liu *et al.*, 2007).

1.2. Estudo da regulação da expressão gênica

Durante a diferenciação celular, ocorre uma significativa mudança no perfil de expressão de proteínas, levando a mudanças fenotípicas e de função. Por isso, o conhecimento de como a expressão gênica ocorre e como é regulada é um passo fundamental no estudo do processo de diferenciação.

1.2.1. Transcrição

A expressão gênica envolve quatro processos celulares principais: transcrição, controle da vida média do RNAm, tradução e degradação de proteínas (Schwanhäusser *et al.*, 2011). A transcrição de regiões codificantes é promovida pela enzima RNA-polimerase II e consiste na síntese de uma molécula de RNAm tendo como molde o genoma e possui três etapas principais: iniciação, alongação e terminação. O ponto inicial da transcrição é marcado pela presença de uma sequência especial de nucleotídeos chamada de promotor, a qual serve como plataforma para montagem do complexo de pré-iniciação, promovendo o início da transcrição. Este fenômeno de iniciação depende da ação coordenada de uma série de fatores e cofatores (revisado por Thomas e Chiang, 2006), dentre os quais estão os fatores de transcrição, os quais se ligam ao promotor ou a sequências no DNA conhecidas como ativadores (*enhancers*) e atuam na regulação da taxa de síntese de um ou de um grupo determinado de RNAm (revisado por Spitz e Furlong, 2012).

Muitos fatores de transcrição já foram descritos como importantes tanto para manutenção da pluripotencialidade de CTs quanto para o processo de diferenciação. Dentre os fatores de transcrição importantes para manutenção da pluripotencialidade, estão Oct3/4, Sox 2 e Nanog (Takahashi e Yamanaka, 2006). Em relação ao processo de diferenciação, foram identificados fatores como CBFA-1/Runx2 e Osterix, fundamentais para regulação da transcrição na diferenciação osteogênica, e Sox-9, para condrogênese (revisado por Augello e De Bari, 2010). No caso da adipogênese, um evento crítico é a fosforilação de C/EBP β , que ativa sua função de ligação ao DNA. Uma vez ativado, este fator estimula a transcrição de PPAR γ e C/EBP γ , outros fatores transcripcionais importantes para formação do adipócito (revisado por Tang e Lane, 2012).

1.2.2. Elementos de ligação ao RNA e estabilidade

O segundo ponto que determina a maior ou menor expressão de um gene é a regulação da vida média do RNAm. A taxa de degradação de transcritos pode ser regulada em resposta a

estímulos recebidos, levando a um aumento ou redução de sua abundância, a fim de suprir as necessidades da célula por proteínas individuais. Além disso, no citoplasma de uma célula eucariótica, as moléculas de RNAm estão sujeitas a diferentes sistemas de vigilância, que atuam principalmente na eliminação de RNAm que poderiam gerar proteínas potencialmente defeituosas (Wu e Brewer, 2012). O *nonstop mRNA decay* (decaimento de RNAm sem parada), por exemplo, é um mecanismo de vigilância que promove a degradação de sequências de RNAm que não possuem códon de parada (Frischmeyer *et al.*, 2002). Já o *no-go mRNA decay* (decaimento de RNAm não ir) foi observado em leveduras e é ativado quando ocorre o bloqueio da passagem do ribossomo durante a elongação traducional (Doma e Parker, 2006). O *nonsense-mediated decay* (NMD, decaimento mediado por falta de sentido), por sua vez, atua na eliminação de moléculas de RNAm que contêm códons de parada prematuros, evitando, assim, a tradução de proteínas com potencial atividade deletéria para a célula (Mendell *et al.*, 2004). Além disso, alguns destes sistemas de decaimento de RNA funcionam também na regulação da expressão de genes fisiológicos. No *Staufen1-mediated decay* (decaimento mediado por Staufen1, SMD), por exemplo, a proteína Staufen-1 se liga à região 3'UTR de seus transcritos-alvo e recruta parte da maquinaria de NMD para promover sua degradação. Em trabalho publicado em 2012, Cho e colaboradores verificaram que este mecanismo é importante para o processo de adipogênese, sendo que sua expressão e atividade aumentam durante o processo de diferenciação, enquanto as do NMD diminuem. Dentre os alvos do SMD, está o RNAm de KLF2, uma proteína que atua inibindo a adipogênese (Cho *et al.*, 2012).

Assim como Staufen1, os demais mecanismos de regulação da expressão gênica envolvem elementos de ligação ao RNA, os quais são capazes de recrutar ou excluir maquinarias de degradação, reduzindo ou aumentando a estabilidade da molécula de RNAm, além de poder determinar sua localização e influenciar na sua taxa de tradução. Existem dois grupos principais de elementos de ligação ao RNAm: as proteínas de ligação ao RNA (*RNA-binding proteins*, RBPs) e os RNAs não codificantes (revisado por Wu e Brewer, 2012). As RBPs interagem com o RNA e podem tanto atuar diretamente sobre ele ou recrutar a ação de outras proteínas ou complexos proteicos. Em 2013, através de estudos de interatoma, 555 RBPs foram identificadas em CTs embrionárias, das quais 294 são preferencialmente expressas nestas células quando comparado a fenótipos diferenciados. Dentro deste grupo, está L1td1, uma RBP que já foi descrita como tendo papel fundamental na manutenção da pluripotencialidade em CTs embrionárias humanas (Kwon *et al.*, 2013).

Os RNAs não codificantes, por sua vez, possuem a capacidade de parear com outros ácidos nucleicos e recrutar a ação de diferentes complexos proteicos que interagem com o RNA. Dentro deste grupo estão os microRNAs (miRNAs), os quais se associam a um complexo de

silenciamento (miRISC) e podem atuar tanto bloqueando a tradução quanto levando o RNAm à degradação (revisado por Bartel, 2009; Wu e Brewer, 2012). No contexto das CTs, já foi identificado que uma série de pequenos RNAs tem papel fundamental tanto na manutenção da pluripotencialidade quanto no processo de diferenciação. O miRNA27b, por exemplo, é um repressor da diferenciação adipogênica, sendo que sua expressão é reduzida durante este processo. Acredita-se que este miRNA atue diretamente através da ligação à região 3'UTR de PPAR γ , reduzindo sua atividade (Karbiener *et al.*, 2009). Além disso, este mesmo miRNA parece ser importante para a atividade imunomodulatória de CTs derivadas de tecido adiposo (Chen *et al.*, 2013 a). Outra classe de RNAs não-codificantes associados à regulação de RNAm é a dos grandes RNAs intergênicos não codificantes (*large intergenic non-coding RNA*, lincRNA). Ainda não há um consenso sobre a forma de atuação destas moléculas, mas acredita-se que possam atuar em diferentes níveis da expressão gênica (Ulitsky e Bartel, 2013). Em trabalho publicado em 2011, Guttman e colaboradores identificaram 137 lincRNAs envolvidos na regulação da expressão gênica de CTs embrionárias, dos quais 26 estariam relacionados à manutenção da pluripotencialidade (Guttman *et al.*, 2011).

Em geral, os elementos de ligação ao RNA reconhecem sequências e/ou estruturas localizadas nas regiões não codificantes do transcrito. Alguns grupos de RNAm, inclusive, têm sua taxa de expressão regulada de forma coordenada devido à presença de elementos comuns (por exemplo, regiões ricas em AU ou em GU) na sequência não traduzida que funcionam como plataforma para ligação de moléculas regulatórias (Wu e Brewer, 2012). Em trabalho desenvolvido por nosso grupo, em 2013, foi identificado que, após a indução para diferenciação adipogênica de CTs derivadas de tecido adiposo, muitos transcritos apresentavam mudanças (aumento ou redução) no tamanho da região 3'UTR, possivelmente influenciando na estabilidade do RNAm ou na sua associação com polissomos (Spangenberg *et al.*, 2013).

Conforme descrito, muitos dos elementos de ligação ao RNA atuam através do recrutamento de complexos de degradação de RNA. Um dos principais sinais que levam à degradação de transcritos é a ausência da cauda poliA. Assim, um dos principais sistemas de degradação de RNAm é o decaimento dependente de deadenilação. Neste sistema, as deadenilases Pan2-Pan-3 promovem a remoção inicial da cauda poliA, seguidas da ação do complexo Ccr4-Not. Na próxima etapa, ocorre a ação de exonucleases, as quais podem atuar em ambas as direções. O complexo proteico chamado exossomo é o principal responsável pela degradação 3'-5'. Já a ação no sentido 5'-3' é iniciada pela atuação de um complexo de decapeamento (que tem como enzimas principais Dcp1-Dcp2), o qual promove a remoção do *cap* da extremidade 5', seguido da ação de exorribonucleases mediadas por Xrn1, as quais degradam o RNAm na direção 5'-3'. Antagonicamente à ação das deadenilases, existem

proteínas conhecidas como poliA polimerases, que promovem o aumento do tamanho da cauda poliA, aumentando a estabilidade da molécula e estimulando sua tradução. Além disso, existe outro sistema de decaimento independente de deadenilação mediado por endorribonucleases, as quais frequentemente têm como alvo moléculas de RNAm tradicionalmente ativas (Figura 1.2) (revisado por Kong e Lasko, 2012; Wu e Brewer, 2012).

No citoplasma de eucariontes ainda são encontradas regiões onde muitos destes complexos de manutenção e degradação de RNA se concentram, como os grânulos de stress e de processamento (*P bodies*). Estudos sugerem que estas duas estruturas interagem na atuação da manutenção do RNAm, sendo que os grânulos de stress teriam como papel principal a triagem, seleção e remodelamento de RNPM (ribonucleoproteínas), enquanto que os *P bodies* seriam os principais responsáveis pela degradação do RNAm (Kedersha *et al.*, 2005). Em trabalho desenvolvido pelo nosso grupo, vem sendo estudada a composição destas estruturas em CTs derivadas de tecido adiposo e o seu possível papel na manutenção da multipotencialidade e do processo de diferenciação.

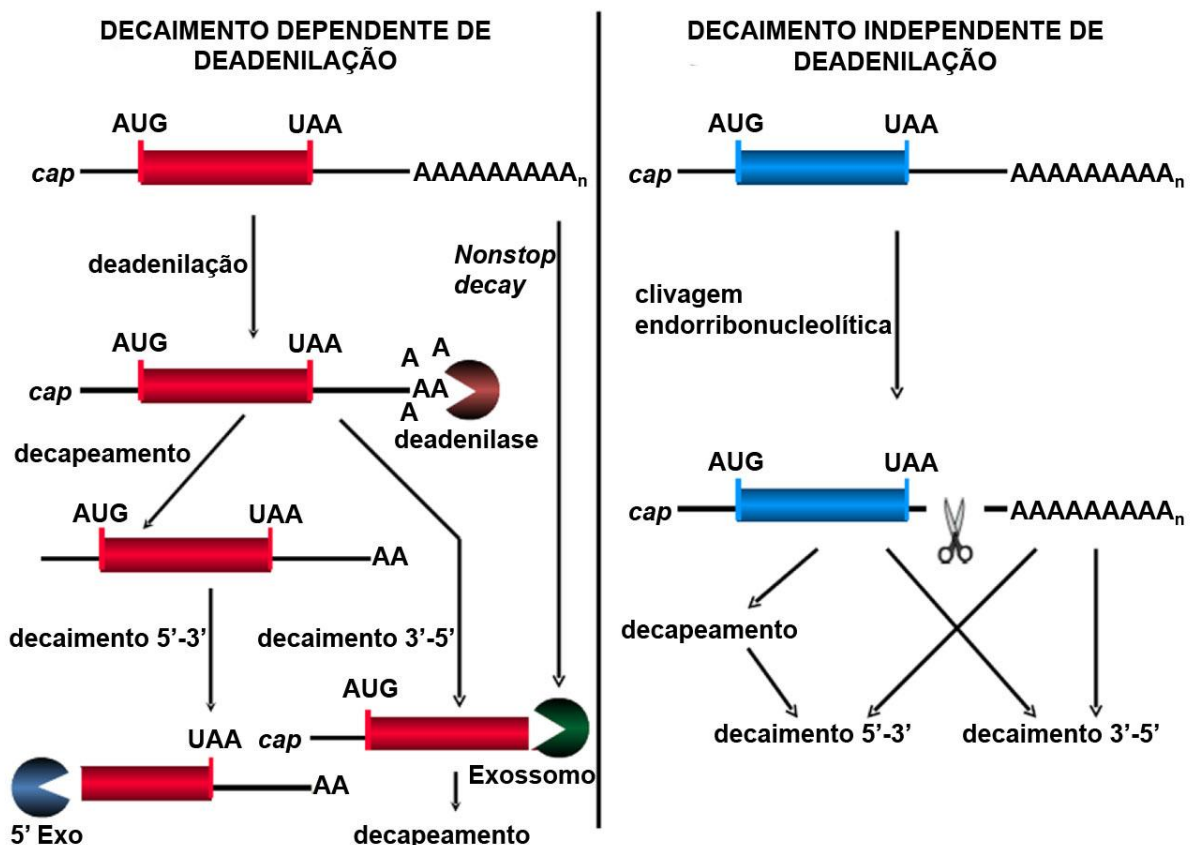


Figura 1.2. Vias de decaimento de RNA em células de mamíferos. Uma das principais vias de decaimento de RNA é a dependente do encurtamento da cauda poliA. Esta via tem início com a ação de enzimas deadenilase, seguida da degradação exonucleolítica no sentido 5'-3' (iniciada por um processo de decapeamento) ou 3'-5'. Por outro lado, existe também um processo de decaimento que independente de deadenilação e que tem como ponto de partida a ação de endonucleases (adaptado de Wu e Brewer, 2012).

1.2.3. Tradução e modificações pós-traducionais

Além de atuar na estabilidade do RNAm, os elementos de ligação ao RNA também atuam na regulação da tradução, outro ponto importante para determinação do nível de expressão de um gene. A regulação traducional também permite controlar a distribuição espacial e temporal das proteínas sintetizadas, podendo determinar sua localização na célula e o momento em que será produzida de forma altamente dinâmica. Assim como o processo de transcrição, a tradução de um RNAm pode ser dividida em três subprocessos: iniciação, alongação e terminação. O principal ponto de regulação da tradução é a etapa de iniciação. Em geral, o recrutamento do ribossomo pelo RNAm depende da interação do 5'-*cap* com uma série de fatores de iniciação. Assim, existem proteínas regulatórias que funcionam como inibidores competitivos dos fatores de iniciação entre si, e outras que atuam impedindo a ligação destes fatores ao *cap*. Outra forma de regulação se dá pela presença de quadros de leitura na região 5' (*upstream open reading frames*, uORFs), antes da sequência codificante em si. Estas uORFs recrutam a subunidade menor do ribossomo, condicionando a leitura da ORF principal a um novo processo de escaneamento, cuja eficiência irá depender da distância entre a uORF e a ORF principal, da presença de estruturas secundárias, entre outros. Calcula-se que, em humanos, cerca de metade dos transcritos tenham uORFs. Além da iniciação, as etapas seguintes da tradução também podem ser reguladas, principalmente através do impedimento da montagem total do ribossomo (junção da subunidade maior) e de bloqueio da alongação (revisado por Kong e Lasko, 2012).

Outra forma de regulação da expressão gênica é a modulação da velocidade de tradução. Além de influenciar a taxa de síntese da proteína, o controle da velocidade também parece ser importante para o correto dobramento do peptídeo e para determinar a sua localização (Zhang *et al.*, 2009; Ingolia *et al.*, 2011). Ainda não há um consenso sobre os mecanismos que determinam a velocidade com a qual o ribossomo consegue ler um RNAm e sintetizar a cadeia polipeptídica, sendo que os estudos realizados apontam para diferentes formas de regulação. Os principais estudos indicam que existe uma tendência de redução da velocidade de tradução quando há a ocorrência de códons raros, que pareiam com RNA transportadores (RNAt) de baixa abundância, sendo que esta modulação no ritmo de síntese seria importante para o correto dobramento da proteína (Zhang *et al.*, 2009). Por outro lado, outros estudos apontaram que existem sim regiões consenso que determinam uma menor velocidade de tradução, mas que isto não estaria relacionado à presença de códons raros (Ingolia *et al.*, 2011). Outra hipótese apresentada é que a velocidade de tradução pode ser modulada pela interação do próprio peptídeo nascente com o canal de saída do ribossomo (Lu e Deutsch, 2008).

A maior ou menor abundância de uma proteína pode ainda ser determinada pela manutenção de sua estabilidade, que pode ser regulada através de modificações pós-traducionais. Estas modificações são eventos de processamento covalentes que modificam as propriedades de uma proteína através de clivagem proteolítica ou pela adição de um grupo modificador a um ou mais aminoácidos. Além de regular a vida média, estas modificações podem ainda determinar a atividade, a localização e a capacidade de interação da proteína (Mann e Jensen, 2003). No caso da diferenciação adipogênica, por exemplo, a estabilidade e a atividade do fator de transcrição PPAR γ são reguladas por eventos de fosforilação, ubiquitinação, sumoilação e adição de grupamento O-GlcNAc (*O-linked N-acetylglucosamine*, N-acetilglicosamina em ligação O-glicosídica) à sua cadeia polipeptídica (revisado por Floyd e Stephens, 2012).

1.3. Ferramentas de análise de expressão gênica

A expressão gênica é um processo altamente complexo e dinâmico, possuindo vários possíveis pontos de regulação. O conhecimento do perfil de expressão gênica de uma célula é, portanto, de extrema importância para entender sua fisiologia e regulação (Ingolia *et al.*, 2012). Nesta perspectiva, foram desenvolvidas diferentes técnicas a fim de monitorar quais genes estão sendo expressos nas mais diversas situações. Dois dos principais métodos são os microarranjos de DNA/RNA e o sequenciamento em larga escala RNA-seq. Os microarranjos consistem em lâminas de vidro onde sondas específicas para diferentes genes são impressas de forma individualizada e organizada. Este arranjo é utilizado para incubação com a amostra de RNA que se deseja analisar marcada com fluoróforos, o que permite a identificação dos pontos (e, portanto, dos genes) em que há hibridização. Tendo em vista que centenas e até milhares de sondas poderiam ser colocadas em uma lâmina, isto permitiu a análise relativamente rápida e simultânea de uma grande quantidade de genes (Brown e Botstein, 1999). Uma das desvantagens desta técnica, contudo, é que ela se limita a um rol de genes conhecidos, sendo pouco sensível a polimorfismos. Já o sequenciamento em larga escala de RNA (RNA-seq) se caracteriza por solucionar estas limitações, permitindo a identificação de novas sequências. O RNA-seq consiste na produção de uma biblioteca de DNA (cDNA) a partir de uma amostra de RNAm e no sequenciamento em larga escala deste material (Mortazavi *et al.*, 2008). Entretanto, tanto o RNA-seq quanto os microarranjos tinham inicialmente como matéria prima todo o RNAm existente na célula. Assim, as variações no nível de expressão dos genes detectados estavam majoritariamente relacionadas à regulação em nível transcricional (Ingolia *et al.*, 2012).

Mas, conforme descrito anteriormente, a expressão gênica é um processo complexo que possui uma série de pontos críticos regulatórios tanto em nível transcricional quanto pós-transcricional, o que torna a relação RNAm-proteína também complexa. Em 2004, Tian e colaboradores utilizaram análises por microarranjos e proteômica quantitativa a fim de avaliar a correlação entre os níveis de RNAm e proteínas em células de linhagem hematopoiética e em células isoladas do fígado de camundongos. Neste trabalho, foi constatado que apenas 40% das alterações em nível de expressão de uma proteína estão relacionadas a alterações na abundância de RNAm (Tian *et al.*, 2004). Em 2011, Schwanhäusser e colaboradores compararam as taxas de expressão e renovação de RNAm e proteínas em fibroblastos de camundongo, usando marcação com isótopos estáveis na cultura celular (*stable isotope labelling by amino acids in cell culture*, SILAC). Neste trabalho, também foi constatado que apenas 40% da variabilidade nos níveis de proteínas seriam explicados pelos níveis de RNAm, sendo que a maior parte da regulação pós-transcricional se daria pela modulação da taxa de tradução e uma menor parte seria devido à estabilidade do RNAm. Ainda neste trabalho, verificou-se que, embora a estabilidade de proteínas seja fundamental para a manutenção de sua abundância, esta forma de regulação tem um papel modesto dentro do cenário global de regulação dos níveis de proteínas (Schwanhäusser *et al.*, 2011). Em ambos os trabalhos, fica evidente, portanto, o importante papel da regulação pós-transcricional na modulação do nível de expressão proteica (Tian *et al.*, 2004; Schwanhäusser *et al.*, 2011). Assim, a busca por técnicas que contemplem este aspecto da expressão gênica tornou-se um campo bastante importante. Nesta perspectiva, foi desenvolvida uma técnica conhecida como *polysome profiling*, a qual consiste no isolamento e sequenciamento do RNAm que se encontra associado aos polissomos, através de um gradiente de sacarose. Em trabalho anterior realizado em nosso laboratório, foi utilizada a técnica de *polysome profiling* para avaliação do perfil de expressão gênica de CTs derivadas de tecido adiposo durante a diferenciação adipogênica. Ao comparar os resultados obtidos após o sequenciamento de RNAm total e da fração associada a polissomos, foi possível perceber que cerca de 60% dos genes diferencialmente expressos apresentavam algum nível de regulação pós-transcricional (Figura 1.3) (Spangenberg *et al.*, 2013).

Contudo, a separação da fração polissomal como um todo não é capaz de revelar a intensidade de tradução de um determinado transcrito. Isso poderia ser feito através da análise em separado das diferentes frações do gradiente polissomal. Entretanto, este protocolo enfrentaria algumas dificuldades técnicas, como o elevado número de frações a serem analisadas e o fato de que é difícil obter uma separação com precisão dos transcritos que possuem poucos ribossomos associados (Ingolia, 2014). Além disso, complexos ribonucleoproteicos pesados não comprometidos com a tradução cossedimentam com os polissomos, dificultando a separação dos RNAm que estão efetivamente sendo traduzidos

(Holetz *et al.*, 2007). Outra desvantagem da técnica de *polysome profiling* é a impossibilidade de indicar a posição exata dos ribossomos no RNAm, uma informação importante para estudos de regiões de pausa e outras formas de regulação traducional (Ingolia, 2014).

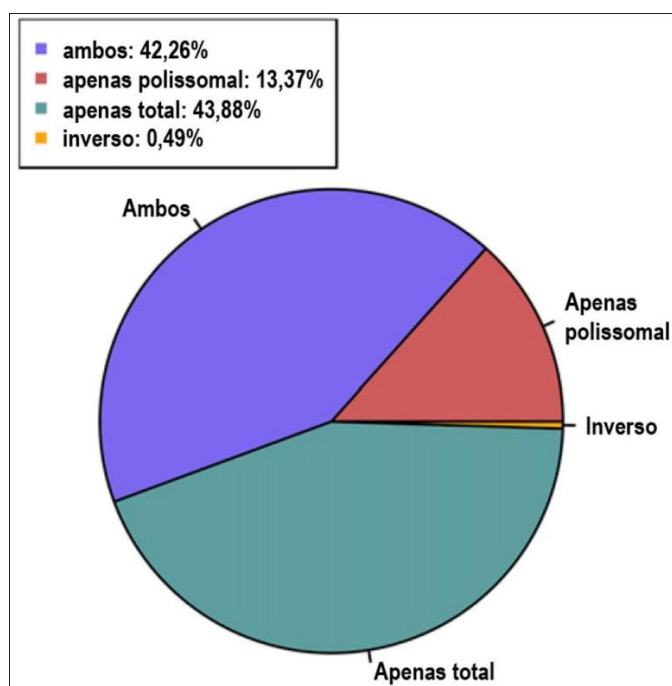


Figura 1.3. Análise da expressão gênica diferencial de CTs derivadas de tecido adiposo durante adipogênese por RNA total e polissomal. Após três dias de indução para diferenciação adipogênica, o RNA total e o polissomal foram coletados e submetidos a RNA-seq. O gráfico destaca o percentual de genes que apresentaram mudança de expressão em cada uma de quatro categorias: mudança apenas na fração polissomal, mudança apenas na fração de RNA total, mudança concordante entre as duas frações e mudança discordante entre as duas frações (adaptado de Spangenberg *et al.*, 2013).

Assim, uma nova proposta para isolamento do RNAm efetivamente associado a ribossomos foi apresentada em 2009 por Ingolia e colaboradores. Esta técnica baseia-se no fato de que os ribossomos associam-se ao RNAm envolvendo e protegendo uma sequência de cerca de 30 nucleotídeos (conhecida como *footprint* do ribossomo). Ao submeter o conteúdo citoplasmático à digestão por endonuclease, o RNA que se encontra exposto é degradado, enquanto que esta região protegida é preservada (Steitz, 1969). O isolamento destas sequências e seu posterior sequenciamento em larga escala permite-nos ter uma visão geral das sequências de RNAm que efetivamente estão associadas a polissomos e que, provavelmente, estão sendo traduzidas pela célula em um determinado momento (Figura 1.4). As sequências obtidas revelam as *footprints* deixadas pelos ribossomos e, ao serem mapeadas, permitem identificar exatamente quais regiões do transcrito estão sendo traduzidas (Figura 1.5). Assim, o *ribosome profiling* não apenas fornece informações sobre quais genes estão sendo mais ou menos expressos, mas também traz informações sobre a cinética traducional (Ingolia *et al.*, 2009; Ingolia *et al.*, 2011; Ingolia *et al.*, 2012).

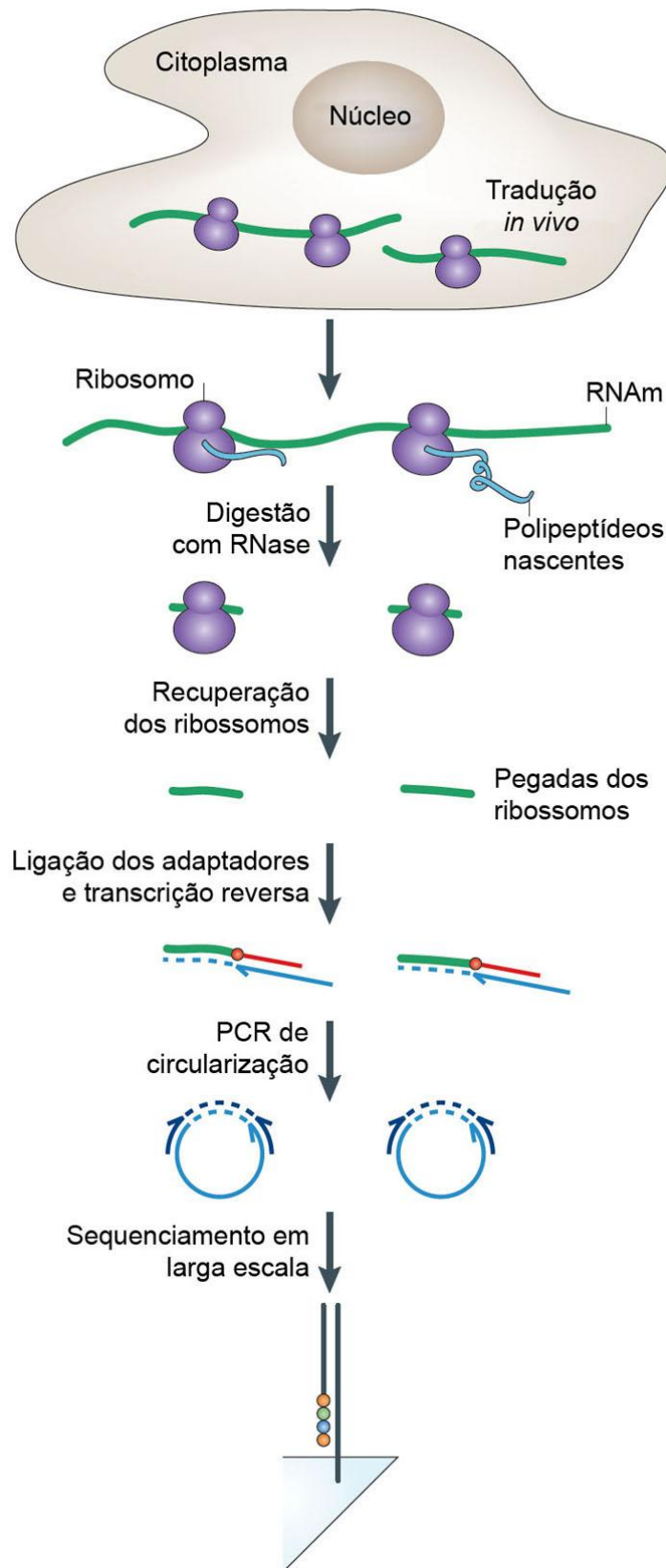


Figura 1.4. Esquematização do protocolo de *ribosome profiling*. Após lise celular, o conteúdo citoplasmático é submetido à digestão com uma endonuclease, a qual irá degradar o RNA que se encontra exposto. Os fragmentos envolvidos pelo ribossomo, que possuem, em média, 30 nucleotídeos, serão protegidos e podem ser isolados com base no tamanho. Por fim, estes fragmentos purificados podem ser sequenciados (larga escala) e mapeados contra o genoma de referência (adaptado de Ingolia, 2014).

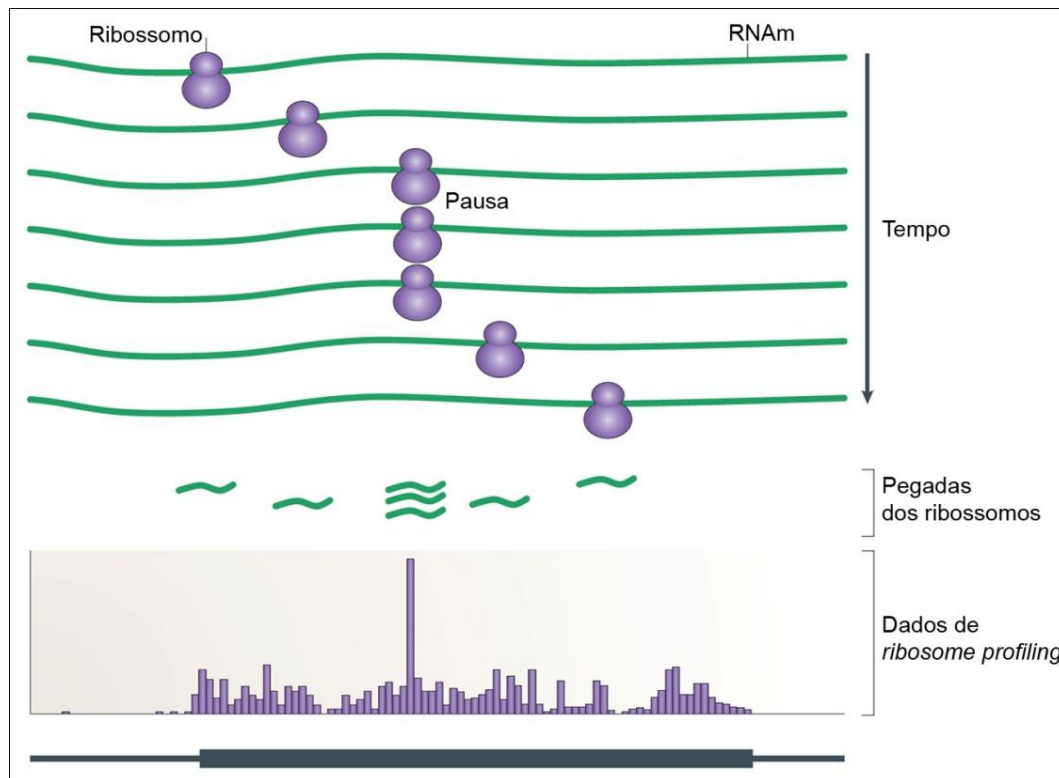


Figura 1.5. Dados obtidos por *ribosome profiling*. A partir do mapeamento das sequências obtidas por *ribosome profiling*, é possível identificar a posição dos ribossomos na molécula de RNA e verificar, por exemplo, regiões onde a velocidade de tradução é menor (adaptado de Ingolia, 2014).

No primeiro trabalho publicado, em 2009, a técnica de *ribosome profiling* foi aplicada ao estudo de leveduras em condições nutritivas normais e reduzidas (*starvation*). O mapeamento das *footprints* ribossomais permitiu a verificação do quadro de leitura que estava sendo traduzido, o que é interessante para estudos de mudança programada de quadro de leitura (*programmed frameshifting*) e de leitura através do códon de parada (*readthrough of stop codon*). Além disso, outros fenômenos como *splincing* alternativo, uORFs e iniciação em códons diferentes de AUG também puderam ser detectados. Também foi possível verificar a ocorrência de regiões de maior densidade de ribossomos, onde a velocidade de passagem do ribossomo seria mais lenta, o que é muito interessante para estudos de pausa traducional e de modulação da síntese e do dobramento de proteínas. A partir de medidas de taxas de tradução, foi possível, por exemplo, verificar que um terço dos genes tinha sua expressão regulada em nível traducional mediante diferentes condições de disponibilidade de nutrientes (Ingolia *et al.*, 2009). Em 2011, o mesmo grupo publicou um novo trabalho utilizando *ribosome profiling*, desta vez tendo como modelo de estudo CTs embrionárias de camundongos. Ao analisar as regiões de pausa, verificou-se a presença de peptídeos consenso (glutamato ou aspartato no sítio A do ribossomo, precedido por uma prolina ou glicina e outra prolina) que poderiam determinar a menor velocidade de alongação, sugerindo que este fenômeno não estaria relacionado à presença de códons raros. Através do uso de *harringtonine*, uma droga

que bloqueia os ribossomos na fase de iniciação (sem afetar a elongação), foram feitas inferências sobre a cinética traducional, sendo que foi calculado que o ribossomo avança a uma velocidade de 5,6 aminoácidos por segundo. Outro fenômeno que pôde ser observado pelo *ribosome profiling* foi a ocorrência de sítios alternativos de entrada de ribossomos e formação de possíveis peptídeos truncados ou mesmo de diferentes isoformas de proteínas. Também foi analisada a ocorrência de uORFs, as quais podem impedir ou não a tradução da ORF principal, agindo como um importante elemento de regulação. Dentre os transcritos que apresentavam uORFs estão Oct4 e Nanog, dois fatores de transcrição responsáveis pela manutenção da pluripotencialidade. Além disso, foi constatado que, durante a diferenciação destas células para formação de corpos embrióides, houve uma redução da tradução das uORFs. Isso pode estar relacionado a uma mudança no cenário de tradução, havendo um aumento do sistema de iniciação independente de *cap*, o que prejudicaria a leitura de uORFs (Ingolia *et al.*, 2011).

Outro elemento de regulação que pôde ser estudado por esta técnica são os lincRNAs. Inicialmente, foram detectadas *footprints* ribossomais nestes elementos, sugerindo que eles poderiam estar sendo traduzidos (Ingolia *et al.*, 2011). Contudo, a análise do padrão de ocupação dos ribossomos nestas moléculas demonstrou que este era diferente do observado em ORFs de verdadeiros RNAm e mais semelhante ao de outros RNAs não codificantes, sugerindo que não haveria tradução (Guttman *et al.*, 2013). A metodologia de *ribosome profiling* também já foi adaptada para estudo de tradução na mitocôndria (Rooijers *et al.*, 2013) e também em outros organismos, como *Arabidopsis thaliana* (Juntawong *et al.*, 2014), *Drosophila melanogaster* (Dunn *et al.*, 2013), *Trypanosoma brucei* (Vasquez *et al.*, 2014), entre outros, confirmando o potencial uso desta ferramenta.

2. JUSTIFICATIVA

As CTs adultas são uma das grandes apostas da Medicina Regenerativa para aplicação em futuros tratamentos de diversas doenças e lesões sofridas pelo ser humano e outros animais. O uso destas células encontradas em tecidos adultos tem a vantagem de permitir a realização de transplantes autólogos, o que reduz o risco de rejeição. Contudo, é preciso primeiramente conhecer melhor como ocorre a diferenciação e a proliferação das CTs, a fim de que possamos monitorar estes processos, aumentando a eficácia de futuros tratamentos. O conhecimento preciso das mudanças de expressão gênica nas diferentes etapas de diferenciação, o mapeamento de quais proteínas são ou deixam de ser expressas a cada etapa e de como este processo é regulado são de fundamental importância para a correta manipulação e utilização destas células. Assim, a busca e aperfeiçoamento de novas técnicas que nos permitam fazer este acompanhamento mostram-se como um passo fundamental para um melhor aproveitamento do potencial das CTs. Conforme citado anteriormente, trabalho anterior realizado em nosso laboratório com a técnica *polysome profiling* revelou que 60% dos genes diferencialmente expressos durante o processo de adipogênese de CTs derivadas de tecido adiposo apresentavam algum nível de regulação pós-transcricional (Spangenberg *et al.*, 2013). Assim, a aplicação da técnica de *ribosome profiling*, por sua vez, permitirá não apenas a avaliação de quais genes estão sendo mais ou menos expressos, mas também fornecerá indícios de como este processo estaria sendo regulado.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Estabelecimento do protocolo de *ribosome profiling* para o estudo de CTs obtidas de tecido adiposo humano e aplicação desta técnica para análise do processo de diferenciação deste tipo celular em adipócitos.

3.2. Objetivos específicos

3.2.1. Estabelecer o protocolo de ribosome profiling aplicado ao estudo de CTs obtidas de tecido adiposo

- Estabelecer culturas de CTs adultas obtidas de tecido adiposo;
- Estabelecer o protocolo de lise de CTs adultas obtidas de tecido adiposo;
- Estabelecer o protocolo de digestão do RNAm com endonuclease (tempo de incubação e concentração da enzima);
- Estabelecer o protocolo de isolamento e purificação dos fragmentos de RNAm associados e protegidos por ribossomos.

3.2.2. Análise do tradutoma de CTs obtidas de tecido adiposo durante a diferenciação adipogênica por ribosome profiling

- Aplicar a metodologia estabelecida de *ribosome profiling* a CTs obtidas de tecido adiposo no tempo 0 e após 72 horas de indução para diferenciação adipogênica;
- Sequenciar os fragmentos de RNA isolados pela técnica de *ribosome profiling* e de extração de RNA poliA;
- Mapear e analisar as sequências identificadas;
- Analisar a expressão gênica diferencial entre as células no tempo 0 e após 72 horas de indução a partir de dados de poliA e de *ribosome profiling*;
- Analisar a eficiência traducional dos transcritos no tempo 0 e após 72 horas de indução;
- Comparar os resultados obtidos pelo sequenciamento das amostras de RNA poliA e de *ribosome profiling* com os dados obtidos por proteômica.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Modelo de estudo

Neste trabalho, foram utilizadas CTs adultas humanas obtidas de tecido adiposo, cuja coleta foi realizada no Instituto de Medicina e Cirurgia do Paraná por uma equipe colaboradora do Núcleo de Tecnologia Celular, da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUC-PR). O tecido adiposo utilizado foi obtido a partir de três doadores (n=3) submetidos a cirurgia bariátrica seguida de dermolipectomia na região abdominal. A coleta foi feita com o consentimento dos doadores, que foram esclarecidos quanto aos objetivos do projeto de pesquisa, de acordo com normas para pesquisa envolvendo seres humanos e com a aprovação do comitê de ética da Fundação Oswaldo Cruz (protocolo número 419/07, aprovado em 10 de outubro de 2007).

4.1.1. Isolamento das CTs de tecido adiposo humano

O procedimento para isolamento da CTs a partir de tecido adiposo foi padronizado previamente por Rebelatto e colaboradores em 2008. Primeiramente, 100 mL do tecido adiposo coletado foram lavados em solução salina tamponada por fosfato estéril (PBS, Gibco, Invitrogen), a fim de remover resíduos contaminantes e hemácias. Em seguida, o tecido foi digerido com colagenase tipo I (1 mg/mL, Invitrogen) sob agitação constante, por 30 minutos a 37° C. O material digerido foi filtrado duas vezes, primeiro em membrana de nylon de 100 µm e, em seguida, de 40 µm (BD Biosciences), a fim de eliminar fragmentos não digeridos. O conjunto foi centrifugado a 800 x g por 10 minutos e os eritrócitos contaminantes foram removidos através de incubação por 5 minutos com tampão de lise eritrocítico pH 7,3. As células estromais coletadas foram lavadas, plaqueadas em densidade de 1×10^5 células/cm² em meio contendo *Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12* (DMEM-F12, Gibco), 10% de soro fetal bovino (SFB), penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100 µg/mL) e mantidas a 37° C e 5% de dióxido de carbono (CO₂). Após 24 horas, as células não aderentes foram removidas e o meio de cultura passou a ser trocado duas vezes por semana. Quando foi atingida uma confluência de 80%-90%, as células foram desaderidas através de incubação com tripsina/EDTA (ácido etilenodiaminotetracético) (0,25%, Invitrogen) e replaqueadas em passagem 1.

As células obtidas a partir deste protocolo foram previamente caracterizadas quanto ao perfil de expressão de antígenos de superfície através de citometria de fluxo (FACS Calibur, BD Biosciences) (Rebelatto *et al.*, 2008). Elas foram positivas para CD105, CD90, CD73, CD166,

CD29 e CD44, e apresentaram baixa expressão (menos de 2% de células positivas) de CD14, CD45 e CD31, moléculas caracteristicamente expressas por células de linhagem hematopoética.

4.1.2. Cultivo das CTs obtidas de tecido adiposo e indução para diferenciação adipogênica

As CTs isoladas de tecido adiposo foram cultivadas em garrafas de 150 cm² (TTP), com meio de cultivo composto por DMEM-F12, 15% de SFB (Gibco®), penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100 µg/mL), e mantidas a 37° C e 5% de CO₂ (estufa úmida, HEPA Class 100, Thermo Scientific). A troca de meio era realizada duas vezes por semana e a passagem de células era feita quando estas atingiam 70% a 80% de confluência. Para passagem, as células foram lavadas duas vezes com solução salina balanceada sem sais de cálcio e magnésio (BSS-CMF) e incubadas com tripsina (0,05%) (Sigma) por 5 minutos a 37° C. A ação da enzima foi, então, inibida com meio de cultura contendo SFB (15%) (Gibco). Após centrifugação (700 x g, 8° C, 5 minutos), as células foram ressuspensas em meio de cultivo e replaqueadas a uma densidade de 1x10³ a 3x10³ células por cm².

Para os ensaios de diferenciação adipogênica, foram utilizadas células em passagem 5. A indução foi feita com meio de cultivo contendo esta mesma composição básica acrescido de indometacina (200 µM), 3-isobutil 1-metilxantina (IBMX, 500 µM), insulina (1 µg/mL) e dexametasona (1 µM) (todos Sigma). A indução adipogênica foi iniciada quando as células apresentavam 40% a 60% de confluência e mantida por 72 horas (t=72h). Segundo estudos anteriores, este período de indução de 72h parece ser o tempo mínimo necessário para desencadear o processo de adipogênese, uma vez que a indução por períodos mais curtos resultou na obtenção de um menor percentual de adipócitos maduros (Spangenberg *et al.* 2013).

Além disso, parte das células de cada um dos três pacientes foi cultivada em placas de 24 poços e tratada com meio de diferenciação adipogênica por 14 dias, a fim de avaliar sua capacidade de diferenciação. Ao final deste período, as células foram fixadas com 4% de paraformaldeído (em PBS) por 30 minutos e armazenadas em PBS para posterior marcação com vermelho Nilo.

4.1.3. Marcação com vermelho Nilo

O vermelho Nilo é um marcador que, ao se associar a lipídeos neutros, como colesterol esterificado e triacilglicerídeos (presentes em inclusões lipídicas, típicas de adipócitos), emite fluorescência em comprimentos de onda próximos ao amarelo-verde. Para marcação, as células fixadas foram lavadas com PBS por duas vezes e incubadas com uma

solução de vermelho Nilo (estoque a 1 mg/mL dissolvido em dimetil sulfóxido; solução de uso a 1 µg/mL, diluída em PBS) por 30 minutos a 4° C. Em seguida, foram lavadas com PBS e incubadas com 4'6'diamidino-2-fenilindol dihidroclorido (DAPI, 1:1000) por 20 minutos em temperatura ambiente. Por fim, as células foram lavadas por três vezes com PBS e analisadas ao microscópio óptico de fluorescência (TE300, Nikon). Para quantificação do percentual de células que sofreram diferenciação, foram registradas imagens de 10 campos aleatórios da placa de cultura e feita contagem o número de células (número de núcleos) negativos e positivos para marcação com vermelho Nilo.

4.2. Padronização da metodologia de *ribosome profiling* para CTs obtidas de tecido adiposo

4.2.1. Lise celular

A primeira etapa do trabalho de padronização consistiu no estabelecimento de um protocolo de lise celular, capaz de promover a permeabilização da membrana plasmática, sem que a membrana nuclear fosse rompida. Desta forma, o conteúdo citoplasmático (inclusive os polissomos) seria liberado sem contaminação com DNA e RNA nucleares. Para isso, foram testadas quatro soluções de lise, obtidas a partir de dados disponíveis na literatura (Tabela 4.1) (Goldenberg *et al.*, 1985; Alves *et al.*, 2010; Ingolia *et al.*, 2011; Spangenberg *et al.*, 2013).

Tabela 4.1. Soluções de lise.

Solução	Composição	Fonte
1	Tris HCl pH 7,4 (20 mM), cloreto de magnésio (MgCl ₂) (15 mM), cloreto de sódio (NaCl) (250 mM), cicloheximida (100 µg/mL), Triton X-100 (0,5%), ditioneitol (DTT) (1 mM), DNase (24 U/mL)	Ingolia <i>et al.</i> , 2011
2	Tris HCl pH 7,4 (15 mM), MgCl ₂ (15 mM), NaCl (300 mM), cicloheximida (100 µg/mL), Triton X-100 (1%), heparina (20 µg/mL)	Spangenberg <i>et al.</i> , 2013
3	Tris HCl pH 7,4 (10 mM), MgCl ₂ (5 mM), NaCl (10 mM), cicloheximida (100 µg/mL), Triton™ X-100 (0,5%), β-mercaptoetanol (5 mM), heparina (20 µg/mL)	Goldenberg <i>et al.</i> , 1985; Alves <i>et al.</i> , 2010
4	Tris HCl pH 7,4 (10 mM), MgCl ₂ (5 mM), NaCl (10 mM), cicloheximida (100 µg/mL), Nonidet™ P-40 (0,25%), β-mercaptoetanol (5 mM), heparina (20 µg/mL)	Goldenberg <i>et al.</i> , 1985; Alves <i>et al.</i> , 2010

Para este procedimento, o meio de cultura foi retirado e as células foram desaderidas através de tratamento com tripsina, conforme descrito anteriormente. Em seguida, foram lavadas duas vezes com solução salina tamponada por fosfato (PBS) (pH 7,4), centrifugadas e o sobrenadante foi descartado. As células foram, então, ressuspensas nos diferentes tampões de lise e incubadas em gelo por 10 minutos. O lisado foi centrifugado a 12000 x g, 4° C, por

10 minutos a fim de decantar os núcleos e restos celulares. O sobrenadante (que contém os polissomos) foi coletado e mantido em gelo para análise.

A avaliação do procedimento de lise foi feita de duas formas. Primeiramente, foi feita eletroforese em gel de agarose 1% para verificação da obtenção de RNA íntegro. Em seguida, foi avaliada a quantidade de RNA obtida com cada uma das soluções. Para isso, o RNA foi extraído com TRIzol® Reagent (Invitrogen), conforme especificações do fabricante, e a concentração de RNA foi analisada por espectrofotometria (NanoDrop® ND-1000).

4.2.2. Digestão com endonuclease

A próxima etapa do processo consistiu no tratamento do lisado com RNase. Para este trabalho, optou-se pelo uso da nuclease Benzonase®. Para inibir a ação da enzima, foi utilizado um inibidor recombinante de RNase (RNase OUT™, Invitrogen). Foram testadas diferentes concentrações da enzima e diferentes momentos de aplicações desta a fim de avaliar a metodologia mais adequada para que o RNA desprotegido fosse degradado, preservando-se os fragmentos que se encontram associados a ribossomos. As quatro condições testadas encontram-se descritas na tabela 4.2.

Tabela 4.2. Condições para aplicação da endonuclease.

Condição	Descrição
1	Aplicação de 250 unidades de Benzonase® (para 10 ⁶ células) diretamente sobre o lisado celular, inibição com RNase OUT™ e ultracentrifugação do lisado celular sobre colchão de sacarose 1 M
2	Aplicação de 500 unidades de Benzonase® (para 10 ⁶ células) diretamente sobre o lisado celular, inibição com RNase OUT™ e ultracentrifugação do lisado celular sobre colchão de sacarose 1 M
3	Ultracentrifugação do lisado celular sobre colchão de sacarose 2 M, aplicação de 250 unidades de Benzonase® (para 10 ⁶ células) e inibição com RNase OUT™
4	Ultracentrifugação do lisado celular sobre colchão de sacarose 2 M, aplicação de 500 unidades de Benzonase® (para 10 ⁶ células) e inibição com RNase OUT™

As amostras obtidas pelos diferentes protocolos foram, então, submetidas à extração de RNA utilizando-se o kit mirVana™, seguido-se especificações do fabricante, e analisadas por eletroforese, utilizando-se o sistema Bioanalyzer.

4.2.3. Isolamento dos fragmentos de 30 nucleotídeos

Para separação dos fragmentos de 30 nucleotídeos, foram testadas duas metodologias. Primeiramente, foi avaliado o uso do sistema de fracionamento flashPAGE™, o qual consiste na realização de eletroforese, em que as frações de RNA separadas podem ser coletadas a intervalos

de tempo determinados, ou seja, o sistema permite a coleta direta dos fragmentos de RNA de diferentes tamanhos separados por eletroforese de acordo com o tempo de corrida. O material obtido anteriormente (após digestão com Benzonase®) foi submetido à eletroforese por este sistema, sendo que foram coletadas as frações nos intervalos de 0-8, 10-12, 12-15, 15-20 e 20-25 minutos. O RNA obtido, que estava no tampão de corrida, foi precipitado através de incubação com uma solução final de etanol 80%, acetato de sódio 300 mM e 15 µg do coprecipitante GlycoBlue™ (Ambion®), por 16 horas a -80° C e centrifugação por 2 horas a 4° C a 16100 x g. O RNA obtido foi, então, lavado com etanol 80%, aquecido a 65° C para secagem, ressuspensionado em água e analisado pelo sistema 2100 Agilent Bioanalyzer (Small RNA kit).

Em seguida, foi avaliada a metodologia utilizada por Ingolia e colaboradores (2011) para realização do *ribosome profiling* e separação dos fragmentos de 30 nucleotídeos. Para separação dos fragmentos desejados, a amostra foi submetida à eletroforese em gel de acrilamida-ureia (6%) (180 V, 320 mA), a banda de 30 nucleotídeos foi coletada e o RNA purificado. Para isso, o fragmento de gel coletado foi macerado, foram acrescentados 200 µL de água livre de nuclease, o conjunto foi aquecido a 70° C por 10 minutos e filtrado. Em seguida, o RNA foi precipitado (conforme descrito anteriormente) e analisado pelo sistema Agilent 2100 Bioanalyzer.

4.3. Aplicação do protocolo de *ribosome profiling* e isolamento do RNA poliA de CTs obtidas de tecido adiposo

O protocolo de *ribosome profiling* padronizado foi, então, aplicado ao estudo do processo de diferenciação de CTs humanas adultas. Foram utilizadas células de três doadores diferentes (n=3), as quais foram analisadas no tempo 0 (t=0h) e após 72 horas (t=72h) de indução para diferenciação adipogênica. Além do *ribosome profiling*, também foi aplicado o protocolo de isolamento de RNA poliA a estas amostras, a fim de que pudessem ser comparados os resultados obtidos para RNA poliA e *ribosome profiling*. Antes do início do procedimento, as células foram tratadas com cicloheximida, uma droga que bloqueia o processo de alongação dos ribossomos durante a tradução, estabilizando os ribossomos sobre o RNA.

4.3.1. Aplicação do protocolo de *ribosome profiling* ao estudo de CTs obtidas de tecido adiposo

O protocolo final de *ribosome profiling* aplicado foi o seguinte:

- (1) incubação das células em cultura com cicloheximida (100 µg/mL) por 10 minutos a 37° C

- (2) lavagem das células com BSS-CMF
- (3) tratamento das células com tripsina 0,05%/ EDTA 0,02% por 5 minutos a 37° C e, após as células desaderirem, bloqueio da ação da enzima com SFB
- (4) lavagem das células com PBS (duas vezes)
- (5) centrifugação das células a 700 x g por 5 minutos para retirada do PBS
- (6) ressuspensão das células em tampão de lise - Tris HCl pH 7,4 (15 mM), MgCl₂ (15 mM), NaCl (300 mM), cicloheximida (100 µg/mL), Triton X-100 (1%), heparina (20 µg/mL), utilizando-se 600 µL para 2-6x10⁶ células, e incubação por 10 minutos no gelo
- (7) centrifugação do lisado celular a 12000 x g por 10 minutos a 4° C para decantação dos núcleos e restos celulares
- (8) coleta do sobrenadante e transferência para um novo microtubo
- (9) incubação do material coletado com Benzonase™, utilizando-se 375 unidades da enzima (pureza>90%) para 10⁶ células iniciais, por 10 minutos a 25° C
- (10) inibição da ação da endonuclease com RNase OUT™ na proporção de uma unidade do inibidor para cada duas unidades de Benzonase™ (1:2)
- (11) aplicação das amostras sobre 2 mL de sacarose 1 M (preparada no mesmo tampão utilizado para lise celular, apenas sem Triton X-100) em um tubo de ultracentrífuga
- (12) ultracentrifugação das amostras a 39000 rpm (rotor P40ST, HIMAC CP80WX Preparative Ultracentrifuge, HITACHI) por 2 horas a 4° C
- (13) descarte do sobrenadante e extração do RNA do material precipitado com mirVana™
- (14) separação dos fragmentos de 30 nucleotídeos através de eletroforese em gel de acrilamida-uréia (6%) (180 V, 320 mA) e excisão da banda de 30 nucleotídeos
- (15) centrifugação da banda coletada em um microtubo de 0,5 mL furado (colocado dentro de um microtubo de 1,5 mL), a fim de macerar o gel
- (16) aplicação de 200 µL de água livre de nuclease ao gel e aquecimento a 70° C por 10 minutos
- (17) filtração da amostra em filtro de ponteira livre de nuclease para retirada da acrilamida
- (18) precipitação do RNA com etanol 80%, acetato de sódio (300 mM) e coprecipitante GlycoBlue™ (15 µg, Ambion®) por 16 horas a -80° C
- (19) centrifugação por 2 horas a 4° C a 16100 x g, lavagem com etanol 80%, secagem a 65° C e ressuspensão em água livre de nuclease
- (20) verificação da quantidade e tamanho dos fragmentos isolados através do sistema Agilent 2100 Bioanalyzer
- (21) armazenamento das amostras a -80° C

4.3.2. Extração do RNA total e isolamento de RNA poliA

Para isolamento do RNA total, as células foram primeiramente desaderidas com tripsina, conforme descrito anteriormente, e lavadas duas vezes com PBS. Em seguida, foi feita extração do RNA total com TRIzol® Reagent (Invitrogen), conforme especificações do fabricante. Ao final do processo, o RNA obtido foi eluído em água e quantificado por espectrofotometria (NanoDrop® ND-1000).

Para isolamento do RNA poliA, foi utilizado o kit PolyATtract® mRNA Isolation Systems IV (Promega), seguindo-se especificações do fabricante. Em linhas gerais, o protocolo consistiu na desnaturação do RNA total (aquecimento a 65° C por 10 minutos) e incubação com sondas de oligoDT conjugadas a biotina (30 minutos em temperatura ambiente), as quais hibridizam com a cauda poliA do RNAm. Em seguida, foi feita a incubação do material com *beads* magnéticas conjugadas a estreptavidina. A seguir, foi utilizado um suporte magnetizado para imobilizar o RNA ligado às *beads* (que corresponde ao RNA poliA) e foram feitas sucessivas lavagens. Por fim, o RNA poliA foi eluído em 150 µL de água livre de nucleases. Este volume foi reduzido para 20 µL, através de aquecimento a 65° C sob pressão reduzida (utilizando-se o sistema SpeedVac Concentrator, modelo SPD131DDA), e a solução final obtida foi armazenada a -80° C.

4.4. Preparo das amostras de RNA poliA e de *ribosome profiling* para sequenciamento

4.4.1. Construção da biblioteca de DNA e realização da PCR de emulsão

A próxima etapa do trabalho foi o preparo das amostras de poliA e *ribosome profiling* para análise por sequenciamento. O sistema de sequenciamento utilizado foi o SOLiD™ versão 4 (Life Technologies), cujos princípios serão abordados mais adiante. Para o preparo das amostras, o primeiro passo realizado foi a digestão do RNA poliA com nuclease. Estas amostras foram incubadas com RNase III a 37° C, por 10 minutos, a fim de que fossem obtidos fragmentos de RNA de 150 a 200 nucleotídeos. Em seguida, o RNA digerido passou por um processo de purificação, a fim de remover restos de enzima e tampão. Tendo em vista que a quantidade inicial de RNA de cada uma das amostras estava perto do limite mínimo (100 ng), optou-se por não realizar a etapa de análise da quantidade e tamanho dos fragmentos de RNA obtidos após a digestão, a fim de reduzir a perda de material.

Em seguida, foi realizada a etapa de inserção dos adaptadores nas amostras tanto de RNA poliA quanto de RNA obtido por *ribosome profiling* (Figura 4.1 A). Os adaptadores consistem em oligonucleotídeos que possuem, em uma das extremidades, uma sequência conhecida e, na outra extremidade, uma sequência degenerada de fita simples. A região degenerada permite que estas moléculas hibridizem com os fragmentos de RNA e sejam ligados. A porção conhecida servirá como molde para os iniciadores da reação de transcriptase reversa. Assim, estes adaptadores foram adicionados em cada uma das amostras e o conjunto foi incubado a 65° C por 10 minutos para desnaturação e, em seguida, a 5° C por 5 minutos a fim de permitir a hibridização. Foi, então, adicionada a enzima de ligação (em tampão apropriado) e o conjunto foi incubado por 16 horas a 16° C. Isso permite que a enzima atue e promova a ligação dos fragmentos de RNA com os adaptadores.

A próxima etapa consistiu na realização da reação de transcrição reversa (RT) e purificação do cDNA (Figura 4.1 B), a fim de remover restos de enzima e tampão. Em seguida, foi feita a seleção dos fragmentos de tamanho desejado, correspondentes ao tamanho do RNA original mais os adaptadores. Em cada uma das extremidades da molécula de RNA, foi inserido um adaptador de 25 nucleotídeos (total de 50 nucleotídeos por fragmento). A seleção foi feita através de eletroforese em gel desnaturante de acrilamida-ureia 6% (180 V, por aproximadamente, 25 minutos) e coleta da região correspondente aos fragmentos do tamanho de interesse. Assim, para as amostras de RNA poliA, foram coletados os fragmentos entre 150 e 250 nucleotídeos, enquanto que, para as amostras de *ribosome profiling*, foram coletados os fragmentos de 75 a 100 nucleotídeos. Em seguida, as porções de gel coletadas foram divididas em quatro partes iguais e nomeadas a, b, c, d, conforme o esquema representado na Figura 4.1 C. Um dos fragmentos centrais (b) foi utilizado para a realização da etapa seguinte, de amplificação do cDNA. Segundo o fabricante do kit, a quantidade de cDNA existente neste ¼ de amostra é suficiente para amplificação e obtenção de cDNA para as próximas etapas do sequenciamento.

Em seguida, foi realizada a amplificação do cDNA por PCR (Figura 4.1 D). Nesta etapa, para cada uma das amostras, foi utilizado um iniciador que possui uma sequência identificadora. O produto obtido ao final do processo de PCR foi quantificado pelo método Qubit® de quantificação fluorométrica. Nos casos em que a quantidade de DNA obtida foi baixa, foi feita uma nova PCR, utilizando-se duas bandas (c, d) do gel. Em seguida, foi feito um *pool* de todas as amostras para o sequenciamento. É importante lembrar que, durante o sequenciamento, os fragmentos de cada amostra, mesmo que misturados, podem ser identificados pelas sequências identificadoras inseridas na PCR. O

pool das amostras foi feito de forma a se obter uma solução com concentração de 50 pg/ μ L de DNA. A proporção entre as amostras de *ribosome profiling* e poliA foi 3:1, tendo em vista a necessidade de se obter uma maior cobertura para análise do *ribosome profiling*.

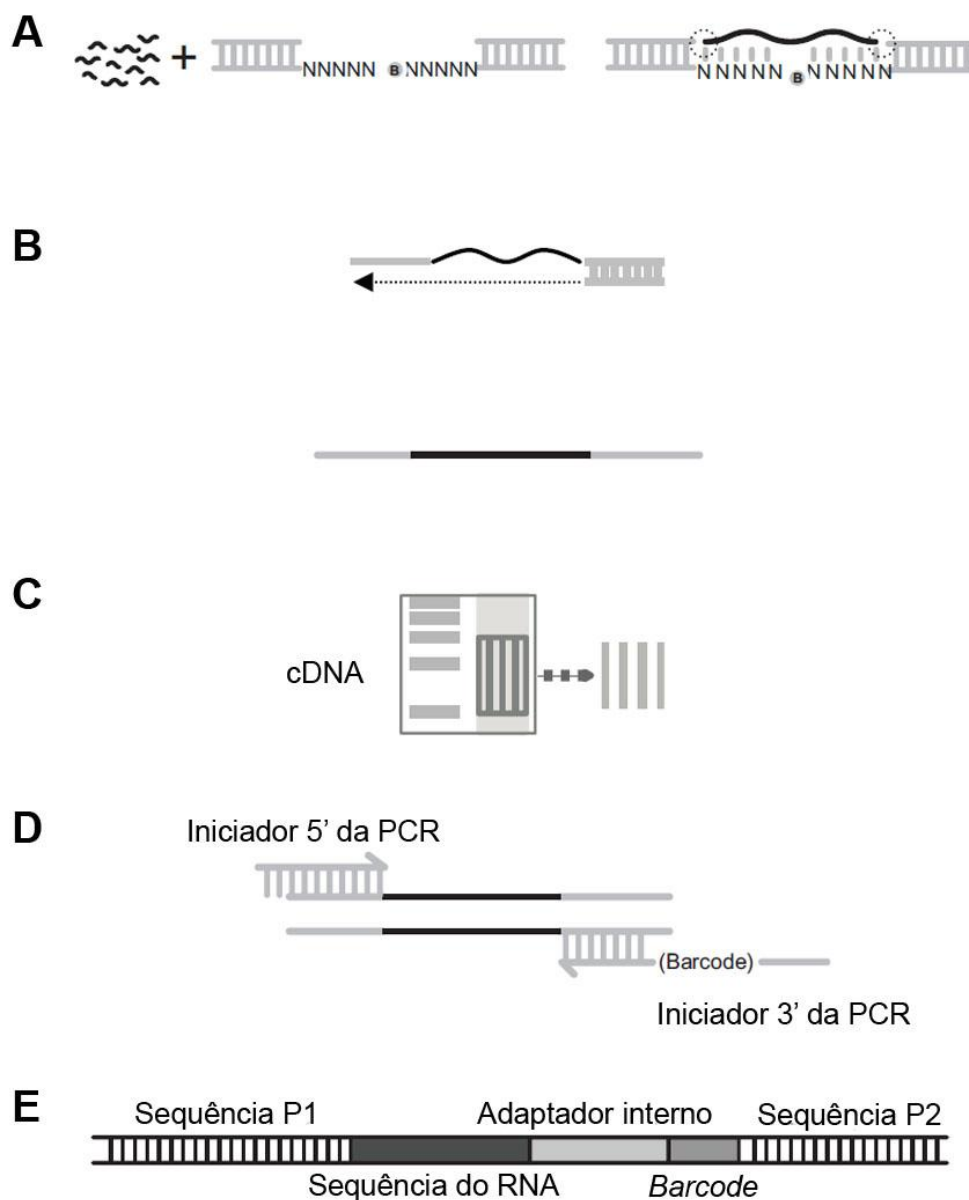


Figura 4.1. Esquematização do preparo da biblioteca de cDNA para sequenciamento. A primeira etapa do preparo das amostras para sequenciamento consistiu na hibridização e ligação dos adaptadores (A). Em seguida, foi realizada reação de transcrição reversa, tendo como iniciadores as sequências dos adaptadores (B). Para seleção dos fragmentos de cDNA do tamanho desejado, foi feita eletroforese em gel de acrilamida-ureia (6%) e a região correspondente aos tamanhos de interesse foi coletada. Em seguida, a região coletada foi dividida em quatro porções iguais, nomeadas de a, b, c, d (C). A porção b foi então utilizada para amplificação do cDNA por PCR (D), sendo que, nesta etapa, foram utilizados iniciadores com sequências identificadoras diferentes para cada uma das amostras. Por fim, está representado o esquema final das sequências obtidas (E) (adaptado do protocolo SOLiD® Total RNA-Seq Kit, Life Technologies).

Este pool de amostras foi, então, utilizado para a realização da PCR de emulsão (Figura 4.2). Esta consiste na ligação das moléculas de DNA a *beads*, de forma que cada *bead* possua apenas uma sequência de DNA. A PCR para amplificação do DNA foi realizada, e, como resultado final, cada *bead* deve ser recoberta por múltiplas cópias de uma mesma sequência (quando são corretamente formados os microrreatores monoclonais). Em seguida, foi feito o enriquecimento das *beads* clonais através do uso de *beads* recobertas com a sequência de P2, as quais pareiam com as sequências amplificadas. Por fim, foi feita reação de transferase terminal para adição de uma deoxiuridina trifosfato (dUTP) à extremidade 3' de P2. Esta modificação tem como objetivo melhorar a aderência das *beads* à lâmina de vidro.

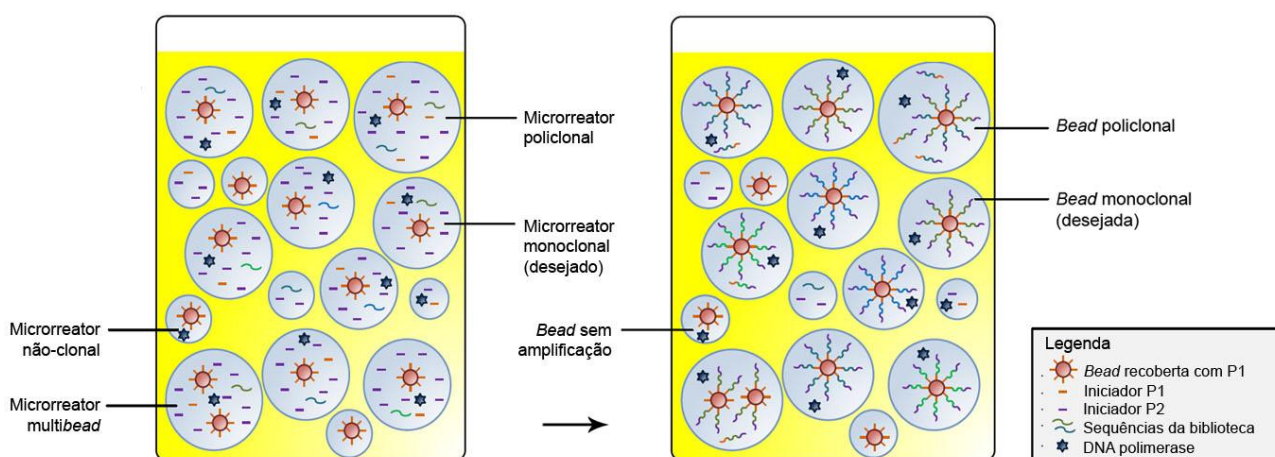


Figura 4.2. PCR de emulsão. A emulsão é formada por gotículas aquosas, que funcionam como microrreatores, em suspensão em um meio oleoso. O objetivo é que cada microrreator seja monoclonal, sendo constituído por uma *bead* recoberta com P1, uma sequência única da biblioteca, DNA polimerase e iniciadores para P1 e P2. Assim, quando é feita a PCR, cada *bead* ficaria recoberta por múltiplas sequências idênticas (*bead* monoclonal). Contudo, há a ocorrência de formação de reatores policlonais (com mais de uma sequência diferente), não-clonais e multibeads (adaptado do protocolo SOLiD® Total RNA-Seq Kit, Life Technologies).

4.4.2. Sequenciamento na plataforma SOLiD™

O material obtido após a PCR de emulsão foi então depositado em quatro lâminas completas para o sequenciamento. Foram depositadas, em média, 500 milhões de *beads* em cada lâmina. O sequenciamento foi feito nas plataformas SOLiD™ versão 4 do Instituto Carlos Chagas e da Universidade Federal do Paraná, sendo que duas lâminas foram analisadas em cada local.

A metodologia SOLiD™ (*Sequencing by Oligo Ligation Detection*, Sequenciamento por Detecção de Ligação de Oligo) de sequenciamento baseia-se na ligação de sondas de 8 nucleotídeos, cuja sequência geral é -C-T-N-N-N-Z-Z-Z-. Nas primeiras duas posições

(extremidade 3'), está localizado um dinucleotídeo conhecido variável. As três posições seguintes (-N-N-N-) são ocupadas por uma sequência degenerada, ou seja, capaz de parear com qualquer sequência. As três últimas posições são formadas por bases modificadas universais, sem preferência de união. Por fim, na extremidade 5', está ligado um fluorocromo. Assim, a especificidade da ligação é dada apenas pelo pareamento do dinucleotídeo inicial. Existem 16 possíveis combinações de dinucleotídeos, sendo que cada uma é identificada por um de quatro fluorocromos. Quando ocorre a ligação, as três últimas bases (-Z-Z-Z-) e o fluorocromo são excisados, havendo emissão de luz em um determinado comprimento de onda, que é detectado e registrado (Figura 4.3 A). Assim, permanece pareada à sequência molde uma sequência de 5 nucleotídeos. Em seguida, tem início uma nova rodada de hibridização com a seguinte sequência de 8 nucleotídeos e o processo segue sucessivamente. Ao longo deste primeiro ciclo de hibridizações, são registradas as informações referentes às posições 1 e 2, 6 e 7, 11 e 12 e assim por diante. Ao final do processo, é feita a desnaturação da dupla fita formada e tem início um novo processo de sequenciamento com uma defasagem de um nucleotídeo. Assim, são obtidas as informações das posições 0 e 1, 5 e 6, 10 e 11 e assim por diante. Este processo de reiniciação (*primer resetting*) é feito em um total de 5 vezes, sempre com uma defasagem de um nucleotídeo (Figura 4.3 B), e, ao todo, são sequenciados 50 nucleotídeos. As informações de fluorescência registradas podem então ser decodificadas por um código de cores. Segundo este código, cada cor representa quatro combinações de dois nucleotídeos. Assim, a definição de uma posição irá sempre depender da base anterior (Figura 4.3. C). É importante notar que a primeira posição é conhecida e corresponde ao último nucleotídeo do adaptador P1. Assim, o arquivo de cores gerado pode ser traduzido em dados de sequência.

Ao final do processo de sequenciamento realizado, para cada amostra, foram obtidos dois arquivos. Um arquivo de sequência e um de qualidade, os quais foram utilizados para as etapas seguintes de análise dos resultados.

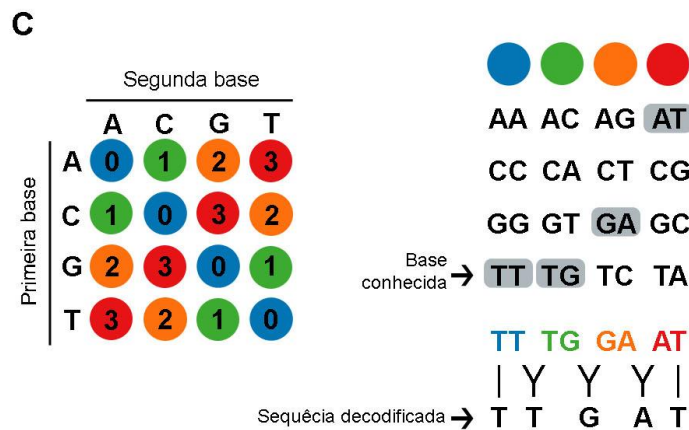
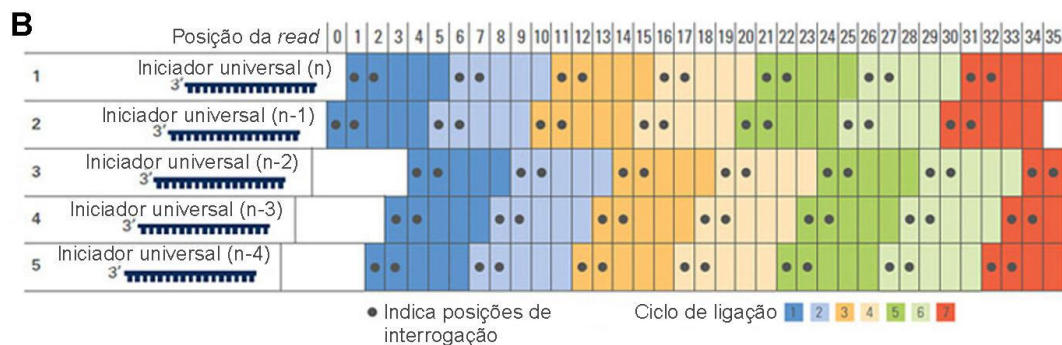
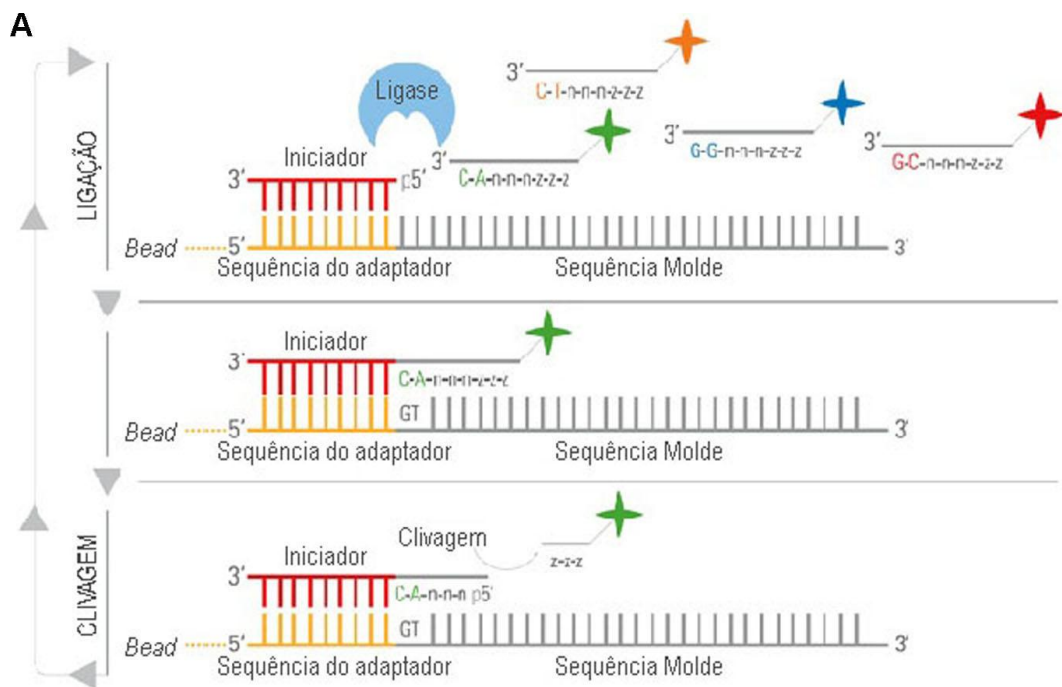


Figura 4.3. Princípio de sequenciamento da plataforma SOLiD™. Quando ocorre o pareamento correto dos dois primeiros nucleotídeos, a enzima ligase promove a união do oligo à extremidade 5' livre, ocorre a clivagem do trinucleotídeo final e há emissão de fluorescência (A). A cada rodada, um novo processo de hibridização ocorre, sendo que vão sendo registradas as informações das posições 1 e 2, 6 e 7, 11 e 12 etc. Ao final do processo, tem início um novo ciclo de hibridizações que é iniciado com defasagem de um nucleotídeo, sendo registradas as informações de 0 e 1, 5 e 6, 10 e 11 etc. (B). Por fim, as informações de fluorescência registradas podem ser decodificadas por um código de cores (C). Cada cor representa quatro pares de nucleotídeos diferentes. Assim, a definição de cada base depende da combinação de duas cores. É importante notar que a primeira posição da sequência é conhecida, pois a hibridização tem início na região 5' de P1 (adaptado do protocolo SOLiD®, Life Technologies).

4.5. Triagem dos resultados obtidos por sequenciamento

A análise dos resultados obtidos por sequenciamento foi realizada em colaboração com um grupo de pesquisa do Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, de Montevideu, Uruguai, coordenado pelo Dr. Jose Sotelo-Siveira. Ao todo, para cada condição de cultivo (t=0 e t=72h) e para cada amostra de RNA (poliA e *ribosome profiling*), foram feitas e analisadas três réplicas biológicas (TA84, TA85, TA86) e três réplicas técnicas do sequenciamento, uma vez que o *pool* de amostras analisado foi depositado em três lâminas diferentes (Tabela 4.3).

Tabela 4.3. Réplicas biológicas e técnicas para cada uma das amostras de RNA.

Doador	Condição	Tipo de RNA	Lâminas
TA84	t=0	poliA	1,2,3
TA84	t=72h	poliA	1,2,3
TA85	t=0	poliA	1,2,3
TA85	t=72h	poliA	1,2,3
TA86	t=0	poliA	1,2,3
TA86	t=72h	poliA	1,2,3
TA84	t=0	<i>ribosome profiling</i>	1,2,3
TA84	t=72h	<i>ribosome profiling</i>	1,2,3
TA85	t=0	<i>ribosome profiling</i>	1,2,3
TA85	t=72h	<i>ribosome profiling</i>	1,2,3
TA86	t=0	<i>ribosome profiling</i>	1,2,3
TA86	t=72h	<i>ribosome profiling</i>	1,2,3

Para a análise inicial, foi utilizada a ferramenta CLC Genomics Workbench (CLC bio). Nesta primeira fase da análise, as réplicas biológicas e técnicas foram tratadas em separado. A primeira etapa consistiu na realização de uma análise de qualidade das sequências obtidas, através da ferramenta *QC Reports*. A análise de qualidade foi feita com base no valor PHRED. Este valor (Q) é determinado da seguinte forma: $Q=10\log_{10}(P)$, onde P é a probabilidade de cometer um erro na determinação de uma base. A tabela 4.4 resume a relação entre alguns valores de PHRED e a chance de erro.

Tabela 4.4. Relação entre valor PHRED e probabilidade de erro na determinação de uma base.

Valor de PHRED	Probabilidade de uma base mal determinada	Precisão
10	1 em 10	90%
20	1 em 100	99%
30	1 em 1000	99,9%
40	1 em 10000	99,99%
50	1 em 100000	99,999%

Em seguida, foi feita a etapa de *trimming*, a qual consistiu na remoção dos adaptadores e sequências identificadoras, seguida da seleção de sequências segundo o tamanho e

qualidade. Na seleção por tamanho, foram utilizados dois filtros distintos, conforme a amostra. Para as sequências de poliA, foram selecionadas apenas as sequências com mais de 18 nucleotídeos. Para as amostras de *ribosome profiling*, foram selecionadas as sequências que possuíam entre 25 e 40 nucleotídeos. Quanto à qualidade, foram selecionadas as sequências que possuíam um valor de p menor do que 0,05. Após o *trimming*, foi feita uma nova análise de qualidade das sequências.

Estas sequências selecionadas foram então mapeadas primeiramente contra uma base de dados de RNA ribossomal (RNAr), a fim de subtrair a contaminação por estas moléculas. Então, apenas as sequências que não mapearam contra RNAr foram utilizadas para mapeamento contra uma base de dados de mRNA (*human.rna_annotated_subset.NM_only*). O alinhamento foi feito seguindo-se o protocolo padrão de RNA-Seq do sistema CLC Genomics, com os seguintes critérios: número máximo de *mismatches*: 2; fração de tamanho mínimo: 0,9; fração de similaridade mínima: 0,8; número máximo de *hits* por leitura (*read*): 10. A partir desta etapa, as réplicas técnicas foram unidas e tratadas em conjunto. As réplicas biológicas foram ainda analisadas em separado. Após o mapeamento, foi feita a normalização dos dados utilizando-se o método DESeq (Anders e Huber, 2010). A partir dos dados normalizados, foi feita uma filtragem para eliminar os transcritos que não possuíam leitura e os que tinham uma relação desvio padrão/soma maior do que 0,2. Por fim, foram selecionados apenas os transcritos que possuíam pelo menos 30 leituras em cada réplica biológica.

4.6. Análise dos resultados obtidos por sequenciamento

Uma vez concluída a filtragem, as réplicas biológicas foram unidas e analisadas em conjunto. A partir da listagem de transcritos identificados, foi também feita uma lista dos genes identificados, que não levava em consideração a diversidade de variantes e polimorfismos de um mesmo gene. O objetivo foi fazer primeiramente uma análise de quais genes são expressos em cada condição, sem avaliar (em um primeiro momento) as possíveis diferenças de expressão e tradução de transcritos diferentes de um mesmo gene. Assim, foi feita a comparação entre as listas de poliA e *ribosome profiling* para cada condição (t=0 e t=72h), a fim de verificar qual o percentual de genes em comum entre as diferentes amostras de RNA. Em seguida, foi feita a comparação entre listas das diferentes condições de cultivo dentro de cada amostra de RNA. Cabe destacar que esta comparação levou em consideração apenas a presença ou ausência de um determinado gene em cada listagem. Assim, com base apenas em um critério qualitativo, ela nos permitiu fazer uma primeira avaliação do percentual de genes expressos diferencialmente em cada uma das condições.

Em seguida, foram retomadas as listas de transcritos identificados e foi calculado o *fold change* de cada transcrito entre as condições t=0 e t=72h ($FC = n^\circ$ de leituras em t72h/ n° de leituras em t0) para cada uma das amostras de RNA, e o resultado obtido foi colocado em escala logarítmica de base 2. A partir da listagem de transcritos regulados positivamente ($\log_2(FC) \geq 1$) e negativamente ($\log_2(FC) \leq -1$) (valor de $p < 0,05$) após a indução para a diferenciação, foi feita a tabela dos genes que sofriam esta variação para análise de ontologia gênica. Isso foi feito, mais uma vez, com o objetivo de avaliar primeiramente a variação de expressão de genes entre as condições t=0 e t=72h, sem considerar possíveis variantes e polimorfismos de transcritos de um mesmo gene. A partir das listas de genes de expressão diferencial geradas, foram feitas análises utilizando-se a ferramenta DAVID (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery) Bioinformatics Resources 6.7, do National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID), NIH (Huang *et al.*, 2009 a, b) e a ferramenta GOrilla - Gene Ontology enRIchment anaLysis and visuaLizAtion tool (Eden *et al.*, 2007; Eden *et al.*, 2009). No caso das análises feitas pela plataforma GOrilla, foi utilizado como *background* a lista de todos os 11779 genes identificados em poliA e *ribosome profiling*.

Em seguida, foi calculada a eficiência traducional para cada transcrito em cada uma das condições (eficiência traducional = n° de leituras em *ribosome profiling*/ n° de leituras em poliA) e o *fold change* de eficiência traducional entre t=0 e t=72h (FC eficiência traducional = eficiência traducional em t72h/eficiência traducional em t0). O resultado de *fold change* de eficiência traducional foi, então, convertido em escala logarítmica de base 2. Em seguida, foram selecionados para análise por ontologia gênica os genes que tiveram \log_2 de eficiência traducional (que corresponde ao *fold change* observado nas amostras de poliA) entre -1 e 1 e que tiveram a eficiência traducional aumentada ($\log_2(FC \text{ ef trad}) \geq 1$) ou reduzida ($\log_2(FC \text{ ef trad}) \leq -1$). O objetivo foi avaliar as sequências que tiveram pouca variação em nível transcricional e maior variação em nível traducional (o que poderia ser detectado apenas por *ribosome profiling*).

4.7. Preparo das amostras para análise por proteômica

A próxima etapa do projeto consistiu na análise do proteoma das células para comparação com os resultados obtidos por sequenciamento. Foram, portanto, usadas CTs dos mesmos três doadores que foram utilizadas para os experimentos de *ribosome profiling*. Estas foram cultivadas nas mesmas condições descritas anteriormente, em passagem cinco, mantidas sem indução (t=0) e induzidas para adipogênese por três dias (t=72h) (item 4.1.2).

Para o preparo das amostras para proteômica, o primeiro passo consistiu na lise celular. Para isso, o meio de cultura foi retirado, as células foram desaderidas com tripsina (conforme descrito anteriormente) e lavadas duas vezes com PBS. Após centrifugação, o sobrenadante foi descartado e as células foram incubadas por 25 minutos em temperatura ambiente em tampão de lise composto por Hepes (50 mM), dodecil sulfato de sódio (SDS, 4%) e DTT (0,1 M). Foram utilizados 100 µL de tampão de lise para 1×10^6 células. O conjunto foi aquecido a 99° C por 5 minutos e, após resfriamento até a temperatura ambiente, foi submetido a sonicação (em banho) por 60 minutos. Ao final do processo, as amostras foram centrifugadas a 20000 x g e o sobrenadante foi coletado.

Uma vez concluído o processo de lise, foi realizada uma etapa de purificação da amostra (principalmente para remoção do SDS) e digestão das proteínas com tripsina. Para isso, foi utilizado um método de preparação por filtragem (*filter-aided sample preparation*, FASP), sendo que foram utilizados filtros de 30 K (Amicon Ultra – 0,5 mL 30 K, Millipore). Todos os procedimentos desta primeira etapa de preparo de amostras foram realizados em temperatura ambiente. Foram colocados 30 µL de lisado celular e 200 µL de tampão de ureia com DTT (ureia 8 M, TrisHCl 100 mM, DTT 10 mM) por filtro, e o conjunto foi centrifugado por 15 minutos a 14000 x g. Foram feitas mais duas lavagens com o mesmo tampão. Em seguida, as amostras foram incubadas com solução de iodoacetamida (IAA, 0,05 M) por 20 minutos em câmara escura. Após centrifugação (14000 x g), as amostras foram lavadas por duas vezes com solução de ureia (ureia 8 M, TrisHCl 100 mM) e mais duas vezes com solução de bicarbonato de amônio 50 mM. Ao final do processo, foi feita quantificação das proteínas retidas no filtro com o kit de ensaio de ácido bicinconínico (*bicinchoninic acid*, BCA, Sigma), seguindo-se especificações do fabricante. A partir da medida obtida, foi acrescentada tripsina na proporção de 1 µg da enzima para cada 100 µg de proteína. As soluções foram recolocadas nas unidades filtrantes, o conjunto foi agitado e incubado por 19 horas a 37° C em câmara úmida. Ao final da incubação, as unidades filtrantes foram transferidas para novos tubos de coleta e submetidas à centrifugação para recuperação das proteínas. Foram feitas mais duas lavagens com solução de bicarbonato de amônio e outras duas com NaCl 0,5 M. Por fim, foi feita dosagem por espectrofotometria (NanoDrop® ND-1000), as amostras foram acidificadas com solução de acetonitrila (5%) e ácido trifluoroacético (1%), adicionadas a *stage-tips* (membrana C18 Empore em ponteira P200 da Eppendorf) e armazenadas a 4° C para posterior análise pelo espectrômetro de massas Thermo Fisher LTO Orbitrap XL e identificação dos peptídeos pelo programa MaxQuant Platform.

5. RESULTADOS

5.1. Padronização do processo de *ribosome profiling* para CTs obtidas de tecido adiposo

5.1.1. Lise celular

Para a primeira etapa do protocolo de *ribosome profiling*, foram testadas quatro soluções de lise. Observou-se que, após a incubação com os tampões 3 e 4 (Tabela 4.1), as soluções ficaram viscosas, o que sugere que houve lise nuclear, levando a uma contaminação da amostra com DNA e RNA nucleares. Isso não ocorreu com as soluções 1 e 2.

Através da eletroforese dos extratos celulares em gel de agarose, observou-se que as quatro soluções foram eficientes para a obtenção de RNA íntegro (Figura 5.1). Através da análise por espectrofotometria, observou-se que, através do uso da solução 2, obteve-se a maior quantidade de RNA, com um total de 2603 ng de RNA obtidos a partir de $4,8 \times 10^5$ células. Com o uso da solução 1, obteve-se um total de 759 ng de RNA, a partir também de $4,8 \times 10^5$ células. Já com o uso das soluções 3 e 4, foram obtidos, respectivamente, 459 ng e 415 ng de RNA, sendo que, em ambos os casos, foram utilizadas inicialmente $2,4 \times 10^5$ células. Os resultados obtidos por espectrofotometria encontram-se descritos na Tabela 5.1.

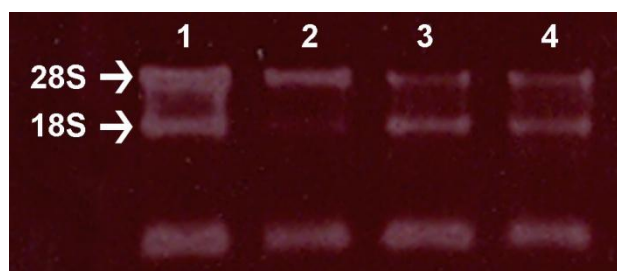


Figura 5.1. Eletroforese em gel de agarose (1%) mostrando o RNA obtido após lise de CTs derivadas de tecido adiposo com diferentes tampões. A eletroforese foi realizada com o RNA obtido a partir da lise de CTs humanas derivadas de tecido adiposo com as soluções 1, 2, 3 e 4. Pode-se observar que, em todos os casos, foi possível recuperar RNA íntegro, em que as bandas correspondentes ao RNA ribossomal das unidades 18S e 28S estão visíveis.

Tabela 5.1. Quantificação por espectrofotometria (NanoDrop®) do RNA obtido após lise de CTs obtidas de tecido adiposo com diferentes tampões.

Solução	Nº de células utilizado	RNA (ng)
1	$4,8 \times 10^5$	759
2	$4,8 \times 10^5$	2603
3	$2,4 \times 10^5$	459
4	$2,4 \times 10^5$	415

Assim, a solução 2 se mostrou a mais eficiente para obtenção de maior quantidade de RNA, sendo também capaz de permeabilizar a membrana plasmática sem degradar a estrutura nuclear. Além disso, a solução 2 já foi utilizada em estudos prévios em nosso laboratório (Spangenberg *et al.*, 2013), o que representa mais um ponto positivo, pois facilita a comparação com dados já disponíveis do grupo.

5.1.2. Digestão com endonuclease

Foram testadas quatro condições para digestão do lisado celular com Benzonase® (descritas na Tabela 4.2), as quais envolviam diferentes concentrações da enzima e diferentes momentos de aplicação desta. O material obtido ao final de cada procedimento foi submetido à extração de RNA com o uso do kit mirVana™, o qual permite um enriquecimento de pequenos RNAs (com menos de 200 nucleotídeos), e analisado pelo sistema Agilent 2100 Bioanalyzer (Figura 5.2). Observou-se que, a partir das condições 1 e 2, nas quais o tratamento com Benzonase® foi realizado antes da ultracentrifugação, o processo de digestão e recuperação do RNA foi bem sucedido (Figura 5.2 A, B, C). Na condição 1 (Figura 5.2 A, B), a quantidade de fragmentos de, aproximadamente, 30 nucleotídeos recuperada foi de 60 ng. Na condição 2, (Figura 5.2 A, C), a quantidade final de fragmentos de, aproximadamente, 30 nucleotídeos foi de, aproximadamente, 45 ng. Já as condições 3 e 4, nas quais a digestão com a RNase foi realizada após a ultracentrifugação, não foram eficientes, uma vez que não foi obtido RNA ao fim do processo, ou a quantidade de RNA recuperada estava abaixo do limite de detecção do método (Figura 5.2 A, D, E). Assim, a aplicação da Benzonase® antes da ultracentrifugação mostrou ser o procedimento mais eficiente para obtenção de fragmentos de, aproximadamente, 30 nucleotídeos. Tendo em vista que nas duas concentrações (250 e 500 unidades) da enzima foi obtida aproximadamente a mesma quantidade de RNA, por uma questão de economia, optou-se inicialmente pelo uso da concentração mais baixa de Benzonase®. Posteriormente foi necessário fazer uma nova adaptação do protocolo, pois foi utilizado um novo lote da enzima com menor grau de pureza (pureza>90%). Assim, passou-se a utilizar a concentração de 375 unidades da enzima para cada 10⁶ células.

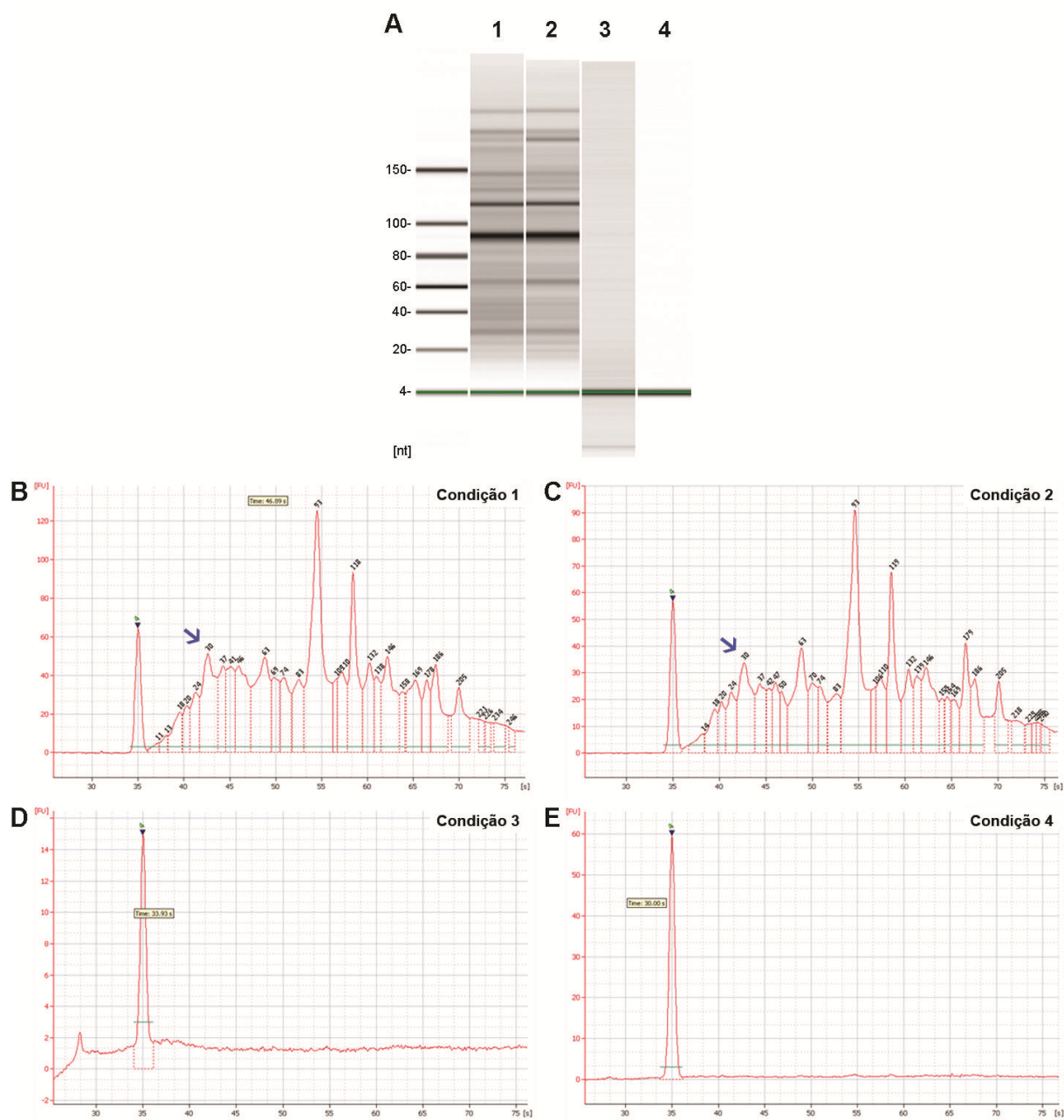


Figura 5.2. Eletroforese do RNA obtido a partir de diferentes protocolos de digestão com Benzonase® através do sistema Agilent 2100 Bioanalyzer. Observou-se que, a partir das condições 1 (A coluna 1, B) e 2 (A coluna 2, C), foi possível recuperar RNA ao final do processo, sendo que o pico de 30 nucleotídeos ficou visível em ambos os casos (B, C, setas azuis). Através das condições 3 (A coluna 3, D) e 4 (A coluna 4, E), não foi obtido RNA ou a concentração deste ficou abaixo do limite de detecção do método. Na eletroforese, a banda de fragmentos de 4 nucleotídeos corresponde ao marcador controle do sistema (A, B, C, D, E).

5.1.3. Isolamento dos fragmentos de 30 nucleotídeos

Para separação dos fragmentos de 30 nucleotídeos, primeiramente, foi avaliado o uso do sistema de fracionamento flashPAGE™, coletando-se as frações de 0-8, 10-12, 12-15, 15-20 e 20-25 minutos. A avaliação do tamanho e da quantidade dos fragmentos coletados foi feita pelo sistema 2100 Agilent Bioanalyzer. Para o primeiro teste realizado, foram utilizadas

10^6 células. A análise pelo sistema 2100 Agilent Bioanalyzer revelou que foram obtidos cerca de 20 ng de RNA de 30 nucleotídeos, os quais foram isolados na fração de 12 a 15 minutos (Figura 5.3 A e B). A partir deste resultado, foram feitos novos testes (2 e 3), utilizando-se, em média, 6×10^6 células. Contudo, em ambos os casos, foram obtidos menos de 20 ng de RNA de 30 nucleotídeos (Figura 5.3 C e D).

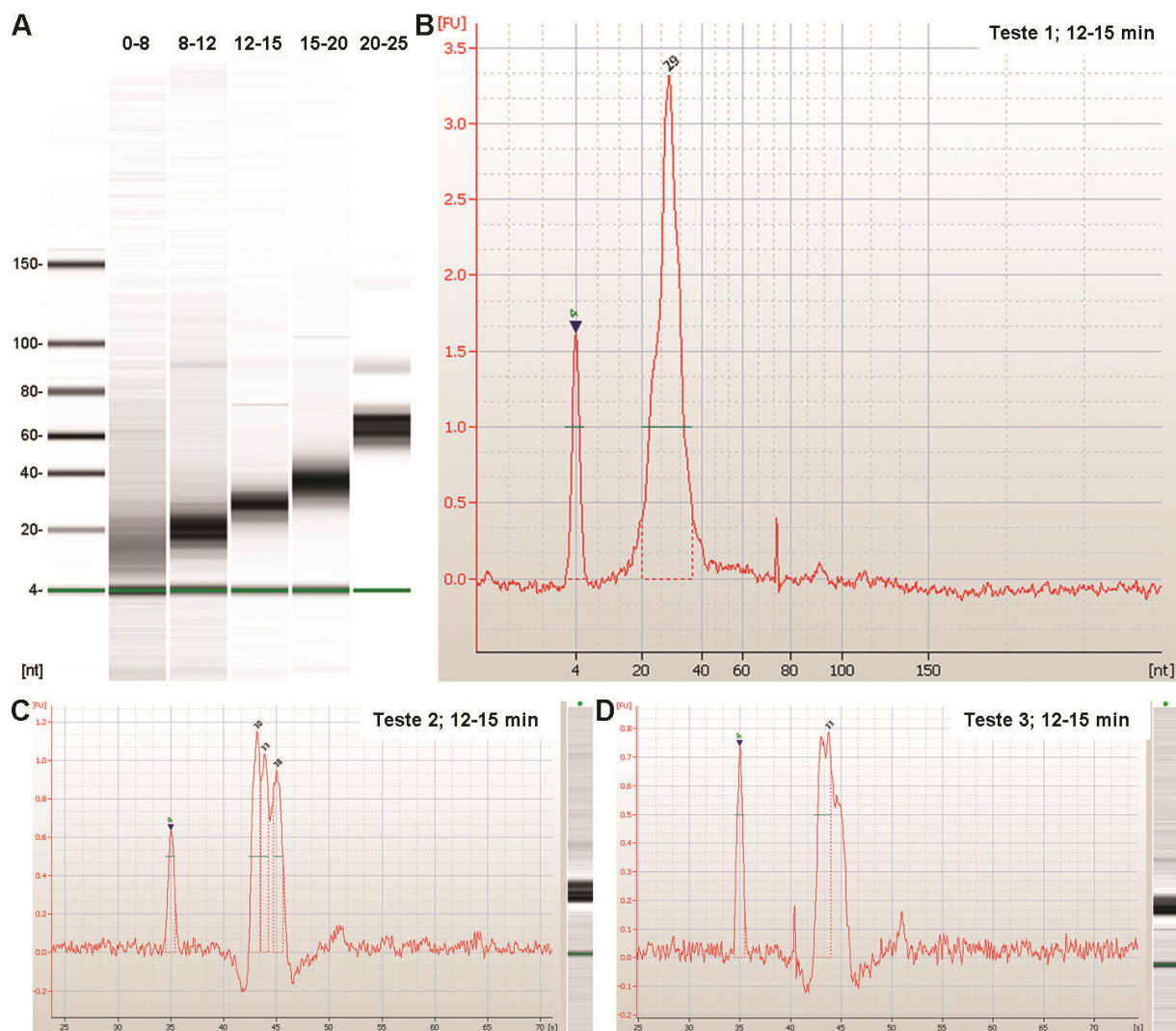


Figura 5.3. Eletroforese através do sistema Agilent 2100 Bioanalyzer do RNA fracionado pelo sistema flashPAGE. Para o primeiro teste, foram utilizadas 1×10^6 células. Após análise pelo Agilent 2100 Bioanalyzer (A), observou-se que os fragmentos de RNA de cerca de 30 nucleotídeos foram separados na fração coletada de 12-15 minutos (B), sendo que foram obtidos cerca de 20 ng. Nos testes 2 e 3, foram utilizadas, em média, 6×10^6 células. A quantidade de RNA de 30 nucleotídeos recuperada ao final do processo foi de 18 ng no teste 2 (C) e de 9 ng no teste 3 (D). Na eletroforese, a banda de fragmentos de 4 nucleotídeos corresponde ao marcador de peso controle do sistema (A, B, C, D).

Em seguida, foi avaliada a metodologia de isolamento utilizada por Ingolia e colaboradores (2011) no protocolo do *ribosome profiling*. Foram utilizadas 7×10^6 células. Para a separação dos fragmentos desejados, a amostra foi submetida à eletroforese em gel de acrilamida-ureia (Figura 5.4 A), a banda de 30 nucleotídeos foi coletada e o RNA purificado.

A análise no sistema Agilent 2100 Bioanalyzer, revelou que o novo protocolo foi bem sucedido, obtendo-se um total de 108 ng de fragmentos de RNA de 30 nucleotídeos (Figura 5.4 B).

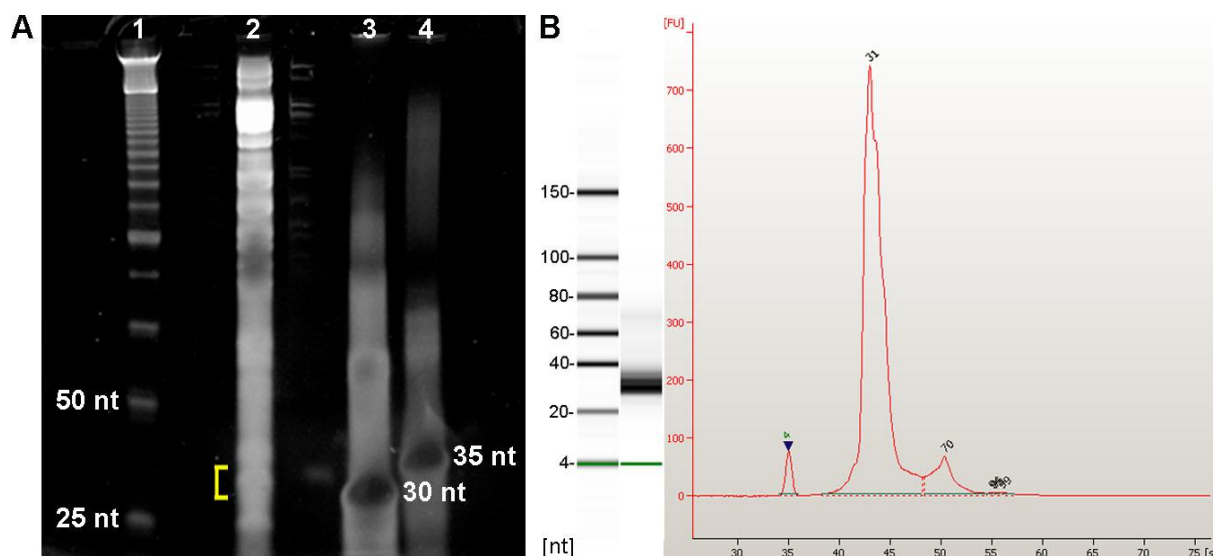


Figura 5.4. Separação dos fragmentos de 30 nucleotídeos por eletroforese em gel de acrilamida-uréia (6%). O RNA obtido através da aplicação do protocolo de *ribosome profiling* (utilizando-se 7×10^6 células iniciais) foi submetido à eletroforese em gel de acrilamida-uréia (6%) (180 V, 320 mA). Foi utilizado o marcador de peso molecular de 25 pares de base (500 ng) (25 bp DNA Ladder, Invitrogen) (A coluna 1), além de dois oligonucleotídeos de 30 nucleotídeos (A coluna 3) e 35 nucleotídeos (A coluna 4). A banda de 30 nucleotídeos foi coletada (A coluna 2, região indicada pela barra amarela) e o RNA foi purificado e analisado no Agilent 2100 Bioanalyzer (B). Observou-se que os fragmentos de 30 nucleotídeos foram isolados, com uma quantidade de 108 ng. Na análise pelo sistema Agilent 2100 Bioanalyzer (B), a banda de fragmentos de 4 nucleotídeos corresponde ao marcador de peso controle do sistema.

5.2. Controle da capacidade de diferenciação

As CTs isoladas de tecido adiposo de três doadores (TA84, TA85 e TA86) foram cultivadas em garrafas de 150 cm^2 até a passagem 5. Para a realização dos experimentos de *ribosome profiling*, as células foram cultivadas até uma confluência de 40% a 60% (Figura 5.5 A) e induzidas para diferenciação adipogênica por três dias ($t=72\text{h}$). Após este período, não é possível observar mudanças morfológicas características da diferenciação em adipócitos (Figura 5.5 B).

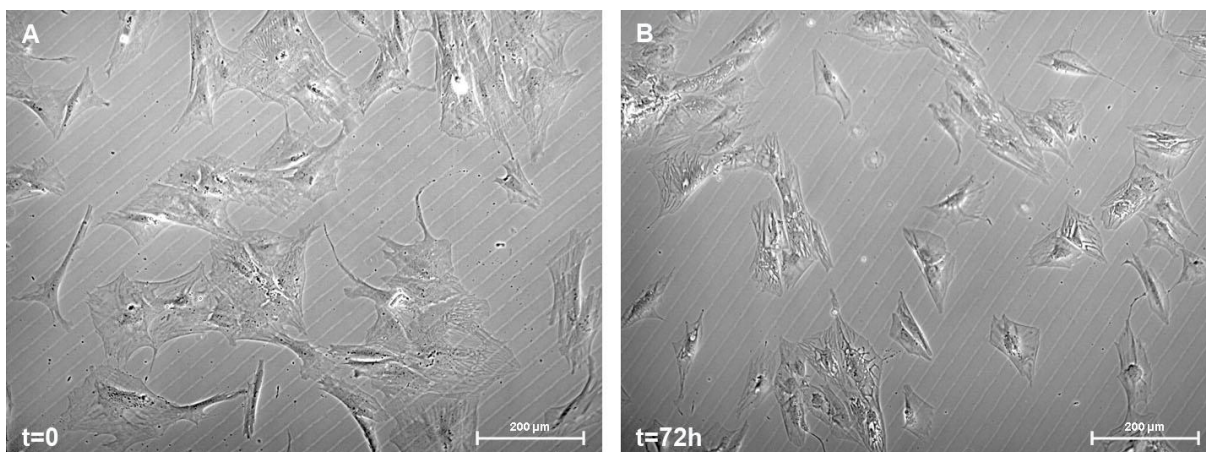


Figura 5.5. Morfologia das células não-induzidas e induzidas para diferenciação adipogênica por três dias. As células do doador TA84 foram mantidas em meio de cultivo ($t=0$) (A) e induzidas para diferenciação adipogênica por 3 dias ($t=72h$) (B). Após este período, observa-se que há uma mudança de morfologia das células induzidas para diferenciação, com o citoplasma ficando reduzido quando comparado com a situação em que não foi feita a indução. Contudo, ainda não é possível constatar modificações morfológicas características de adipogênese, tal qual a formação de inclusões lipídicas no citoplasma da célula.

Para confirmar a capacidade de diferenciação, as células foram cultivadas em placas de cultura de 24 poços e tratadas com meio para diferenciação adipogênica (item 4.1.2) por 14 dias. Após o tratamento, foi possível observar, tanto morfológicamente quanto pela presença de inclusões lipídicas, que houve diferenciação em adipócitos (Figura 5.6). Na amostra do doador TA84, 49,37% das células apresentavam inclusões lipídicas após 14 dias de indução. Na amostra TA85, este percentual foi de 37,3%, e, na amostra TA86, foi de 48%.

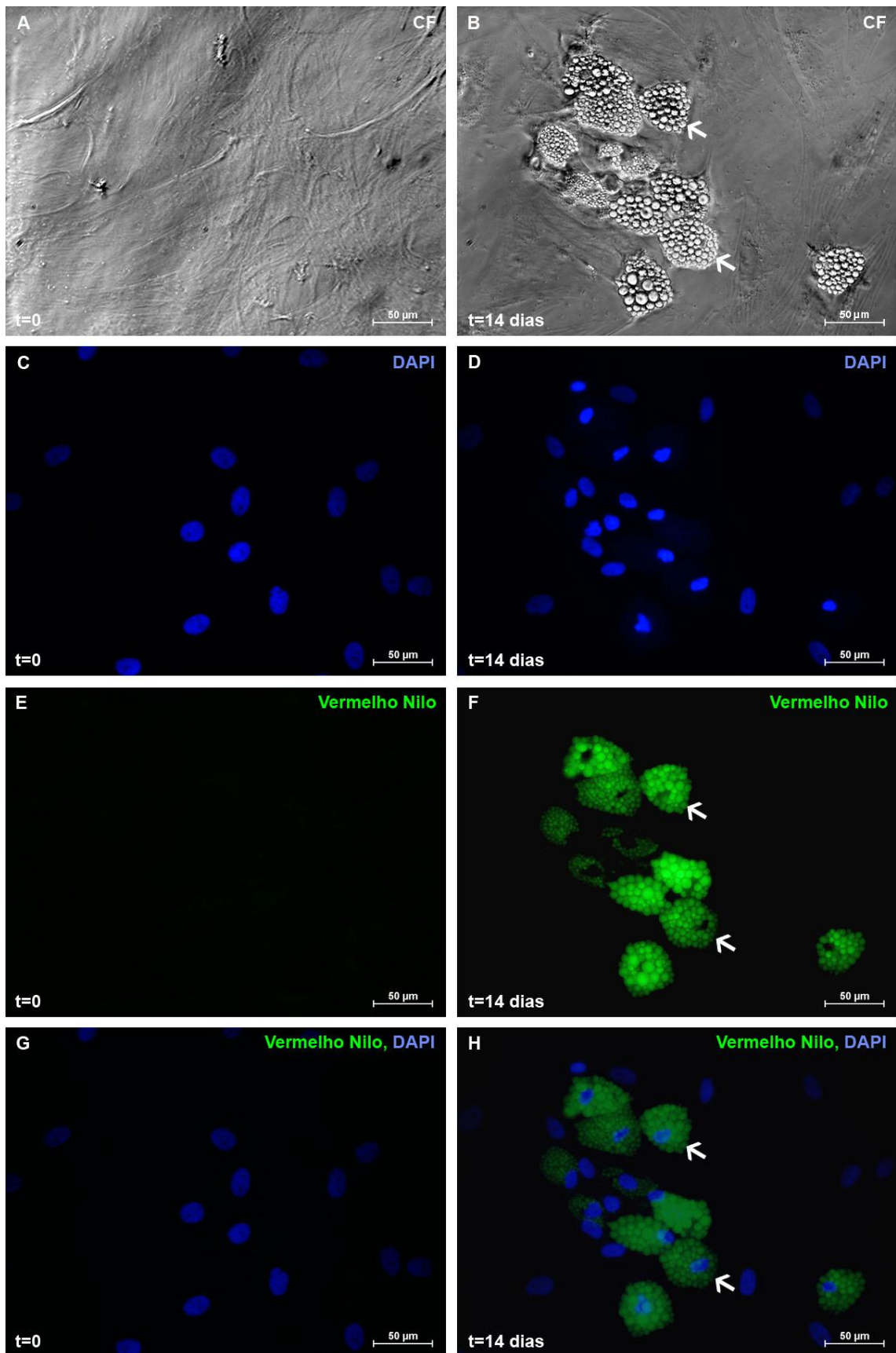


Figura 5.6. Morfologia e marcação com vermelho Nilo das células não-induzidas e induzidas para diferenciação adipogênica por 14 dias. As células do doador TA84 foram mantidas em meio de cultivo (A, C, E, G) e induzidas para diferenciação adipogênica por 14 dias (B, D, F, H). Após este período, é possível visualizar a formação de inclusões lipídicas (setas brancas), as quais são coradas pelo vermelho Nilo.

5.3. Aplicação do protocolo de *ribosome profiling* ao estudo de CTs obtidas de tecido adiposo

O protocolo de *ribosome profiling* estabelecido foi aplicado ao estudo do processo de diferenciação adipogênica de CTs adultas obtidas de três doadores. Para o doador TA84, foram utilizadas 12×10^6 células para a condição $t=0$ e 7×10^6 células para a condição $t=72h$. Foi realizado o protocolo estabelecido para *ribosome profiling*, ao final do qual foi realizada eletroforese em gel de acrilamida-uréia (6%), a banda correspondente aos fragmentos de 30 nucleotídeos foi coletada (Figura 5.7 A) e o RNA foi purificado. A análise pelo sistema Agilent 2100 Bioanalyzer demonstrou que foi possível recuperar 220 ng de fragmentos de RNA de, aproximadamente, 30 nucleotídeos para a condição $t=0$ (Figura 5.7 B), e 320 ng para a condição $t=72h$ (Figura 5.7 C). O RNA obtido ao final do processo foi armazenado a -80°C .

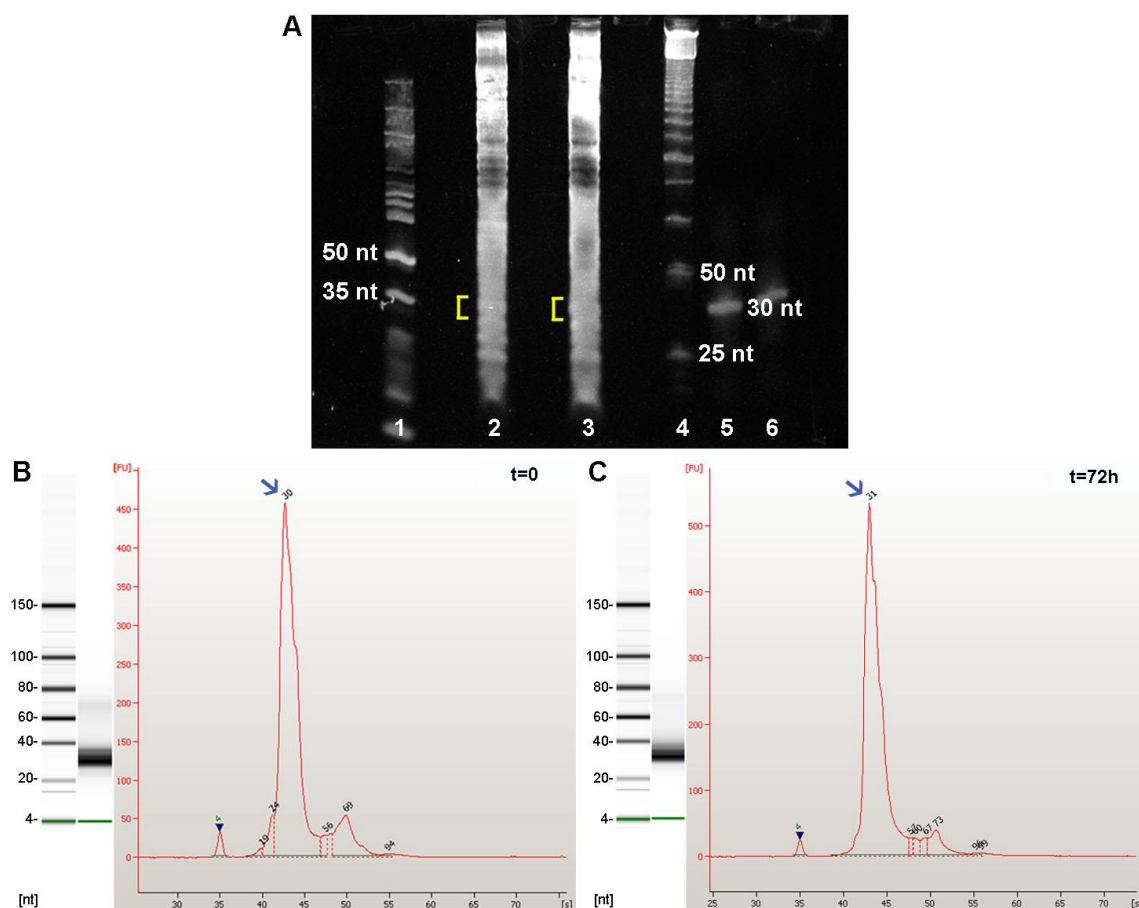


Figura 5.7. *Ribosome profiling* de CTs obtidas de tecido adiposo induzidas para diferenciação adipogênica ($t=72\text{ h}$) e não induzidas ($t=0$), TA84. Foram utilizadas 12×10^6 células da condição $t=0$ e 7×10^6 células da condição $t=72h$. Após a digestão do lisado com Benzonase®, ultracentrifugação e extração do RNA, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de acrilamida-uréia (6%) (A) e as regiões correspondentes aos fragmentos de 30 nucleotídeos (indicadas pela barras amarelas) das condições $t=0$ (A, coluna 2) e $t=72h$ (A, coluna 3) foram coletadas e o RNA foi purificado. Foi utilizado o marcador GeneRuler Ultra Low Range DNA Ladder (200 ng) (Thermo Scientific) (A, coluna 1), o marcador de peso molecular de 25 pares de base (500 ng) (25 bp DNA Ladder, Invitrogen) (A, coluna 4), e dois oligonucleotídeos, um com 30 nucleotídeos (A, coluna 5) e outro com 35 (A, coluna 6). A análise pelo sistema Agilent 2100 Bioanalyzer demonstrou que foi possível recuperar 220 ng de fragmentos de RNA de, aproximadamente, 30 nucleotídeos para a condição $t=0$ (B), e 320 ng para a condição $t=72h$ (C).

Para o doador TA85, foram utilizadas 10×10^6 células para a condição $t=0$ e 7×10^6 células para a amostra $t=72h$. O protocolo de *ribosome profiling* foi aplicado, sendo que o gel obtido após a eletroforese para separação dos fragmentos de 30 nucleotídeos, bem como a região coletada estão representados na Figura 5.8 A. Após quantificação, constatou-se que foram obtidos 190 ng de fragmentos de RNA de, aproximadamente, 30 nucleotídeos para a condição $t=0$ (Figura 5.8 B), e 100 ng para a condição $t=72h$ (Figura 5.8 C).

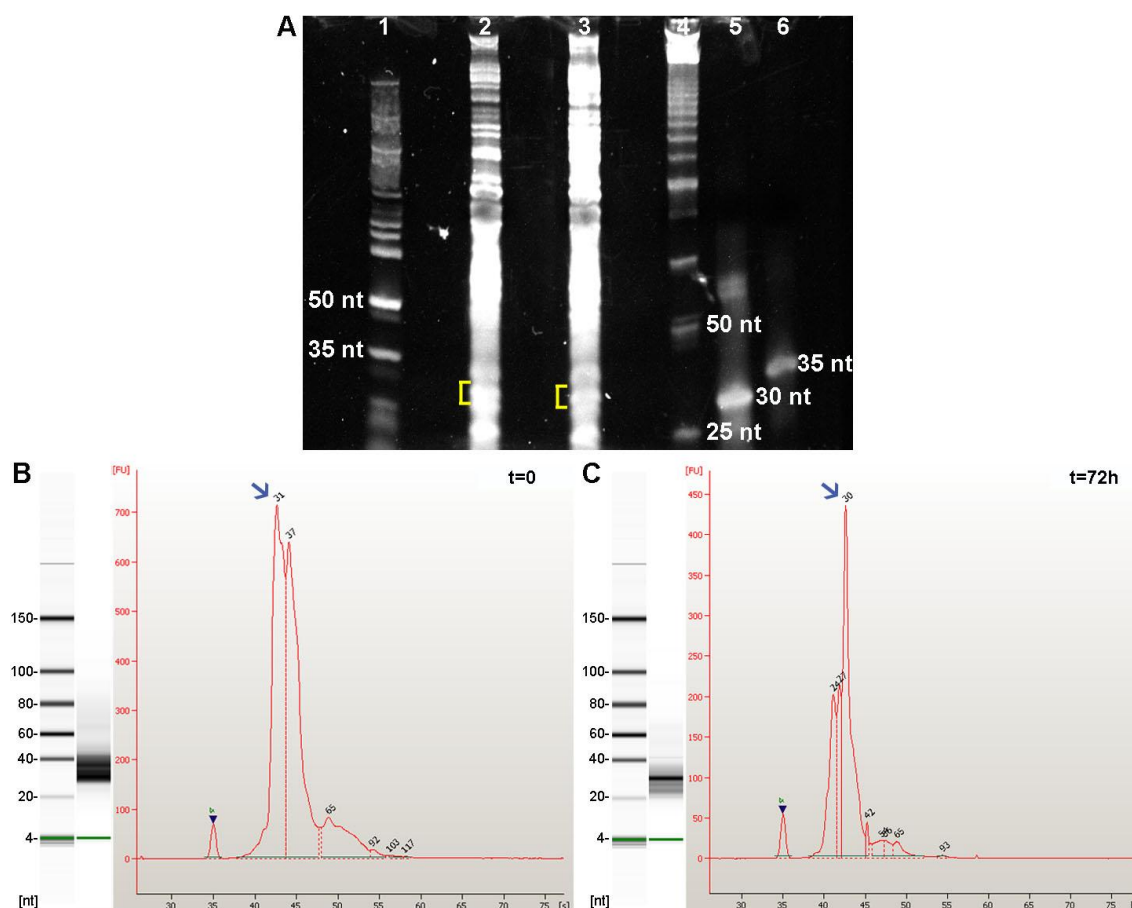


Figura 5.8. Ribosome profiling de CTs obtidas de tecido adiposo induzidas para diferenciação adipogênica ($t=72$ horas) e não induzidas ($t=0$), TA85. Foram utilizadas 10×10^6 células da condição $t=0$ e 7×10^6 células da condição $t=72h$. Após a digestão do lisado com Benzonase®, ultracentrifugação e extração do RNA, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de acrilamida-uréia (6%) (A), sendo que as regiões correspondentes aos fragmentos de 30 nucleotídeos (indicadas pela barras amarelas) das condições $t=0$ (A, coluna 2) e $t=72h$ (A, coluna 3) foram coletadas e o RNA foi purificado. Foi utilizado o marcador GeneRuler Ultra Low Range DNA Ladder (200 ng) (Thermo Scientific) (A, coluna 1), o marcador de peso molecular de 25 pares de base (500 ng) (25 bp DNA Ladder, Invitrogen) (A, coluna 4), e dois oligonucleotídeos, um com 30 nucleotídeos (A, coluna 5) e outro com 35 (A, coluna 6). A análise pelo sistema Agilent 2100 Bioanalyzer demonstrou que foi possível recuperar 190 ng de fragmentos de RNA de, aproximadamente, 30 nucleotídeos para a condição $t=0$ (B), e 100 ng para a condição $t=72h$ (C).

Do doador TA86, foram utilizadas 8×10^6 células para a condição $t=0$ e 7×10^6 células para a $t=72h$. Ao final do processo, foi realizada a eletroforese em gel de acrilamida-ureia (6%), sendo que as bandas de 30 nucleotídeos de cada uma das condições (Figura 5.9 A)

foram coletadas e o RNA purificado. Após quantificação, constatou-se que foram obtidos 320 ng de RNA de, aproximadamente, 30 nucleotídeos para t=0, e 140 ng para t=72h (Figura 5.9 B e C, respectivamente).

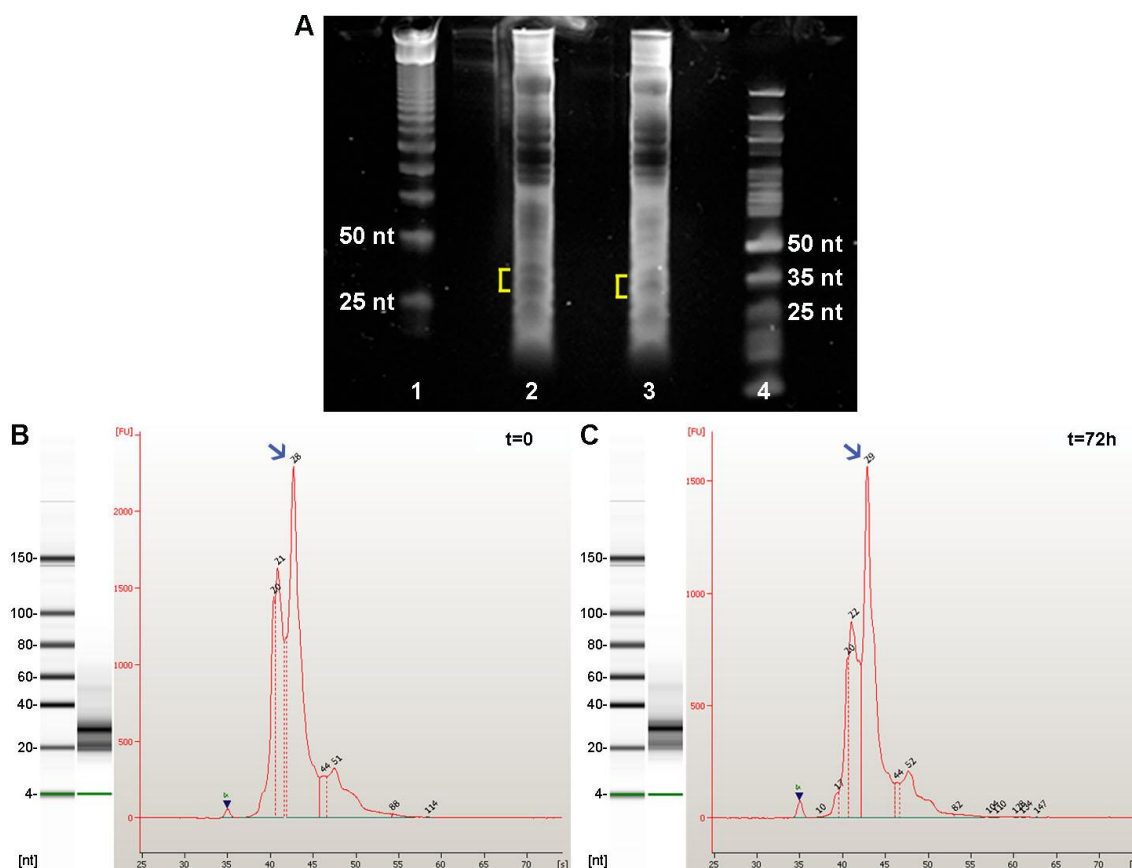


Figura 5.9. Ribosome profiling de CTs obtidas de tecido adiposo induzidas para diferenciação adipogênica (t=72h) e não induzidas (t=0), TA86. Foram utilizadas 8×10^6 células da condição t=0 e 7×10^6 células da condição t=72h. Após a digestão do lisado com Benzonase®, ultracentrifugação e extração do RNA, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de acrilamida-uréia (6%) (A), sendo que as regiões correspondentes aos fragmentos de 30 nucleotídeos (indicadas pela barras amarelas) das condições t=0 (A, coluna 2) e t=72h (A, coluna 3) foram coletadas e o RNA foi purificado. Foi utilizado o marcador de peso molecular de 25 pares de base (500 ng) (25 bp DNA Ladder, Invitrogen) (A, coluna 1), e o marcador GeneRuler Ultra Low Range DNA Ladder (200 ng) (Thermo Scientific) (A, coluna 4). A análise pelo sistema Agilent 2100 Bioanalyzer demonstrou que foi possível recuperar 320 ng de fragmentos de RNA de, aproximadamente, 30 nucleotídeos para t=0 (B), e 140 ng para t=72h (C).

5.4. Extração do RNA total e isolamento do RNA poliA das amostras de CTs obtidas de tecido adiposo

Para extração do RNA total, foram usadas duas garrafas de 150 cm², com confluência de 50% a 60%, para cada condição. A quantidade de células obtida para cada uma das amostras está descrita na Tabela 5.2. Após a extração com TRIzol® Reagent, seguindo-se as especificações do fabricante, o RNA obtido foi quantificado por espectrofotometria (NanoDrop®) e os resultados obtidos estão também apresentados na Tabela 5.2. O próximo

passo consistiu no isolamento do RNA poliA, utilizando-se o kit PolyATtract® mRNA isolation Partiu-se de uma quantidade inicial de 7000 ng de RNA total de cada uma das amostras. Ao final do procedimento, foi feita quantificação pelo método Qubit® de quantificação fluorométrica e os resultados obtidos estão descritos na Tabela 5.2. Em algumas amostras (TA84 t=0, TA85 t=0 e t=72h e TA86 t=0), a quantidade de RNA poliA obtida foi menor do que 100 ng. Assim, foi feito um novo isolamento de RNA poliA com estas amostras. Foram utilizados 7000 ng para TA84 t=0, 4000 ng de RNA total para amostra TA86 t=72h, 6300 e 3600 ng para as amostras TA85 t=0 e t=72h, respectivamente. Após o isolamento, não foi feita quantificação, a fim de evitar perdas no processo. O material isolado foi apenas acrescentado às amostras obtidas anteriormente e o conjunto foi armazenado a -80° C para posterior sequenciamento.

Tabela 5.2. Número de células utilizado para extração do RNA total e quantificação de RNA total e poliA recuperados.

Amostra	Condição	Nº de células	RNA total (ng)	RNA poliA (ng)
TA84	t=0	2,4x10 ⁶	42330	97
	t=72h	1,4x10 ⁶	9840	117
TA85	t=0	2,0x10 ⁶	13500	81
	t=72h	1,4x10 ⁶	9990	60
TA86	t=0	1,6x10 ⁶	34020	102
	t=72h	1,4x10 ⁶	11940	86

5.5. Preparo das amostras de RNA poliA e de *ribosome profiling* para sequenciamento

5.5.1. Construção da biblioteca de DNA e realização da PCR de emulsão

A próxima etapa do trabalho foi o preparo das amostras para análise por sequenciamento. O conjunto de todas as amostras e a quantidade de RNA de cada uma delas encontram-se descritos na Tabela 5.3. Os primeiros passos do preparo das amostras foram: digestão do RNA com RNase (esta etapa foi realizada apenas com RNA poliA), inserção dos adaptadores, realização de reação de transcriptase reversa, seleção dos fragmentos de tamanho desejado e amplificação por PCR. Nesta última etapa, para cada uma das amostras, foi utilizado um iniciador que possui uma sequência identificadora. As sequências identificadoras correspondentes a cada uma das amostras estão descritas na Tabela 5.3. O produto obtido ao final do processo de PCR foi quantificado pelo método Qubit® de quantificação fluorométrica. Em três amostras (TA84 t=0 poliA, TA84 t=72h poliA e TA86 t=0 poliA), a quantidade de DNA obtida nesta primeira PCR foi pouca,

ficando abaixo da capacidade de detecção do sistema Qubit®. Assim, foi feita uma nova PCR, utilizando-se duas bandas (c, d) do gel. Os resultados finais obtidos (com a nova PCR) são apresentados na Tabela 5.3. Em seguida, foi feito um *pool* das amostras de forma a obter uma solução com concentração final de 50 pg/μL e foi realizada a PCR de emulsão.

Tabela 5.3. Quantidade de RNA obtido para cada amostra para o preparo do sequenciamento, sequência identificadora inserida e concentração de DNA após RT-PCR.

Amostra	Condição	RNA (ng)	Sequência identificadora	DNA (ng/μL)**
TA84	t=0 poliA	97*	1	0,285
	t=0 RP	220	7	1,92
	t=72h poliA	117	2	0,296
	t=72h RP	320	8	2,73
TA85	t=0 poliA	81*	3	0,8
	t=0 RP	190	9	17,4
	t=72h poliA	60*	4	1,53
	t=72h RP	100	10	4,77
TA86	t=0 poliA	102	5	4,69
	t=0 RP	320	11	11,4
	t=72h poliA	86*	6	0,4
	t=72h RP	140	12	9,53

* Nestas amostras, foi feita uma nova extração de RNA poliA, mas que não foi quantificada, então, certamente, este valor está subestimado

** Volume = 17 μL

5.5.2. Sequenciamento na plataforma SOLiD™

O material obtido após a PCR de emulsão foi depositado em quatro lâminas completas para o sequenciamento. Este foi feito nas plataformas SOLiD™ do Instituto Carlos Chagas e da Universidade Federal do Paraná, sendo que duas lâminas foram analisadas em cada local. Em uma das lâminas, houve um problema na análise de duas ligações (7 e 12). Provavelmente houve falha no sequenciamento e as imagens referentes a estas posições não foram adquiridas ou tiveram má qualidade. Assim, não foi possível determinar qual fluorocromo foi detectado nestas posições. Conforme descrito anteriormente, a determinação de cada base pelo sequenciamento na plataforma SOLiD™ depende da combinação de duas cores (Figura 4.3). Assim, a falha na identificação de uma posição compromete a decodificação de todas as posições subsequentes. Existem algumas alternativas capazes de contornar este problema, como o uso de programas de mapeamento que o fazem com base no código de cores e a utilização destas sequências mapeadas para uma nova análise pela ferramenta CLC Genomics Workbench. Contudo, neste trabalho, optou-se por desconsiderar (pelo menos em um primeiro momento) estes dados em que houve falha e prosseguir com as informações das outras lâminas.

O número de leituras obtido para cada réplica de cada condição encontra-se descrito na Tabela 5.4. Pode-se observar que foram obtidas cerca de 450 milhões de leituras por lâmina. Entre as diferentes condições, a proporção de 3:1 entre o número de leituras de *ribosome profiling* e de poliA foi obtido. Foram obtidas, em média, 60 milhões de leituras para cada uma das amostras de poliA e cerca de 170 milhões para cada uma das de *ribosome profiling*.

Tabela 5.4. Número de leituras obtido para cada uma das amostras através do sequenciamento na plataforma SOLiD™.

Amostra	Condição	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Total
TA84	t=0 poliA	16.686.750	15.925.167	16.167.038	48.778.955
	t=0 RP	54.485.993	52.468.841	60.606.465	167.561.299
	t=72h poliA	24.607.420	23.310.493	22.133.734	70.051.647
	t=72h RP	60.641.069	57.658.758	67.310.975	185.610.802
TA85	t=0 poliA	23.265.351	21.764.152	21.546.079	66.575.582
	t=0 RP	46.900.639	44.305.395	51.641.432	142.847.466
	t=72h poliA	12.846.979	12.112.285	13.858.664	38.817.928
	t=72h RP	69.561.058	65.899.392	70.384.278	205.844.728
TA86	t=0 poliA	15.610.892	14.610.518	16.690.604	46.912.014
	t=0 RP	51.722.912	48.637.049	54.148.063	154.508.024
	t=72h poliA	27.072.164	25.604.982	26.890.724	79.567.870
	t=72h RP	64.160.925	60.961.374	61.586.180	186.708.479
Total		467.562.152	443.258.406	482.964.236	1.393.784.794

5.6. Triagem e processamento dos resultados obtidos no sequenciamento

A etapa subsequente do trabalho consistiu na triagem e processamento dos dados obtidos a partir do sequenciamento, a qual foi realizada em colaboração com o grupo de pesquisa coordenado pelo Dr. Jose Sotelo Silveira. Durante duas semanas, foi feito um estágio junto a esta equipe no Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, de Montevideu, Uruguai, para acompanhamento e discussão das análises e resultados obtidos.

5.6.1 Trimming e mapeamento contra RNAr

O primeiro passo da análise dos resultados consistiu em fazer o *trimming* das sequências para remover os adaptadores e descartar aquelas que não possuíam tamanho e qualidade estipulados (item 4.5). O número e o percentual de sequências que passaram por cada uma das etapas deste processo encontram-se descritos na Tabela 5.5. Nestas primeiras etapas da análise dos dados, as réplicas biológicas e técnicas foram tratadas em separado.

Cabe lembrar que as réplicas biológicas se referem às amostras dos três doadores que foram utilizadas (TA84, TA85 e TA86). Já as réplicas técnicas são réplicas do sequenciamento, uma vez que o *pool* de amostras foi sequenciado em três lâminas. Contudo, como os resultados obtidos entre as réplicas técnicas foram bastante semelhantes, eles estão apresentados em conjunto na Tabela 5.5. O adaptador foi identificado em cerca de 15% das sequências de poliA e em cerca de 30% das sequências de *ribosome profiling*. Na análise por qualidade, cerca de 90% das sequências sofreram *trimming*. Após a filtragem por tamanho, foram obtidas, em média, de 30 a 40 milhões de leituras para cada condição.

Os efeitos do *trimming* de qualidade e da filtragem por tamanho podem ser visualizados na Figura 5.10, onde está representada a análise das sequências do TA85 t=0 poliA (Figura 5.10 A, B, C, D) e *ribosome profiling* (Figura 5.10 E, F, G, H). Quanto à qualidade, é possível observar que foram selecionadas apenas as sequências com valor PHRED maior do que 20. Este valor de PHRED indica que há 99% de chance de que a base indicada esteja correta (chance de erro 1 em 100). Quanto ao tamanho, antes do *trimming*, todas as sequências possuíam 50 nucleotídeos, pois este foi o número de nucleotídeos lidos durante o sequenciamento. Para as amostras de poliA, foram selecionadas as sequências com mais de 18 nucleotídeos. Para as de *ribosome profiling*, foram selecionadas as sequências com 25 a 40 nucleotídeos.

Tabela 5.5. Número e percentual de sequências que sofreram *trimming* em cada uma das etapas realizadas (remoção de adaptadores, filtragem de tamanho e de qualidade) e que restaram ao final do processo.

Amostra	Condição	Nº de sequências antes do <i>trimming</i>	% de sequências em que o adaptador foi identificado	% de sequências <i>trimmed</i> por qualidade	Nº de sequências após filtragem por tamanho	% de <i>trimming</i> (total)
TA84	t=0 poliA	48.778.955	13,72%	90,43%	32.341.816	66,30%
	t=0 RP	167.561.299	28,87%	90,64%	47.528.212	28,36%
	t=72h poliA	70.051.647	20,84%	89,46%	47.630.949	67,99%
	t=72h RP	185.610.802	31,55%	90,36%	50.610.309	27,27%
TA85	t=0 poliA	66.575.582	15,58%	89,47%	43.470.078	65,29%
	t=0 RP	142.847.466	30,53%	86,69%	55.451.896	38,82%
	t=72h poliA	38.817.928	9,96%	89,31%	25.670.241	66,13%
	t=72h RP	205.844.728	31,98%	89,81%	56.298.386	27,35%
TA86	t=0 poliA	46.912.014	5,90%	88,56%	30.569.213	65,16%
	t=0 RP	154.508.024	31,63%	88,55%	43.778.504	28,33%
	t=72h poliA	79.567.870	17,40%	90,11%	55.273.545	69,47%
	t=72h RP	186.708.479	34,89%	88,56%	53.014.413	28,39%

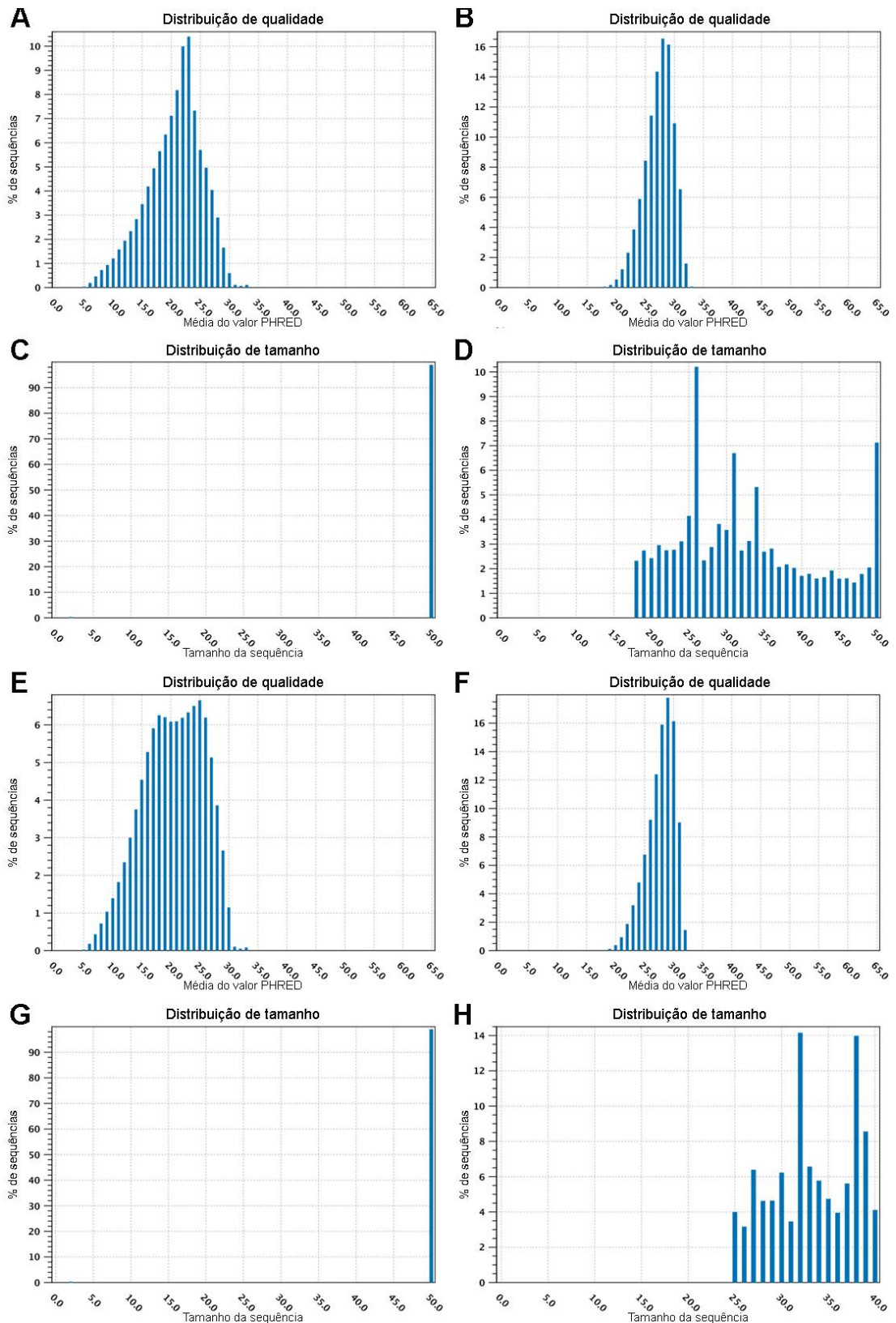


Figura 5.10. Efeito do *trimming* na qualidade e no tamanho das seqüências de poliA e de *ribosome profiling*. Análise do tamanho médio e da qualidade (valor PHRED) antes (A, C, E, G) e após (B, D, G, H) o *trimming*. São apresentados os resultados obtidos para as seqüências da TA85, t=0, poliA (A, B, C, D) e *ribosome profiling* (E, F, G, H). Quanto à qualidade, pode-se observar que são selecionadas apenas as seqüências com valor PHRED superior a 20. Quanto ao tamanho, com a retirada dos adaptadores e a filtragem por tamanho, foram selecionadas as seqüências com mais de 18 nucleotídeos para poliA e com 25 a 40 nucleotídeos para *ribosome profiling*.

A partir das sequências selecionadas após o *trimming*, foi feito um primeiro mapeamento contra uma base de dados de RNAr, a fim de subtrair a contaminação por estes. Nesta etapa, as réplicas biológicas e técnicas foram também mapeadas em separado. Mas, como os resultados obtidos entre as réplicas técnicas foram semelhantes, estes estão apresentados em conjunto na Tabela 5.6. Observou-se que, nas amostras de poliA, cerca de 7,5% das sequências correspondiam a RNAr. Já no caso das de *ribosome profiling*, este percentual foi de 75% (Tabela 5.6).

Tabela 5.6. Mapeamento contra RNAr.

Amostra	Condição	Nº inicial de sequências	Nº de sequências mapeadas vs RNAr	% de RNAr
TA84	t=0 poliA	32.641.816	2.032.350	6,28%
	t=0 RP	47.528.212	35.007.491	73,66%
	t=72h poliA	47.630.949	2.241.454	4,71%
	t=72h RP	50.610.309	40.362.426	79,75%
TA85	t=0 poliA	43.470.078	2.139.877	4,92%
	t=0 RP	55.451.896	37.553.696	67,72%
	t=72h poliA	25.670.241	3.003.703	11,7%
	t=72h RP	56.298.386	48.045.208	85,34%
TA86	t=0 poliA	30.569.213	2.274.058	7,44%
	t=0 RP	43.778.504	29.286.722	66,9%
	t=72h poliA	55.273.545	5.713.051	10,34%
	t=72h RP	53.014.413	42.501.656	80,17%

5.6.2. Mapeamento contra RNAm e normalização dos dados

A lista de sequências que não mapearam contra RNAr foi utilizada para fazer o mapeamento contra uma base de dados de RNAm, a qual possui uma lista de 34.760 transcritos. A partir desta etapa, as réplicas técnicas foram unidas e tratadas em conjunto. As réplicas biológicas ainda foram tratadas em separado. A partir das sequências de RNA poliA, em média, obteve-se aproximadamente 51% de mapeamento para a condição t=0 e 42% para a condição t=72h. Já para as amostras de *ribosome profiling*, para a condição t=0, em média, 13% das sequências mapearam, enquanto para a t=72h, este percentual foi de apenas 5% (Tabela 5.7). Os dados de mapeamento obtidos foram normalizados (DESeq) e o resultado pode ser visualizado na Figura 5.11. Após a normalização, foram descartados os transcritos que não possuíam leituras e os que possuíam uma relação desvio padrão/soma (D/S) maior que 0,2. Em seguida, foram selecionados apenas os transcritos que possuíam pelo menos 30 leituras para cada réplica biológica (Tabela 5.8). Após esta filtragem, chegou-se a um cenário final de 18.140 transcritos para a condição t=0 poliA, 17.420 para a t=72h poliA, 9.017 para a condição t=0 *ribosome profiling* e 8.168 para a condição t=72h *ribosome profiling* (Tabela S1).

Tabela 5.7. Mapeamento contra RNAm.

Amostra	Condição	Nº inicial de sequências	Nº de sequências mapeadas vs RNAm	% mapeados vs RNAm
TA84	t=0 poliA	32.641.816	12.785.846	39,17%
	t=0 RP	47.528.212	5.502.054	11,58%
	t=72h poliA	47.630.949	18.212.054	38,24%
	t=72h RP	50.610.309	3.302.610	6,53%
TA85	t=0 poliA	43.470.078	20.329.622	46,77%
	t=0 RP	55.451.896	9.352.154	16,87%
	t=72h poliA	25.670.241	13.369.927	52,08%
	t=72h RP	56.298.386	1.628.647	2,89%
TA86	t=0 poliA	30.569.213	20.400.367	66,74%
	t=0 RP	43.778.504	4.842.402	11,06%
	t=72h poliA	55.273.545	19.614.276	35,49%
	t=72h RP	53.014.413	2.589.229	4,88%

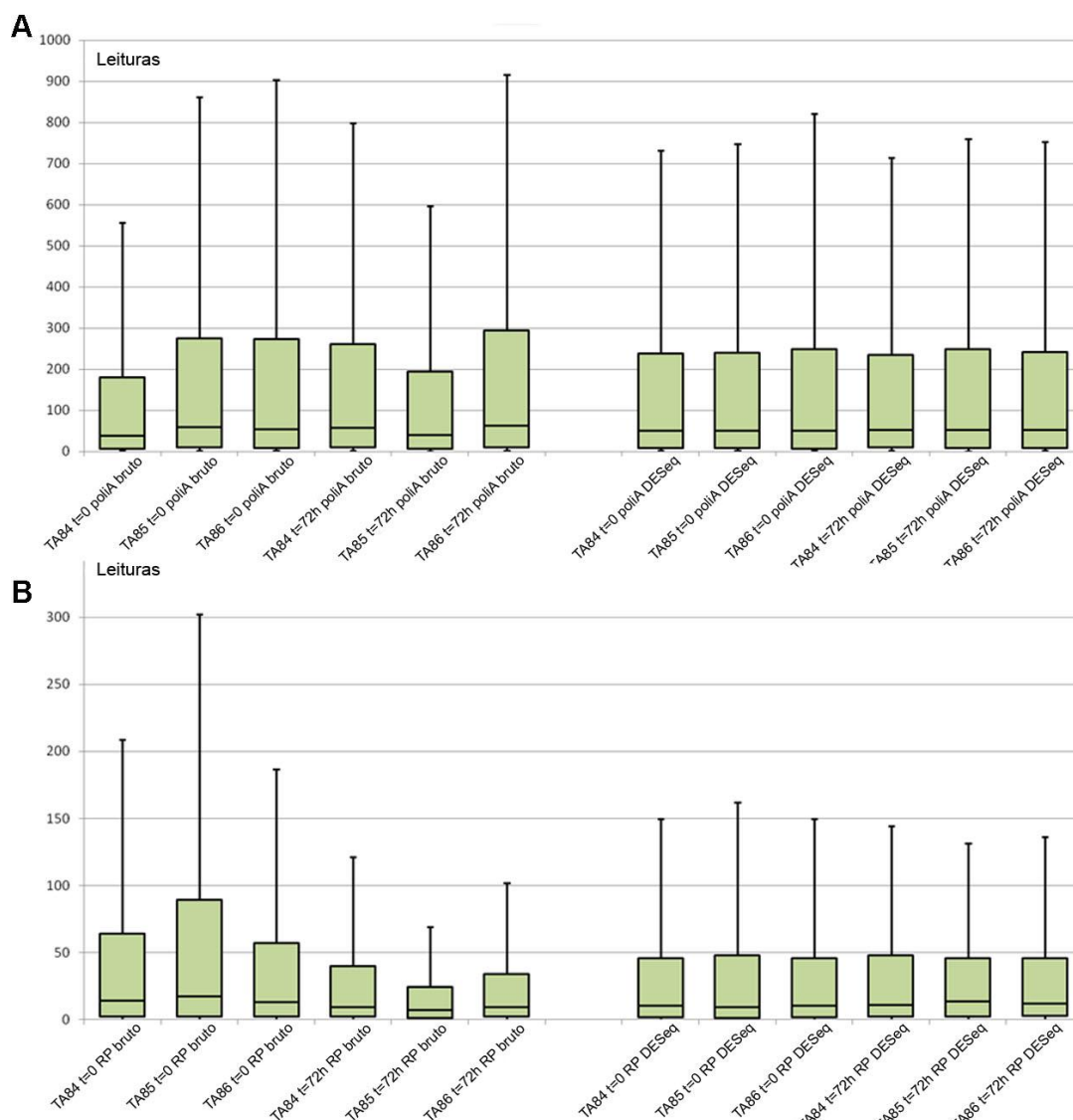


Figura 5.11. Boxplot do número de leituras antes e após a normalização (DESeq). Distribuição do número de reads dos genes para cada uma das amostras de poliA (A) e ribosome profiling (B) antes e após a normalização pelo método DESeq.

Tabela 5.8. Filtragem de transcritos.

Condição	Nº de transcritos	Nº de transcritos filtrados (eliminados)			Nº transcritos final	
		0 leituras	D/S>0,2	<30 leituras	Nº transcritos detectados	%*
poliA t=0	34.760	438	5.436	10.746	18.140	52,19%
RP t=0	34.760	1.693	10.567	13.483	17.420	50,12%
poliA t=72h	34.760	381	6.643	10.316	9.017	25,94%
RP t=72h	34.760	1.889	12.773	11.930	8.168	23,50%

*Percentual em relação ao banco de dados de referência de 34.760 transcritos.

Na figura 5.12, está representado o mapeamento das leituras obtidas pelas amostras de poliA e de *ribosome profiling* (TA84, t=0) para o transcrito da actina B (ACTB). É possível notar que, enquanto as amostras de poliA têm leituras ao longo de todo o transcrito, as de *ribosome profiling* se limitam à região de 1128 nucleotídeos correspondente à ORF. No caso do mapeamento das leituras de *ribosome profiling*, também é possível verificar que há um maior número de leituras na região inicial da ORF, onde ocorre a iniciação da tradução.

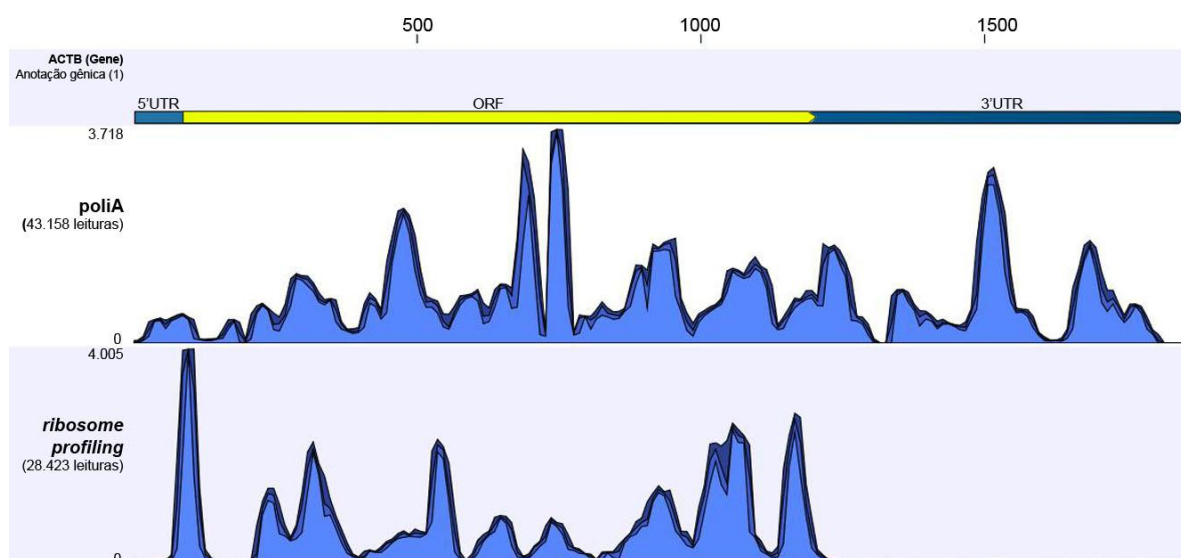


Figura 5.12. Mapeamento das leituras obtidas por poliA e por *ribosome profiling* sobre o transcrito de actina B. O transcrito de actina B possui ao todo 1852 nucleotídeos (representado nesta figura pela barra azul superior), sendo que a ORF (barra amarela) possui 1128 nucleotídeos (85-1212). No eixo y está indicado o número de leituras identificadas em cada região do transcrito pelas amostras de poliA (superior) e de *ribosome profiling* (inferior).

5.7. Análise dos resultados obtidos por sequenciamento

A partir da listagem de transcritos identificados, foi também feita uma lista dos genes identificados (ou seja, desconsiderando-se os diferentes transcritos de um mesmo gene) (Tabela S2). Primeiramente, foram comparadas as listas de poliA e *ribosome*

profiling para cada uma das condições (t=0 e t=72h). Observou-se que, em t=0, 59% foram encontrados em ambas as amostras de RNA (poliA e *ribosome profiling*), enquanto 41% foram encontrados somente em poliA e menos de 1% foi identificado exclusivamente em *ribosome profiling* (Figura 5.13 A). Em t=72h, 53% dos genes foram identificados em ambas as amostras, 45% apenas em poliA e 2% apenas em *ribosome profiling* (Figura 5.13 B).

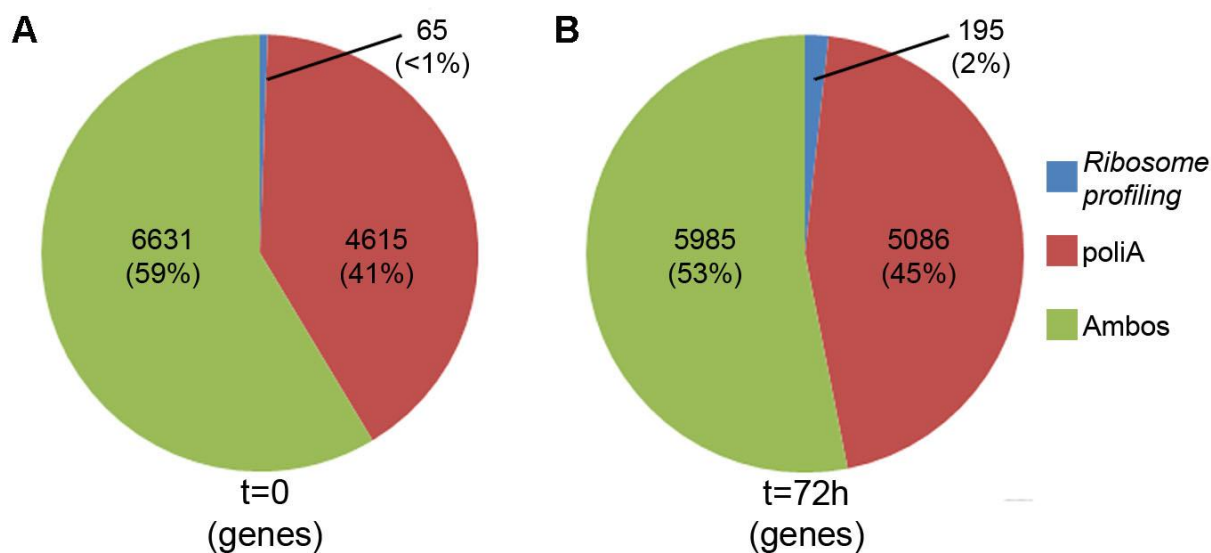


Figura 5.13. Comparação das listas de genes identificados para cada uma das amostras de RNA (poliA e *ribosome profiling*). Foram comparadas as listas de genes identificados nas amostras de poliA e de *ribosome profiling* nas diferentes condições t=0 (A) e t=72h (B), a fim de identificar quais seqüências haviam em comum e quais eram diferentes entre as duas amostras de RNA.

Foram comparadas também as listas de t=0 e t=72h de cada uma das amostras de RNA (poliA e de *ribosome profiling*). Esta comparação permite fazer uma primeira análise qualitativa dos genes identificados por cada uma das amostras de RNA como diferencialmente expressos antes e após a indução para diferenciação adipogênica. Quando foram analisados os genes encontrados em poliA (Figura 5.14 A), observou-se que 5% deles estavam presentes apenas nas seqüências de t=0 e 4% apenas nas de t=72h e 91% em ambas. Já quando foi analisada a lista de genes de *ribosome profiling* (Figura 5.14 B), observou-se que 15% destes estavam presentes apenas na listagem de t=0 e 8% apenas na de t=72h.

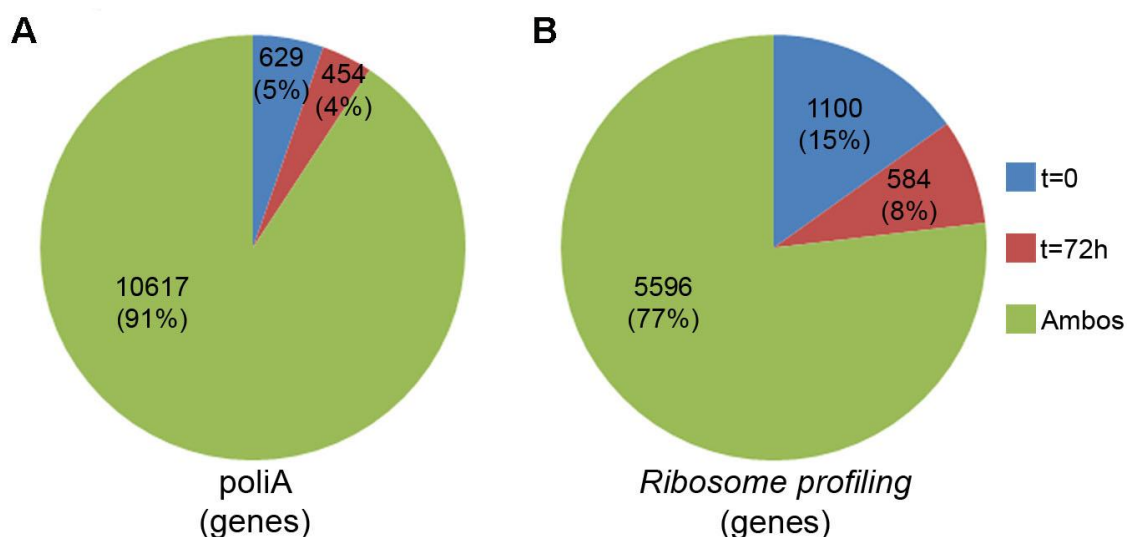


Figura 5.14. Comparação das listas de genes identificados em cada uma das amostras de RNA para cada uma das condições. Foram confrontadas as listas de genes das diferentes condições (t=0 e t=72h) para as amostras de poliA (A) e *ribosome profiling* (B), o que permite avaliar uma expressão diferencial qualitativa entre as células que não foram induzidas para diferenciação adipogênica e as que foram induzidas.

Em seguida, foram comparados os resultados de t=0 e t=72h para cálculo do *fold change* e identificação dos genes regulados positivamente e negativamente após três dias de indução para diferenciação adipogênica (Tabela S3). Dentre os genes regulados positivamente ($\log_2(\text{FC}) \geq 1$, valor de $p < 0,05$), 194 foram encontrados apenas em poliA, 198 em ambas as amostras e 425 apenas em *ribosome profiling* (Figura 5.15 A). Já entre os regulados negativamente ($\log_2(\text{FC}) \leq -1$, valor de $p < 0,05$), 169 foram identificados apenas em poliA, 150 em ambos e 741 em *ribosome profiling* (Figura 5.15 B). Destaca-se o fato de que mais de 50% dos genes expressos diferencialmente foram identificados apenas por *ribosome profiling*.

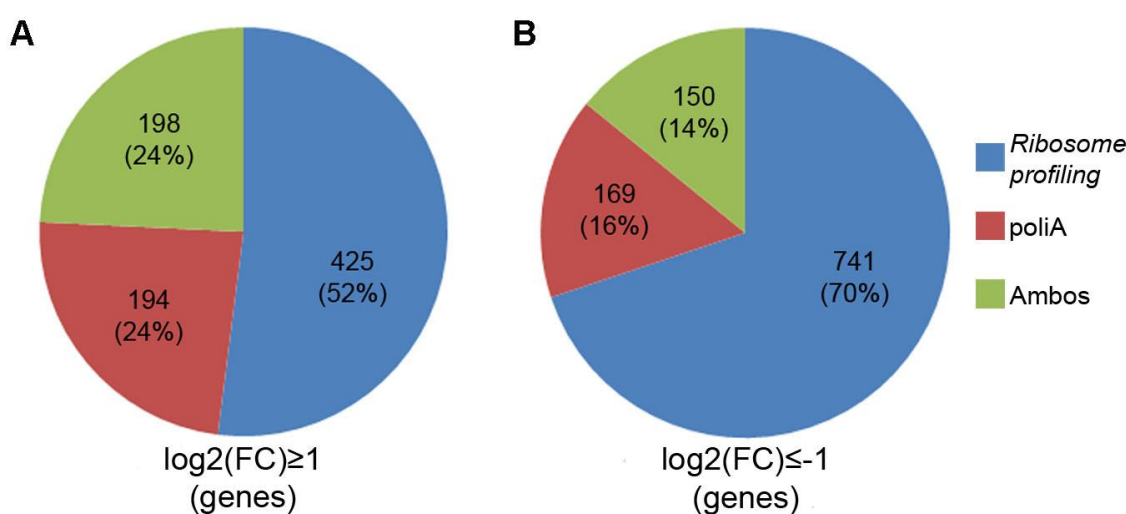


Figura 5.15. Genes regulados positivamente e negativamente após três dias de indução para adipogênese. Número e percentual de genes que tiveram $\log_2(\text{FC})$ maior do que 1 (A) ou menor do que -1 (B) e valor de $p < 0,05$ após a indução para diferenciação adipogênica por três dias. Os gráficos evidenciam os genes que foram identificados como regulados apenas em uma das amostras de RNA (poliA ou *ribosome profiling*) ou em ambas.

5.7.1. Análise de ontologia gênica – Genes regulados positivamente

Para as análises de ontologia gênica, foram consideradas apenas as listas de genes identificados para cada uma das condições. Primeiramente foram analisados os genes que estavam regulados positivamente em t=72h ($\log_2(\text{FC}) \geq 1$, valor de $p < 0,05$) (Tabela S5). Para isso, foram consideradas três listas em separado: a de genes que aparecem regulados positivamente somente na amostra de *ribosome profiling*, a dos que aparecem apenas em poliA e a de genes que constam em ambas as listas. Primeiramente, foi feita a análise de vias cujos genes aparecem regulados positivamente em ambas as listas (intersecção das listas de poliA e *ribosome profiling*) através do banco de dados KEGG (Tabela 5.9). Constatou-se que vias envolvidas na diferenciação adipogênica e de biossíntese de lipídeos aparecem reguladas positivamente. Entre elas está a via de sinalização PPAR, que é característica do processo de adipogênese (Figura 5.16, marcação em vermelho). No caso das vias enriquecidas apenas em poliA, destaca-se a presença de elementos da via de sinalização de PPAR, PPAR γ e SORBS1. Contudo, é preciso notar que estes genes também foram identificados por *ribosome profiling* e tiveram a expressão aumentada em t=72h. Entretanto, o número de leituras obtido ficou abaixo de 30 e, por isso, não foram computados na listagem estabelecida. Ambos os métodos também detectaram regulação positiva na expressão de FKBP5, sendo que, por poliA, foi detectado um aumento na taxa de expressão de 10 vezes, enquanto que, por *ribosome profiling*, este aumento foi de 20 vezes. Dentre as vias identificadas apenas por *ribosome profiling*, destaca-se também a presença de vias de apoptose. Entretanto, cabe destacar que foram identificados tanto genes envolvidos na ativação da apoptose (ex: ENDO-1) quanto inibidores (ex: BCL2-like1). Além disso, foi observada a presença de genes relacionados a vias de câncer. Os genes identificados como relacionados a esta via estão envolvidos em regulação de apoptose, proliferação e diferenciação celular.

As mesmas listas foram submetidas à análise pela ferramenta GOrilla, com agrupamento por processo biológico. Para os genes regulados positivamente apenas em poliA, foram encontrados 20 termos, para os de *ribosome profiling* foram encontrados 59 e para os genes que foram identificados como regulados positivamente em ambas as amostras de RNA foram identificados 242 termos. Na Tabela 5.10 estão representados os 15 termos com menor valor de p identificados em cada uma das situações. Destaca-se a presença de vários termos relacionados ao metabolismo e à biossíntese de lipídeos como regulados positivamente em ambas as amostras de RNA. Alguns destes termos aparecem apenas na listagem de poliA. No caso dos termos detectados apenas por *ribosome profiling*, destaca-se a presença de processos de desenvolvimento e de diferenciação. Além disso, foram também encontrados como regulados positivamente genes relacionados à regulação da proliferação e à adesão celular.

Tabela 5.9. Análise pelo banco de dados KEGG dos genes regulados positivamente após 72h de diferenciação adipogênica para cada uma das amostras de RNA.

Regulados positivamente somente em poliA		
Termo	Nº genes identificados	Valor de p
Biossíntese de ácido de bile primário	3	9.62E-03
Via de sinalização PPAR	4	2.68E-02
Interação citocina-citocina receptor	6	9.89E-02

Regulados positivamente somente em <i>ribosome profiling</i>		
Termo	Nº genes identificados	Valor de p
Apoptose	7	2.4E-02
Biossíntese de keratan sulfato	3	4.9E-02
Biossíntese de terpenóide	3	5.6E-02
Vias em câncer	14	7.8E-02
Metabolismo de triptofano	4	8.3E-02
Via de sinalização de neurotrofina	7	1.0E-01

Regulados positivamente em poliA e <i>ribosome profiling</i>		
Termo	Nº genes identificados	Valor de p
Biossíntese de ácidos graxos insaturados	6	3.2E-05
Biossíntese de esteróides	4	3.0E-03
Metabolismo de xenobióticos por citocromo P450	6	3.9E-03
Metabolismo de piruvato	5	5.2E-03
Via de sinalização PPAR	6	7.2E-03
Biossíntese de hormônio esteróide	5	8.5E-03
Metabolismo de propanoato	4	1.8E-02
Metabolismo de butanoato	4	2.2E-02
Metabolismo de ácido graxo	4	3.3E-02
Reabsorção de sódio regulada por aldosterona	4	3.5E-02
Degradação de valina, leucina e isoleucina	4	4.2E-02
Metabolismo de glutatona	4	5.8E-02
Metabolismo de prolina e arginina	4	6.7E-02
Via de sinalização de insulina	6	9.0E-02

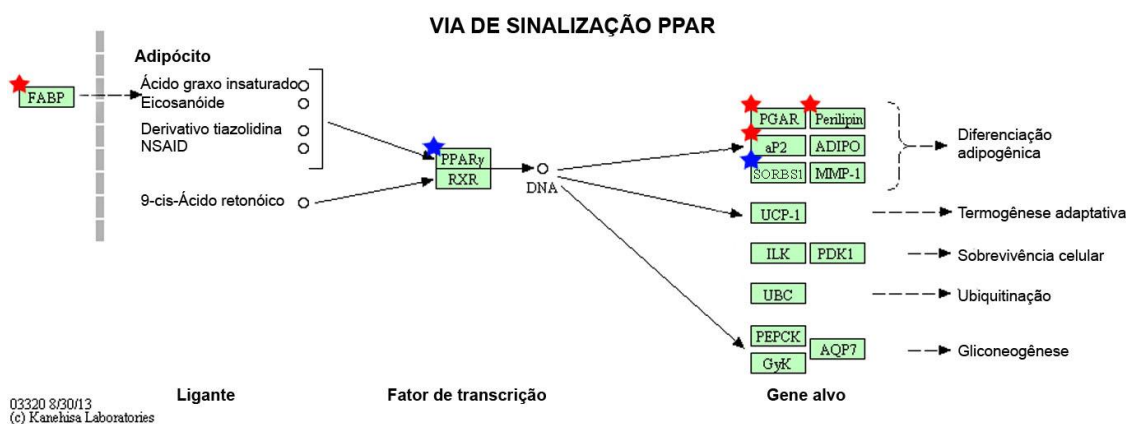


Figura 5.16. Ativação da via de sinalização PPAR após 72 horas de indução para diferenciação adipogênica em poliA e em *ribosome profiling*. Uma das vias características da diferenciação adipogênica é a do PPAR. Marcados com uma estrela vermelha estão os genes que aparecem regulados positivamente tanto em poliA quanto em *ribosome profiling*. Já as estrelas azuis indicam os genes que aparecem regulados positivamente apenas nas amostras de poliA.

Tabela 5.10. Análise pelo banco de dados GOrilla dos genes envolvidos em processos metabólicos regulados positivamente após 72h de diferenciação adipogênica para cada uma das amostras de RNA.

Regulados positivamente somente em poliA		
Termo	Nº genes identificados	Valor de p
Processo metabólico de ácido de bile	5	1.67E-05
Processo metabólico de colesterol	8	2.81E-05
Processo biossintético de ácido de bile	4	2.88E-05
Processo metabólico de esterol	8	5.34E-05
Processo metabólico de esteróide	10	7.90E-05
Regulação de processo biossintético de esteróide	5	1.92E-04
Processo metabólico de isoprenóide	6	2.15E-04
Resposta celular a íon zinco	3	2.15E-04
Regulação de secreção de glucagon	2	2.56E-04
Processo metabólico de terpenóide	5	3.73E-04
Regulação de armazenamento de colesterol	3	4.50E-04
Desenvolvimento de osteoblasto	3	6.11E-04
Processo metabólico de xenobióticos	6	6.99E-04
Regulação da pressão sanguínea	6	6.99E-04
Remodelamento de partícula de lipoproteína de baixa densidade	2	7.61E-04
Regulados positivamente somente em <i>ribosome profiling</i>		
Processo de desenvolvimento de organismo único	131	3.95E-08
Regulação de processo de desenvolvimento	73	4.41E-08
Processo de desenvolvimento	140	5.37E-08
Regulação da diferenciação celular	55	5.40E-07
Desenvolvimento de estrutura anatômica	91	1.68E-06
Resposta a composto contendo oxigênio	50	4.62E-06
Processo de organismo único	290	5.76E-06
Desenvolvimento de órgão	49	6.28E-06
Regulação de desenvolvimento do organismo multicelular	52	8.66E-06
Regulação da proliferação celular	54	1.10E-05
Adesão celular	36	1.23E-05
Adesão biológica	36	1.29E-05
Processo de desenvolvimento envolvido em reprodução	22	1.47E-05
Resposta a estímulo endógeno	52	1.79E-05
Resposta a composto organitrogênio	34	5.30E-05
Regulados positivamente em poliA e <i>ribosome profiling</i>		
Processo metabólico de lipídeos	44	4.63E-14
Regulação da proliferação celular	47	1.12E-13
Processo metabólico de ácido monocarboxílico	26	4.12E-13
Processo de organismo único	164	1.14E-12
Processo metabólico de pequenas moléculas	69	1.63E-12
Processo metabólico de ácidos graxos	20	3.11E-11
Processo metabólico de lipídeo celular	34	2.02E-10
Processo do organismo multicelular	62	4.81E-10
Processo metabólico oxoácido	35	5.35E-10
Processo metabólico de ácidos orgânicos	35	6.95E-10
Processo biossintético de lipídeos	25	9.98E-10
Regulação positiva de processo biológico	83	1.94E-09
Processo de organismo único-multicelular	60	2.14E-09
Processo metabólico de organismo único	87	2.38E-09
Resposta a químico	62	3.50E-09

5.7.2. Análise de ontologia gênica – Genes regulados negativamente

Em seguida, foram analisados os genes que estavam regulados negativamente em t=72h (Tabela S6). Primeiramente, foi feita a análise através do banco de dados KEGG, cujos resultados encontrados estão descritos na Tabela 5.11. Destaca-se o fato de que genes relacionados com adesão focal e envolvidos na regulação do citoesqueleto de actina aparecem nas três listagens. Contudo, a maioria dos genes foram detectados como regulados negativamente apenas por *ribosome profiling*. Esta técnica também permitiu verificar que 53 genes ribossomais estão regulados negativamente, assim como 9 genes relacionados com a biossíntese de RNAt (Tabela 5.11).

Tabela 5.11. Análise pelo banco de dados KEGG dos genes regulados negativamente após 72h de diferenciação adipogênica para cada uma das amostras de RNA.

Regulados negativamente somente em poliA		
Termo	Nº genes identificados	Valor de p
Junções aderentes	5	7.1E-03
Carcinoma de célula basal	4	1.7E-02
Adesão focal	6	5.0E-02
Câncer colorretal	4	5.1E-02
Regulação do citoesqueleto de actina	6	6.3E-02
Câncer endometrial	3	9.5E-02
Regulados negativamente somente em <i>ribosome profiling</i>		
Ribossomo	53	1.5E-42
Infecção patogênica por <i>Escherichia coli</i>	17	1.2E-07
Regulação do citoesqueleto de actina	34	3.6E-07
Exportação de proteína	5	7.3E-04
Adesão focal	24	1.9E-03
Biossíntese de aminoacil-RNAt	9	2.6E-03
Migração transendotelial de leucócito	16	4.3E-03
Cardiomiopatia dilatada	13	8.3E-03
Fagocitose mediada por Fc gama R	13	1.1E-02
Cardiomiopatia hipertrófica (HCM)	12	1.2E-02
Junção aderente	16	1.4E-02
Junção gap	12	1.7E-02
Infecção por <i>Vibrio cholerae</i>	9	1.7E-02
Orientação do axônio	14	4.4E-02
Metabolismo de frutose e manose	6	5.0E-02
Proteassomo	7	6.0E-02
Metabolismo do selenoaminoácido	5	6.7E-02
Via de sinalização da neurotrofina	13	6.7E-02
Spliceossomo	13	7.4E-02
Via de sinalização VEGF	9	7.9E-02
Regulados negativamente em poliA e <i>ribosome profiling</i>		
Via pentose fosfato	3	3.5E-02
Cardiomiopatia arritmogênica do ventrículo direito (ARVC)	4	6.0E-02
Junções aderentes	4	6.2E-02
Moléculas de adesão celular (CAMs)	5	6.9E-02
Biossíntese de aminoacil-RNAt	3	8.4E-02

As mesmas listas foram, então, submetidas à análise pela ferramenta GOrilla, com agrupamento por processo biológico. Para os genes regulados negativamente apenas em poliA foram encontrados 13 termos, para os identificados apenas em *ribosome profiling* foram encontrados 141 termos e para os genes que apareceram em ambas as listas foram identificados 42 termos. Os 15 termos com menor valor de p de cada uma das listas estão descritos na Tabela 5.12. Para a listagem de genes identificados como regulados negativamente em ambas as amostras de RNA, destaca-se a identificação de termos relacionados com a regulação negativa de processos biológicos, metabólitos, de fosforilação e de proliferação celular. Para os encontrados apenas em poliA, estão termos relacionados com o desenvolvimento muscular e de manutenção de CT somáticas. Para os genes regulados negativamente em *ribosome profiling*, foram identificados diversos termos relacionados à tradução. Também foram identificados termos relacionados à transcrição e ao ciclo de vida viral. Contudo, os genes relacionados a estes dois termos são, na verdade, genes ribossomais. Outro gene importante que teve regulação negativa detectada por *ribosome profiling* foi KLF2, um inibidor de adipogênese. Ao fazer o mapeamento das leituras no transcrito de KLF2, é possível verificar uma maior concentração de *footprints* ribossomais na região 3' da ORF (Figura 5.17).

Tabela 5.12. Análise pelo banco de dados GOrilla dos genes envolvidos em processos metabólicos regulados negativamente após 72h de diferenciação adipogênica para cada uma das amostras de RNA.

Regulados negativamente somente em poliA		
Termo	Nº genes identificados	Valor de p
Desenvolvimento de tecido muscular esquelético	6	1.54E-05
Desenvolvimento de tecido muscular	7	1.97E-05
Desenvolvimento de tecido	16	2.21E-05
Desenvolvimento de tecido muscular estriado	6	8.02E-05
Diferenciação celular	26	1.60E-04
Geração de neurônios	3	1.70E-04
Regulação positiva de fosforilação de peptidil-serina	5	2.59E-04
Diferenciação de leucócitos	8	3.63E-04
Desenvolvimento de célula glial	4	4.63E-04
Morfogênese embrionária de genitália	2	6.50E-04
Morfogênese embrionária da porção final do tubo digestivo	2	6.50E-04
Desmontagem do componente celular envolvido na fase de execução da apoptose	5	6.91E-04
Manutenção de CTs somáticas	4	7.24E-04
Regulados negativamente somente em <i>ribosome profiling</i>		
Elongação da tradução	54	1.53E-38
Marcação cotraducional de proteína dependente de SRP para membrana	55	1.17E-37
Transcrição viral	49	2.08E-37
Marcação cotraducional de proteína para membrana	55	4.44E-37
Marcação de proteína para retículo endoplasmático	55	4.44E-37
Ciclo de vida viral	51	5.99E-37
Estabelecimento de localização de proteína no retículo endoplasmático	55	8.51E-37
Terminação da tradução	49	1.07E-36
Desmontagem de complexo de proteína celular	52	2.51E-36
Iniciação da tradução	55	1.12E-34
Desmontagem de complexo de proteína	54	2.75E-34
Desmontagem de complexo macromolecular	55	6.12E-34
Marcação de proteína para membrana	59	2.30E-33
Tradução	72	6.51E-29
Estabelecimento de localização de proteína na membrana	61	1.06E-28
Regulados negativamente em poliA e <i>ribosome profiling</i>		
Regulação da proliferação celular	26	1.39E-05
Processo de desenvolvimento	55	2.54E-05
Regulação negativa de processo biológico	51	4.85E-05
Regulação negativa de processo metabólico de fósforo	12	7.18E-05
Regulação negativa de processo metabólico de fosfato	12	7.18E-05
Regulação negativa de processo celular	48	7.22E-05
Hidroxilação peptidil-prolina	3	7.48E-05
Morfogênese de estrutura anatômica	24	7.50E-05
Regulação de fosforilação de proteína	21	7.94E-05
Regulação de fosforilação	23	1.09E-04
Regulação negativa de fosforilação de proteína	10	1.17E-04
Regulação negativa de fosforilação	11	1.23E-04
Processo de organismo único	109	1.37E-04
Processo de desenvolvimento de organismo único	49	1.65E-04
Regulação negativa de proliferação celular	15	1.75E-04

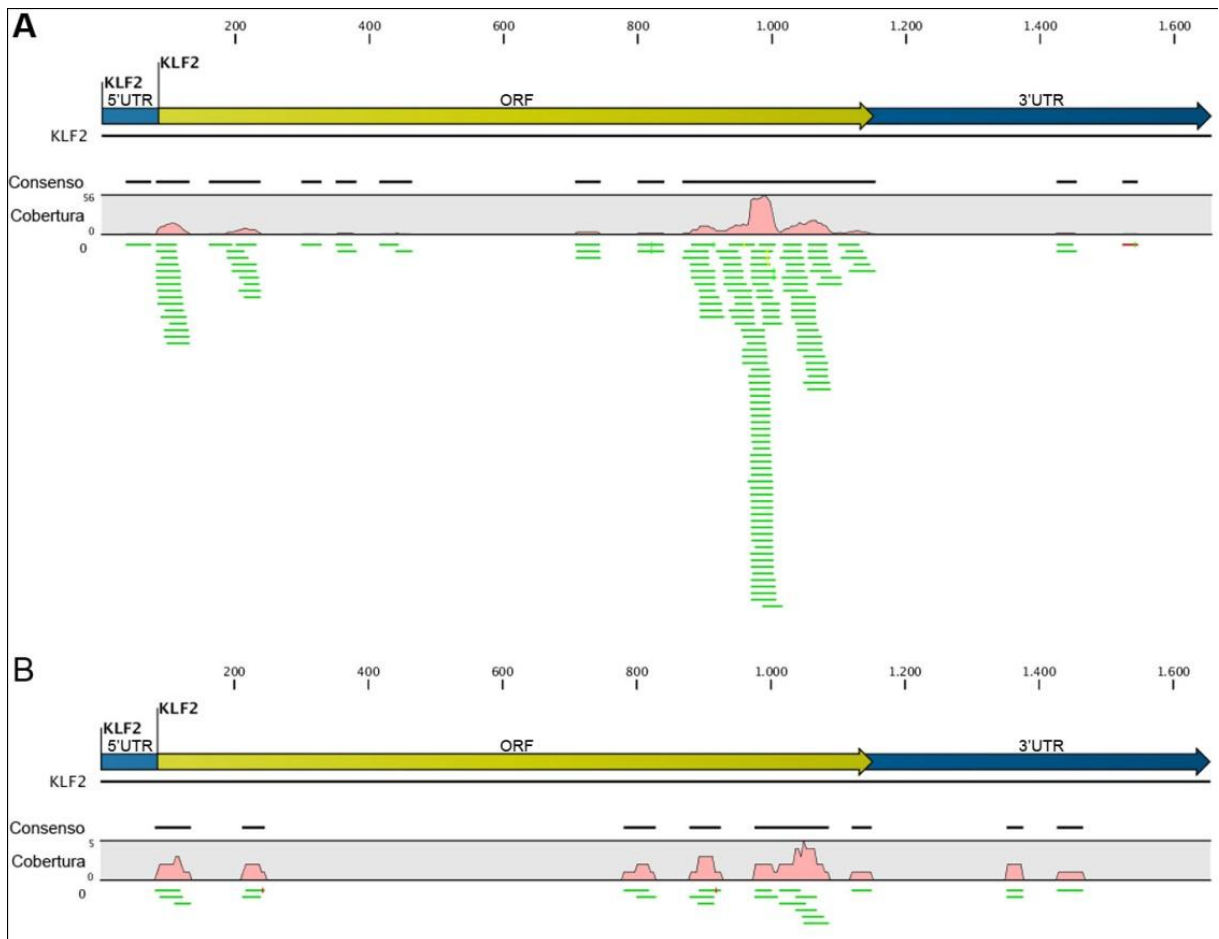


Figura 5.17. Mapeamento das *footprints* ribossomais nos transcrito de KLF2. Resultado do mapeamento das leituras obtidas por *ribosome profiling* no transcrito de KLF2 em $t=0$ (A) e em $t=72h$ (B) (TA84, réplica técnica 3). Em $t=0$, é possível observar a ocorrência de uma concentração de *footprints* ribossomais na região 5' da ORF principal, entretanto o maior número de *footprints* está localizado na região 3' da ORF. Para $t=72h$, a cobertura foi bastante baixa, reflexo da menor eficiência de tradução deste transcrito. Todavia, é possível verificar que as poucas leituras obtidas se concentram também nas regiões 5' e, principalmente, 3' da ORF principal.

5.7.3. Eficiência traducional

Em seguida, foi feita a análise de ontologia gênica dos genes que tiveram eficiência traducional reduzida ou aumentada após 72 horas de indução para diferenciação adipogênica (Tabela S4, Tabela S7). Primeiramente, foi feita análise pelo banco de dados KEGG (Tabela 5.13). Destaca-se o fato de que, nesta análise, alguns genes relacionados à adesão focal e à regulação de citoesqueleto de actina tiveram eficiência traducional aumentada. Por outro lado, 70 genes relacionados com ribossomos e 7 relacionados à biossíntese de aminoácil-RNAt tiveram a eficiência traducional reduzida.

Tabela 5.13. Análise pelo banco de dados KEGG dos genes que tiveram eficiência traducional aumentada ($\log_2 \geq 1$) ou reduzida ($\log_2 \leq -1$) após 72h de diferenciação adipogênica para cada uma das amostras de RNA.

\log_2 de eficiência traducional ≥ 1		
Termo	Nº genes identificados	Valor de p
Biossíntese de sulfato de condroitina	3	1.3E-02
Regulação do citoesqueleto de actina	6	2.8E-02
Interação ECM-receptor	4	3.0E-02
Adesão focal	5	7.7E-02
\log_2 de eficiência traducional ≤ -1		
Ribossomo	70	2.8E-87
Doença de Parkinson	16	6.7E-05
Doença de Huntington	19	1.0E-04
Fosforilação oxidativa	14	9.8E-04
Infecção patogênica por <i>Escherichia coli</i>	9	1.1E-03
Biossíntese de aminoacil-RNAt	7	3.7E-03
Doença de Alzheimer	14	7.2E-03
Proteassomo	7	7.3E-03
Metabolismo de selenoaminoácidos	4	7.0E-02

As mesmas listagens de genes foram submetidas à análise com a ferramenta GOrilla, com foco na classificação por processos biológicos (Tabela 5.14). Foram identificados 21 termos relacionados aos genes que tiveram eficiência traducional aumentada e 168 com eficiência reduzida. Os 20 termos com menor valor de p estão representados na Tabela 5.14. Dentre os termos relacionados como ativados traducionalmente, estão alguns relacionados à adesão celular e à organização da matriz extracelular. Já entre os termos com redução da eficiência traducional, estão termos relacionados com tradução. Destaca-se também o fato de que genes relacionados à via NMD também tiveram regulação negativa.

Tabela 5.14. Análise pelo banco de dados GOrilla dos genes que tiveram eficiência traducional aumentada ($\log_2 \geq 1$) ou reduzida ($\log_2 \leq -1$) após 72h de diferenciação adipogênica para cada uma das amostras de RNA.

\log_2 de eficiência traducional ≥ 1		
Termo	Nº genes identificados	Valor de p
Regulação da adesão celular	12	4.34E-07
Regulação positiva da adesão celular	8	3.15E-06
Desenvolvimento de estrutura anatômica	30	8.80E-05
Regulação negativa de ativação de complemento, via de lectina	2	9.36E-05
Regulação de ativação de complemento, via de lectina	2	9.36E-05
Adesão celular	14	1.14E-04
Adesão biológica	14	1.17E-04
Processo de desenvolvimento de organismo único	39	1.33E-04
Regulação positiva de adesão célula-sustrato	5	1.43E-04
Regulação de qualidade biológica	28	2.09E-04
Processo de desenvolvimento	41	2.15E-04
Organização de matriz extracelular	9	2.31E-04
Organização de estrutura extracelular	9	2.31E-04
Regulação negativa de despolimerização de proteína	4	3.91E-04
Regulação negativa de complexo de desmontagem de proteína	4	4.35E-04
Processo biossintético de glicosaminoglicana	5	7.02E-04
Processo biossintético de aminoglicana	5	7.47E-04
Processo metabólico de sulfato de condroitina	4	7.78E-04
Regulação de despolimerização de proteína	4	7.78E-04
Desenvolvimento de órgão	16	8.93E-04
\log_2 de eficiência traducional ≤ -1		
Elongação da tradução	72	9.08E-87
Transcrição viral	67	2.04E-86
Terminação da tradução	67	4.96E-85
Ciclo de vida viral	69	9.06E-85
Iniciação da tradução	74	8.32E-82
Desmontagem de complexo de proteína celular	68	5.20E-80
Marcação cotraducional de proteína dependente de SRP para membrana	70	2.17E-79
Marcação cotraducional de proteína para membrana	70	1.75E-78
Marcação de proteína para o retículo endoplasmático	70	1.75E-78
Estabelecimento de localização de proteína no retículo endoplasmático	70	4.83E-78
Desmontagem de complexo de proteína	69	1.38E-74
Desmontagem de complexo macromolecular	70	5.47E-74
Processo catabólico de RNAm núcleo-transcrito, NMD	69	4.97E-73
Tradução	89	3.63E-70
Marcação de proteína para membrana	70	1.72E-66
Estabelecimento de localização de proteína para membrana	72	2.38E-60
Processo catabólico de RNAm núcleo-transcrito	70	2.70E-59
Processo catabólico de RNAm	71	3.49E-59
Marcação de proteína	80	6.09E-58
Processo catabólico de RNA	73	1.03E-57

5.8. Análise por *ribosome profiling* de genes e vias regulados traducionalmente

5.8.1. Regulação das vias de sinalização de adesão focal e do citoesqueleto de actina

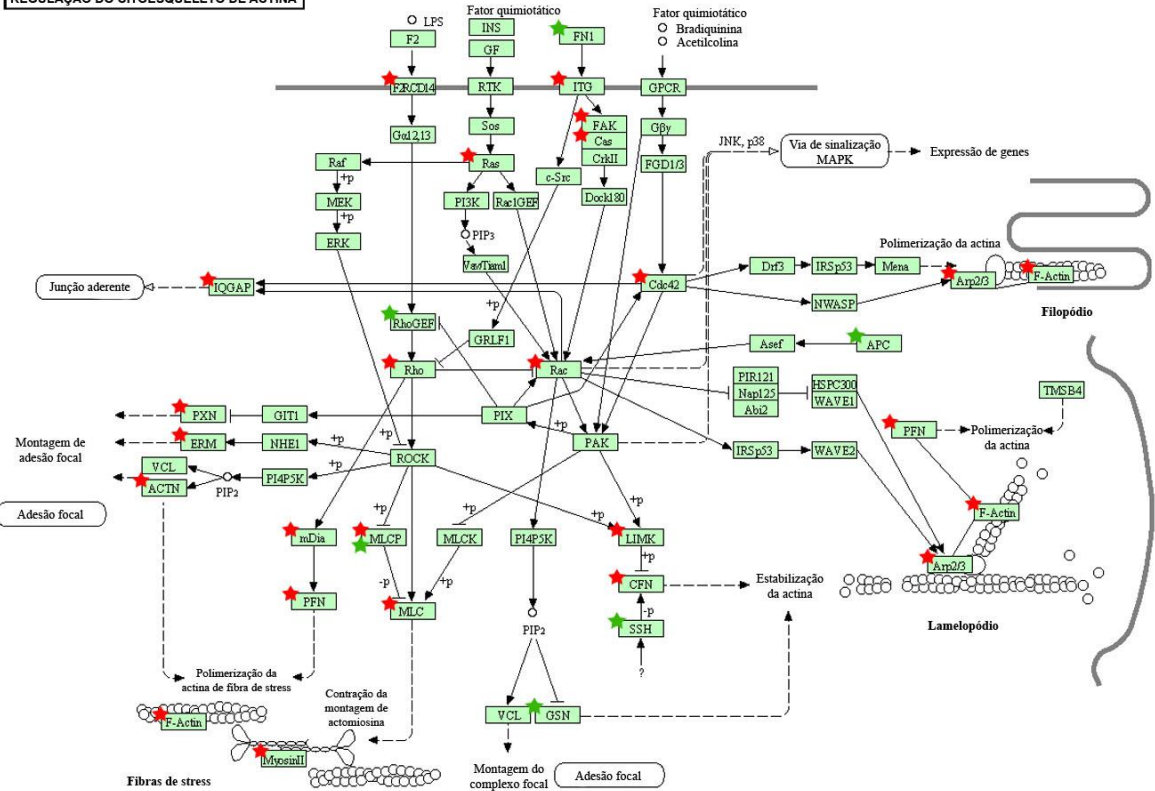
A análise de ontologia gênica revelou que dois sistemas tiveram alguns genes com regulação negativa e outros com positiva em $t=72h$: a via de sinalização de adesão focal e a de regulação do citoesqueleto de actina. Em ambos os sistemas, a maior parte dos genes apresentou regulação negativa quando foi analisada a expressão diferencial por *ribosome profiling* (Figura 5.18, marcação em vermelho). Alguns, genes, contudo, tiveram a eficiência traducional aumentada (Figura 5.18, marcação em verde).

Quanto à adesão celular, foi possível notar que os genes que tiveram a expressão reduzida estão principalmente relacionados com a sinalização interna desencadeada pela adesão focal. Dentre eles estão FAK (*focal adhesion kinase*, quinase de adesão focal) e RhoA, as quais tiveram uma queda de expressão de mais de duas vezes ($\log_2=-1,4$ e $-1,2$, respectivamente) na análise por *ribosome profiling*. Por outro lado, dentre os genes que tiveram regulação positiva (no caso, eficiência traducional aumentada) está MLCP, o qual possui efeito inibitório sobre a via de RhoA. Além disso, foi observado aumento do número de sequências identificadas de outros tipos de moléculas de adesão, como NRCAM e fibronectina 1.

Quanto à regulação do citoesqueleto de actina, é possível notar que as vias relacionadas com a polimerização de actina e formação de fibras de stress e de lamelopódios estão majoritariamente inibidas. Algumas destas vias, inclusive, estão interligadas às vias de sinalização de adesão focal (FAK e RhoA) (Figura 5.18 A, B).

A

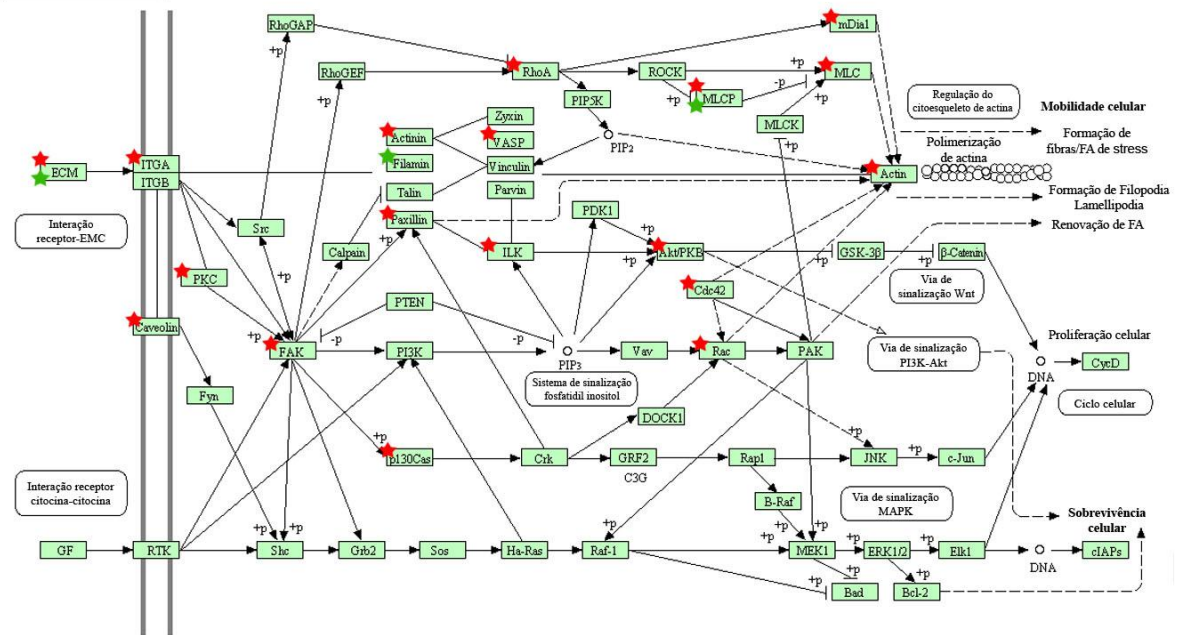
REGULAÇÃO DO CITOESQUELETO DE ACTINA



04810 8/8/13
(c) Kanehisa Laboratories

B

ADESÃO FOCAL



04510 8/8/13
(c) Kanehisa Laboratories

Figura 5.18. Regulação das vias de regulação do citoesqueleto de actina e de adesão focal em t=72h. Os esquemas representam os principais genes envolvidos na regulação do citoesqueleto de actina (A) e na via de sinalização desencadeada por adesão focal (B). As estrelas em vermelho destacam genes que tiveram regulação negativa quando foram analisados os dados de *ribosome profiling*. As estrelas em verde indicam genes que tiveram a eficiência traducional aumentada após 72 horas de indução para diferenciação adipogênica.

5.8.2. Regulação de diferentes vias e sistemas relacionados à tradução

Um dos resultados observados de maior destaque é a forte regulação negativa detectada por *ribosome profiling* de genes relacionados à tradução. Observou-se que 70 genes relacionados ao ribossomo (análise por KEGG) tiveram eficiência traducional reduzida (Figura 5.19). Destaca-se o fato de que muitos destes genes apresentaram um aumento no número de leituras detectado por poliA. Contudo, o número de *footprints* ribossomais foi reduzido. Dentre os genes que tiveram maior redução de eficiência traducional está a proteína ribossomal da subunidade maior 30 (RPL 30). O mapeamento de leituras do transcrito de RPL30 em t=0 e t=72h está representado na Figura 5.20. É possível observar a redução no número de leituras em t=72h, porém o padrão de distribuição ao longo do transcrito é bastante semelhante nas duas condições. Em ambas as condições, pode-se notar a ocorrência de uma maior concentração de *footprints* na região 5' da ORF principal, ou seja, na região de iniciação da tradução. Além dos genes ribossomais, também tiveram eficiência traducional reduzida genes relacionados à biossíntese de aminoacil-RNAt, ao processo de iniciação, alongação e terminação da atividade traducional, à marcação cotraducional para endereçamento de proteína nascente, processamento de RNAr, montagem das subunidades ribossomais, entre outros.

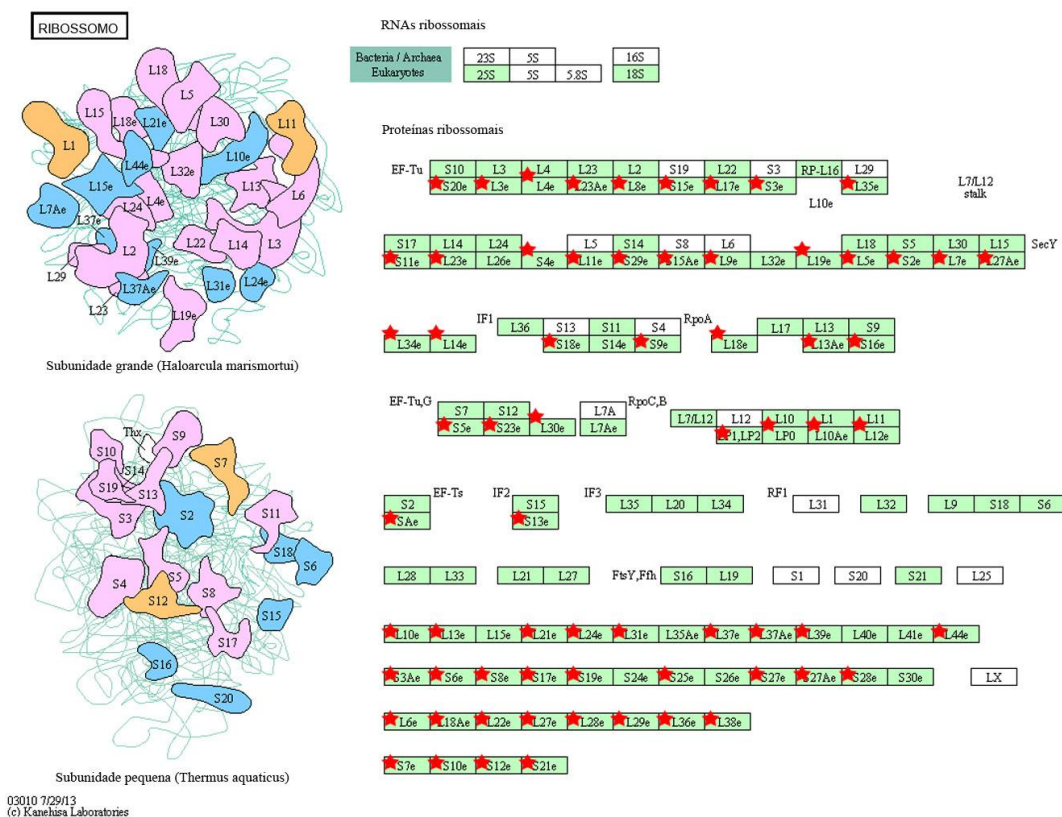


Figura 5.19. Regulação da eficiência traducional de proteínas ribossomais. Marcadas com estrela vermelha estão os genes das proteínas das subunidades ribossomais maior (*large*, L) e menor (*small*, S) que tiveram eficiência traducional reduzida após 72 horas de indução para diferenciação adipogênica.

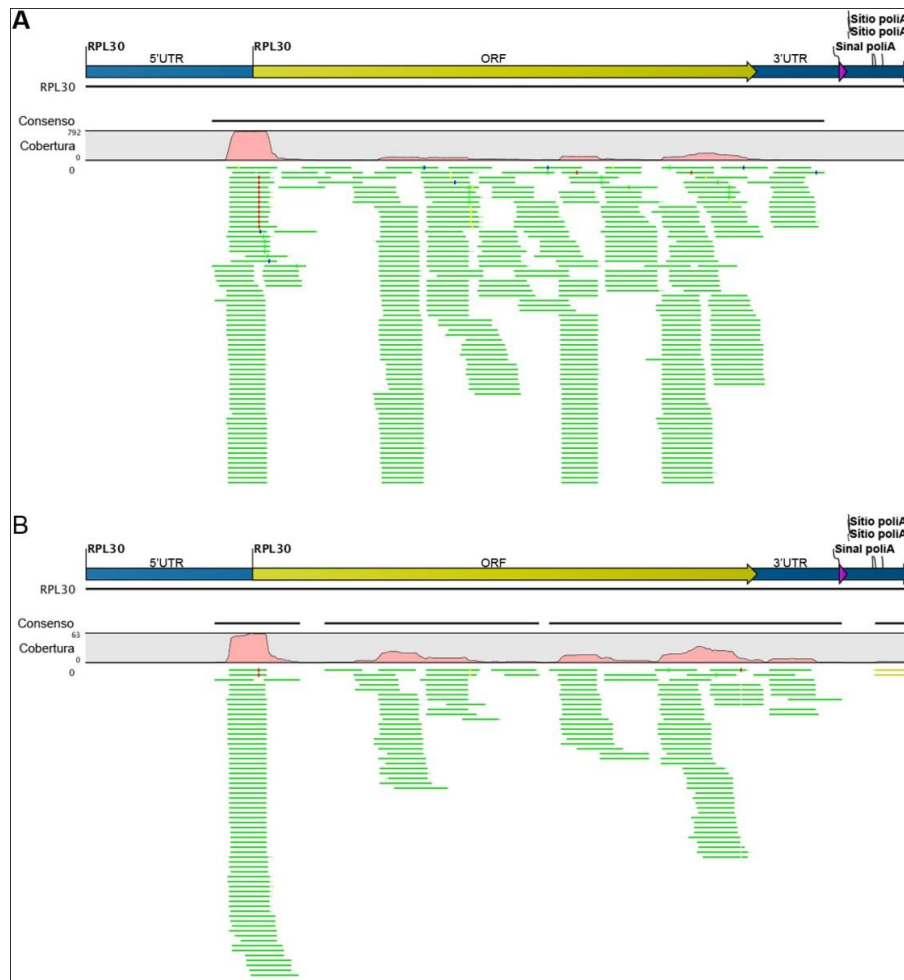


Figura 5.20. Mapeamento das *footprints* ribossomais no transcrito de RPL30. Resultado do mapeamento das leituras obtidas por *ribosome profiling* no transcrito de RPL30 em t=0 (A) e em t=72h (B) (TA86, réplica técnica 1).

5.9. Preparo de amostras para análise por proteômica

A etapa seguinte do trabalho consistiu no preparo das amostras para análise por proteômica. Para o doador TA84, foram utilizadas $4,6 \times 10^6$ células para a condição t=0 e $2,2 \times 10^6$ células para a condição t=72 horas. Ao final do protocolo, foram preparados 6 *stage-tips* para cada amostra, com 10 μg de proteína cada um. Para o doador TA85, foram utilizadas $3,5 \times 10^6$ células para a condição t=0 e $3,1 \times 10^6$ células para a amostra t=72h, sendo que, ao final, foram preparadas também 6 *stage-tips* para cada amostra, com 15 μg de proteína cada um. Já para o doador TA86, foram utilizadas $3,2 \times 10^6$ células para a condição t=0 e $2,9 \times 10^6$ células para a condição t=72 horas. Ao final do protocolo, foram preparados 6 *stage-tips* para cada amostra, com 15 μg de proteína cada um. As amostras foram armazenadas a 4° C para posterior análise por espectrometria de massa. Em uma corrida teste de 2 horas com as proteínas eluídas de um *stage-tip* (TA86 t=0), foram identificadas 467 proteínas.

6. DISCUSSÃO

6.1. Padronização do protocolo de *ribosome profiling*

A primeira fase do trabalho consistiu na adaptação e estabelecimento do protocolo de *ribosome profiling* para o estudo de CTs adultas obtidas de tecido adiposo. A primeira etapa do processo consiste na lise celular. Para isso, foram testadas quatro soluções. A solução 2 (Spangenberg *et al.*, 2013) apresentou o melhor rendimento, obtendo-se uma maior quantidade de RNA ao final do processo (Tabela 5.1). Com o uso desta solução também não foi observada mudança na viscosidade da solução (indicativo de precipitação do DNA), como ocorreu com o uso das soluções 3 e 4. No caso destas duas soluções, a mudança de viscosidade sugere que houve degradação da membrana plasmática e extravasamento do conteúdo nuclear. Isso pode estar relacionado ao fato de que estas soluções foram padronizadas para um tipo de célula bastante diferente das humanas, como é o caso do *Trypanosoma cruzi*, o qual se caracteriza por possuir um citoesqueleto subpelicular e ser bastante resistente a variações no meio ambiente onde se encontra. Ainda sobre o uso da solução 2, é importante notar que esta composição já foi utilizada no trabalho de *polysome profiling* de CTs realizado por nosso grupo (Spangenberg *et al.*, 2013). Assim, a escolha desta solução também facilita a comparação dos resultados obtidos neste trabalho com dados anteriores do grupo.

A etapa seguinte, de digestão do RNA, tem como objetivo degradar o RNA que se encontra exposto, preservando-se aquele que está protegido pelos ribossomos. Este processo foi descrito por Steitz em 1969, sendo que, neste trabalho, também foi identificado o tamanho da *footprint* deixada pelo ribossomo, que é de cerca de 30 nucleotídeos. Neste trabalho foi utilizada como nuclease a enzima Benzonase® e foram testadas diferentes concentrações e momentos de aplicação desta a fim de otimizar a obtenção dos fragmentos de 30 nucleotídeos. Quanto ao momento de aplicação foi testado o protocolo utilizado por Ingolia e colaboradores, no qual a enzima foi aplicada diretamente sobre o lisado celular, atuando sobre todo o conjunto de RNAs extraídos do citoplasma celular. Em seguida, o material digerido foi aplicado sobre um colchão de sacarose (1 M) e submetido à ultracentrifugação a fim de sedimentar os ribossomos associados ao RNA. Além de sedimentar os monossomos, este processo serve para “limpar” a amostra, sendo que parte dos restos de RNA livres, ou seja, que não estão associados aos ribossomos, fica retida na sacarose. Ao aplicar este processo, vimos que foi possível recuperar e extrair RNA e que os fragmentos de 30 nucleotídeos foram preservados (Figura 5.2 B, C). Também foi testado outro protocolo, no qual a enzima foi aplicada após a ultracentrifugação. Esta metodologia é utilizada por um grupo colaborador do

instituto para realização de *ribosome profiling* em *Trypanosoma cruzi*. Contudo, este protocolo não foi bem sucedido em CTs humanas derivadas de tecido adiposo e não foi possível recuperar RNA ao final do processo (Figura 5.2 D, E). Um dos motivos que pode ter levado a este resultado é que, através da ultracentrifugação, pouco RNA associado a complexos proteicos (inclusive polissomos) foi sedimentado, e a concentração de Benzonase® utilizada foi demasiada, levando à degradação completa da amostra. O fato de que foi utilizado um colchão de sacarose de 2 M - ou seja, duas vezes mais concentrado - pode ter dificultado a sedimentação dos complexos como os polissomos. Tendo em vista que o primeiro protocolo foi bem sucedido e que as condições utilizadas foram satisfatórias, optamos pela escolha desta metodologia. Quanto à quantidade de Benzonase® utilizada, foram testadas duas concentrações, 250 e 500 unidades da enzima para 10^6 células. Nos dois casos, foi obtida aproximadamente a mesma quantidade de RNA e optou-se, portanto, pelo uso de 250 unidades de Benzonase®. Posteriormente, passou-se a utilizar um novo lote da enzima, com menor grau de pureza e, por este motivo, optou-se por aumentar a concentração de uso desta para 375 unidades para 10^6 células.

Em seguida, a separação dos fragmentos de 30 nucleotídeos foi realizada. Primeiramente, foi testado o sistema de fracionamento flashPAGE™, o qual permite que as frações separadas por eletroforese sejam coletadas em intervalos de tempo determinados. No experimento piloto realizado, a separação por este sistema foi bem sucedida (Figura 5.3 A, B). Entretanto, ao tentar repetir o experimento, o resultado não foi satisfatório (Figura 5.3 C, D). Além disso, o produto flashPAGE™ foi descontinuado pelo fabricante. Assim, buscou-se um protocolo de eletroforese alternativo e optou-se pelo sistema utilizado por Ingolia e colaboradores (2011), de eletroforese em gel de acrilamida-ureia, excisão da banda de 30 nucleotídeos e purificação do RNA, sendo que esta metodologia foi bem sucedida (Figura 5.4).

6.2. Aplicação do protocolo de *ribosome profiling* ao estudo de CTs obtidas de tecido adiposo

Uma vez estabelecido o protocolo, este foi aplicado ao estudo do processo de diferenciação das CTs humanas derivadas de tecido adiposo após três dias de indução. O protocolo padronizado foi bem sucedido, sendo que, para cada uma das amostras, foi possível recuperar, ao final do processo, a quantidade necessária de RNA (mínimo de 100 ng) de aproximadamente 30 nucleotídeos para a realização do sequenciamento. A análise do tamanho e a quantificação dos fragmentos recuperados feitas pelo sistema Agilent 2100 Bioanalyzer revelaram que houve uma pequena variação no tamanho dos fragmentos recuperados, de 28 a 31 nucleotídeos, que será discutida posteriormente. Mas, além disso, foi

possível perceber que houve comigração de fragmentos de tamanhos diversos, como, por exemplo, com menos de 25 nucleotídeos (Figura 5.9) e com mais de 35 nucleotídeos (Figura 5.8). Parte desta contaminação pôde ser removida durante o preparo das amostras para sequenciamento, em que foi feita uma etapa de seleção dos fragmentos pelo tamanho, e também durante o *trimming* das sequências obtidas, em que foi realizada uma etapa de filtragem por tamanho (tema que também será discutido adiante).

6.2.1. Análise do sequenciamento

Para o sequenciamento, optou-se por fazer um *pool* de todas as amostras e depositá-lo em quatro lâminas completas (em média, 500 milhões de *beads* por lâmina). Isso foi feito para minimizar a variabilidade na manipulação das réplicas biológicas e do processo de sequenciamento (réplicas técnicas). Após o sequenciamento, constatou-se que foi obtido o número de leituras esperado para cada amostra, com cerca de 60 milhões de leituras para cada uma das amostras de poliA e 170 milhões para cada uma das de *ribosome profiling*. Conforme descrito anteriormente, em uma das lâminas houve um problema na identificação de duas ligações e este material foi desconsiderado nesta primeira análise.

Na primeira etapa de *trimming*, em que foi feita a retirada dos adaptadores, constatou-se que estes foram identificados em cerca de 15% das sequências de poliA e em cerca de 30% das de *ribosome profiling*. É importante lembrar que os fragmentos de RNA poliA utilizados possuíam entre 150 a 200 nucleotídeos. Como foram sequenciados apenas 50 nucleotídeos, este percentual de sequências nas quais o adaptador foi identificado provavelmente corresponde a sequências sem inserto, por exemplo, dímeros de adaptadores. Já os fragmentos de *ribosome profiling* possuíam cerca de 30 nucleotídeos. Portanto, esperava-se que o sequenciamento chegasse aos adaptadores. Entretanto, estes foram identificados em apenas 30% das sequências. Isso, em parte, pode ser devido à presença de sequências sem adaptador. Mas também é possível que isso se deva a uma queda na qualidade da leitura da sequência. Uma das características do sistema SOLiD™ é uma diminuição gradual na precisão do sequenciamento ao longo dos ciclos. Assim, enquanto as primeiras bases são precisamente determinadas, as posições finais não têm uma boa leitura, aumentando a chance de erro. Isso é agravado pelo fato de que o sistema de decodificação depende da informação de duas cores consecutivas. Assim, o erro na identificação em um fluorocromo leva à decodificação errônea de todas as posições subsequentes. Como os adaptadores estão localizados na região final das sequências, é possível que estes não sejam identificados devido a erros no sequenciamento. Por isso, a etapa seguinte de *trimming* por qualidade é bastante importante, pois permite a

remoção dos fragmentos de sequência com baixa qualidade. Pôde-se notar que, em média, 90% das sequências sofreram *trimming* por qualidade tanto nas amostras de poliA quanto nas de *ribosome profiling*. A filtragem por tamanho também auxilia na remoção de sequências em que os adaptadores não foram removidos e que, portanto, ficaram com tamanho maior do que o esperado.

Ao final deste processo, observou-se que, para as amostras de poliA, entre 65% e 70% das sequências iniciais passaram pelo *trimming*. Este percentual condiz com o fato de que 15% das sequências aparentemente não possuíam inserto e, portanto, foram descartadas, além das perdas por filtragem de tamanho e qualidade. Já para as de *ribosome profiling*, em média, apenas 30% das sequências passaram pelo *trimming*. Neste caso, isso pode estar relacionado a perdas durante o *trimming* de qualidade e também devido à dificuldade de detecção dos adaptadores abordada anteriormente. Como muitos adaptadores não foram reconhecidos e, portanto, não foram removidos das sequências, estas ficaram com um tamanho maior do que o esperado e, portanto, foram eliminadas na filtragem por tamanho. Após a conclusão do *trimming*, foi possível perceber que as sequências selecionadas possuíam qualidade com valor PHRED entre 20 e 30 (maioria próximo a 30), o que significa uma precisão de 99% a 99,9%.

6.2.2. Footprints ribossomais de CTs humanas obtidas de tecido adiposo

Durante a aplicação do protocolo de *ribosome profiling*, após a separação por eletroforese e recuperação do RNA digerido por endonuclease, foi feita análise do tamanho dos fragmentos obtidos. Observou-se que houve uma pequena variação de tamanho das sequências, entre 28 e 31 nucleotídeos (Figuras 5.7, 5.8 e 5.9). Esta variação pode estar relacionada a um grau de imprecisão do sistema na detecção (Agilent 2100 Bioanalyzer) de diferenças de tamanho de poucos nucleotídeos. Além disso, em ambos os trabalhos publicados em 2009 e 2011, Ingolia e colaboradores descreveram que há sim uma pequena variação no tamanho das *footprints* ribossomais sequenciadas. No estudo realizado em 2009, a partir de células de levedura, foi observado que as sequências obtidas a partir de *ribosome profiling* tinham de 22 a 31 nucleotídeos, sendo que a maior parte tinha entre 28 e 30 nucleotídeos (Ingolia *et al.*, 2009). Já no trabalho publicado em 2011, em que foram utilizadas CTs embrionárias de camundongo, os fragmentos sequenciados tinham entre 27 e 34 nt, sendo que a maior parte tinha entre 30 e 32 nucleotídeos (Ingolia *et al.*, 2011). Assim, pode-se notar que, além de haver uma pequena faixa de variação entre as *footprints* obtidas a partir de um mesmo experimento, houve também certa variação entre as *footprints* obtidas de espécies diferentes. Em trabalho de *ribosome profiling* de mitocôndrias de fibroblastos humanos,

observou-se que havia também uma variação no tamanho das *footprints* obtidas, com uma distribuição bimodal com picos em 27 e 33 nucleotídeos (Rooijers *et al.*, 2013). Já quando o protocolo de *ribosome profiling* foi aplicado em células de *Arabidopsis thaliana*, foram obtidos fragmentos de RNA de 27 a 34 nucleotídeos, sendo que a maioria possuía entre 30 e 32 nucleotídeos (Juntawong *et al.*, 2014).

Após o sequenciamento das amostras e a realização do *trimming*, obteve-se uma faixa de tamanho de sequências entre 25 e 40 nucleotídeos. A presença de sequências menores do que o esperado pode estar relacionada à remoção de extremidades de sequências com baixa qualidade. Por outro lado, a ocorrência de sequências com tamanho acima do esperado pode estar relacionada à dificuldade de remoção de adaptadores abordada anteriormente. Assim, é possível que alguns adaptadores não tenham sido propriamente removidos e, por isso, os fragmentos ficaram com tamanho acima do esperado. Além disso, a variabilidade no tamanho pode estar relacionada também ao fato de que, conforme discutido anteriormente, foi observada comigração de moléculas com tamanho diferente do esperado após o isolamento dos fragmentos correspondentes às *footprints* ribossomais, como, por exemplo, com menos de 25 nucleotídeos (Figura 5.9) e com mais de 35 nucleotídeos (Figura 5.8), que não foram propriamente removidas pelos processos subsequentes de seleção por tamanho.

6.2.3. Contaminação com RNAr

O alinhamento das sequências obtidas contra um banco de dados de RNAr revelou que, nas amostras de poliA, houve uma contaminação média de 7,5% com este tipo de molécula. Já nas amostras de *ribosome profiling*, este percentual subiu para cerca de 75% (Tabela 5.6). Este resultado é compatível com outros trabalhos que utilizaram esta técnica (Ingolia *et al.*, 2009; Rooijers *et al.*, 2013; Vasquez *et al.*, 2014). O ribossomo é formado por uma estrutura que contém muitos quilobases de RNAr e protege apenas um fragmento de cerca de 30 nucleotídeos de RNAm (Ingolia *et al.*, 2012). Como a nuclease atua sobre todas as moléculas de RNA, não é de se surpreender que a contaminação com RNAr seja tão expressiva nestas amostras. Para reduzir a contaminação por RNAr, alguns grupos utilizaram como estratégia o uso de um sistema para depleção de RNAr após a digestão com a nuclease (Ingolia *et al.*, 2011; Dunn *et al.*, 2013; Juntawong *et al.*, 2014). Esta estratégia é interessante, pois reduz a contaminação antes do sequenciamento, aumentando assim o percentual de sequências de interesse obtidas. Assim, ao adotar esta técnica, consegue-se uma boa cobertura de genes com um menor número de lâminas a serem sequenciadas. Contudo, o protocolo para

depleção de RNAr em experimentos de *ribosome profiling* exige o desenho de oligonucleotídeos especiais que cubram toda a extensão da molécula ou, pelo menos, das regiões que se encontram mais expostas ou suscetíveis ao ataque da nuclease, uma vez que o RNAr também é fragmentado pela ação da enzima (Ingolia *et al.*, 2012). Além disso, a depleção de RNAr leva a perdas significativas da amostra, não sendo uma estratégia interessante no caso de utilização de amostras raras. Outros grupos, por sua vez, optaram pelo sequenciamento de toda a amostra digerida (e selecionada por tamanho) e subtração da contaminação por alinhamento de bancos de dados de RNAr (Ingolia *et al.*, 2009; Rooijers *et al.*, 2013). No presente trabalho, optou-se por esta segunda estratégia, tendo em vista que as CTs se caracterizam por possuírem baixo nível de atividade traducional, o que pode ser percebido pelo perfil polissomal. Este perfil com poucos complexos polissomais se mantém nos primeiros dias de diferenciação (Spangenberg *et al.*, 2013). Isto dificulta a obtenção de RNA protegido por ribossomos, sendo necessário o uso de uma grande quantidade de células. Esta informação é compatível com o que foi observado na preparação deste trabalho, em que foi necessária a utilização de, em média, $5 \text{ a } 8 \times 10^6$ células de cada amostra para obtenção de, pelo menos, 100 ng de RNA de 30 nucleotídeos, quantidade mínima recomendada para realização do protocolo de sequenciamento.

6.2.4. Mapeamento contra RNAm

O passo seguinte do trabalho consistiu no mapeamento das sequências selecionadas contra um banco de dados de RNAm. Foi possível observar que, para as amostras de poliA, obteve-se uma média de mapeamento de 40 a 50%. Já para as amostras de *ribosome profiling*, este percentual foi de 5% a 15% (Tabela 5.7). É importante lembrar que este percentual se refere à quantidade de sequências mapeadas contra RNAm em relação ao número total de sequências selecionadas após o *trimming*. Assim, o percentual mais baixo de mapeamento das sequências de *ribosome profiling* se deve à presença massiva de RNAr nestas amostras, conforme discutido anteriormente. Além disso, não foi realizada a filtragem de RNA transportador, outro importante contaminante de amostras de RNA (Ingolia *et al.*, 2012). Esta estratégia de mapeamento também não permite identificar a presença de outros tipos de RNA não codificantes. Ao comparar as condições t=0 e t=72h, destaca-se o fato de que o percentual de mapeamento foi mais baixo nas amostras submetidas à indução para diferenciação. Em especial nas amostras de *ribosome profiling*, o percentual de mapeamento em t=72h foi menos da metade do observado em t=0. Isso pode estar relacionado a variações na manipulação e qualidade das amostras, mas também a um

fenômeno biológico, como uma menor atividade traducional após este período de indução para diferenciação, um tópico que será discutido mais adiante. Apesar da baixa quantidade de sequências mapeadas, foi possível identificar mais de 8.000 transcritos a partir das amostras de *ribosome profiling* e mais de 17.000 a partir de poliA. Este número reflete o fato de que as sequências selecionadas possuíam boa qualidade. Todavia, é preciso destacar que, dentre os critérios de filtragem, foram descartados apenas os transcritos que possuíam menos de 30 leituras. Assim, seria interessante fazer um novo sequenciamento das amostras de *ribosome profiling*, a fim de aumentar a cobertura, melhorar o mapeamento e os critérios de filtragem, o que daria maior solidez aos dados obtidos.

Ao comparar o mapeamento das sequências obtidas pelas duas amostras de RNA, é possível verificar que, enquanto as leituras de poliA se distribuem ao longo de todo o transcrito (no caso, foi utilizado como exemplo o transcrito da actina B), as de *ribosome profiling* se concentram na região correspondente à ORF. O acúmulo de *footprints* observadas na região 5' da ORF sugere que, no processo de iniciação da tradução, a velocidade ribossomal é mais lenta. Este resultado também foi observado por Ingolia e colaboradores na maioria dos transcritos e pode estar relacionado a uma menor velocidade de síntese no início da tradução, como também a terminações prematuras da tradução (Ingolia *et al.*, 2009).

A partir da lista de transcritos, foi obtida uma listagem dos genes identificados, com o objetivo de fazer, primeiramente, uma avaliação geral dos genes expressos, sem considerar as possíveis variantes e polimorfismos de transcritos. Ao comparar as listas obtidas a partir das diferentes amostras de RNA, verificou-se que quase a totalidade dos genes identificados por *ribosome profiling* também foram encontrados na análise do RNA poliA. Este resultado é coerente com o fato de que os fragmentos de RNAm associados a ribossomos, identificados por *ribosome profiling*, também fazem parte do *pool* de RNA poliA da célula. Acredita-se que o fato de alguns genes terem sido identificados apenas em *ribosome profiling* se deva a uma cobertura insuficiente de leituras ou mesmo a erros de sequenciamento. Por outro lado, destaca-se o fato de que mais de 40% dos genes encontrados em poliA não foram identificados por *ribosome profiling*. Este resultado sugere que estas sequências não estariam associadas a ribossomos e, portanto, não estariam sendo traduzidas. É preciso levar em consideração o fato de que a cobertura obtida a partir dos experimentos de *ribosome profiling* foi menor e, portanto, alguns destes genes não tenham sido identificados nestas amostras devido à baixa profundidade de sequenciamento. Mas, há de se destacar que trabalhos anteriores já demonstraram que, de fato, o RNAm está sujeito a uma complexa rede de regulação pós-transcricional e, portanto, muitos dos transcritos não

se associam a polissomos e não são traduzidos em proteínas (Tian *et al.*, 2004; Schwanhäusser *et al.*, 2011; Spangenberg *et al.*, 2013). Mesmo assim, conforme discutido anteriormente, seria interessante aumentar a cobertura do sequenciamento, a fim de confirmar estes resultados.

Através da comparação dos genes identificados para cada uma das condições biológicas (t=0 e t=72h) em cada uma das amostras, foi possível fazer uma avaliação de expressão diferencial. É importante destacar que esta primeira avaliação foi qualitativa, considerando-se apenas a presença ou ausência de um gene ou transcrito em cada condição. A partir das amostras de RNA poliA, observou-se uma expressão diferencial (qualitativa) de 9% de genes entre as condições t=0 e t=72h. Entretanto, quando foram analisados os dados de *ribosome profiling*, a expressão diferencial foi de 23% entre os genes. Este resultado sugere que o protocolo de *ribosome profiling* se mostrou mais sensível à mudança de expressão gênica após a diferenciação adipogênica.

Ao ser considerado o *fold change*, ou seja, ao considerar não apenas qualitativamente, mas também quantitativamente a mudança de expressão de um transcrito ou gene, tornou-se ainda mais evidente a sensibilidade da técnica. Neste caso, mais de 50% dos genes diferencialmente expressos foram identificados apenas por *ribosome profiling*. Todavia, 15% a 25% apareceram com expressão diferencial apenas nas análises de poliA e não em *ribosome profiling*. Isso pode se dever ao fato de a cobertura das amostras de *ribosome profiling* ter sido menor e estas sequências não terem sido identificadas. Mas também é possível que alguns destes genes estejam submetidos a mecanismos compensatórios de regulação pós-transcricional que levem a uma mesma taxa de tradução apesar da presença de uma quantidade de transcritos diferente. Em trabalho anterior desenvolvido por nosso grupo, observou-se que, durante a diferenciação adipogênica de CTs adultas, alguns genes apresentaram mudança nos níveis gerais de RNAm na célula, contudo, ao analisar a fração polissomal, não houve alterações significativas (Spangenberg *et al.*, 2013). McManus e colaboradores, por sua vez, ao utilizarem a técnica de *ribosome profiling* para comparar a abundância transcricional e a eficiência traducional entre duas espécies de levedura (*Saccharomyces cerevisiae* e *S. paradoxus*), constataram que muitos transcritos que tiveram aumento no nível de transcritos, apresentavam redução no nível traducional. Da mesma forma, outras moléculas de RNAm apresentaram menor quantidade de transcritos, tiveram eficiência traducional aumentada. Neste trabalho, os autores sugerem que a regulação pós-transcricional poderia exercer um efeito tampão sobre a expressão gênica divergente em leveduras (McManus *et al.*, 2014).

6.3. Análise da regulação da expressão gênica por *ribosome profiling*

6.3.1. Diferenciação adipogênica de CTs obtidas de tecido adiposo

A fim de confirmar a capacidade de diferenciação adipogênica das células isoladas dos três pacientes utilizados neste trabalho, foi feito um controle de indução de diferenciação por 14 dias. A marcação com vermelho Nilo revelou que, em média, 40% a 50% das células se diferenciaram em adipócitos durante este período. Este percentual de diferenciação pode estar relacionado à presença de células com menor potencialidade na população isolada. Estudos anteriores descreveram que, de fato, as CTs derivadas de tecido adiposo constituem uma população heterogênea (Baer e Geiger, 2012). Esta heterogeneidade na população celular analisada deve ser levada em consideração nas análises, uma vez que acrescentam ruído aos resultados obtidos.

Mas, tendo em vista que o objetivo deste trabalho foi analisar os mecanismos de regulação da expressão gênica nos primeiros dias de diferenciação, os experimentos de *ribosome profiling* foram realizados após três dias de indução. Trabalhos anteriores já demonstraram que este parece ser o tempo mínimo para o comprometimento das células com a linhagem adipogênica (Spangenberg *et al.*, 2013). Em nossos experimentos, foi possível perceber que, após 72 horas de indução, morfologicamente, as células não apresentavam fenótipo de adipócitos, também corroborando resultados anteriores. Contudo, a análise molecular permitiu confirmar que as principais vias relacionadas à adipogênese, como a de PPAR e as de metabolismo de lipídeos (Pittenger *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 2007; Spangenberg *et al.*, 2013), já estavam ativadas (Tabela 5.9; Figura 5.16). Além disso, também foi detectado um aumento na taxa de expressão de FKBP5, uma molécula envolvida na modulação de resposta de receptores hormonais e de fatores de transcrição, que já foi caracterizada como regulada positivamente durante a diferenciação de CTs de origem mesodermal em diferentes linhagens celulares (osteogênica, condrogênica e adipogênica) (Liu *et al.*, 2007). FKBP5 teve aumento na taxa de expressão detectado em ambas as amostras de RNA, contudo por *ribosome profiling* foi verificado um aumento maior. Isso sugere que o processo de expressão de FKBP5 pode estar sujeito a mecanismos de regulação aditivos tanto em nível transcricional quanto pós-transcricional e traducional. Porém, KLF2, um inibidor de adipogênese, teve regulação negativa detectada por *ribosome profiling* após a indução para diferenciação. É interessante notar que KLF2 tem sua regulação mediada por SMD, cuja eficiência depende da ocorrência de um evento de terminação de tradução (Cho *et al.*, 2012). Ao mapear as sequências obtidas por *ribosome profiling*, foi possível observar uma maior concentração de

footprints ribossomais na região de terminação traducional, próximo à extremidade 3' da ORF principal (Figura 5.17). Isso indica uma menor velocidade de tradução nesta região, um evento que pode ser importante para que ocorra o recrutamento da maquinaria de degradação do sistema de decaimento SMD.

6.3.2. Indução para diferenciação adipogênica leva à regulação do citoesqueleto de actina e de adesão celular

A partir da aplicação da técnica de *ribosome profiling* verificou-se também que genes relacionados à regulação da estrutura do citoesqueleto de actina e de adesão celular tiveram uma redução do número de leituras após a indução para diferenciação adipogênica. Isso sugere que estes genes estariam menos associados a ribossomos e, portanto, teriam uma menor taxa traducional. Estudos anteriores já demonstraram que a interação mecânica das CTs com o meio ambiente tem papel importante na determinação do destino celular. A via de sinalização desencadeada pela formação de adesões focais (FAK), por exemplo, é capaz de estimular a diferenciação osteogênica e inibir a adipogênica de CTs de origem mesodermal (Salasznyk *et al.*, 2007; Sen *et al.*, 2008). A ativação da via de sinalização de FAK leva à inibição de GSK3 β por AKT/PKB e à manutenção de β catenina, favorecendo a osteogênese e prejudicando a adipogênese (Sen *et al.*, 2008; Sen *et al.*, 2011). Além disso, a ativação de FAK leva à ativação de RhoA, o que também estimula o desenvolvimento osteogênico e inibe a diferenciação em adipócitos (McBeath *et al.*, 2004). Os resultados de *ribosome profiling* demonstraram justamente que houve uma redução na expressão de vários elementos desta via de sinalização, dentre os quais AKT/PKB e RhoA e aumento de expressão de elementos inibitórios, como MLCP, o que favoreceria a adipogênese. Esta mudança de expressão de proteínas relacionadas à regulação do citoesqueleto de actina não havia sido detectada no trabalho anterior desenvolvido por nosso grupo, em que foi utilizada a técnica de *polysome profiling* para analisar a diferenciação adipogênica de CTs derivadas de tecido adiposo (Spangenberg *et al.*, 2013). Isso pode estar relacionado a uma diferença cobertura de sequenciamento ou por características intrínsecas das técnicas utilizadas. Conforme descrito anteriormente, a técnica de *polysome profiling* não permite a identificação de diferenças na taxa de tradução de transcritos e também está sujeita à cossedimentação de outros complexos proteicos junto à fração polissomal (Holetz *et al.*, 2007; Ingolia, 2014).

Em contrapartida à redução das adesões focais, houve um aumento na expressão de outros genes relacionados à adesão e à reestruturação da matriz extracelular (Tabela 5.14), tal qual NRCAM, a qual já foi descrita como tendo papel importante para a capacidade de

diferenciação adipogênica de CTs. Além de atuar na adesão celular, NRCAM também parece ser importante para ativação da via de insulina (um dos químicos utilizados na indução da diferenciação adipogênica), uma vez que células NRCAM^{-/-} mostraram-se resistentes à insulina (Yang *et al.*, 2011).

Diretamente relacionada à sinalização envolvida e desencadeada por adesões focais, está a regulação do citoesqueleto de actina. O citoesqueleto funciona como base para inúmeras funções celulares como migração e divisão. Além disso, ele funciona como uma via transdutora de sinais, transformando estímulos mecânicos em sinalização intracelular. Estudos realizados com CTs demonstraram que a alteração da atividade de polimerização/despolimerização de actina afeta sua capacidade de diferenciação. O uso de drogas que provocam a despolimerização de actina levam a uma redução da capacidade de diferenciação osteogênica e aumento da capacidade adipogênica (Müller *et al.*, 2013; Sonowal *et al.*, 2013). Os resultados obtidos por *ribosome profiling* demonstraram de forma muito clara que há uma inibição das vias envolvidas na polimerização do citoesqueleto de actina após a indução para diferenciação adipogênica. Assim, os resultados sugerem que a regulação das vias de adesão celular e de manutenção do citoesqueleto de actina é um passo importante para garantir o comprometimento das CTs derivadas de tecido adiposo com uma determinada linhagem celular (no caso, adipogênica) e na inibição de outros caminhos de diferenciação (por exemplo, osteogênese) e que estes sistemas estariam sendo regulados principalmente em nível pós-transcricional e traducional, uma vez que foram detectados majoritariamente por *ribosome profiling*.

A menor expressão de genes relacionados à polimerização de actina também pode ser relacionada com a mudança de morfologia celular observada após 72 horas de indução para diferenciação (Figura 5.5). Apesar de não serem verificadas mudanças que caracterizem a formação de adipócitos, é possível observar que houve redução do citoplasma, com as células menos espalhadas. Em trabalhos anteriores, as mudanças de morfologia celular já foram detectadas como importantes para modular a capacidade de diferenciação, sendo que uma conformação mais arredondada favoreceria o processo de adipogênese (McBeath *et al.*, 2004).

6.3.3. Após 72 horas de indução para diferenciação adipogênica células apresentam queda na eficiência traducional de genes relacionados à tradução

Em trabalho publicado em 2008, Sampath e colaboradores verificaram um aumento global na atividade traducional durante o processo de diferenciação de CTs murinas em corpos embrióides, com enriquecimento do perfil polissomal (Sampath *et al.*, 2008). Já Ingolia e colaboradores, ao utilizar a técnica de *ribosome profiling* neste mesmo modelo de

estudo, observaram um modesto aumento de eficiência traducional de proteínas ribossomais nos experimentos realizados em pontos iniciais de diferenciação (36 horas após a retirada do fator inibidor de leucemia, o qual mantém as CTs embrionárias em um estado indiferenciado, do meio de cultivo), sendo que, em pontos mais tardios (8 dias após a retirada do fator inibidor de leucemia), foi detectada forte repressão (queda de 3 a 4 vezes na eficiência traducional) destes genes. Segundo os autores, o aumento inicial da expressão de genes ribossomais poderia levar a um excesso de ribossomos na célula, o que poderia ser compensado com uma redução na eficiência na síntese destas proteínas mais tardiamente. Neste trabalho foi observado também um modesto aumento na eficiência traducional de genes relacionados com a síntese de proteínas integrais de membrana (Ingolia *et al.*, 2011). Entretanto, é importante notar que ambos os trabalhos foram desenvolvidos com CTs embrionárias. Já em trabalho anterior desenvolvido por nosso grupo, não foi observado nenhum enriquecimento no perfil polissomal de CT adultas derivadas de tecido adiposo durante a diferenciação adipogênica. Através da técnica de *polysome profiling*, também não foram detectadas mudanças significativas na expressão de genes de proteínas ribossomais (Spangenberg *et al.*, 2013).

Por outro lado, no presente trabalho, foi observada uma redução geral nas vias relacionadas com a síntese proteica, inclusive dos sistemas de endereçamento de proteínas para o sistema de endomembranas. Setenta genes ribossomais apresentaram queda na eficiência traducional em $t=72h$. Cabe destacar que, ao analisar os níveis de expressão em poliA, muitos destes genes tiveram aumento no número de leituras. Assim, este resultado sugere que estes genes sofrem maior regulação em nível traducional. Ao analisar as *footprints* ribossomais obtidas para o RNAm da proteína RPL30 antes e após a indução para diferenciação, observa-se uma queda significativa no número de leituras, porém o padrão geral de distribuição é o mesmo. Assim, como no caso da actina B, também foi possível notar um acúmulo de leituras na região 5' da ORF, o que pode estar relacionado a uma menor velocidade de tradução durante a iniciação.

O fato de que esta mudança de expressão de proteínas ribossomais não foi detectada em trabalho anterior desenvolvido pelo grupo no mesmo modelo de estudo pode estar relacionado a diferenças na cobertura de sequenciamento ou por características distintas das técnicas utilizadas, conforme discutido anteriormente. Cabe destacar que, no presente trabalho, além dos genes ribossomais, também foi detectada repressão traducional de outros genes relacionados com a síntese de proteínas, como de biossíntese de aminoacil-RNAt, processo de iniciação, alongação e terminação da atividade traducional, marcação cotraducional para endereçamento de proteína nascente, processamento de RNAr, montagem

das subunidades ribossomais, entre outros. Além disso, de maneira geral, foi obtido um menor percentual de *footprints* ribossomais nas amostras induzidas para diferenciação adipogênica: em t=0, cerca de 15% das sequências selecionadas após o *trimming* mapearam contra RNAm, enquanto que, em t=72h, esse percentual foi de 5% (Tabela 5.7). É possível que isso esteja relacionado a uma menor atividade traducional da célula após este período de indução para diferenciação adipogênica.

Contudo, uma análise mais completa da atividade traducional é fundamental para compreender como esta atividade está regulada durante o processo de diferenciação em CTs adultas humanas. Ensaio funcionais de incorporação de aminoácidos marcados poderão trazer informações sobre a atividade traducional durante as primeiras 72 horas de diferenciação. Além disso, é preciso fazer uma análise mais detalhada dos dados obtidos pela técnica de *ribosome profiling*, a fim de verificar outros efeitos gerais na regulação da expressão gênica. Trabalhos anteriores já demonstraram, por exemplo, que a redução na síntese de proteínas ribossomais em células HeLa leva à desmontagem de complexos de repressão por microRNAs, levando a um aumento da tradução de RNAm regulados por este sistema em comparação com os não regulados (Janas *et al.*, 2012). Assim, seria interessante verificar se este efeito também pode ser visualizado no modelo de estudo aqui utilizado.

Os resultados obtidos no presente trabalho reforçam as evidências de que os mecanismos de regulação pós-transcricionais e traducionais têm um papel muito importante na regulação da expressão gênica. Isso corrobora dados anteriores obtidos pelo grupo em que foi feita a análise da diferenciação de CTs derivadas de tecido adiposo humano através da técnica de *polysome profiling*. Cabe destacar que a técnica de *ribosome profiling* permitiu obter informações mais detalhadas de como estes fenômenos podem estar acontecendo. Por outro lado, conforme discutido anteriormente, foram observados alguns resultados diferentes entre os dois trabalhos, como é o caso da regulação do citoesqueleto de actina e da expressão de genes ribossomais nas durante a diferenciação e que deverão ser analisados em maior detalhe. É preciso destacar que, até o momento, foi feita uma análise primária dos resultados, a fim de se obter uma visão geral de como se dá a regulação da expressão gênica em CTs adultas derivadas de tecido adiposo humano. Portanto, ainda é necessário realizar uma análise mais profunda dos dados obtidos por *ribosome profiling* e desenvolver experimentos complementares a fim de confirmar os resultados obtidos. Uma análise por imunofluorescência da organização do citoesqueleto de actina e das adesões focais antes e após a indução para adipogênese, por exemplo, seria interessante para verificar o comportamento destas estruturas durante a diferenciação. Além disso, conforme discutido anteriormente, a realização de ensaios funcionais a fim de medir o nível de atividade

traducional ao longo do processo de diferenciação seria importante para verificação dos possíveis efeitos causados pela redução da eficiência traducional de proteínas ribossomais constatada por *ribosome profiling*. Ao comparar os resultados obtidos por RNA-seq de poliA e de *ribosome profiling* com os dados de proteômica, também será possível verificar ainda o grau de correlação que cada uma destas técnicas tem com o conteúdo de proteínas da célula.

7. CONCLUSÕES

- Foi possível estabelecer um protocolo de *ribosome profiling* para o estudo de CTs obtidas de tecido adiposo humano;
- Através da aplicação do protocolo de *ribosome profiling* estabelecido, foi possível isolar fragmentos de RNA de 28 a 31 nucleotídeos, tamanho que corresponde à região protegida pelos ribossomos após digestão por nuclease;
- A aplicação da técnica de *ribosome profiling* se mostrou mais sensível à expressão diferencial em CTs obtidas de tecido adiposo induzidas para adipogênese;
- Os resultados obtidos sugerem que mais de 75% dos genes estariam submetidos a algum tipo de regulação em nível traducional;
- As CTs obtidas de tecido adiposo humano, após 72 horas de indução para diferenciação adipogênica, não apresentaram modificações morfológicas significativas, contudo, em nível molecular, vias relacionadas à diferenciação adipogênica e ao metabolismo de lipídeos já estavam ativas;
- As CTs obtidas de tecido adiposo humano, após 72 horas de indução para diferenciação adipogênica, apresentaram regulação negativa, em nível pós-transcricional, de genes relacionados com as vias de regulação do citoesqueleto de actina e de adesão focal e de genes relacionados com a atividade traducional, com destaque para as proteínas ribossomais, as quais apresentaram uma eficiência de tradução reduzida.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, L.R.; AVILA, A.R.; CORREA, A.; HOLETZ, F.B.; MANSUR, F.C., MANQUE, P.A., DE MENEZES, J.P.; BUCK, G.A.; KRIEGER, M.A.; GOLDENBERG, S. Proteomic analysis reveals the dynamic association of proteins with translated mRNAs in *Trypanosoma cruzi*. **Gene**. v. 452, n. 2, p. 72-8, 2010.

ANDERS, S.; HUBER, W. Differential expression analysis for sequence count data. **Genome biology**. v. 11, n. 10, r106, 2010.

AUGELLO, A.; DE BARI, C. The regulation of differentiation in mesenchymal stem cells. **Human gene therapy**. v. 21, n. 10, p. 1226-38, 2010.

BAER, P.C.; GEIGER, H. Adipose-derived mesenchymal stromal/stem cells: tissue localization, characterization, and heterogeneity. **Stem cells international**. v. 2012, ID 812693, 2012.

BARTEL, D.P. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. **Cell**. v. 136, n. 2, p. 215-33, 2009.

BEN-DAVID, U.; KOPPER, O.; BENVENISTY, N. Expanding the boundaries of embryonic stem cells. **Cell Stem Cell**. v. 10, n. 6, p. 666-77, 2012.

BLANPAIN, C.; LOWRY, W.E.; GEOGHEGAN, A.; POLAK, L.; FUCHS, E. Self-renewal, multipotency, and the existence of two cell populations within an epithelial stem cell niche. **Cell**. v. 118, n. 5, p. 635-48, 2004.

BROWN, P.O.; BOTSTEIN, D. Exploring the new world of the genome with DNA microarrays. **Nature genetics**. v. 21, n. 1, p. 33-7, 1999.

BURA, A.; PLANAT-BENARD, V.; BOURIN, P.; SILVESTRE, J.S.; GROSS, F.; GROLLEAU, J.L.; SAINT-LEBESE, B.; PEYRAFITTE, J.A.; FLEURY, S.; GADELORGE, M.; TAURAND, M.; DUPUIS-CORONAS, S.; LEOBON, B.; CASTEILLA, L. Phase I trial: the use of autologous cultured adipose-derived stroma/stem cells to treat patients with non-revascularizable critical limb ischemia. **Cytotherapy**. v. 16, n. 2, p. 245-57, 2014.

CHEN, K.D.; GOTO, S.; HSU, L.W.; LIN, T.Y.; NAKANO, T.; LAI, C.Y.; CHANG, Y.C.; WENG, W.T.; KUO, Y.R.; WANG, C.C.; CHENG, Y.F.; MA, Y.Y.; LIN, C.C.; CHEN, C.L. Identification of miR-27b as a novel signature from the mRNA profiles of adipose-derived mesenchymal stem cells involved in the tolerogenic response. **PloS One**. v. 8, n. 4, e60492, 2013 (a).

CHEN, Y.; WANG, K.; CHANDRAMOULI, G.V.; KNOTT, J.G.; LEACH, R. Trophoblast lineage cells derived from human induced pluripotent stem cells. **Biochemical and biophysical research communications**. v. 436, n. 4, p. 677-84, 2013 (b).

CHO, H.; KIM, K.M.; HAN, S.; CHOE, J.; PARK, S.G.; CHOI, S.S.; KIM, Y.K. Staufen1-mediated mRNA decay functions in adipogenesis. **Molecular cell**. v. 46, n. 4, p. 495-506, 2012.

DALEY, W.P.; PETERS, S.B.; LARSEN, M. Extracellular matrix dynamics in development and regenerative medicine. **Journal of cell science**. v. 121, pt. 3, p. 255-64, 2008.

- DOMA, M.K.; PARKER, R. Endonucleolytic cleavage of eukaryotic mRNAs with stalls in translation elongation. **Nature**. v. 440, n. 7083, p. 561-4, 2006.
- DUNN, J.G.; FOO, C.K.; BELLETIER, N.G.; GAVIS, E.R.; WEISSMAN, J.S. Ribosome profiling reveals pervasive and regulated stop codon readthrough in *Drosophila melanogaster*. **Elife**. v. 2, e01179, 2013.
- EDEN, E.; LIPSON, D.; YOGEV, S.; YAKHINI, Z. Discovering motifs in ranked lists of DNA sequences. **PLoS computational biology**. v. 3, n. 3, e39, 2007.
- EDEN, E.; NAVON, R.; STEINFELD, I.; LIPSON, D.; YAKHINI, Z. GOrilla: a tool for discovery and visualization of enriched GO terms in ranked gene lists. **BMC bioinformatics**. v. 10, n. 48, 2009.
- ENGLER, A.J.; SEN, S.; SWEENEY, H.L.; DISCHER, D.E. Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. **Cell**. v. 126, n. 4, p. 677-89, 2006.
- ERICES, A.; CONGET, P.; MINGUELL, J.J. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. **British journal of haematology**. v. 109, n. 1, p. 235-42, 2000.
- FLOYD, Z.E.; STEPHENS, J.M.; Controlling a master switch of adipocyte development and insulin sensitivity: covalent modifications of PPAR γ . **Biochimica and Biophysica acta**. v. 1822, n. 7, p. 1090-5, 2012.
- FRISCHMEYER, P.A.; VAN HOOFF, A.; O'DONNELL, K.; GUERRERIO, A.L.; PARKER, R.; DIETZ, H.C. An mRNA surveillance mechanism that eliminates transcripts lacking termination codons. **Science**. v. 295, n. 5563, p. 2258-61, 2002.
- FUCHS, E.; SEGRE, J.A. Stem cells: a new lease on life. **Cell**. v. 100, n. 1, p. 143-55, 2000.
- FUCHS, E.; CHEN, T. A matter of life and death: self-renewal in stem cells. **EMBO reports**. v. 14, n. 1, p. 39-48, 2013.
- GOLDENBERG, S.; SALLES, J.M.; CONTRERAS, V.T.; LIMA FRANCO, M.P.; KATZIN, A.M.; COLLI, W.; MOREL, C.M. Characterization of messenger RNA from epimastigotes and metacyclic trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. **FEBS letters**. v. 180, n. 2, p. 265-70, 1985.
- GRONTHOS, S.; MANKANI, M.; BRAHIM, J.; ROBEY, P.G.; SHI, S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v. 97, n. 25, p. 13625-30, 2000.
- GRONTHOS, S.; FRANKLIN, D.M.; LEDDY, H.A.; ROBEY, P.G.; STORMS, R.W.; GIMBLE, J.M. Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells. **Journal of cellular physiology**. v. 189, n. 1, p. 54-63, 2001.
- GUTTMAN, M.; DONAGHEY, J.; CAREY, B.W.; GARBER, M.; GRENIER, J.K.; MUNSON, G.; YOUNG, G.; LUCAS, A.B.; ACH, R.; BRUHN, L.; YANG, X.; AMIT, I.; MEISSNER, A.; REGEV, A.; RINN, J.L.; ROOT, D.E.; LANDER E.S. lincRNAs act in the circuitry controlling pluripotency and differentiation. v. 477, n. 7364, p. 295-300, 2011.

GUTTMAN, M.; RUSSELL, P.; INGOLIA, N.T.; WEISSMAN, J.S.; LANDER, E.S. Ribosome profiling provides evidence that large noncoding RNAs do not encode proteins. **Cell**. v. 154, n. 1, p. 240-51, 2013.

HERBERTS, C.A.; KWA, M.S.; HERMSEN, H.P. Risk factors in the development of stem cell therapy. **Journal of translational medicine**. v. 9, n. 29, 2011.

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. 1062-7, 2007.

HUANG, DA W.; SHERMAN, B.T.; LEMPICKI, R.A. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. **Nature protocols**. v. 4, n. 1, p. 44-57, 2009. (a)

HUANG, DA W.; SHERMAN, B.T.; LEMPICKI, R.A. Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. **Nucleic acids research**. v. 37, n. 1, p. 1-13, 2009. (b)

INGOLIA, N.T.; GHAEMMAGHAMI, S.; NEWMAN, J.R.; WEISSMAN, J.S. Genome-wide analysis in vivo of translation with nucleotide resolution using ribosome profiling. **Science**. v. 324, n. 5924, p. 218-23, 2009.

INGOLIA, N.T.; LAREAU, L.F.; WEISSMAN, J.S. Ribosome profiling of mouse embryonic stem cells reveals the complexity and dynamics of mammalian proteomes. **Cell**. v. 147, n. 4, p. 789- 802, 2011.

INGOLIA, N.T.; BRAR, G.A.; ROUSKIN, S.; MCGEACHY, A.M.; WEISSMAN, J.S. The ribosome profiling strategy for monitoring translation in vivo by deep sequencing of ribosome-protected mRNA fragments. **Nature protocols**. v. 7, n. 8, p. 1534-50, 2012.

INGOLIA, N.T. Ribosome profiling: new views of translation, from single codons to genome scale. **Nature Reviews Genetics**. v. 15, n. 3, p. 205-13, 2014.

JANAS, M.M.; WANG, E.; LOVE, T.; HARRIS, A.S.; STEVENSON, K.; SEMMELMANN, K.; SHAFFER, J.M.; CHEN, P.H.; DOENCH, J.G.; YERRAMILI, S.V.; NEUBERG, D.S.; ILIOPOULOS, D.; HOUSMAN, D.E.; BURGE, C.B.; NOVINA, C.D. Reduced expression of ribosomal proteins relieves microRNA-mediated repression. **Molecular cell**. v. 46, n.2, p. 171-86, 2012.

JUNTAWONG, P.; GIRKE, T.; BAZIN, J.; BAILEY-SERRES, J. Translational dynamics revealed by genome-wide profiling of ribosome footprints in Arabidopsis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v. 111, n. 1, p. 203-12, 2014.

KARBIENER, M.; FISCHER, C.; NOWITSCH, S.; OPRIESSNIG, P.; PAPAK, C.; AILHAUD, G.; DANI, C.; AMRI, E.Z.; SCHEIDELER, M. microRNA miR-27b impairs human adipocyte differentiation and targets PPARgamma. **Biochemical and biophysical research communications**. v. 390, n. 2, p. 247-51, 2009.

KEDERSHA, N.; STOECKLIN, G.; AYODELE, M.; YACONO, P.; LYKKE-ANDERSEN, J.; FRITZLER, M.L.; SCHEUNER, D.; KAUFMAN, R.J.; GOLAN, D.E.; ANDERSON, P. Stress granules and processing bodies are dynamically linked sites of mRNP remodeling. **The Journal of cell biology**. v. 169, n. 6, p. 871-84, 2005.

KILROY, G.E.; FOSTER, S.J.; WU, X.; RUIZ, J.; SHERWOOD, S.; HEIFETZ, A.; LUDLOW, J.W.; STRICKER, D.M.; POTINY, S.; GREEN, P.; HALVORSEN, Y.D.; CHEATHAM, B.; STORMS, R.W.; GIMBLE, J.M. Cytokine profile of human adipose-derived stem cells: expression of angiogenic, hematopoietic, and pro-inflammatory factors. **Journal of cellular physiology**. v. 212, n. 3, p. 702-9, 2007.

KONG, J.; LASKO, P. Translational control in cellular and developmental processes. **Nature reviews. Genetics**. v. 13, n. 6, p. 383-94, 2012.

KWON, S.C.; YI, H.; EICHELBAUM, K.; FÖHR, S.; FISCHER, B.; YOU, K.T.; CASTELLO, A.; KRIJGSVELD, J.; HENTZE, M.W.; KIM, V.N. The RNA-binding protein repertoire of embryonic stem cells. **Nature structural and molecular biology**. v. 20, n. 9, p. 1122-30, 2013.

LEEPER, N.J.; HUNTER, A.L.; COOKE, J.P. Stem cell therapy for vascular regeneration: adult, embryonic, and induced pluripotent stem cells. **Circulation**. v. 122, n. 5, p. 517-26, 2010.

LI, Y.; SHEN, Z.; SHELAT, H.; GENG, Y.J. Reprogramming somatic cells to pluripotency: A fresh look at Yamanaka's model. **Cell Cycle**. v. 12, n. 23, p. 3594-8, 2013.

LIU, T.M.; MARTINA, M.; HUTMACHER, D.W.; HUI, J.H.; LEE, E.H.; LIM, B. Identification of common pathways mediating differentiation of bone marrow- and adipose tissue-derived human mesenchymal stem cells into three mesenchymal lineages. **Stem cells**. v. 25, n. 3, p. 750-60, 2007.

LIU, Z.J.; ZHUGE, Y.; VELAZQUEZ, O.C. Trafficking and differentiation of mesenchymal stem cells. **Journal of cellular biochemistry**. v. 106, n. 6, p. 984-91, 2009.

LU, J.; DEUTSCH, C. Electrostatics in the ribosomal tunnel modulate chain elongation rates. **Journal of molecular biology**. v. 384, n. 1, p. 73-86, 2008.

MALI, P.; YE, Z.; HOMMOND, H.H.; YU, X.; LIN, J.; CHEN, G.; ZOU, J.; CHENG, L. Improved efficiency and pace of generating induced pluripotent stem cells from human adult and fetal fibroblasts. **Stem cells**. v. 26, n. 8, p. 1998-2005, 2008.

MANN, M.; JENSEN, O.N. Proteomic analysis of post-translational modifications. **Nature biotechnology**. v. 21, n. 3, p. 255-61, 2003.

MCBEATH, R.; PIRONE, D.M.; NELSON, C.M.; BHADRIRAJU, K.; CHEN, C.S. Cell shape, cytoskeletal tension, and RhoA regulate stem cell lineage commitment. **Developmental cell**. v. 6, n. 4, p. 483-95, 2004.

MCMANUS, C.J.; MAY, G.E.; SPEALMAN, P.; SHTEYMAN, A. Ribosome profiling reveals post-transcriptional buffering of divergent gene expression in yeast. **Genome research**. v. 24, n. 3, p. 422-30, 2014.

- MENDELL, J.T.; SHARIFI, N.A.; MEYERS, J.L.; MARTINEZ-MURILLO, F.; DIETZ, H.C. Nonsense surveillance regulates expression of diverse classes of mammalian transcripts and mutes genomic noise. **Nature genetics**. v. 36, n. 10, p. 1073-8, 2004.
- MORTAZAVI, A.; WILLIAMS, B.A.; MCCUE, K.; SCHAEFFER, L.; WOLD, B. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. **Nature methods**. v. 5, n. 7, p. 621-8, 2008.
- MÜLLER, P.; LANGENBACH, A.; KAMINSKI, A.; RYCHLY, J. Modulating the actin cytoskeleton affects mechanically induced signal transduction and differentiation in mesenchymal stem cells. **PLoS One**. v. 8, n. 7, e71283, 2013.
- OKITA, K.; ICHISAKA, T.; YAMANAKA, S. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. **Cell**. v. 448, n. 7151, p. 313-7, 2007.
- PITTENGER, M.F.; MACKAY, A.M.; BECK, S.C.; JAISWAL, R.K.; DOUGLAS, R.; MOSCA, J.D.; MOORMAN, M.A.; SIMONETTI, D.W.; CRAIG, S.; MARSHAK, D.R. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. **Science**. v. 284, n. 5411, p. 143-7, 1999.
- RAJASHEKHAR, G.; RAMADAN, A.; ABBURI, C.; CALLAGHAN, B.; TRAKTUEV, D.O.; EVANS-MOLINA, C.; MATURI, R.; HARRIS, A.; KERN, T.S.; MARCH, K.L. Regenerative therapeutic potential of adipose stromal cells in early stage diabetic retinopathy. **PloS One**. v. 9, n. 1, e84671, 2014.
- 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.
- REHMAN, J.; TRAKTUEV, D.; LI, J.; MERFELD-CLAUSS, S.; TEMM-GROVE, C.J.; BOVENKERK, J.E.; PELL, C.L.; JOHNSTONE, B.H.; CONSIDINE, R.V.; MARCH, K.L. Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells. **Circulation**. v. 109, n. 10, p. 1292-8, 2004.
- ROOIJERS, K.; LOAYZA-PUCH, F.; NIJTMANS, L.G.; AGAMI, R. Ribosome profiling reveals features of normal and disease-associated mitochondrial translation. **Nature communications**. v. 4, n. 2886, 2013.
- SALASZNYK, R.M.; KLEES, R.F.; WILLIAMS, W.A.; BOSKEY, A.; PLOPPER, G.E. Focal adhesion kinase signaling pathways regulate the osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. **Experimental cell research**. v. 313, n. 1, p. 22-37, 2007.
- SAMPATH, P.; PRITCHARD, D.K.; PABON, L.; REINECKE, H.; SCHWARTZ, S.M.; MORRIS, D.R. MURRY, C.E. A hierarchical network controls protein translation during murine embryonic stem cell self-renewal and differentiation. **Cell stem cell**. v. 2, n. 5, p. 448-60, 2008.

SCHWANHÄUSSER, B.; BUSSE, D.; LI, N.; DITTMAR, G.; SCHUCHHARDT, J.; WOLF, J.; CHEN, W.; SELBACH, M. Global quantification of mammalian gene expression control. **Nature**. v. 473, n. 7347, p. 337-42, 2011.

SEN, B.; XIE, Z.; CASE, N.; MA, M.; RUBIN, C.; RUBIN, J. Mechanical strain inhibits adipogenesis in mesenchymal stem cells by stimulating a durable beta-catenin signal. **Endocrinology**. v. 149, n. 12, p. 6065-75, 2008.

SEN, B.; GUILLUY, C.; XIE, Z.; CASE, N.; STYNER, M.; THOMAS, J.; OGUZ, I.; RUBIN, C.; BURRIDGE, K.; RUBIN, J. Mechanically induced focal adhesion assembly amplifies anti-adipogenic pathways in mesenchymal stem cells. **Stem cells**. v. 29, n. 11, p. 1829-36, 2011.

SHERMAN, M.I. The culture of cells derived from mouse blastocysts. **Cell**. v. 5, n. 4, p. 343-9, 1975.

SIGNER, R.A.; MORRISON, S.J. Mechanisms that regulate stem cell aging and life span. **Cell Stem Cell**. v. 12, n. 2, p. 152-65, 2013.

SLACK, J. Skinny dipping for stem cells. **Nature cell biology**. v. 3, n. 9, p. 205-6, 2001.

SONOWAL, H.; KUMAR, A.; BHATTACHARYYA, J.; GOGOI, P.K.; JAGANATHAN, B.G. Inhibition of actin polymerization decreases osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells through p38 MAPK pathway. **Journal of biomedical science**. v. 20, n. 71, 2013.

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 research**. v. 11, n. 2, p. 902-12, 2013.

SPANGRUDE, G.J.; HEIMFELD, S.; WEISSMAN, I.L. Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. **Science**. v. 241, n. 4861, p. 58-62, 1988.

SPITZ, F.; FURLONG, E.E. Transcription factors: from enhancer binding to developmental control. **Nature Reviews Genetics**. v. 13, n. 9, p. 613-26, 2012.

STEITZ, J.A. Polypeptide chain initiation: nucleotide sequences of the three ribosomal binding sites in bacteriophage R17 RNA. **Nature**. v. 224, n. 5223, p. 957-64, 1969.

TAKAHASHI, K.; YAMANAKA, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. **Cell**. v. 126, n. 4, p. 663-76, 2006.

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. 861-72, 2007.

TANG, Q.Q.; LANE, M.D. Adipogenesis: from stem cell to adipocyte. **Annual review of biochemistry**. v. 81, p. 715-36, 2012.

THOMAS, M.C.; CHIANG, C.M. The general transcription machinery and general cofactors. **Critical reviews in biochemistry and molecular biology**. v. 41, n. 3, p. 105-78, 2006.

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, n. 5391, p. 1145-7, 1998.

TIAN, Q.; STEPANIANTS, S.B.; MAO, M.; WENG, L.; FEETHAM, M.C.; DOYLE, M.J.; YI, E.C.; DAI, H.; THORSSON, V.; ENG, J.; GOODLETT, D.; BERGER, J.P.; GUNTER, B.; LINSELEY, P.S.; STOUGHTON, R.B.; AEBERSOLD, R.; COLLINS, S.J.; HANLON, W.A.; HOOD, L.E. Integrated genomic and proteomic analyses of gene expression in mammalian cells. **Molecular and cellular proteomics: MCP**. v. 3, n. 10, p. 960-9, 2004.

TRAYHURN, P.; BEATTIE, J.H. Physiological role of adipose tissue: white adipose tissue as an endocrine and secretory organ. **The Proceedings of Nutrition Society**. v. 60, n. 3, p. 329-39, 2001.

ULITSKY, I.; BARTEL, D.P. lincRNAs: genomics, evolution, and mechanisms. **Cell**. v. 154, n. 1, p. 26-46, 2013.

VARMA, M.J.; BREULS, R.G.; SCHOUTEN, T.E.; JURGENS, W.J.; BONTKES, H.J.; SCHUURHUIS, G.J.; VAN HAM, S.M.; VAN MILLIGEN, F.J. Phenotypical and functional characterization of freshly isolated adipose tissue-derived stem cells. **Stem cells and development**. v.16, n.1, p. 91-104, 2007.

VASQUEZ, J.J.; HON, C.C.; VANSELOW, J.T.; SCHLOSSER, A.; SIEGEL, T.N. Comparative ribosome profiling reveals extensive translational complexity in different *Trypanosoma brucei* life cycle stages. **Nucleic acids research**. (publicação *online* antes da impressão) 2014.

WAGERS, A.J.; WEISSMAN, I.L. Plasticity of adult stem cells. **Cell**. v. 116, n. 5, p. 639-48, 2004.

WEISSMAN, I.L. Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. **Cell**. v. 100, n. 1, p. 157-68, 2000.

WONG, C.E.; PARATORE, C.; DOURS-ZIMMERMANN, M.T.; ROCHAT, A.; PIETRI, T.; SUTER, U.; ZIMMERMANN, D.R.; DUFOUR, S.; THIERY, J.P.; MEIJER, D.; BEERMANN, F.; BARRANDON, Y.; SOMMER, L. Neural crest-derived cells with stem cell features can be traced back to multiple lineages in the adult skin. **The Journal of cell biology**. v. 175, n. 6, p. 1005-15, 2006.

WU, X.; BREWER, G. The regulation of mRNA stability in mammalian cells: 2.0. **Gene**. v. 500, n. 1, p. 10-21, 2012.

YANG, H.J.; XIA, Y.Y.; WANG, L.; LIU, R.; GOH, K.J.; JU, P.J.; FENG, Z.W. A novel role for neural cell adhesion molecule in modulating insulin signaling and adipocyte differentiation of mouse mesenchymal stem cells. **Journal of cell science**. v. 124, n. 15, p. 2552-60, 2011.

YAMANAKA, S. A fresh look at iPS cells. **Cell**. v. 137, n. 1, p. 13-7, 2009.

YOSHIOKA, N.; GROS, E.; KUMAR, S.; DEACON, D.C.; MARON, C.; MUOTRI, A.R.; CHI, N.C.; FU, X.D.; YU, B.D.; DOWDY, S.F. Efficient generation of human iPSCs by a synthetic self-replicative RNA. **Cell Stem Cell**. v. 13, n. 2, p. 246-54, 2013.

ZHANG, G.; HUBALEWSKA, M.; IGNATOVA, Z. Transient ribosomal attenuation coordinates protein synthesis and co-translational folding. **Nature structural and molecular biology**. v. 16, n. 3, p. 274-80, 2009.

ZUK, P.A.; ZHU, M.; MIZUNO, H.; HUANG, J.; FUTRELL, J.W.; KATZ, A.J.; BENHAIM, P.; LORENZ, H.P.; HEDRICK, M.H. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. **Tissue engineering**. v. 7, n. 2, 2011-28, 2001.

ZUK, P.A.; ZHU, M.; ASHJIAN, P.; DE UGARTE, D.A.; HUANG, J.I.; MIZUNO, H.; ALFONSO, Z.C.; FRASER, J.K.; BENHAIM, P.; HEDRICK, M.H. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. **Molecular biology of the cell**. v. 13, n. 12, p. 4279-95, 2002.

MATERIAL SUPLEMENTAR

Tabela S1. Número de leituras obtido para cada transcrito identificado após normalização dos dados por DESeq e filtragem ($D/S < 0,2$; número de leituras ≥ 30) para cada uma das condições (t=0, t=72h, poliA, *ribosome profiling*).

Tabela S2. Lista de genes identificados para cada uma das condições (t=0, t=72h, poliA, *ribosome profiling*).

Tabela S3. Cálculo do *fold change* para cada transcrito entre as condições t=0 e t=72h para cada uma das amostras de RNA (poliA e *ribosome profiling*).

Tabela S4. Cálculo do *fold change* da eficiência traducional para cada transcrito entre as condições t=0 e t=72h para cada uma das amostras de RNA (poliA e *ribosome profiling*).

Tabela S5. Lista dos genes regulados positivamente ($\log_2(FC) \geq 1$) após 72 horas de indução para diferenciação adipogênica e análise de ontologia gênica pelos bancos de dados KEGG e GOrilla.

Tabela S6. Lista dos genes regulados negativamente ($\log_2(FC) \leq -1$) após 72 horas de indução para diferenciação adipogênica e análise de ontologia gênica pelos bancos de dados KEGG e GOrilla.

Tabela S7. Lista dos genes que tiveram eficiência traducional aumentada ($\log_2 \geq 1$) ou reduzida ($\log_2 \leq -1$) após 72h de diferenciação adipogênica e análise de ontologia gênica pelos bancos de dados KEGG e GOrilla.