

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

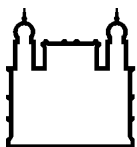
INSTITUTO CARLOS CHAGAS
Doutorado em Biociências e Biotecnologia

**ANÁLISE DA REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA EM CÉLULAS-TRONCO
OBTIDAS DE TECIDO ADIPOSE HUMANO DURANTE A DIFERENCIAÇÃO
ADIPOGÊNICA E OSTEOGÊNICA E ESTUDO DO PAPEL DA HELICASE DDX6
NESTE PROCESSO**

BRUNA HILZENDEGER MARCON

Curitiba/PR

2019



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO CARLOS CHAGAS
Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia

BRUNA HILZENDEGER MARCON

ANÁLISE DA REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA EM CÉLULAS-TRONCO
OBTIDAS DE TECIDO ADIPOSEO HUMANO DURANTE A DIFERENCIAÇÃO
ADIPOGÊNICA E OSTEOGÊNICA E ESTUDO DO PAPEL DA
HELICASE DDX6 NESTE PROCESSO

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

Orientadores: Dr. Alejandro Correa
Dr. Bruno Dallagiovanna

Curitiba/PR

2019

AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores Alejandro e Bruno, agradeço por me receberem no laboratório e por todo conhecimento compartilhado nos últimos anos. Obrigada também por todo apoio e compreensão com a minha jornada dupla de tecnologista/doutoranda e por tantas vezes terem me atendido em fins de semana e feriados para que este projeto pudesse ser concretizado.

Aos demais pesquisadores do grupo, Alessandra, Marco e Patrícia, obrigada por me receberem tão bem na equipe, pelas discussões e ajuda no desenvolvimento deste trabalho. À equipe do Labcet, obrigada pela amizade e companheirismo ao longo destes anos. Gostaria também de dedicar um agradecimento especial para Crisciele, que cuida de tudo e de todos no laboratório, Addeli, Ana Paula, Anny, Isabela, Maria Júlia e Thamile, que acompanharam mais de perto esta caminhada científica e pessoal.

A toda a equipe do Instituto Carlos Chagas e da Fiocruz, obrigada por proporcionarem este ambiente de trabalho tão completo e agradável. Em especial, agradeço às Plataformas de Espectrometria de Massas, de Microscopia Confocal e Eletrônica e de Sequenciamento de Alto Desempenho, que permitiram a realização deste trabalho.

À equipe da Microscopia, Maurílio, Lia Carolina, Beatriz, Yohana e Tábata, pelo apoio e compreensão com a minha jornada de trabalho e Doutorado.

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.

Às colaboradoras do Uruguai, Lucía Spangenberg e Rocio Amorin, pelas análises e apoio para o desenvolvimento deste trabalho.

À minha família, por todo o apoio e carinho. Em especial, agradeço aos meus pais, Antonio e Goretti, pela dedicação e amor incondicional ao longo de toda a vida, e ao meu marido, Diego, pelo amor, apoio, paciência e compreensão sem os quais eu jamais teria conseguido realizar este trabalho. Amo vocês.

Às agências de fomento e fontes financiadoras deste projeto, Fiocruz, Fundação Araucária e CNPq.

INSTITUTO CARLOS CHAGAS

ANÁLISE DA REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA EM CÉLULAS-TRONCO OBTIDAS DE TECIDO ADIPOSE HUMANO DURANTE A DIFERENCIAÇÃO ADIPOGÊNICA E OSTEOGÊNICA E ESTUDO DO PAPEL DA HELICASE DDX6 NESTE PROCESSO

RESUMO

Tese de Doutorado

Bruna Hilzendeger Marcon

As células-tronco obtidas de tecido adiposo humano (hASCs) são consideradas uma alternativa interessante para uso na medicina regenerativa e a compreensão de como se dá o balanço entre a manutenção de seu estado indiferenciado e o início da diferenciação é um passo importante para melhor aproveitar seu potencial. Dentre os mecanismos envolvidos neste processo, está a regulação do ciclo de vida dos transcritos, que envolve a ação de proteínas de ligação ao RNA, como a helicase DDX6. Em uma tese de Doutorado desenvolvida previamente em nosso grupo, observou-se que a redução da expressão desta proteína em hASCs (através do uso de RNAi) levou à aceleração da diferenciação adipogênica, com um maior acúmulo de lipídeos. Assim, o objetivo deste trabalho foi analisar a regulação da expressão gênica em hASCs durante as primeiras 24 horas de diferenciação adipogênica e osteogênica e avaliar o papel da helicase DDX6 neste processo. Para isso, foi primeiramente realizado o sequenciamento do RNAm total e das frações associadas a monossomos e polissomos de hASCs mantidas em meio não-indutor ou tratadas com meio de indução adipogênica ou osteogênica por 24 horas. A análise dos dados revelou que, em ambos os processos de diferenciação, houve uma importante regulação da expressão, sendo que na osteogênese houve um predomínio de genes regulados positivamente, enquanto que na adipogênese a maior parte dos genes diferencialmente expresso teve regulação negativa. Também se observou que, após 24 horas de indução adipogênica, já foi possível verificar mudanças na expressão de genes relacionados com a diferenciação, o que não ocorreu na osteogênese, sugerindo que o comprometimento com a diferenciação é mais precoce na adipogênese em hASCs. Além disso, após 24 horas de indução adipogênica, houve redução da atividade proliferativa nas hASCs, as quais apresentaram uma parada do ciclo celular em G1. Os resultados obtidos sugerem que este processo é independente de DEPTOR (inibidor da via mTOR, a qual é conhecida por regular processos como proliferação), estando majoritariamente relacionado a uma redução na abundância de transcritos de ciclo celular e proliferação. Em uma segunda etapa do trabalho, foi avaliado o papel da DDX6 em hASCs. Observou-se que hASCs expressam DDX6, a qual se encontrou dispersa no citoplasma, também se concentrando em estruturas granulares, as quais tiveram um comportamento semelhante a *P-bodies*: a manutenção de sua estrutura depende de RNA, apresentam colocalização parcial com Dcp1a e aumentam de número após tratamento com um análogo de puromicina. Através da análise por gradiente de sacarose, observou-se que, em hASCs, DDX6 comigrou majoritariamente com a fração livre, mas foi também identificada na fração de monossomos/polissomos leves. Porém, quando foi feita indução para diferenciação, houve mudança no padrão de sedimentação. Através de análise por imunofluorescência e por coimunoprecipitação, observou-se que DDX6 associa-se a diferentes moléculas que regulam o ciclo de vida do RNAm em hASCs e têm seu padrão de distribuição alterado durante o início da adipogênese e da osteogênese, o que pode estar relacionado às mudanças no comportamento do ciclo celular e da regulação da expressão gênica observadas durante o início do processo de diferenciação. A análise complementar do conteúdo de RNAm que se associa aos complexos contendo DDX6 nestas diferentes condições poderá trazer mais informações sobre o possível papel desta helicase na regulação da expressão gênica durante o início da diferenciação em hASCs. Desta forma, os resultados obtidos podem auxiliar na compreensão de como a manutenção do estado indiferenciado de hASCs é regulada e dos mecanismos que ocorrem nas primeiras etapas da diferenciação adipogênica e osteogênica.

Palavras-chave: Células-tronco obtidas de tecido adiposo humano; Regulação da expressão gênica; Grânulos de RNPs; DDX6

INSTITUTO CARLOS CHAGAS

ANALYSIS OF THE GENE EXPRESSION REGULATION IN HUMAN ADIPOSE TISSUE-DERIVED STEM CELLS DURING ADIPOGENIC AND OSTEOGENIC DIFFERENTIATION AND STUDY OF THE ROLE OF THE DDX6 HELICASE DURING THIS PROCESS

ABSTRACT

Tese de Doutorado

Bruna Hilzendeger Marcon

Human adipose tissue-derived stem cells (hASCs) are known as an interesting source for regenerative medicine. The comprehension of how the balance between stemness and the differentiation process is controlled is an important step to better use and to take advantage of their potential. The regulation of the mRNA life cycle is one of the mechanisms that control this process, and it involves the acting of RNA-binding proteins, as the DDX6 helicase. In a Doctoral thesis developed in our group, we found that DDX6 knockdown (using RNAi) in hASCs led to the acceleration of the adipogenic differentiation, causing an increase in the lipid droplets accumulation. Therefore, the aim of this work was to analyze the gene expression regulation in hASCs after 24 hours of adipogenic and osteogenic differentiation and to study the role of DDX6 helicase in this process. First, we performed the sequencing of the total and the polysome-associated mRNA from hASCs non-induced or induced to adipogenesis and osteogenesis for 24 hours. In both differentiation processes, there was an important gene expression regulation. During osteogenesis most of the differentially expressed genes were upregulated, while in adipogenesis most of them were downregulated. After 24 hours of adipogenic induction, genes related to the differentiation process were already differentially expressed. This was not observed in osteogenesis, suggesting that the cell commitment with the differentiation process happens earlier in adipogenesis in hASCs. Moreover, after 24 hours of adipogenic induction, there was a decrease in the proliferative activity of hASCs, with G1-cell cycle arrest. The results obtained suggest that this process is DEPTOR-independent (DEPTOR is an inhibitor the mTOR pathway, which regulates proliferation), and are mainly related to a reduction of the abundance of transcripts related to cell cycle and proliferation. Then, we evaluated the role of DDX6 in hASCs. We found that DDX6 is expressed in hASCs, mainly dispersed in the cytoplasm and also localized in granules. These granules had features of P-bodies: their structure was RNA-dependent, they colocalized partially with Dcp1a and there was an increased in their number and size after treatment with a puromycin analogue. Through sucrose gradient separation, we observed that, in hASCs, DDX6 comigrates mostly with the RNA-free fraction, but was also found in the monosome/light polysome fractions. However, when differentiation was induced, there was a change in the sedimentation pattern. Using immunofluorescence and coimmunoprecipitation, we also observed that, in hASCs, DDX6 is associated with molecules that regulate the mRNA life cycle. There was also a change in the distribution pattern of DDX6 after 24 hours of adipogenic and osteogenic induction that may be related to changes in the cell cycle and in the gene expression regulation during the beginning of the differentiation process. Further analysis of the mRNA content of the complexes associated to DDX6 in these different conditions may yield more information about a possible role of this helicase in the regulation of the gene expression during the beginning of the differentiation process of hASCs. The results obtained paved the way for a better understanding of the stemness maintenance and the processes involved in the early steps of the adipogenic and the osteogenic differentiation.

Keywords: Adipose tissue-derived stem cell, gene expression regulation, mRNP granules, DDX6.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1.	Representação esquemática da dinâmica e função dos <i>P-bodies</i>	26
Figura 4.1.	Análise da capacidade de diferenciação das hASCs.....	55
Figura 4.2.	Padronização do protocolo de lise celular para imunoprecipitação.....	56
Figura 4.3.	Padronização de coimunoprecipitação de DDX6 e seus parceiros em células HeLa e hASCs.....	57
Figura 4.4.	Coimunoprecipitação de DDX6 e seus parceiros em hASCs, padronização da centrifugação e da lavagem.....	59
Figura 4.5.	Coimunoprecipitação de DDX6 e seus parceiros em hASCs, padronização da pré-limpeza e da metodologia de eluição.....	62
Figura 4.6.	Análise por ontologia gênica de processo biológico de genes com expressão diferencial após 24 horas de osteogênese.....	67
Figura 4.7.	Análise por ontologia gênica de processo biológico de genes com expressão diferencial após 24 horas de adipogênese.....	69
Figura 4.8.	Regulação da expressão gênica de transcritos relacionados a ciclo celular e proliferação.....	70
Figura 4.9.	hASCs induzidas para adipogênese por 24 horas apresentam redução da proliferação, com parada do ciclo celular em G1.....	71
Figura 4.10.	Silenciamento de RNAm de DEPTOR em hASCs leva à redução da proliferação.....	74
Figura 4.11.	Análise da localização de DDX6 em hASCs mantidas em meio não indutor.....	76
Figura 4.12.	Análise da distribuição de DDX6 em hASCs tratadas com RNase A.....	77
Figura 4.13.	Localização de TIA1 e DDX6 em hASCs em condições controle e submetidas a estresse.....	79
Figura 4.14.	Localização de PABP e DDX6 em hASCs em condições controle e submetidas a estresse.....	80
Figura 4.15.	Localização de Dcp1a e DDX6 em hASCs em condições controle e submetidas a estresse.....	81
Figura 4.16.	Quantificação de grânulos de DDX6 em hASCs tratadas com um análogo de puromicina.....	83

Figura 4.17. Localização de DRIPs e DDX6 em hASCs em condições controle e submetidas a estresse.....	84
Figura 4.18. Localização de DRIPs e TIAR em hASCs em condições controle e submetidas a estresse.....	85
Figura 4.19. Análise do enriquecimento de DRIPs em grânulos de DDX6 e de TIAR observados em hASCs.....	87
Figura 4.20. Análise da localização de DDX6 em hASCs induzidas para adipogênese e osteogênese por 24 horas.....	88
Figura 4.21. Quantificação de grânulos contendo DDX6 em hASCs.....	89
Figura 4.22. Quantificação da proteína DDX6 em hASCs.....	90
Figura 4.23. Análise da localização de DDX6 em hASCs induzidas para adipogênese e osteogênese por 24 horas tratadas com RNase A.....	91
Figura 4.24. Localização de DRIPs e DDX6 em hASCs induzidas para adipogênese e osteogênese por 24 horas.....	92
Figura 4.25. Localização de TIA1 e DDX6 em hASCs induzidas para adipogênese e osteogênese.....	94
Figura 4.26. Localização de PABP e DDX6 em hASCs induzidas para adipogênese e osteogênese.....	95
Figura 4.27. Localização de Dcp1a e DDX6 em hASCs induzidas para adipogênese e osteogênese.....	96
Figura 4.28. Avaliação do padrão de migração de DDX6 em gradiente de sacarose.....	98
Figura 4.29. Coimunoprecipitação de DDX6 e seus parceiros em hASCs tratadas com meio não-indutor e induzidas para adipogênese e osteogênese por 24 horas, doador 1.....	100
Figura 4.30. Coimunoprecipitação de DDX6 e seus parceiros em hASCs tratadas com meio não-indutor e induzidas para adipogênese e osteogênese por 24 horas, doador 2.....	101
Figura 4.31. <i>Heatmap</i> do enriquecimento das proteínas identificadas por coimunoprecipitação de DDX6 e agrupamento hierárquico das réplicas e condições avaliadas.....	106
Figura 4.32. Análise por ontologia gênica e de interação entre as proteínas identificadas por coimunoprecipitação de DDX6.....	107

Figura 4.33. Proteínas identificadas como diferencialmente enriquecidas nos complexos associados a DDX6 em hASCs não induzidas, induzidas para adipogênese e osteogênese por 24 horas.....	108
Figura 5.1. Perfil de expressão gênica e comportamento de DDX6 em hASCs mantidas em meio não indutor e induzidas para adipogênese e osteogênese por 24 horas.....	130

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1.	Anticorpos utilizados para caracterização do perfil de expressão proteico por citometria de fluxo.....	34
Tabela 3.2.	Anticorpos primários utilizados para imunomarcação.....	40
Tabela 3.3.	Anticorpos secundários utilizados para análise por imunofluorescência....	40
Tabela 3.4.	Soluções utilizadas no teste do protocolo de imunoprecipitação de DDX6 em células HeLa.....	46
Tabela 3.5.	Soluções utilizadas no protocolo de imunoprecipitação de DDX6 em hASCs.....	49
Tabela 4.1.	Caracterização imunofenotípica por citometria de fluxo das células isoladas de tecido adiposo humano.....	54
Tabela 4.2.	Proteínas obtidas por coimunoprecipitação de DDX6, identificadas por espectrometria de massas, primeira análise.....	60
Tabela 4.3.	Proteínas obtidas por coimunoprecipitação de DDX6, identificadas por espectrometria de massas, segunda análise (50 com maior intensidade)....	63
Tabela 4.4.	Número de <i>reads</i> obtido por sequenciamento de cada condição, tipo de RNAm e réplica biológica (n=3).....	66
Tabela 4.5.	Ensaio de incorporação de EdU em hASCs tratadas com meio de manutenção (NI) ou induzidas para adipogênese (A) por 24 horas.....	71
Tabela 4.6.	Análise de ciclo celular em hASCs tratadas com meio de manutenção (NI) ou induzidas para adipogênese (A) por 24 horas.....	72
Tabela 4.7.	Quantificação do DNA obtido após o preparo para sequenciamento das amostras de RNA das duas réplicas técnicas dos doadores 1 e 2.....	102
Tabela 4.8.	Listagem das 15 proteínas identificadas como mais enriquecidas em cada uma das réplicas da análise por espectrometria de massas da imunoprecipitação de DDX6 em hASCs não-induzidas, induzidas para adipogênese ou osteogênese por 24 horas.....	104

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ARE	<i>AU-rich elements</i> (elementos ricos em AU)
ATP	<i>adenosine triphosphate</i> (trifosfato de adenosina)
BSA	<i>bovine serum albumin</i> (albumina de soro bovino)
BSS-CMF	<i>balanced salt solution – calcium and magnesium free</i> (solução salina balanceada, sem sais de cálcio e magnésio)
cAMP	<i>cyclic adenosine 3', 5' – monophosphate</i> (adenosina 3',5'-monofostado cíclico)
cDNA	<i>complementary deoxyribonucleic acid</i> (ácido desoxidorribonucleico complementar)
CF	contraste de fase
CHAPS	3-[(3-colamidopropil)dimetilamônio]-1-propanosulfonato
CO₂	dióxido de carbono
CP	cadeia pesada do anticorpo
Da	Dalton
DAPI	4'6'diamidino-2-fenilindol dihidroclorido
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMEM-F12	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12</i>
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> (ácido desoxirribonucleico)
DRIP	<i>defective ribosomal product</i> (produto ribossomal defeituoso)
DTT	ditiotreitól
EDTA	<i>ethylenediamine tetraacetic acid</i> (ácido etilendiaminotetracético)
eIF	<i>eukaryotic initiation factor</i> (fator de iniciação da tradução de eucariontes)
EP	erro padrão
FAPS	<i>fluorescence-activated particle sorting</i> (separação de partículas ativadas por fluorescência)

FC	<i>fold change</i> (razão de mudança)
FDR	<i>false discovery rate</i> (taxa de falsa descoberta)
GDP	<i>guanosine diphosphate</i> (difosfato de guanosina)
GTP	<i>guanosine triphosphate</i> (trifosfato de guanosina)
hASCs	<i>human adipose tissue-derived stem cells</i> (células-tronco obtidas de tecido adiposo humano)
HCl	ácido clorídrico
IBMX	isobutilmetilxantina
iPSCs	<i>induced pluripotent stem cells</i> (células-tronco pluripotentes induzidas)
lincRNA	<i>large intergenic non-coding RNA</i> (ácido ribonucleico não codificante intergênico longo)
MgCl₂	cloreto de magnésio
NaCl	cloreto de sódio
NGD	<i>no-go-mediated decay</i> (decaimento mediado por <i>no-go</i>)
NMD	<i>nonsense-mediated decay</i> (decaimento mediado por falta de sentido)
NSD	<i>nonstop-mediated decay</i> (decaimento mediado por falta de parada)
OI	<i>OsteoImage</i>
OPP	O-propargil-puromicina
ORF	<i>open read frame</i> (quadro aberto de leitura)
PABP	<i>polyA binding proteins</i> (proteína de ligação à cauda poliA)
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> (solução salina tamponada por fosfato)
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (reação em cadeia da polimerase)
pH	potencial hidrogeniônico
RBP	<i>RNA-binding proteins</i> (proteína de ligação ao RNA)
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i> (complexo de silenciamento induzido por RNA)

RNA	<i>ribonucleic acid</i> (ácido ribonucleico)
RNA_m	ácido ribonucleico mensageiro
RNA_t	ácido ribonucleico transportador
RNP_m	ribonucleoproteína mensageira
ROS	<i>reactive oxygen species</i> (espécies reativas de oxigênio)
RT	<i>reverse transcription</i> (transcrição reversa)
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> (dodecil sulfato de sódio)
SDS-PAGE	<i>SDS-polyacrylamide gel electrophoresis</i> (eletroforese em gel de acrilamida desnaturante - SDS)
SFB	soro fetal bovino
siDEP	siRNA contra DEPTOR
siNS	siRNA <i>nonsense</i> (sem sentido)
TBS	<i>Tris buffered saline</i> (salina tamponada por Tris)
TFA	<i>trifluoroacetic acid</i> (ácido trifluoroacético)
Tris	tris(hidroximetil)aminometano ácido
Tris-HCl	solução tampão Tris ácido
UTR	<i>untranslated region</i> (região não-traduzida)
VN	Vermelho Nilo

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	16
1.1.	Células-tronco.....	16
1.1.1.	As células-tronco obtidas de tecido adiposo humano.....	16
1.1.2.	Adipogênese e osteogênese.....	17
1.2.	Regulação da expressão gênica.....	19
1.2.1.	Regulação transcricional da expressão gênica.....	19
1.2.2.	Regulação pós-transcricional da expressão gênica.....	21
1.2.3.	Proteínas de ligação ao RNA e grânulos de ribonucleoproteínas mensageiras.....	24
1.2.4.	A helicase DDX6.....	27
2.	OBJETIVOS.....	32
2.1.	Objetivo geral.....	32
2.2.	Objetivos específicos.....	32
3.	MATERIAL E MÉTODOS.....	33
3.1.	Modelo de estudo.....	33
3.1.1.	Isolamento e cultivo das hASCs.....	33
3.1.2.	Imunofenotipagem por citometria de fluxo.....	34
3.1.3.	Indução para diferenciação adipogênica e osteogênica.....	35
3.1.4.	Marcação com Vermelho Nilo.....	35
3.1.5.	Marcação com OsteoImage.....	36
3.2.	Separação por gradiente de densidade de sacarose e isolamento de RNA.....	36
3.3.	Preparação da biblioteca de cDNA e sequenciamento das amostras de RNA total e associado a polissomos.....	33
3.4.	Análise dos dados de sequenciamento de RNA total e associado a polissomos....	34

3.5.	Ensaio de incorporação de EdU.....	38
3.6.	Análise de ciclo celular.....	38
3.7.	Silenciamento por RNA de interferência.....	38
3.8.	Extração de RNA e qRT-PCR.....	39
3.9.	Análise por imunofluorescência.....	39
3.10.	Eletroforese de proteínas em gel de acrilamida.....	41
3.11.	Coloração com prata.....	41
3.12.	Western Blot.....	41
3.13.	Tratamento de hASCs com RNase.....	42
3.14.	Ensaio de localização de peptídeos nascentes.....	42
3.15.	Quantificação do enriquecimento de DRIPs em grânulos de DDX6 e TIAR.....	43
3.16.	Padronização do protocolo de coimunoprecipitação de DDX6 e seus parceiros...	44
3.16.1.	Lise celular.....	44
3.16.2.	Padronização do protocolo de imunoprecipitação de DDX6 em células HeLa.....	45
3.16.3.	Padronização do protocolo de imunoprecipitação de DDX6 em hASCs.....	47
3.16.4.	Coimunoprecipitação de DDX6 e seus parceiros em hASCs.....	48
3.17.	Análise de amostras de proteínas por espectrometria de massas.....	49
3.18.	Análise dos dados de espectrometria de massas.....	50
3.19.	Análise estatística.....	52
4.	RESULTADOS.....	53
4.1.	Isolamento e caracterização de hASCs.....	53
4.2.	Padronização do protocolo de coimunoprecipitação de DDX6 e seus parceiros...	54
4.3.	Análise de genes regulados positivamente e negativamente durante a diferenciação adipogênica e osteogênica.....	65

4.4.	hASCs induzidas para adipogênese apresentam parada no ciclo celular em G1 por uma via independente de DEPTOR.....	71
4.5.	Análise do perfil de expressão de DDX6 em hASCs.....	75
4.5.1	. DDX6 localiza-se dispersa no citoplasma de hASCs e é observada em estruturas granulares.....	75
4.5.2.	Grânulos de DDX6 observados em hASCs são dependentes de RNA.....	76
4.5.3.	Grânulos de DDX6 observados em hASCs colocalizam com Dcpl1a e, sob estresse, com TIA1 e PABP.....	77
4.5.4.	Grânulos de DDX6 observados em hASCs são enriquecidos com produtos ribossômicos defeituosos apenas quando é feita a indução de estresse.....	82
4.6.	hASCs induzidas para adipogênese e osteogênese por 24 horas apresentam mudança no padrão de distribuição de DDX6.....	88
4.7.	Grânulos de DDX6 presentes em hASCs induzidas para adipogênese e osteogênese são dependentes de RNA, mas não acumulam DRIPs.....	90
4.8.	Grânulos de DDX6 observados em hASCs induzidas para diferenciação adipogênica e osteogênica colocalizam com Dcpl1a, mas não com TIA1 e PABP.....	93
4.9.	Associação de DDX6 a diferentes complexos durante a diferenciação adipogênica e osteogênica.....	97
4.10.	Coimunoprecipitação de DDX6 e seus parceiros em hASCs induzidas para adipogênese e osteogênese por 24 horas.....	99
4.11.	Em hASCs, DDX6 associa-se a complexos de proteínas envolvidas na regulação do ciclo de vida do RNAm.....	103
5.	DISCUSSÃO E PERSPECTIVAS	109
5.1.	Isolamento e caracterização de hASCs.....	109
5.2.	Padronização do protocolo de coimunoprecipitação da proteína DDX6 e seus parceiros.....	110
5.3.	hASCs induzidas para adipogênese apresentam forte regulação negativa de ciclo celular.....	112
5.4.	A helicase DDX6 está dispersa no citoplasma de hASCs e em grânulos dependentes de RNA que se assemelham a <i>P-bodies</i>	117

5.5.	hASCs induzidas para adipogênese e osteogênese apresentam mudança na localização de DDX6.....	120
5.6.	Análise do conteúdo de complexos associados a DDX6 em hASCs após 24 horas de adipogênese e de osteogênese.....	123
6.	CONCLUSÕES	131
7.	REFERÊNCIAS	133
	ANEXOS	144

1. INTRODUÇÃO

1.1. Células-tronco

As células-tronco caracterizam-se por sua capacidade de se autorrenovar e de dar origem a diferentes tipos celulares. Além disso, estas células podem ser mantidas por longos períodos, mas têm suas características e comportamento determinados pelo meio (nicho) em que se encontram (Slack, 2018). As células-tronco são classificadas em três tipos principais: as embrionárias, as pluripotentes induzidas (*induced pluripotent stem cells*, iPSCs) e as adultas. As células-tronco embrionárias são obtidas da massa celular interna do blastocisto em desenvolvimento e caracterizam-se por serem pluripotentes, ou seja, têm a capacidade de dar origem a células dos três folhetos embrionários (Evans e Kaufman, 1981; Martin, 1981; Thomson *et al.*, 1998). Já as iPSCs são obtidas a partir de células somáticas, que são reprogramadas para recuperar sua pluripotencialidade (Takahashi *et al.*, 2007; Takahashi e Yamanaka, 2006). As células-tronco adultas, por sua vez, podem ser encontradas nos tecidos adultos, onde atuam na renovação e na manutenção da homeostase do tecido (Fuchs e Segre, 2000). Dentre as células-tronco adultas, estão as chamadas células-tronco mesenquimais, as quais têm origem na mesoderme e possuem a capacidade de formar diferentes linhagens, como adipócitos, osteócitos e cartilagem. Além disso, ao longo dos anos, diversos trabalhos demonstraram um importante papel destas células como sinalizadoras, secretando fatores imunomoduladores e tróficos, os quais possuem um importante papel no processo de regeneração tecidual, o que amplia ainda mais as possibilidades de aplicação destas células na medicina (Caplan, 2017).

1.1.1. As células-tronco obtidas de tecido adiposo humano

Ao se avaliar o potencial uso de células-tronco adultas na medicina regenerativa, é importante considerar alguns fatores, como o acesso a grandes quantidades de material através de métodos pouco ou mesmo não invasivos, a facilidade de cultivo e a capacidade de diferenciação por metodologias bem estabelecidas e reprodutíveis. Estas características são observadas em células-tronco derivadas de tecido adiposo (Kocan *et al.*, 2017). O tecido adiposo é um tecido conjuntivo que tem como principais funções: reserva energética, preenchimento, proteção térmica e mecânica, além de participar do sistema endócrino com a secreção de citocinas e fatores de crescimento e de processos inflamatórios (Trayhurn e Beattie, 2001). As células-tronco derivadas de tecido adiposo humano (*human adipose tissue-derived*

stem cells, hASCs) têm origem mesodermal e podem ser isoladas de material que normalmente é descartado em cirurgias que envolvem lipossucção, sendo que este procedimento é considerado bem tolerado e seguro e permite a obtenção de uma grande quantidade de células-tronco (Baer e Geiger, 2012; Rebelatto *et al.*, 2008). O protocolo seguido para isolamento das hASCs também é considerado simples e eficiente. Em geral, o tecido adiposo é submetido à digestão enzimática (colagenase tipo I), centrifugado e incubado com soluções salinas para lise de células sanguíneas, sendo que o critério final para obtenção das células-tronco é sua capacidade de adesão ao plástico (Baer e Geiger, 2012; Rebelatto *et al.*, 2008; Zuk *et al.*, 2001). Diversos fatores podem influenciar as características da população de hASCs, como o local de extração do tecido no organismo, a idade dos doadores, os meios de cultura utilizados e outras condições de cultivo, como densidade de plaqueamento e número de repiques realizados. Assim, os protocolos utilizados devem ser bem padronizados e considerados nas análises realizadas com hASCs (Kocan *et al.*, 2017).

O isolamento de hASCs foi primeiramente estabelecido por Zuk e colaboradores (Zuk *et al.*, 2002). A partir de amostras de lipoaspirados, foram isoladas células de morfologia fibroblastoide, que puderam ser mantidas em cultura por longos períodos de tempo e capazes de dar origem às linhagens adipogênica, condrogênica, osteogênica e miogênica, tanto em cultura direta (Zuk *et al.*, 2001), quanto a partir de ensaios de clonagem (Zuk *et al.*, 2002). Ao longo dos anos, diversos estudos demonstraram que, além da capacidade de dar origem a células de diferentes fenótipos, as hASCs também desempenham um papel trófico, ou seja, possuem capacidade de promover a regeneração tecidual ao estimular a proliferação de células locais e invasoras (Kocan *et al.*, 2017) e também parácrino, através da secreção de citocinas, como fatores angiogênicos, antiapoptóticos (Rehman *et al.*, 2004), fatores hematopoiéticos e pró-inflamatórios (Kilroy *et al.*, 2007), além de vesículas extracelulares (Choi *et al.*, 2017; Kang *et al.*, 2016), aumentando ainda mais as possibilidades de aplicação na medicina. Diante disso, a compreensão mais completa da biologia e regulação destas células, dos processos envolvidos na manutenção de seu estado multipotente e também durante processos de diferenciação se mostra um ponto importante para melhor aproveitar seu potencial uso na medicina.

1.1.2. Adipogênese e osteogênese

Conforme descrito anteriormente, no organismo, as células-tronco adultas atuam na manutenção da homeostase e na regeneração tecidual (Fuchs e Segre, 2000). O tecido ósseo, por exemplo, passa por um constante remodelamento. Estima-se que, em adultos, o esqueleto

seja renovado a cada 7 anos. Esta renovação envolve a constante absorção óssea por osteoclastos e a formação de tecido novo a partir de osteoblastos em um processo altamente equilibrado. Os osteoblastos são formados a partir de células-tronco mesenquimais encontradas na medula óssea. Estas mesmas células são capazes de dar origem a outras linhagens celulares, dentre as quais adipócitos (Chen *et al.*, 2016; Muruganandan, Roman e Sinal, 2009). Estudos demonstram que fatores e vias que estimulam a osteogênese inibem a adipogênese. Da mesma forma, a indução adipogênica leva à inibição da osteogênese (Beresford *et al.*, 1992; James *et al.*, 2010). No organismo, o desequilíbrio entre a diferenciação adipogênica e osteogênica na medula óssea pode desencadear diversas doenças, por isso a compreensão dos mecanismos que levam ao comprometimento com cada uma destas linhagens torna-se de grande relevância (Chen *et al.*, 2016).

O processo de diferenciação adipogênica e osteogênica em células-tronco envolve dois passos principais: o comprometimento com uma determinada linhagem – passando de células-tronco a progenitores comprometidos - e a maturação – passando de progenitores a tipos celulares específicos (Chen *et al.*, 2016). *In vitro*, o processo de osteogênese pode ser induzido com o uso de meio contendo ácido ascórbico, β -glicerofosfato e dexametasona. Estes fatores levam ao aumento da expressão de FHL2, TAZ, MKP-1 e Col1, os quais estão envolvidos no aumento da expressão e na atividade de RUNX2, um dos principais fatores transcricionais envolvidos no desencadeamento da diferenciação osteogênica. Além disso, o β -glicerofosfato serve como fonte de fosfato para formação de cristais de hidroxiapatita, que marca o processo de mineralização, característico de osteoblastos (Langenbach e Handschel, 2013). Já o processo de diferenciação adipogênica pode ser estimulado *in vitro* pelo uso de insulina, glicocorticoides e fatores que estimulam a produção de cAMP (como isobutilmetilxantina, IBMX) (Chapman *et al.*, 1984; MacDougald e Lane, 1995; Ringold, Chapman e Knight, 1986; Rosen *et al.*, 2000). Dentre os fatores envolvidos no início da diferenciação adipogênica estão as C/EPBs (*CCAAT/enhancer binding proteins*) e o PPAR γ (*peroxisome proliferator-activated receptor- γ*) (Cao, Umek e McKnight, 1991; Shao e Lazar, 1997). A diferenciação terminal, por sua vez, é marcada pela expressão de fatores como glicerofosfato desidrogenase, sintase de ácidos graxos (*fatty acid synthase*, FAS), acetil CoA carboxilase, enzima málica, transportador de glicose tipo 4 (Glut 4), receptor de insulina e aP2 (*adipocyte-selective fatty acid binding protein*), e pelo acúmulo de inclusões lipídicas, características de adipócitos (Rosen *et al.*, 2000).

Em artigos prévios de nosso grupo, foi demonstrado que hASCs induzidas para diferenciação adipogênica passam por uma importante regulação pós-transcricional da expressão gênica. Em trabalho publicado em 2013, foram analisadas hASCs induzidas para

adipogênese por três dias, sendo demonstrado que, após este período de tratamento, as células já se encontram comprometidas com esta linhagem celular. Ao comparar os resultados obtidos pelo sequenciamento de RNAm total e da fração associada a polissomos, foi constatado que cerca de 60% dos genes diferencialmente expressos nas primeiras 72 horas de adipogênese apresentavam algum nível de regulação pós-transcricional. Além disso, constatou-se que 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). Posteriormente, utilizando-se a técnica de *ribosome profiling*, foi demonstrado que hASCs induzidas para adipogênese por três dias passam por uma forte regulação traducional, com redução da expressão de genes relacionados à síntese proteica, além de apresentarem redução de tamanho, menor atividade proliferativa e migratória. Através de ensaio de incorporação de metionina, também foi observado que hASCs induzidas para adipogênese possuem redução da taxa de síntese proteica, a qual já pôde ser observada após 12 horas de tratamento com meio de diferenciação adipogênica (Marcon *et al.*, 2017). Estas observações sugerem que há uma importante regulação da expressão gênica no início do processo de adipogênese em hASCs.

1.2. Regulação da expressão gênica

Para melhor aproveitar o potencial das células-tronco em terapias celulares, é importante compreender os mecanismos envolvidos na manutenção da sua potencialidade e o que determina a entrada em diferenciação. A compreensão de como se dá a regulação da expressão gênica durante estes processos é um passo fundamental. A expressão gênica envolve quatro etapas principais: transcrição, controle da vida média do RNAm, tradução e degradação de proteínas (Schwanhäusser *et al.*, 2011).

1.2.1. Regulação transcricional da expressão gênica

A síntese de RNAm é realizada pela RNA polimerase II, a qual é composta por 12 subunidades. A associação da enzima com o DNA é feita em conjunto com os chamados fatores gerais de transcrição (TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIIF e TFIIH), dando origem ao chamado complexo de pré-iniciação. Os fatores gerais de transcrição auxiliam na ligação da RNA polimerase com a região promotora e na abertura da dupla fita de DNA, formando a chamada bolha de transcrição e dando início à síntese de um precursor de RNAm (revisado por Sainsbury

et al., 2015). Além dos fatores gerais, há ainda outros elementos que participam deste processo de iniciação que são específicos de genes ou grupos de genes. Estes fatores e cofatores se ligam a sequências de DNA que podem estar em regiões distantes do genoma chamadas *enhancers*, as quais funcionam como plataformas operacionais, recrutando fatores e contribuindo para o aumento da taxa de transcrição gênica (revisado por Heinz et al., 2015; Spitz and Furlong, 2012). A participação dos fatores e cofatores neste processo de iniciação não apenas auxiliam no início da transcrição, mas também funcionam como uma forma de regular todo o processo.

Na etapa de alongação, por sua vez, uma das principais formas de regulação é através do controle da velocidade da RNA polimerase. Logo no início da síntese do RNA, a enzima tem um atraso em seu avanço (*pausing*), ficando acumulada na proximidade da região promotora e do sítio de início de transcrição. Este atraso possui tanto funções de controle de qualidade (como checagem do capeamento da extremidade 5' do RNA) quanto regulatória, e pode ser influenciado pela presença de reguladores negativos, ou mesmo de nucleossomos presentes na proximidade da região promotora. A liberação da RNA polimerase por sua vez é estimulada pela presença de fatores positivos de alongação e de ciclinas, como a ciclina T1. Além desta etapa de início, a continuidade da alongação também pode ser regulada, com a velocidade de avanço da RNA polimerase variando entre genes e mesmo dentro do mesmo gene. Estudos apontam que esta regulação da velocidade está relacionada tanto a características do próprio gene (como número de exons), quanto a modificações nas histonas de nucleossomos próximos (revisado por Jonkers and Lis, 2015). A etapa de terminação da transcrição, por sua vez, também auxilia na regulação da expressão gênica, ao se delimitar os limites da sequência do transcrito e finalizar a estruturação do RNAm, com a clivagem da extremidade 3' e adição da cauda poliA (revisado por Porrua and Libri, 2015). Diversas proteínas associam-se ao pré-RNAm à medida em que este vai sendo transcrito, promovendo modificações, como a excisão dos introns, adição dos complexos que marcam as junções entre exons, do *cap* 5'7-metilguanisona (m^7G) e da cauda poliA (Gehring, Wahle e Fischer, 2017). Além de serem importantes para a estrutura e funcionalidade do RNAm, estas modificações também servem como pontos de controle da qualidade do transcrito, sendo que a falta destes elementos pode determinar o encaminhamento da molécula para degradação.

A síntese do RNAm também é regulada pelo grau de enovelamento dos nucleossomos ao redor do local onde está ocorrendo a transcrição, que está diretamente relacionado a modificações pós-traducionais de suas proteínas, como acetilação e metilação. Além disso, o próprio DNA pode sofrer alterações que determinam a acessibilidade da maquinaria de transcrição, como metilação. Estas modificações que determinam o remodelamento da

cromatina participam da regulação da expressão gênica e podem ser passadas de uma geração a outra, sendo chamadas de epigenéticas, uma vez que não estão relacionadas a mudanças na sequência nucleotídica em si (revisado por Allis and Jenuwein, 2016).

1.2.2. Regulação pós-transcricional da expressão gênica

Após a síntese do RNAm, ele é transportado para o citoplasma, onde é traduzido e degradado. Contudo, cada uma destas etapas passa por diferentes tipos de regulação, a fim de controlar o nível, a localização e a qualidade da síntese de proteínas. Em eucariontes, o transporte do RNAm para o citoplasma é feito principalmente através dos complexos de poro nuclear, que permitem a livre passagem de pequenas moléculas (menores do que 30-40kDa/5nm), embora estruturas maiores, como complexos de RNA-proteína (formando as chamadas ribonucleoproteínas, RNPm), não consigam transitar livremente. Um dos desafios do trânsito de RNPm deve-se ao fato de serem complexos bastante diversificados, já que as moléculas de RNAm possuem sequências e tamanhos variados e se associam a diferentes tipos de proteínas. Para atravessar os poros, as RNPm se associam aos receptores de transporte nuclear Mex67-Mrt2 e a outras proteínas adaptadoras em um processo mediado pelo complexo de transporte/exportação TREX. Os receptores de transporte nucleares, por sua vez, interagem com as proteínas do poro para viabilizar a passagem da RNPm. Além de regular o trânsito de moléculas entre núcleo e citoplasma, as proteínas do poro nuclear também fazem um controle de qualidade, impedindo a exportação de moléculas de RNAm aberrantes (revisado por Sloan et al., 2016). Além disso, em 2012, Speese e colaboradores demonstraram em células pós sinápticas a ocorrência de transporte de grandes complexos de RNPm através do brotamento de vesículas na dupla membrana do envelope nuclear (Speese *et al.*, 2012).

Uma vez no citoplasma, o RNAm pode associar-se à maquinaria de tradução. Durante os primeiros ciclos de leitura do transcrito, o RNAm passa por um *screening* de qualidade, o qual pode levar à sua degradação, caso sejam encontradas falhas que comprometam a qualidade do processo. A ausência de elementos como o *cap* 5' ou a cauda poliA são sinais de erro na estrutura no RNAm e funcionam como sinal para ativação do processo de degradação. Além disso, falhas como a presença de códons de parada prematuros, ou ausência de códons de parada no transcrito, ou ainda a presença de elementos que impedem o avanço do ribossomo ao longo da cadeia polinucleotídica desencadeiam o recrutamento de maquinarias de degradação conhecidas como *Nonsense* (NMD), *Nonstop* (NSD) e *No-go Mediated Decay* (NGD), respectivamente (Wu e Brewer, 2012).

O RNAm íntegro, por sua vez, pode ter sua taxa de tradução modulada, provendo uma possibilidade de ajuste fino da expressão gênica na célula. Assim como o processo de transcrição, a tradução de um RNAm pode ser dividida em três etapas principais: iniciação, alongação e terminação; sendo que a etapa de iniciação pode ser dependente ou não do *cap* 5'. Pela via dependente de *cap*, em eucariontes, fatores de início da tradução (*eukaryotic translation initiation factors*, eIFs1, 1A, 3 e 5) se ligam à subunidade menor do ribossomo e em seguida a um complexo ternário ou 43S, composto por um RNAt de metionina, o fator eIF2 e uma guanosina trifosfato (GTP), dando origem ao complexo de pré-iniciação. Ao RNAm, inicialmente se liga o complexo eIF4F, o qual é composto pelos fatores eIF4E (que se liga ao *cap*), eIF4G (que se associa a proteínas de ligação à cauda poliA - *polyA binding proteins*, PABPs) e eIF4A. Este complexo então recruta o complexo de pré-iniciação para o RNAm, formando o complexo 48S. Ao se ligar ao transcrito, a subunidade menor do ribossomo faz a varredura do RNAm até chegar ao códon de iniciação. A subunidade maior do ribossomo é então recrutada através da intermediação de eIF5b, enquanto os fatores eIF1, 2-GTP, 3 e 5 são liberados. O GTP associado a eIF5b é clivado, sendo liberado GDP+Pi, além dos fatores eIF1A e eIF5B, tendo então início a etapa de alongação (Kong e Lasko, 2012). Tendo em vista a participação de uma série de fatores em cada passo do início de tradução, uma das formas de regulação é através da ação de inibidores competitivos dos fatores de iniciação como a proteína de ligação a eIF4E, 4E-BP1 (*eIF4E binding protein 1*) (Pause *et al.*, 1994), ou de modificações pós-traducionais que alteram a função destas proteínas, como a fosforilação de eIF2a (Donnelly *et al.*, 2013).

A etapa de alongação, por sua vez, também pode ser regulada, através da modulação da velocidade de avanço dos ribossomos. Além de influenciar na taxa de síntese da proteína, esta regulação da velocidade pode também levar a mudanças no dobramento do polipeptídeo ou mesmo desencadear a desmontagem do polissomo e a degradação do RNAm (Ingolia, Lareau e Weissman, 2011; Radhakrishnan *et al.*, 2016; Sweet, Kovalak e Coller, 2012; Zhang, Hubalewska e Ignatova, 2009).

As etapas de controle da taxa de tradução podem levar tanto a um silenciamento definitivo de um transcrito, encaminhando-o para a via de degradação, ou transiente. O silenciamento e armazenamento temporário do RNAm pode ser utilizado tanto para controlar o *timing*, quanto a localização do produto proteico na célula. Em células neuronais, por exemplo, RNAm específicos são silenciados ao chegarem ao citoplasma e são transportados até os dendritos para só então serem traduzidos (Eberwine *et al.*, 2001). Já os oócitos estocam transcritos que serão utilizados durante as primeiras etapas do desenvolvimento embrionário.

Durante este período, a atividade transcricional é fortemente reduzida, sendo que a síntese proteica é feita majoritariamente com base nestas moléculas de RNAm que haviam sido armazenadas (Ladomery, Wade e Sommerville, 1997).

Parte importante da homeostase celular é o *turnover* das moléculas de RNA, ou seja, a sua degradação e reaproveitamento dos nucleotídeos para síntese de novas moléculas. Conforme descrito anteriormente, a ausência de elementos como a cauda poliA e o *cap 5'* são sinais que marcam o transcrito para degradação. Assim, a principal via de degradação de RNAm tem início com a degradação da cauda poliA, através da ação das nucleases Pan2-Pan3 e posteriormente do complexo Ccr4-NOT (Wu e Brewer, 2012). Em seguida, o processo de degradação pode seguir em dois sentidos, 5'-3' ou 3'-5'. Para a quebra 5'-3', primeiramente a maquinaria de decapeamento da molécula é ativada. Fazem parte deste complexo a enzima decapeadora Dcp2 e sua ativadora Dcp1 (Dunckley e Parker, 1999; Lykke-Andersen, 2002). Uma vez que estes elementos tenham sido removidos, a degradação do RNAm tem continuidade com a ação da exonuclease XRN1, que atua no sentido 5'-3' (Wu e Brewer, 2012). Outra via importante de degradação do RNA é promovida pela ação de exossomos. Estes complexos multiproteicos podem ser recrutados após a remoção da cauda poliA e promovem a quebra da molécula de RNA no sentido 3'-5', sendo que a degradação do *cap 5'* é realizada ao final do processo, através da atuação da enzima DcpS (Wu e Brewer, 2012).

Estas diferentes etapas de regulação fazem com que o nível de proteínas na célula não seja um reflexo direto no nível de RNAm. Nos últimos anos, diferentes trabalhos evidenciaram a importância da regulação pós-transcricional e traducional para o controle da expressão gênica. Estudos demonstraram que 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 (Schwanhäusser *et al.*, 2011; Tian *et al.*, 2004). Conforme descrito anteriormente, dois trabalhos anteriores realizados em nosso laboratório, utilizando as técnicas de *polysome profiling* e de *ribosome profiling*, mostraram que mais de 60% dos genes diferencialmente expressos durante a diferenciação adipogênica de hASCs apresentavam algum nível de regulação pós-transcricional (Marcon *et al.*, 2017; Spangenberg *et al.*, 2013). Conforme descrito anteriormente, no trabalho publicado em 2017, foi demonstrado também que hASCs induzidas para adipogênese apresentam redução da atividade traducional após 12 horas de tratamento (Marcon *et al.*, 2017). Contudo, ainda faltam estudos que elucidem quais processos estão envolvidos nestas primeiras etapas de diferenciação e como se dá a regulação da expressão gênica durante este período.

1.2.3. Proteínas de ligação ao RNA e grânulos de ribonucleoproteínas mensageiras

A regulação do uso do RNAm pela célula através do controle de sua localização, tradução e estabilidade envolve a atuação de outros elementos, como é o caso das proteínas de ligação ao RNA (*RNA-binding proteins*, RBPs), dos RNAs não codificantes e de outras pequenas moléculas, como íons, formando as partículas de RNPm (Gehring, Wahle e Fischer, 2017). As RBPs podem reconhecer tanto uma sequência nucleotídica quanto estruturas secundárias do RNA alvo. A associação de RBPs ao RNA frequentemente é feita através de domínios característicos de ligação, como é o caso do motivo de reconhecimento de RNA (*RNA recognition motif*, RRM), dos domínios de homologia K (*K-homology domain*, KH), dedos de zinco (*zinc fingers*), DEAD-box e do motivo de reconhecimento de RNA dupla fita (Gehring, Wahle e Fischer, 2017; Hentze *et al.*, 2018). Além disso, nos últimos anos, diferentes estudos vêm demonstrando que esta associação pode ser feita por interações não-canônicas envolvendo complexos proteicos (Hentze *et al.*, 2018).

De acordo com a diversidade de alvos, as RBPs podem ser classificadas em três grupos gerais: as proteínas *core* comuns, que se ligam a todos os RNAm em fases específicas de seu ciclo de vida e fazem parte de mecanismos gerais de processamento, como é o caso das proteínas que promovem o *splicing*, a adição do *cap* 5' e da cauda poliA; as proteínas específicas, que reconhecem determinadas sequências ou estruturas de um grupo restrito de RNAs, ligando-se ao transcrito com alta afinidade; e as proteínas não-específicas, que possuem uma especificidade baixa, reconhecendo uma maior variedade de transcritos, como é o caso de helicases da família DEAD-box. Frequentemente, a associação destas RBPs não-específicas pode ser direcionada através da interação com outras proteínas ou complexos proteicos, conferindo uma maior especificidade para sua atividade (Gehring, Wahle e Fischer, 2017).

No citoplasma de eucariontes, são encontradas regiões onde muitos destes complexos ribonucleoproteicos de manutenção e degradação de RNA se concentram, formando os chamados grânulos de RNPm. Estas organelas não possuem membrana e apresentam um comportamento de estrutura líquida, mantendo-se em uma fase separada do restante do citoplasma (Elbaum-Garfinkle *et al.*, 2015; Jain *et al.*, 2016; Lin *et al.*, 2015; Molliex *et al.*, 2015; Standart e Weil, 2018). O processo de montagem dos grânulos de RNPm envolve a formação de agregados, os quais incluem a presença de proteínas que tendem a interagir umas com as outras. Entre os fatores que podem levar a esta agregação, está a presença de domínios *prion-like*, como é o caso de TIA1 (Kedersha *et al.*, 2000), de domínios ricos em glutamina-asparagina, como em LSM4 (Decker, Teixeira e Parker, 2007; Reijns *et al.*, 2008) e de

autointeração, como em Edc3 (Decker, Teixeira e Parker, 2007). Estudos sugerem também que a interação RNA-proteína e entre domínios de regiões desordenadas intrínsecas levam a uma separação de fase líquida-líquida, dando origem à estrutura granular (Lin *et al.*, 2015; Molliex *et al.*, 2015). No caso de grânulos de estresse, Jain e colaboradores propuseram um modelo em que estas estruturas seriam compostas por núcleos estáveis, mantidos por interações proteína-proteína, envoltos por uma camada mais dinâmica mantida por separação de fase líquida-líquida (Jain *et al.*, 2016).

A classificação específica de cada tipo de grânulo de RNPm depende da presença de proteínas características, do contexto celular em que se encontra e de sua função presumida (Buchan, 2014). Dois exemplos de grânulos de RNPm são os de estresse e os de processamento (*P-bodies*). Os grânulos de estresse se formam quando a célula é submetida a uma situação de estresse, reduzindo a atividade traducional, principalmente como resultado da fosforilação do fator de iniciação eIF2 α . Diante dessa situação, os RNAm bloqueados são direcionados para grânulos de estresse, onde são armazenados, podendo posteriormente ser liberados e traduzidos ou enviados para degradação (Kedersha *et al.*, 2000, 2005, 1999). Algumas das proteínas que caracteristicamente compõem os grânulos de estresse são TIA1 e TIAR (Kedersha *et al.*, 1999).

Já os *P-bodies* foram inicialmente caracterizados como regiões do citoplasma da célula em que haveria uma grande concentração e atuação de proteínas envolvidas no decaimento do RNAm, como a enzima decapeadora Dcp2 e o ativadores de decapeamento Dcp1 e DDX6 (Kedersha *et al.*, 2005; Sheth e Parker, 2003). Porém, trabalhos subsequentes sugeriram que estes grânulos também poderiam atuar como complexos de armazenamento de RNAm em situações determinadas (Arribere, Doudna e Gilbert, 2011; Brengues, Teixeira e Parker, 2005; Chu e Rana, 2006). Em trabalho publicado em 2017, Hubstenberger e colaboradores realizaram o isolamento de *P-bodies* através da técnica de FAPS (*fluorescence-activated particle sorting*, separação de partículas ativadas por fluorescência). Estes grânulos purificados continham moléculas de RNAm com a região 5' protegida, porém RNAs antisense e linc - os quais por definição não são traduzidos, mas são degradados pelas mesmas vias que o RNAm – não estavam presentes. Desta forma, os autores sugeriram que os RNAm encontrados em *P-bodies* correspondem a transcritos cujo processo de degradação foi inibido, sendo que as enzimas decapeadoras ali encontradas estariam inativas e/ou que a proteção do 5'-*cap* bloquearia sua atuação. (Hubstenberger *et al.*, 2017). Além disso, estudos de localização de sítios de degradação demonstraram que este processo ocorre no citoplasma da célula, mas não especificamente em *P-bodies* (Horvathova *et al.*, 2017; Tutucci *et al.*, 2018). Assim, estes trabalhos sugerem que, embora os *P-bodies* contenham diversas proteínas ligadas a vias de

decaimento, esta atividade ocorreria principalmente fora destes grânulos, no citoplasma da célula (Luo, Na e Slavoff, 2018; Standart e Weil, 2018) (Figura 1.1). Quanto aos transcritos identificados nos *P-bodies*, observou-se que, em células HEK293, estes grânulos estão enriquecidos em moléculas de RNAm de genes relacionados a funções regulatórias, sendo menos frequente a observação de transcritos de funções básicas, como *housekeeping* (Hubstenberger *et al.*, 2017; Standart e Weil, 2018) (Figura 1.1).

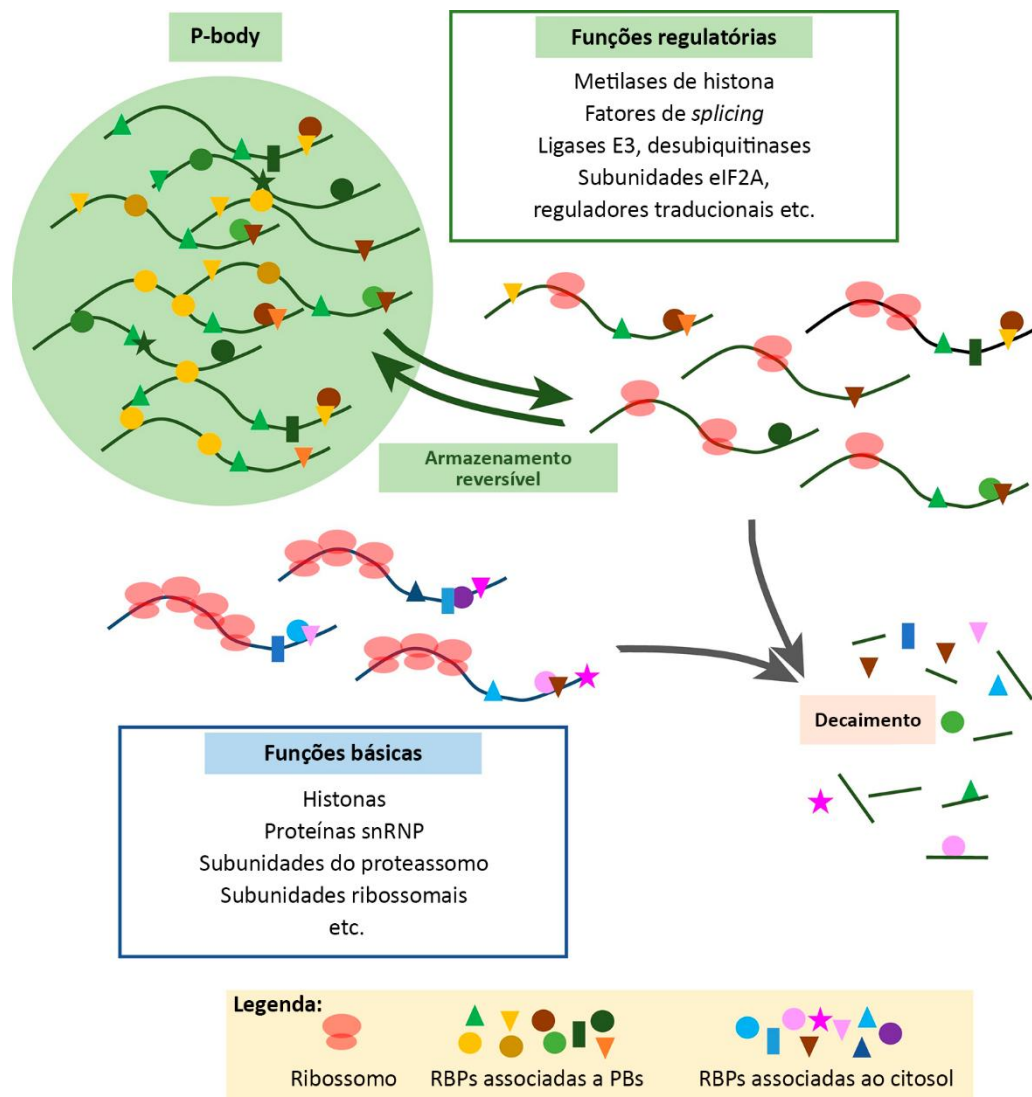


Figura 1.1. Representação esquemática da dinâmica e função dos *P-bodies*. Os *P-bodies* são inclusões viscosas encontradas no citoplasma da célula, as quais contêm moléculas de RNAm tradicionalmente silenciadas ligadas a RBPs. Dentre os transcritos enriquecidos nestas estruturas, estão moléculas com função regulatória. Estas RNPs transitam entre estas inclusões viscosas e o citoplasma, onde podem tanto ser direcionadas para a síntese proteica quanto para o processo de degradação. Embora os *P-bodies* contenham proteínas ligadas a vias de decaimento do RNAm, acredita-se que esta atividade ocorra principalmente no citoplasma, fora destas estruturas (adaptado de Standart e Weil, 2018).

Uma das características comuns entre os grânulos de RNPm é o fato de serem formados por RNAm silenciados (Buchan, 2014). Além disso, os grânulos atuam em constante interação com os polissomos, sendo que o RNAm pode transitar entre estas estruturas (Bregues, Teixeira e Parker, 2005; Kedersha *et al.*, 2000; Sheth e Parker, 2003). Assim, a utilização de drogas que bloqueiam a síntese proteica em diferentes etapas afeta a formação de grânulos de RNPm. A cicloheximida, por exemplo, bloqueia o avanço dos ribossomos sobre o RNAm e impede que o polissomo seja desmontado. Por isso, a utilização desta droga leva à redução da quantidade e do tamanho de grânulos de estresse (Kedersha *et al.*, 2000) e *P-bodies* (Sheth e Parker, 2003).

Os grânulos de RNPm também podem interagir entre si, podendo sofrer fusões, troca de elementos ou mesmo representar diferentes estágios de maturação (Buchan, 2014). Assim, para cada tipo de célula e durante diferentes estágios do ciclo de vida, podem ser formadas diferentes composições de ribonucleoproteínas, as quais participam e representam uma parte dos mecanismos de regulação da expressão gênica que estão sendo desenvolvidos em um determinado cenário celular.

1.2.4. A helicase DDX6

DDX6 é uma proteína de aproximadamente 54 kDa que pertence a uma subfamília altamente conservada de helicases DEAD-box. As proteínas DEAD-box possuem uma sequência motivo altamente conservada, a qual é necessária para sua função RNA helicase. Fazem parte desta sequência nove domínios conservados, dentre os quais o motivo II, que contém os aminoácidos Asp-Glu-Ala-Asp (D-E-A-D), de onde deriva o nome do grupo. Os motivos DEAD, I, Q e VI são necessários para a função de ligação e hidrólise de ATP (adenosina trifosfato), necessária para a função helicase (revisado por Linder, 2006). Dentro da subfamília de DDX6, estão os homólogos Dhh1p encontrado em *Saccharomyces cerevisiae*, CGH1 em *Caenorhabditis elegans*, Me31B em *Drosophila*, Xp54 em *Xenopus* e RCK/p54 em mamíferos (Ladomery, Wade e Sommerville, 1997; Minshall *et al.*, 2009; Weston e Sommerville, 2006). Embora a proteína encontrada em humanos tenha sido inicialmente denominada RCK/p54, nos últimos anos diversos grupos vêm adotando a nomenclatura DDX6 (Ayache *et al.*, 2015; Huang *et al.*, 2017; Taniguchi *et al.*, 2018; Wang, Y. *et al.*, 2015), sendo por isso esta a forma utilizada no presente estudo. Apesar de serem proteínas altamente conservadas, as diferenças mais significativas encontradas entre os homólogos de DDX6 em diferentes espécies estão nas regiões próximas às extremidades C e N terminal, o que pode estar

relacionado às variadas interações observadas em células e organismos distintos (Weston e Sommerville, 2006).

Ao longo dos anos, diferentes trabalhos demonstraram que DDX6 e seus homólogos podem ter diferentes funções. Através de ensaios de interação (como imunoprecipitação e TAP-tag), demonstrou-se que DDX6 (ou seus homólogos em diferentes espécies) é capaz de se associar com proteínas que participam da maquinaria de decapeamento, como Dcp1, EDC3, EDC4, Lsm1 e Pat 1; proteínas mediadoras da tradução, como eIF4E, e de repressão traducional, como 4E-T, ataxina 2/2L (ATXN2 e ATXN2L), LSM14; além de outras RBPs como YBX1, IGF2BP2 E FXR1, proteínas de ligação à cauda poliA e proteínas ribossomais (Ayache *et al.*, 2015; Coller *et al.*, 2001; Wang, Y. *et al.*, 2015); o que sugere a participação desta proteína em diferentes etapas do ciclo de vida do RNAm. Interessantemente, trabalhos demonstraram que DDX6 ou seus homólogos em diferentes espécies encontram-se em excesso molar com relação ao número de moléculas de RNAm (Ernoul-Lange *et al.*, 2012; Kramer *et al.*, 2010). Em células HeLa, por exemplo, haveria uma média de 2×10^6 moléculas de DDX6, enquanto que a estimativa média de moléculas de RNAm é de 3×10^5 por célula (Ernoul-Lange *et al.*, 2012).

Em estudo com oócitos de *Xenopus*, Lodomery e colaboradores identificaram a presença de Xp54 (homólogo de DDX6 na espécie) em partículas de RNPm, responsáveis pelo armazenamento de transcritos, sugerindo que esta proteína poderia estar associada à inibição traducional e ao armazenamento de RNAm durante os estágios iniciais do desenvolvimento embrionário, período em que a atividade transcricional da célula é altamente limitada (Lodomery, Wade e Sommerville, 1997). Também em oócitos de *Xenopus* e em células HeLa, foi demonstrado que DDX6 é realmente capaz de se associar e inibir a tradução de RNAm alvos, atividades reguladas pelos domínios conservados da família DEAD-box (Minshall *et al.*, 2009). DDX6 e seus homólogos também já foram identificados em grânulos de estresse, os quais são estruturas caracterizadas pelo armazenamento de transcritos silenciados (Nonhoff *et al.*, 2007; Wilczynska *et al.*, 2005). Além disso, trabalhos com diferentes organismos demonstraram que DDX6 e seus homólogos são capazes de inibir a síntese proteica por diferentes mecanismos, como: através da inibição da formação do complexo de pré-iniciação 48S (Coller e Parker, 2005); ao se associar com proteínas do complexo RISC, como as argonautas 1 e 2, atuando junto à via de decaimento mediada por microRNAs (Chu e Rana, 2006); associando-se à maquinaria de deadenilação (Chen *et al.*, 2014; Ozgur *et al.*, 2015); e ativando a via de decapeamento de RNAm (Coller *et al.*, 2001).

O papel de DDX6 na repressão traducional e na via de decaimento de transcritos também faz com que esta proteína e seus homólogos sejam encontrados em *P-bodies* (Chu e Rana, 2006; Coller e Parker, 2005; Hubstenberger *et al.*, 2017; Sheth e Parker, 2003), sendo necessária para a montagem e manutenção destes complexos (Ayache *et al.*, 2015; Chu e Rana, 2006; Coller e Parker, 2005; Minshall *et al.*, 2009). Cerca de metade das proteínas encontradas em *P-bodies* isolados pela técnica de FAPS são parceiros conhecidos de DDX6, o que sugere um papel central desta helicase na montagem destes grânulos (Hubstenberger *et al.*, 2017; Standart e Weil, 2018). Mas, apesar de sua importância para montagem de *P-bodies*, a helicase é encontrada majoritariamente dispersa no citoplasma, fora destas estruturas (Ayache *et al.*, 2015; Ernoult-Lange *et al.*, 2012) e também no núcleo, embora em menor quantidade (Huang *et al.*, 2017). DDX6 também é capaz de se associar a polissomos, estando tanto relacionada com a ativação (Wang, Y. *et al.*, 2015), quanto com a repressão traducional (Radhakrishnan *et al.*, 2016; Sweet, Kovalak e Coller, 2012). Dois trabalhos demonstraram que Dhh1p (homólogo de DDX6 em leveduras) atua no monitoramento da velocidade traducional. Em 2012, Sweet e colaboradores demonstraram que Dhh1 associa-se a polissomos lentos por uma via independente dos fatores de iniciação eIF4E e eIF3b (Sweet, Kovalak e Coller, 2012). Já em 2016, Radhakrishnan e colaboradores identificaram que Dhh1p atua como um sensor de velocidade traducional, associando-se a RNAm com códons subótimos em que a velocidade traducional é reduzida e encaminhando-os para degradação, estabelecendo um *crossstalk* entre a tradução e o decaimento de RNAm (Radhakrishnan *et al.*, 2016).

Trabalhos anteriores também abordaram o papel de DDX6 em diferentes tipos de células-tronco. O silenciamento de DDX6 em células-tronco embrionárias levou ao aumento da expressão de alvos de microRNAs. Este incremento não esteve relacionado com mudanças na estabilidade destes RNAm alvos, mas sim de sua taxa de tradução (Freimer, Hu e Belloch, 2018). Por outro lado, Kami e colaboradores demonstraram que DDX6 possui um papel fundamental na obtenção de iPSCs a partir de células TIG-1 (fibroblastos derivados de pulmão fetal humano), atuando na degradação do RNAm parental (Kami *et al.*, 2018).

Em células-tronco neurais, foi demonstrado que DDX6 associa-se a TRIM32, aumentando a atividade do microRNA Let-7a e estimulando a diferenciação neuronal, através de um processo dependente de sua atividade helicase. Além disso, a superexpressão de DDX6 levou à redução da atividade proliferativa nestas células, enquanto que o silenciamento causou ao aumento da proliferação e redução da neurogênese (Nicklas *et al.*, 2015). Já Wang e colaboradores demonstraram o envolvimento de DDX6 na regulação da proliferação e diferenciação de progenitores epidermais através da associação com diferentes complexos

proteicos, inclusive com polissomos. Observou-se que DDX6 e eIF4E podem ser recrutados por YBX1 e se ligam a transcritos relacionados à proliferação (CDK1, CDK2, HMGB2, TOP2) e à manutenção do estado de *stemness* (EZH2, ACTL6A), facilitando sua tradução. Por outro lado, também se constatou que DDX6 pode se associar a EDC3 e levar à desestabilização do mRNA de KLF4 (Wang, Y. *et al.*, 2015), um fator transcricional fundamental para a diferenciação epidermal terminal (Segre, Bauer e Fuchs, 1999). A perda de DDX6 em progenitores de células musculares também levou a um aumento da expressão de genes de diferenciação e redução de proliferação (Wang, Y. *et al.*, 2015). Em uma tese de Doutorado desenvolvida no grupo, Cofré verificou que o *knockdown* de DDX6 concomitantemente com a indução para diferenciação adipogênica levou ao amadurecimento mais rápido dos adipócitos, aumentando a quantidade de inclusões lipídicas nas células, quando comparado ao controle (Cofré, 2015).

Em conjunto, estes trabalhos demonstram que DDX6 possui um importante papel na regulação pós-transcricional de diferentes tipos celulares, atuando inclusive no processo de diferenciação de células-tronco. Estas atividades estão frequentemente relacionadas à associação com diferentes proteínas, sendo que a participação em complexos com composições distintas pode levar à participação de DDX6 em atividades diversificadas. Além disso, outros grupos já demonstraram que a desregulação no nível de DDX6 está envolvida em diferentes tipos de câncer (Hashimoto *et al.*, 2001; Nakagawa *et al.*, 1999; Taniguchi *et al.*, 2018), o que destaca a importância de estudos sobre seu funcionamento para medicina.

Tendo em vista as informações apresentadas, levantou-se a hipótese de que o estímulo para diferenciação adipogênica e osteogênica poderia levar a mudanças na expressão gênica de hASCs já nas primeiras 24 horas de tratamento com meio indutor. Através da análise e comparação de dados de sequenciamento de RNAm total e polissomal, será possível ter um panorama geral de quais genes estão diferencialmente expressos neste contexto e de qual o nível principal de regulação: pelo controle de abundância de RNAm ou na associação com a maquinaria traducional. Além disso, a identificação destes genes diferencialmente expressos poderia dar indícios do grau de comprometimento das hASCs com o processo de diferenciação nestas duas linhagens celulares nas primeiras 24 horas de tratamento com meio de indução. O fato de que trabalhos anteriores demonstraram que a helicase DDX6 atua em diferentes níveis de regulação do ciclo de vida do RNAm, participando inclusive do processo de diferenciação de diferentes tipos de células-tronco em diversos fenótipos, também levantou a hipótese de que ela poderia participar deste disparo dos processos de adipogênese e osteogênese, atuando em conjunto com diferentes proteínas. A análise da presença e do comportamento de DDX6 em

hASCs mantidas em meio não-indutor e após a indução para adipogênese e osteogênese, e a caracterização dos complexos aos quais ela se associa poderia dar indícios de uma possível participação da helicase neste contexto. Estas informações poderão se somar aos demais trabalhos do nosso e de outros grupos com o intuito de compreender os mecanismos envolvidos no disparo da diferenciação adipogênica e osteogênica, a fim de elucidar tanto processos que ocorrem no organismo, quanto visando ao aproveitamento e utilização do potencial das células-tronco em possíveis aplicações na medicina.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Analisar a regulação da expressão gênica em hASCs após 24 horas de indução para diferenciação adipogênica e osteogênica, e avaliar o papel da helicase DDX6 neste processo.

2.2. Objetivos específicos

- Análise do perfil de expressão gênica de hASCs não-induzidas e após a indução para diferenciação adipogênica e osteogênica por 24 horas através do sequenciamento de RNAm total e de RNAm associado a polissomos (*polysome profiling*);

- Análise da atividade proliferativa e do ciclo celular de hASCs não-induzidas e após a indução para diferenciação adipogênica e osteogênica por 24 horas;

- Análise da expressão e distribuição da helicase DDX6 em hASCs não-induzidas e após a indução para diferenciação adipogênica e osteogênica por 24 horas;

-Determinar o conteúdo de complexos de RNPM contendo DDX6 em hASCs não-induzidas e após a indução para diferenciação adipogênica e osteogênica por 24 horas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Modelo de estudo

Foram utilizadas hASCs isoladas de tecido adiposo de doadores submetidos a cirurgia de lipoaspiração. 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 (número de aprovação CAAE: 48374715.8.0000.5248).

3.1.1. Isolamento e cultivo das hASCs

O procedimento para isolamento da hASCs foi padronizado previamente por Rebelatto e colaboradores em 2008 (Rebelatto *et al.*, 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), 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 (cloreto de amônio 0,83%, bicarbonato de sódio 0,1% e ácido etilenodiaminotetracético – EDTA - 0,004%), 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 coletadas através de incubação com tripsina/EDTA (0,25%, Invitrogen) e replaqueadas em passagem 1.

As células-tronco isoladas foram cultivadas em garrafas de 150 cm², com meio de cultivo composto por DMEM, 10% 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 (10%) (Gibco). Após centrifugação (700 x g, 8° C, 5 minutos), as células foram ressuspensas em meio de cultivo e replaqueadas a uma densidade de 1×10^3 a 3×10^3 células por cm^2 .

Para verificação de que as células isoladas possuíam perfil de células-tronco mesenquimais, segundo os critérios estabelecidos por Dominici e colaboradores em 2006, foi feita caracterização imunofenotípica por citometria de fluxo e foi analisada a capacidade de diferenciação em pelo menos dois fenótipos celulares (adipócitos e osteoblastos).

3.1.2. Imunofenotipagem por citometria de fluxo

A caracterização do perfil de expressão proteico das células isoladas foi realizada quanto estas atingiram passagem 4 ou 5. Os anticorpos utilizados estão descritos na tabela 3.1. Foram utilizadas 2×10^5 células para cada antígeno analisado.

Tabela 3.1. Anticorpos utilizados para caracterização do perfil de expressão proteico por citometria de fluxo.

Antígeno	Hospedeiro	Tipo*	Fluoróforo	Fabricante/Catálogo	Diluição
CD90(Thy1)	camundongo	m	FITC	BioLegend/ 328108	1:5
CD105	camundongo	m	PE	E-Bioscience/ 12-1057-42	1:50
CD73	camundongo	m	APC	E-Bioscience/ 17-0739-42	1:50
CD140b	camundongo	m	PE	BD/558821	2:5
CD34	camundongo	m	FITC	E-Bioscience/ 11-0349-42	1:50
CD11b	camundongo	m	PE	BD/557321	1:50
CD45	camundongo	m	APC	E-Bioscience/ 17-0459-73	1:50
CD19	camundongo	m	FITC	E-Bioscience/ 11-0199-73	1:50
HLA-DR	camundongo	m	APC	E-Bioscience/ 17-9956-42	1:50
CD31 (PECAM1)	camundongo	m	FITC	E-Bioscience/ 11-0319-42	1:50

*m = monoclonal; p = policlonal

Para imunofenotipagem, as células foram lavadas duas vezes com BSS-CMF e incubadas com tripsina (0,05%) por 5 minutos a 37° C. A ação da enzima foi, então, inibida com meio de cultura contendo SFB (10%). Após centrifugação (700 x g, 8° C, 5 minutos), as

células foram ressuspensas em PBS contendo 1% de albumina de soro bovino (BSA) e incubadas nesta solução de bloqueio em gelo por 1 hora. As células foram centrifugadas e o sobrenadante foi descartado. Em seguida, as amostras foram incubadas com os anticorpos descritos na tabela 3.1, diluídos em solução de bloqueio, por 1 hora a 4° C e ao abrigo da luz. As células foram centrifugadas, lavadas uma vez com PBS e fixadas com paraformaldeído 4% (incubação por 10 minutos em temperatura ambiente). Por fim, as células foram lavadas duas vezes com PBS, ressuspensas nesta mesma solução e analisadas. A análise por citometria de fluxo foi realizada nos citômetros de fluxo FACS Calibur (BD) ou FACSAria II (BD) e a análise dos dados foi feita com o programa Flow Jo versão 7.5 (Flowjo).

3.1.3. Indução para diferenciação adipogênica e osteogênica

Para indução de diferenciação adipogênica, foram utilizados os meios de cultivo comerciais *hMSC Adipogenic Differentiation Medium* (meio indutor, Lonza) e *hMSC Adipogenic Maintenance Medium* (meio de manutenção, Lonza). Para o ensaio de análise da capacidade de diferenciação das hASCs, foi seguido um protocolo de tratamento das células por 3 dias com meio de indução e 4 dias com meio de manutenção (recomendado pelo fabricante), sendo que este ciclo foi repetido até um total de 28 dias. 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.

Para indução da diferenciação osteogênica, foi utilizado meio de cultivo comercial *hMSC Mesenchymal Stem Cell Osteogenic Differentiation Medium* (Lonza). Para verificação da capacidade de diferenciação osteogênica das células-tronco isoladas, as células foram tratadas com esse meio por 21 dias, sendo que a troca era realizada a cada 3-4 dias. Ao final deste período, as células foram fixadas com 4% de paraformaldeído por 30 minutos e armazenadas em PBS para posterior marcação com o kit OsteoImage.

O meio de manutenção Lonza foi utilizado como controle nos ensaios de *polysome profiling*, imunofluorescência, ensaios de imunoprecipitação e Western Blot.

3.1.4. 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

previamente 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, as células foram lavadas com PBS e incubadas com 4',6'-diamidino-2-fenilindol dihidroclorido (DAPI) diluído em PBS (1 µg/µL) por 20 minutos em temperatura ambiente. Por fim, as células foram lavadas por três vezes com PBS e analisadas ao microscópio óptico de fluorescência (Leica DMI6000B) e aquisição de imagens utilizando-se o software LAS AF.

3.1.5. Marcação com OsteoImage

Para verificação da diferenciação osteogênica, foi utilizado o kit OsteoImage™ Mineralization Assay. Este kit possui um corante fluorescente (excitação/emissão = 492/520 nm) que se liga especificamente à hidroxiapatita, a qual é produzida por osteoblastos. Para marcação, as células previamente fixadas foram lavadas com o tampão de lavagem do kit, incubadas com o corante de hidroxiapatita por 30 minutos em temperatura ambiente (protegidas da luz) e novamente lavadas. Em seguida, foi feita marcação com DAPI (1 µg/µL) por 20 minutos em temperatura ambiente. Após três lavagens com PBS, as células foram mantidas neste mesmo tampão. Foi feita, então, análise do material ao microscópio óptico de fluorescência (Leica DMI6000B) e aquisição de imagens utilizando-se o software LAS AF.

3.2. Separação por gradiente de densidade de sacarose e isolamento de RNA

Quando as hASCs em cultivo atingiram aproximadamente 70% de confluência, foi realizado tratamento com meio controle, de indução adipogênica e osteogênica por 24 horas. Em seguida, as células foram tratadas com 0,1 mg/mL de cicloheximida (Sigma-Aldrich) (10 minutos, 37° C), coletadas com tripsina e lavadas duas vezes com 0,1 mg/mL de cicloheximida em PBS. Após centrifugação (700 x g; 5 minutos), o *pellet* celular foi ressuscitado em tampão de lise polissomal (15 mM Tris-HCl pH 7,4, 15 mM MgCl₂, 300 mM NaCl, 100 µg/mL cicloheximida, 1% Triton X-100) e incubado por 10 minutos em gelo. O lisado celular foi centrifugado a 12000 x g por 10 minutos a 4° C e o sobrenadante foi coletado e depositado sobre um gradiente de sacarose (10-50%, preparado previamente com BioComp model 108 Gradient Master). As amostras foram centrifugadas a 150000 x g (rotor SW40, HIMAC CP80WX HITACHI) por 2,5 horas a 4° C e as frações do gradiente de sacarose foram separadas usando o sistema de fracionamento de gradiente ISCO (ISCO Model 160 Gradient Former Foxy Jr.

Fraction Collector), conectado a um detector de UV. A absorbância a 275 nm foi monitorada e o perfil polissomal foi gravado. A razão entre as frações monossomal e polissomal foram quantificadas e a área abaixo dos picos monossomal e polissomal foram calculadas usando o *software* ImageJ.

O RNA obtido pelo fracionamento por gradiente de sacarose e o RNA total foram isolados usando Direct-zol™ RNA MiniPrep (Zymo Research), seguindo as instruções do fabricante.

Quando foi feito o gradiente para avaliação da presença de DDX6 nas diferentes frações, foi adicionado tampão de amostra 4x (Tris-HCl 160 mM, pH 6.8, dodecil sulfato de sódio – SDS - 4%, β -mercaptoetanol 10%, glicerol 24%, azul de bromofenol 0,02%) nas frações coletadas. Além disso, após a separação do gradiente, foi adicionado o mesmo tampão (diluído para 1x) ao fundo do tubo em que foi realizado o gradiente, a fim de coletar os complexos maiores que aí se depositam.

3.3. Preparação da biblioteca de cDNA e sequenciamento das amostras de RNA total e associado a polissomos

Para preparação da biblioteca de cDNA, foi utilizado o TruSeq Stranded Total RNA Sample Preparation kit (Illumina, Inc.) e o sequenciamento foi realizado em uma plataforma Illumina HiSeq utilizando o RNA-seq kit, seguindo as recomendações do fabricante (Illumina, Inc.). Ao final do preparo, o DNA obtido foi analisado por Bioanalyzer e por PCR em tempo real.

3.4. Análise dos dados de sequenciamento de RNA total e associado a polissomos

A análise dos dados de sequenciamento foi realizada em colaboração com a Dra. Lucía Spangenberg, do Instituto Pasteur de Montevideú. O mapeamento e contagem dos dados de sequenciamento foram realizados utilizando-se um pacote Rsubread package (Liao, Smyth e Shi, 2013). A clusterização hierárquica das amostras (log das contagens mais um) foi realizada para avaliação da variabilidade biológica. Cada amostra foi normalizada para um milhão de *reads* para contagem para tamanho da biblioteca.

A análise de expressão diferencial foi realizada utilizando o Bioconductor R pacote edgeR (Robinson, McCarthy e Smyth, 2010). Para esta análise, foram retidos apenas os genes com pelo menos uma contagem por milhão em pelo menos três amostras.

A análise de ontologia gênica foi realizada utilizando gProfiler (Reimand *et al.*, 2016) e DAVID (Huang, Sherman e Lempicki, 2009a; b).

3.5. Ensaio de incorporação de EdU

Para análise de proliferação, as células foram tratadas com meio controle ou de indução adipogênica acrescidos de 10 μ M de EdU (em meio de cultivo) por 24 horas. Em seguida, as células foram coletadas com tripsina, lavadas, fixadas e marcadas com Click-iT® EdU Alexa Fluor® 647 Flow Cytometry Assay Kit (Molecular Probes, Thermo Fisher Scientific), seguindo as instruções do fabricante. Cerca de 10000 eventos foram adquiridos usando-se o citômetro de fluxo FACSCanto II (BD Biosciences) e a análise dos dados foi realizada usando o software Flow Jo versão 10.0.8r1.

3.6. Análise de ciclo celular

Para análise de ciclo celular, as células foram coletadas com tripsina, lavadas em PBS e centrifugadas (700 x g, 5 minutos). O *pellet* celular foi ressuscitado em uma solução gelada de 70% etanol e 30% de PBS e incubada por 2 horas a 4° C para fixação. Em seguida, as células foram lavadas uma vez com PBS e centrifugadas. As células foram ressuscitadas em 100 μ L de PBS e foi adicionado um volume igual de solução de coloração 2X (3,4 mM Tris-HCl pH 7,4; 0,1% Nonidet P40; 700 U/L RNase A DNase-free; 10 mM NaCl; 30 μ g/mL iodeto de propídeo) e o conjunto foi incubado por 10 minutos. Após centrifugação, o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuscitadas em PBS para análise por citometria de fluxo. Cerca de 10000 eventos foram adquiridos usando-se o citômetro de fluxo FACSCanto II (BD Biosciences) e a análise dos dados foi realizada usando o software Flow Jo versão 10.0.8r1.

3.7. Silenciamento por RNA de interferência

Os ensaios de silenciamento e análise por qRT-PCR foram realizados em colaboração com a Dra. Patrícia Shigunov. Para reduzir a expressão de DEPTOR em hASCs, foi feito silenciamento por RNA de interferência (siRNA) com Lipofectamine 2000 Transfection Reagent (InvitrogenTM), seguindo recomendações do fabricante. Todos os siRNAs dupla fita foram desenhados e sintetizados por Origine (Maryland, Estado Unidos). As células foram inicialmente plaqueadas em placas de 6 poços (1×10^5 células/poço) até que atingissem 80-90% de confluência e então transfectadas com 10 nM de siRNA contra DEPTOR (siDep –

SR312133B) ou com um controle negativo universal *scrambled (nonsense)* de siRNA (siNS – SR30004). Após seis horas de transfecção, o meio de cultura foi trocado para remoção do agente transfectante. As células foram mantidas nesta condição por um total de 24 horas e o nível de expressão do RNAm e de proteína de DEPTOR foi mensurado utilizando-se qRT-PCR e Western Blot, respectivamente.

3.8. Extração de RNA e qRT-PCR

O RNA total de hASCs foi extraído utilizando-se o kit RNeasy Mini (QIAGEN), seguindo-se recomendações do fabricante. A reação de transcriptase reversa foi realizada com o kit ImProm-II™ Reverse Transcription System (Promega), com 1 µg de RNA total, e seguindo-se também as recomendações do fabricante. O nível relativo de expressão do RNAm de DEPTOR foi mensurado através de qPCR com o equipamento LightCycler® 96 Instrument (Roche) e SYBR Select Master Mix (Life Sciences). O programa de ciclos foi o seguinte: início a 50° C por 2 minutos, desnaturação a 95° C por 2 minutos, seguido por 45 ciclos de desnaturação a 95° C por 15 segundos, anelamento a 60° C por 15 segundos e extensão a 72° C por 1 minuto. As sequências iniciadoras (*primers*) para GAPDH humano (*Forward* 5'GGCGATGCTGGCGCTGAGTAC3' e *Reverse* 5'TGGTTCACACCCATGACGA3') resultam em fragmentos com 149 pares de base; as de DEPTOR (*Forward* 5'AATCCAGTCAGAGCAGCGGA3' e *Reverse* 5'CCATGGTTTTAGGGCCGTGC 3') resultam em fragmentos com 134 pares de base e reconhece ambas as isoforma (1 e 2). As reações foram corridas em triplicata e os produtos gerados foram analisados com o *software* LightCycler® 96 (Roche). Os dados foram avaliados como valores de $2^{-\Delta\Delta Cq}$, onde Cq indica o ciclo *threshold*.

3.9. Análise por imunofluorescência

Para análise por imunofluorescência, as células foram cultivadas em lâminas associadas a câmaras de incubação Nunc™ Lab-Tek™ (Nunc). Os anticorpos primários e secundários utilizados encontram-se descritos nas tabelas 3.2 e 3.3, respectivamente.

Para imunomarcação, as células que estavam em cultura foram lavadas com PBS e fixadas com 4% de paraformaldeído (diluído em PBS) por 20 minutos em temperatura ambiente. Após lavagem com PBS por três vezes, as células foram incubadas com solução de permeabilização (0,5% Triton X-100 em PBS) por 10 minutos e novamente lavadas com PBS

por três vezes (com incubações de 5 minutos). Em seguida, as células foram incubadas com solução de bloqueio (3% de BSA) por uma hora em temperatura ambiente. Em seguida, foi feita incubação com o anticorpo primário também diluído em solução de bloqueio por uma hora, em temperatura ambiente. As células foram lavadas três vezes com PBS, com incubações de 5 minutos, com suave agitação, a cada lavagem. A incubação com o anticorpo secundário (também diluído em solução de bloqueio) foi feita por uma hora, em temperatura ambiente, ao abrigo da luz. Em seguida, as células foram novamente lavadas três vezes com PBS, com incubações de 5, 20 e 5 minutos, sob suave agitação. Por fim, as células foram incubadas com DAPI (1 µg/µL) por 20 minutos, em temperatura ambiente, e lavadas com PBS. A análise do material foi feita ao microscópio óptico de fluorescência (Leica DMI6000B) e a aquisição de imagens foi realizada utilizando-se o software LAS AF.

Tabela 3.2. Anticorpos primários utilizados para imunomarcação.

Antígeno	Hospedeiro	Tipo*	Fabricante/Catálogo	Diluição IFF	Diluição WB
Dcp1a	camundongo	m	Santa Cruz/ sc-100706	1:50	1:200
DEPTOR/DEPDC6	coelho	m	Cell Signaling/ 11816S	-	1:1000
PABP	camundongo	m	Santa Cruz/sc-32318	1:50	-
DDX6 (Rck/p54)	coelho	p	MBL/PD009	1:400	1:2500
TIA1	camundongo	pm	ICC**	1:400	-
TIAR	coelho	m	Cell Signaling/8509S	1:400	-

*m = monoclonal; p = policlonal; pm = policlonal mono específico; IFF = imunofluorescência; WB = Western Blot

** o anticorpo anti-TIA1 foi gentilmente cedido pela Dra. Fabíola Barbieri Holetz

Tabela 3.3. Anticorpos secundários utilizados para análise por imunofluorescência.

Antígeno	Hospedeiro	Fluoróforo	Fabricante/Referência	Diluição
IgG de camundongo	cabra	Alexa Fluor® 546	Invitrogen/A11003	1:600
IgG de camundongo	cabra	Alexa Fluor® 488	Invitrogen/A11001	1:800
IgG de coelho	cabra	Alexa Fluor® 546	Invitrogen/A11010	1:600
IgG de coelho	cabra	Alexa Fluor® 488	Invitrogen/A11008	1:800

A contagem dos grânulos contendo DDX6 foi feita manualmente. Para isso, foram adquiridas 20 imagens de cada condição e foi feita marcação dos limites de cada célula. Em seguida, utilizando o *software* LASAF, foi estabelecido um corte baseado em um limite mínimo

de intensidade de luz (*threshold*), a fim de que apenas as estruturas granulares (mais brilhantes) fossem exibidas. O mesmo *threshold* foi aplicado nas três condições de tratamento das células (não-induzidas e induzidas para adipogênese ou osteogênese) e foi então feita a contagem de grânulos.

3.10. Eletroforese de proteínas em gel de acrilamida

As amostras de proteínas obtidas (extrato celular, imunoprecipitados e controles) foram resolvidas através de eletroforese em gel de acrilamida desnaturante (SDS-PAGE). Para isso, 30 µL de amostra foram acrescidos de 10 µL de tampão de amostra 4x (Tris-HCl 160 mM, pH 6.8, SDS 4%, β-mercaptoetanol 10%, glicerol 24%, azul de bromofenol 0,02%), aquecidos a 95° C por 10 minutos e aplicados em gel de acrilamida desnaturante 10% (SDS 0,1%, Tris-HCl 400 mM, pH8.8, acrilamida 10%, persulfato de amônio 0,075%, TEMED 0,07%). A separação das proteínas foi feita em tampão para SDS-PAGE (Tris-Base 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0,1%) a 30 mA, durante 90-120 minutos.

3.11. Coloração com prata

O gel obtido a partir do SDS-PAGE (item 3.4) foi incubado com solução de fixação por 30 minutos (etanol 50%, ácido acético 12%, formaldeído 0,02%), lavado três vezes em etanol 50%, com incubações de 5, 10 e 15 minutos, e incubado em solução de sensibilização (tiosulfato de sódio 0,02%) por 1 minuto. Em seguida, o gel foi lavado três vezes com água destilada (agitação vigorosa) e incubado com solução de nitrato de prata (nitrato de prata 0,2%, formaldeído 0,03%) por 30 minutos. O gel foi, então, lavado três vezes com água destilada (agitação vigorosa) e incubado com solução de revelação (carbonato de sódio 3%, formaldeído 2%, tiosulfato de sódio 0,0004%, formaldeído 0,02%) até que fosse possível visualizar as bandas proteicas. A revelação foi, então, interrompida com solução de término da reação (etanol 50%, ácido acético 12%).

3.12. Western Blot

Para Western Blot, as proteínas foram separadas por SDS-PAGE e transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Hybond C, Amersham Biosciences), com tampão de transferência (Tris-Base 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20%), *overnight*, a 4° C, 25 V. A membrana foi bloqueada com tampão de bloqueio (salina tamponada por Tris – TBS,

Tween®20 0,1%, leite em pó desnatado 5%) por uma hora em temperatura ambiente e lavada três vezes (com incubações de 5 minutos) com TBS-T (TBS, 0,1% Tween®20). Foram adicionados os anticorpos primários (tabela 3.2), diluídos em TBS-T com 5% de BSA, e foi feita incubação *overnight*, a 4° C, sob agitação suave. A membrana foi lavada três vezes com TBS-T (com incubações de 5 minutos) e foi adicionado o anticorpo secundário (anti-IgG de camundongo, conjugado a fosfatase alcalina, diluição 1:1000, Sigma; ou anti-IgG de coelho, conjugado a peroxidase, diluição 1:2500), diluído em tampão de bloqueio. Ao final, a membrana foi lavada novamente com TBS-T. A revelação de amostras marcadas com peroxidase foi feita com Novex® ECL HRP Chemiluminescent. A revelação de amostras marcadas com fosfatase alcalina foi feita com tampão AP, BCIP e NBT.

Para quantificação, foi utilizado o *software* Image J. A normalização foi feita em relação à quantidade de proteínas totais (controle de *loading*), a qual foi mensurada com base na intensidade registrada para três bandas de pesos moleculares diferentes de cada *lane*. Para DEPTOR, foi feita a normalização com base na quantificação das bandas marcadas com Ponceau nas alturas de aproximadamente 60 kDa, 70 kDa e 80 kDa. Para DDX6, a normalização foi feita com a bandas nas alturas de aproximadamente 30 kDa, 40 kDa e 55 kDa.

3.13. Tratamento de hASCs com RNase

Para verificar se as estruturas granulares contendo DDX6 eram dependentes de RNA, foi realizado tratamento com RNase seguido de imunofluorescência. Para isso, as hASCs que estavam em cultivo foram lavadas duas vezes com PBS e incubadas com solução de permeabilização (PBS, Triton X-100 0,5%) por 2 minutos (37° C). O tampão de permeabilização foi retirado e as células foram lavadas mais duas vezes com PBS. Em seguida, as células foram incubadas por 5 minutos com solução contendo 10 mg/mL de RNase A (temperatura ambiente). Após a retirada da solução contendo RNase A, as células foram lavadas duas vezes com PBS e fixadas com paraformaldeído (4% em PBS) por 20 minutos e depois mantidas em PBS para posterior marcação por imunofluorescência e análise ao microscópio óptico.

3.14. Ensaio de localização de peptídeos nascentes

Para localização de peptídeos nascentes, foi utilizado o kit Click-it Plus OPP Protein Synthesis Assay Alexa 488 (Invitrogen). Para o ensaio, as hASCs em cultivo foram incubadas

com uma solução de trabalho contendo 20 μ M de O-propargil-puromicina (OPP, diluído em meio de cultura) por 30 minutos (37° C), lavadas uma vez com PBS e fixadas com paraformaldeído 4% (15 minutos). Em seguida, as células foram lavadas com PBS, permeabilizadas (incubação com 0,5% Triton X-100 em PBS por 10 minutos) e novamente lavadas com PBS. Por fim, foi feita a reação de detecção do OPP e marcação do núcleo seguindo-se as orientações do fabricante.

Para avaliação da localização de peptídeos nascentes em situações de estresse, foi feito também um experimento com tratamento das hASCs com arsenito. Foram avaliadas hASCs (1) incubadas com OPP por 30 minutos (em meio controle) e (2) incubadas com OPP e arsenito de sódio (0,5 mM) por 30 minutos (juntos).

Após a realização da marcação de OPP, foi feita imunofluorescência com anticorpos contra os antígenos TIAR e DDX6 (tabela 3.2). As amostras foram analisadas ao microscópio confocal a laser Leica SP5 AOBS.

3.15. Quantificação do enriquecimento de DRIPs em grânulos de DDX6 e TIAR

A partir do ensaio de incorporação de OPP, ocorre a formação de produtos ribossomais defeituosos (*defective ribosomal products*, DRIPs) a partir da terminação prematura do processo de síntese proteica (Ganassi *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2012). Para quantificar o enriquecimento de DRIPs nos grânulos de TIAR e DDX6, as amostras foram analisadas ao microscópio confocal a laser Leica SP5 AOBS, sendo adquiridas 5 imagens de cada condição. As imagens foram analisadas utilizando o sistema Columbus™ Image Data Storage and Analysis (PerkinElmer). A metodologia utilizada foi elaborada com base no processo de análise de enriquecimento de DRIPs em grânulos de estresse descrito por Ganassi e colaboradores em 2016 (Ganassi *et al.*, 2016).

O sistema Columbus™ é executado com base em blocos de construção (*building blocks*) de análise. A seguir, será descrito o caminho de análise seguido, com a identificação dos blocos de construção utilizados, com a especificação das metodologias aplicadas dentro de cada bloco. Primeiramente, foram identificados os núcleos com base na marcação de DAPI (*Find Nuclei*, método B) e o citoplasma com base na marcação de OPP (*Find Cytoplasm*, método D). A região do citoplasma foi selecionada (*Select Cell Region*, método *Resize Region*) e dentro desta região, foram identificados os grânulos com base na marcação de DDX6 ou TIAR, utilizando-se o critério de intensidade (*Find Image Region*, método *Common Threshold*). Em seguida, foi identificada a região do citoplasma ao redor dos grânulos, a qual consistiu, portanto, em todo o citoplasma,

excluindo-se apenas as regiões dos grânulos. Para isso, foi utilizado o bloco de construção *Select Region*, método *Restrict by Mask*, utilizando-se como máscara inversa a região dos grânulos previamente selecionadas. Por fim, aplicando-se os blocos de construção *Calculate Intensity Properties*, foram mensuradas a intensidade média de OPP nas regiões dos grânulos e no citoplasma ao redor dos grânulos. O cálculo de enriquecimento de OPP em cada grânulo foi feito com base na razão entre a intensidade média de OPP na região do grânulo e a intensidade média de OPP no arredor deste. Os dados foram plotados em histogramas de distribuição de frequência desta razão e também em gráficos de coluna demonstrando o percentual de grânulos enriquecidos em OPP por célula. Foram considerados enriquecidos grânulos em que a razão de intensidade de OPP entre o grânulos e o citoplasma foi maior do que 1,5, com base no descrito por Ganassi e colaboradores (Ganassi *et al.*, 2016).

3.16. Padronização do protocolo de coimunoprecipitação de DDX6 e seus parceiros

Para avaliar o papel da proteína DDX6 durante a diferenciação adipogênica e osteogênica, optou-se por fazer a caracterização do conteúdo proteico e de RNA dos complexos aos quais ela se associa. Para isso, foi escolhida a estratégia de isolar estes complexos através da imunoprecipitação de DDX6 e de seus parceiros para posteriormente ser feita análise deste material por espectrometria de massas e sequenciamento de RNA. O protocolo de imunoprecipitação de antígenos e seus parceiros consiste em quatro etapas principais: lise celular; ressuspensão em solução tampão (no caso de a lise ter sido mecânica); imunoprecipitação dos antígenos de interesse, através do uso de anticorpos ligados a *beads*; e recuperação do material isolado. Cada etapa deve ser padronizada a fim de que seja possível manter o antígeno de interesse ligado a seus parceiros e, ao mesmo tempo, reduzir as ligações inespecíficas com outras moléculas.

3.16.1. Lise celular

A primeira etapa da imunoprecipitação consiste na lise celular. Foram avaliadas duas metodologias: lise mecânica e uso de tampão de lise. Para lise mecânica, foi testado o método de criomoagem (*cryogrinding*). Para tal, as células foram lavadas duas vezes com PBS e uma vez com PBS acrescido de inibidor de protease (cOmplete Protease Inhibitor Cocktail Tablets, Roche). O material foi centrifugado (700 x g, 8° C, 5 minutos) e o sobrenadante descartado. Com o auxílio de uma micropipeta, o *pellet* celular obtido foi

gotejado em um tubo contendo nitrogênio líquido, promovendo o congelamento das amostras. O tubo foi então colocado em um recipiente contendo gelo seco, a fim de que o nitrogênio pudesse evaporar, mantendo a amostra congelada. As células congeladas foram submetidas a moagem a frio, utilizando-se um moinho vibratório (Retsch MM400), com ciclos de 2 minutos de vibração a 30 Hz e 2 minutos de congelamento em nitrogênio líquido. Este ciclo foi repetido 5 vezes. O pó de células obtido foi pesado e armazenado a -80° C. Por fim, foi ressuscitado em tampão Hepes (40 mM, pH 7), cloreto de sódio (120 mM), EDTA (1 mM); CHAPS (3-[(3-colamidopropil)dimetilamônio]-1-propanosulfonato, 0,3%); e inibidor de protease (cOmplete Protease Inhibitor Cocktail Tablets, Mini EDTA-free, Roche) (Isabelle *et al.*, 2012), para análise por eletroforese em gel de acrilamida.

Em seguida, foi avaliado um protocolo utilizando-se um tampão de lise diretamente sobre as células. O tampão era composto por Tris-HCl pH 7,4 50 mM; acetato de potássio 100 mM; acetato de magnésio 2mM; 0,5 mM ditioneitol – DTT; 1% Nonidet P-40 e inibidor de protease (cOmplete Protease Inhibitor Cocktail Tablets, Mini EDTA-free, Roche, uma pastilha para 10 mL de solução) (Jain *et al.*, 2016). Neste protocolo, as células foram lavadas com PBS, colocadas sobre gelo e o tampão de lise (4 mL para cada 5 garrafas de 180 cm², com células em confluência de aproximadamente 80%) foi adicionado diretamente dentro da garrafa de cultivo. As células foram raspadas, o lisado foi transferido para um tubo de centrifuga e foi feito *up/down* duas vezes com uma seringa. Em seguida, o lisado foi submetido a dois ciclos de sonicação em banho de 10 segundos cada, com 20 segundos de intervalo em gelo. Por fim, a amostra foi centrifugada (5 minutos, 1000 x g, 4° C) e o sobrenadante foi coletado para utilização na imunoprecipitação.

Os dois protocolos de lise foram avaliados quanto ao rendimento e ao padrão de proteínas obtido por eletroforese de proteínas em gel de acrilamida e coloração com prata.

3.16.2. Padronização do protocolo de imunoprecipitação de DDX6 em células HeLa

Uma vez estabelecido o protocolo de lise celular, foram feitos os ensaios de imunoprecipitação. Como o rendimento das hASCs é baixo, sendo necessários muitos frascos de cultivo para realização dos experimentos, foram feitos inicialmente testes com células HeLa submetidas a estresse por incubação com arsenito de sódio (0,5 mM) por 45 minutos. Foi avaliado o protocolo descrito por Jain e colaboradores para isolamento de grânulos de estresse em células de leveduras e de mamíferos (Jain *et al.*, 2016), com algumas modificações. As utilizadas as soluções descritas na tabela 3.4.

Tabela 3.4. Soluções utilizadas no teste do protocolo de imunoprecipitação de DDX6 em células HeLa

Tampão de lise	
Reagente	Concentração
Tris-HCl pH 7,4	50 mM
Acetato de potássio	100 mM
Acetato de magnésio	2mM
DTT	0,5 mM
Nonidet P-40	0,5%
Inibidor de protease*	Uma pastilha para 10 mL
Tampão de lavagem 1	
Tris-HCl pH 8	20 mM
Cloreto de sódio	300 mM
Tampão de lavagem 2	
Tris-HCl pH 8	20 mM
Cloreto de sódio	500 mM
Tampão de lavagem 3	
Tris-HCl pH 7,4	50 mM
Acetato de potássio	100 mM
Acetato de magnésio	2mM
DTT	0,5 mM
Nonidet P-40	1%
Ureia	2 M
Inibidor de protease	Uma pastilha para 10 mL
Tampão de lavagem 4	
Tris-HCl pH 7,4	50 mM
Acetato de potássio	100 mM
Acetato de magnésio	2mM
DTT	0,5 mM
Inibidor de protease *	Uma pastilha para 10 mL
Tampão TBS	
Tris-HCl pH 8	20 mM
Cloreto de sódio	150 mM

*Foi utilizado como inibidor de protease o cOmplete Protease Inhibitor Cocktail Tablets, Mini EDTA-free, Roche.

Para imunoprecipitação, foi utilizado o anticorpo anti-Rck/p54 (DDX6) (policlonal feito em coelho, PD009, MBL) e *beads* magnéticas conjugadas a proteína A (Dynabeads Protein A, Invitrogen). As células foram lavadas com PBS, colocadas sobre gelo e o tampão de lise (3 mL para cada garrafa de 180 cm² – células HeLa) foi adicionado diretamente dentro da garrafa de cultivo. As células foram raspadas, o lisado foi transferido para um tubo de centrífuga e foi passado duas

vezes por uma seringa. Em seguida, o lisado foi submetido a dois ciclos de sonicação em banho de 10 segundos cada, com 20 segundos de intervalo em gelo. A amostra foi centrifugada (5 minutos, 10 x g, 4° C) e o sobrenadante foi coletado e transferido para um novo tubo. Em seguida, o lisado foi novamente centrifugado (20 minutos, 14000 x g, 4° C), o sobrenadante foi descartado e o *pellet* (fração enriquecida em grânulos de RNA) foi ressuscitado em 1 mL de tampão de lise. Foi feita uma nova centrifugação (20 minutos, 14000 x g, 4° C) e o *pellet* foi ressuscitado em 300 µL de tampão de lise. Foi adicionado o anticorpo anti-Rck/p54 e o conjunto foi incubado por 16-17 horas, a 4° C, sob agitação suave. As amostras foram novamente centrifugadas (20 minutos, 14000 x g, 4° C), o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuscitado em 500 µL de tampão de lise. As *beads* magnéticas (previamente equilibradas através de duas lavagens de 5 minutos em TBS e três no tampão de lise) foram adicionadas e o conjunto foi incubado por 3 horas, a 4° C, sob agitação suave. As *beads* magnéticas foram coletadas e lavadas três vezes com tampão de lavagem 1 (incubação de 5 minutos cada), uma vez com o tampão de lavagem 2 (incubação de 5 minutos), uma vez no tampão de lavagem 3 (incubação de 2 minutos) e uma vez no tampão de lavagem 4 (incubação de 5 minutos). Ao final, as *beads* magnéticas foram ressuscitadas no tampão de lavagem 4 e foi adicionado tampão de amostra 4x (Tris-HCl 160 mM, pH 6.8, SDS 4%, β-mercaptoetanol 10%, glicerol 24%, azul de bromofenol 0,02%) para eluir o imunoprecipitado. As amostras foram analisadas por eletroforese em gel de acrilamida corado com prata e Western Blot.

3.16.3. Padronização do protocolo de imunoprecipitação de DDX6 em hASCs

Uma vez que o protocolo testado teve sucesso com células HeLa, foi feita a avaliação do uso deste procedimento para hASCs, com algumas modificações: (1) o tampão de lise foi preparado com 1% de detergente e foram usados 4 mL de tampão para cada 5 garrafas de 180 cm²; (2) a primeira centrifugação – para retirada de membranas e restos celulares – foi feita a 1000 x g (em vez de 10 x g); (3) as centrifugações para enriquecimento de grânulos foram feitas a 16400 x g (em vez de 14000 x g); (4) foi feita uma etapa de pré-limpeza (incubação com as *beads* magnéticas sem anticorpo) antes da incubação com o anticorpo a fim de remover elementos (proteínas, RNA etc.) que se ligam inespecificamente às *beads*.

Em seguida, foram feitas outras adaptações. Foi avaliada a realização de um processo diferente de lavagem das *beads* magnéticas. Assim, não foi utilizado o tampão de lavagem 1; foram feitas duas lavagens no tampão 2; uma no tampão 3; e uma no tampão 4. Além disso, foi feito também um novo teste, mantendo o padrão do protocolo inicial, mas em que foram feitas duas imunoprecipitações em paralelo: uma com o *pellet* obtido após a centrifugação a 16400 x g e outra

com o sobrenadante. Por fim, uma última adaptação realizada foi a utilização do reagente TRIzol (Thermo Fisher) para extração de proteínas e RNA da amostra imunoprecipitada. Para verificação da especificidade do protocolo estabelecido, foi feito também um controle com a análise da imunoprecipitação de uma proteína não correlacionada a DDX6, utilizando-se o mesmo protocolo. Neste caso, foi utilizado o anticorpo anti-histona H3, produzido em coelho (Abcam, ab1791).

3.16.4. Coimunoprecipitação de DDX6 e seus parceiros em hASCs

A partir dos resultados obtidos, foi estabelecido o protocolo de coimunoprecipitação de DDX6 e seus parceiros em hASCs. As soluções utilizadas estão descritas na tabela 3.5. Para imunoprecipitação, foi utilizado o anticorpo anti-Rck/p54 (DDX6) (7 μ L para cada imunoprecipitação, policlonal feito em coelho, PD009, MBL) e *beads* magnéticas conjugadas a proteína A (60 μ L de *beads* para cada imunoprecipitação, Dynabeads Protein A, Invitrogen). As células foram lavadas com PBS (37° C), o tampão de lise gelado (4 mL para cada 5 garrafas de 180 cm² – hASCs) foi adicionado diretamente dentro da garrafa de cultivo e as células foram raspadas sobre gelo. O lisado foi transferido para um tubo de centrífuga e foi passado duas vezes por uma seringa. Em seguida, o lisado foi submetido a dois ciclos de sonicação em banho de 10 segundos cada, com 20 segundos de intervalo em gelo. A amostra foi centrifugada (5 minutos, 1000 x g, 4° C) e o sobrenadante foi coletado e transferido para um novo tubo. Em seguida, as células foram novamente centrifugadas (20 minutos, 10000 x g, 4° C) e o sobrenadante foi coletado e transferido para um novo tubo. Para pré-limpeza, as *beads* magnéticas previamente equilibradas (duas lavagens de 5 minutos em TBS e três no tampão de lise) foram adicionadas e incubadas por 3 horas, a 4° C, sob agitação suave. Em seguida, as *beads* foram removidas, o anticorpo anti-Rck/p54 foi adicionado e o conjunto foi incubado por 16-17 horas, a 4° C, sob agitação suave. As *beads* magnéticas previamente equilibradas foram adicionadas e o conjunto foi incubado por 3 horas, a 4° C, sob agitação suave. As *beads* magnéticas foram coletadas e lavadas três vezes com tampão de lavagem 1 (incubação de 5 minutos cada), uma vez com o tampão de lavagem 2 (incubação de 5 minutos), uma vez no tampão de lavagem 3 (incubação de 2 minutos) e uma vez no tampão de lavagem 4 (incubação de 5 minutos). Nesta última etapa, a amostra foi transferida para um novo tubo. Foi adicionado 1 mL de TRIzol e foi feita a extração de RNA e proteínas com TRIzol (Thermo Fisher), seguindo-se as recomendações do fabricante. As *beads* magnéticas utilizadas da etapa de pré-limpeza foram lavadas, seguindo-se o mesmo protocolo aplicado nas *beads* da imunoprecipitação, e o conteúdo proteico e de RNA que permaneceu aderido foi extraído com TRIzol. O RNA extraído foi preparado e analisado por RNA-Seq conforme descrito no item 3.3.

Tabela 3.5. Soluções utilizadas no protocolo de imunoprecipitação de DDX6 em hASCs

Tampão de lise	
Reagente	Concentração
Tris-HCl pH 7,4	50 mM
Acetato de potássio	100 mM
Acetato de magnésio	2mM
DTT	0,5 mM
Nonidet P-40	1%
Inibidor de RNase*	65 unidades/mL
Inibidor de protease*	Uma pastilha para 10 mL

Tampão de lavagem 1	
Tris-HCl pH 8	20 mM
Cloreto de sódio	200 mM

Tampão de lavagem 2	
Tris-HCl pH 8	20 mM
Cloreto de sódio	500 mM

Tampão de lavagem 3	
Tris-HCl pH 7,4	50 mM
Acetato de potássio	100 mM
Acetato de magnésio	2 mM
DTT	0,5 mM
Nonidet P-40	1%
Ureia	2 M
Inibidor de protease	Uma pastilha para 10 mL

Tampão de lavagem 4	
Tris-HCl pH 7,4	50 mM
Acetato de potássio	100 mM
Acetato de magnésio	2mM
DTT	0,5 mM
Inibidor de protease *	Uma pastilha para 10 mL

Tampão TBS	
Tris-HCl pH 8	20 mM
Cloreto de sódio	150 mM

*Foi utilizado como inibidor de RNase a RNase OUT (Invitrogen) e como inibidor de protease o cOplete Protease Inhibitor Cocktail Tablets, Mini EDTA-free, Roche.

3.17. Análise de amostras de proteínas por espectrometria de massas

As amostras e controles obtidos a partir da coimunoprecipitação de DDX6 e seus parceiros foram submetidos a análise por espectrometria de massas. Para isso, as amostras

foram primeiramente submetidas a eletroforese em gel de acrilamida 10% e coradas com prata. Em seguida, a região do gel contendo amostra foi coletada, cortada em porções de cerca de 3-5 mm e transferida para um tubo de centrífuga. Foi adicionada solução de descoloração (tiosulfato de sódio 50 mM; ferricianeto de potássio 15 mM) e o conjunto foi incubado por 10 minutos a 25° C sob agitação. Em seguida, foram feitas lavagens com solução ABC (bicarbonato de amônio 50 mM) até remover completamente a solução de descoloração. O gel foi então desidratado com etanol 100%, seco (utilizando-se o equipamento SpeedVac) e foi adicionado tampão de redução (DTT 10 mM em solução ABC 50 mM) por 60 minutos, 56° C, sob agitação. O sobrenadante foi descartado, foi adicionado tampão de alquilação (iodoacetamida 55 mM em solução ABC 50 mM) e o conjunto foi incubado por 45 minutos, 25° C, sob agitação e protegido da luz. O sobrenadante foi descartado, o gel foi lavado uma vez com solução ABC (50 mM), desidratado com etanol 100% e mais uma vez lavado com solução ABC. Em seguida, o gel foi novamente desidratado com etanol 100% e seco. Foi adicionada solução de tripsina (tripsina 12,5 ng/μL em solução ABC) e o conjunto foi incubado por 20 minutos, 4° C. Em seguida, o excesso da solução de tripsina foi retirado, foi adicionada solução ABC em volume suficiente para cobrir o gel e o conjunto foi incubado a 37° C por 16-18 horas. O processo de digestão foi interrompido com solução de ácido trifluoroacético (TFA) e o sobrenadante foi coletado. Foi adicionada solução de extração (TFA 3%; acetonitrila 30%), o conjunto foi incubado por 10 minutos, 25° C e o sobrenadante foi coletado. Esta etapa foi repetida mais uma vez. Em seguida, o mesmo procedimento foi realizado com acetonitrila 100%. O sobrenadante coletado em todas estas etapas foi seco até que seu volume fosse reduzido a 10-20% do volume original. Os peptídeos obtidos foram então purificados em StageTips-C18 e armazenados para análise por espectrometria de massas.

A análise por espectrometria de massas foi feita na Plataforma de Espectrometria de Massas RPT02H, Fiocruz-PR, pertencente à Rede de Plataformas Tecnológicas Fiocruz. A análise foi realizada no espectrômetro Thermo Fisher LTO Orbitrap XL e a identificação dos peptídeos foi feita utilizando-se o *software* MaxQuant (versão 1.6.1.0), tendo parâmetro um FDR de 1% tanto em nível de peptídeo quanto de proteína.

3.18. Análise dos dados de espectrometria de massas

Os dados obtidos por espectrometria de massas foram analisados utilizando-se o *software* Perseus (versão 1.6.2.3). A partir da tabela de proteínas identificadas através do

software MaxQuant, foi primeiramente feita uma filtragem para remover as proteínas apenas identificadas por sítio, as reversas e os potenciais contaminantes. Em seguida, foram removidas as proteínas identificadas nas amostras de pré-limpeza, ou seja, aquelas que se ligam inespecificamente às *beads*. Foram consideradas como presentes nas amostras de pré-limpeza aquelas proteínas que tiveram pelo menos 1 peptídeo único identificado em pelo menos uma das réplicas de pelo menos uma das condições (não-induzido, induzido para adipogênese ou induzido para osteogênese). Por fim, foram consideradas como presentes nas amostras de imunoprecipitação de DDX6 apenas as proteínas que foram identificadas com pelo menos 2 peptídeos únicos em pelo menos uma das réplicas de pelo menos uma das condições (não-induzido, induzido para adipogênese ou induzido para osteogênese).

A partir das proteínas consideradas como presentes nas amostras de imunoprecipitação (após as etapas de filtragem), foi feita a quantificação utilizando-se como parâmetro a intensidade do sinal de cada proteína. Para isso, os valores de intensidade foram convertidos em escala logarítmica ($\log_{10}(\text{Intensidade})$) e os valores faltantes foram imputados a partir de uma distribuição normal separadamente para cada réplica de cada amostra. Por fim, foi realizada uma normalização dividindo-se cada valor pela média de cada réplica.

Utilizando-se o *software* Morpheus (<https://software.broadinstitute.org/morpheus>), foi feita a análise de agrupamento hierárquico não-supervisionado, tendo como métrica de dissimilaridade a medida de distância Euclidiana e método de ligação a média das distâncias, a partir da qual foi gerado um dendograma. As proteínas diferencialmente associadas a DDX6 nas diferentes condições (não-induzido, induzido para adipogênese ou induzido para osteogênese) foram identificadas a partir de análise utilizando-se ANOVA (considerando-se significativas as proteínas com valor de $p < 0,05$), seguida de post hoc test (FDR=0,05).

A análise de ontologia gênica foi realizada utilizando a base de dados gProfiler (Reimand *et al.*, 2016). Também foi feita análise de predição de interações proteína-proteína utilizando-se a ferramenta STRING (Szklarczyk *et al.*, 2017). Para construção do mapa de interações, foram utilizados os seguintes parâmetros: ligações entre nós representando ações moleculares, utilização de mineração de texto, experimentos e bancos de dados como fontes de informações sobre as interações e pontuação de interação mínima de 0,7 (alta confiança). As proteínas que não apresentaram interações preditas dentro destes parâmetros foram ocultadas do mapa gerado.

3.19. Análise estatística

Todos os experimentos foram realizados com hASCs de pelo menos 3 doadores diferentes (réplicas biológicas), com exceção do ensaio de imunoprecipitação, que foi desenvolvido com células de 2 doadores diferentes e com duas réplicas técnicas de cada doador. Os gráficos de barras representam média com erro padrão (EP). As análises foram realizadas utilizando o *software* GraphPad Prisma (versão 7.01). Antes da realização da análise estatística, foi feita a verificação de distribuição utilizando-se o teste de normalidade de Shapiro-Wilk. Para experimentos com duas condições diferentes e distribuição gaussiana, foi utilizado teste T não-pareado. Quando foi observada distribuição não-gaussiana, foi utilizado o teste de Mann-Whitney. Em experimentos com mais de duas condições e distribuição gaussiana, foi utilizado *One-Way* ANOVA com múltiplas comparações e pós-teste de Tukey. Em experimentos com mais de duas condições e distribuição não-gaussiana, foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis, com múltiplas comparações e pós-teste de Dunn. Para experimentos de análise de grupos e distribuição gaussiana, foi utilizado *Two-Way* ANOVA com múltiplas comparações, seguido de pós-teste de Sidak. Valores de $p \leq 0,05$ foram considerados significativos.

4. RESULTADOS

Os resultados obtidos durante o desenvolvimento deste trabalho foram organizados em três capítulos. O primeiro deles descreve o processo de obtenção de hASCs e a padronização de protocolos utilizados nesta pesquisa. No segundo, estão os resultados da análise da regulação da expressão gênica de hASCs induzidas para adipogênese e osteogênese por 24 horas, bem como ensaios complementares para confirmação das observações realizadas. O terceiro capítulo, por sua vez, trata das análises relacionadas ao comportamento da proteína DDX6 em hASCs, tanto mantidas em seu estado de *stemness*, quanto induzidas para diferenciação adipogênica e osteogênica.

CAPÍTULO I

Isolamento de hASCs e padronização de protocolos

4.1. Isolamento e caracterização de hASCs

Foram isoladas hASCs de doadores com idade de 17 a 56 anos submetidos a lipoaspiração. Para verificar se as células obtidas possuíam o perfil de células-tronco, foi feita caracterização imunofenotípica e foi analisada a capacidade de diferenciação em pelo menos dois fenótipos celulares (adipócitos e osteoblastos). As células utilizadas para análise da expressão gênica através do sequenciamento de RNA total e associado a polissomos foram caracterizadas pelo grupo previamente (Robert *et al.*, 2018), seguindo o mesmo protocolo descrito no presente trabalho. Para as demais análises, foram isoladas e caracterizadas células de três doadores.

A caracterização imunofenotípica foi realizada com as células em passagem 4 (P4) ou 5 (P5). Para as células isoladas do doador TAL13 (doador A), observou-se que mais de 99% das células expressavam CD90, CD105, CD73 e CD140b e menos de 2% expressavam CD11b, CD45, CD19 e CD31. Para CD34 e HLADR, obteve-se 5,68% e 3,19% de células positivas, respectivamente. Para o doador TAL15 (doador B), mais de 90% das células expressavam CD90 e CD140b, e mais de 99% tiveram marcação para CD105 e CD73. Menos de 5% expressavam CD34, CD11b, HLADR e CD31. Para CD45 e CD19, obteve-se menos de 2% de células positivas. Para o doador TAL16 (doador C), mais de 98% das células expressavam CD90, CD105, CD73 e CD140b. Menos de 2% foram positivas para CD11b, CD45 e CD31, enquanto que menos de 5% tiveram marcação para CD34, CD19 e HLADR (Tabela 4.1). Na análise do potencial de diferenciação, observou-se que as células isoladas dos três doadores tiveram a capacidade de diferenciar em adipócitos e em osteócitos (Figura 4.1 A e B), confirmando o fenótipo de hASCs.

Tabela 4.1. Caracterização imunofenotípica por citometria de fluxo das células isoladas de tecido adiposo humano.

Fenótipo	Característico de	TAL13 (P4) (doador A)	TAL15 (P5) (doador B)	TAL16 (P5) (doador C)
CD90+	células mesenquimais	98,42%	92,02%	98,45%
CD105+	células mesenquimais	99,34%	99,80%	99,92%
CD73+	células mesenquimais	99,39%	99,90%	99,89%
CD140b+	células derivadas de mesenquimais	99,90%	93,70%	99,91%
CD34+	progenitor hematopoiético	5,68%	2,39%	3,03%
CD11b+	macrófagos e monócitos	1,20%	2,19%	1,48%
CD45+	células hematopoiéticas	0,73%	1,98%	1,39%
CD19+	células B	1,49%	1,95%	2,27%
HLADR+	leucócitos	3,91%	3,13%	4,56%
CD31+	células endoteliais	1,31%	2,02%	1,50%

4.2. Padronização do protocolo de coimunoprecipitação de DDX6 e seus parceiros

Um dos objetivos deste trabalho consistiu em avaliar a presença e o comportamento da proteína DDX6 em hASCs. A fim de analisar os complexos aos quais esta helicase se associa, optou-se pela utilização da metodologia de coimunoprecipitação de DDX6 e seus parceiros. Para isso, foi necessário primeiramente realizar a padronização desta metodologia em hASCs. O primeiro passo foi avaliar dois protocolos de lise celular para realização da imunoprecipitação: lise mecânica por criomoagem e uso de tampão de lise. Em um primeiro teste de criomoagem, foram usadas $2,2 \times 10^7$ células (cultivadas em 14 garrafas de 150 cm²), sendo que, ao final do processo, foram obtidos 200 mg de pó de células. Devido ao baixo rendimento obtido, foi feita uma nova tentativa de criomoagem, com 6×10^7 células (cultivadas em 48 garrafas de 150 cm²), a partir da qual foram obtidos 800 mg de pó de células. Em seguida, 50 mg do pó de célula foi ressuscitado em uma solução tampão e analisado por eletroforese em gel de acrilamida e coloração com prata. Foi possível observar que, a partir da criomoagem, foram obtidas proteínas com tamanhos variáveis (Figura 4.2 A). Isso sugere que o processo de lise celular foi eficiente e que a integridade das proteínas foi mantida, uma vez que não foram verificados sinais de degradação (“arrasto”). Contudo o rendimento deste protocolo foi muito baixo, sendo que foram necessárias 48 garrafas de 150 cm² para obtenção de apenas 800 mg de pó de células. Já com a utilização do tampão de lise, foi possível obter uma boa quantidade de proteínas, sem que também fosse observada degradação (Figura 4.2 B). Tendo em vista que este protocolo teve melhor rendimento, obtendo-se um lisado celular com proteínas íntegras e com distribuição homogênea de tamanho, optou-se por utilizar esta metodologia para a realização da imunoprecipitação.

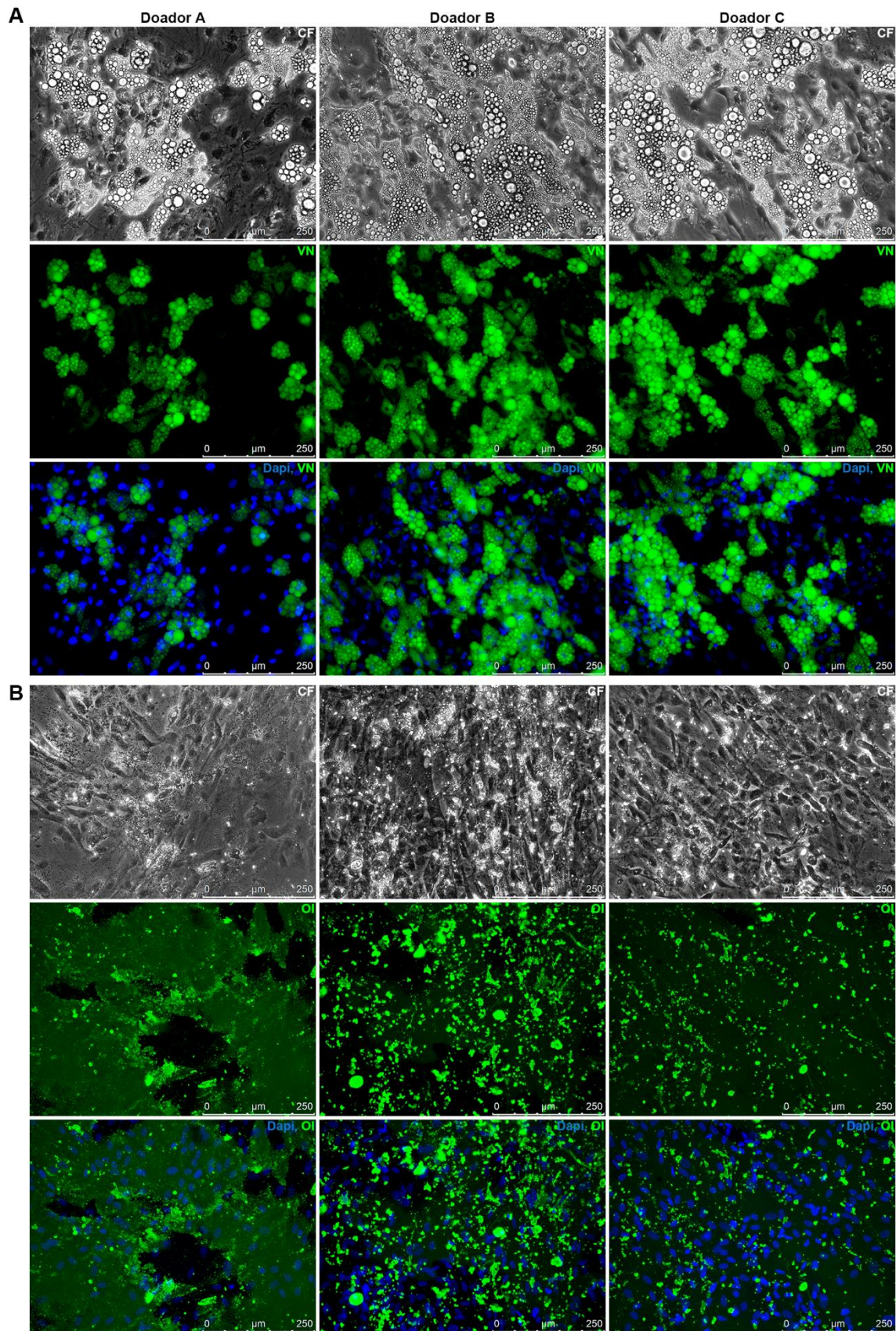


Figura 4.1. Análise da capacidade de diferenciação das hASCs. (A) Após indução adipogênica (28 dias), observam-se inclusões lipídicas por contraste de fase (CF) e marcadas em verde pelo corante Vermelho Nilo (VN). (B) Após indução osteogênica (21 dias), os cristais de hidroxiapatita foram marcados com o kit OsteoImage (OI). Núcleos foram corados com DAPI.

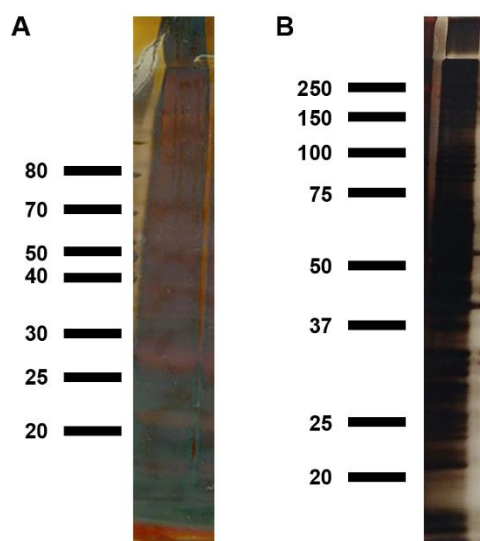


Figura 4.2. Padronização do protocolo de lise celular para imunoprecipitação. (A) O pó de células obtido por criomoagem foi ressuscitado em uma solução tampão e submetido a eletroforese em gel de acrilamida 10%. Após coloração com prata, foi possível observar uma distribuição homogênea de bandas ao longo do gel, o que sugere que o processo de lise foi eficiente e sem degradação de proteínas. (B) O lisado celular obtido com o uso de solução de lise (Tris-HCl pH 7,4 50 mM; acetato de potássio 100 mM; acetato de magnésio 2mM; 0,5 mM DTT; 1% Nonidet P-40 e inibidor de protease) foi submetido a eletroforese em gel de acrilamida 10%. Após coloração com prata, também foi possível observar uma distribuição homogênea de bandas ao longo do gel, demonstrando que o processo de lise foi eficiente e sem degradação de proteínas.

Uma vez estabelecida a etapa de lise, foi dada continuidade à padronização do protocolo de imunoprecipitação. Foi avaliada a metodologia estabelecida por Jain e colaboradores, a qual foi utilizada para isolamento de grânulos de estresse a partir de células de leveduras e de mamífero submetidas a estresse com azida de sódio e arsenito de sódio, respectivamente (Jain *et al.*, 2016). Com base nesse protocolo, após a lise celular, o extrato obtido foi centrifugado a fim de que os grânulos de RNPM pudessem decantar e formar um *pellet*, e esta fração enriquecida de grânulos foi ressuscitada e utilizada para imunoprecipitação. Em uma primeira avaliação, optou-se pela realização de um experimento piloto de imunoprecipitação de DDX6 de células HeLa submetidas a estresse com arsenito de sódio, a fim de verificar a reprodutibilidade do protocolo descrito por Jain e colaboradores. Através da análise por eletroforese em gel de acrilamida e coloração com prata, foi possível observar que, na amostra de imunoprecipitação eluída das *beads*, foi obtida uma boa quantidade de proteínas, inclusive com uma banda na altura correspondente a DDX6 (aproximadamente 55 kDa) (Figura 4.3 A, coluna 9). Por Western Blot, foi confirmado o isolamento de DDX6 (Figura 4.3 B) e pelo menos um de seus parceiros conhecidos, Dcp1a (Figura 4.3 C).

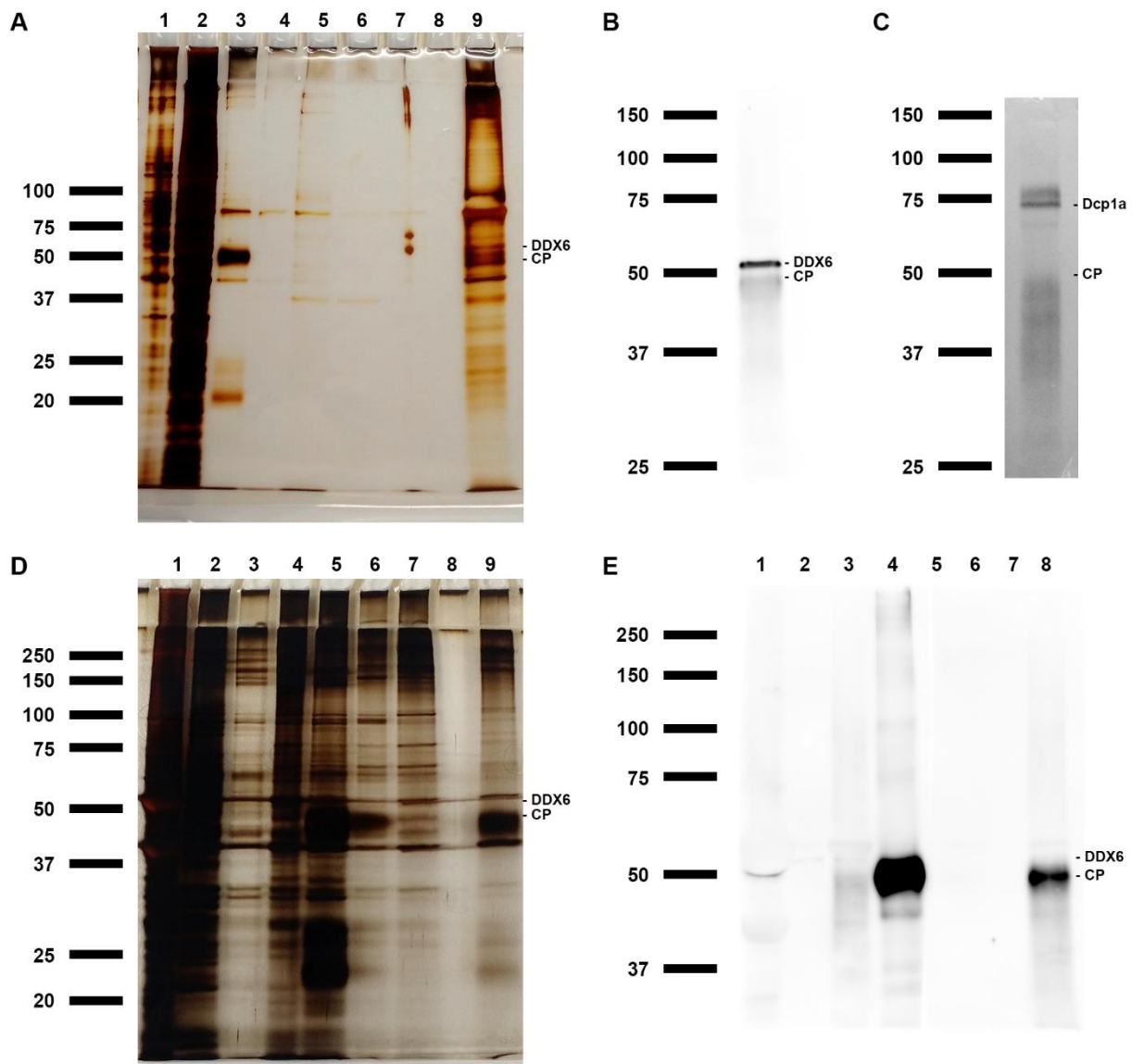


Figura 4.3. Padronização de coimunoprecipitação de DDX6 e seus parceiros em células HeLa e hASCs. (A) Análise por eletroforese em gel de acrilamida e coloração com prata do teste de imunoprecipitação de DDX6 em células HeLa submetidas a estresse: 1- *Pellet* após centrifugação a 1000 x g; 2- Sobrenadante após a centrifugação a 1000 x g; 3- Sobrenadante do extrato com anticorpo, após centrifugação a 16400 x g; 4- Extrato e anticorpo que não se ligaram as *beads* magnéticas; 5- Primeira lavagem das *beads* (tampão de lavagem 1); 6- Quarta lavagem das *beads* (tampão 2); 7- Quinta lavagem das *beads* (tampão 3); 8-Vazio; 9-Imunoprecipitado de DDX6. (B) Western Blot com imunoprecipitado de DDX6 e marcação com anticorpo anti-DDX6 e (C) anti-Dcp1a. (D) Análise do teste de imunoprecipitação de DDX6 em hASCs por eletroforese em gel de acrilamida e coloração com prata: 1- *Pellet* após centrifugação a 1000 x g; 2- Sobrenadante após a primeira centrifugação a 16400 x g; 3- Sobrenadante após a segunda centrifugação a 16400 x g; 4- Eluído das *beads* de pré-limpeza; 5- Sobrenadante do extrato com anticorpo, após centrifugação a 16400 x g; 6- Extrato e anticorpo que não se ligaram às *beads* magnéticas; 7- Primeira lavagem das *beads* (tampão de lavagem 1); 8-Vazio; 9-Imunoprecipitação de DDX6. (E) Análise do teste de imunoprecipitação de DDX6 em hASCs por Western Blot: 1- *Pellet* após centrifugação a 1000 x g; 2- Sobrenadante após a primeira centrifugação a 16400 x g; 3- Eluído das *beads* de pré-limpeza; 4- Sobrenadante do extrato com anticorpo, após centrifugação a 16400 x g; 5- Vazio; 6- Extrato e anticorpo que não se ligaram as *beads* magnéticas; 7- Vazio; 8- Imunoprecipitado de DDX6. Estão indicadas as alturas esperadas das proteínas DDX6, Dcp1a e para a cadeia pesada do anticorpo (CP).

Em seguida, este mesmo protocolo foi utilizado para a imunoprecipitação de DDX6 de hASCs, com algumas modificações. Em uma primeira avaliação do protocolo, observou-se que, durante as centrifugações para enriquecimento da fração de grânulos, formava-se um *pellet* difícil de ressuspender. Diante disso, foi levantada a hipótese de que isso se devia a uma lise pouco eficiente e a uma má separação da fração de membranas. Assim, foram feitas as seguintes adaptações: (1) o tampão de lise foi preparado com 1% de detergente e foram usados 4 mL de tampão para cada 5 garrafas de 180 cm²; (2) a primeira centrifugação – para retirada de membranas e restos celulares – foi feita a 1000 x g (em vez de 10 x g); (3) as centrifugações para enriquecimento de grânulos foram feitas a 16400 x g (em vez de 14000 x g); (4) foi feita uma etapa de pré-limpeza (incubação com as *beads* magnéticas sem anticorpo) antes da incubação com o anticorpo a fim de remover elementos (proteínas, RNA etc.) que se ligam inespecificamente às *beads*.

Após a realização do ensaio de imunoprecipitação com este novo protocolo, as amostras foram analisadas por eletroforese e Western Blot. Por eletroforese de gel de acrilamida e coloração com prata, observou-se que foram obtidas proteínas a partir da imunoprecipitação de DDX6 (Figura 4.3 D, coluna 9), mas com um padrão diferente do observado no teste feito com as células HeLa sob estresse (Figura 4.3 A, coluna 9). Por Western Blot, constatou-se que, através deste protocolo, não foi possível detectar a proteína DDX6, sendo observada apenas a banda correspondente à cadeia pesada do anticorpo (Figura 4.3 E, coluna 8). Por eletroforese e coloração com prata, também foram observadas muitas bandas de proteínas na amostra da lavagem das *beads* magnéticas, após a incubação com extrato celular e anticorpo (Figura 4.3 D, coluna 7). Assim, foi levantada a hipótese de que as condições de lavagem utilizadas não foram adequadas e houve perda de material nesta etapa. Além disso, por Western Blot, foi observada uma discreta marcação na altura de DDX6 no controle do sobrenadante após a primeira centrifugação a 16400 x g (Figura 4.3 E, coluna 2).

Diante destes resultados, foi realizado um novo teste com mudanças no protocolo de lavagem das *beads* magnéticas e aumento da velocidade de centrifugação de enriquecimento da fração de grânulos para 20000 x g, a fim de favorecer a decantação dos complexos associados a DDX6. A partir deste novo teste, também não houve sucesso no isolamento da proteína DDX6 (Figura 4.4 B, coluna 11). Observou-se que houve perda de proteínas na etapa de pré-limpeza (Figura 4.4 A, coluna 4) e, por Western Blot, não foi verificada marcação na altura correspondente a DDX6 no imunoprecipitado, nem nos controles. Assim, optou-se por fazer um novo teste sem a etapa de pré-limpeza. Além disso, foram feitas duas imunoprecipitações em paralelo: uma utilizando o *pellet* da etapa de centrifugação a 20000 x g (conforme foi feito anteriormente) e uma com o sobrenadante. Isso foi feito, pois uma das hipóteses levantadas seria que esta velocidade de centrifugação não seria suficiente para decantar os complexos associados a DDX6 em hASCs.

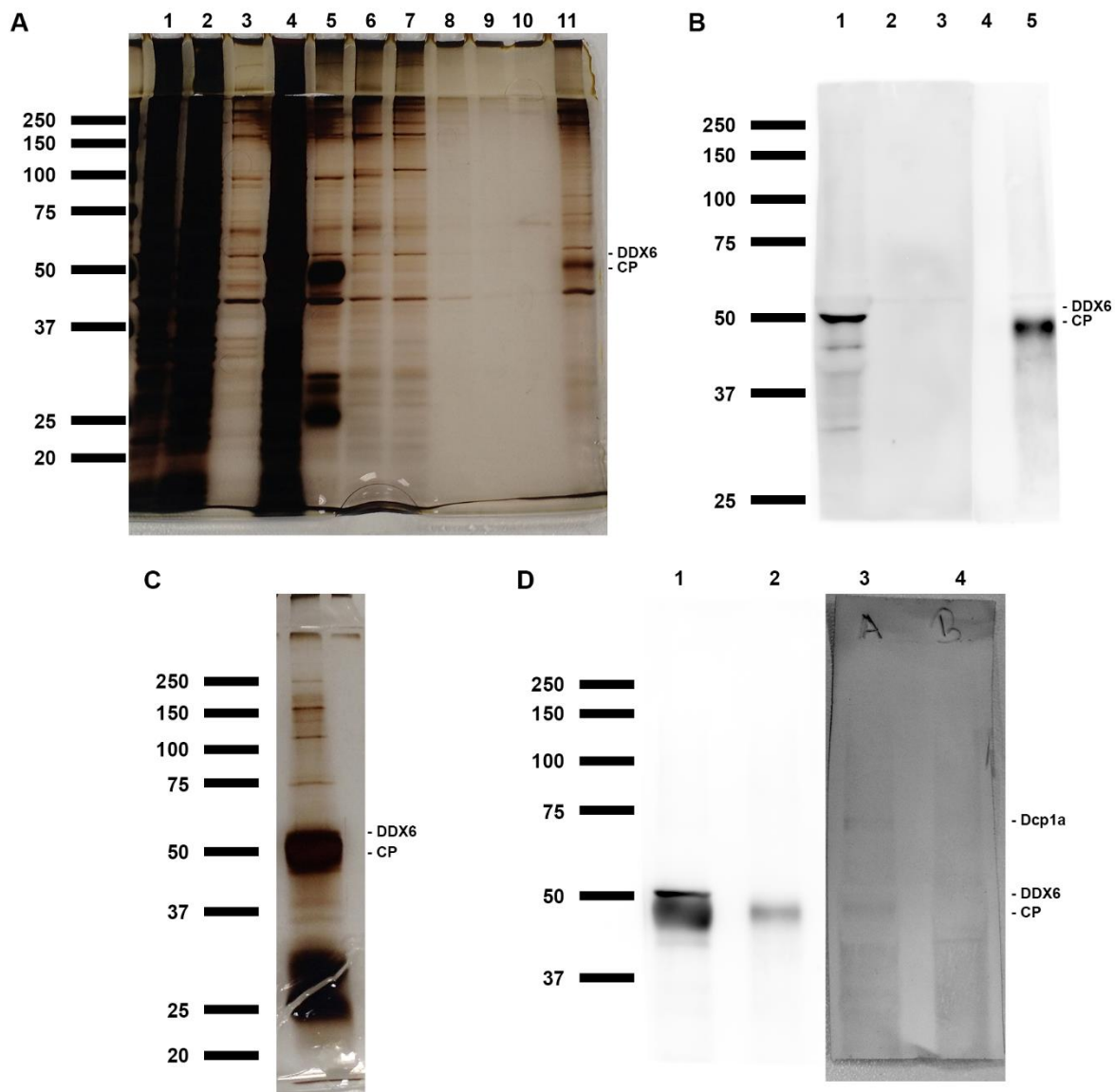


Figura 4.4. Coimunoprecipitação de DDX6 e seus parceiros em hASCs, padronização da centrifugação e da lavagem. (A) Análise por eletroforese em gel de acrilamida e coloração com prata do teste de imunoprecipitação de DDX6 em hASCs, teste com mudança no protocolo de lavagem: 1- *Pellet* após centrifugação a 1000 x g; 2- Sobrenadante após a primeira centrifugação a 20000 x g; 3- Sobrenadante após a segunda centrifugação a 20000 x g; 4- Eluído das *beads* de pré-limpeza; 5- Sobrenadante do extrato com anticorpo, após centrifugação a 20000 x g; 6- Extrato e anticorpo que não se ligaram as *beads* magnéticas; 7- Primeira lavagem das *beads* (tampão de lavagem 2); 8- Segunda lavagem das *beads* (tampão 2); 9- Terceira lavagem das *beads* (tampão 3); 10- Quarta lavagem das *beads* (tampão 4); 11- Imunoprecipitado de DDX6. (B) Western Blot com imunoprecipitado de DDX6 e marcação com anticorpo anti-DDX6: 1- Eluído das *beads* de pré-limpeza; 2- Extrato e anticorpo que não se ligaram as *beads* magnéticas; 3- Primeira lavagem das *beads* (tampão de lavagem 2); 4- Vazio; 5- Imunoprecipitado de DDX6. (C) Análise por eletroforese em gel de acrilamida e coloração com prata do imunoprecipitado de DDX6 em hASCs, teste sem pré-limpeza e com e sem enriquecimento de grânulos por centrifugação. (D) Esta mesma amostra foi analisada por Western Blot: 1- Imunoprecipitado de DDX6 com sobrenadante (centrifugação a 20000 x g), marcação para DDX6; 2- Imunoprecipitado de DDX6 com *pellet*, marcação para DDX6; 3- Imunoprecipitado de DDX6 com sobrenadante, marcação para Dcp1a; 4- Imunoprecipitado de DDX6 com *pellet*, marcação para Dcp1a. Estão indicadas as alturas esperadas para as proteínas DDX6, Dcp1a e para a cadeia pesada do anticorpo (CP).

Utilizando o protocolo de imunoprecipitação com o sobrenadante da centrifugação de 20000 x g, foi obtida uma boa quantidade de proteínas (Figura 4.4 C) e foi possível coimunoprecipitar a proteína DDX6 (Figura 4.4 D, coluna 1) e Dcp1a, um de seus parceiros conhecidos (Figura 4.4 D, coluna 3). Quando foi feito o protocolo com o *pellet* da centrifugação de 20000 x g, nem a proteína DDX6 nem Dcp1a estavam presentes (Figura 4.4 D, colunas 2 e 4). Diante disso, a amostra de imunoprecipitação obtida do sobrenadante foi analisada por espectrometria de massas, sendo identificadas 67 proteínas, as quais estão descritas na tabela 4.2 (Tabela 4.2; Anexo III Tabela S1). A partir dos dados obtidos, foi possível confirmar o isolamento de DDX6 a partir do protocolo de imunoprecipitação estabelecido. Ao classificar os peptídeos identificados por intensidade, observou-se que DDX6 ficou em segundo lugar, sendo que apenas moléculas de imunoglobulina (provenientes do anticorpo utilizado no protocolo) tiveram maior representação. Além disso, foram obtidos peptídeos de outras proteínas já descritas na literatura como parte de complexos com DDX6, como PABC1, PABC4, EDC3, UPF1, ATXN2, ATXN2L, HSPA5 e NUFIP2 (Ayache *et al.*, 2015). Portanto, os resultados obtidos pela análise por espectrometria de massas confirmaram que o protocolo estabelecido foi eficiente para coimunoprecipitação de DDX6 e de proteínas parceiras.

Para finalizar a padronização do protocolo de coimunoprecipitação de DDX6, foi feito um novo teste com as seguintes adaptações: utilização de uma etapa de pré-limpeza, redução da centrifugação do extrato celular de 20000 x g para 10000 x g e a utilização do reagente TRIzol para isolamento de proteínas e RNA. Neste novo teste, também foram feitos controles para verificar a eficiência e a especificidade do protocolo. Foram analisados: o *input* (extrato celular total, após centrifugação para retirar restos celulares); o eluído das *beads* magnéticas utilizadas na pré-limpeza; a imunoprecipitação de uma proteína não relacionada a DDX6 (no caso, foi utilizada a histona H3); o extrato celular com anticorpo que não se ligou às *beads* magnéticas; as condições de imunoprecipitação com e sem pré-limpeza e utilizando dois métodos de extração de proteínas: uso de tampão de amostra e de TRIzol. As amostras e controles foram submetidos a eletroforese em gel de acrilamida, coloração com prata (Figura 4.5) e análise por espectrometria de massas.

Tabela 4.2. Proteínas obtidas por coimunoprecipitação de DDX6, identificadas por espectrometria de massas, primeira análise.

Nome do gene	Peptídeos	Peptídeos Únicos	Intensidade
IGHG1;IGHG2;IGHG4;IGHG3	1	1	1.28E+09
DDX6	18	18	6.54E+08
FLII	22	12	2.05E+08
MYH9	22	18	1.97E+08
LRRFIP1	17	17	1.84E+08

PABPC1	16	10	1.82E+08
KIF14	1	1	1.64E+08
ACTB	8	0	1.59E+08
MAP1B	22	22	1.30E+08
MVP	17	17	1.28E+08
QPRT	5	5	9.10E+07
GBP1	1	1	7.52E+07
DCD	2	2	6.09E+07
ACTBL2	3	1	6.01E+07
YBX1;YBX2	4	2	5.41E+07
EDC3	7	7	4.51E+07
PABPC4	10	4	3.00E+07
UPF1	6	6	2.34E+07
FAM167B	1	1	2.05E+07
TMCO5B	1	1	1.94E+07
ATXN2	5	5	1.86E+07
SCHIP1;IQCJ-SCHIP1	1	1	1.83E+07
IGKV1-8;IGKV1-9;IGKV1-27	1	1	1.70E+07
FLII	12	2	1.57E+07
DSG1	3	3	1.47E+07
CKAP4	4	4	1.40E+07
JUP	5	5	1.18E+07
DSP	3	3	1.02E+07
MB21D2	4	4	9.40E+06
MYH14	2	1	9.27E+06
MYO1C	4	4	8.49E+06
ARHGAP24	2	2	7.13E+06
CSTA	2	2	6.77E+06
FAM120A	4	4	6.70E+06
MYO1B	5	4	5.98E+06
YBX3	3	1	5.65E+06
APC2	1	1	5.61E+06
RPL18A	2	2	5.03E+06
TUBB	3	0	4.91E+06
EEF1A1P5;EEF1A1;EEF1A2	1	1	4.89E+06
SYCP1	1	1	4.75E+06
WRN	1	1	4.61E+06
TUBA1B;TUBA4A	3	0	3.24E+06
RPL7	1	1	2.61E+06
LGALS7	1	1	2.35E+06
GGCT	1	1	2.26E+06
HSPA5	1	1	2.24E+06
HMCN2	1	1	2.17E+06
ACTA1;ACTC1;ACTG2;ACTA2	5	1	1.85E+06
RPLP0;RPLP0P6	1	1	1.80E+06

LYZ	1	1	1.68E+06
MYADM	1	1	1.59E+06
TPM4	1	0	1.58E+06
DDX5;DDX17	1	1	1.56E+06
U2AF2	1	1	1.40E+06
ATXN2L	1	1	1.39E+06
RPL13	1	1	1.36E+06
RBMS1;RBMS3	1	1	1.35E+06
NUFIP2	1	1	1.29E+06
CCDC80	1	1	1.13E+06
RPS4X	1	1	1.04E+06
PIP	1	1	7.56E+05
TCHH	1	1	7.06E+05
PDCD6IP	1	1	6.47E+05
PLB1	1	1	4.99E+05
SUGP2	1	1	4.90E+05
ZNF813	1	1	4.54E+05

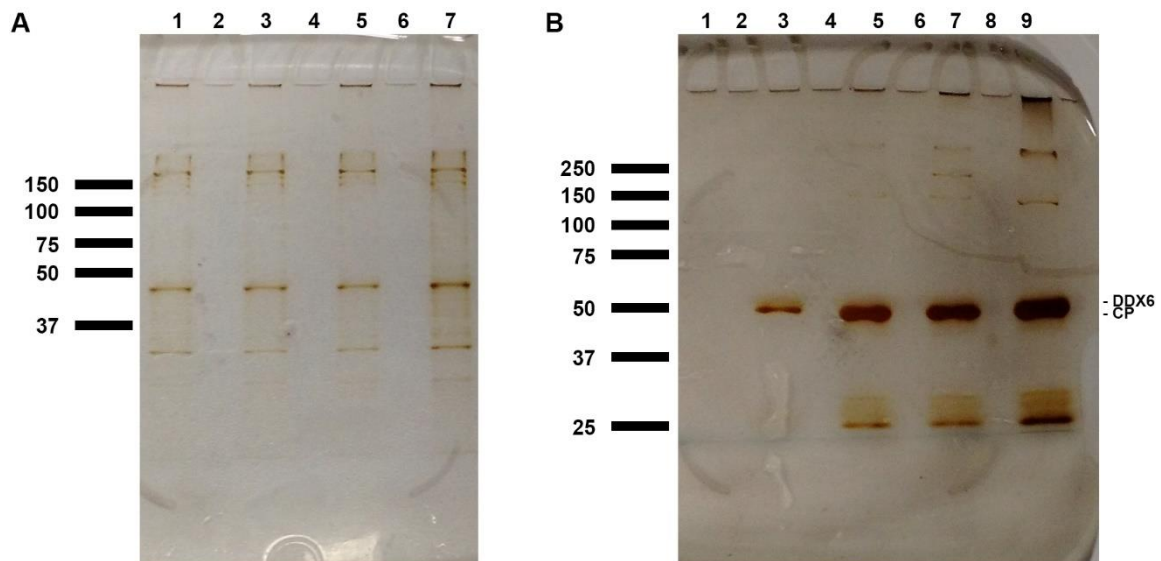


Figura 4.5. Coimunoprecipitação de DDX6 e seus parceiros em hASCs, padronização da pré-limpeza e da metodologia de eluição. (A) Análise por eletroforese em gel de acrilamida e coloração com prata dos controles da imunoprecipitação de DDX6 e histona H3 em hASCs: 1- Extrato e anticorpo que não se ligaram as *beads* magnéticas, teste de imunoprecipitação de DDX6 sem pré-limpeza; 3- Extrato e anticorpo que não se ligaram as *beads* magnéticas, teste de imunoprecipitação de DDX6 com pré-limpeza; 5- Extrato e anticorpo que não se ligaram as *beads* magnéticas, teste de imunoprecipitação de histona H3 sem pré-limpeza. 7- *Input* (extrato celular inicial) As colunas 2, 4 e 6 estão vazias. (B) Análise por eletroforese em gel de acrilamida e coloração com prata dos controles e da imunoprecipitação de DDX6 e histona H3 em hASCs: 1- Eluído das *beads* de pré-limpeza; 3- Imunoprecipitado de histona H3 sem pré-limpeza; 5- Imunoprecipitado de DDX6 sem pré-limpeza e eluição com tampão de amostra; 7- Imunoprecipitado de DDX6 com pré-limpeza e eluição com tampão de amostra; 9- Imunoprecipitado de DDX6 sem pré-limpeza e eluição com TRIzol. As colunas 2, 4, 6 e 8 estão vazias. Estão indicadas as alturas esperadas para a proteína DDX6 e para a cadeia pesada do anticorpo (CP).

A partir da análise por espectrometria de massas, foram identificados 111 peptídeos na coimunoprecipitação de DDX6 sem pré-limpeza e eluição com tampão de amostra; 144 peptídeos no teste com pré-limpeza e eluição com tampão de amostra; e 124 peptídeos no teste sem-pré-limpeza e eluição com TRIzol (Tabela 4.3, Anexo III Tabela S2). Nestes três testes, foi observada a presença de DDX6 como maior intensidade do que os demais peptídeos. Além disso, com estes três protocolos foram coimunoprecipitados peptídeos de proteínas já descritas como parceiras de DDX6, como PABC1, PABP4, EDC3, ATXN2, UPF1 e YBX1 (Tabela 4.3, Anexo III Tabela S2). Através da análise do *input*, foram identificados 591 peptídeos, dentre os quais estava a presença de DDX6, porém com intensidade igual a, em média, 0,009% das obtidas nas análises de coimunoprecipitação de DDX6. Também foram analisados o extrato celular com anticorpo que não se ligou às *beads* magnéticas. Neles também foi observada a presença de DDX6, mas com, em média, intensidade igual a 0,026% das obtidas nas análises de coimunoprecipitação de DDX6, confirmando a eficiência do protocolo estabelecido no enriquecimento desta proteína. Tendo em vista que o objetivo do trabalho é a coimunoprecipitação de DDX6 e outras proteínas do complexo, também foi verificada a eficiência de enriquecimento destes parceiros da helicase. EDC3, ATXN2 e YBX1, por exemplo, foram identificados na imunoprecipitação e não no *input*, nem no extrato do anticorpo que não se ligou às *beads* magnéticas. Já PABC1, foi identificado nestes controles, mas com uma intensidade correspondente a 0,6% da observada na imunoprecipitação (Anexo III Tabela S2).

Tabela 4.3. Proteínas obtidas por coimunoprecipitação de DDX6, identificadas por espectrometria de massas, segunda análise (50 com maior intensidade).

Nome do gene	Peptídeos			Peptídeos únicos			Intensidade		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
DDX6	23	19	27	23	19	27	1.32E+09	1.07E+09	3.26E+09
LRRFIP1	33	29	33	33	29	33	1.11E+09	8.63E+08	1.69E+09
FLII	46	42	48	23	22	25	8.73E+08	6.04E+08	1.71E+09
IGHG1;IGHG2;IGHG4;IGHG3	1	1	1	1	1	1	5.59E+08	1.51E+07	9.44E+08
PABPC1	19	17	25	13	10	17	2.90E+08	2.18E+08	5.92E+08
MYH9	83	11	23	67	7	19	9.50E+08	1.88E+07	7.63E+07
ACTB	13	7	13	0	0	0	3.89E+08	1.15E+08	4.61E+08
EDC3	14	12	21	14	12	21	1.55E+08	1.28E+08	4.88E+08
MAP1B	42	36	36	42	36	36	2.46E+08	1.60E+08	2.62E+08
IGKV1-8;IGKV1-9;IGKV1-27	1	1	1	1	1	1	1.07E+08	1.10E+08	2.67E+08
QPRT	6	5	6	6	5	6	1.04E+08	3.47E+07	2.74E+08
MB21D2	10	8	11	10	8	11	3.25E+07	4.17E+07	1.15E+08
MUC19	1	0	0	1	0	0	1.66E+08	0.00E+00	0.00E+00
ATXN2	11	11	9	11	11	9	3.41E+07	2.00E+07	6.96E+07

MVP	11	8	15	11	8	15	2.82E+07	1.93E+07	5.99E+07
SULF1	9	8	3	9	8	3	5.09E+07	3.74E+07	9.31E+06
YBX1	6	3	4	2	2	2	4.45E+07	7.25E+06	3.50E+07
PABPC4	12	12	12	6	5	5	2.58E+07	2.74E+07	2.36E+07
RPL7	7	3	5	7	3	5	3.12E+07	1.01E+07	3.25E+07
UPF1	14	7	10	14	7	10	2.86E+07	9.21E+06	3.59E+07
TUBA1C;TUBA1B	8	7	6	0	0	0	1.94E+07	1.94E+07	3.42E+07
ARHGAP24	8	8	10	8	8	10	1.81E+07	1.79E+07	3.52E+07
PDCD6	7	6	6	7	6	6	2.45E+07	1.90E+07	2.27E+07
MYL12A;MYL12B	7	1	2	2	1	1	5.84E+07	1.26E+06	3.87E+06
SAMHD1	8	6	8	8	6	8	2.04E+07	1.04E+07	2.97E+07
TUBB4B	5	7	9	0	0	0	1.19E+07	1.27E+07	3.17E+07
CKAP4	11	10	7	11	10	7	2.18E+07	1.41E+07	1.99E+07
RPL3	4	3	5	4	3	5	2.05E+07	1.68E+07	1.23E+07
RPL10A	3	1	4	3	1	4	1.56E+07	6.20E+06	2.59E+07
IFI16	6	3	5	6	3	5	2.03E+07	8.51E+06	1.73E+07
ACTBL2	3	4	4	0	1	0	0.00E+00	4.21E+07	0.00E+00
TGFBI	7	7	4	7	7	4	1.78E+07	1.19E+07	9.59E+06
BTBD10	3	5	7	3	5	7	6.76E+06	5.24E+06	2.56E+07
KIF14	1	0	1	1	0	1	1.64E+07	0.00E+00	2.09E+07
RPLP0;RPLP0P6	5	3	5	5	3	5	1.47E+07	3.44E+06	1.77E+07
RPS4X	2	2	6	2	2	6	3.89E+06	1.28E+07	1.78E+07
COL15A1	5	4	6	5	4	6	7.14E+06	5.75E+06	2.05E+07
PUF60	3	4	5	3	4	5	6.36E+06	6.93E+06	1.89E+07
RPL30	2	2	4	2	2	4	7.78E+06	3.59E+06	1.85E+07
LSM12	2	1	2	2	1	2	8.38E+06	4.57E+06	1.62E+07
TBC1D10C	1	1	1	1	1	1	3.09E+06	3.73E+06	2.06E+07
FLII	25	21	24	2	1	1	9.75E+06	4.27E+06	1.18E+07
PTRF	5	2	2	5	2	2	1.59E+07	2.81E+06	5.90E+06
RPL4	6	4	2	6	4	2	1.39E+07	6.43E+06	4.22E+06
MYL6	4	1	0	4	1	0	2.27E+07	1.47E+06	0.00E+00
RPL13	4	3	0	4	3	0	1.58E+07	7.81E+06	0.00E+00
MYO1C	13	1	1	12	1	1	2.28E+07	0.00E+00	9.36E+04
VIM	6	4	5	6	4	5	7.77E+06	3.92E+06	9.65E+06
SLC25A5	4	4	2	1	1	0	7.18E+06	3.86E+06	8.31E+06
RPL18A	5	3	1	5	3	1	1.26E+07	1.24E+06	5.16E+06

*1- Imunoprecipitação DDX6 com pré-limpeza e eluição com tampão de amostra; 2- Imunoprecipitação DDX6 sem pré-limpeza e eluição com tampão de amostra; 3- imunoprecipitação DDX6 sem pré-limpeza, eluição com TRIzol.

A fim de verificar a especificidade do protocolo utilizado, foi analisado o eluído das *beads* magnéticas utilizadas na pré-limpeza, sendo que foram identificados 41 peptídeos, dentre as quais estavam os de proteínas do citoesqueleto, mas não os de DDX6 (Anexo III Tabela S2), confirmando que esta proteína não se liga inespecificamente às *beads* magnéticas. Também para verificar a especificidade do protocolo, foi feito em paralelo a imunoprecipitação de histona H3, utilizando o

mesmo protocolo e reagentes de DDX6, com exceção do anticorpo. Por espectrometria de massas, foram identificados 67 peptídeos, dentre os quais estavam os da histona H3, mas não os de DDX6 (Anexo III Tabela S2), também confirmando a especificidade do protocolo utilizado.

Uma vez que a etapa de obtenção das hASCs e de padronização dos protocolos estava concluída, foi dado seguimento à análise da expressão gênica e, em seguida, ao comportamento de DDX6 com este modelo de estudo.

CAPÍTULO II

Análise da expressão gênica em hASCs após 24 horas de indução adipogênica e osteogênica

4.3. Análise de genes regulados positivamente e negativamente durante a diferenciação adipogênica e osteogênica

Para compreender os mecanismos envolvidos na diferenciação adipogênica e osteogênica de hASCs, foi realizada a análise da expressão gênica por sequenciamento de RNA total e associado a polissomos. Em trabalho anterior do grupo, observou-se que, após 24 horas de indução para adipogênese, as células passam por uma forte redução da taxa de síntese proteica, com mudança no perfil de fosforilação de 4E-BP1, um inibidor da atividade traducional (Marcon *et al.*, 2017), o que sugere uma forte regulação da expressão gênica. Tendo em vista estas observações prévias, neste trabalho foi realizada a análise de hASCs tratadas com meio controle ou indutor para adipogênese ou osteogênese por 24 horas. Este período de indução foi escolhido com o objetivo de entender os passos iniciais do processo de diferenciação.

A análise por sequenciamento foi realizada em colaboração com outros membros do grupo de pesquisa. Foram feitas três réplicas biológicas de cada condição, sendo analisado o RNAm total, associado a polissomos e a monossomos. Para as amostras de RNAm total, foram obtidas entre 48 e 58 milhões de *reads*; para as de RNAm associado a monossomos, foram 44 e 63 milhões de *reads*; enquanto que para as de RNAm associado a polissomos foram obtidas entre 54 e 82 milhões (Tabela 4.4). Os dados referentes ao detalhamento do protocolo de separação por gradiente de sacarose e sequenciamento das frações de RNA livre, associada a monossomos/polissomos leves e polissomos pesados de hASCs por gradiente de sacarose, os controles realizados e a confirmação dos resultados obtidos foram compilados em um manuscrito intitulado “Total and polysomal RNA-Seq of human adipose-derived stem cells undergoing early adipogenesis and osteogenesis” (Anexo I). Este artigo foi submetido para publicação na revista Scientific Data e tem como primeiros autores Bruna Marcon e a Dra.

Lucía Spangenberg, e como autor para correspondência a Dra. Patrícia Shigunov. Cabe destacar que este primeiro artigo não aborda a análise dos dados obtidos, que será descrita a seguir.

Tabela 4.4. Número de *reads* obtido por sequenciamento de cada condição, tipo de RNAm e réplica biológica (n=3).

Condição	RNAm	Réplica biológica	Número de <i>reads</i> (milhões)	Total de <i>reads</i> por condição(milhões)
NI	Total	1	8,82	57,45
		2	22,27	
		3	26,36	
	Monossomal	1	23,33	62,70
		2	17,40	
		3	21,96	
	Polissomal	1	19,65	54,41
		2	18,46	
		3	16,30	
Adipo	Total	1	13,55	49,98
		2	18,76	
		3	17,67	
	Monossomal	1	14,47	52,75
		2	15,62	
		3	22,66	
	Polissomal	1	17,66	61,60
		2	18,48	
		3	25,47	
Osteo	Total	1	17,17	48,77
		2	15,18	
		3	16,42	
	Monossomal	1	14,43	44,90
		2	13,89	
		3	16,58	
	Polissomal	1	30,46	81,92
		2	31,81	
		3	19,65	

Em seguida, utilizando-se as ferramentas gProfiler e KEGG, foi feita a análise de ontologia gênica dos genes identificados como diferencialmente expressos em hASCs induzidas para adipogênese pelo sequenciamento de RNAm total e associado a polissomos. Os resultados referentes à diferenciação osteogênica foram previamente analisados e publicados (Robert *et al.*, 2018). Porém, no presente trabalho, estes mesmos dados foram reavaliados utilizando outra ferramenta de ontologia gênica (gProfiler), a fim de que as informações observadas possam ser correlacionadas com a análise da diferenciação adipogênica e com o estudo do conteúdo de RNA dos grânulos de DDX6.

Primeiramente, foi feita a reanálise dos dados referentes à osteogênese. A partir dos dados de RNA total, observou-se que, 407 genes tiveram regulação positiva ($\log_2(\text{FC}) > 1$; $\text{FDR} < 0,01$) e 346 negativa ($\log_2(\text{FC}) < -1$; $\text{FDR} < 0,01$) (Anexo III Tabela S3), após 24 horas de indução osteogênica. Por ontologia gênica, observou-se que genes relacionados a morfogênese de estrutura anatômica, resposta a químico, estímulo externo e substância orgânica, regulação da cascata MAPK, de processo de desenvolvimento e metabólico tiveram regulação positiva (Figura 4.6 A, Anexo III Tabela S5). Já a análise dos genes com regulação negativa revelou que estavam enriquecidos termos relacionados a morfogênese de estrutura anatômica, processo de desenvolvimento celular, motilidade, migração e diferenciação celulares, além de desenvolvimento de sistema, estrutura anatômica, tecido e órgão multicelular e animal (Figura 4.6 B, Anexo III Tabela S5).

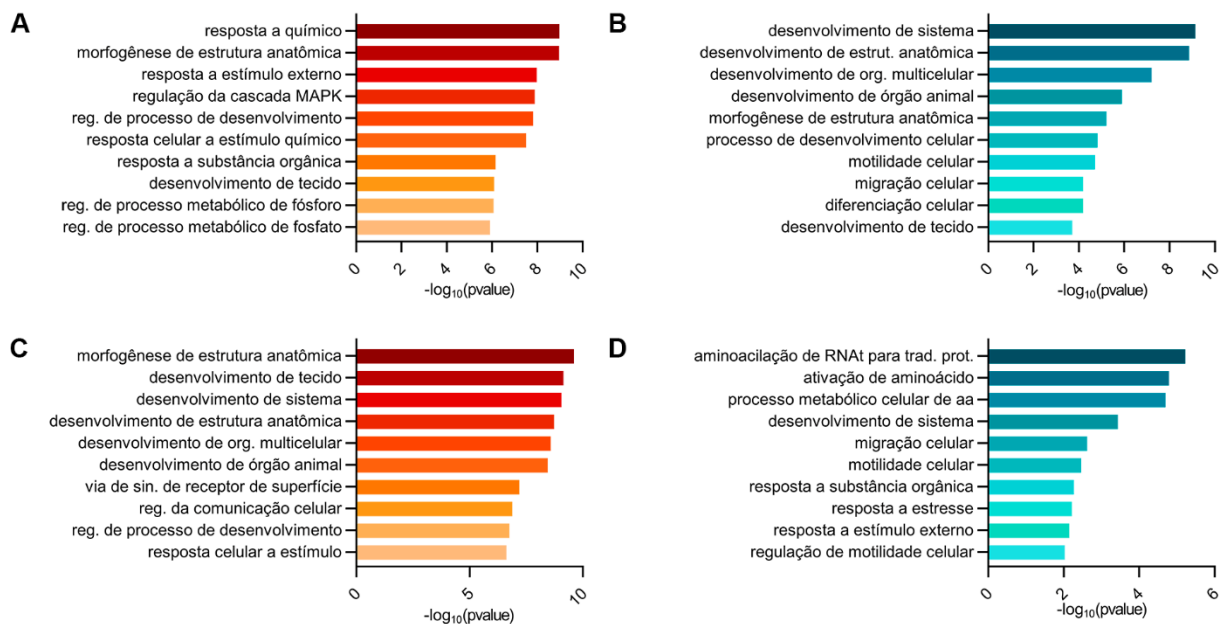


Figura 4.6. Análise por ontologia gênica de processo biológico de genes com expressão diferencial após 24 horas de osteogênese. Termos enriquecidos na análise de genes regulados positivamente ($\log(\text{FC}) > 1$; $\text{FDR} < 0,01$) (A) e negativamente ($\log(\text{FC}) < -1$; $\text{FDR} < 0,01$) (B) identificados no sequenciamento de RNAm total (gProfiler). Termos enriquecidos na análise de genes regulados positivamente (C) e negativamente (D) no sequenciamento de RNAm associado a polissomos pesados (gProfiler). Estão descritos os 10 termos com menor valor de p e $t \text{ depth} = 2-3$.

Na análise de RNA associado a polissomos após 24 horas de diferenciação osteogênica, foram observados 717 genes regulados positivamente e 317 negativamente (Anexo III Tabela S4). Por ontologia gênica, termos relacionados a morfogênese de estrutura anatômica, via de sinalização de receptor de superfície, resposta celular a estímulo e regulação da comunicação celular e de processo de desenvolvimento, além de desenvolvimento de tecido, de sistema, de organismo multicelular, de órgão animal estavam enriquecidos entre os genes regulados positivamente (Figura 4.6 C, Anexo III Tabela S5). Já os transcritos relacionados a

aminoacilação de RNAt, ativação e processo metabólico de aminoácido, desenvolvimento de sistema, resposta a substância orgânica, estímulo externo e estresse, e motilidade de migração celulares tiveram regulação negativa (Figura 4.6 D, Anexo III Tabela S5).

Em seguida, foi feita a análise dos dados referentes à diferenciação adipogênica. Através da análise de RNA total, observou-se que, após 24 horas de indução adipogênica, 551 genes tiveram regulação positiva e 942 negativa (Anexo III Tabela S6). Por ontologia gênica, observou-se que genes relacionados a desenvolvimento de tecidos e de sistema, resposta a substâncias orgânicas e componente contendo oxigênio e metabolismo de lipídeos tiveram regulação positiva. Por outro lado, a análise dos genes com regulação negativa demonstrou que estavam enriquecidos termos relacionados a ciclo celular, mitose, separação de cromátides irmãs, organização de organelas e montagem de nucleossomos (Figura 4.7 A e B, Anexo III Tabela S9). Entre os genes relacionados com ciclo celular que tiveram regulação negativa, estão os das ciclinas A2, B1, B2, D1 e F e das quinases dependentes de ciclinas (*cyclin-dependent kinases*, CDKs) 1 e 2. Por outro lado, CDKN1A/p21 (*cyclin-dependent kinase inhibitor 1A*), que participa da parada de ciclo celular, teve aumento na sua expressão ($\log_2(\text{FC})=0,84$; $\text{FDR}=4,3\text{E}-03$).

Em relação à análise de RNA associado a polissomos após 24 horas de diferenciação adipogênica, foram observados 727 genes regulados positivamente e 979 negativamente (Anexo III Tabela S7). Por ontologia gênica, observou-se que genes relacionados a resposta a substâncias orgânicas e estímulo químico, desenvolvimento de organismo multicelular, de sistema e de tecido e metabolismo de lipídeos tiveram aumento na sua expressão (Figura 4.7 C e D, Anexo III Tabela S9). Além disso, identificou-se também um aumento na associação com polissomos dos transcritos C/EBP- β e C/EBP- δ (Anexo III Tabela S7), os quais são fatores transcricionais cujo aumento na expressão durante o início da adipogênese já foi previamente descrito (Cao, Umek e McKnight, 1991; Janderová *et al.*, 2003). Por outro lado, os transcritos relacionados a mitose, organização de cromossomo e citoesqueleto, replicação do DNA e ciclo celular tiveram regulação negativa. Entre os transcritos com expressão reduzida, estão as ciclinas B1, B2, D1, E2 e F; e CDKs 1 e 2. Também foi observada regulação negativa de genes envolvidos no controle transcricional de ciclina D1, tais quais E2F-1 e JUN (Anexo III Tabela S7) e de genes relacionados a mudanças estruturais que ocorrem na célula durante o ciclo celular, como os envolvidos na replicação do DNA, componentes do complexo da DNA polimerase, helicases de DNA, lamínas, histonas e quinesinas. Por outro lado, CDKN1A/p1 também teve aumento na associação com polissomos ($\log_2(\text{FC})=0,93$; $\text{FDR}=2,86\text{E}-04$). Os dados de RNAm total e polissomal também foram analisados utilizando o banco de dados KEGG (Anexo III Tabela S10). Através desta plataforma, foi possível observar com maior clareza a regulação negativa de genes relacionados ao ciclo celular (Figura 4.7 E).

A partir dos dados analisados, observou-se uma forte regulação negativa de genes relacionados a ciclo celular e mitose tanto em relação ao RNA total, quanto polissomal, sugerindo que haveria tanto uma redução na quantidade de transcritos, quanto uma menor associação destes com polissomos. A menor ligação de RNAm à maquinaria traducional poderia, portanto, ser apenas um reflexo da menor quantidade de transcritos; ou poderia haver uma redução da sua taxa de tradução, sendo que estas sequências passariam da fração de polissomos pesados para a de leves/monossomal. Para avaliar isso, foi feita análise do RNA associado à fração monossomal e de polissomos leves. Foram observados 29 genes regulados positivamente e 14 negativamente na fração monossomal/polissomal leve (Anexo III Tabela S8). Por análise qualitativa, observou-se que todos os transcritos identificados como regulados positivamente nesta fração também o estavam na fração de polissomos pesados. O mesmo resultado foi observado para os genes regulados negativamente.

Em seguida, foi feita uma análise focada em genes relacionados a ciclo celular e proliferação. Foram selecionados todos os genes incluídos em termos relacionados a proliferação, mitose ou ciclo celular na análise de ontologia gênica. Em seguida, foi realizada a análise do $\log_2(\text{FC})$ de cada uma das frações e foi plotado em um gráfico de dispersão. Observou-se que a maior parte dos genes teve regulação similar nas frações total e associada a polissomos leves/monossomos e associada a polissomos pesados, embora com mais variabilidade na fração monossomal (Figura 4.8 A e B). Assim, os resultados sugerem que há uma forte regulação negativa de genes relacionados a ciclo celular e proliferação, a qual estaria majoritariamente ligada a uma regulação do nível de RNAm.

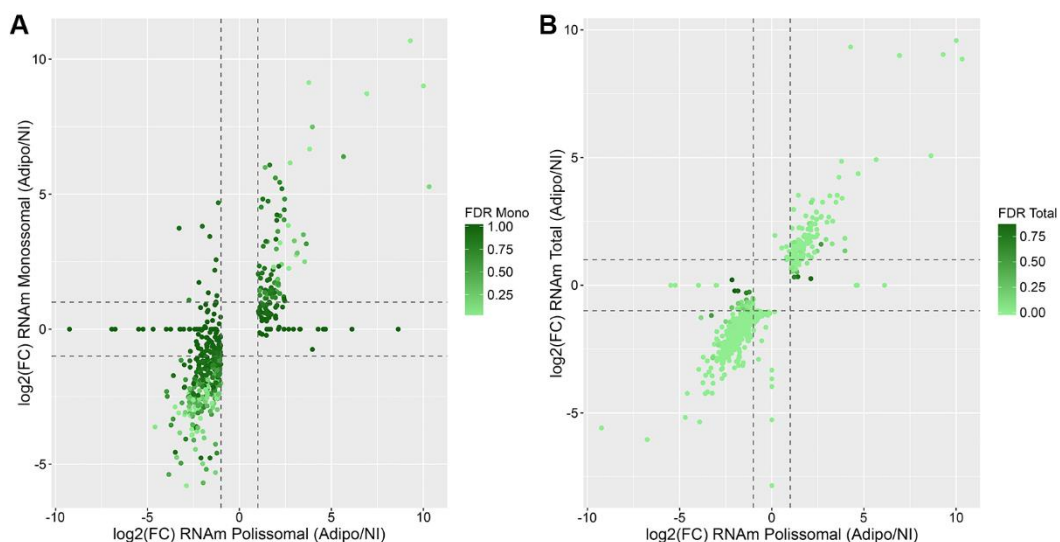


Figura 4.8. Regulação da expressão gênica de transcritos relacionados a ciclo celular e proliferação. (A) Os genes relacionados a ciclo celular e proliferação identificados como diferencialmente expressos nas frações monossomal/polissomos leves e/ou de polissomos pesados foram selecionados. O gráfico representa o diagrama de dispersão de $\log_2(\text{FC})$ destes genes em cada uma das frações. (B) A mesma análise foi realizada com os genes relacionados a ciclo celular e proliferação identificados diferencialmente expressos nas frações total e/ou de polissomos pesados.

4.4. hASCs induzidas para adipogênese apresentam parada no ciclo celular em G1 por uma via independente de DEPTOR

Tendo em vista a forte regulação negativa de genes relacionados a ciclo celular e proliferação, foi feita a análise para verificar estas condições em hASCs durante o início da diferenciação adipogênica. Para análise de proliferação, foi utilizado o ensaio de incorporação de EdU. Os resultados obtidos demonstraram que 55,17% (EP = $\pm 5,881$) das células tratadas com meio controle incorporaram EdU em um intervalo de 24 horas, enquanto que, para as células induzidas para adipogênese, este percentual foi de apenas 15,14% (EP = $\pm 4,539$) (Figura 4.9 A). Além disso, observou-se que houve redução da capacidade de proliferação de células de doadores com idade mais avançada (Tabela 4.5). Porém, em todos os casos, houve uma redução média de 40% no percentual de hASCs que incorporaram EdU após a indução para adipogênese, independentemente da idade do doador.

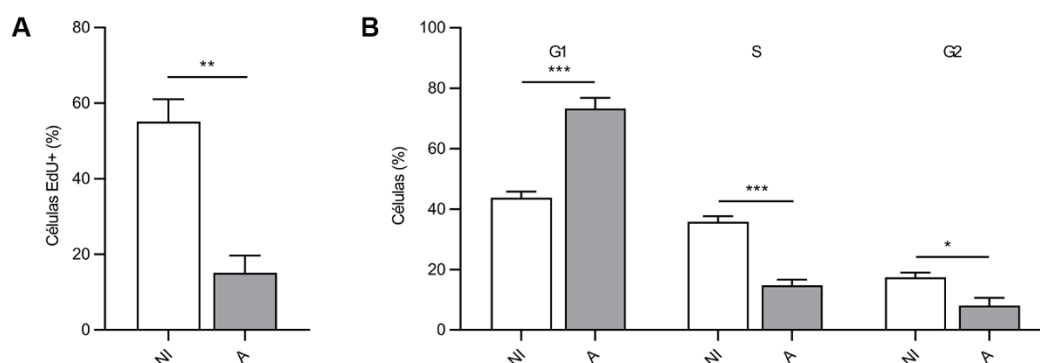


Figura 4.9. hASCs induzidas para adipogênese por 24 horas apresentam redução da proliferação, com parada do ciclo celular em G1. (A) Análise de proliferação celular por ensaios de incorporação de EdU com hASCs tratadas com meio controle ou de indução adipogênica por 24 horas (n=3). Média com erro padrão (EP); Análise por teste T de Student não-pareado: $**p < 0,01$. (B) Análise de ciclo celular de hASCs tratadas com meio controle e de indução adipogênica por 24 horas. As células foram marcadas com iodeto de propídeo e analisadas por citometria de fluxo. Média com EP; Análise por teste T de Student não-pareado: $*p < 0,05$; $***p < 0,001$.

Tabela 4.5. Ensaio de incorporação de EdU em hASCs tratadas com meio de manutenção (NI) ou induzidas para adipogênese (A) por 24 horas.

Doador	Idade	% EdU+ NI	% EdU+ A
Doador 1	17 anos	64,5	22,6
Doador 2	46 anos	44,3	6,93
Doador 3	27 anos	56,7	15,9

Para verificar qual fase do ciclo celular estava sendo afetada, foi realizado o ensaio de ciclo celular. Observou-se que as células tratadas com meio controle tiveram em média 43,78% (EP = $\pm 2,036$) de células em G1, 35,9% (EP = $\pm 1,709$) em S e 17,48% em G2 (EP = $\pm 1,522$). Por outro lado, quando foi feita indução adipogênica, 73,38% (EP = $\pm 3,490$) das células permaneceram em G1, e apenas 14,73% (EP = $\pm 1,928$) e 8,5% (EP = $\pm 2,530$) continuaram para S e G2, respectivamente (Figura 4.9 B). Assim como observado no ensaio de incorporação de EdU, houve uma redução no percentual de células em G2 em doadores de idade mais avançada, o que pode estar relacionado a uma redução na capacidade de proliferação. Mesmo assim, em todas as amostras, houve uma redução do percentual de células nas fases S e G2, com aumento em G1 quando a adipogênese foi induzida (Tabela 4.6). Desta forma, os resultados obtidos sugerem que hASCs induzidas para adipogênese por 24 horas possuem redução na atividade proliferativa, com parada do ciclo celular em G1.

Tabela 4.6. Análise de ciclo celular em hASCs tratadas com meio de manutenção (NI) ou induzidas para adipogênese (A) por 24 horas.

Doador	Idade	Condição	% G1	% S	% G2
Doador 1	17 anos	NI	39,9	35,1	21,1
		A	75,5	14,2	6,47
Doador 2	46 anos	NI	48,3	32,6	17,1
		A	80,1	12,7	2,03
Doador 3	27 anos	NI	40,8	35,2	18
		A	74,3	11,7	10,3
Doador 4	56 anos	NI	46,1	40,7	13,7
		A	63,6	20,3	13,8

Conforme descrito, em trabalho anterior do grupo, observou-se que hASCs induzidas para adipogênese por 72 horas apresentam redução do tamanho celular e das atividades traducional, migratória e proliferativa. Além disso, observou-se uma mudança no perfil de fosforilação de 4EBP1, um inibidor traducional regulado pela via mTOR (Marcon *et al.*, 2017). Estes resultados, juntamente com a constatação de que a parada no ciclo celular tem início já nas primeiras 24 horas de diferenciação adipogênica, levantaram a hipótese de que a via mTOR poderia regular a redução da atividade proliferativa observada.

Ao analisar os dados obtidos por sequenciamento do RNAm associado a polissomos, observou-se que o nível de expressão de mTOR e de outros genes relacionados não tiveram mudança significativa de expressão nas primeiras 24 horas de adipogênese, com exceção de

DEPTOR, um regulador negativo da via, que teve aumento na sua associação com polissomos ($\log_2(\text{FC})=1,58$; $\text{FDR}=1,64\text{E}-08$) (Anexo III Tabela S7). Utilizando-se a estratégia de RNAi, foi feito o silenciamento de DEPTOR em hASCs para verificação do seu papel na regulação da proliferação e do ciclo celular na adipogênese. Em 2011, Zhao e colaboradores demonstraram que a meia-vida de DEPTOR é de menos de 12 horas (Zhao, Xiong e Sun, 2011). Assim, no presente estudo, foi feito o silenciamento deste transcrito por 24 horas, o qual foi confirmado por RT-PCR e por Western Blot (Figura 4.10 A, B, C e D). Em seguida, as células foram tratadas com meio controle e indutor de adipogênese por mais 24 horas.

Através do ensaio de incorporação de EdU, observou-se que o silenciamento de DEPTOR reduziu a proliferação celular em hASCs tratadas tanto com meio controle quanto induzidas para adipogênese. Quando a transfecção foi realizada usando siRNA *scramble* 29,43% (EP= $\pm 1,828$) das hASCs não-induzidas e 20,73% (EP = $\pm 0,733$) das induzidas proliferaram (n=3). Quando foi feita transfecção com siRNA para DEPTOR, 23,37% (EP = $\pm 1,707$) das hASCs não-induzidas e 14,39% (EP = $\pm 3,541$) das induzidas para adipogênese proliferaram (n=3). Além disso, a redução da proliferação após a indução adipogênica foi mantida mesmo com o silenciamento de DEPTOR (Figura 4.10 E). Porém, pouca mudança foi observada no ciclo celular após o silenciamento de DEPTOR, sendo que o mesmo padrão foi obtido tanto nas células tratadas com meio não-indutor quanto nas induzidas (n=3) (Figura 4.10 F). Contudo, houve redução no percentual de células na fase S quando houve o silenciamento de DEPTOR (meio não-indutor). Estas observações sugerem que a parada na proliferação e no ciclo celular observada durante o início da adipogênese em hASCs ocorre por mecanismos que atuam independentemente da atividade de DEPTOR.

Os resultados observados demonstraram que as células induzidas para adipogênese por 24 horas apresentam redução de sua atividade proliferativa, com parada de ciclo celular em G1. Os dados obtidos por sequenciamento sugerem que este fenótipo estaria relacionado a uma forte redução da expressão de genes relacionados a ciclo celular, mitose e proliferação, sendo que esta regulação se daria majoritariamente em nível de RNAm total, por um mecanismo independente de DEPTOR. Estes resultados juntamente com estudos complementares realizados em colaboração com o grupo foram utilizados para elaboração do artigo intitulado “Cell cycle genes are downregulated after adipogenic triggering in human adipose-derived stem cells by regulation of mRNA abundance” (Anexo II), que tem como primeiro autor Bruna Marcon e como autores para correspondência Dr. Alejandro

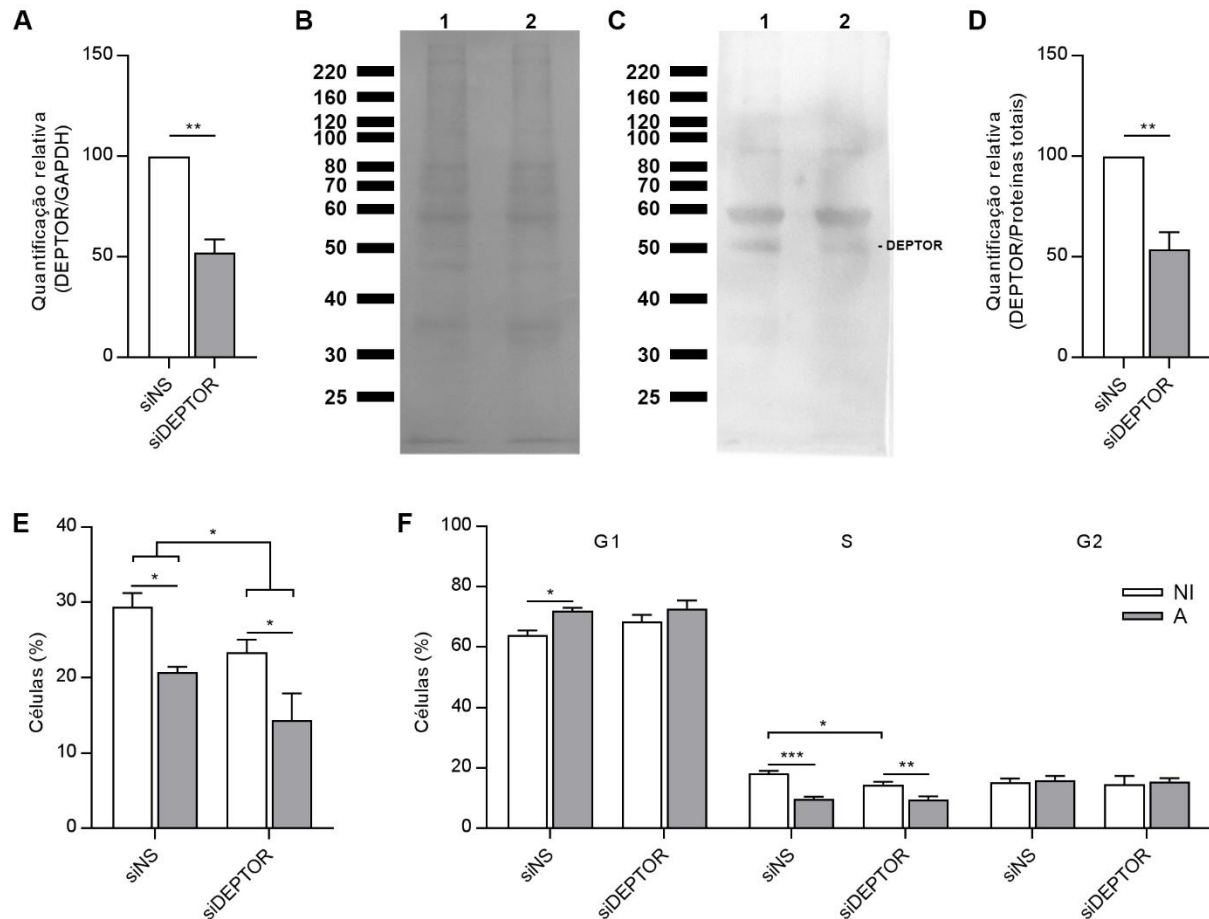


Figura 4.10. Silenciamento de RNAm de DEPTOR em hASCs leva à redução da proliferação. (A) qRT-PCR de DEPTOR de hASCs transfectadas com siRNA para DEPTOR (siDEPTOR) ou siRNA *scramble* (*nonsense* - siNS). Os resultados de qRT-PCR foram normalizados em relação aos níveis de GAPDH (n=3). Média com EP; Análise por teste T de Student não-pareado: **p < 0,01. (B) Membrana corada com Ponceau com amostras de proteínas de hASCs transfectadas com siDEPTOR (coluna 1) e siNS (coluna 2) e (C) Western Blot para DEPTOR, com indicação de peso molecular (em kDa). (D) Quantificação da expressão de DEPTOR por Western Blot; os resultados foram normalizados em relação à quantificação de proteínas totais (n=3). Média com EP; Análise por teste T de Student não-pareado: **p<0,01. E) Ensaio de incorporação de EdU com hASCs submetidas a *knockdown* de DEPTOR por 24 horas e tratadas com meio não-indutor (NI) e indutor de adipogênese (A) por 24 horas (n=3). Média com EP; *Two-way* ANOVA, com múltiplas comparações, seguido de pós-teste de Sidak: *p < 0,05. (F) Análise de ciclo celular de hASCs submetidas a *knockdown* de DEPTOR por 24 horas e tratadas com meio não-indutor (NI) e indutor de adipogênese (A) por 24 horas. As células foram coradas com solução de iodeto de propídeo e analisadas por citometria de fluxo (n=3). Média com EP; *Two-way* ANOVA, com múltiplas comparações, seguido de pós-teste de Sidak: *p < 0,05; **p < 0,01; ***p<0,001.

CAPÍTULO III

Análise da dinâmica de DDX6 em hASCs

4.5. Análise do perfil de expressão de DDX6 em hASCs

Os resultados até então obtidos sugerem que, durante o início da adipogênese, as hASCs passam por uma importante regulação da expressão gênica, a qual está relacionada a mudanças na abundância de RNAm. Esta regulação pode ocorrer tanto por mecanismos transcricionais quanto pós-transcricionais, como controle da estabilidade de RNAm. Conforme descrito anteriormente, em uma tese de Doutorado desenvolvida no grupo, foi demonstrado que DDX6 é expressa em hASCs e que, quando foi feito o silenciamento desta proteína seguido de indução para diferenciação adipogênica, as células tiveram um maior acúmulo de lipídeos (Cofré, 2015). Além disso, outros grupos de pesquisa já demonstraram que DDX6 possui um importante papel na regulação da expressão gênica, atuando tanto em mecanismos de controle traducional, quanto de estabilidade de RNAm em diferentes células, inclusive em células-tronco. Diante disso, foi levantada a hipótese de que DDX6 poderia estar envolvida na regulação da expressão gênica durante o início do processo de diferenciação de hASCs. A fim de avaliar o possível papel de DDX6 na manutenção do estado de *stemness* e na diferenciação, foi primeiramente feita uma caracterização geral da expressão desta proteína em hASCs.

4.5.1. DDX6 localiza-se dispersa no citoplasma de hASCs e é observada em estruturas granulares

Para confirmar a expressão e o padrão de distribuição de DDX6 em hASCs, foi feita a análise dos dados obtidos por sequenciamento do RNAm total e associado a polissomos e também por imunofluorescência. Através das informações obtidas por sequenciamento, observou-se que o transcrito de DDX6 está presente no RNA total (Anexo III Tabelas S3 e S6) e encontra-se associado à fração polissomal (Anexo III Tabelas S4 e S7), o que sugere que ele é expresso em hASCs nas condições avaliadas. Através da análise por imunofluorescência, foi confirmado que a proteína DDX6 é expressa em hASCs e se encontra dispersa pelo citoplasma, sendo que, em alguns pontos, ela se concentra em estruturas granulares (Figura 4.11, setas brancas).

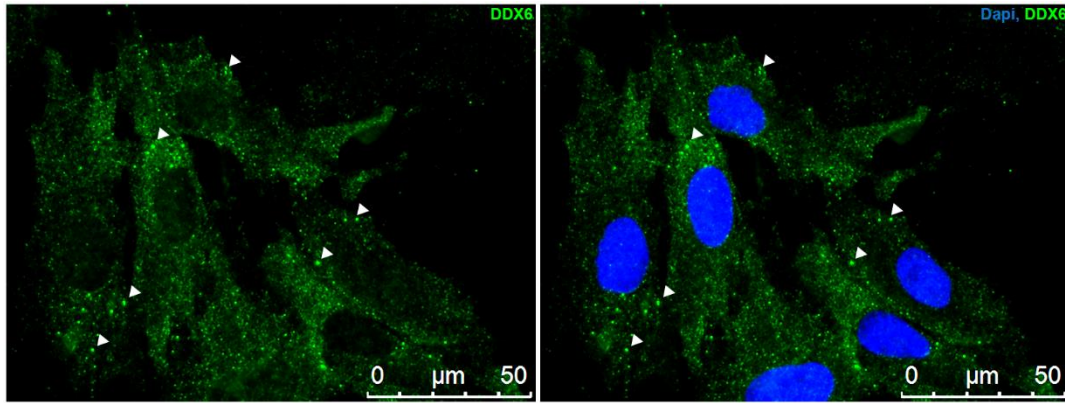


Figura 4.11. Análise da localização de DDX6 em hASCs mantidas em meio não indutor. Através da análise por imunofluorescência, foi possível observar que a helicase DDX6 encontra-se dispersa pelo citoplasma e também concentrada em algumas regiões, formando estruturas granulares (setas brancas). Núcleos foram corados com DAPI.

4.5.2. Grânulos de DDX6 observados em hASCs são dependentes de RNA

A partir da observação da presença de grânulos que contêm DDX6 em hASCs, a etapa seguinte do trabalho consistiu em compreender a natureza destas estruturas. Diferentes trabalhos prévios demonstraram a capacidade de DDX6 de se associar a complexos contendo RNA (Ayache *et al.*, 2015; Collier e Parker, 2005; Wang, Y. *et al.*, 2015) e de que a associação RNA-proteína é importante para a manutenção de grânulos contendo esta helicase (Ernoul-Lange *et al.*, 2012). Assim, a primeira questão avaliada foi se os grânulos contendo DDX6 observados em hASCs dependem de RNA para manutenção de sua estrutura. Para isso, foi realizado o tratamento de hASCs com RNase A seguido de imunofluorescência com anti-DDX6, a fim de verificar se a degradação do RNA levaria a uma desmontagem dos grânulos. Para este ensaio, as células precisam ser primeiramente tratadas com solução de permeabilização (contendo 0,5% Triton X-100) e RNase ainda vivas. Como o tratamento com detergente causa danos à estrutura da célula, foi feito um controle com as células que foram apenas incubadas com a solução de permeabilização, sem RNase. Após a realização da imunomarcção, foi possível observar a presença de grânulos contendo DDX6 nas células permeabilizadas, mas sem RNase A (Figura 4.12 A e C, setas brancas), apesar dos danos causados à estrutura da célula. Quando foi feito tratamento com RNase A, houve grande redução da presença de grânulos contendo DDX6, sendo que os poucos grânulos ainda presentes eram menores do que os observados no controle (Figura 4.12 B e D, setas brancas). Este resultado sugere que a manutenção da estrutura dos grânulos contendo DDX6 em hASCs dependem de RNA.

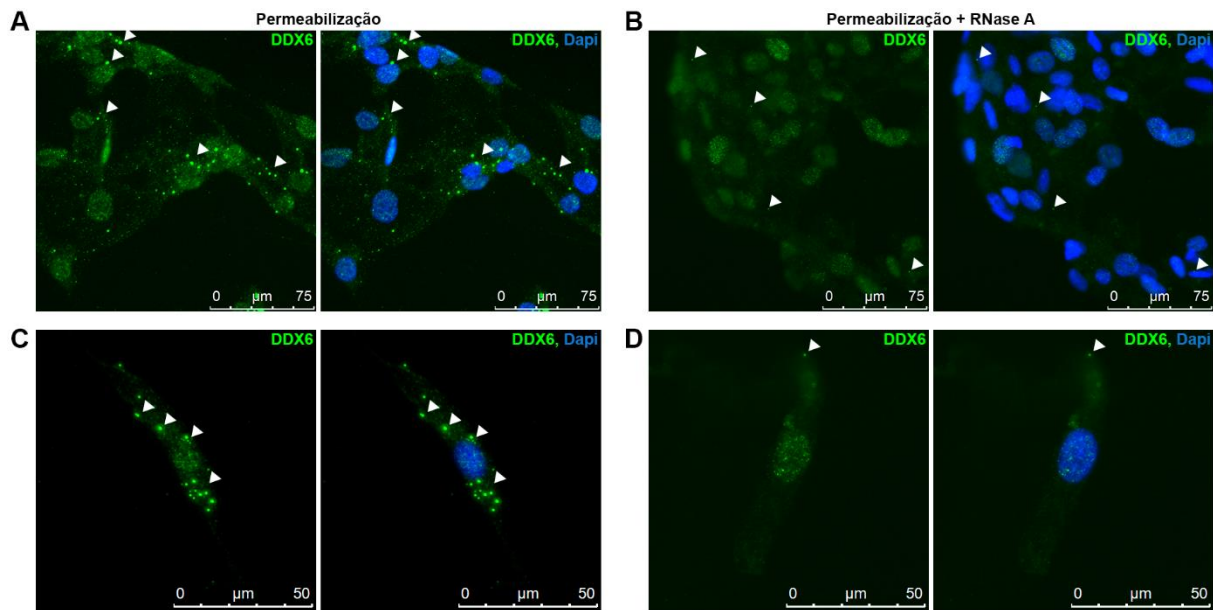


Figura 4.12. Análise da distribuição de DDX6 em hASCs tratadas com RNase A. (A) Através da análise por imunofluorescência da localização de DDX6 em hASCs que foram apenas permeabilizadas, foi possível observar a presença de estruturas granulares contendo DDX6 (setas brancas). (B) Quando foi feito o tratamento com 10 mg/mL de RNase A por 5 minutos, houve a redução da presença de grânulos contendo DDX6, sendo que os poucos grânulos presentes eram menores do que os observados no controle (setas brancas). Uma maior magnificação das células apenas permeabilizadas (C) e das tratadas com RNase A (D) também é apresentada. Em todos os painéis, as setas brancas destacam os grânulos observados. Núcleos foram corados com DAPI.

4.5.3. Grânulos de DDX6 observados em hASCs colocalizam com *Dcp1a* e, sob estresse, com *TIA1* e *PABP*

Trabalhos anteriores demonstraram a presença de DDX6 em dois tipos de grânulos que contêm RNA: grânulos de estresse (Nonhoff *et al.*, 2007) e *P-bodies* (Ayache *et al.*, 2015; Chu e Rana, 2006; Coller e Parker, 2005; Minshall *et al.*, 2009). Estas estruturas apresentam algumas proteínas em comum, mas também outras específicas (Kedersha *et al.*, 2005). A fim de fazer uma caracterização inicial sobre a composição proteica dos grânulos de DDX6 em hASCs, foi feita análise por imunofluorescência de hASCs para verificação da colocalização entre esta helicase e proteínas específicas de grânulos de estresse e de *P-bodies*.

Conforme descrito anteriormente, duas proteínas características de grânulos de estresse são TIA1 e TIAR (Kedersha *et al.*, 1999). Através de análise por microscopia confocal, observou-se que a proteína TIA1 está concentrada no núcleo de hASCs, enquanto que DDX6 tem localização majoritariamente citoplasmática (Figura 4.13, primeira coluna).

Esta observação demonstra que os grânulos de DDX6 observados em hASCs não apresentam esta proteína característica de grânulos de estresse. Para verificar se a composição destes grânulos muda após a indução de estresse, a mesma avaliação foi feita com hASCs tratadas com arsenito de sódio. Nesta situação, observa-se que uma parte das proteínas TIA1 desloca-se para o citoplasma e passa a compor os chamados grânulos de estresse. Nesta situação, observa-se a colocalização parcial das estruturas granulares contendo DDX6 com os grânulos de TIA1 (Figura 4.13, segunda coluna). Nota-se que há a presença de regiões em que há a colocalização de grânulos de DDX6 e de TIA1 (Figura 4.13, segunda coluna, setas abertas), além de grânulos marcados apenas com TIA1 (Figura 4.13, segunda coluna, asteriscos) ou DDX6 (Figura 4.13, segunda coluna, setas brancas). Também se destaca a presença de grânulos de DDX6 ou de TIA1 justapostos (Figura 4.13, segunda coluna, losangos).

Outra proteína previamente caracterizada como presente apenas em grânulos de estresse (e não em *P-bodies*) é PABP-1 (Kedersha *et al.*, 2005). A fim de confirmar as observações feitas com a marcação de TIA, o mesmo ensaio foi realizado para marcação com PABP. Observou-se que em hASCs mantidas em meio controle (sem estresse), PABP encontra-se majoritariamente dispersa no citoplasma, porém não é observada em grânulos. Nesta condição, portanto, não é observada a colocalização entre DDX6 e PABP em estruturas granulares (Figura 4.14, primeira coluna). Porém, quando foi feita a indução de estresse, PABP passou a compor estruturas granulares, as quais colocalizam parcialmente com DDX6, semelhantemente ao padrão observado na análise com TIA1 (Figura 4.14, primeira coluna).

Em seguida, foi feita marcação para DDX6 e Dcp1a, uma proteína que faz parte do complexo de decapeamento do RNAm (Lykke-Andersen, 2002) e é encontrada em *P-bodies* (Hubstenberger *et al.*, 2017; Kedersha *et al.*, 2005; Sheth e Parker, 2003). Assim como DDX6, a proteína Dcp1a encontra-se dispersa no citoplasma de hASCs, mas também é observada em estruturas granulares. Nestes grânulos, observa-se a colocalização parcial com DDX6 (Figura 4.15). Quando as células foram submetidas ao estresse, também foi observada uma colocalização parcial entre estas proteínas (Figura 4.15).

As observações realizadas demonstram que em hASCs mantidas em condições não-estressantes, os grânulos citoplasmáticos de DDX6 colocalizam com Dcp1a, mas não com TIA1, nem PABP, tendo, portanto, um perfil mais semelhante ao de *P-bodies*. Porém, quando foi feito o tratamento com arsenito de sódio, observou-se a formação de grânulos de estresse compostos por TIA1 e também compostos por PABP, os quais colocalizam parcialmente com DDX6. Em situação de estresse, também se observou a colocalização parcial entre DDX6 e Dcp1a.

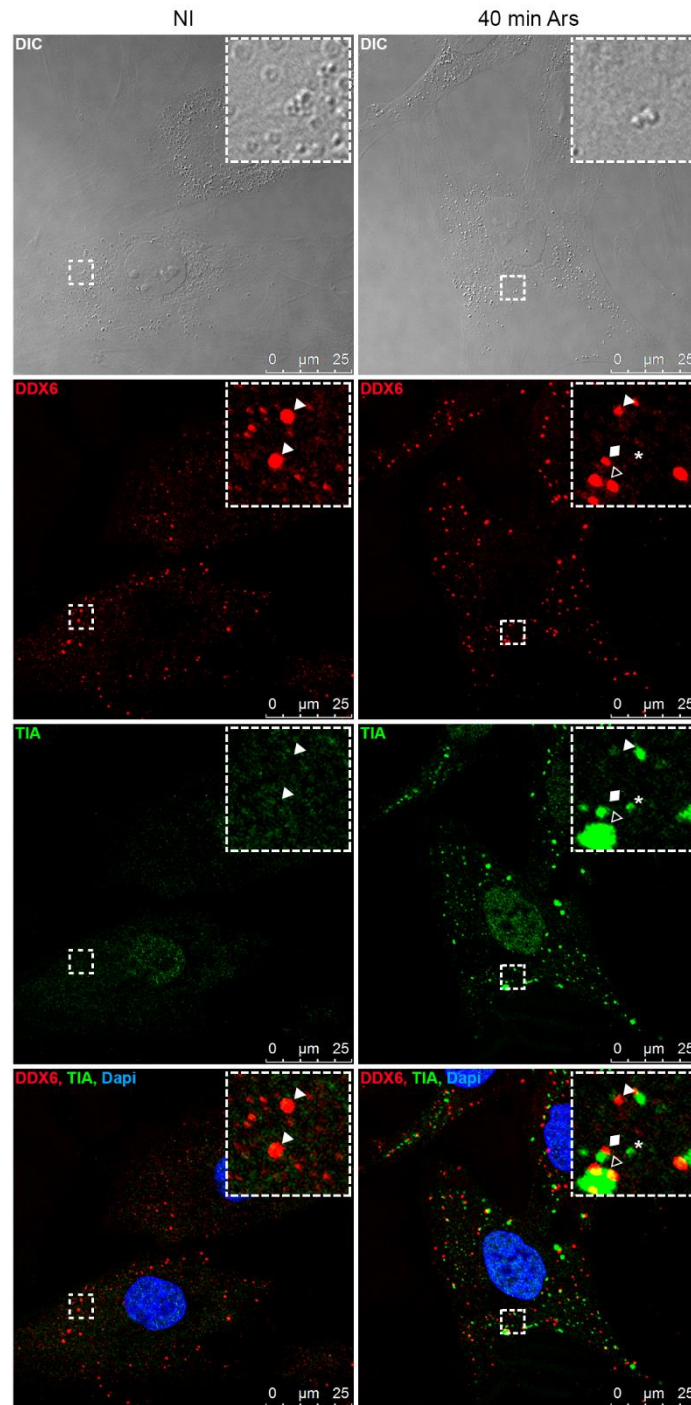


Figura 4.13. Localização de TIA1 e DDX6 em hASCs em condições controle e submetidas a estresse. Foi realizada imunofluorescência de hASCs mantidas em meio de cultivo ou submetidas a estresse com arsenito de sódio (0,5 mM por 40 minutos), seguida de análise por microscopia confocal. Foi possível observar que em hASCs mantidas em meio controle, a proteína TIA1 encontra-se concentrada majoritariamente no núcleo, não havendo colocalização com os grânulos de com DDX6 (primeira coluna, setas brancas). Porém, quando foi feita a indução do estresse (segunda coluna), TIA1 desloca-se para o citoplasma, onde passa a compor os grânulos de estresse. Nesta condição, foi observada a colocalização parcial entre os grânulos de DDX6 e os de TIA1 (setas abertas). Porém, destaca-se que, no estresse, também são observados grânulos apenas marcados com DDX6 (setas brancas) e apenas marcados com TIA1 (asteriscos), sendo que alguns destes encontram-se justapostos (losangos). Núcleos foram corados com DAPI.

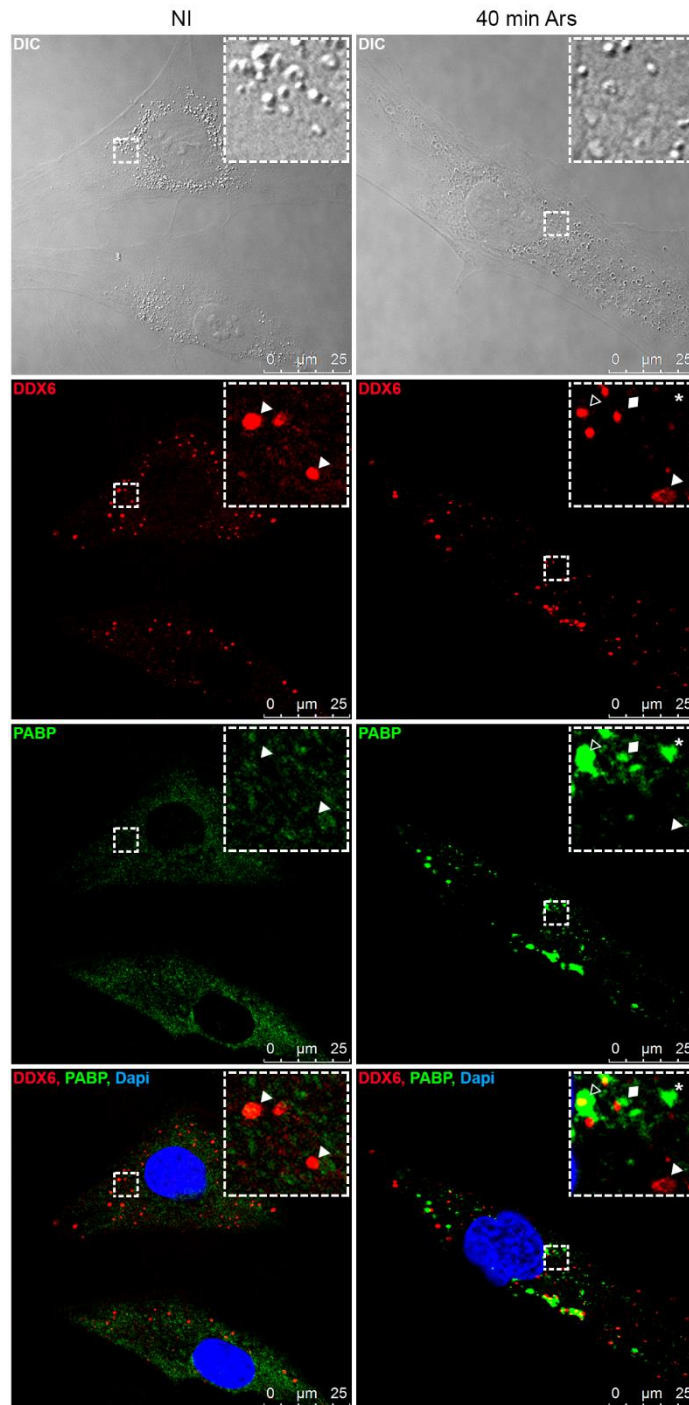


Figura 4.14. Localização de PABP e DDX6 em hASCs em condições controle e submetidas a estresse. Foi realizada imunofluorescência de hASCs mantidas em meio de cultivo ou submetidas a estresse com arsenito de sódio (0,5 mM por 40 minutos), seguida de análise por microscopia confocal. Foi possível observar que em hASCs mantidas em meio controle, PABP encontra-se dispersa no citoplasma, não havendo colocalização com os grânulos de com DDX6 (primeira coluna, setas brancas). Porém, quando foi feita a indução do estresse (segunda coluna), PABP passa a concentrar-se em grânulos de estresse, os quais colocalizam parcialmente com as estruturas granulares contendo DDX6 (setas abertas). Destaca-se que, no estresse, também foram observados grânulos apenas marcados com DDX6 (setas brancas) e apenas marcados com PABP (asteriscos), sendo que alguns destes encontram-se justapostos (losangos). Núcleos foram corados com DAPI.

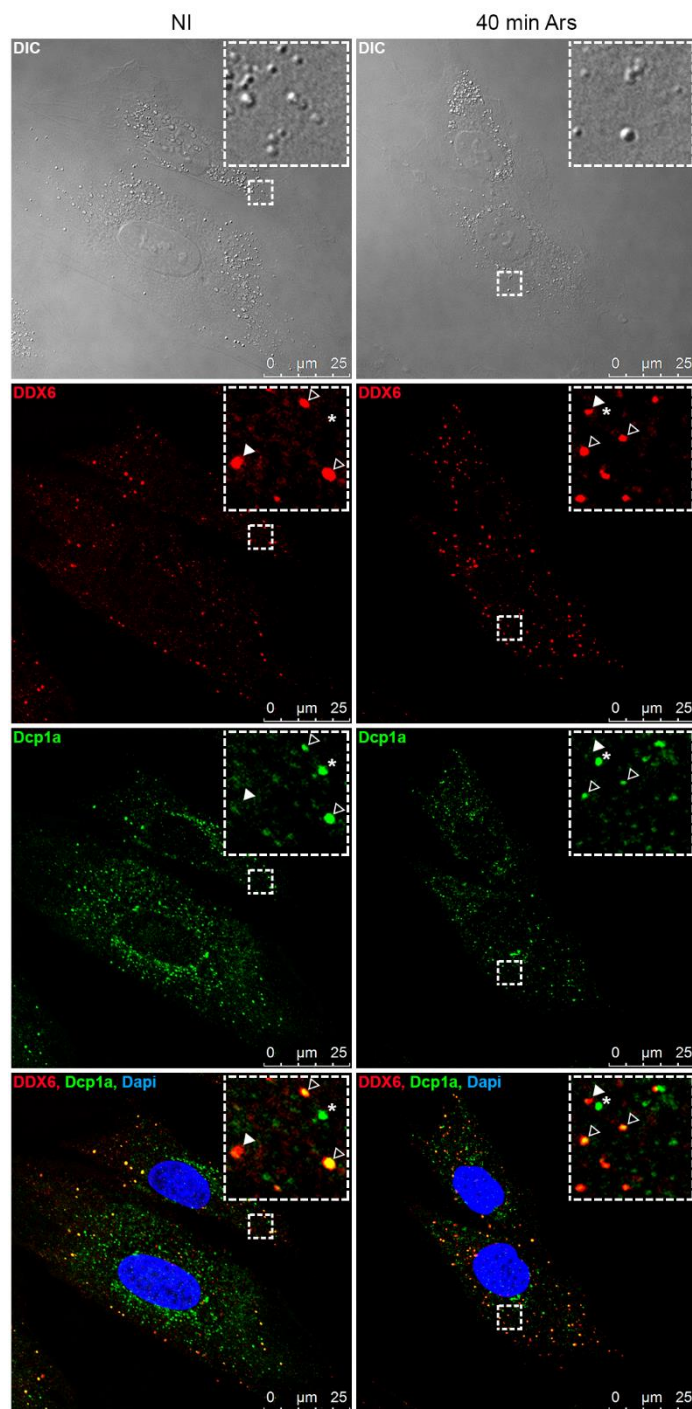


Figura 4.15. Localização de Dcp1a e DDX6 em hASCs em condições controle e submetidas a estresse. Foi realizada imunofluorescência de hASCs mantidas em meio de cultivo ou submetidas a estresse com arsenito de sódio (0,5 mM por 40 minutos), seguida de análise por microscopia confocal. Foi possível observar que em hASCs a proteína Dcp1a possui um padrão de distribuição semelhante ao de DDX6, estando dispersa no citoplasma, mas também concentrada em grânulos. Estes grânulos apresentam uma colocalização parcial com DDX6. São observados grânulos apenas marcados com DDX6 (setas brancas), apenas marcados com Dcp1a (asteriscos) e também grânulos em que ambas as proteínas são encontradas (setas abertas) em ambas as condições, controle (primeira coluna) e estresse (segunda coluna). Núcleos foram corados com DAPI.

4.5.4. Grânulos de DDX6 observados em hASCs são enriquecidos com produtos ribossomais defeituosos apenas quando é feita a indução de estresse

Artigos prévios demonstraram que há um aumento na formação de *P-bodies* a partir da redução da atividade traducional e liberação do RNAm dos polissomos (Sheth e Parker, 2003; Teixeira *et al.*, 2005). A utilização de drogas como a puromicina, que causam a uma terminação prematura da síntese proteica, leva, portanto, a um aumento na formação de *P-bodies* (Eulalio *et al.*, 2007). Além disso, a terminação prematura do processo de tradução leva à formação de produtos ribossomais defeituosos (*defective ribosomal products*, DRIPs) (Ganassi *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2012). A fim de compreender se o processo de parada prematura da tradução e a liberação de DRIPs poderia influenciar na formação dos grânulos de DDX6 observados em hASCs, foi feita análise usando o kit Click-it Plus OPP Protein Synthesis Assay Alexa 488 (Invitrogen). O princípio deste protocolo consiste na marcação de peptídeos nascentes com um análogo de puromicina, o qual contém um radical alcino (O-propargil-puromicina, OPP). Esta molécula é incorporada na cadeia de peptídeos que estão sendo ativamente sintetizados, levando à terminação prematura da tradução e à liberação da cadeia nascente. Estes peptídeos defeituosos (DRIPs) que contêm OPP podem então ser identificados através da ligação de uma molécula de azida fluorescente por uma reação de cicloadição azida-alcino catalisada por cobre (Liu *et al.*, 2012). Assim, esta metodologia permite a análise do processo de indução da terminação prematura da síntese proteica, além de permitir a análise da localização dos DRIPs formados. Em seguida, foi feita marcação com anticorpo anti-DDX6 e as amostras foram analisadas por microscopia confocal.

Primeiramente, foi feita a quantificação de grânulos contendo DDX6 em hASCs tratadas ou não com OPP. Observou-se que a incubação com o análogo de puromicina levou a um aumento de aproximadamente 80% no número médio de grânulos de DDX6 por célula (Figuras 4.16), confirmando que a formação destes grânulos pode ser estimulada pela parada prematura do processo de síntese proteica. A partir da marcação do OPP, constatou-se que, nas hASCs mantidas em meio controle, os DRIPs estão localizados tanto no citoplasma quanto no núcleo, observando-se regiões com diferentes intensidades de sinal (Figuras 4.17 e 4.18), o que é compatível com resultados obtidos em outros tipos celulares (Liu *et al.*, 2012). Quando foi feita a marcação com anti-DDX6, observou-se que há a presença de DRIPs nas regiões correspondentes aos grânulos de DDX6, embora não

pareça haver um enriquecimento do sinal de OPP nestes pontos (Figura 4.17, coluna 1, setas brancas).

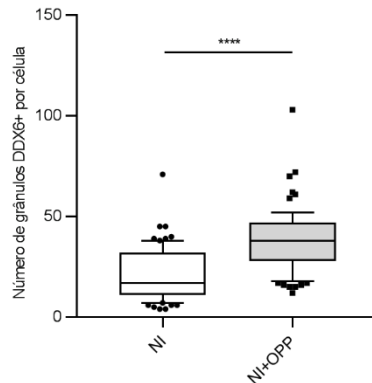


Figura 4.16. Quantificação de grânulos de DDX6 em hASCs tratadas com um análogo de puromicina. Quantificação do número de grânulos de DDX6 por célula em hASCs mantidas em meio não-indutor e tratadas (NI+OPP) ou não (NI) com OPP. Foram analisadas 70 células por condição (n=70). Quartil 10-90%. Teste de Mann-Whitney: ****p < 0,0001.

Para avaliar melhor a relação de enriquecimento de DRIPs em regiões granulares, a mesma análise foi realizada em hASCs submetidas a estresse com arsenito de sódio, sendo que foi feita marcação tanto com DDX6 quanto com TIAR, que é um marcador característico de grânulos de estresse. Quando as hASCs foram incubadas com OPP em meio de cultivo controle, a proteína TIAR estava concentrada no núcleo (Figura 4.18, coluna 1). Isso demonstra que o tratamento realizado com OPP, embora tenha levado a um aumento na formação de grânulos de DDX6 (Figuras 4.16), não chegou a induzir a formação de grânulos de estresse característicos. Quando o OPP foi adicionado juntamente com o arsenito, TIAR migra para o citoplasma, onde participa da formação de grânulos de estresse citoplasmáticos, nos quais se observa um aumento do sinal de OPP em relação ao restante do citoplasma (Figura 4.18, coluna 2, setas brancas), o que sugere um enriquecimento de DRIPs nessas estruturas. A mesma observação foi feita nos grânulos de DDX6 em hASCs submetidas a estresse com arsenito de sódio (Figura 4.17, coluna 2, setas brancas).

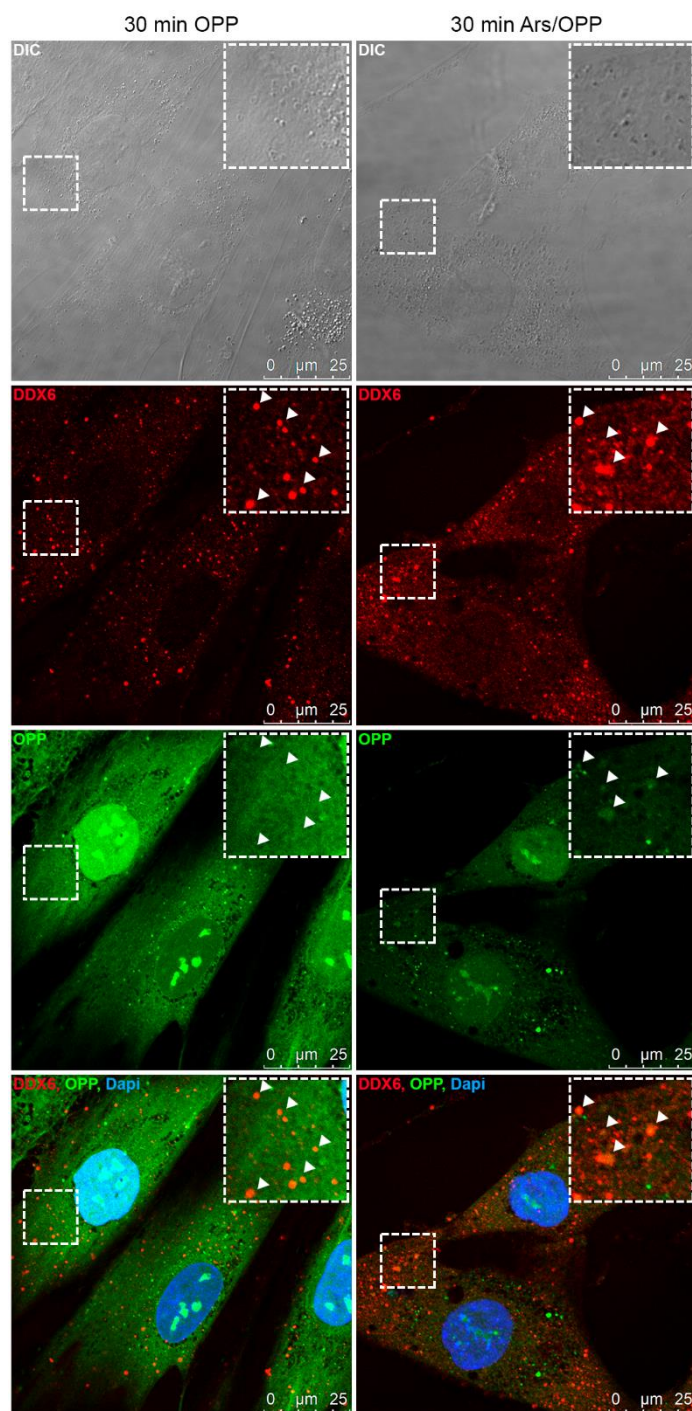


Figura 4.17. Localização de DRIPs e DDX6 em hASCs em condições controle e submetidas a estresse. Análise por microscopia confocal da localização de DRIPs marcadas com OPP (20 μ M) por 30 minutos em meio de cultivo controle (primeira coluna) ou meio de cultivo acrescido de arsenito de sódio (0,5 mM) e OPP (20 μ M) (segunda coluna), seguida de imunofluorescência com anti-DDX6. É possível observar que tanto nas células mantidas em meio controle quanto nas submetidas a estresse há a presença de grânulos citoplasmáticos contendo DDX6 (setas brancas). A marcação de DRIPs com OPP demonstra uma redução do sinal obtido quando as células são tratadas com arsenito, o que é compatível com a redução da atividade traducional. Mesmo assim, no estresse, é possível notar um maior sinal de OPP na região dos grânulos (setas brancas) quando comparado ao restante do citoplasma. Núcleos foram corados com DAPI.

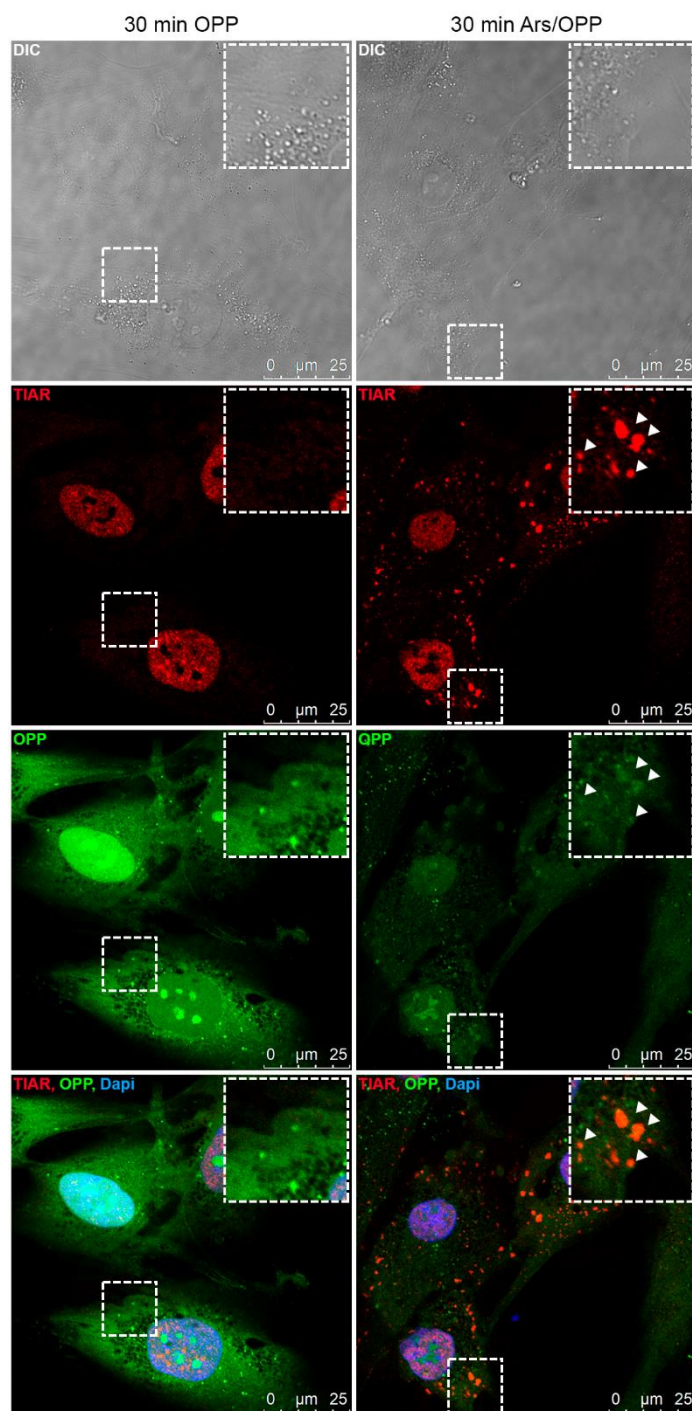


Figura 4.18. Localização de DRIPs e TIAR em hASCs em condições controle e submetidas a estresse. Análise por microscopia confocal da localização de DRIPs marcadas com OPP (20 μ M) por 30 minutos em meio de cultivo controle (primeira coluna) ou meio de cultivo acrescido de arsenito de sódio (0,5 mM) e OPP (20 μ M) (segunda coluna), seguida de imunofluorescência com anti-TIAR. Nas células mantidas em meio controle (coluna 1), a proteína TIAR encontra-se concentrada na região nuclear. Já nas células submetidas a estresse (coluna 2), TIAR é observada tanto no núcleo quanto em grânulos de estresse citoplasmáticos (setas brancas). Na região dos grânulos de estresse, observa-se também um maior sinal de OPP (setas brancas) quando comparado ao restante do citoplasma. Núcleos foram corados com DAPI.

A fim de corroborar as observações feitas, as imagens adquiridas por microscopia confocal foram analisadas utilizando-se o sistema Columbus™ para quantificação do enriquecimento de DRIPS na região dos grânulos de TIAR e de DDX6. O enriquecimento de DRIPs nos grânulos foi avaliado através da razão entre a intensidade média de OPP nos grânulos e a intensidade média de OPP no restante do citoplasma. Os dados obtidos para cada grânulo foram plotados em um histograma de frequência. Comparando-se os histogramas na análise de grânulos de DDX6, observou-se um aumento do enriquecimento de DRIPs quando as células foram submetidas a estresse (Figura 4.19 A e B). O perfil de enriquecimento de DRIPs nos grânulos de DDX6 de hASCs tratadas com arsenito assemelha-se ao observado em grânulos de TIAR (Figura 4.19 C). Para analisar esta mudança no perfil de enriquecimento, foi feita quantificação do percentual de grânulos em que a razão entre a intensidade de DRIPs dentro e fora do grânulos foi maior do que 1,5 (Ganassi *et al.*, 2016). Foi constatado que em hASCs não submetidas a estresse, apenas 13,8% dos grânulos de DDX6 estavam enriquecidos em DRIPs (ou seja, tiveram a razão do sinal maior do que 1,5). Já quando as células foram tratadas com arsenito, este percentual aumentou para 41,99% (Figura 4.19 D). Em comparação, o percentual de grânulos de estresse (marcados com TIAR) enriquecidos em DRIPs foi de 66,42% (Figura 4.19 E).

As observações realizadas sugerem que, quando mantidas em condições de cultivo não-estressantes, hASCs possuem grânulos de DDX6 cuja formação é estimulada pelo uso de um agente que cause a parada prematura do processo de síntese proteica, como o OPP, mas que não estão enriquecidos em DRIPs. Quando um agente estressante é adicionado (como o arsenito de sódio), há uma redução da atividade traducional (com diminuição do sinal geral de OPP) e a formação de grânulos de DDX6 enriquecidos em DRIPs.

A partir dos resultados até então obtidos, constatou-se que hASCs expressam DDX6, sendo que esta proteína se encontra majoritariamente na região citoplasmática, sendo observada tanto dispersa no citoplasma quanto em grânulos. Estes grânulos não são enriquecidos em DRIPs, mas têm a manutenção de sua estrutura dependente de RNA. Além disso, pelo menos uma parte destas estruturas granulares contém Dcp1a, uma proteína característica de *P-bodies*, e sua formação é estimulada pelo uso de um análogo de puomicina. Quando as hASCs são submetidas a estresse, situação em que ocorre uma redução da atividade traducional, DDX6 é observada em grânulos que colocalizam parcialmente tanto com proteínas características de grânulos de estresse (TIA1 e PABP) quanto de *P-bodies*. Essas observações sugerem que, semelhante ao observado em outros tipos celulares, em hASCs, DDX6 passa por mudanças no seu padrão de distribuição quando as células são submetidas a mudanças no seu padrão de

expressão gênica. Além disso, os resultados obtidos pela análise por sequenciamento do RNA total e associado a polissomos de hASCs induzidas para adipogênese e osteogênese demonstrou que há uma significativa mudança da expressão gênica nas primeiras 24 horas de indução para diferenciação. Em trabalho prévio do grupo, também foi demonstrado que hASCs induzidas para diferenciação adipogênica apresentam uma forte regulação negativa de atividade traducional nas primeiras 24 horas de adipogênese (Marcon *et al.*, 2017). Diante destas observações, a etapa seguinte do trabalho consistiu em avaliar o comportamento de DDX6 em hASCs induzidas para diferenciação.

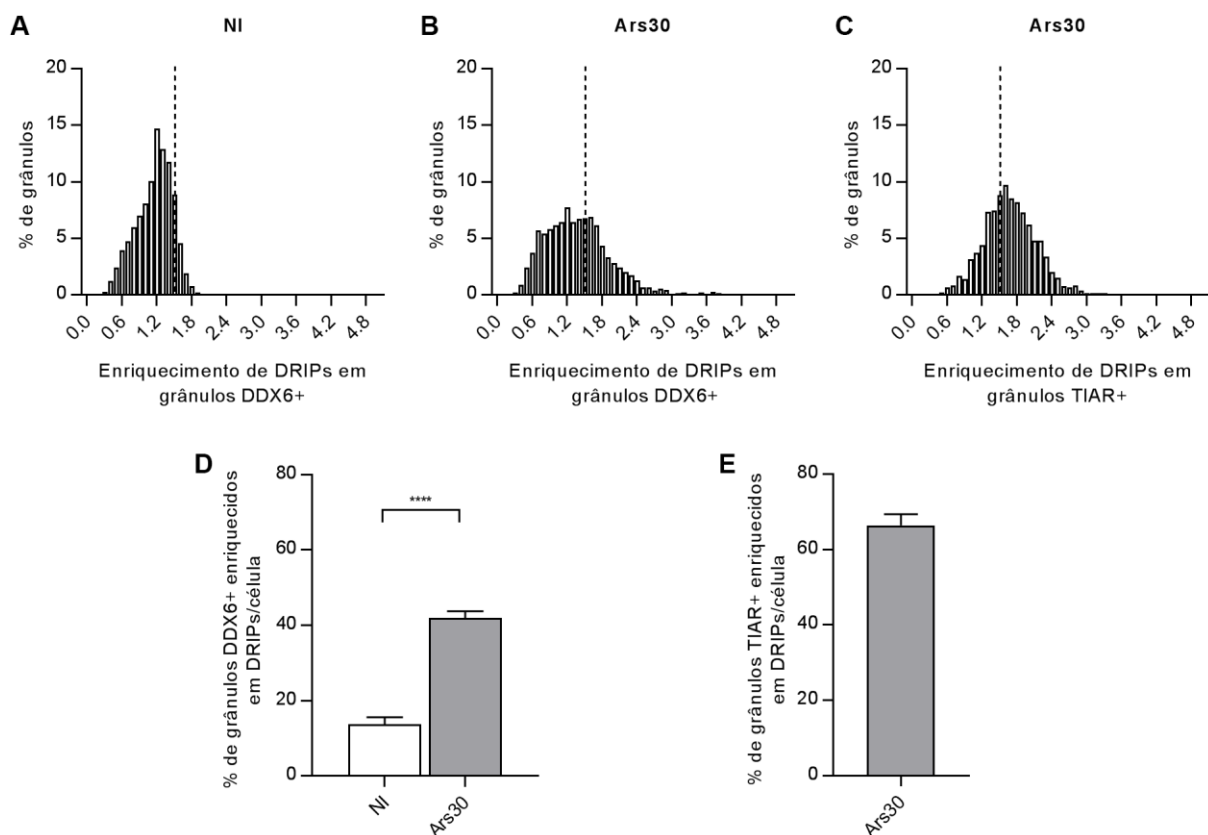


Figura 4.19. Análise do enriquecimento de DRIPs em grânulos de DDX6 e de TIAR observados em hASCs. (A) Histograma de distribuição de frequência (percentual) do enriquecimento de DRIPs em grânulos de DDX6 de hASCs mantidas em meio de cultivo controle. O enriquecimento das DRIPs foi calculado pela razão entre a intensidade média de OPP na região de cada grânulo e a intensidade média de OPP no restante do citoplasma. (B) Histograma de distribuição de frequência do enriquecimento de DRIPs em grânulos de DDX6 de hASCs submetidas a estresse. (C) Histograma de distribuição de frequência do enriquecimento de DRIPs em grânulos de TIAR de hASCs submetidas a estresse. Foram analisados pelo menos 1700 grânulos por condição. (D) Percentual de grânulos de DDX6 com enriquecimento de DRIPs > 1,5 por célula. Foram analisadas pelo menos 34 células por condição. Média com EP. Teste de Mann-Whitney; **** $p < 0,0001$. (E) Percentual de grânulos de TIAR com enriquecimento de DRIPs > 1,5 por célula. Foram analisadas 32 células. Média com EP.

4.6. hASCs induzidas para adipogênese e osteogênese por 24 horas apresentam mudança no padrão de distribuição de DDX6

Através de análise de imunofluorescência, observou-se que DDX6 também se encontra principalmente dispersa no citoplasma, com a presença de grânulos, tanto em hASCs induzidas para adipogênese quanto para osteogênese por 24 horas (Figura 4.20). Porém, quando foi feita a indução adipogênica, houve uma diminuição no percentual de células que contêm grânulos (Figura 4.21 A) e também uma redução no número de estruturas granulares contendo DDX6 por célula em comparação ao observado em hASCs não-induzidas (Figura 4.21 B e C). Enquanto que, quando foi feita indução para osteogênese, foi observado um aumento no número de grânulos por célula (Figura 4.21 B e C). É interessante notar que há uma grande variabilidade no número de grânulos por célula em todas as condições (Figura 4.21 D), sendo que as medianas obtidas para cada uma das condições foram sempre menores do que as médias (Figura 4.21 B e C).

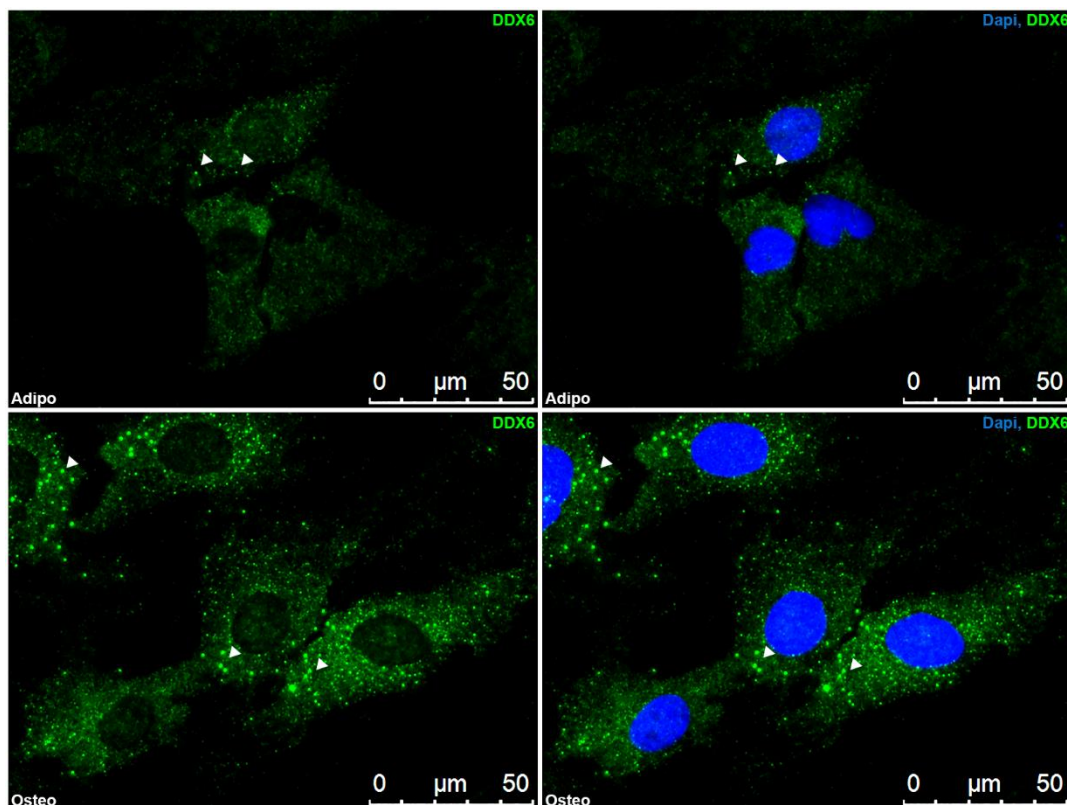


Figura 4.20. Análise da localização de DDX6 em hASCs induzidas para adipogênese e osteogênese por 24 horas. Através da análise por imunofluorescência, é possível observar que a helicase DDX6 encontra-se dispersa pelo citoplasma e também concentrada em algumas regiões, formando estruturas granulares (setas abertas), em ambas as condições. Porém, quando foi induzida a adipogênese, foi observada uma menor quantidade de grânulos de DDX6. Já quando foi feita a indução osteogênica, houve um aumento da quantidade destas estruturas granulares. Núcleos foram corados com DAPI.

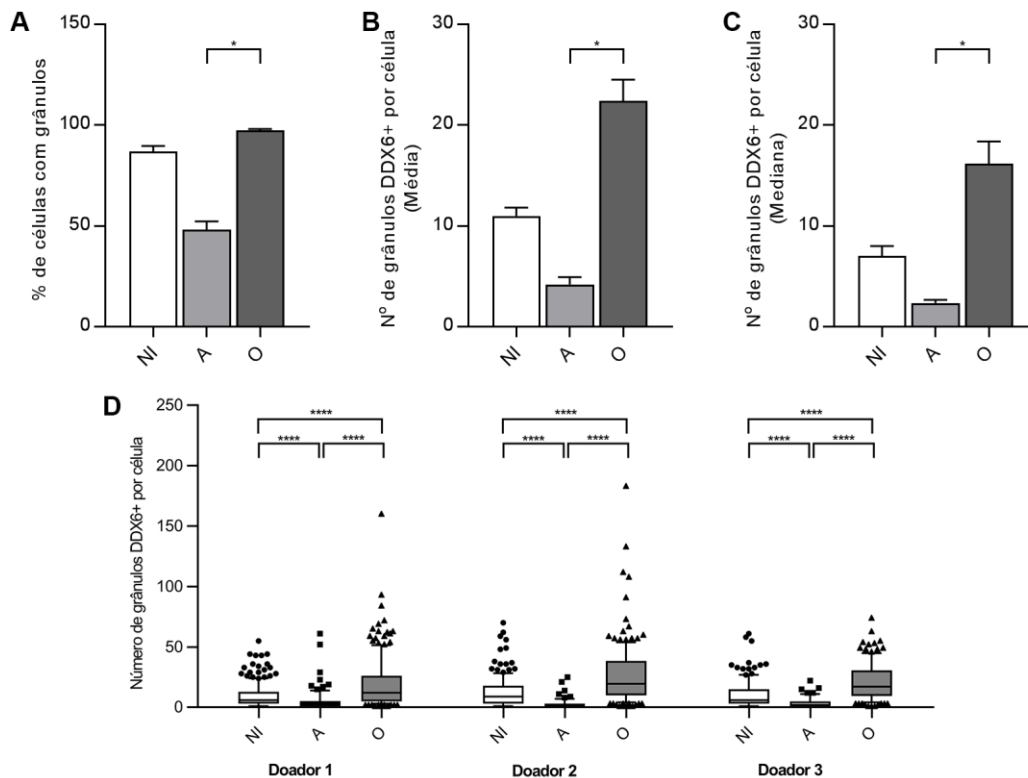


Figura 4.21. Quantificação de grânulos contendo DDX6 em hASCs. (A) Quantificação através da análise por imunofluorescência do número de hASCs contendo grânulos de DDX6 após 24 horas de tratamento com meio não-indutor (NI), indutor para adipogênese (A) ou osteogênese (O) (n=3); Média com EP. (B) Quantificação da média do número de grânulos de DDX6 por célula (n=3); Média com EP. (C) Quantificação da mediana do número de grânulos de DDX6 por célula; (n=3); Média com EP. (D) Quantificação do número de grânulos de DDX6 por célula de cada doador. Quartil 10-90%. Em todas análises, foi utilizado Teste de Kruskal-Wallis, com pós-teste de múltiplas comparações Dunn: *p < 0,05; ****p < 0,0001.

A mudança no padrão de distribuição de DDX6 levantou a possibilidade de que este fenômeno poderia estar ligado a uma mudança na abundância desta proteína durante o início dos processos de diferenciação. Ao analisar os dados obtidos por sequenciamento, observou-se que não houve mudança significativa na abundância de RNAm total de DDX6 após 24 horas de indução adipogênica ($\log(\text{FC})=-0,52$; $\text{FDR}=0,06$). Também não houve mudança na associação do transcrito a polissomos ($\log(\text{FC})=-0,48$; $\text{FDR}=0,07$). Na diferenciação osteogênica, também não foi observada mudança no *fold change* de DDX6 tanto na análise de RNAm total ($\log(\text{FC})=-0,17$; $\text{FDR}=0,82$), quanto do associado a polissomos ($\log(\text{FC})=-0,44$; $\text{FDR}=0,38$). Este resultado foi confirmado por Western Blot, sendo que não houve mudança na quantidade da proteína DDX6 nas primeiras 24 horas de indução para adipogênese e osteogênese (Figura 4.22 A, B e C).

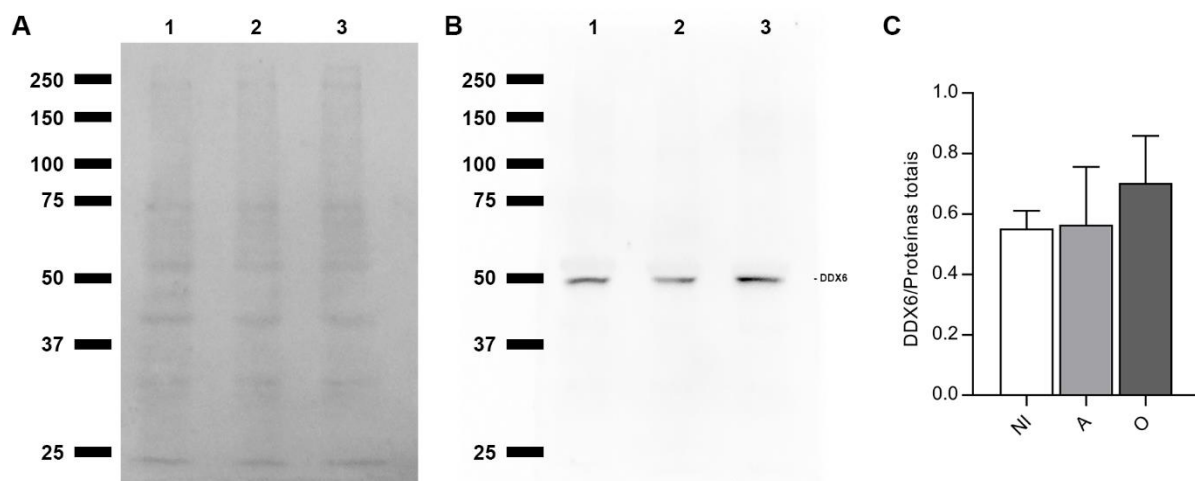


Figura 4.22. Quantificação da proteína DDX6 em hASCs. Análise por Western Blot da expressão da proteína DDX6 em hASCs após 24 horas de tratamento com meio não-indutor (1, NI), indutor para adipogênese (2, A) ou osteogênese (3, O). As membranas foram coradas com Ponceau (A) para quantificação de proteínas totais e posteriormente submetidas à marcação com anticorpo específico (B) (indicação de peso molecular em kDa). (C) Quantificação proteína DDX6; os dados foram normalizados em relação às proteínas totais (n=3). Média com EP; Teste de Kruskal-Wallis.

4.7. Grânulos de DDX6 presentes em hASCs induzidas para adipogênese e osteogênese são dependentes de RNA, mas não acumulam DRIPs

A mudança na distribuição de DDX6 durante as primeiras 24 horas de indução para diferenciação adipogênica e osteogênica, com mudança na quantidade de grânulos, levou ao questionamento de se as estruturas granulares observadas nestas condições teriam características semelhantes às observadas em hASCs mantidas em meio controle (não induzidas).

Para verificação da dependência de RNA para manutenção dos grânulos de DDX6, as hASCs foram induzidas para adipogênese ou osteogênese por 24 horas e, em seguida, submetidas ao tratamento com RNase A e à imunomarcação com anti-DDX6. Através da análise ao microscópio, verificou-se que, tanto na adipogênese quanto na osteogênese, quando as células são apenas permeabilizadas (sem RNase A), é possível observar a presença de grânulos de DDX6 (Figura 4.23 A e C). Porém, o tratamento com RNase A leva à redução destas estruturas, sendo que os raros grânulos observados são menores do que os presentes nas células apenas permeabilizadas. Assim, os resultados obtidos sugerem que os grânulos contendo DDX6 observados em hASCs induzidas para adipogênese ou osteogênese por 24 horas dependem de RNA para manutenção de sua estrutura, semelhantemente ao observado nas células não induzidas (Figura 4.12).

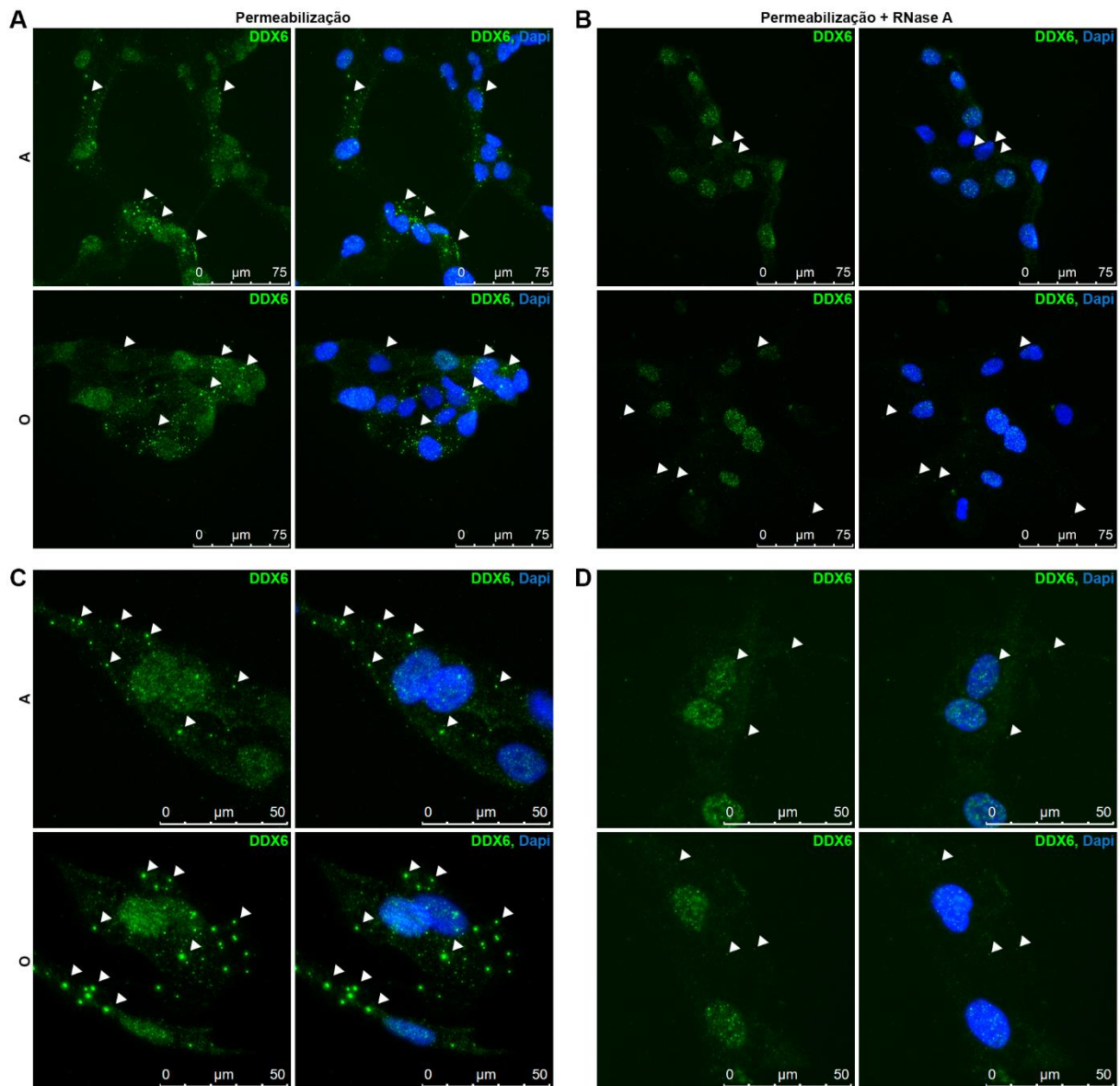


Figura 4.23. Análise da localização de DDX6 em hASCs induzidas para adipogênese e osteogênese por 24 horas tratadas com RNase A. (A) Através da análise por imunofluorescência da localização de DDX6 em hASCs - induzidas para adipogênese (A) ou osteogênese (O) por 24 horas - que foram apenas permeabilizadas, foi possível observar a presença de estruturas granulares contendo DDX6 (setas brancas). (B) Quando foi feito o tratamento com 10 mg/mL de RNase A por 5 minutos, houve redução da presença de grânulos contendo DDX6 em ambas as condições (A e O). Uma maior magnificação das células apenas permeabilizadas (C) e das tratadas com RNase A (D) também é apresentada. Núcleos foram corados com DAPI.

Em seguida, foi feito o ensaio com OPP, a fim de verificar se os grânulos observados durante o início da diferenciação acumulam DRIPs. Assim como observado nas células mantidas em meio não-indutor, os grânulos de DDX6 presentes em hASCs induzidas para adipogênese e para osteogênese possuem DRIPs, porém não são enriquecidos com estes peptídeos defeituosos (Figura 4.24).

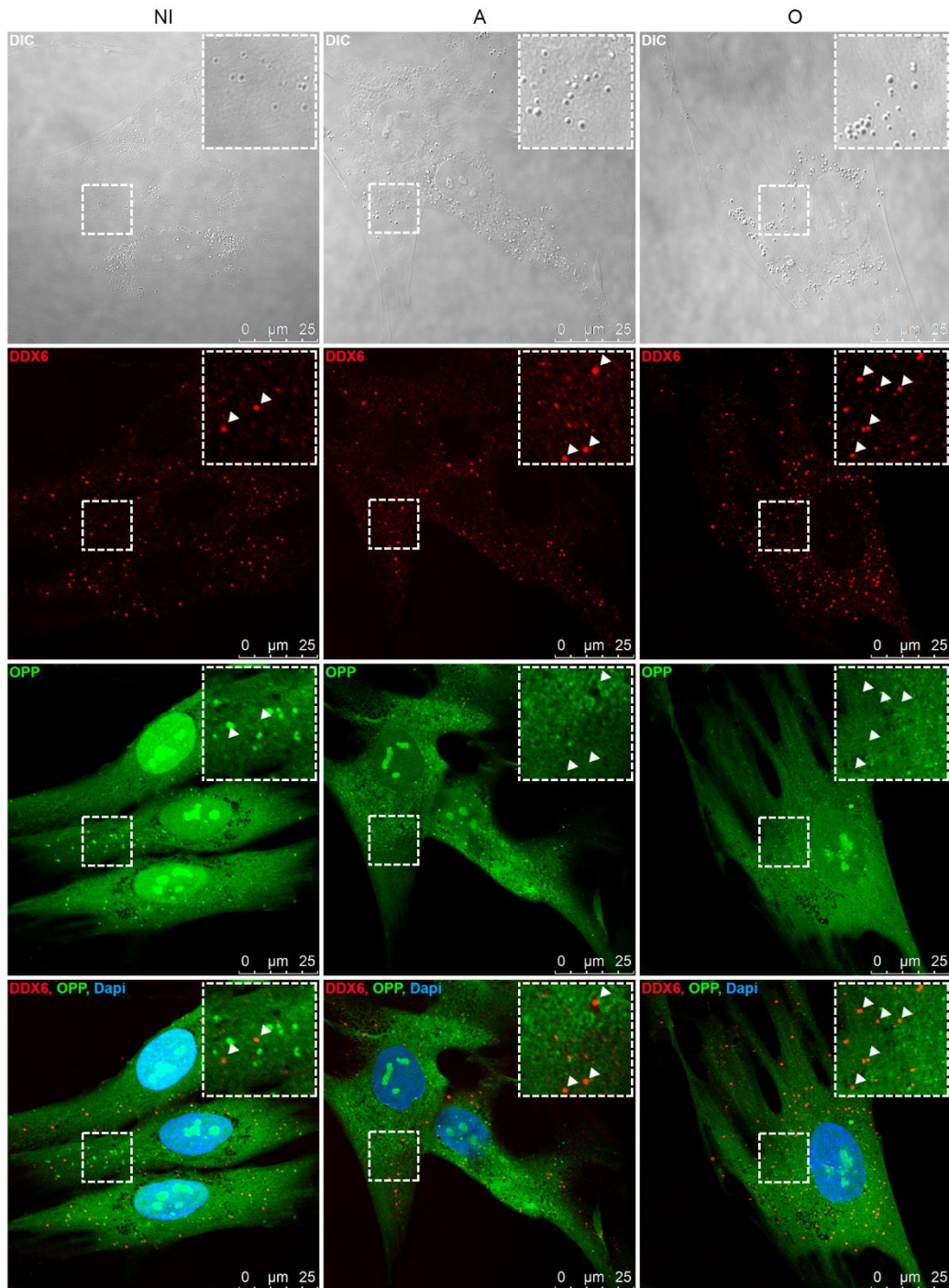


Figura 4.24. Localização de DRIPs e DDX6 em hASCs induzidas para adipogênese e osteogênese por 24 horas. Análise por microscopia confocal da localização de DRIPs em hASCs tratadas com meio não-indutor (NI), de indução adipogênica (A) ou osteogênica (O) por 24 horas, seguido de marcação de DRIPs com OPP (20 μ M) por 30 minutos e de imunofluorescência com anti-DDX6. É possível observar que tanto nas células mantidas em meio controle quanto nas induzidas para diferenciação há a presença de grânulos de DDX6 nos quais há a presença de DRIPs (setas brancas), mas sem haver um enriquecimento na região dos grânulos. Núcleos foram corados com DAPI.

4.8. Grânulos de DDX6 observados em hASCs induzidas para diferenciação adipogênica e osteogênica colocalizam com Dcp1a, mas não com TIA1 e PABP

A etapa seguinte da caracterização dos grânulos de DDX6 em hASCs induzidas para diferenciação consistiu na avaliação da colocalização de DDX6 com proteínas características de grânulos de estresse e *P-bodies*, seguida de análise por microscopia confocal. Primeiramente foi feita a análise de localização de DDX6 e TIA1 - característica de grânulos de estresse. Foi observado que, em tanto em hASCs induzidas para adipogênese quanto para osteogênese, TIA1 estava majoritariamente concentrada no núcleo, não sendo observado um enriquecimento desta proteína nas regiões dos grânulos de DDX6 (Figuras 4.25), um padrão semelhante ao observado em hASCs não induzidas e não submetidas a estresse (Figura 4.13 e 4.25).

Em seguida, foi feita a análise da localização de PABP. Assim como observado nas hASCs não induzidas e não submetidas a estresse (Figura 4.14), PABP encontra-se dispersa no citoplasma tanto na indução adipogênica quanto na osteogênica, porém não acumula em grânulos (Figura 4.26). Desta forma, também não foi observado um enriquecimento de PABP nos grânulos de DDX6 nas duas condições de diferenciação avaliadas.

Por fim, foi feita a análise da localização de Dcp1a, a qual é caracterizada por estar presente em *P-bodies*. Tanto nas células induzidas para adipogênese quanto para osteogênese, Dcp1a foi observada dispersa no citoplasma, mas também concentrada em grânulos, havendo uma colocalização parcial com DDX6 (Figura 4.27). Foi observada a presença de grânulos enriquecidos tanto com DDX6 quanto com Dcp1a (Figura 4.27, setas abertas), além de grânulos enriquecidos apenas com DDX6 (Figura 4.27, setas brancas) ou enriquecidos apenas com Dcp1a (Figura 4.27, asteriscos).

Assim, os resultados obtidos na análise por imunomarcacão demonstraram que os grânulos contendo DDX6 observados em hASCs induzidas para adipogênese ou para osteogênese por 24 horas estão enriquecidos em Dcp1a, mas não com PABP e TIA1, apresentando um padrão de marcação mais semelhante a *P-bodies*. Porém destaca-se que, tanto nas células não-induzidas, quanto nas tratadas com meio de diferenciação, há a presença de grânulos que também não colocalizam com Dcp1a.

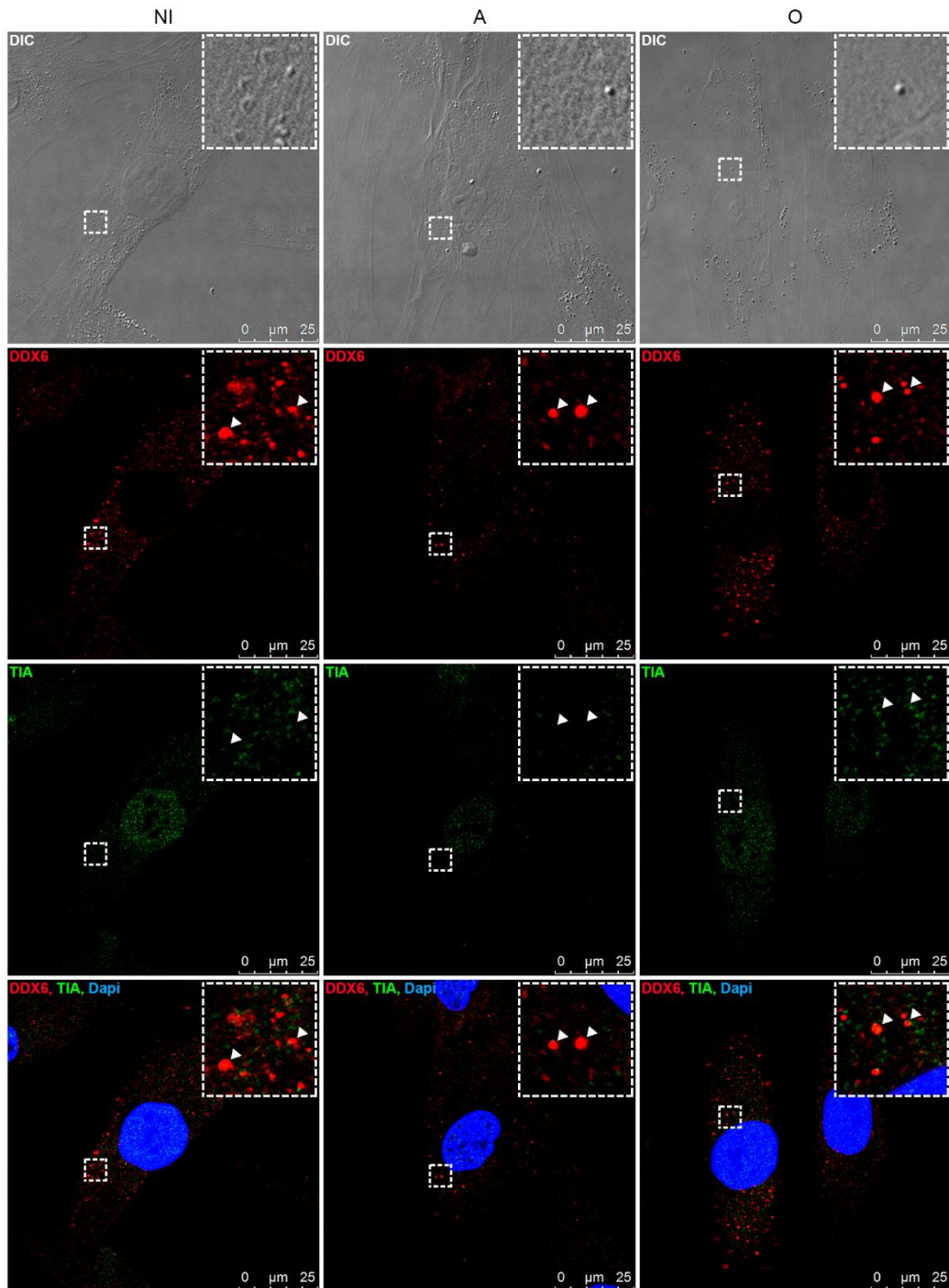


Figura 4.25. Localização de TIA1 e DDX6 em hASCs induzidas para adipogênese e osteogênese. Foi realizada imunofluorescência de hASCs tratadas com meio não-indutor (NI), de indução adipogênica (A) ou osteogênica (O) por 24 horas, seguida de análise por microscopia confocal. Observou-se que, em todas as condições, TIA1 encontra-se majoritariamente concentrada no núcleo, não sendo observado enriquecimento desta proteína nos grânulos de DDX6 (setas brancas). Núcleos foram corados com DAPI.

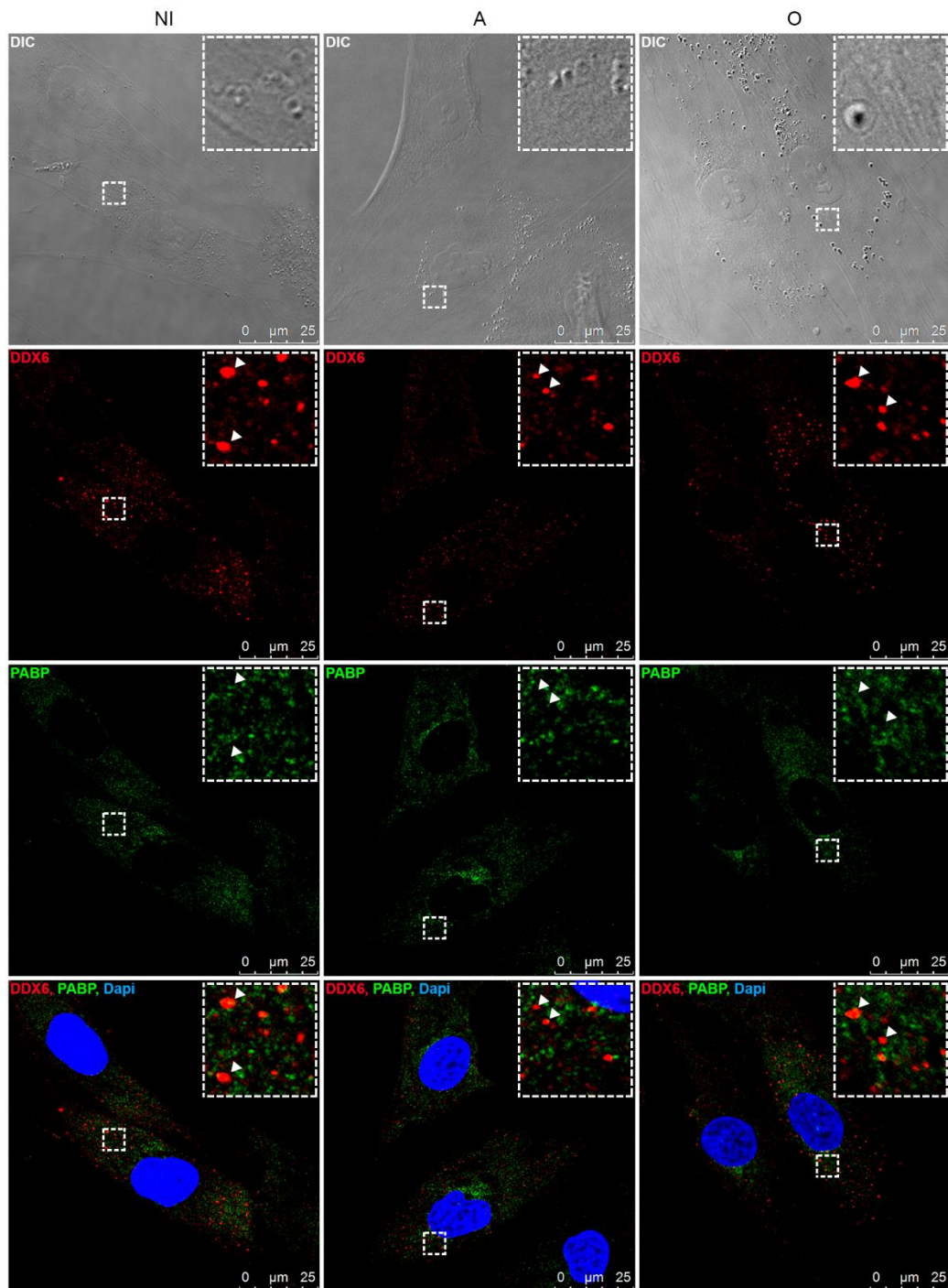


Figura 4.26. Localização de PABP e DDX6 em hASCs induzidas para adipogênese e osteogênese. Foi realizada imunofluorescência de hASCs tratadas com meio não-indutor (NI), de indução adipogênica (A) ou osteogênica (O) por 24 horas, seguida de análise por microscopia confocal. Observou-se que, em todas as condições, PABP encontra-se majoritariamente dispersa no citoplasma, mas não concentrada em grânulos. Não foi observado enriquecimento desta proteína nos grânulos de DDX6 (setas brancas). Núcleos foram corados com DAPI.

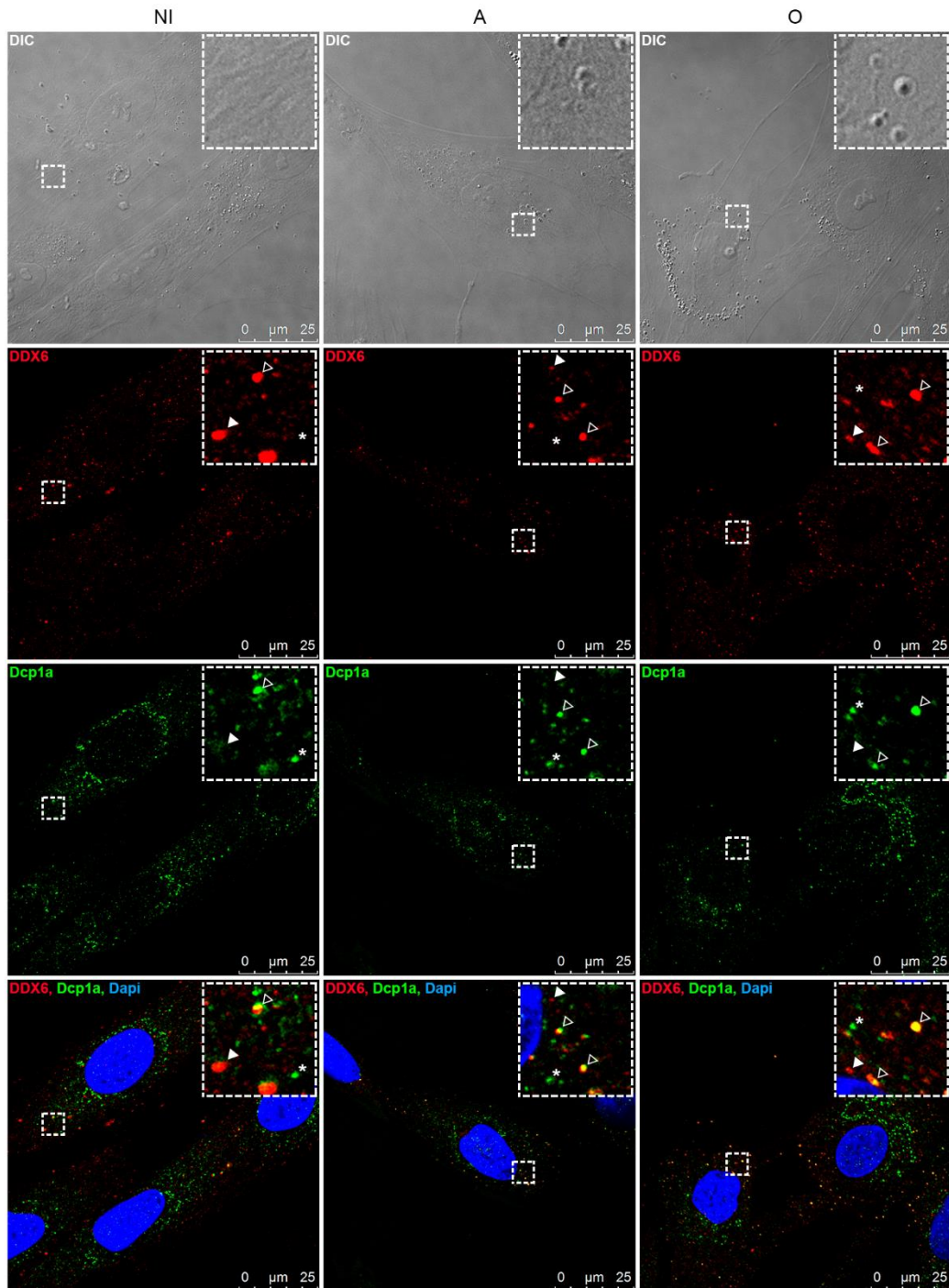


Figura 4.27. Localização de Dcp1a e DDX6 em hASCs induzidas para adipogênese e osteogênese. Foi realizada imunofluorescência de hASCs tratadas com meio não-indutor (NI), de indução adipogênica (A) ou osteogênica (O) por 24 horas, seguida de análise por microscopia confocal. Foi possível observar que, em todas as condições, a proteína Dcp1a possui um padrão de distribuição semelhante ao de DDX6, estando dispersa no citoplasma, mas também concentrada em grânulos. Estes grânulos apresentam colocalização parcial com DDX6. São observados grânulos apenas marcados com DDX6 (setas brancas), apenas marcados com Dcp1a (asteriscos) e também grânulos em que ambas as proteínas são encontradas (setas abertas). Núcleos foram corados com DAPI.

4.9. Associação de DDX6 a diferentes complexos durante a diferenciação adipogênica e osteogênica

As análises realizadas demonstraram que em hASCs induzidas para adipogênese e osteogênese há a presença de grânulos de DDX6 que são dependentes de RNA e que não acumulam DRIPs, semelhantemente ao observado em células não-induzidas, mas cuja quantidade varia nas primeiras 24 horas de indução. Por outro lado, as análises de sequenciamento e Western Blot sugerem que há apenas uma modificação no padrão de localização de DDX6 nestas condições, sem que haja mudança na abundância desta helicase. A partir desta observação, foi levantada a hipótese de que DDX6 poderia se associar a complexos com tamanho, composição e/ou estabilidade diferentes durante o processo de diferenciação. Além disso, trabalhos anteriores demonstraram a associação de DDX6 a polissomos (Radhakrishnan *et al.*, 2016; Sweet, Kovalak e Coller, 2012; Wang, Y. *et al.*, 2015), e Wang e colaboradores demonstraram que durante a diferenciação de progenitores epidermais, DDX6 se associa a frações polissomais e auxilia no carregamento de transcritos alvos a polissomos (Wang, Y. *et al.*, 2015). Assim, foi realizado um fracionamento por gradiente de sacarose, seguido de avaliação por Western Blot da presença de DDX6 nas diferentes frações, a fim de avaliar se a mudança de localização de DDX6 observada estaria relacionada a uma mudança no padrão de associação a polissomos ou a complexos distintos.

Os resultados obtidos demonstram que, em hASCs mantidas em meio de manutenção (não-induzidas) por 24 horas, DDX6 está presente majoritariamente na fração livre de polissomos (fração 2), sendo também encontrada na fração que comigra com monossomos (frações 4, 5 e 6) e/ou polissomos leves (frações 8, 10 e 12) (Figura 4.28 A, B e C, coluna 1). Quando foi feita a indução para adipogênese por 24 horas, observou-se uma redução de DDX6 na fração livre, com um aumento nas frações que comigram com monossomos/polissomos leves, sendo inclusive observada sua presença na fração 14, que corresponderia a uma comigração com polissomos mais pesados (Figura 4.28 A, B e C, coluna 2). Já quando foi feita a indução para osteogênese, houve também uma maior presença de DDX6 comigrando com monossomos/polissomos leves do que o observado nas células não induzidas (Figura 4.28 A, B e C, coluna 3). Porém, menos do que o obtido na indução adipogênica. Por fim, é interessante notar que em nenhuma das condições foi observada a presença de DDX6 na fração correspondente ao fundo do tubo do gradiente, onde são observados complexos proteicos maiores. Assim, os resultados obtidos

demonstram que, após 24 horas de indução para diferenciação adipogênica ou osteogênica, há uma mudança no padrão de distribuição de DDX6 em um gradiente de sacarose. Esta observação sugere que DDX6 pode se associar a complexos com coeficientes de sedimentação distintos, os quais podem possuir tanto tamanho, quanto estabilidade ou composições diferentes.

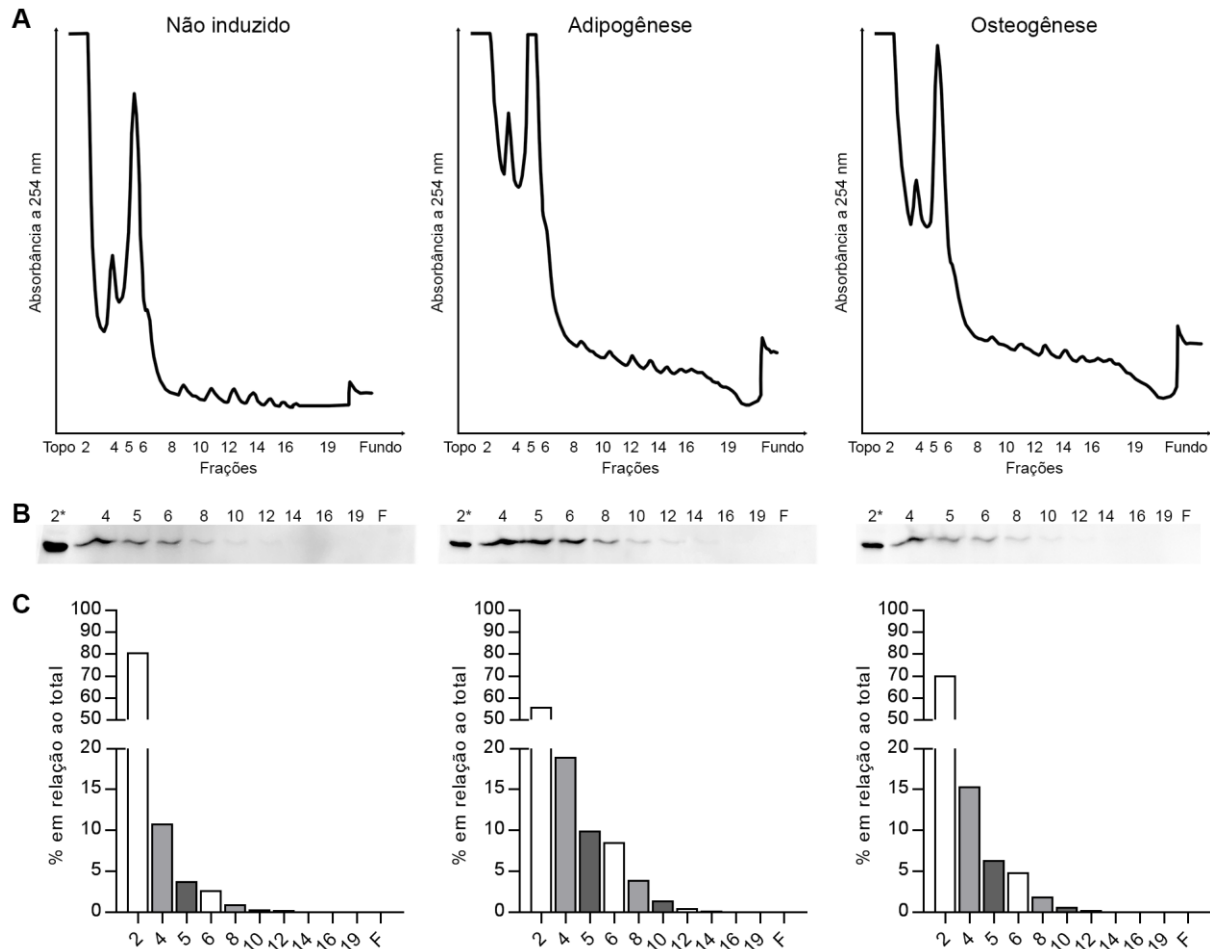


Figura 4.28. Avaliação do padrão de migração de DDX6 em gradiente de sacarose. (A) Perfil polissomal obtido após a separação por gradiente de sacarose de estratos celulares de hASCs tratadas com meio de manutenção (não induzido), de indução adipogênica ou osteogênica por 24 horas. (B) Western Blot de DDX6 com diferentes regiões do gradiente, correspondentes à fração livre de polissomos (fração 2) e as que comigram monossomos (frações 4, 5 e 6), polissomos leves (frações 8, 10 e 12), polissomos pesados (frações 14, 16 e 19) e ao fundo do gradiente. *Para o Western Blot, a fração 2 foi aplicada diluída 1:5. (C) Quantificação de DDX6 nas diferentes frações em relação ao sinal total obtido.

4.10. Coimunoprecipitação de DDX6 e seus parceiros em hASCs induzidas para adipogênese e osteogênese por 24 horas

A fim de explorar com maior detalhe a composição dos complexos associados a DDX6 em hASCs em seu estado de *stemness* e durante o início da diferenciação, foi realizada a coimunoprecipitação desta helicase e seus parceiros em hASCs tratadas com meio não-indutor, indutor para adipogênese e indutor para osteogênese por 24 horas. Para cada condição, foram usadas hASCs cultivadas em 5 garrafas de 180 cm², com confluência de aproximadamente 80%. As *beads* utilizadas na pré-limpeza também foram eluídas e o conteúdo de RNA e proteínas foram isolados com TRIzol para análise. Foram feitas duas réplicas biológicas (utilizando-se células de dois doadores diferentes - doadores 1 e 2) e duas réplicas técnicas de cada doador (A e B). Ou seja, a partir de amostras de células de um mesmo doador, foram feitas duas imunoprecipitações. As amostras de proteínas obtidas foram submetidas a eletroforese em gel de acrilamida, coradas com prata (Figuras 4.29 e 4.30) e preparadas para análise por espectrometria de massas. Através da análise por eletroforese, observou-se que as amostras correspondentes ao eluído das *beads* magnéticas utilizadas na pré-limpeza não apresentaram uma coloração evidente com prata em nenhuma das réplicas realizadas, o que pode estar relacionado a uma baixa quantidade de proteínas que se ligam inespecificamente às *beads* magnéticas (Figuras 4.29 A, C e 4.30 A, C). Mesmo assim, a região do gel correspondente à aplicação e eletroforese destas amostras foi coletada e preparada para análise por espectrometria de massas.

Nas amostras de imunoprecipitação de DDX6, foi possível observar a presença de uma forte banda na altura de cerca de 50 kDa, provavelmente correspondente à cadeia pesada do anticorpo utilizado na imunoprecipitação. Também foi possível observar uma discreta banda justaposta, estando um pouco acima da altura de 50 kDa, possivelmente correspondente à proteína DDX6, a qual tem 55 kDa (Figuras 4.29 B, D e 4.30 B, D). Nas eletroforeses com as réplicas das imunoprecipitações de DDX6, observou-se a presença de padrões de bandas um pouco diferentes. Como a eletroforese e a coloração com prata destas amostras foi realizada em experimentos distintos, é possível que isto esteja ligado a tempos de corrida e de coloração diferentes. Além disso, na réplica B do doador 2 (Figura 4.30 C, D), houve uma falha na polimerização do gel, sendo que esta não foi uniforme e por isso as bandas de proteínas não se distribuíram paralelamente ao longo do gel. Porém, isso não acarretou em perda de amostras. Por fim, as amostras de proteínas foram preparadas e analisadas por espectrometria de massas.

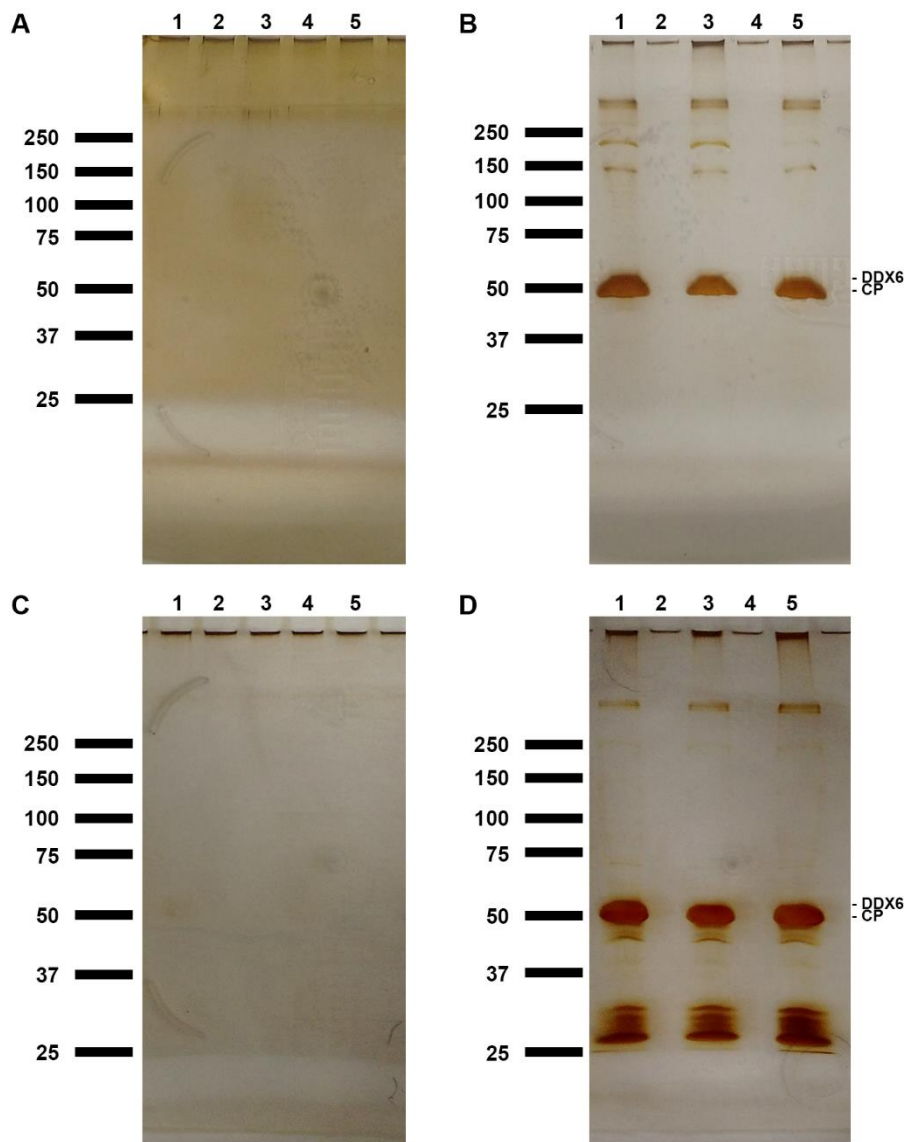


Figura 4.29. Coimunoprecipitação de DDX6 e seus parceiros em hASCs tratadas com meio não-indutor e induzidas para adipogênese e osteogênese por 24 horas, doador 1. (A) Análise por eletroforese em gel de acrilamida e coloração com prata dos controles da imunoprecipitação de DDX6 em hASCs, doador 1, réplica A: 1- Eluído das *beads* de pré-limpeza de hASCs tratadas com meio não-indutor por 24 horas; 2- Vazio; 3- Eluído das *beads* de pré-limpeza de hASCs tratadas com meio indutor de adipogênese por 24 horas; 4- Vazio 5- Eluído das *beads* de pré-limpeza de hASCs tratadas com meio indutor de osteogênese por 24 horas. (B) Análise por eletroforese em gel de acrilamida e coloração com prata dos da imunoprecipitação de DDX6 em hASCs, doador 1, réplica A: 1- Imunoprecipitado de DDX6 de hASCs tratadas com meio não-indutor por 24 horas; 2- Vazio; 3- Imunoprecipitado de DDX6 de hASCs tratadas com meio indutor de adipogênese por 24 horas; 4- Vazio 5- Imunoprecipitado de DDX6 de hASCs tratadas com meio indutor de osteogênese por 24 horas. (C) e (D) correspondem à repetição do mesmo experimento, realizado com células do mesmo doador (réplica B). Estão indicadas as alturas esperadas para a proteína DDX6 e para a cadeia pesada do anticorpo (CP).

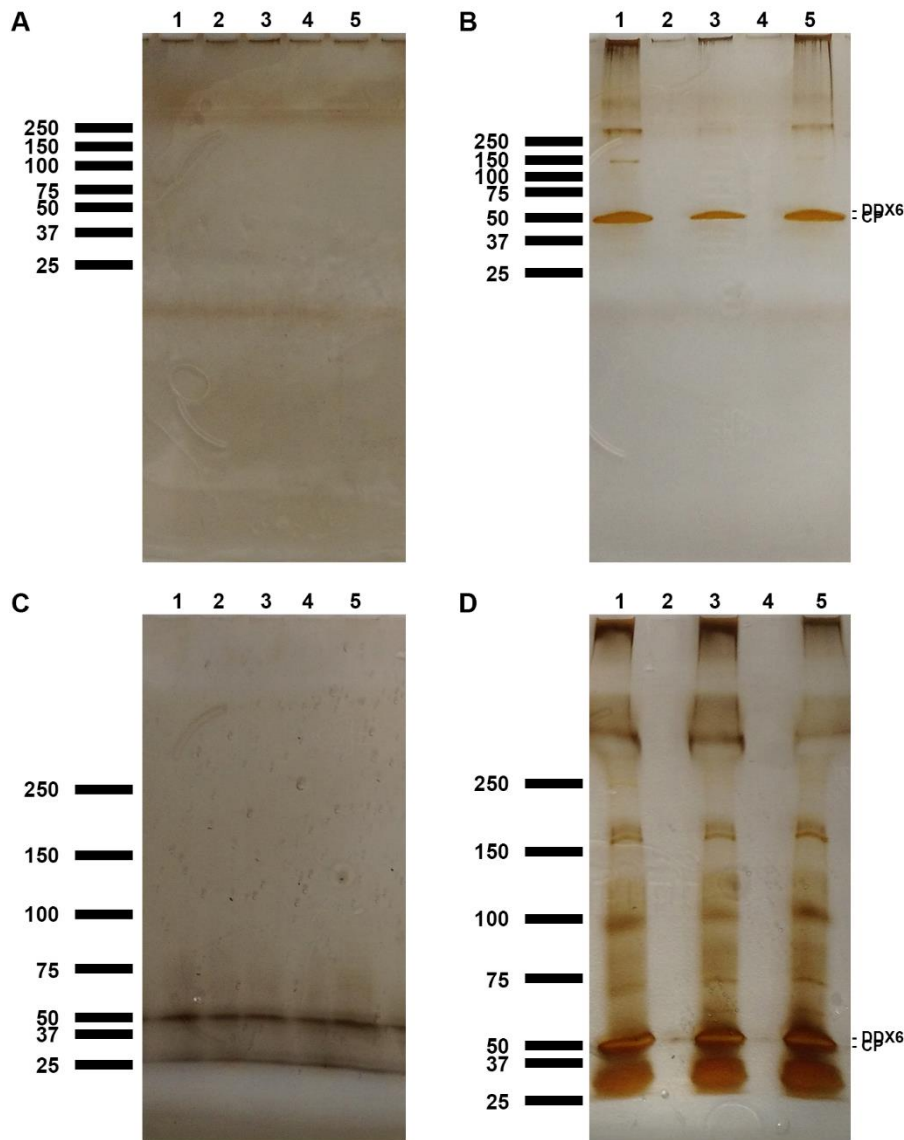


Figura 4.30. Coimunoprecipitação de DDX6 e seus parceiros em hASCs tratadas com meio não-indutor e induzidas para adipogênese e osteogênese por 24 horas, doador 2. (A) Análise por eletroforese em gel de acrilamida e coloração com prata dos controles da imunoprecipitação de DDX6 em hASCs, doador 2, réplica A: 1- Eluído das *beads* de pré-limpeza de hASCs tratadas com meio não-indutor por 24 horas; 2- Vazio; 3- Eluído das *beads* de pré-limpeza de hASCs tratadas com meio indutor de adipogênese por 24 horas; 4- Vazio 5- Eluído das *beads* de pré-limpeza de hASCs tratadas com meio indutor de osteogênese por 24 horas. (B) Análise por eletroforese em gel de acrilamida e coloração com prata dos da imunoprecipitação de DDX6 em hASCs, doador 2, réplica A: 1- Imunoprecipitado de DDX6 de hASCs tratadas com meio não-indutor por 24 horas; 2- Vazio; 3- Imunoprecipitado de DDX6 de hASCs tratadas com meio indutor de adipogênese por 24 horas; 4- Vazio 5- Imunoprecipitado de DDX6 de hASCs tratadas com meio indutor de osteogênese por 24 horas. (C) e (D) correspondem à repetição do mesmo experimento, realizado com células do mesmo doador (réplica B). Estão indicadas as alturas esperadas para a proteína DDX6 e para a cadeia pesada do anticorpo (CP).

O RNA das amostras de imunoprecipitação e controles de pré-limpeza também foi extraído, precipitado e armazenado a -80° C para preparo do sequenciamento. Durante a etapa de padronização do protocolo de imunoprecipitação, foi feito um teste de extração e quantificação de RNA, sendo que, a partir de 5 garrafas de 180 cm² de hASCs, foram obtidos 72 ng de RNA na imunoprecipitação de DDX6. Tendo em vista a pouca quantidade de material obtido e levando em consideração que para quantificação uma parte do material isolado é perdido, optou-se por não ser feita a quantificação de RNA antes do preparo das amostras para sequenciamento. Desta forma, todo o RNA isolado de cada uma das amostras foi utilizado para o preparo das bibliotecas de DNA, as quais foram analisadas por Bioanalyzer para verificação do tamanho dos fragmentos obtidos e por PCR em tempo real para quantificação.

Através da análise realizada, observou-se que foi obtida uma baixa quantidade de material para todas as amostras, principalmente nas correspondentes à pré-limpeza. Para análise por sequenciamento, são necessários pelo menos 2 nM de DNA, e isso foi obtido em poucas amostras (Tabela 4.7). Este resultado pode estar relacionado a uma baixa quantidade de inicial de RNA. A quantificação precisa e a inserção de uma quantidade adequada de amostra na lâmina de sequenciamento são fundamentais para o sucesso deste processo. Em caso de amostras que estão um pouco abaixo da quantidade mínima de 2 nM, é possível adaptar as primeiras etapas de processamento da amostra a fim de ajustar as concentrações. Diante deste cenário, optou-se por proceder com o sequenciamento apenas das amostras que tinham concentração próximo a 2 nM (Tabela 4.7, amostras destacadas). Estas amostras foram preparadas e submetidas a sequenciamento. Porém, a análise destes dados será realizada em um projeto posterior a este trabalho.

Tabela 4.7. Quantificação do DNA obtido após o preparo para sequenciamento das amostras de RNA das duas réplicas técnicas dos doadores 1 e 2.

Doador	Réplica técnica	Amostra	Tamanho dos fragmentos (bp)	Quantidade (pM)
1	A	Pré-limpeza NI	334	0,04
		Pré-limpeza Adipo	352	0,09
		Pré-limpeza Osteo	385	0,11
		IP NI	247	10,09
		IP Adipo	337	1,25
	B	IP Osteo	281	5,22
		Pré-limpeza NI	354	0,11
		Pré-limpeza Adipo	372	0,09
		Pré-limpeza Osteo	315	0,05
		IP NI	440	0,06
		IP Adipo	322	0,22

		IP Osteo	294	0,08
	A	Pré-limpeza NI	276	0,20
		Pré-limpeza Adipo	352	18,63
		Pré-limpeza Osteo	360	4,95
		IP NI	325	1,15
		IP Adipo	247	11,22
		IP Osteo	327	2,15
2	B	Pré-limpeza NI	368	0,27
		Pré-limpeza Adipo	434	0,04
		Pré-limpeza Osteo	249	0,57
		IP NI	449	1,18
		IP Adipo	287	0,98
		IP Osteo	354	5,95

4.11. Em hASCs, DDX6 associa-se a complexos de proteínas envolvidas na regulação do ciclo de vida do RNAm

Conforme descrito anteriormente, foram preparadas para análise por espectrometria de massas as amostras de imunoprecipitação de DDX6 em hASCs não-induzidas, induzidas para adipogênese e para osteogênese por 24 horas, com duas réplicas técnicas e duas biológicas. Além disso, para cada uma destas condições, o eluído das *beads* utilizadas na etapa de pré-limpeza também foram preparados para análise, a fim de que pudessem ser identificadas as proteínas que se ligam inespecificamente às *beads* magnéticas. Desta forma, foi analisado por espectrometria de massas um total de 24 amostras, resultando na identificação de 348 proteínas (Anexo III, Tabela S11). Após o processo de filtragem das amostras para remoção de proteínas apenas identificadas por sítio, as reversas e os potenciais contaminantes, foi obtida uma listagem de 276 proteínas. Em seguida, foram removidas da listagem as proteínas identificadas nas amostras de pré-limpeza, resultando em uma listagem de 193 proteínas. Por fim, foram selecionadas apenas as proteínas identificadas com pelo menos 2 peptídeos únicos em pelo menos umas das réplicas de imunoprecipitação. Assim, foi obtida uma listagem final de 144 proteínas consideradas como identificadas especificamente nas amostras de imunoprecipitação de DDX6 em hASCs no conjunto das condições avaliadas (Anexo III, Tabela S12). A tabela 4.8 demonstra as 15 proteínas mais enriquecidas em cada uma das réplicas analisadas (Tabela 4.8). Foi possível observar que, em todas as condições, a helicase DDX6 esteve sempre entre as duas proteínas identificadas como maior intensidade. Além disso, foi possível observar a presença de parceiros conhecidos de complexos contendo DDX6, como PABPC1, PABPC4, EDC3, ATXN2, ATXN2L, YBX1, LARP1, Dcp1a, Dcp1b, e UPF1 (Anexo III, Tabela 12).

Tabela 4.8. Listagem das 15 proteínas identificadas como mais enriquecidas em cada uma das réplicas da análise por espectrometria de massas da imunoprecipitação de DDX6 em hASCs não-induzidas, induzidas para adipogênese ou osteogênese por 24 horas.

Não induzido			
Réplica 1 A	Réplica 1 B	Réplica 2 A	Réplica 2 B
MYH9	DDX6	DDX6	DDX6
DDX6	MYH9	FLII	FLII
PABPC1	FLII	PABPC1	MYH9
FLII	PABPC1	MAP1B	MAP1B
IFI16	MAP1B	MYH9	PABPC1
EDC3	MVP	EDC3	EDC3
MYO1C	MYL12A;MYL12B	MVP	PDCD6
ATXN2	EDC3	PABPC4	MB21D2
MYL12A;MYL12B	MYO1C	MB21D2	YBX1
PABPC4	CKAP4	YBX1	MVP
YBX1	IFI16	UPF1	TUBB
UPF1	PDCD6	ARHGAP24	CRYAB
MYO1B	ATXN2	SAMHD1	MYL12A;MYL12B
MVP	MYL6	PDCD6	RPL10A
CKAP4	PABPC4	ATXN2	ATXN2

Adipogênese			
Réplica 1 A	Réplica 1 B	Réplica 2 A	Réplica 2 B
MYH9	MYH9	DDX6	DDX6
DDX6	DDX6	FLII	FLII
FLII	FLII	MAP1B	MYH9
PABPC1	PABPC1	PABPC1	PABPC1
MYO1C	MAP1B	EDC3	MB21D2
EDC3	EDC3	MYH9	MAP1B
IFI16	IFI16	ARHGAP24	EDC3
MYO1B	PABPC4	MVP	ARHGAP24
MAP1B	MYO1C	MB21D2	PDCD6
MYL12A;MYL12B	ARHGAP24	YBX1	MVP
PABPC4	MYL12A;MYL12B	PABPC4	YBX1
ARHGAP24	CKAP4	PDCD6	CRYAB
ACTA1;ACTC1;ACTG2;A CTA2	ACTA1;ACTC1;ACTG2;A CTA2	CKAP4	TUBB
CKAP4	PDCD6	CRYAB	RPL10A
YBX1	MVP	ACTA1;ACTC1;ACTG2;A CTA2	PABPC4

Osteogênese			
Réplica 1 A	Réplica 1 B	Réplica 2 A	Réplica 2 B
DDX6	MYH9	DDX6	DDX6
MYH9	DDX6	FLII	FLII

FLII	FLII	MAP1B	MAP1B
PABPC1	MAP1B	PABPC1	MYH9
MAP1B	PABPC1	EDC3	PABPC1
EDC3	EDC3	ARHGAP24	PDCD6
ARHGAP24	MYO1C	MB21D2	EDC3
IFI16	ARHGAP24	MYH9	YBX1
MYO1C	PDCD6	PABPC4	MB21D2
PRUNE2	MYL12A;MYL12B	YBX1	CRYAB
ATXN2	PRUNE2	CRYAB	TUBB
ACTA1;ACTC1;ACTG2;ACTA2	PABPC4	PDCD6	ARHGAP24
QPRT	IFI16	UPF1	RPL10A
PABPC4	CKAP4	RPL10A	RPS13
YBX1	ACTA1;ACTC1;ACTG2;ACTA2	AP2B1	PABPC4

Em seguida, foi feita a análise de clusterização hierárquica para comparação entre os resultados obtidos em cada réplica técnica e biológica realizada. Observou-se que há primeiramente o agrupamento entre as réplicas técnicas e biológicas, e não entre os diferentes tratamentos realizados (Figura 4.31). Por outro lado, ao observar o *heatmap* obtido, é possível notar que o padrão de enriquecimento das proteínas identificadas é bastante semelhante entre as réplicas das diferentes condições (Figura 4.31). Este resultado sugere que os complexos associados a DDX6 de hASCs não induzidas, ou tratadas com meio de indução adipogênica ou osteogênica por 24 horas isolados por imunoprecipitação possuem uma composição proteica bastante semelhante, sendo que as variações observadas se devem majoritariamente a variações experimentais entre réplicas (técnicas e biológicas).

Tendo em vista a semelhança observada entre os complexos proteicos associados a DDX6, foi feita a análise de ontologia gênica do conjunto de proteínas identificadas nas diferentes réplicas e condições (Anexo III, Tabela S13). A partir dos resultados obtidos, observou-se que foram identificadas proteínas relacionadas à iniciação da tradução e à biogênese de complexo de RNP, além de mecanismos de localização na célula, como localização de macromolécula celular e de proteína, transporte intracelular e estabelecimento de localização na célula. Também foram identificados como enriquecidos termos relacionados a processos catabólicos celular e de substância orgânica e de regulação de processo metabólico e biológico (Figura 4.32 A). Cabe destacar que as proteínas associadas a localização e metabolismo estão relacionadas a processos envolvendo o ciclo de vida do RNAm, uma vez que incluem moléculas como UPF1, Dcp1a, Dcp1b, PABPC1, PABPC4, EDC3 e proteínas ribossomais.

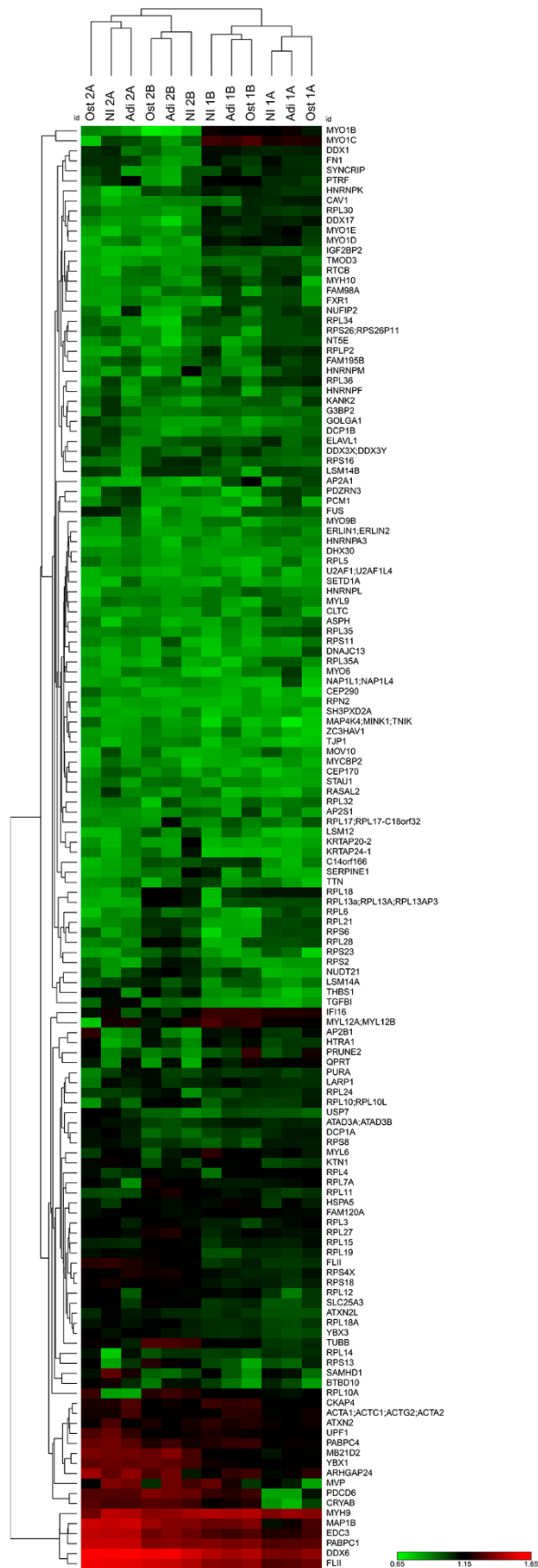


Figura 4.31. Heatmap do enriquecimento das proteínas identificadas por coimunoprecipitação de DDX6 e agrupamento hierárquico das réplicas e condições avaliadas. A partir do dendrograma obtido, observou-se que há maior semelhança entre as réplicas técnicas (A, B) e biológicas (doadores 1 e 2), do que entre as diferentes condições de cultivo (NI, adipogênese e osteogênese).

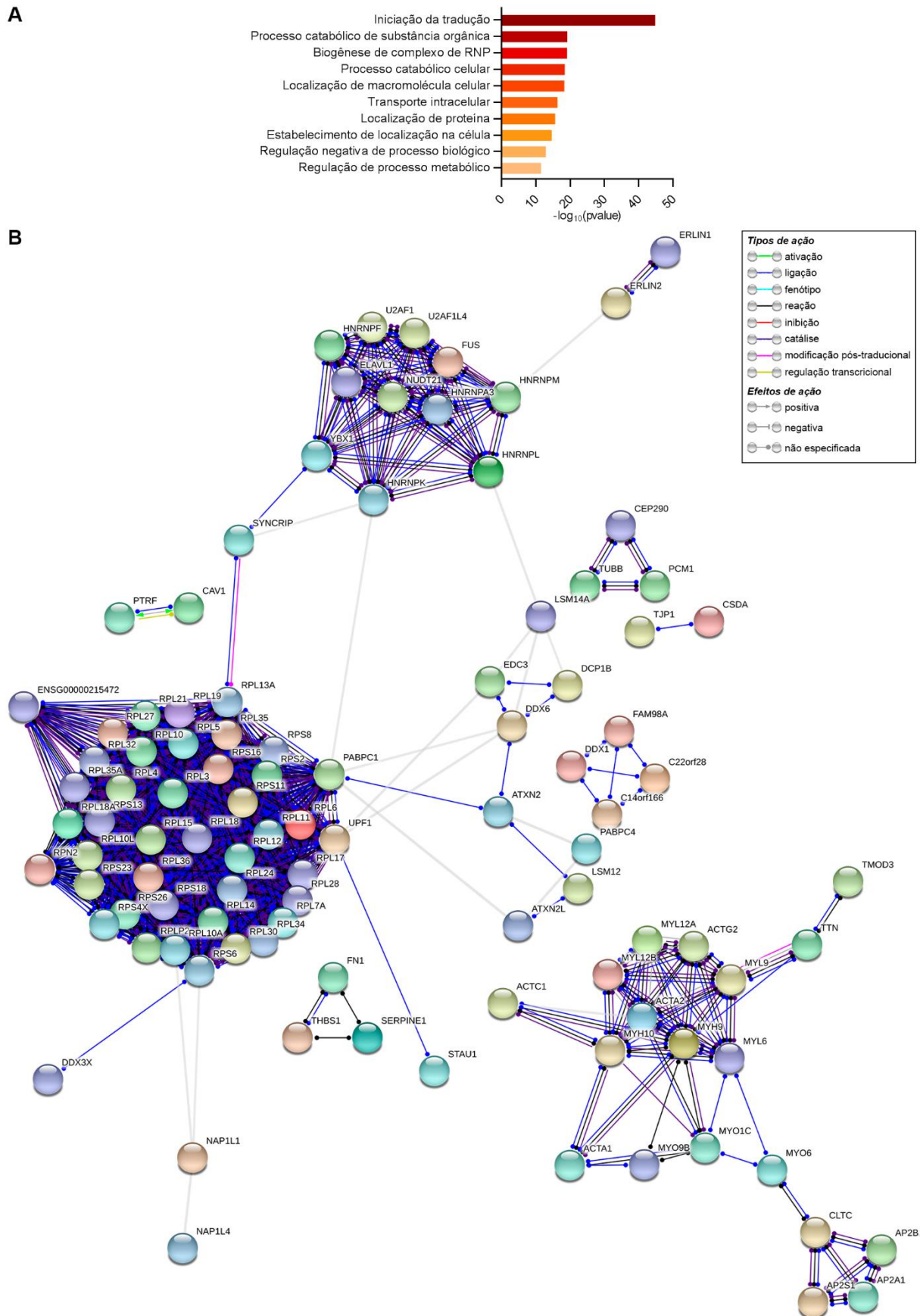


Figura 4.32. Análise por ontologia gênica e de interação entre as proteínas identificadas por coimunoprecipitação de DDX6. (A) Termos enriquecidos na análise por ontologia gênica de processo biológico (gProfiler). Estão apresentados os 10 termos com menor valor de p e $t\text{ depth}=3$.

(B) Mapa de interações previstas entre as proteínas, obtido utilizando-se o banco de dados STRING. Foram destacados os modos de ação previstos com alto nível de confiança (pontuação STRING maior do que 0,7). As proteínas identificadas na coimunoprecipitação, mas que não apresentaram interação prevista por esta base de dados foram ocultadas no diagrama.

Em seguida, foi feita a análise de interação prevista entre as proteínas identificadas utilizando-se a base de dados STRING. A partir dos resultados obtidos, foi possível observar que 101 das proteínas identificadas possuem interações entre si previstas com alto grau de confiança, principalmente através de ligação, catálise e reação (Figura 4.32 B).

Apesar da semelhança entre os complexos obtidos nas diferentes condições de cultivo, foram identificadas proteínas que se associam diferencialmente a DDX6 nestes diferentes tratamentos: ELAVL1, FAM98A, MVP, PRUNE2, RPN2 e U2AF1 (Figura 4.33). Desta forma, os resultados obtidos sugerem que, em hASCs, DDX6 associa-se a complexos contendo proteínas que participam de diferentes etapas do ciclo de vida do RNAm (como início da tradução e em complexos de RNPm), da localização de macromoléculas e processos metabólicos, as quais interagem através de interações de ligação, catálise e reação. De uma maneira geral, a composição destes complexos mantém-se quando as hASCs são induzidas para adipogênese e osteogênese por 24 horas. Porém, algumas proteínas apresentam enriquecimento diferencial nestas diferentes condições, o que pode estar relacionado a diferentes funções dos complexos associados a DDX6.

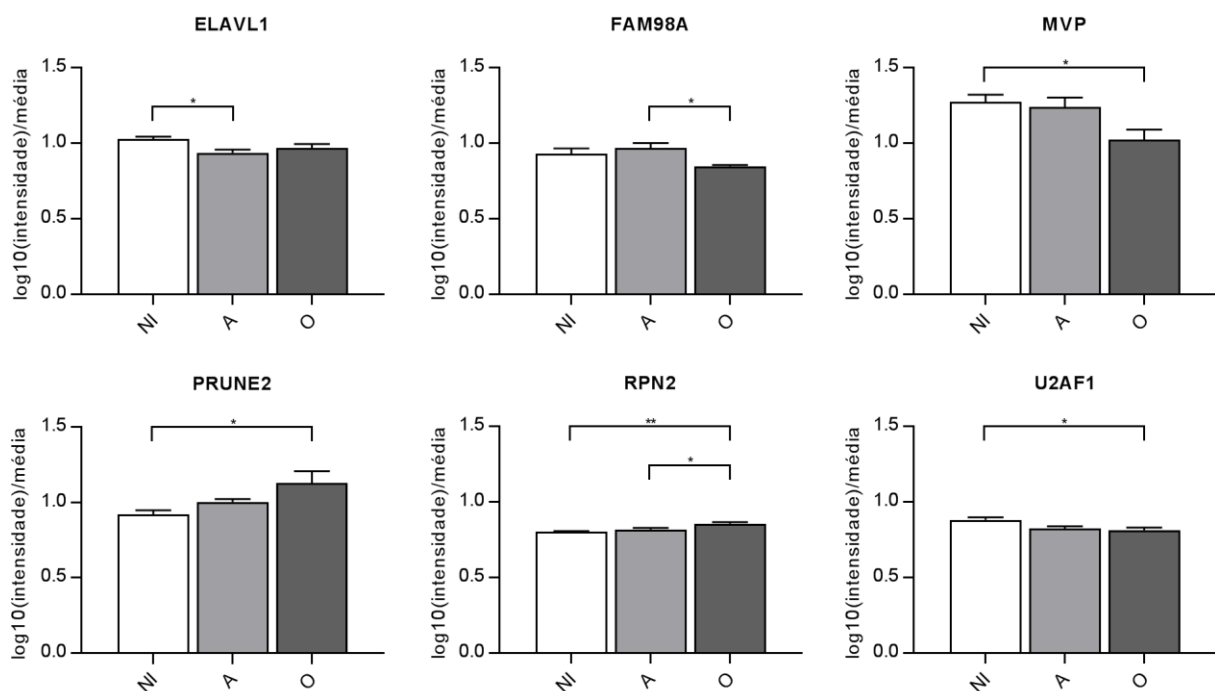


Figura 4.33. Proteínas identificadas como diferencialmente enriquecidas nos complexos associados a DDX6 em hASCs não induzidas, induzidas para adipogênese e osteogênese por 24 horas. Média com EP; *One-way* ANOVA, com múltiplas comparações e pós-teste de Tukey: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

5. DISCUSSÃO E PERSPECTIVAS

5.1. Isolamento e caracterização de hASCs

A primeira etapa do trabalho consistiu no isolamento e caracterização de hASCs, as quais têm origem mesenquimal. Segundo os critérios apresentados por Dominici e colaboradores (2006), a população de células-tronco mesenquimais deve apresentar mais de 95% de células positivas para CD105, CD73 e CD90 e devem ter menos de 2% de células positivas para CD45, CD34, CD11b (ou CD14), CD19 (ou CD79a) e HLA classe II (Dominici *et al.*, 2006). Em relação aos marcadores positivos, para os três doadores foi obtida marcação de mais de 95% da população, com exceção da expressão de CD90 nas células do doador B (TAL15), que foi de 92,02%. Além destes marcadores propostos por Dominici, também foi feita análise de CD140b, característico de células derivadas de mesenquimais, observando-se também mais de 93% de células positivas para os três doadores. Também se observou uma baixa expressão dos marcadores negativos, sendo que, para os três doadores, obteve-se menos de 2% de células positivas para CD45 (marcador de células hematopoiéticas), menos de 3% para CD11b (marcador de macrófagos e monócitos) e CD19 (marcador de células B) e menos de 6% para HLADR (marcador de leucócitos) e CD34 (marcador de progenitores hematopoiéticos). Além disso, foi feita também imunofenotipagem para CD31, marcador de células endoteliais, sendo que foram observados menos de 3% de células positivas nos três doadores.

Embora os critérios estabelecidos por Dominici e colaboradores em 2006 sirvam com guia para a caracterização de células-tronco mesenquimais adultas, outros trabalhos demonstram que o perfil imunofenotípico destas células pode variar de acordo com o tecido isolado. Em trabalho publicado em 2008, por exemplo, Rebelatto e colaboradores isolaram e caracterizaram células-tronco de medula óssea, sangue de cordão umbilical e tecido adiposo (Rebelatto *et al.*, 2008). Neste trabalho, verificou-se que células-tronco isoladas de sangue de cordão umbilical e de tecido adiposo, por exemplo, apresentavam em média 10% de células positivas para CD34. Outros trabalhos também já demonstraram que o perfil de expressão de células-tronco obtidas de tecido adiposo varia segundo o tempo de cultivo (Boquest *et al.*, 2005; Varma *et al.*, 2007). Em estudo publicado em 2007, Varma e colaboradores demonstraram que, logo após o isolamento, as células-tronco 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 de CD105 e CD166 (Varma *et al.*, 2007). Cabe destacar que, no

presente estudo, foi observada uma marcação mais forte para CD34 nas células do doador A (TAL13), a qual teve a imunofenotipagem realizada em passagem 4, enquanto os demais doadores foram avaliados em passagem 5. Então, possivelmente essa expressão acima do esperado se deve ao fato de que a amostra foi avaliada após um intervalo menor de tempo de cultivo. Além disso, as células isoladas dos três doadores também foram capazes de se diferenciar tanto em adipócitos quanto em osteoblastos, o que confirma a multipotencialidade característica de células-tronco mesenquimais.

5.2. Padronização do protocolo de coimunoprecipitação da proteína DDX6 e seus parceiros

O primeiro passo da padronização do protocolo foi o estabelecimento do procedimento de lise celular. Foram avaliadas duas metodologias: lise mecânica e uso de tampão de lise. O método mecânico testado foi a criomoagem. Embora tenha sido atingido um bom nível de rompimento celular, obtendo-se proteínas de diferentes tamanhos e sem degradação aparente, o rendimento desta metodologia foi bastante baixo. A partir de 48 garrafas de cultivo celular de 180 cm², foram obtidos apenas 800 mg de pó de células. Cabe destacar que este pó de células ainda contém uma boa parte de água, seja das próprias células lisadas, do PBS utilizado para lavagem ou mesmo por congelamento de água ambiente durante o processo de moagem a frio. Já com a utilização de um tampão de lise, observou-se um melhor rendimento, mantendo-se a integridade das proteínas (não foi observada degradação através da análise por eletroforese) e obtendo-se uma boa distribuição de tamanhos de proteínas, demonstrando que o protocolo de lise foi bem-sucedido. Assim, optou-se pela utilização desta metodologia para realização da imunoprecipitação.

Em seguida, foram feitos os primeiros testes de coimunoprecipitação de DDX6 de células HeLa submetidas a estresse. A escolha de realizar estes primeiros testes com este tipo de célula e condição se deu por dois motivos: (1) o protocolo de testado foi descrito por Jain e colaboradores para o isolamento de grânulos de estresse de células de leveduras e de mamíferos. Nestas condições, há um aumento da quantidade e do tamanho tanto de grânulos de estresse quanto de *P-bodies* (Jain *et al.*, 2016; Kedersha *et al.*, 2005, 1999). Assim, optou-se por utilizar as células em uma situação semelhante para poder avaliar com maior precisão a reprodutibilidade deste protocolo em nosso laboratório; (2) pelo fato de que as células HeLa apresentam um melhor rendimento (são obtidas mais células com menos garrafas de cultivo). Assim, isso garante uma maior agilidade e economia nesta etapa de padronização.

Para obter uma melhor purificação de grânulos de estresse, Jain e colaboradores estabeleceram uma metodologia de enriquecimento da fração de grânulos através de centrifugação. No presente trabalho, este protocolo se mostrou eficiente também para imunoprecipitação de DDX6 em células HeLa submetidas a estresse com arsenito, uma situação em que há aumento da quantidade e do tamanho de grânulos contendo esta helicase (Cofré, 2015; Martínez *et al.*, 2013). Contudo, quando este procedimento foi aplicado em hASCs, não foi obtido sucesso. Diante dos resultados, foram feitas primeiramente mudanças no protocolo de lavagem, na utilização da etapa de pré-limpeza e na etapa centrifugação do extrato celular. Por fim, observou-se que o processo de centrifugação para enriquecimento dos grânulos não foi eficiente para formar um *pellet* enriquecido de complexos associados a DDX6 em hASCs. Isso pode estar relacionado ao fato de que o coeficiente de sedimentação dos grânulos contendo DDX6 seja diferente em hASCs e células HeLa tratadas com arsenito de sódio, uma vez que, conforme descrito, a indução de estresse leva ao aumento do número e do tamanho destas estruturas granulares (Cofré, 2015; Martínez *et al.*, 2013). Além disso, trabalhos anteriores demonstraram que a proteína DDX6 encontra-se majoritariamente dispersa no citoplasma, sendo que apenas uma pequena fração está em estruturas granulares (Ayache *et al.*, 2015; Ernoult-Lange *et al.*, 2012). Por imunofluorescência, foi possível constatar que o mesmo padrão é seguido em hASCs. Desta forma, no protocolo estabelecido, o extrato celular centrifugado a uma velocidade menor apenas para remover restos celulares, sendo que o sobrenadante desta etapa foi utilizado para imunoprecipitação. Além da obtenção da proteína DDX6 e seus parceiros conhecidos, este novo protocolo permitiria o isolamento não apenas da proteína que estaria associada a grânulos, mas também da que se encontraria dispersa no citoplasma, em complexos menores. Através da análise por espectrometria de massas, foi possível confirmar o isolamento de DDX6 e também de proteínas já descritas como parceiras, como DDX6, como PABC1, PABC4, EDC3, UPF1, ATXN2, ATXN2L, HSPA5 e NUFIP2 (Ayache *et al.*, 2015).

A etapa final de padronização do protocolo consistiu na análise da realização de uma etapa de pré-limpeza da amostra e da extração das proteínas obtidas com TRIzol. A etapa de pré-limpeza consiste na incubação do extrato celular (antes da adição do anticorpo) com as *beads* magnéticas e tem como objetivo a remoção de proteínas que se ligam inespecificamente a elas. Já o uso do TRIzol foi avaliado, pois ele permite o isolamento de RNA e proteínas de uma mesma amostra, o que é interessante, considerando o objetivo do trabalho de avaliar o conteúdo proteico e de RNA dos complexos associados a DDX6. Através da análise por espectrometria de massas desses testes, verificou-se que os protocolos com e sem pré-limpeza e também o uso de TRIzol foram eficientes no isolamento de DDX6 e proteínas parceiras.

Assim, no protocolo final, optou-se pela realização da etapa de pré-limpeza e pelo uso de TRIzol.

Por fim, os dados obtidos foram comparados com a análise por espectrometria de massas do extrato celular (*input*), do eluído das *beads* utilizadas na pré-limpeza e da coimunoprecipitação de uma proteína não relacionada (histona H3). Através desta avaliação, verificou-se que o protocolo estabelecido permitiu obter e enriquecer com especificidade a helicase DDX6 e proteínas parceiras. Assim, foi confirmado o estabelecimento de um protocolo eficiente e específico para coimunoprecipitação de DDX6 e dos complexos associados em hASCs.

5.3. hASCs induzidas para adipogênese apresentam forte regulação negativa de ciclo celular

Uma vez concluída a etapa de obtenção de hASCs e padronização de protocolos, foi dado início à análise da expressão gênica em hASCs induzidas para adipogênese e osteogênese por 24 horas. Em trabalho anterior do grupo, observou-se que hASCs induzidas para adipogênese por 3 dias apresentam forte regulação negativa traducional de genes ligados à síntese proteica. Esta regulação foi acompanhada de uma redução da atividade traducional (identificada através de ensaio de incorporação de metionina), a qual já pôde ser identificada entre 12 e 24 horas de indução. A fim de compreender esta regulação, foi então feita a análise por sequenciamento de RNAm total e associado a polissomos leves/monossomos e pesados de hASCs induzidas para diferenciação adipogênica e osteogênica por 24 horas. A análise de sequenciamento foi realizada em colaboração com outros membros do grupo de pesquisa. Tendo em vista a complexidade dos experimentos realizados e dos dados obtidos, as informações referentes ao desenho experimental, à metodologia detalhada e à validação de resultados foram descritas e compiladas em um manuscrito, o qual foi submetido para o jornal *Scientific Data* (Anexo I). O objetivo deste trabalho foi disponibilizar esta base de dados brutos para o desenvolvimento de outros estudos regulação da expressão gênica através da análise da associação ao RNA de diferentes frações. Além disso, as informações descritas podem servir como *background* para futuras caracterizações de regulação transcricional e pós-transcricional não apenas em hASCs, mas também para outros tipos celulares.

Em seguida, foi realizada a análise de genes diferencialmente expressos entre as diferentes condições de cultivo. Em relação aos dados referentes à adipogênese, foi feita uma análise completa, com ensaios subsequentes para compreensão dos resultados. Conforme

descrito anteriormente, as informações referentes à expressão gênica na osteogênese, bem como estudos complementares já foram analisados e publicados (Robert *et al.*, 2018). Contudo, no presente trabalho, estes dados foram reanalisados utilizando-se a base de dados gProfiler (Reimand *et al.*, 2016) para posterior comparação com os resultados de adipogênese e da análise do comportamento de DDX6 durante a diferenciação. A opção pela utilização da ferramenta gProfiler para análise de enriquecimento funcional foi feita levando em consideração a atualização do sistema (Reimand *et al.*, 2016), o fato de permitir a análise tanto de listas mais complexas (como as de sequenciamento de RNAm total e associado a frações de polissomos) quanto de mais simples (como os dados de RNA e proteínas obtidos de coimunoprecipitação) e fornecer os resultados de termos enriquecidos com diferentes graus de complexidade (de mais gerais a específicos).

Para seleção dos genes considerados como regulados positivamente e negativamente, foi utilizado um critério de $\log(\text{FC}) > 1$ ou $\log(\text{FC}) < -1$ e $\text{FDR} < 0,01$. Seguindo este parâmetro, observou-se que, quando foi induzida a diferenciação osteogênica, foi identificado um número maior de genes regulados positivamente do que negativamente, tanto por análise de RNAm total (407 positivamente, 346 negativamente) quanto do associado a polissomos (717 positivamente, 317 negativamente). Além disso, destaca-se o fato de que foram observados duas vezes mais genes regulados positivamente na análise do RNAm associado a polissomos, o que sugere uma importante regulação pós-transcricional da expressão gênica. Já os dados de adipogênese revelaram uma maior abundância de genes regulados negativamente, tanto em nível de RNAm total (551 positivamente, 942 negativamente) quanto polissomal (727 positivamente, 979 negativamente). Estes resultados sugerem que o início do processo de diferenciação osteogênica e adipogênica possuem um perfil de regulação diferente, sendo que na osteogênese há uma maior quantidade de genes com regulação positiva, enquanto na adipogênese predomina a regulação negativa.

Através da análise por ontologia gênica dos dados referentes à diferenciação osteogênica, verificou-se que genes relacionados ao desenvolvimento de sistemas, órgãos e tecidos tiveram tanto regulação positiva quanto negativa. Dentre os dados relacionados à regulação negativa, observou-se que genes relacionados à motilidade/migração tiveram redução tanto em relação ao RNAm total, quanto do associado a polissomos. Em trabalho de nosso grupo, foi demonstrado que hASCs induzidas para osteogênese têm um aumento da capacidade de adesão, quando comparada com células não induzidas (Robert *et al.*, 2018).

Por outro lado, também se constatou que, após 24 horas de indução para osteogênese, ainda não há uma regulação consistente de genes relacionados a este processo de diferenciação.

Em ensaio celular, observou-se que, de fato, é necessário um período de tratamento das hASCs por 21 dias para que estas atinjam um processo completo de maturação (Robert *et al.*, 2018). Em comparação, no caso da adipogênese, já foi previamente demonstrado que a indução por três dias é suficiente para desencadear o processo de diferenciação (Spangenberg *et al.*, 2013). Complementariamente, no presente trabalho, verificou-se que, após 24 horas de indução, já houve uma regulação positiva de genes relacionados à adipogênese e ao metabolismo de lipídeos.

Em relação à análise da diferenciação adipogênica, também foi verificada uma consistente regulação negativa de genes ligados ao ciclo celular e à proliferação nas primeiras 24 horas de indução. Este padrão não foi observado quando foi feita indução osteogênica (Robert *et al.*, 2018). Trabalhos anteriores demonstraram que, durante o início da diferenciação adipogênica de pré-adipócitos e células-tronco mesenquimais, há uma redução da atividade proliferativa e parada no ciclo celular (Marquez *et al.*, 2017; Reichert e Eick, 1999). Entretanto, não há ainda uma compreensão completa de como isso ocorre. Em modelo de pré-adipócitos 3T3, Tang e colaboradores observaram que, antes de haver o bloqueio da proliferação, ocorre uma etapa de expansão clonal, a qual seria necessária para a diferenciação adipogênica (Tang, Otto e Lane, 2003). Contudo, os resultados obtidos por Qiu e colaboradores sugerem que tal passo não seria necessário (Qiu *et al.*, 2001). Já Marquez e colaboradores, utilizando como modelo células-tronco obtidas de tecido adiposo, constataram que, durante as primeiras 48 horas de adipogênese, as células passam sim por uma etapa de expansão clonal mitótica (Marquez *et al.*, 2017). Contudo, no presente trabalho, foi observada uma redução da atividade proliferativa de hASCs por ensaio de EdU já durante as primeiras 24 horas de diferenciação adipogênica, havendo uma parada no ciclo celular das células em G1. As diferenças observadas nos estudos podem estar relacionadas ao fato de que Marquez e colaboradores utilizaram um período de incubação com EdU de 8 horas, enquanto que, no presente trabalho, foi utilizado um período de 24 horas. Isto foi feito com o objetivo de analisar o balanço final da atividade proliferativa após 24 horas de tratamento com meio de indução adipogênica, a fim de fazer um paralelo com a análise realizada por sequenciamento de RNA. Desta forma, mudanças no estado de proliferação em períodos mais curtos podem não ter sido verificadas em nosso modelo. Também foi observada uma redução da atividade proliferativa das células isoladas de doadores de idade mais avançada. Esta diminuição na capacidade de proliferação hASCs com o avanço da idade dos doadores já foi previamente descrito (Marędziak *et al.*, 2016; Ye *et al.*, 2016). Contudo, em todas as amostras, houve uma redução de cerca de 40% no percentual de células

que proliferaram após a indução para diferenciação, sugerindo que este fenômeno de parada no ciclo celular durante o início da adipogênese é independente da idade do doador.

Além disso, em análise complementar em colaboração com outros membros do grupo, observou-se que houve uma mudança no perfil polissomal de células induzidas para adipogênese quando comparadas com as mantidas em meio controle. Foi constatado um enriquecimento do pico monossomal e redução da fração de polissomos pesados durante o início da diferenciação adipogênica (artigo submetido para publicação - Anexo III, Figura 1). Isso poderia estar relacionado a uma redução da atividade traducional global da célula, que pode levar a este tipo de mudança no perfil polissomal (Courtes *et al.*, 2014).

Diante disso, foi levantada a hipótese de que esta mudança poderia ser regulada pela via mTOR, uma vez que em trabalho anterior do grupo já havia sido demonstrado que após 72 horas de indução adipogênica há uma redução de tamanho e de atividade migratória, proliferativa e traducional, acompanhada de mudança no perfil de fosforilação de 4EBP1, características reguladas pela via mTOR. Ao analisar os dados obtidos por sequenciamento, observou-se um aumento na expressão de DEPTOR após 24 horas de adipogênese. DEPTOR interage com mTORC1 e mTORC2, inibindo esta via (Peterson *et al.*, 2009). Além disso, DEPTOR regula positivamente a adipogênese, tendo sido demonstrado que esta proteína estimula a diferenciação, tem sua regulação aumentada em tecido adiposo branco em humanos que apresentam obesidade e aumenta a expansão de tecido adiposo branco em camundongos que a superexpressam (Laplante *et al.*, 2012).

Para verificar se a expressão deste gene estava relacionada com a mudança no ciclo celular observada, foi feito um ensaio de silenciamento deste transcrito. Porém, mesmo após o *knockdown* de DEPTOR, as hASCs continuaram a apresentar parada no ciclo celular após a indução adipogênica, sendo inclusive observada uma redução ainda maior na atividade proliferativa das hASCs tanto tratadas com meio não-indutor quanto indutor. Estes resultados sugerem, portanto, que a redução na atividade proliferativa, com parada do ciclo celular em G1 observada em hASCs induzidas para adipogênese é regulada por mecanismos independentes de DEPTOR. Contudo, é preciso considerar a possibilidade de que este resultado possa estar relacionado ao fato de que o silenciamento realizado não foi suficiente para afetar a atividade de DEPTOR, ou porque o silenciamento levou à ativação de outras vias que mantiveram a atividade mitótica da célula. Por outro lado, em 2013, Zhang e colaboradores demonstraram que em células de mieloma múltiplo, uma redução de 50% no nível de mRNA de DEPTOR (semelhante ao obtido neste trabalho) levou a uma diminuição similar no nível de proteína e a mudanças no perfil de elementos *downstream* da via mTOR (como a fosforilação de 4EBP1 e

Akt), assim como redução na proliferação celular (Zhang *et al.*, 2013; ZHANG *et al.*, 2013). Um resultado semelhante foi observado em outros estudos com células de mieloma múltiplo (Peterson *et al.*, 2009) e de osteosarcoma (Hu *et al.*, 2017), nos quais níveis maiores de silenciamento de DEPTOR foram obtidos. Por outro lado, trabalhos anteriores demonstraram que a atividade de DEPTOR em relação à proliferação e ao ciclo celular pode variar em diferentes tipos de células. Kazi e colaboradores observaram que o *knockdown* de DEPTOR em mioblastos C2C12 leva a um aumento na fosforilação de pRb, o que estimula a transição G1-S (Kazi *et al.*, 2011). Assim, embora os resultados obtidos neste trabalho sugiram que a parada do ciclo celular observada após o início da adipogênese ocorra por mecanismos independentes de DEPTOR, ainda é necessária a realização de estudos complementares para confirmar esta hipótese.

Ainda considerando a mudança no perfil polissomal observada nas hASCs induzidas para adipogênese, foi levantada a hipótese de que este fenômeno poderia estar correlacionado com a regulação traducional negativa de transcritos, que levaria a um deslocamento destas moléculas da fração de polissomos pesados para a de monossomos/polissomos leves. Porém, cabe destacar que a fração monossomal não é restrita apenas a transcritos regulados negativamente em nível traducional. Usando a técnica de *ribosome profiling*, Heyer e Moore verificaram a presença de transcritos de baixa expressão ou contendo pequenas ORFs (menores do que 590 nt) sendo ativamente traduzidos e associados a monossomos (Heyer e Moore, 2016). Assim, para melhor entender o processo envolvido na parada de ciclo celular observada durante o início da adipogênese, foi feita uma análise da regulação da expressão gênica de transcritos considerando as frações total, monossomal e associada a polissomos. Observou-se que a maior parte dos genes identificados como regulados negativamente na fração monossomal também o estavam na fração de polissomos pesados. O mesmo perfil foi obtido para os genes regulados positivamente. Este resultado sugere que a regulação negativa de genes relacionados a ciclo celular e proliferação não se deve majoritariamente a apenas uma redução de sua tradução. Reforçando esta hipótese, está a observação de que houve uma redução destes genes quando foi feita análise do RNAm total. Assim, estes resultados sugerem que o controle do nível de RNAm total seria um dos pontos chave no controle da parada de ciclo celular e de proliferação durante o início da diferenciação adipogênica de hASCs.

Mais especificamente, neste trabalho, foi demonstrado que as ciclinas A2, B1, B2, D1, E2 e F, e as CDKs 1 e 2 estavam reguladas negativamente, enquanto as ciclinas G1 e G2 tiveram aumento de expressão após 24 horas de adipogênese. A relação entre ciclo celular, proliferação e o equilíbrio entre manutenção da potencialidade e diferenciação de células-tronco já foi

demonstrada previamente. Recentemente, Liu e colaboradores observaram que ciclinas da fase G1 (D1, D2, D3, E1 e E2) não são necessárias para proliferação de células-tronco embrionárias, mas a sua regulação negativa afeta a pluripotencialidade (Liu *et al.*, 2017). Além disso, o envolvimento de ciclinas na diferenciação adipogênica também já foi descrito. A ciclina D1, uma proteína lábil que participa da transição entre as fases G1 e S (Baldin *et al.*, 1993), foi previamente identificada como regulada negativamente após 24 horas de indução adipogênica (Janderová *et al.*, 2003; Marquez *et al.*, 2017), embora uma regulação positiva inicial nas primeiras 12 horas também já tenha sido descrita (Janderová *et al.*, 2003). Além disso, em fibroblastos murinos, a deleção de ciclina D1 leva a uma redução da atividade da histona deacetilase (HDAC1) e promove a expressão de PPAR γ e diferenciação adipogênica (Fu *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2003). Por outro lado, as ciclinas D3 e G2 foram previamente caracterizadas como reguladas positivamente durante a diferenciação adipogênica, atuando como coativadores de PPAR γ (Aguilar *et al.*, 2010; Sarruf *et al.*, 2005).

Assim, os resultados e conclusões obtidos neste trabalho corroboram dados anteriores sobre o ciclo celular durante o início da diferenciação adipogênica e trazem novas informações sobre como este processo é regulado. Conforme descrito anteriormente, as análises realizadas foram concluídas e organizadas em um trabalho intitulado “Cell cycle genes are downregulated after adipogenic triggering in human adipose-derived stem cells by regulation of mRNA abundance”, submetido para publicação (Anexo II).

5.4. A helicase DDX6 está dispersa no citoplasma de hASCs e em grânulos dependentes de RNA que se assemelham a *P-bodies*

A etapa seguinte do trabalho consistiu na análise do perfil de expressão da helicase DDX6 em hASCs. Em uma tese de Doutorado desenvolvida no grupo, foi demonstrado que o silenciamento de DDX6, seguido da indução adipogênica levou à aceleração do processo de diferenciação, acarretando em um maior acúmulo de lipídeos (Cofré, 2015). No presente trabalho, foi confirmado que as hASCs expressam DDX6, a qual localiza-se dispersa no citoplasma, sendo também observada em grânulos. Trabalhos prévios em outros tipos celulares demonstraram que DDX6 possui a capacidade de se ligar ao RNA (Ernoult-Lange *et al.*, 2012), atua na regulação da expressão de diferentes transcritos (Minshall *et al.*, 2009; Wang, Y. *et al.*, 2015) e também é encontrada em *P-bodies* (Ayache *et al.*, 2015; Chu e Rana, 2006; Coller e Parker, 2005; Minshall *et al.*, 2009). A proteína DDX6 possui um domínio rico em glutamina e asparagina (*QN-rich*) na sua região N terminal, o qual assemelha-se aos domínios *prion-like*,

que promovem auto-agregação. Porém, em trabalho publicado em 2012, Ernoult-Lange e colaboradores propuseram que a participação da proteína na formação de estruturas como os *P-bodies* estaria mais relacionada à sua capacidade de dimerização e a interações proteína-RNA do que à formação de agregados por interações proteína-proteína (Ernoult-Lange *et al.*, 2012). Assim, neste trabalho, primeiramente foi verificado se os grânulos de DDX6 observados em hASCs também tinham sua manutenção dependente de RNA. Observou-se que, quando foi feito tratamento com RNase, houve redução quase total da presença destas estruturas granulares, sugerindo que estes macrocomplexos contendo DDX6 possuem RNA e têm a manutenção de sua estrutura dependente destas moléculas em hASCs.

Em seguida, foi feita uma primeira análise sobre a composição proteica destes grânulos, a fim de verificar sua semelhança com *P-bodies* e grânulos de estresse, duas estruturas nas quais já foi observada a presença de DDX6 e seus homólogos (Ayache *et al.*, 2015; Chu e Rana, 2006; Coller e Parker, 2005; Minshall *et al.*, 2009; Nonhoff *et al.*, 2007; Wilczynska *et al.*, 2005). Estas análises foram feitas tanto em condições de cultivo controle e também com a indução de estresse, a fim de verificar o comportamento da proteína diante de diferentes cenários de atividade traducional. A partir dos experimentos realizados, constatou-se que DDX6 encontra-se em grânulos semelhantes a *P-bodies* em condições não-estressantes, apresentando uma colocalização parcial com Dcp1a. Porém, cabe destacar que há também a presença de grânulos de DDX6 que não apresentam marcação para Dcp1a. Já quando foi induzido o estresse, ela foi observada tanto em *P-bodies* (identificados com a proteínas Dcp1a), quanto em grânulos de estresse (identificados com a proteína TIA1). Além de DDX6, outras proteínas – como XRN1, eIF4E e TTP - já foram caracterizadas como compartilhadas entre grânulos de estresse e *P-bodies*. Isso está relacionado ao fato de que estas moléculas podem participar de diferentes complexos e de que *P-bodies* e grânulos de estresse são estruturas altamente dinâmicas, os quais interagem entre si e com outros elementos na célula, como polissomos (Bregues, Teixeira e Parker, 2005; Kedersha *et al.*, 2005).

A parada prematura da síntese proteica, com a desmontagem do polissomo e liberação das cadeias peptídicas, leva a um aumento na formação de *P-bodies*. Isso pode ser estimulado com o uso de diferentes drogas, dentre as quais a puromicina (Eulalio *et al.*, 2007). A fim de verificar se o uso deste tipo de agente também estimula a formação de grânulos de DDX6 em hASCs, foi feito uso de um análogo de puromicina (O-propargil-puromicina, OPP), o qual é incorporado na cadeia polipeptídica nascente, provocando a parada prematura do processo traducional. O uso deste análogo foi feito para avaliação não apenas do efeito desta droga, mas também para posterior localização dos peptídeos defeituosos produzidos (Liu *et al.*, 2012). O

interesse na localização destes peptídeos nascentes defeituosos proveio do fato de que estes DRIPs podem ser direcionados para grânulos de estresse, de onde são removidos e degradados através da maquinaria de controle de qualidade de proteínas. Porém, o desbalanço neste processo de *clearance* de DRIPs pode levar a mudanças na dinâmica do grânulos, formando estruturas aberrantes de difícil desmontagem, as quais se assemelham a inclusões patológicas observadas em doenças como a esclerose lateral amiotrófica (Ganassi *et al.*, 2016).

Os resultados obtidos demonstraram que a utilização de OPP levou a um aumento no número de grânulos de DDX6 em hASCs, o que sugere que a formação destes grânulos é estimulada pela parada prematura da síntese proteica e liberação de moléculas RNAm dos polissomos. Em relação à marcação de DRIPs, Liu e colaboradores demonstraram que, em células NIH 3T3, estes peptídeos encontravam-se majoritariamente dispersos no citoplasma, mas também foram observados no núcleo (Liu *et al.*, 2012), um resultado compatível com o obtido no presente trabalho em hASCs. Assim, é interessante notar que, apesar da formação de proteínas truncadas, o sinal de endereçamento (nuclear, por exemplo) é mantido pelo menos em parte destes peptídeos nascentes marcados com OPP. Quando foi feita a análise colocalização, observou-se que os grânulos que contêm DDX6 em hASCs mantidas em meio controle possuem DRIPs, mas que apenas uma pequena fração (13,8%) estaria enriquecida nestas estruturas. Porém, como o citoplasma não tem uma distribuição homogênea de OPP, é possível que este percentual de enriquecimento esteja relacionado a esta distribuição aleatória de DRIPs.

Quando comparamos com grânulos de estresse (identificados pela marcação com TIAR) formados a partir da incubação com arsenito, vemos que, nesta situação, foi possível observar por análise confocal uma maior concentração de DRIPs nas regiões dos grânulos e, por quantificação, observou-se que 66,42% dos grânulos estão enriquecidos com estes peptídeos. Além disso, nesta mesma situação de estresse, constatou-se que 41,99% dos grânulos de DDX6 estavam enriquecidos em DRIPs. Assim, os resultados obtidos demonstram que em meio não-estressante e com a utilização de OPP, houve um aumento no número de grânulos de DDX6, mas que não acumulam DRIPs. Quando este tratamento foi feito em conjunto com a indução de estresse com arsenito de sódio, uma parte de DDX6 passou a compor grânulos que acumulam DRIPs, semelhantes a grânulos de estresse.

É interessante notar que, no trabalho de Ganassi e colaboradores, foi constatado que o enriquecimento de DRIPs em grânulos de estresse ocorre apenas quando, além da indução do estresse, o sistema de controle de qualidade de proteínas está desregulado. Em nosso estudo, por outro lado, observou-se que os grânulos de estresse já se tornaram enriquecidos em DRIPs apenas com o tratamento com arsenito de sódio. Isso pode estar relacionado a um

funcionamento distinto do sistema de controle de qualidade de proteínas entre células HeLa (utilizada no estudo de Ganassi e colaboradores) e hASCs. Ou também devido a particularidades dos protocolos utilizados. No trabalho de Ganassi e colaboradores, o estresse foi induzido com a utilização de MG132, um indutor de estresse por inibição do proteassomo por 3 horas. Já no presente trabalho, foi utilizado arsenito de sódio, um indutor de estresse oxidativo, por 30 minutos.

Desta forma, os resultados obtidos demonstraram que, em hASCs, DDX6 é sintetizada e localiza-se dispersa no citoplasma e também em estruturas granulares. Estes grânulos possuem características semelhantes a *P-bodies*: são dependentes de RNA, colocalizam parcialmente com Dcp1a, aumentam de número quando é feito tratamento com puromicina e não acumulam DRIPs. Quando há a redução da atividade traducional devido à indução de estresse (com arsenito de sódio), DDX6 passa a também estar presente em grânulos de estresse. Porém, destaca-se o fato de que alguns dos grânulos de DDX6 observados tanto em condições controle quanto no estresse não apresentam marcação para Dcp1a, que é um componente característico de *P-bodies*. Assim, é possível que estas estruturas DDX6+Dcp1a- representem um outro tipo de grânulo, ou algum estágio diferente maturação destes grânulos de RNPM. Diferentes grupos já demonstraram que grânulos de estresse e *P-bodies* são estruturas altamente dinâmicas, que interagem entre si e cuja composição pode variar segundo o grau de maturação (Buchan, Muhrad e Parker, 2008; Kedersha *et al.*, 2005).

As observações até então realizadas sugerem que, em hASCs, a helicase DDX6 participa de complexos dependentes de RNA e sua dinâmica de distribuição muda em diferentes contextos de atividade traducional. Os dados obtidos pelo sequenciamento do RNA total e associado a polissomos demonstraram que há uma importante regulação da expressão gênica nas primeiras 24 horas de indução adipogênica e osteogênica. Assim, a próxima etapa do trabalho consistiu em verificar se esta mudança na regulação da expressão gênica nas etapas iniciais de diferenciação seria acompanhada por mudanças na dinâmica de distribuição de DDX6.

5.5. hASCs induzidas para adipogênese e osteogênese apresentam mudança na localização de DDX6

Quando foi feita indução para diferenciação adipogênica e osteogênica, houve mudança na quantidade de estruturas granulares contendo DDX6, embora não tenha sido observada alteração significativa na abundância de proteínas. Este resultado foi semelhante ao observado

em células HeLa submetidas a estresse com arsenito, em que foi constatada uma mudança na distribuição da helicase, mas sem alteração significativa de sua abundância (Ernoul-Lange *et al.*, 2012).

Os grânulos observados após 24 horas de indução para adipogênese e osteogênese são dependentes de RNA, colocalizam parcialmente com Dcp1a e não acumulam DRIPs, semelhantemente aos observados em hASCs mantidas em meio não indutor. Desta forma, os grânulos observados em ambas as condições de diferenciação também apresentaram características semelhantes a *P-bodies*, os quais são normalmente caracterizados como ligados à degradação do RNAm (Ayache *et al.*, 2015; Chu e Rana, 2006; Collier e Parker, 2005; Minshall *et al.*, 2009), embora outros trabalhos tenham verificado que estas estruturas também possam ter um papel de armazenamento (Arribere, Doudna e Gilbert, 2011; Brengues, Teixeira e Parker, 2005; Chu e Rana, 2006). Interessantemente, em nosso trabalho, observou-se um aumento de grânulos contendo DDX6 em um cenário em que houve aumento de genes com regulação positiva (osteogênese) e uma redução da abundância destes grânulos quando foi identificada uma maior presença de genes com regulação negativa (adipogênese).

Por outro lado, conforme descrito por Ernoul-Lange e colaboradores e conforme sugerem os resultados obtidos no presente trabalho, a aglomeração de moléculas de DDX6 para formação de estruturas granulares está diretamente relacionada com a ligação proteína-RNA (Ernoul-Lange *et al.*, 2012). Assim, é possível que a variação no estado de agregação de DDX6 e dos complexos a ela associados esteja relacionada a mudanças na disponibilidade de transcritos. O fato de que a maioria dos genes diferencialmente expressos na adipogênese tiveram regulação negativa (quando foi analisado o RNAm total) poderia levar a uma redução da disponibilidade de transcritos para ligação e agregação de DDX6. Já na osteogênese, a maior parte dos genes diferencialmente expressos tiveram aumento de expressão, o que poderia acarretar em um aumento na disponibilidade de moléculas de RNAm na célula, estimulando a agregação de DDX6. Uma observação que reforça a hipótese de que os grânulos observados têm sua manutenção mais dependente de interações RNA-proteína do que proteína-proteína é o fato de que o tratamento com RNase A levou à desmontagem dos grânulos de DDX6 em todas as condições (não-induzido, adipogênese e osteogênese).

Além disso, Yang e colaboradores verificaram que células que estão proliferando possuem um aumento no tamanho, intensidade e quantidade de *P-bodies* (Yang *et al.*, 2004). Em trabalho publicado em 2013, Aizer e colaboradores demonstraram que há um aumento do número de *P-bodies* em células humanas U2OS ao longo da transição entre as fases G1, S e G2, e que estes grânulos desmontam quando a célula está em mitose (Aizer *et al.*, 2013). No

presente trabalho, foi observado que durante as primeiras 24 horas de indução adipogênica, há uma redução na atividade proliferativa das hASCs com parada do ciclo celular em G1. Desta forma, é possível também que a redução do número de grânulos de DDX6 observados em hASCs no início da adipogênese esteja relacionada com a parada do ciclo celular. Em relação à osteogênese, em outro trabalho desenvolvido pelo grupo, não foi observada mudança no perfil proliferativo de hASCs (marcação com ki67) nas primeiras 24 horas de indução, embora tenha sido constatado um aumento no número de núcleos ao longo do processo de diferenciação (Robert *et al.*, 2018). Neste trabalho de Robert e colaboradores, também não foi realizada a análise do perfil de ciclo celular durante o início da osteogênese. Desta forma, uma investigação complementar neste sentido poderia auxiliar na compreensão da possível correlação entre a progressão do ciclo celular durante o início da diferenciação e o padrão de distribuição de DDX6. Além disso, seria importante que também fosse realizada a quantificação de grânulos contendo marcadores como Dcp1a, a fim de que se pudesse verificar se a variação no número de grânulos estaria realmente relacionada a estruturas semelhantes a *P-bodies* ou a outro tipo de grânulo contendo DDX6.

Trabalhos anteriores também demonstraram que DDX6 é capaz de se associar a polissomos, estando tanto relacionada com o aumento (Wang, Y. *et al.*, 2015) quanto com a redução da atividade traducional (Radhakrishnan *et al.*, 2016; Sweet, Kovalak e Coller, 2012). A fim de investigar uma possível associação de DDX6 com complexos proteicos distintos e possivelmente a polissomos, foi realizado o fracionamento por gradiente de sacarose de extratos de hASCs não induzidas ou tratadas com meio de diferenciação adipogênica e osteogênica por 24 horas, seguida da avaliação da presença desta helicase em diferentes frações por Western Blot. Os resultados obtidos demonstraram que, em hASCs não induzidas, DDX6 está majoritariamente presente na fração livre de polissomos, sendo também observada nas regiões que comigram com monossomos/polissomos leves. Já quando foi feita a indução para diferenciação, houve um deslocamento de DDX6 da fração livre para as frações associadas a monossomos/polissomos leves, o qual foi mais evidente na adipogênese. Estes resultados sugerem que esta helicase associa-se a complexos com coeficientes de sedimentação distintos durante o início do processo de diferenciação e possivelmente à maquinaria traducional. Além disso, a observação por imunofluorescência de que DDX6 está presente em estrutura granulares em hASCs levantou a hipótese de que esta proteína poderia associar-se a complexos maiores, os quais poderiam se depositar no fundo do gradiente de sacarose. Contudo, não foi observada a presença desta helicase nesta fração. Isto pode estar relacionado ao fato de que o coeficiente de sedimentação destes complexos corresponda a uma comigração com frações mais leves. Ou

ainda, há a possibilidade de que estas estruturas tenham baixa estabilidade e desmontem quando submetidas ao processo de lise celular e ao gradiente de sacarose. Em trabalho publicado em 2013, Izumi e colaboradores demonstraram que em extratos de células 293T submetidos a separação por gradiente de sacarose (5% a 65%), as proteínas características de *P-bodies* concentram-se nas frações mais leves (1 a 5, de um total de 19) (Izumi *et al.*, 2013), semelhantemente ao observado no presente estudo com hASCs.

Por outro lado, conforme descrito, foi observada uma pequena variação no coeficiente de sedimentação de DDX6 em diferentes condições de indução para diferenciação. É possível que a variação na quantidade de grânulos e no coeficiente de sedimentação dos complexos associados a DDX6 durante a adipogênese e a osteogênese esteja relacionada à associação desta helicase com complexos proteicos e RNAm diferentes, o que sugere também uma participação desta helicase nestes processos de diferenciação de hASCs. Para caracterizar melhor o conteúdo proteico e de RNA dos complexos associados a DDX6, optou-se pela realização de isolamento destes complexos (através de coimunoprecipitação) e análise por espectrometria de massas e sequenciamento de RNA.

5.6. Análise do conteúdo de complexos associados a DDX6 em hASCs após 24 horas de adipogênese e de osteogênese

Em trabalho publicado em 2015, Wang e colaboradores observaram que, em progenitores epidermais, a proteína DDX6 participa de complexos (contendo YBX1 e eIF4E) que se ligam a genes relacionados a ciclo celular/proliferação e da manutenção do estado de *stemness*, aumentando a sua tradução. Por outro lado, DDX6 em associação com EDC3 se liga ao RNAm de genes associados à diferenciação epidermal, reduzindo sua estabilidade. Quando estas células entram em um processo de diferenciação, há uma redução da expressão de DDX6, levando à diminuição da expressão de genes de proliferação, ciclo celular e *stemness*, e aumento de transcritos relacionados à diferenciação (Wang, Y. *et al.*, 2015). Já Nicklas e colaboradores demonstraram que em células-tronco neurais, DDX6 inibe a proliferação e estimula a neurogênese (Nicklas *et al.*, 2015). Assim, foi levantada a possibilidade de que DDX6 também possa atuar na regulação da atividade proliferativa e de diferenciação em hASCs durante a adipogênese e a osteogênese.

A fim de investigar a composição proteica e de RNA associada a DDX6 em hASCs tanto em seu estado de *stemness* quanto induzidas para diferenciação, foi utilizada a técnica de coimunoprecipitação padronizada neste trabalho. A análise foi feita com hASCs mantidas em

meio não indutor e tratadas com meio de diferenciação adipogênica e osteogênica por 24 horas. Foi realizada a imunoprecipitação de um total de quatro réplicas: duas biológicas e duas técnicas. As réplicas biológicas foram feitas utilizando-se células de dois doadores diferentes. Isso foi realizado para que possam ser identificados quais eventos estão relacionados aos complexos associados a DDX6 de uma forma geral e quais são apenas eventos individuais específicos das células isoladas de um doador em particular. Além disso, foram feitas duas réplicas técnicas de cada experimento, ou seja, a imunoprecipitação foi realizada duas vezes com as células de cada doador. Optou-se por esta estratégia, levando-se em consideração que os complexos de RNPM são estruturas altamente dinâmicas. Assim, a realização das réplicas técnicas aumenta a cobertura de análise e também fornece uma ideia melhor de eventos gerais e específicos de uma preparação individual. Além das imunoprecipitações, também foi preparado para análise o eluído das *beads* magnéticas utilizadas na etapa de pré-limpeza. O objetivo da realização deste controle foi identificar proteínas e RNAs que se ligam inespecificamente às *beads* e realizar uma filtragem dos dados da imunoprecipitação, a fim de que se pudesse obter uma lista mais específica de elementos que realmente participam de complexos associados a DDX6.

As quatro réplicas de amostras de RNA (da imunoprecipitação de DDX6 e da pré-limpeza) foram preparadas para análise por sequenciamento. Porém, obteve-se uma baixa quantidade de material em todas as amostras, principalmente nas preparações dos controles de pré-limpeza. Em relação às amostras de pré-limpeza, isso pode estar relacionado ao fato de que a quantidade de RNA que se ligou inespecificamente às *beads* magnéticas foi muito baixa, resultando na obtenção de uma baixa quantidade de material ao final do processo. Quanto às amostras de coimunoprecipitação, também se obteve uma baixa concentração de biblioteca, o que também pode ser devido a uma pequena quantidade de RNA inicial. Isso pode estar relacionado à dificuldade de manutenção da associação entre RNA e proteínas e à degradação do RNA durante o processo de imunoprecipitação, apesar de terem sido utilizados inibidores de RNase. Mas, apesar de ter sido obtida uma baixa quantidade de material, três réplicas de imunoprecipitação e uma de pré-limpeza puderam ser submetidas ao sequenciamento. Uma vez que os dados tenham sido obtidos, será feita primeiramente uma análise para identificação dos RNAs que se associam aos complexos de DDX6 em cada uma das condições. Em seguida, os dados obtidos serão comparados com os resultados de sequenciamento de RNAm total e associado às frações monossomal e polissomal, a fim de melhor compreender a interação entre estas estruturas e seu papel na manutenção do estado de célula-tronco (*stemness*) e nas diferenciações adipogênica e osteogênica.

A partir dos dados obtidos pela análise por espectrometria de massas, foram obtidas 348 proteínas. Todas as proteínas identificadas com pelo menos 1 peptídeo único nas amostras de pré-limpeza foram removidas das listagens de moléculas encontradas nas amostras de coimunoprecipitação. O objetivo desta filtragem foi remover as proteínas que podem ter sido identificadas na coimunoprecipitação não por se associarem a DDX6, mas por terem se ligado inespecificamente às *beads* magnéticas. Por outro lado, nos dados de coimunoprecipitação, foi exigido que pelo menos em umas das amostras fossem identificados pelo menos 2 peptídeos únicos para que uma proteína fosse confirmada como presente. Estes processos de filtragem foram realizados a fim de reduzir a probabilidade de identificação incorreta de proteínas como associadas a DDX6. Após todo este processo de filtragem, obteve-se uma listagem final de apenas 144 proteínas, dentre as quais estão diversas moléculas já caracterizadas como sendo parceiros de DDX6. Dentre estas, estão proteínas como Dcp1a, EDC3, IGF2BP2, LSM14A, LSM14B, MOV10, STAU1 e UPF1, que já foram caracterizadas como presentes em *P-bodies* (Eulalio *et al.*, 2007; Hubstenberger *et al.*, 2017; Kedersha *et al.*, 2005). Por outro lado, foram também observadas diversas proteínas ribossomais, as quais não são encontradas enriquecidas nestas estruturas (Decker e Parker, 2012; Hubstenberger *et al.*, 2017). Assim, os resultados obtidos sugerem que o protocolo de imunoprecipitação realizado permitiu o isolamento de complexos associados a DDX6 encontrados em estruturas granulares e possivelmente também dispersos no citoplasma.

Entre as proteínas identificadas na imunoprecipitação de DDX6 estão diferentes tipos de miosinas e de proteínas de citoesqueleto, como actina e tubulina. A obtenção de miosinas em amostras de coimunoprecipitação de DDX6 (Ayache *et al.*, 2015) e de isolamento de *P-bodies* (Hubstenberger *et al.*, 2017) já foi previamente descrita. Em trabalho publicado em 2017, Hubstenberger e colaboradores demonstraram a identificação de miosinas juntamente com *P-bodies* purificados e a colocalização de MYO6 com estas estruturas granulares, sugerindo que estas proteínas poderiam ser responsáveis pela conexão entre *P-bodies* e o citoesqueleto (Hubstenberger *et al.*, 2017).

Ao ser feita a análise de agrupamento entre as diferentes amostras, observou-se que os primeiros agrupamentos tiveram como base as réplicas técnicas e biológicas. Este resultado demonstra que as variações observadas entre os grupos estavam mais relacionadas a particularidades de cada experimento e de cada doador de hASCs e não às diferentes condições de cultivo. Cabe destacar que, ao observar o *heatmap* gerado, foi possível notar que o padrão de enriquecimento entre as diferentes réplicas e condições foi bastante semelhante de uma maneira geral. Ao realizar a análise de ontologia gênica destas proteínas, observou-se o

enriquecimento de diversas proteínas que participam do ciclo de vida do RNAm, como tradução, associação a complexos de ribonucleoproteínas, localização e degradação. Além disso, a análise de mapa de interações proteína-proteína demonstrou que dados prévios da literatura e de bancos de dados confirmam que diversas proteínas identificadas por coimunoprecipitação com DDX6 interagem entre si através de reações de ligação, o que reforça a especificidade dos dados obtidos. Desta forma, as observações feitas sugerem que a helicase DDX6 se associa direta ou indiretamente a diversas proteínas que participam do ciclo de vida do RNAm em hASCs, sendo que a composição do conteúdo proteico destes complexos se mantém quando é feita a indução para diferenciação adipogênica e osteogênica por 24 horas. Porém, cabe lembrar que a coimunoprecipitação realizada envolveu a identificação de complexos associados a DDX6 localizados tanto em grânulos quanto dispersos no citoplasma. Assim, uma análise subsequente em que seja possível analisar estas formações em separado, poderia trazer mais informações sobre dinâmica destas estruturas tanto em hASCs não induzidas quanto após o disparo da diferenciação.

Em seguida, foi feita análise estatística para identificação de proteínas que tiveram enriquecimento diferencial na associação com DDX6 em hASCs submetidas a diferentes condições de cultivo. Através desta avaliação foram identificadas as proteínas FAM98A, U2AF1, MVP, PRUNE2, RPN2 e ELAVL1.

U2AF1 é uma RBP que participa da maquinaria de *splicing*, auxiliando na interação entre a partícula ribonucleoproteica nuclear pequena U2 e o pré-RNAm (Wu *et al.*, 1999). A presença de mutações nesta proteína já foi correlacionada com a ocorrência de diferentes tipos de mielodisplasias (Yoshida *et al.*, 2011). Além disso, a associação de DDX6 com proteínas da maquinaria de *splicing* já foi previamente descrita (Ayache *et al.*, 2015), sugerindo que o protocolo obtido pode possivelmente permitir o isolamento de complexos associados a estruturas que atuam no núcleo da célula. A proteína FAM98A, por sua vez, possui domínios de baixa complexidade na sua região C-terminal, e já foi observada a sua presença em grânulos de estresse, mas não em *P-bodies* (Ozeki *et al.*, 2018). Além disso, também já foi demonstrado que ela se associa a proteínas como ATXN2, ATXN2L, DDX1 e NUFIP2 (Ozeki *et al.*, 2018), as quais também estavam presentes nos complexos de DDX6 identificados no presente trabalho.

A MVP (*Major Vault Protein*) forma uma estrutura proteica em formato de barril encontrada no citoplasma celular chamada de *vault* (baú). Em trabalho publicado em 2016, Das e colaboradores demonstraram que MVP possui um importante papel na via de sinalização de crescimento/sobrevivência de células de músculo liso de vias aéreas, através de modificações oxidativas, como a adição de glutatona. A S-glutatonilação poderia ser estimulada por

mecanismos como a redução da expressão de glutathione redoxina-1 (GLRX) e tioredoxina (TXN). Assim, os autores sugerem que a adição de glutathione à proteína MVP estimularia a associação com a miosina-9 e levaria a um aumento da proteção contra morte celular (Das *et al.*, 2016).

Na imunoprecipitação realizada no presente trabalho, destaca-se que também foi isolada miosina 9 (MYH9), a qual foi uma das proteínas identificadas com maior sinal. Assim, uma das hipóteses levantadas, seria de que a presença de MVP nos complexos associados a DDX6 possa se dar através desta proteína. Ao analisar os dados de sequenciamento de RNA total e polissomal de hASCs induzidas para osteogênese por 24 horas, observou-se um aumento da expressão de GLRX, que atua reduzindo a glutathionilação. Além disso, a S-glutathionilação de proteínas pode ser estimulada por um aumento da expressão espécies reativas de oxigênio (ROS) (Sakai *et al.*, 2012). Diferentes trabalhos demonstraram que a produção de ROS inibe a diferenciação osteogênica (Lin *et al.*, 2017). Assim, uma das hipóteses levantadas é que este cenário leve à redução da glutathionilação de MVP durante o início da osteogênese, reduzindo a sua interação com a miosina-9 e a uma menor associação com os complexos ligados a DDX6.

Já na adipogênese, também foi observado um aumento na expressão de GLRX nas primeiras 24 horas de indução adipogênica. Porém, também já foi demonstrado que também há um aumento da produção de ROS durante o início da adipogênese (Drehmer *et al.*, 2016; Wang, W. *et al.*, 2015). Desta forma, pode-se sugerir que este contexto favoreça a manutenção da glutathionilação de MVP e, conseqüentemente, a ligação com a miosina-9 e a associação com os complexos de DDX6.

A identificação de que MVP participaria de complexos de DDX6 em hASCs e de que esta associação passa por mudanças quando as células são induzidas para a osteogênese sugere uma possível participação desta proteína neste processo, podendo envolver modificações pós-traducionais (como a S-glutathionilação) e de localização. A proteína MVP possui um importante papel na regulação de crescimento/sobrevivência celular, funcionando como um intermediário das vias de sinalização STAT3 e Akt (Das *et al.*, 2016); e participa da regulação da expressão gênica durante a resposta pró-inflamatória, atuando em conjunto com C/EBP- β (Peng *et al.*, 2016).

Outra proteína identificada como diferencialmente associada aos complexos de DDX6 na osteogênese foi PRUNE2, também chamada de BMCC1. Esta proteína já foi descrita como expressa em diferentes órgãos, principalmente em tecidos epiteliais e neuronais, e, em células de neuroblastoma, induz a apoptose ao interagir com a via AKT (Tatsumi *et al.*, 2015). Trabalhos anteriores demonstraram que a ativação da via de sinalização AKT estimula a diferenciação osteogênica (Baker, Sohn e Tuan, 2015; Mukherjee e Rotwein, 2009).

Interessantemente, a superexpressão de PRUNE2 reduz a fosforilação de AKT e atenua a atividade anti-apoptótica desta via (Tatsumi *et al.*, 2015), enquanto que o silenciamento de MVP tem um efeito semelhante (Das *et al.*, 2016). E, no presente trabalho, identificou-se um enriquecimento de PRUNE2 com os complexos de DDX6, enquanto que MVP teve redução na associação com estas estruturas. Uma investigação subsequente envolvendo a análise de possíveis modificações pós-traducionais, de localização e de atividade - por silenciamento ou uso de inibidores - destas proteínas poderia elucidar melhor sua atuação em hASCs, a relação com os complexos associados a DDX6 e avaliar uma possível participação no processo de diferenciação.

Outra proteína identificada como diferencialmente associada aos complexos de DDX6 na diferenciação e que tem sua atividade regulada por S-glutacionilação é RPN2 (riboforina-2), a qual faz parte da subunidade regulatória do proteassomo (19S). A adição de glutatona em resíduos de cisteína de RPN2 leva à redução da atividade do proteassomo (Zmijewski, Banerjee e Abraham, 2009). Além disso, esta proteína também já foi observada em diferentes tipos de câncer (Fujiwara *et al.*, 2014; Ono *et al.*, 2015; Zhou *et al.*, 2018), atuando na regulação da atividade proliferativa e migratória (Fujiwara *et al.*, 2014; Zhou *et al.*, 2018). Em células de câncer colorretal, a inibição da expressão de RPN2 através da superexpressão de miR-128 levou à inibição da fosforilação de AKT, à redução da expressão de ciclina D1 e aumento de p53 (Zhou *et al.*, 2018).

Já ELAVL1 (também conhecida com HuR) é uma RBP, com afinidade por regiões ricas em U ou em AU (*AU-rich elements*, elementos ricos em AU, AREs) na região 3'-UTR. Além disso, também já foi demonstrada a sua capacidade de se ligar à região 5'-UTR e a pré-RNA (Srikantan, Tominaga e Gorospe, 2012). A ligação de HuR pode levar a um aumento da estabilidade dos transcritos alvo, ao inibir a repressão por microRNAs (Kundu *et al.*, 2012). Figueroa e colaboradores demonstraram que HuR possui um importante papel na diferenciação muscular de células C2C12, tendo como alvos tanto transcritos relacionados à diferenciação miogênica (como os reguladores transcricionais MyoD e miogenina) quanto à parada do ciclo celular (p21/CDKN1A) (Figueroa *et al.*, 2003). Em trabalho publicado em 2018, McDermott e colaboradores demonstraram que o silenciamento de HuR em células-tronco mesenquimais de medula óssea leva a uma redução da diferenciação osteogênica, embora não afete a diferenciação adipogênica (McDermott *et al.*, 2018).

A associação de ELAVL1 com complexos contendo DDX6 já foi previamente demonstrada (Ayache *et al.*, 2015). No presente trabalho, observou-se que, durante a adipogênese, há a redução da presença desta proteína na coimunoprecipitação com DDX6.

Além disso, ao analisar os dados de sequenciamento de RNA, foi observado um aumento da abundância do transcrito de CDKN1A tanto no RNAm total, quanto associado a polissomos na adipogênese, sendo que o mesmo não ocorre na osteogênese. Isto poderia estar relacionado a uma possível mudança de distribuição de ELAVL1, associando-se a complexos diferentes e aumentando a estabilidade do RNAm de CDKN1A.

Conforme abordado anteriormente, a helicase DDX6 pode desempenhar funções distintas dependendo dos complexos aos quais se associa. Portanto, o enriquecimento diferencial destas proteínas nos complexos associados a DDX6 podem estar relacionados à formação de estruturas com funções diferentes nas hASCs induzidas para adipogênese e osteogênese, as quais podem influenciar no ciclo de vida do RNAm e auxiliar na regulação da expressão gênica nestes processos. Estudos complementares para confirmação desta associação diferencial e a análise do papel destes complexos com composições distintas poderão fornecer mais informações sobre os mecanismos envolvidos no controle deste balanço entre a manutenção do estado de *stemness* e o início da diferenciação.

Os resultados até então obtidos demonstraram que a transição entre o estado indiferenciado e o início do processo de diferenciação adipogênica e osteogênica em hASCs envolve uma série de mudanças moleculares e fenotípicas. Na adipogênese, observou-se que há uma redução da atividade proliferativa, com parada do ciclo celular em G1, um processo que ocorre DEPTOR-independente e que parece ser regulado pelo controle da abundância de transcritos relacionados a ciclo celular e proliferação. Os resultados obtidos e as informações levantadas na literatura sugerem que este cenário pode estar relacionado à redistribuição de DDX6 no citoplasma da célula, reduzindo a sua agregação e diminuindo o número de estruturas granulares contendo esta proteína (Figura 5.1). Já na osteogênese, foi observado um predomínio de genes com aumento de expressão e dados da literatura sugerem que as células mantêm a continuidade do ciclo celular durante este processo. Este cenário, portanto, também poderia estar relacionado à redistribuição de DDX6, sendo que a maior disponibilidade de transcritos e a presença de uma maior quantidade de células transitando entre as fases G1, S e G2 poderia favorecer a agregação de DDX6 (Figura 5.1).

As observações realizadas no presente trabalho representam, portanto, mais um passo na compreensão dos mecanismos que regulam o comportamento de hASCs tanto mantidas no seu estado indiferenciado, quando durante as primeiras etapas de diferenciação adipogênica e osteogênica. A continuidade dos estudos para análise das hipóteses levantadas poderá ampliar ainda mais este conhecimento, a fim de que cada vez mais o potencial uso destas células tanto em pesquisas quanto na medicina regenerativa possa ser aproveitado.

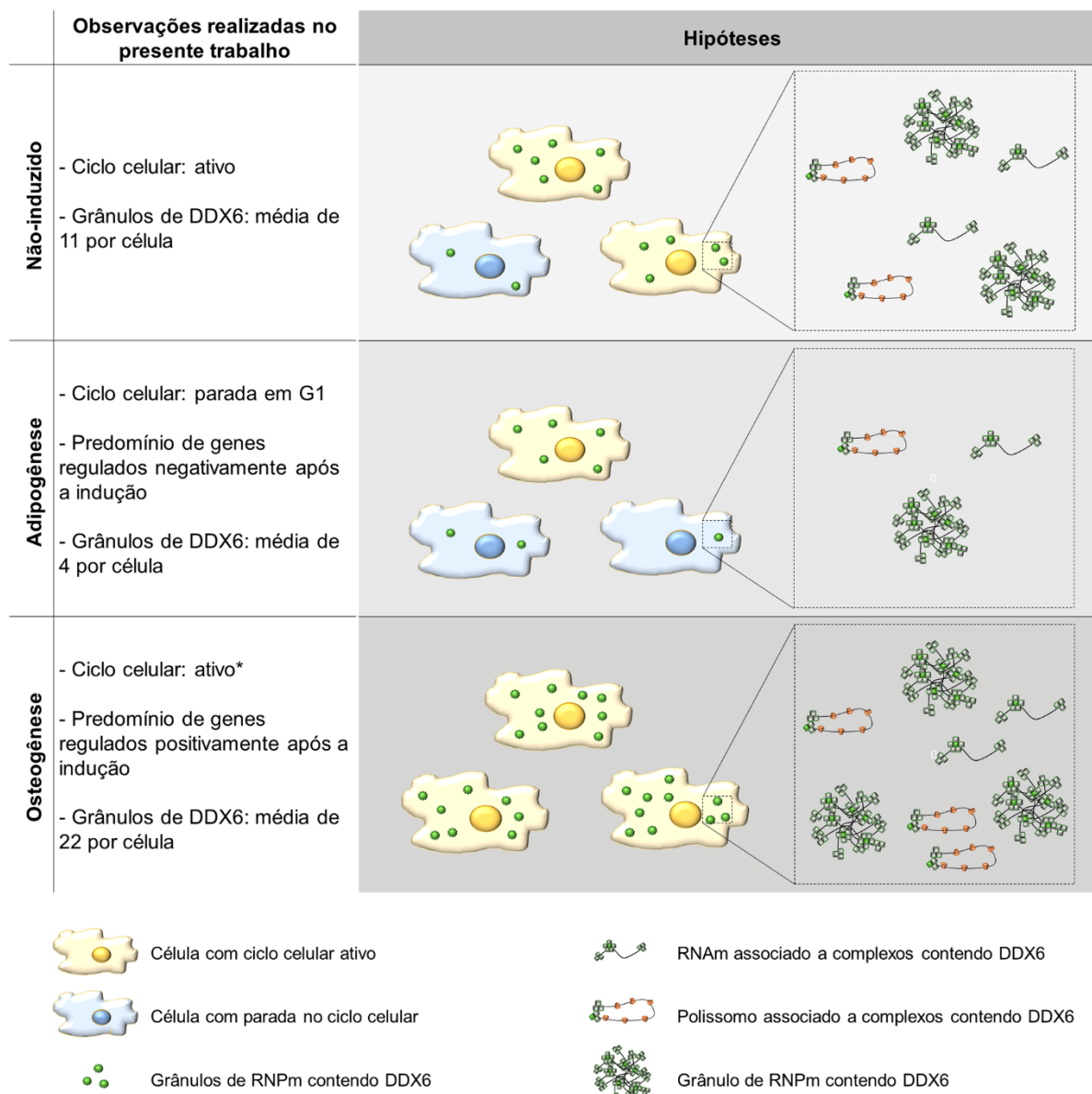


Figura 5.1. Perfil de expressão gênica e comportamento de DDX6 em hASCs mantidas em meio não indutor e induzidas para adipogênese e osteogênese por 24 horas. As observações realizadas no presente trabalho demonstraram que, nas primeiras 24 horas de indução adipogênica e osteogênica, as hASCs passam por mudanças em relação ao seu perfil de proliferação/ciclo celular e à expressão gênica. Na adipogênese, houve predomínio de genes regulados negativamente, incluindo diversos transcritos relacionados à proliferação/ciclo celular, que esteve correlacionada com uma parada de ciclo celular em G1. Com base nestas informações e em dados da literatura, levantou-se a hipótese de que este cenário possa levar à redução no número de grânulos contendo DDX6 devido à redução no número de células ciclando entre as fase G1-S-G2 e/ou devido à menor disponibilidade e interação com moléculas de RNAm, levando à redução da agregação de complexos contendo esta helicase. Já na osteogênese, foi observada a predominância de genes com regulação positiva. Além disso, dados da literatura sugerem que as células induzidas para osteogênese mantêm seu ciclo celular ativo e continuam proliferando (Robert *et al.*, 2018). Desta forma, a hipótese levantada é que este cenário leve à continuação ou ao aumento do número de células transitando entre as fase G1-S-G2 e ao aumento da interação RNA-proteína, favorecendo a agregação de complexos contendo DDX6. * A análise do perfil de ciclo celular de hASCs induzidas para osteogênese não foi realizada no presente trabalho, sendo que esta hipótese foi levantada com base em dados da literatura.

6. CONCLUSÕES

- hASCs induzidas para osteogênese por 24 horas apresentaram regulação da expressão gênica tanto em nível de RNAm total quanto associado a polissomos, sendo que a maior parte dos genes diferencialmente expressos tiveram regulação positiva.
- Entre os genes diferencialmente expressos em hASCs após 24 horas de indução para osteogênese, estão transcritos relacionados ao desenvolvimento, motilidade e migração, porém não foi observada uma expressão diferencial consistente de genes relacionados especificamente com a diferenciação osteogênica.
- hASCs induzidas para adipogênese por 24 horas também apresentaram regulação da expressão gênica tanto em nível de RNAm total quanto associado a polissomos, sendo que a maior parte dos genes diferencialmente expressos tiveram regulação negativa.
- Entre os genes diferencialmente expressos em hASCs após 24 horas de indução para adipogênese, estavam transcritos relacionados à diferenciação adipogênica e ao metabolismo de lipídeos. Isto sugere que, seguindo os protocolos de diferenciação utilizados neste trabalho, o comprometimento com a diferenciação adipogênica ocorre mais precocemente do que com a osteogênica em hASCs.
- Entre os genes com regulação negativa após 24 horas de indução para adipogênese, estavam transcritos relacionados com proliferação e ciclo celular. Esta mudança na expressão gênica foi correlacionada com uma redução na atividade proliferativa das hASCs, com parada do ciclo celular em G1. Os resultados obtidos sugerem que este processo ocorreria por uma via independente de DEPTOR e estaria correlacionado a uma diminuição na abundância de transcritos.
- A helicase DDX6 é expressa em hASCs, sendo observada tanto dispersa no citoplasma quanto concentrada em grânulos. Estes grânulos apresentaram composição e comportamento semelhante a *P-bodies*, uma vez que eram dependentes de RNA, colocalizaram parcialmente com Dcp1a e apresentaram aumento de quantidade quando as células foram submetidas a tratamento com um análogo de puromicina.

- Em hASCs, DDX6 associou-se a complexos de proteínas que participam da regulação do ciclo de vida do RNAm. A composição destes complexos permaneceu bastante semelhante quando as células foram induzidas para adipogênese ou para osteogênese por 24 horas. Dentre as proteínas com enriquecimento diferencial nestes complexos estavam ELAVL1, MVP, PRUNE2, RPN2, FAM98A e U2AF1.

- Quando as hASCs foram induzidas para diferenciação adipogênica e osteogênica por 24 horas, houve alteração no padrão de distribuição de DDX6, sem que houvesse mudança na abundância desta proteína. Na adipogênese houve uma redução no número de grânulos por célula, enquanto que na osteogênese houve um aumento. Esta variação no padrão de distribuição pode estar relacionada à mudança no perfil de ciclo celular e na regulação diferencial da expressão gênica nestes processos. Isto poderia levar a uma mudança na disponibilidade de transcritos que se associam aos complexos DDX6, estimulando ou reduzindo a agregação.

7. REFERÊNCIAS

- AGUILAR, V.; ANNICOTTE, J.-S.; ESCOTE, X.; VENDRELL, J.; LANGIN, D.; FAJAS, L. Cyclin G2 regulates adipogenesis through PPAR gamma coactivation. **Endocrinology**, v. 151, n. 11, p. 5247–54, nov. 2010.
- AIZER, A.; KAFRI, P.; KALO, A.; SHAV-TAL, Y. The P Body Protein Dcp1a Is Hyperphosphorylated during Mitosis. **PLoS ONE**, v. 8, n. 1, p. e49783, 2 jan. 2013.
- ALLIS, C. D.; JENUWEIN, T. The molecular hallmarks of epigenetic control. **Nature reviews. Genetics**, v. 17, n. 8, p. 487–500, 2016.
- ARRIBERE, J. A.; DOUDNA, J. A.; GILBERT, W. V. Reconsidering Movement of Eukaryotic mRNAs between Polysomes and P Bodies. **Molecular Cell**, v. 44, n. 5, p. 745–758, dez. 2011.
- AYACHE, J.; BÉNARD, M.; ERNOULT-LANGE, M.; MINSHALL, N.; STANDART, N.; KRESS, M.; WEIL, D. P-body assembly requires DDX6 repression complexes rather than decay or Ataxin2/2L complexes. **Molecular biology of the cell**, v. 26, n. 14, p. 2579–95, 15 jul. 2015.
- BAER, P. C.; GEIGER, H. Adipose-Derived Mesenchymal Stromal/Stem Cells: Tissue Localization, Characterization, and Heterogeneity. **Stem Cells International**, v. 2012, p. 1–11, 2012.
- BAKER, N.; SOHN, J.; TUAN, R. S. Promotion of human mesenchymal stem cell osteogenesis by PI3-kinase/Akt signaling, and the influence of caveolin-1/cholesterol homeostasis. **Stem cell research & therapy**, v. 6, p. 238, 1 dez. 2015.
- BALDIN, V.; LUKAS, J.; MARCOTE, M. J.; PAGANO, M.; DRAETTA, G. Cyclin D1 is a nuclear protein required for cell cycle progression in G1. **Genes & development**, v. 7, n. 5, p. 812–21, 1 maio 1993.
- BERESFORD, J. N.; BENNETT, J. H.; DEVLIN, C.; LEBOY, P. S.; OWEN, M. E. Evidence for an inverse relationship between the differentiation of adipocytic and osteogenic cells in rat marrow stromal cell cultures. **Journal of cell science**, v. 102 (Pt 2), p. 341–51, jun. 1992.
- BOQUEST, A. C.; SHAHDADFAR, A.; FRØNSDAL, K.; SIGURJONSSON, O.; TUNHEIM, S. H.; COLLAS, P.; BRINCHMANN, J. E. Isolation and Transcription Profiling of Purified Uncultured Human Stromal Stem Cells: Alteration of Gene Expression after In Vitro Cell Culture. **Molecular Biology of the Cell**, v. 16, n. 3, p. 1131–1141, 5 jan. 2005.
- BRENGUES, M.; TEIXEIRA, D.; PARKER, R. Movement of Eukaryotic mRNAs Between Polysomes and Cytoplasmic Processing Bodies. **Science**, v. 310, n. 5747, p. 486–489, 21 out. 2005.
- BUCHAN, J. R. mRNP granules. Assembly, function, and connections with disease. **RNA biology**, v. 11, n. 8, p. 1019–30, 3 ago. 2014.
- BUCHAN, J. R.; MUHLRAD, D.; PARKER, R. P bodies promote stress granule assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. **The Journal of Cell Biology**, v. 183, n. 3, p. 441–455, 3 nov. 2008.
- CAO, Z.; UMEK, R. M.; MCKNIGHT, S. L. Regulated expression of three C/EBP isoforms during adipose conversion of 3T3-L1 cells. **Genes & development**, v. 5, n. 9, p. 1538–52, set. 1991.
- CAPLAN, A. I. Mesenchymal Stem Cells: Time to Change the Name! **Stem cells**

translational medicine, v. 6, n. 6, p. 1445–1451, jun. 2017.

CHAPMAN, A. B.; KNIGHT, D. M.; DIECKMANN, B. S.; RINGOLD, G. M. Analysis of gene expression during differentiation of adipogenic cells in culture and hormonal control of the developmental program. **The Journal of biological chemistry**, v. 259, n. 24, p. 15548–55, 25 dez. 1984.

CHEN, Q. *et al.* Fate decision of mesenchymal stem cells: adipocytes or osteoblasts? **Cell death and differentiation**, v. 23, n. 7, p. 1128–39, jul. 2016.

CHEN, Y.; BOLAND, A.; KUZUOĞLU-ÖZTÜRK, D.; BAWANKAR, P.; LOH, B.; CHANG, C.-T.; WEICHENRIEDER, O.; IZAURRALDE, E. A DDX6-CNOT1 Complex and W-Binding Pockets in CNOT9 Reveal Direct Links between miRNA Target Recognition and Silencing. **Molecular Cell**, v. 54, n. 5, p. 737–750, 5 jun. 2014.

CHOI, E. W.; SEO, M. K.; WOO, E. Y.; KIM, S. H.; PARK, E. J.; KIM, S. Exosomes from human adipose-derived stem cells promote proliferation and migration of skin fibroblasts. **Experimental Dermatology**, 10 nov. 2017.

CHU, C.; RANA, T. M. Translation Repression in Human Cells by MicroRNA-Induced Gene Silencing Requires RCK/p54. **PLoS Biology**, v. 4, n. 7, p. e210, 13 jun. 2006.

COFRÉ, A. H. R. **Estudo da função dos grânulos que contêm TIA e dos Processing Bodies em células-tronco mesenquimais humanas**. [s.l.: s.n.].

COLLER, J. M.; TUCKER, M.; SHETH, U.; VALENCIA-SANCHEZ, M. A.; PARKER, R. The DEAD box helicase, Dhh1p, functions in mRNA decapping and interacts with both the decapping and deadenylase complexes. **RNA (New York, N.Y.)**, v. 7, n. 12, p. 1717–27, dez. 2001.

COLLER, J.; PARKER, R. General Translational Repression by Activators of mRNA Decapping. **Cell**, v. 122, n. 6, p. 875–886, 23 set. 2005.

COURTES, F. C.; VARDY, L.; WONG, N. S. C.; BARDOR, M.; YAP, M. G. S.; LEE, D.-Y. Understanding translational control mechanisms of the mTOR pathway in CHO cells by polysome profiling. **New Biotechnology**, v. 31, n. 5, p. 514–523, 25 set. 2014.

DAS, D.; WANG, Y.-H.; HSIEH, C.-Y.; SUZUKI, Y. J. Major vault protein regulates cell growth/survival signaling through oxidative modifications. **Cellular signalling**, v. 28, n. 1, p. 12–8, jan. 2016.

DECKER, C. J.; PARKER, R. P-bodies and stress granules: possible roles in the control of translation and mRNA degradation. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 4, n. 9, p. a012286, 1 set. 2012.

DECKER, C. J.; TEIXEIRA, D.; PARKER, R. Edc3p and a glutamine/asparagine-rich domain of Lsm4p function in processing body assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. **The Journal of Cell Biology**, v. 179, n. 3, p. 437–449, 5 nov. 2007.

DOMINICI, M.; BLANC, K. LE; MUELLER, I.; SLAPER-CORTENBACH, I.; MARINI, F. .; KRAUSE, D. S.; DEANS, R. J.; KEATING, A.; PROCKOP, D. J.; HORWITZ, E. M. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v. 8, n. 4, p. 315–317, 2006.

DONNELLY, N.; GORMAN, A. M.; GUPTA, S.; SAMALI, A. The eIF2 α kinases: their structures and functions. **Cellular and molecular life sciences : CMLS**, v. 70, n. 19, p. 3493–511, 26 out. 2013.

DREHMER, D. L.; AGUIAR, A. M. DE; BRANDT, A. P.; PETIZ, L.; CADENA, S. M. S.

C.; REBELATTO, C. K.; BROFMAN, P. R. S.; FILIPAK NETO, F.; DALLAGIOVANNA, B.; ABUD, A. P. R. Metabolic switches during the first steps of adipogenic stem cells differentiation. **Stem Cell Research**, v. 17, n. 2, p. 413–421, 1 set. 2016.

DUNCKLEY, T.; PARKER, R. The DCP2 protein is required for mRNA decapping in *Saccharomyces cerevisiae* and contains a functional MutT motif. **The EMBO Journal**, v. 18, n. 19, p. 5411–5422, 1 out. 1999.

EBERWINE, J.; MIYASHIRO, K.; KACHARMINA, J. E.; JOB, C. Local translation of classes of mRNAs that are targeted to neuronal dendrites. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 13, p. 7080–7085, 19 jun. 2001.

ELBAUM-GARFINKLE, S.; KIM, Y.; SZCZEPANIAK, K.; CHEN, C. C.-H.; ECKMANN, C. R.; MYONG, S.; BRANGWYNNE, C. P. The disordered P granule protein LAF-1 drives phase separation into droplets with tunable viscosity and dynamics. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 23, p. 7189–7194, 9 jun. 2015.

ERNOULT-LANGE, M. *et al.* Multiple binding of repressed mRNAs by the P-body protein Rck/p54. **RNA (New York, N.Y.)**, v. 18, n. 9, p. 1702–15, set. 2012.

EULALIO, A.; BEHM-ANSMANT, I.; SCHWEIZER, D.; IZAURRALDE, E. P-Body Formation Is a Consequence, Not the Cause, of RNA-Mediated Gene Silencing. **Molecular and Cellular Biology**, v. 27, n. 11, p. 3970–3981, 1 jun. 2007.

EVANS, M. J.; KAUFMAN, M. H. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. **Nature**, v. 292, n. 5819, p. 154–6, 9 jul. 1981.

FIGUEROA, A.; CUADRADO, A.; FAN, J.; ATASOY, U.; MUSCAT, G. E.; MUÑOZ-CANOVES, P.; GOROSPE, M.; MUÑOZ, A. Role of HuR in skeletal myogenesis through coordinate regulation of muscle differentiation genes. **Molecular and cellular biology**, v. 23, n. 14, p. 4991–5004, jul. 2003.

FREIMER, J. W.; HU, T.; BLELLOCH, R. Decoupling the impact of microRNAs on translational repression versus RNA degradation in embryonic stem cells. **eLife**, v. 7, 25 jul. 2018.

FU, M.; RAO, M.; BOURAS, T.; WANG, C.; WU, K.; ZHANG, X.; LI, Z.; YAO, T.-P.; PESTELL, R. G. Cyclin D1 inhibits peroxisome proliferator-activated receptor gamma-mediated adipogenesis through histone deacetylase recruitment. **The Journal of biological chemistry**, v. 280, n. 17, p. 16934–41, 29 abr. 2005.

FUCHS, E.; SEGRE, J. A. Stem cells: a new lease on life. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 143–55, 7 jan. 2000.

FUJIWARA, T.; TAKAHASHI, R.; KOSAKA, N.; NEZU, Y.; KAWAI, A.; OZAKI, T.; OCHIYA, T. RPN2 Gene Confers Osteosarcoma Cell Malignant Phenotypes and Determines Clinical Prognosis. **Molecular Therapy - Nucleic Acids**, v. 3, p. e189, 2 jan. 2014.

GANASSI, M. *et al.* A Surveillance Function of the HSPB8-BAG3-HSP70 Chaperone Complex Ensures Stress Granule Integrity and Dynamism. **Molecular Cell**, v. 63, n. 5, p. 796–810, 1 set. 2016.

GEHRING, N. H.; WAHLE, E.; FISCHER, U. Deciphering the mRNP Code: RNA-Bound Determinants of Post-Transcriptional Gene Regulation. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 42, n. 5, p. 369–382, maio 2017.

HASHIMOTO, K.; NAKAGAWA, Y.; MORIKAWA, H.; NIKI, M.; EGASHIRA, Y.; HIRATA, I.; KATSU, K.; AKAO, Y. Co-overexpression of DEAD box protein rck/p54 and

c-myc protein in human colorectal adenomas and the relevance of their expression in cultured cell lines. **Carcinogenesis**, v. 22, n. 12, p. 1965–70, dez. 2001.

HEINZ, S.; ROMANOSKI, C. E.; BENNER, C.; GLASS, C. K. The selection and function of cell type-specific enhancers. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 16, n. 3, p. 144–154, 4 mar. 2015.

HENTZE, M. W.; CASTELLO, A.; SCHWARZL, T.; PREISS, T. A brave new world of RNA-binding proteins. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, 17 jan. 2018.

HEYER, E. E.; MOORE, M. J. Redefining the Translational Status of 80S Monosomes. **Cell**, v. 164, n. 4, p. 757–769, 11 fev. 2016.

HORVATHOVA, I.; VOIGT, F.; KOTRYS, A. V; ZHAN, Y.; ARTUS-REVEL, C. G.; EGLINGER, J.; STADLER, M. B.; GIORGETTI, L.; CHAO, J. A. The Dynamics of mRNA Turnover Revealed by Single-Molecule Imaging in Single Cells. **Molecular cell**, v. 68, n. 3, p. 615–625.e9, 2 nov. 2017.

HU, B.; LV, X.; GAO, F.; CHEN, S.; WANG, S.; QING, X.; LIU, J.; WANG, B.; SHAO, Z. Downregulation of DEPTOR inhibits the proliferation, migration, and survival of osteosarcoma through PI3K/Akt/mTOR pathway. **OncoTargets and Therapy**, v. Volume 10, p. 4379–4391, set. 2017.

HUANG, D. 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, 2009a.

_____. Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. **Nucleic acids research**, v. 37, n. 1, p. 1–13, jan. 2009b.

HUANG, J.-H.; KU, W.-C.; CHEN, Y.-C.; CHANG, Y.-L.; CHU, C.-Y. Dual mechanisms regulate the nucleocytoplasmic localization of human DDX6. **Scientific Reports**, v. 7, p. 42853, 20 fev. 2017.

HUBSTENBERGER, A. *et al.* P-Body Purification Reveals the Condensation of Repressed mRNA Regulons. **Molecular Cell**, v. 68, n. 1, p. 144–157.e5, 5 out. 2017.

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.

IZUMI, T.; BURDICK, R.; SHIGEMI, M.; PLISOV, S.; HU, W.-S.; PATHAK, V. K. Mov10 and APOBEC3G localization to processing bodies is not required for virion incorporation and antiviral activity. **Journal of virology**, v. 87, n. 20, p. 11047–62, out. 2013.

JAIN, S.; WHEELER, J. R.; WALTERS, R. W.; AGRAWAL, A.; BARSIC, A.; PARKER, R. ATPase-Modulated Stress Granules Contain a Diverse Proteome and Substructure. **Cell**, v. 164, n. 3, p. 487–98, 28 jan. 2016.

JAMES, A. W.; LEUCHT, P.; LEVI, B.; CARRE, A. L.; XU, Y.; HELMS, J. A.; LONGAKER, M. T. Sonic Hedgehog influences the balance of osteogenesis and adipogenesis in mouse adipose-derived stromal cells. **Tissue engineering. Part A**, v. 16, n. 8, p. 2605–16, ago. 2010.

JANDEROVÁ, L.; MCNEIL, M.; MURRELL, A. N.; MYNATT, R. L.; SMITH, S. R. Human Mesenchymal Stem Cells as an in Vitro Model for Human Adipogenesis. **Obesity Research**, v. 11, n. 1, p. 65–74, jan. 2003.

JONKERS, I.; LIS, J. T. Getting up to speed with transcription elongation by RNA

polymerase II. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 16, n. 3, p. 167–77, 18 mar. 2015.

KAMI, D.; KITANI, T.; NAKAMURA, A.; WAKUI, N.; MIZUTANI, R.; OHUE, M.; KAMETANI, F.; AKIMITSU, N.; GOJO, S. The DEAD-box RNA-binding protein DDX6 regulates parental RNA decay for cellular reprogramming to pluripotency. **PLOS ONE**, v. 13, n. 10, p. e0203708, 1 out. 2018.

KANG, T.; JONES, T. M.; NADDELL, C.; BACANAMWO, M.; CALVERT, J. W.; THOMPSON, W. E.; BOND, V. C.; CHEN, Y. E.; LIU, D. Adipose-Derived Stem Cells Induce Angiogenesis via Microvesicle Transport of miRNA-31. **STEM CELLS Translational Medicine**, v. 5, n. 4, p. 440–450, abr. 2016.

KAZI, A. A.; HONG-BROWN, L.; LANG, S. M.; LANG, C. H. Deptor knockdown enhances mTOR Activity and protein synthesis in myocytes and ameliorates disuse muscle atrophy. **Molecular medicine (Cambridge, Mass.)**, v. 17, n. 9–10, p. 925–36, 2011.

KEDERSHA, N.; CHO, M. R.; LI, W.; YACONO, P. W.; CHEN, S.; GILKS, N.; GOLAN, D. E.; ANDERSON, P. Dynamic shuttling of TIA-1 accompanies the recruitment of mRNA to mammalian stress granules. **The Journal of cell biology**, v. 151, n. 6, p. 1257–68, 11 dez. 2000.

KEDERSHA, N. L.; GUPTA, M.; LI, W.; MILLER, I.; ANDERSON, P. RNA-binding proteins TIA-1 and TIAR link the phosphorylation of eIF-2 alpha to the assembly of mammalian stress granules. **The Journal of cell biology**, v. 147, n. 7, p. 1431–42, 27 dez. 1999.

KEDERSHA, N.; STOECKLIN, G.; AYODELE, M.; YACONO, P.; LYKKE-ANDERSEN, J.; FRITZLER, M. J.; 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, 20 jun. 2005.

KILROY, G. E. *et al.* 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, set. 2007.

KOCAN, B.; MAZIARZ, A.; TABARKIEWICZ, J.; OCHIYA, T.; BANAŚ-ZĄBCZYK, A. Trophic Activity and Phenotype of Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells as a Background of Their Regenerative Potential. **Stem cells international**, v. 2017, p. 1653254, 2017.

KONG, J.; LASKO, P. Translational control in cellular and developmental processes. **Nature Reviews Genetics**, v. 13, n. 6, p. 383–394, 9 maio 2012.

KRAMER, S.; QUEIROZ, R.; ELLIS, L.; HOHEISEL, J. D.; CLAYTON, C.; CARRINGTON, M. The RNA helicase DHH1 is central to the correct expression of many developmentally regulated mRNAs in trypanosomes. **Journal of Cell Science**, v. 123, n. 5, p. 699–711, 1 mar. 2010.

KUNDU, P.; FABIAN, M. R.; SONENBERG, N.; BHATTACHARYYA, S. N.; FILIPOWICZ, W. HuR protein attenuates miRNA-mediated repression by promoting miRISC dissociation from the target RNA. **Nucleic acids research**, v. 40, n. 11, p. 5088–100, jun. 2012.

LADOMERY, M.; WADE, E.; SOMMERVILLE, J. Xp54, the Xenopus homologue of human RNA helicase p54, is an integral component of stored mRNP particles in oocytes. **Nucleic acids research**, v. 25, n. 5, p. 965–73, 1 mar. 1997.

LANGENBACH, F.; HANDSCHEL, J. Effects of dexamethasone, ascorbic acid and b-

glycerophosphate on the osteogenic differentiation of stem cells in vitro. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 4, n. 5, p. 117, 2013.

LAPLANTE, M.; HORVAT, S.; FESTUCCIA, W.; BIRSOY, K.; PREVORSEK, Z.; EFEYAN, A.; SABATINI, D.; MANNING, B. D.; KIM, C. D.; BIRNBAUM, M. J.; AL., ET. DEPTOR Cell-Autonomously Promotes Adipogenesis, and Its Expression Is Associated with Obesity. **Cell Metabolism**, v. 16, n. 2, p. 202–212, 8 ago. 2012.

LIAO, Y.; SMYTH, G. K.; SHI, W. The Subread aligner: fast, accurate and scalable read mapping by seed-and-vote. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. 10, p. e108–e108, 1 maio 2013.

LIN, C.-H.; LI, N.-T.; CHENG, H.-S.; YEN, M.-L. Oxidative stress induces imbalance of adipogenic/osteoblastic lineage commitment in mesenchymal stem cells through decreasing SIRT1 functions. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 22, n. 2, p. 786–796, 3 out. 2017.

LIN, Y.; PROTTER, D. S. W.; ROSEN, M. K.; PARKER, R. Formation and Maturation of Phase-Separated Liquid Droplets by RNA-Binding Proteins. **Molecular cell**, v. 60, n. 2, p. 208–19, 15 out. 2015.

LINDER, P. Dead-box proteins: a family affair--active and passive players in RNP-remodeling. **Nucleic acids research**, v. 34, n. 15, p. 4168–80, 2006.

LIU, J.; XU, Y.; STOLERU, D.; SALIC, A. Imaging protein synthesis in cells and tissues with an alkyne analog of puromycin. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 2, p. 413–418, 10 jan. 2012.

LIU, L. *et al.* G1 cyclins link proliferation, pluripotency and differentiation of embryonic stem cells. **Nature Cell Biology**, v. 19, n. 3, p. 177–188, 13 fev. 2017.

LUO, Y.; NA, Z.; SLAVOFF, S. A. P-Bodies: Composition, Properties, and Functions. **Biochemistry**, v. 57, n. 17, p. 2424–2431, 1 maio 2018.

LYKKE-ANDERSEN, J. Identification of a human decapping complex associated with hUpf proteins in nonsense-mediated decay. **Molecular and cellular biology**, v. 22, n. 23, p. 8114–21, dez. 2002.

MACDOUGALD, O. A.; LANE, M. D. Transcriptional Regulation of Gene Expression During Adipocyte Differentiation. **Annual Review of Biochemistry**, v. 64, n. 1, p. 345–373, jun. 1995.

MARCON, B. H.; HOLETZ, F. B.; EASTMAN, G.; ORIGA-ALVES, A. C.; AMORÓS, M. A.; AGUIAR, A. M. DE; REBELATTO, C. K.; BROFMAN, P. R. S.; SOTELO-SILVEIRA, J.; DALLAGIOVANNA, B. Downregulation of the protein synthesis machinery is a major regulatory event during early adipogenic differentiation of human adipose-derived stromal cells. **Stem Cell Research**, v. 25, p. 191–201, dez. 2017.

MARĘDZIAK, M.; MARYCZ, K.; TOMASZEWSKI, K. A.; KORNICKA, K.; HENRY, B. M. The Influence of Aging on the Regenerative Potential of Human Adipose Derived Mesenchymal Stem Cells. **Stem Cells International**, v. 2016, p. 1–15, 2016.

MARQUEZ, M. *et al.* The Role of Cellular Proliferation in Adipogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells. **Stem Cells and Development**, p. scd.2017.0071, 6 set. 2017.

MARTIN, G. R. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 78, n. 12, p. 7634–8, dez. 1981.

MARTÍNEZ, J. P. *et al.* Screening of small molecules affecting mammalian P-body assembly uncovers links with diverse intracellular processes and organelle physiology. **RNA biology**, v. 10, n. 11, p. 1661–9, nov. 2013.

MCDERMOTT, B. T.; JOHNSON, K. A.; HAYATI, H. F.; TEW, S. R. The RNA binding protein HuR is critical for effective differentiation of bone marrow derived stem cells. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 26, p. S149–S150, 1 abr. 2018.

MINSHALL, N.; KRESS, M.; WEIL, D.; STANDART, N. Role of p54 RNA helicase activity and its C-terminal domain in translational repression, P-body localization and assembly. **Molecular biology of the cell**, v. 20, n. 9, p. 2464–72, maio 2009.

MOLLIEX, A.; TEMIROV, J.; LEE, J.; COUGHLIN, M.; KANAGARAJ, A. P.; KIM, H. J.; MITTAG, T.; TAYLOR, J. P. Phase separation by low complexity domains promotes stress granule assembly and drives pathological fibrillization. **Cell**, v. 163, n. 1, p. 123–33, 24 set. 2015.

MUKHERJEE, A.; ROTWEIN, P. Akt promotes BMP2-mediated osteoblast differentiation and bone development. **Journal of cell science**, v. 122, n. Pt 5, p. 716–26, 1 mar. 2009.

MURUGANANDAN, S.; ROMAN, A. A.; SINAL, C. J. Adipocyte differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells: Cross talk with the osteoblastogenic program. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 66, n. 2, p. 236–253, 16 jan. 2009.

NAKAGAWA, Y. *et al.* Overexpression of rck/p54, a DEAD box protein, in human colorectal tumours. **British journal of cancer**, v. 80, n. 5–6, p. 914–7, maio 1999.

NICKLAS, S.; OKAWA, S.; HILLJE, A.-L.; GONZÁLEZ-CANO, L.; DEL SOL, A.; SCHWAMBORN, J. C. The RNA helicase DDX6 regulates cell-fate specification in neural stem cells via miRNAs. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. 5, p. 2638–2654, 11 mar. 2015.

NONHOFF, U.; RALSER, M.; WELZEL, F.; PICCINI, I.; BALZEREIT, D.; YASPO, M.-L.; LEHRACH, H.; KROBITSCH, S. Ataxin-2 Interacts with the DEAD/H-Box RNA Helicase DDX6 and Interferes with P-Bodies and Stress Granules. **Molecular Biology of the Cell**, v. 18, n. 4, p. 1385–1396, abr. 2007.

ONO, M. *et al.* The expression and clinical significance of ribophorin II (RPN2) in human breast cancer. **Pathology International**, v. 65, n. 6, p. 301–308, jun. 2015.

OZEKI, K.; SUGIYAMA, M.; AKTER, K. A.; NISHIWAKI, K.; ASANO-INAMI, E.; SENGA, T. FAM98A is localized to stress granules and associates with multiple stress granule-localized proteins. **Molecular and Cellular Biochemistry**, 10 jul. 2018.

OZGUR, S.; BASQUIN, J.; KAMENSKA, A.; FILIPOWICZ, W.; STANDART, N.; CONTI, E. Structure of a Human 4E-T/DDX6/CNOT1 Complex Reveals the Different Interplay of DDX6-Binding Proteins with the CCR4-NOT Complex. **Cell reports**, v. 13, n. 4, p. 703–711, 27 out. 2015.

PAUSE, A.; BELSHAM, G. J.; GINGRAS, A. C.; DONZÉ, O.; LIN, T. A.; LAWRENCE, J. C.; SONENBERG, N. Insulin-dependent stimulation of protein synthesis by phosphorylation of a regulator of 5'-cap function. **Nature**, v. 371, n. 6500, p. 762–7, 27 out. 1994.

PENG, N.; LIU, S.; XIA, Z.; REN, S.; FENG, J.; JING, M.; GAO, X.; WIEMER, E. A. C.; ZHU, Y. Inducible Major Vault Protein Plays a Pivotal Role in Double-Stranded RNA- or Virus-Induced Proinflammatory Response. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 196, n. 6, p. 2753–66, 15 mar. 2016.

PETERSON, T. R.; LAPLANTE, M.; THOREEN, C. C.; SANCAK, Y.; KANG, S. A.;

- KUEHL, W. M.; GRAY, N. S.; SABATINI, D. M. DEPTOR is an mTOR inhibitor frequently overexpressed in multiple myeloma cells and required for their survival. **Cell**, v. 137, n. 5, p. 873–86, 29 maio 2009.
- PORRUA, O.; LIBRI, D. Transcription termination and the control of the transcriptome: why, where and how to stop. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 16, n. 3, p. 190–202, 4 mar. 2015.
- QIU, Z.; WEI, Y.; CHEN, N.; JIANG, M.; WU, J.; LIAO, K. DNA Synthesis and Mitotic Clonal Expansion Is Not a Required Step for 3T3-L1 Preadipocyte Differentiation into Adipocytes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 15, p. 11988–11995, 13 abr. 2001.
- RADHAKRISHNAN, A.; CHEN, Y.-H.; MARTIN, S.; ALHUSAINI, N.; GREEN, R.; COLLIER, J. The DEAD-Box Protein Dhh1p Couples mRNA Decay and Translation by Monitoring Codon Optimality. **Cell**, v. 167, n. 1, p. 122–132.e9, 22 set. 2016.
- REBELATTO, C. K. *et al.* Dissimilar differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, and adipose tissue. **Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.)**, v. 233, n. 7, p. 901–13, jul. 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. 1292–1298, 16 mar. 2004.
- REICHERT, M.; EICK, D. Analysis of cell cycle arrest in adipocyte differentiation. **Oncogene**, v. 18, n. 2, p. 459–466, 20 jan. 1999.
- REIJNS, M. A. M.; ALEXANDER, R. D.; SPILLER, M. P.; BEGGS, J. D. A role for Q/N-rich aggregation-prone regions in P-body localization. **Journal of cell science**, v. 121, n. Pt 15, p. 2463–72, 1 ago. 2008.
- REIMAND, U.; ARAK, T.; ADLER, P.; KOLBERG, L.; REISBERG, S.; PETERSON, H.; VILO, J. g:Profiler—a web server for functional interpretation of gene lists (2016 update). **Nucleic Acids Research**, 2016.
- RINGOLD, G. M.; CHAPMAN, A. B.; KNIGHT, D. M. Glucocorticoid control of developmentally regulated adipose genes. **Journal of steroid biochemistry**, v. 24, n. 1, p. 69–75, jan. 1986.
- ROBERT, A. W.; ANGULSKI, A. B. B.; SPANGENBERG, L.; SHIGUNOV, P.; PEREIRA, I. T.; BETTES, P. S. L.; NAYA, H.; CORREA, A.; DALLAGIOVANNA, B.; STIMAMIGLIO, M. A. Gene expression analysis of human adipose tissue-derived stem cells during the initial steps of in vitro osteogenesis. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 4739, 16 dez. 2018.
- ROBINSON, M. D.; MCCARTHY, D. J.; SMYTH, G. K. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. **Bioinformatics (Oxford, England)**, v. 26, n. 1, p. 139–40, 1 jan. 2010.
- ROSEN, E. D.; WALKER, C. J.; PUIGSERVER, P.; SPIEGELMAN, B. M. Transcriptional regulation of adipogenesis. **Genes & development**, v. 14, n. 11, p. 1293–307, 1 jun. 2000.
- SAINSBURY, S.; BERNECKY, C.; CRAMER, P. Structural basis of transcription initiation by RNA polymerase II. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 16, n. 3, p. 129–143, 18 mar. 2015.
- SAKAI, J. *et al.* Reactive Oxygen Species-Induced Actin Glutathionylation Controls Actin

Dynamics in Neutrophils. **Immunity**, v. 37, n. 6, p. 1037–1049, 14 dez. 2012.

SARRUF, D. A.; IANKOVA, I.; ABELLA, A.; ASSOU, S.; MIARD, S.; FAJAS, L. Cyclin D3 promotes adipogenesis through activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma. **Molecular and cellular biology**, v. 25, n. 22, p. 9985–95, nov. 2005.

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. 337–342, 18 maio 2011.

SEGRE, J. A.; BAUER, C.; FUCHS, E. Klf4 is a transcription factor required for establishing the barrier function of the skin. **Nature Genetics**, v. 22, n. 4, p. 356–400, 1 ago. 1999.

SHAO, D.; LAZAR, M. A. Peroxisome proliferator activated receptor gamma, CCAAT/enhancer-binding protein alpha, and cell cycle status regulate the commitment to adipocyte differentiation. **The Journal of biological chemistry**, v. 272, n. 34, p. 21473–8, 22 ago. 1997.

SHETH, U.; PARKER, R. Decapping and Decay of Messenger RNA Occur in Cytoplasmic Processing Bodies. **Science**, v. 300, n. 5620, p. 805–808, 2 maio 2003.

SLACK, J. M. W. What is a stem cell? **Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology**, v. 7, n. 5, p. e323, 15 set. 2018.

SLOAN, K. E.; GLEIZES, P.-E.; BOHNSACK, M. T. Nucleocytoplasmic Transport of RNAs and RNA-Protein Complexes. **Journal of molecular biology**, v. 428, n. 10 Pt A, p. 2040–59, 22 maio 2016.

SPANGENBERG, L. *et al.* Polysome profiling shows extensive posttranscriptional regulation during human adipocyte stem cell differentiation into adipocytes. **Stem Cell Research**, v. 11, n. 2, p. 902–912, 2013.

SPEESE, S. D. *et al.* Nuclear Envelope Budding Enables Large Ribonucleoprotein Particle Export during Synaptic Wnt Signaling. **Cell**, v. 149, n. 4, p. 832–846, 11 maio 2012.

SPITZ, F.; FURLONG, E. E. M. Transcription factors: from enhancer binding to developmental control. **Nature Reviews Genetics**, v. 13, n. 9, p. 613–626, 7 ago. 2012.

SRIKANTAN, S.; TOMINAGA, K.; GOROSPE, M. Functional interplay between RNA-binding protein HuR and microRNAs. **Current protein & peptide science**, v. 13, n. 4, p. 372–9, jun. 2012.

STANDART, N.; WEIL, D. P-Bodies: Cytosolic Droplets for Coordinated mRNA Storage. **Trends in Genetics**, v. 34, n. 8, p. 612–626, ago. 2018.

SWEET, T.; KOVALAK, C.; COLLIER, J. The DEAD-box protein Dhh1 promotes decapping by slowing ribosome movement. **PLoS biology**, v. 10, n. 6, p. e1001342, 12 jun. 2012.

SZKLARCZYK, D. *et al.* The STRING database in 2017: quality-controlled protein-protein association networks, made broadly accessible. **Nucleic acids research**, v. 45, n. D1, p. D362–D368, 2017.

TAKAHASHI, K.; TANABE, K.; OHNUKI, M.; NARITA, M.; ICHISAKA, T.; TOMODA, K.; YAMANAKA, S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. **Cell**, v. 131, n. 5, p. 861–872, 30 nov. 2007.

TAKAHASHI, K.; YAMANAKA, S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. **Cell**, v. 126, n. 4, p. 663–676, 25 ago. 2006.

- TANG, Q.-Q.; OTTO, T. C.; LANE, M. D. Mitotic clonal expansion: A synchronous process required for adipogenesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 1, p. 44–49, 7 jan. 2003.
- TANIGUCHI, K.; IWATSUKI, A.; SUGITO, N.; SHINOHARA, H.; KURANAGA, Y.; OSHIKAWA, Y.; TAJIRIKA, T.; FUTAMURA, M.; YOSHIDA, K.; UCHIYAMA, K.; AKAO, Y. Oncogene RNA helicase DDX6 promotes the process of c-Myc expression in gastric cancer cells. **Molecular Carcinogenesis**, 4 jan. 2018.
- TATSUMI, Y.; TAKANO, R.; ISLAM, M. S.; YOKOCHI, T.; ITAMI, M.; NAKAMURA, Y.; NAKAGAWARA, A. BMCC1, which is an interacting partner of BCL2, attenuates AKT activity, accompanied by apoptosis. **Cell Death & Disease**, v. 6, n. 1, p. e1607–e1607, 22 jan. 2015.
- TEIXEIRA, D.; SHETH, U.; VALENCIA-SANCHEZ, M. A.; BRENGUES, M.; PARKER, R. Processing bodies require RNA for assembly and contain nontranslating mRNAs. **RNA**, v. 11, n. 4, p. 371–382, 1 abr. 2005.
- 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 (New York, N.Y.)**, v. 282, n. 5391, p. 1145–7, 6 nov. 1998.
- TIAN, Q. *et al.* Integrated Genomic and Proteomic Analyses of Gene Expression in Mammalian Cells. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 3, n. 10, p. 960–969, out. 2004.
- TRAYHURN, P.; BEATTIE, J. H. Physiological role of adipose tissue: white adipose tissue as an endocrine and secretory organ. **The Proceedings of the Nutrition Society**, v. 60, n. 3, p. 329–39, ago. 2001.
- TUTUCCI, E.; VERA, M.; BISWAS, J.; GARCIA, J.; PARKER, R.; SINGER, R. H. An improved MS2 system for accurate reporting of the mRNA life cycle. **Nature methods**, v. 15, n. 1, p. 81–89, 13 jan. 2018.
- VARMA, M. J. O.; BREULS, R. G. M.; SCHOUTEN, T. E.; JURGENS, W. J. F. M.; BONTKES, H. J.; SCHUURHUIS, G. J.; HAM, S. M. VAN; MILLIGEN, F. J. VAN. Phenotypical and functional characterization of freshly isolated adipose tissue-derived stem cells. **Stem cells and development**, v. 16, n. 1, p. 91–104, fev. 2007.
- WANG, C. *et al.* Cyclin D1 repression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression and transactivation. **Molecular and cellular biology**, v. 23, n. 17, p. 6159–73, 1 set. 2003.
- WANG, W.; ZHANG, Y.; LU, W.; LIU, K. Mitochondrial reactive oxygen species regulate adipocyte differentiation of mesenchymal stem cells in hematopoietic stress induced by arabinosylcytosine. **PloS one**, v. 10, n. 3, p. e0120629, 2015.
- WANG, Y.; ARRIBAS-LAYTON, M.; CHEN, Y.; LYKKE-ANDERSEN, J.; SEN, G. L. DDX6 Orchestrates Mammalian Progenitor Function through the mRNA Degradation and Translation Pathways. **Molecular Cell**, v. 60, n. 1, p. 118–130, 1 out. 2015.
- WESTON, A.; SOMMERVILLE, J. Xp54 and related (DDX6-like) RNA helicases: roles in messenger RNP assembly, translation regulation and RNA degradation. **Nucleic Acids Research**, v. 34, n. 10, p. 3082–3094, 31 maio 2006.
- WILCZYNSKA, A.; AIGUEPERSE, C.; KRESS, M.; DAUTRY, F.; WEIL, D. The translational regulator CPEB1 provides a link between dcp1 bodies and stress granules. **Journal of Cell Science**, v. 118, n. 5, p. 981–992, 1 mar. 2005.

WU, S.; ROMFO, C. M.; NILSEN, T. W.; GREEN, M. R. Functional recognition of the 3' splice site AG by the splicing factor U2AF35. **Nature**, v. 402, n. 6763, p. 832–835, 16 dez. 1999.

WU, X.; BREWER, G. The regulation of mRNA stability in mammalian cells: 2.0. **Gene**, v. 500, n. 1, p. 10–21, 25 maio 2012.

YANG, Z.; JAKYMIW, A.; WOOD, M. R.; EYSTATHIOY, T.; RUBIN, R. L.; FRITZLER, M. J.; CHAN, E. K. L. GW182 is critical for the stability of GW bodies expressed during the cell cycle and cell proliferation. **Journal of Cell Science**, v. 117, n. 23, p. 5567–5578, 1 nov. 2004.

YE, X.; LIAO, C.; LIU, G.; XU, Y.; TAN, J.; SONG, Z. Age-Related Changes in the Regenerative Potential of Adipose-Derived Stem Cells Isolated from the Prominent Fat Pads in Human Lower Eyelids. **PloS one**, v. 11, n. 11, p. e0166590, 2016.

YOSHIDA, K. *et al.* Frequent pathway mutations of splicing machinery in myelodysplasia. **Nature**, v. 478, n. 7367, p. 64–69, 11 out. 2011.

ZHANG, G.; HUBALEWSKA, M.; IGNATOVA, Z. Transient ribosomal attenuation coordinates protein synthesis and co-translational folding. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 16, n. 3, p. 274–280, 8 mar. 2009.

ZHANG, H.-R.; CHEN, J.-M.; ZENG, Z.-Y.; QUE, W.-Z. Knockdown of DEPTOR inhibits cell proliferation and increases chemosensitivity to melphalan in human multiple myeloma RPMI-8226 cells via inhibiting PI3K/AKT activity. **Journal of International Medical Research**, v. 41, n. 3, p. 584–595, 15 jun. 2013.

ZHANG, H.; CHEN, J.; ZENG, Z.; QUE, W.; ZHOU, L. Knockdown of DEPTOR induces apoptosis, increases chemosensitivity to doxorubicin and suppresses autophagy in RPMI-8226 human multiple myeloma cells in vitro. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 31, n. 5, p. 1127–1134, maio 2013.

ZHAO, Y.; XIONG, X.; SUN, Y. DEPTOR, an mTOR inhibitor, is a physiological substrate of SCF(β TrCP) E3 ubiquitin ligase and regulates survival and autophagy. **Molecular cell**, v. 44, n. 2, p. 304–16, 21 out. 2011.

ZHOU, T.; WU, L.; WANG, Q.; JIANG, Z.; LI, Y.; MA, N.; CHEN, W.; HOU, Z.; GAN, W.; CHEN, S. MicroRNA-128 targeting RPN2 inhibits cell proliferation and migration through the Akt-p53-cyclin pathway in colorectal cancer cells. **Oncology Letters**, v. 16, n. 6, p. 6940–6949, 26 set. 2018.

ZMIJEWSKI, J. W.; BANERJEE, S.; ABRAHAM, E. S -Glutathionylation of the Rpn2 Regulatory Subunit Inhibits 26 S Proteasomal Function. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 33, p. 22213–22221, 14 ago. 2009.

ZUK, P. A.; ZHU, M.; ASHJIAN, P.; UGARTE, D. A. DE; 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, dez. 2002.

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, p. 211–28, abr. 2001.

ANEXO I

MANUSCRITO

Total and polysomal RNA-Seq of human adipose-derived stem cells undergoing early adipogenesis and osteogenesis

Bruna H. Marcon^{1#}, Lucia Spangenberg^{2#}, Bernardo Bonilauri¹, Anny Waloski Robert¹, Addeli Bez Batti Angulski¹, Guillermo Cabrera Cabo², Axel R. Cofré¹, Bruno Dallagiovanna^{1*}, Patrícia Shigunov^{1*}

¹Laboratory of Basic Biology of Stem Cells (LABCET), Instituto Carlos Chagas - FIOCRUZ-PR, Curitiba, Paraná, 81830-010, Brazil

²Unidad de Bioinformática, Institut Pasteur Montevideo. Mataojo 2020, Montevideo, 11400, Uruguay.

#Authors contributed equally to this work.

*To whom correspondence should be addressed at: Laboratory of Basic Biology of Stem Cells (LABCET), Instituto Carlos Chagas - FIOCRUZ-PR, Curitiba, Paraná, Rua Prof. Algacyr Munhoz Mader, 3775, CIC, 81830-010, Brazil.

Tel: +55 41 21043231

Email: bruno.dallagiovanna@fiocruz.br, patricia.shigunov@fiocruz.br

ABSTRACT

In the adult organism, the adipogenic and osteogenic stem cell differentiation processes are essential for the maintenance of tissue homeostasis, and an imbalance between these pathways is related to diverse diseases. To identify and determine the regulation of genes involved in triggering the differentiation process, we treated human adipose-derived stem cells (hASCs) with control, adipogenic and osteogenic induction media for 24 h and then sequenced the different RNA fractions (total, ribosome-free, monosomal and polysomal). In our previous study, we published data showing differentially expressed genes during early adipogenesis and osteogenesis and explored the transcriptional and post-transcriptional mechanisms involved in these processes, demonstrating the potential of the dataset obtained in this study. Herein, we demonstrate the experimental design, detailed methodology and data validation. Analyses of the dynamics and enrichment of transcripts in different RNA fractions provides an important resource for understanding the molecular mechanisms involved in the onset of adipogenic and osteogenic differentiation. It also establishes a background for future characterization of the transcriptional and post-transcriptional regulation of different cell types.

BACKGROUND

Human adipose-derived stem cells (hASCs) were first described by Zuk et al. as multipotent stem cells derived from mesodermal origin that can be isolated from tissue that is typically discarded after liposuction surgery ^{1,2}. The protocol for hASC isolation is considered simple and efficient; the tissue is enzymatically digested, centrifuged and incubated with hemolytic buffer, and hASCs are selected based on their ability to adhere to plastic ^{1,3,4}. Moreover, liposuction surgery is considered a well-tolerated and safe procedure, which are

important features for future applications in medicine 3. Adipocytes and osteocytes are among the phenotypes obtained from hASCs 2. Studies have demonstrated the factors and pathways that stimulate osteogenesis inhibit adipogenesis. Conversely, adipogenic induction leads to osteogenic inhibition 5,6. In an organism, the imbalance between adipogenesis and osteogenesis in the bone marrow leads to different diseases, highlighting the importance of understanding the mechanisms involved in these differentiation pathways 7.

We previously analyzed the gene expression of hASCs undergoing adipogenesis induction for 72 h by polysome and ribosome profiling 8,9, 72 h is considered the minimum induction period for commitment to adipogenesis 9. Both approaches have shown that post-transcriptional mechanisms have an important role during early adipogenesis. Furthermore, using a methionine incorporation assay, we also demonstrated that adipogenic-induced hASCs had reduced translational activity when compared to non-induced cells, a difference that could be observed as early as after 12 h of treatment 8.

To further understand the initial steps involved in triggering the differentiation process, we used RNA-Seq to analyze gene expression in hASCs during the first 24 h of adipogenesis and osteogenesis. To evaluate the transcriptional and post-transcriptional regulation involved in these processes, we utilized total RNA-Seq and polysome profiling methodology 10 (and Marcon et al, under revision). Using sucrose density gradient and ultracentrifugation, cell lysates can be separated into fractions containing ribosome-free, monosome-associated and polysome-associated RNAs according to the sedimentation rates of these structures. The absorbance of RNA (254 nm) along the gradient is recorded and yields a profile that identifies peaks corresponding to fractions enriched in the 40S, 60S and 80S subunits and polysomes that contain more than one ribosomal unit 9,11. Variations in the protein synthesis activity of the cell lead to changes in the polysome profile, with mRNAs shifting among fractions according to their translational status and transcript features 12,13. Analysis of the mRNAs associated with different regions of the polysomal gradient may show the dynamics of gene expression regulation under different cell conditions.

Notably, our analysis of total, monosome- and polysome-bound RNA from hASCs undergoing adipogenesis induction for 24 h revealed a strong downregulation of genes related to the cell cycle and proliferation that was mainly related to the regulation of mRNA abundance (Marcon et al., under revision). Moreover, in the first 24 h of adipogenic treatment in hASCs, an upregulation of genes related to the differentiation process was already observable (Marcon et al., under revision). Unlike adipogenesis, our data showed that after 24 h of only osteogenic induction, a minor change in gene regulation related to osteogenesis occurred. In this early step, gene regulation was related to the maintenance of cell processes, such as proliferation and adhesion, that are necessary at 21 days of induction for osteogenic commitment 10. Detailed data regarding the accomplishments of this study, including the process workflow, methodology applied, data obtained and technical validation, are shown (Figure 1). This information may be useful for future studies on triggering hASC differentiation processes and provide a foundation for new analyses of gene regulation in different cells and processes.

METHODS

Isolation, characterization, culture and differentiation of human hASC.

hASCs were isolated from adipose tissue obtained from three healthy female donors (27, 32 and 44 years old) that underwent liposuction surgery. This study was performed in accordance with the guidelines for research involving human subjects and with approval from the Ethics Committee of Fundação Oswaldo Cruz, Brazil (CAAE: 48374715.8.0000.5248). hASCs were

isolated, characterized and cultivated as previously described 10. These methods are expanded versions of descriptions in our related work¹⁰. First, 200 mL of adipose tissue was washed with 1 L of sterile phosphate-buffered saline (PBS) (Gibco Invitrogen®, Carlsbad, CA, USA) and digested with 0.4 mg/mL collagenase type I (Gibco Invitrogen®, Carlsbad, CA, USA) diluted in PBS for 30 min at 37 °C and 5% CO₂ under constant shaking. After the incubation period, the shaking was halted, and the cell suspension was allowed to stand for 5 minutes to separate the lipid-enriched phase (upper). The bottom phase was collected and filtered through a 100- μ m mesh filter (BD Bioscience). The cell suspension obtained was centrifuged (10 min, 950 x g, 8°C), and the supernatant was discarded. The cell pellet was resuspended and treated with hemolysis buffer (0.83% ammonium chloride, 0.1% sodium bicarbonate and 0.004% EDTA) for 10 min to remove erythrocytes. After centrifugation (150 x g, 10 min, 8°C), the supernatant was discarded, and the cell pellet was resuspended in PBS and filtered through a 40- μ m mesh filter (BD Bioscience). After centrifugation (350 x g, 10 min, 8°C), the supernatant was discarded, and the cells were plated at a density of 1 \times 10⁵ cells/cm² in T75 culture flasks in DMEM supplemented with 10 % fetal bovine serum (FBS), penicillin (100 units/ml) and streptomycin (100 μ g/ml). The flasks were incubated in a humidified incubator at 37 °C and 5 % CO₂. The culture medium was changed twice a week until the hASC cultures were 80-90% confluent, at which point the cells were trypsinized and expanded. All tests were performed with cell passaged 4 to 6 times.

Cell characterization was performed according to the minimal criteria for defining mesenchymal stem cells as established by the International Society for Cellular Therapy. First, cells were detached using trypsin-EDTA and incubated in blocking solution (1% bovine serum albumin (BSA) diluted in PBS) at 4 °C for one hour. The cells were then incubated for one more hour at 4°C in the dark with the following antibodies (diluted in blocking solution): FITC-conjugated anti-human CD90 (Thy1), CD34, CD31 and CD19; APC-conjugated anti-human CD73; and PE-conjugated anti-human CD45, HLA-DR, CD117 and CD11b. Mouse IgG antibodies (FITC, APC, PE) were used as negative controls. After incubation, the cells were washed once with PBS, and the data were acquired on a FACSCanto II instrument (Becton Dickinson). For each sample, at least 10,000 events were collected and analyzed with FlowJo® v.10 software (Flowjo, LLC).

For adipogenic and osteogenic differentiation, hASCs were treated with hMSC Adipogenic Differentiation Medium (hMSC Adipogenic BulletKit, Lonza) or hMSC Osteogenic Differentiation Medium (hMSC Osteogenic BulletKit, Lonza), respectively, according to the manufacturer's instructions. Adipogenic differentiation was induced by cycles of treatment for 3 days with induction medium and 3-4 days of maintenance over a total of 28 days. The induction medium consisted of basal medium plus the adipogenic inducers indomethacin, insulin, dexamethasone and IBMX. Osteogenic differentiation was induced with medium containing β -glycerophosphate, ascorbic acid and dexamethasone over 21 days. The medium was replaced every 3–4 days. The efficiencies of adipogenic and osteogenic differentiation were determined by assessing the cytoplasmic accumulation of triglycerides with AdipoRed™ Assay Reagent (Lonza) or the mineralized extracellular matrix using the OsteoImage™ Mineralization Assay (Lonza), respectively.

Sucrose density gradient separation and RNA purification.

Polysomal fractions were prepared as previously described 10. These methods are expanded versions of descriptions in our related work¹⁰. First, hASC cultures at 60-70% of confluence were either induced to osteogenic (OST) or adipogenic (ADI) differentiation or kept in maintenance medium (CT - control) for 24 h. The cells were then treated with 0.1 mg/ml cycloheximide (Sigma Aldrich - St. Louis, MO, EUA) diluted in culture medium for 10 min at

37 °C. Cells were detached with trypsin and then centrifuged (700 x g, 5 min, 8 °C), and the resulting cell pellets were washed twice in 0.1 mg/ml cycloheximide diluted in PBS. After centrifugation (700 x g, 5 min, 8 °C), the cell pellet was resuspended in lysis buffer (15 mM Tris HCl (pH 7.4), 15 mM MgCl₂, 300 mM NaCl, 100 µg/mL cycloheximide, 1% Triton X-100) and incubated for 10 min on ice. The cell lysates were centrifuged (12000 × g, 10 min, 4 °C), and the supernatants were carefully isolated and loaded onto 10 to 50 % sucrose gradients (BioComp Model 108 Gradient Master ver. 5.3). Gradients were subjected to ultracentrifugation (150000 × g, SW40 rotor, HIMAC CP80WX HITACHI, 160 min, 4 °C) and then fractionated with the ISCO gradient fractionation system (ISCO Model 160 Gradient Former Foxy Jr. Fraction Collector) connected to a UV detector to monitor absorbance at 254 nm. The polysome profile was recorded.

The ribosome-free, monosome-associated and polysome-associated RNA fractions as well as the total RNA were extracted using the Direct-zol™ RNA MiniPrep kit (Zymo Research) according to the manufacturer's instructions.

cDNA library construction

In total, 1 µg of RNA from three independent biological sample replicates of each condition (ribosome-free, monosome-associated, polysome-associated and total RNA) was used for cDNA library construction and RNA-Seq (Table 1). The cDNA libraries were prepared with the TruSeq Stranded Total RNA Sample Preparation kit (Illumina, Inc.) following the manufacturer's instructions. The library size was verified using the Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent), and the library concentration was confirmed by qPCR using the Illumina Library Quantification Kit Universal qPCR mix (Kapa Biosystems).

Large-scale sequencing

The samples were prepared for sequencing on the Illumina Platform using the TruSeq Stranded Total RNA LT Kit. For clustering and sequencing, the TruSeq SR Cluster Kit v3 - cBot – HS and TruSeq SBS Kit v3 - HS (100-cycles) were used. Samples were sequenced on the Illumina HiSeq 2500 System. The raw data were deposited in ArrayExpress under the number E-MTAB-6298.

Bioinformatic analyses

Sequence data were mapped and counted by comparison against the latest version of the GRCh38 human genome with the Rsubread package. The mapping of reads was done with default parameters (unique mapping of reads), and counting was performed using the Ensembl annotation (GRCh38).

For quality evaluation purposes, we performed multidimensional analysis (MDS; multidimensional scaling), a method involving dimension reduction of the count matrix, to explore associations between variables. The log-2 transformation values of the raw counts were used for this analysis, and rows with no information were eliminated (0 counts in all samples). Samples of the same condition should cluster together to ensure consistency and replicability of the results.

For comparisons of gene expression between samples, RPKM values (reads per kilobase per million mapped reads) were determined. Differential expression analysis was performed using the Bioconductor R package edgeR 14. Different comparisons were considered for adipogenesis and osteogenesis. For each RNA fraction (polysomal, monosomal, total and ribosome-free RNA), the induced condition (ADI or OST) versus the stem cell state (CT - control) was analyzed. This analysis included genes with at least one count per million in at least three samples. After a normalization procedure using three recommended methods

(estimateGLMCommonDisp, estimateGLMTrendedDisp, estimateGLMTagwiseDisp), differential expression analyses of all comparisons were performed using the generalized linear mixed model (glmFit and glmLRT). Correction for multiple testing was performed with the FDR (false discovery rate). The results from some of these analyses with the parameters mentioned above are shown in Robert et al., 2018¹⁰, Marcon et al., 2018 (under revision).

Quantitative RT-PCR

Total RNA was extracted using the RNeasy Kit (Qiagen), and polysomal RNA was extracted with the Direct-zol™ RNA Kit (Zymo Research) according to the manufacturer's instructions. For complementary DNA (cDNA) synthesis, oligo-dT primers and the IMPROM II Reverse Transcriptase Kit (Promega) were used according to the manufacturer's instructions. qRT-PCR was performed by using a SYBR green PCR premixture (Applied Biosystems - Foster City, CA, EUA). Normalization was performed using the internal control GAPDH (glyceraldehyde phosphate dehydrogenase), and all reactions were performed in technical triplicate. The primers used for quantitative RT-PCR are listed in Table 2.

DATA RECORDS

Raw RNA-Seq data as generated by Illumina HiSeq 2500 can be downloaded at the ArrayExpress repository (<https://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/>) under the ID E-MTAB-6298. This site serves as a landing page for this study and includes a description of the project, metadata and raw sequencing files (data citation 1: <https://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/experiments/E-MTAB-6298/> [2018]). LogFC values of each comparison, ADI vs. CT and OST vs. CT, for each RNA fraction are stored in a previously published supplementary file 10 (Marcon 2018 under revision). Each tab corresponds to one RNA fraction (polysomal, monosomal, total and free), and the following values are reported: Ensembl Gene ID, logFC value, logCPM (log value of counts per million), P-value, FDR (false discovery rate), gene alias and biotype. In addition, for each gene, the raw counts in each sample, RPKM values and a description are provided.

TECHNICAL VALIDATION

Polysome profiling analysis

The polysome profiles of hASCs from 3 donors treated with control, adipogenic or osteogenic induction media for 24 h obtained by sucrose density gradient fractionation are represented in Figure 2. Using this approach, fractions corresponding to ribosome-free, monosome-associated and polysome-associated RNAs could be separated for posterior RNA purification. Notably, hASCs have a poor polysome profile as previously described⁹.

RNA quality control

Samples of isolated RNA were analyzed for the quality and concentration of RNA to determine their suitability for RNA-sequencing using the Agilent RNA 6000 Nano Kit and Agilent 2100 Bioanalyzer instrument. In figure 3A, the RNA quality is demonstrated based on the presence of 18S and 28S ribosomal RNA except for in the ribosome-free RNA samples (samples 1, 5 and 9). This result is also shown in Figure 3B with examples of electropherograms showing that the RNA separation processes in the ribosome-free, monosome and polysome fractions were efficient. All samples were prepared for sequencing according to the TruSeq Stranded Total RNA manufacturer's manual. For the fragmentation step, the time of incubation was

adjusted according to the RNA integrity number (RIN), allowing the preparation of partially degraded samples, as was the case for samples 4 and 7 from donor TL02 (Figure 3A).

Sequencing accuracy

High-quality sequencing data were obtained as shown in figure 3C (1, 2, 3, 4), which shows an example sample from all RNA fractions. The quality distribution per read position is shown, revealing that most positions were of high quality along the entire read (more than half of the reads lengths had quality values higher than 35, and almost all the read lengths had quality values above 29). This was true for all samples. Table 3 shows the number of reads obtained in each run (an average of ~19.800.000 reads) and the numbers and percentages of mapped reads (average was roughly 82%).

Reproducibility of biological samples

MDS plots were determined to assess the reproducibility of our results. For each differentiation (adipogenesis/osteogenesis) and each RNA fraction, one MDS plot was performed. In addition, pairs of RNA fractions were visualized together, e.g., polysomal and total RNA fractions for adipogenic (Figure 3D) and osteogenic (Figure 3E) differentiation. Four homogenous sample groups were observed: stem cell total RNA (orange), stem cell polysomal fraction (blue), induced total RNA (green) and induced polysomal fraction (red).

Quantitative reverse transcription PCR (qRT-PCR)

Validation of RNA-Seq was performed by quantitative RT-PCR. We selected a total of 6 differentially expressed genes in the polysomal fraction of adipogenic and osteogenic differentiation (24 h) (Figure 4). Expression values were normalized to fold changes for comparison. Although these two techniques are normally not comparable due to the utilization of different procedures, a high correlation was detected in our analysis. The similarities in the expression levels of these genes show that our RNA-Seq data were consistent.

Validation by comparison with published studies

Several studies have investigated the gene expression profiles of mesenchymal stem cells induced to undergo adipogenesis and osteogenesis from diverse sources at different timepoints. Many of these studies evaluated processes via microarray analysis or total mRNA sequencing 15–19. Bionaz et al. used mesenchymal stem cells from porcine bone marrow and adipose tissue to profile gene expression during adipogenesis and osteogenesis at 4 timepoints: 0, 2, 7 and 21 days. Considering that their analysis was performed on day 2 of differentiation, they observed that osteogenesis showed more upregulated genes, while initial adipogenesis exhibited a higher number of downregulated genes 15. Similarly, Jaeger et al. found that 70% of DEGs were downregulated upon the adipogenic differentiation of hASCs. When osteogenesis was induced, only 43% of DEGs were downregulated 16. Initial analysis of our data comparing total vs. polysomal-associated mRNAs after 24 h of osteogenic induction demonstrated that most of the DEGs (CT vs. OST) were regulated at the post-transcriptional level, and most of these mRNAs were upregulated 10. Conversely, when we analyzed data from adipogenesis induction, approximately 60% of the DEGs were downregulated in both the total and polysome-bound RNA samples (Marcon et al., under revision).

The transcriptome of hASCs after 1, 7, 14 and 21 days of adipogenic induction was also analyzed by Ambele et al. in 2016 using a microarray. After applying a stringent criteria of fold change (≥ 4 or ≤ -4 with p -value <0.05 and FDR <0.5), 128 DEGs were identified in the first 24 h of adipogenesis 19. A comparison of published data showed that the DEGs found by Ambele et al. that were also identified in our total and polysomal RNA-Seq fractions were similarly regulated (up or down) in both experiments (Supplementary file 1).

USAGE NOTES

RNA-Seq analyses have been used to study differentially expressed genes for the identification of regulatory gene networks. hASCs have the ability to differentiate into different phenotypes, such as adipocytes and osteoblasts, which were evaluated in this study. Cells were isolated from the adipose tissues of Brazilian donors, and these results could be used for other cross-sectional studies. This work studied different cell populations of mRNAs, including ribosome-free, monosome-associated and polysome-associated mRNAs. Comparisons of data from these fractions uncovered information regarding the dynamics of transcription during the early stages of adipogenesis and osteogenesis, and these findings may be used for subsequent studies on the mechanisms underlying the transition between stemness maintenance and initiation of the differentiation process.

ADDITIONAL INFORMATION

Ethical Approval and Consent to participate

This study was performed in accordance with the guidelines for research involving human subjects and was approved by the Ethics Committee of Fundação Oswaldo Cruz, Brazil (CAAE: 48374715.8.0000.5248).

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

The authors report no potential conflicts of interest or financial interests regarding this research.

Funding

This work was supported by FIOCRUZ.

Acknowledgments

The authors thank the Program for Technological Development in Tools for Health-PDTIS FIOCRUZ for allowing them to use their facilities. We thank Wagner Nagib de Souza Birbeire for the graphic design help.

Authors' contributions

A L.S. and B.H.M. contributed equally to this work, as they conceived, designed, and performed the experiments, analyzed the data, and drafted the paper; L.S. and G.C.C. analyzed the raw data, assisted in data interpretation and drafted the paper; B.B., AWR, ABBA, ARC and P.S. performed the experiments and analyzed the data; B.D. and P.S., conceived the experimental setup, contributed to data analysis and drafted the manuscript. All authors reviewed the manuscript.

REFERENCES

1. Zuk, P. A. et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng.* 7, 211–28 (2001).
2. Zuk, P. A. et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol. Biol. Cell* 13, 4279–95 (2002).

3. Baer, P. C. & Geiger, H. Adipose-Derived Mesenchymal Stromal/Stem Cells: Tissue Localization, Characterization, and Heterogeneity. *Stem Cells Int.* 2012, 1–11 (2012).
4. Rebelatto, C. K. et al. Dissimilar differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, and adipose tissue. *Exp. Biol. Med.* (Maywood). 233, 901–13 (2008).
5. Beresford, J. N., Bennett, J. H., Devlin, C., Leboy, P. S. & Owen, M. E. Evidence for an inverse relationship between the differentiation of adipocytic and osteogenic cells in rat marrow stromal cell cultures. *J. Cell Sci.* 102 (Pt 2), 341–51 (1992).
6. James, A. W. et al. Sonic Hedgehog influences the balance of osteogenesis and adipogenesis in mouse adipose-derived stromal cells. *Tissue Eng. Part A* 16, 2605–16 (2010).
7. Chen, Q. et al. Fate decision of mesenchymal stem cells: adipocytes or osteoblasts? *Cell Death Differ.* 23, 1128–39 (2016).
8. Marcon, B. H. et al. Downregulation of the protein synthesis machinery is a major regulatory event during early adipogenic differentiation of human adipose-derived stromal cells. *Stem Cell Res.* 25, 191–201 (2017).
9. Spangenberg, L. et al. Polysome profiling shows extensive posttranscriptional regulation during human adipocyte stem cell differentiation into adipocytes. *Stem Cell Res.* 11, 902–912 (2013).
10. Robert, A. W. et al. Gene expression analysis of human adipose tissue-derived stem cells during the initial steps of in vitro osteogenesis. *Sci. Rep.* 8, 4739 (2018).
11. Chassé, H., Boulben, S., Costache, V., Cormier, P. & Morales, J. Analysis of translation using polysome profiling. *Nucleic Acids Res.* 45, e15 (2017).
12. Courtes, F. C. et al. Understanding translational control mechanisms of the mTOR pathway in CHO cells by polysome profiling. *N. Biotechnol.* 31, 514–523 (2014).
13. Heyer, E. E. & Moore, M. J. Redefining the Translational Status of 80S Monosomes. *Cell* 164, 757–769 (2016).
14. Robinson, M. D., McCarthy, D. J. & Smyth, G. K. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* 26, 139–40 (2010).
15. Bionaz, M., Monaco, E. & Wheeler, M. B. Transcription Adaptation during In Vitro Adipogenesis and Osteogenesis of Porcine Mesenchymal Stem Cells: Dynamics of Pathways, Biological Processes, Up-Stream Regulators, and Gene Networks. *PLoS One* 10, e0137644 (2015).
16. Jääger, K., Islam, S., Zajac, P., Linnarsson, S. & Neuman, T. RNA-Seq Analysis Reveals Different Dynamics of Differentiation of Human Dermis- and Adipose-Derived Stromal Stem Cells. *PLoS One* 7, e38833 (2012).
17. Menssen, A. et al. Differential gene expression profiling of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells during adipogenic development. *BMC Genomics* 12, 461 (2011).

18. Scheideler, M. et al. Comparative transcriptomics of human multipotent stem cells during adipogenesis and osteoblastogenesis. *BMC Genomics* 9, 340 (2008).
19. Ambele, M. A., Dessels, C., Durandt, C. & Pepper, M. S. Genome-wide analysis of gene expression during adipogenesis in human adipose-derived stromal cells reveals novel patterns of gene expression during adipocyte differentiation. *Stem Cell Res.* 16, 725–734 (2016).

DATA CITATIONS

Data citations 1: ArrayExpress repository, ID E-MTAB-6298.

FIGURES AND TABLES

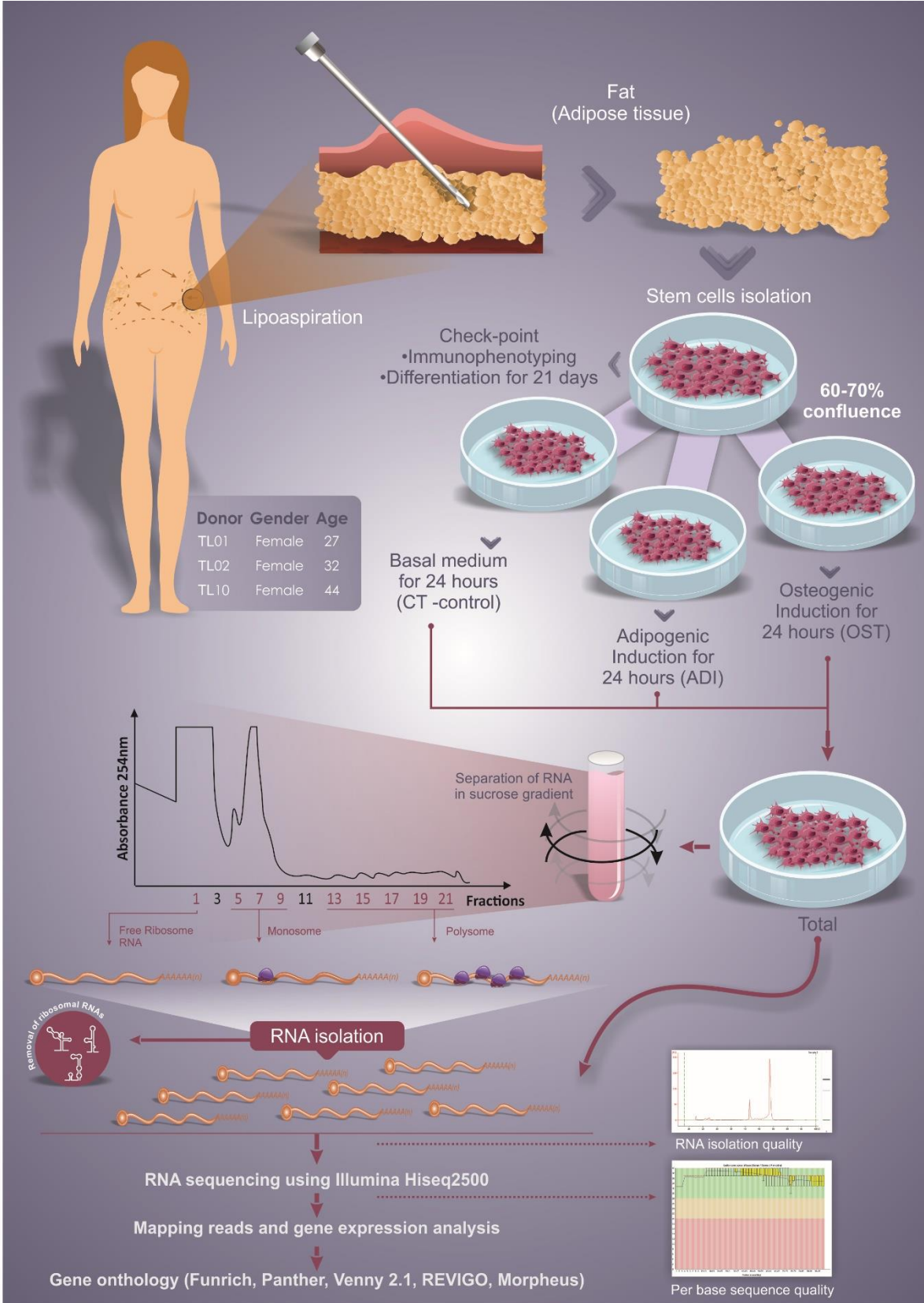


Figure 1. Study design workflow for hASC isolation and collection for RNA-Seq analysis of total, ribosome-free, monosome-associated and polysome-associated RNAs.

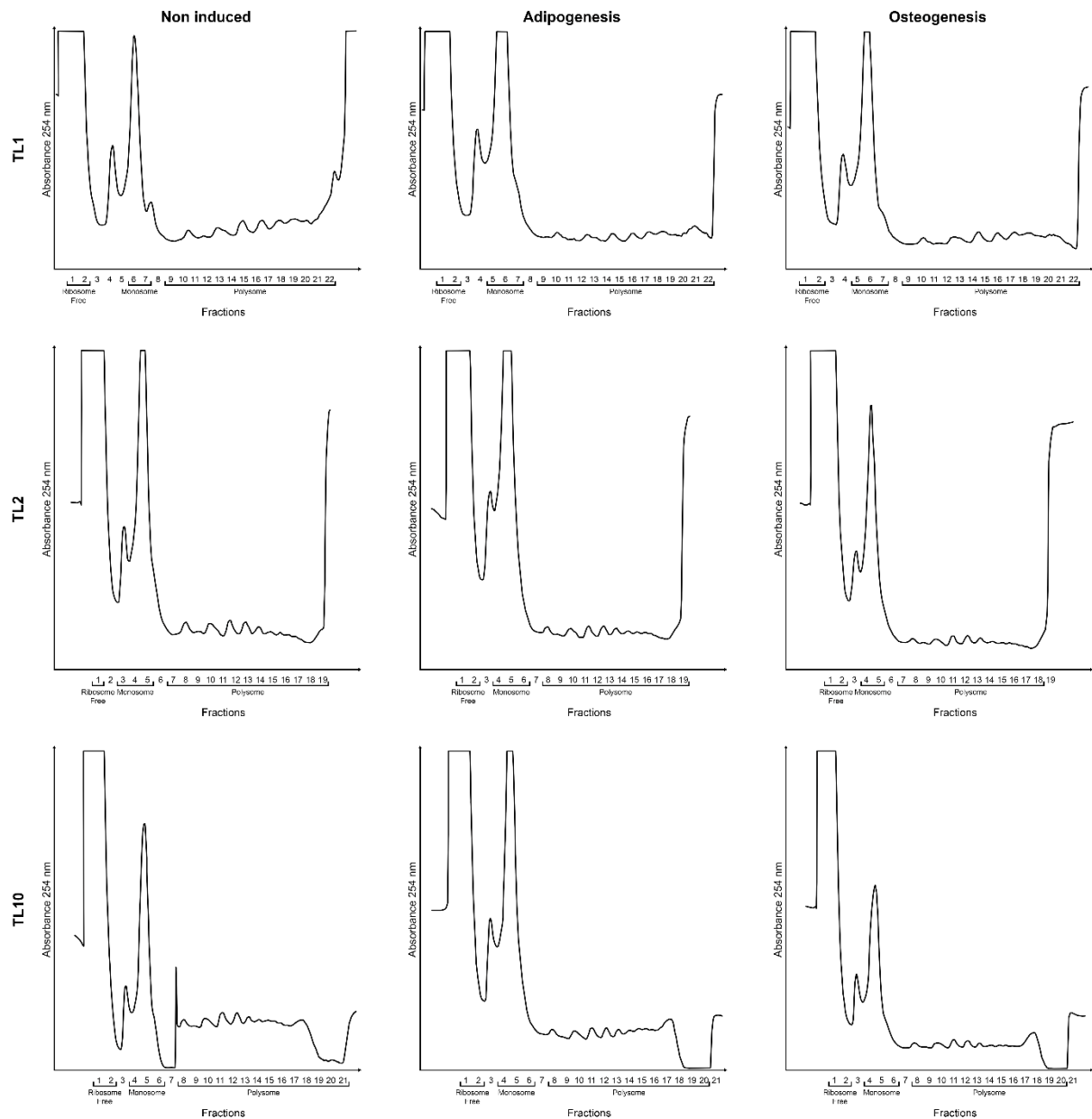


Figure 2. Polysome profile obtained by sucrose gradient density fractionation. These are the full version with all polysome profiling graphics described in our related works (Robert *et al.*, 2018) (Marcon, 2018 – under review). hASCs isolated from 3 donors were treated with control (CT), adipogenic (ADI) and osteogenic (OST) induction media for 24 h and then submitted to sucrose gradient density fractionation. The polysome profile of each sample was recorded (absorbance at 254 nm).

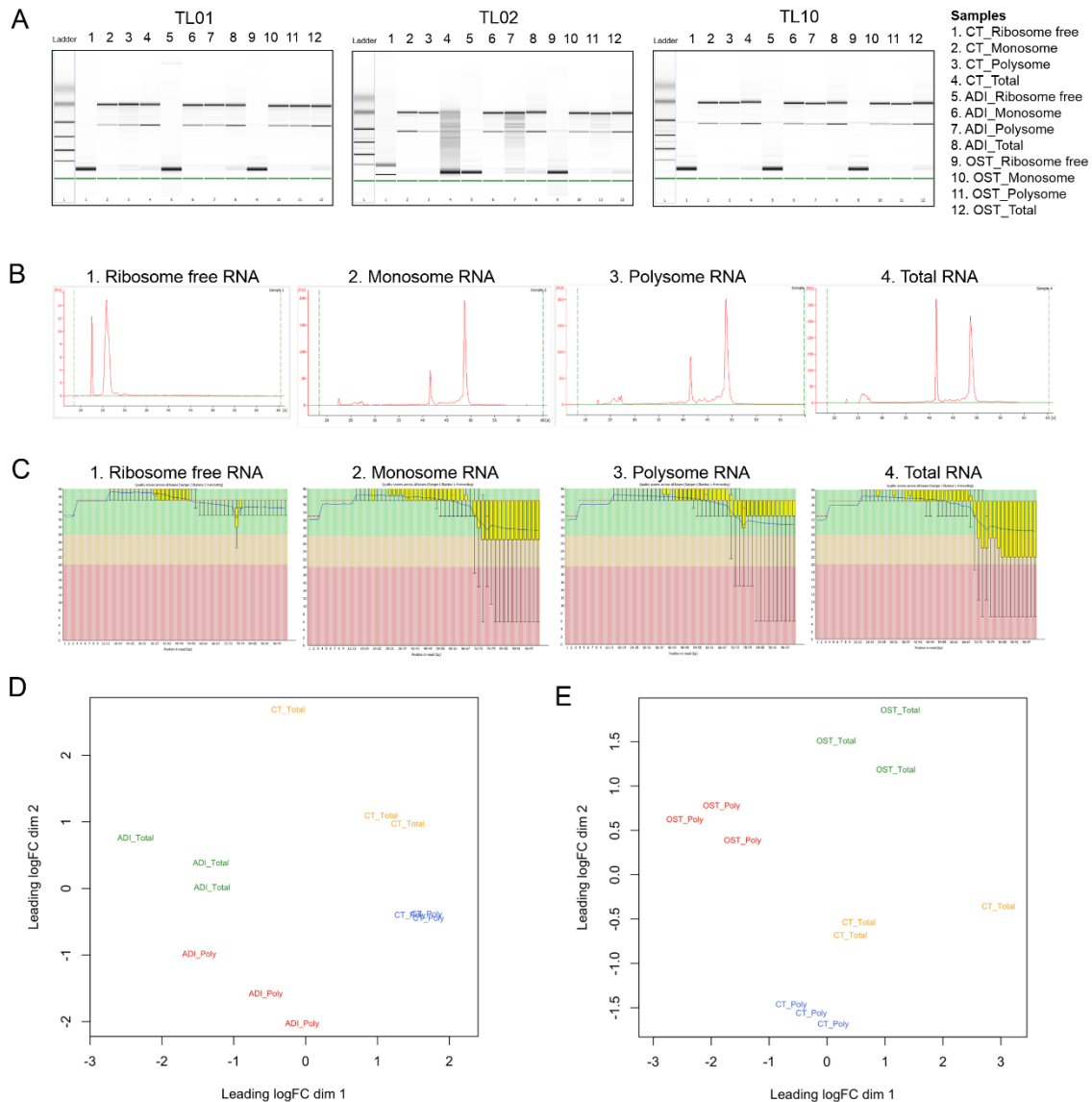


Figure 3. RNA isolation quality results and per base sequence quality of RNA-sequencing reads. (A) RNA quality of ribosome-free, monosome, polysome and total RNA from hASCs determined using the RNA 6000 Nano Chip. (B) Examples of electropherograms of ribosome-free, monosomal, polysomal and total RNA from hASCs as determined using the RNA 6000 Nano Chip. (C) Examples of per base sequence quality scores for ribosome-free, monosomal, polysomal and total RNA samples sequenced by FastQC (version 0.11.3). (D-E) MDS plot of polysomal and total RNA fractions for adipogenic (D) and osteogenic (E) differentiation. CT: control, hASCs treated with maintenance medium for 24 h; ADI: hASCs treated with adipogenic medium for 24 h; OST: hASCs treated with osteogenic medium for 24 h.

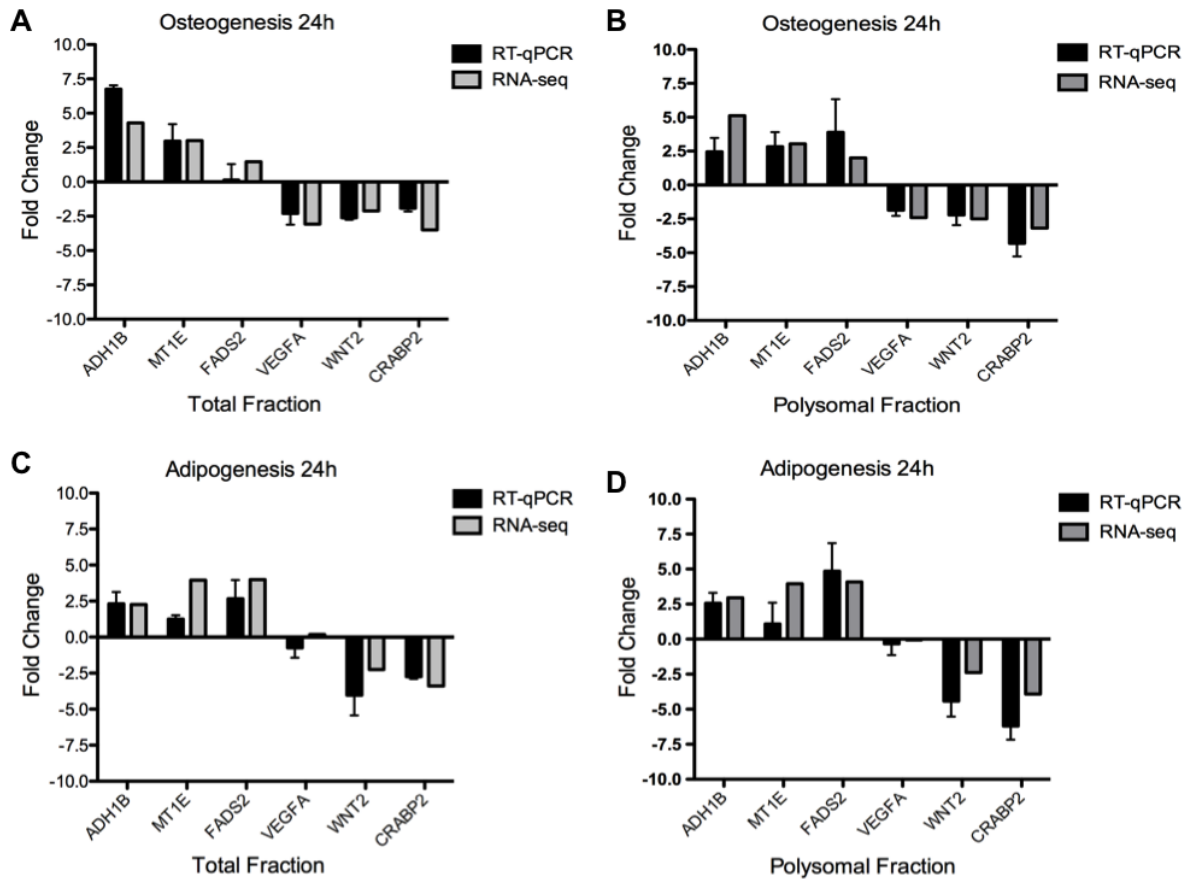


Figure 4. RT-qPCR validation of 6 differentially expressed genes. (A-B) Fold change differences in expression after osteogenic differentiation in total and polysomal fractions using RT-qPCR and RNA-Seq. (C-D) Fold change differences in expression after adipogenic differentiation in total and polysomal fraction using RT-qPCR and RNA-Seq. Fold change differences were calculated using log₂ base values. RT-qPCR analysis of the total fraction was performed in technical and biological triplicate. RT-qPCR analysis of the polysomal fraction was performed in technical triplicate and biological duplicate. RNA-Seq analysis was performed in biological triplicate.

Sample	Organism	Organism Part	Cell Type	Material Type	Fraction	Differentiation induction	Donor
TL01_ADI_Free	Homo sapiens	adipose tissue	ASC	RNA	Free	Adipogenesis	TL01
TL01_ADI_Mono	Homo sapiens	adipose tissue	ASC	RNA	Monosome	Adipogenesis	TL01
TL01_ADI_Poly	Homo sapiens	adipose tissue	ASC	RNA	Polysome	Adipogenesis	TL01
TL01_ADI_Total	Homo sapiens	adipose tissue	ASC	RNA	Total	Adipogenesis	TL01
TL01_CT_Free	Homo sapiens	adipose tissue	ASC	RNA	Free	Control - Non-differentiated	TL01
TL01_CT_Mono	Homo sapiens	adipose tissue	ASC	RNA	Monosome	Control - Non-differentiated	TL01
TL01_CT_Poly	Homo sapiens	adipose tissue	ASC	RNA	Polysome	Control - Non-differentiated	TL01

TL01_CT_Total	Homo sapiens	adipose tissue	ASC	RNA	Total	Control - Non-differentiated	TL01
TL01_OST_Free	Homo sapiens	adipose tissue	ASC	RNA	Free	Osteogenesis	TL01
TL01_OST_Mono	Homo sapiens	adipose tissue	ASC	RNA	Monosome	Osteogenesis	TL01
TL01_OST_Poly	Homo sapiens	adipose tissue	ASC	RNA	Polysome	Osteogenesis	TL01
TL01_OST_Total	Homo sapiens	adipose tissue	ASC	RNA	Total	Osteogenesis	TL01
TL02_ADI_Free	Homo sapiens	adipose tissue	ASC	RNA	Free	Adipogenesis	TL02
TL02_ADI_Mono	Homo sapiens	adipose tissue	ASC	RNA	Monosome	Adipogenesis	TL02
TL02_ADI_Poly	Homo sapiens	adipose tissue	ASC	RNA	Polysome	Adipogenesis	TL02
TL02_ADI_Total	Homo sapiens	adipose tissue	ASC	RNA	Total	Adipogenesis	TL02
TL02_CT_Free	Homo sapiens	adipose tissue	ASC	RNA	Free	Control - Non-differentiated	TL02
TL02_CT_Mono	Homo sapiens	adipose tissue	ASC	RNA	Monosome	Control - Non-differentiated	TL02
TL02_CT_Poly	Homo sapiens	adipose tissue	ASC	RNA	Polysome	Control - Non-differentiated	TL02
TL02_CT_Total	Homo sapiens	adipose tissue	ASC	RNA	Total	Control - Non-differentiated	TL02
TL02_OST_Free	Homo sapiens	adipose tissue	ASC	RNA	Free	Osteogenesis	TL02
TL02_OST_Mono	Homo sapiens	adipose tissue	ASC	RNA	Monosome	Osteogenesis	TL02
TL02_OST_Poly	Homo sapiens	adipose tissue	ASC	RNA	Polysome	Osteogenesis	TL02
TL02_OST_Total	Homo sapiens	adipose tissue	ASC	RNA	Total	Osteogenesis	TL02
TL10_ADI_Free	Homo sapiens	adipose tissue	ASC	RNA	Free	Adipogenesis	TL10
TL10_ADI_Mono	Homo sapiens	adipose tissue	ASC	RNA	Monosome	Adipogenesis	TL10
TL10_ADI_Poly	Homo sapiens	adipose tissue	ASC	RNA	Polysome	Adipogenesis	TL10
TL10_ADI_Total	Homo sapiens	adipose tissue	ASC	RNA	Total	Adipogenesis	TL10
TL10_CT_Free	Homo sapiens	adipose tissue	ASC	RNA	Free	Control - Non-differentiated	TL10
TL10_CT_Mono	Homo sapiens	adipose tissue	ASC	RNA	Monosome	Control - Non-differentiated	TL10
TL10_CT_Poly	Homo sapiens	adipose tissue	ASC	RNA	Polysome	Control - Non-differentiated	TL10
TL10_CT_Total	Homo sapiens	adipose tissue	ASC	RNA	Total	Control - Non-differentiated	TL10
TL10_OST_Free	Homo sapiens	adipose tissue	ASC	RNA	Free	Osteogenesis	TL10
TL10_OST_Mono	Homo sapiens	adipose tissue	ASC	RNA	Monosome	Osteogenesis	TL10
TL10_OST_Poly	Homo sapiens	adipose tissue	ASC	RNA	Polysome	Osteogenesis	TL10

TL10_OST_Total	Homo sapiens	adipose tissue	ASC	RNA	Total	Osteogenesis	TL10
----------------	--------------	----------------	-----	-----	-------	--------------	------

Table 1. Description of data generated from the RNA-sequencing analysis of individually collected total, free, monosomal and polysomal cells deposited in ArrayExpress under the number E-MTAB-6298.

Gene Name	Forward Primer Sequence 5'-3'	Reverse Primer Sequence 5'-3'	bp
ADH1B	GGTGGCTGTAGGAATCTGTCACAC	GGGTCCCCGAGGATTGCCT	248
MT1E	CCTGCTGCCCCATGAGCTGT	CCGGACATCAGGCACAGCAGC	90
FADS2	CAAAAGCCGAAAGCGAAGAGG	CCCACGAATTCCAGGTCAGG	368
VEGFA	CTACCTCCACCATGCCAAGTG	TGCGCTGATAGACATCCATGA	101
WNT2	TGAACGCCCTCTCGGTGGA	GCCCTGGCTAATGGCACGCA	203
CRABP2	AGAGAACCTGACGACCCGGCG	TCCACTGCTGGCTTGGACGC	232
GAPDH	GGCGATGCTGGCGCTGAGTAC	TGGTTCACACCCATGACGA	149

Table 2. RT-qPCR primer sequences. Oligonucleotide primers used to analyze the differential expression of genes after 24 h of adipogenic and osteogenic differentiation.

Condition	Processed reads	Mapped reads	%mapped
TL01_CT_Total	8822585	6194842	70,22
TL01_CT_Livre	19443837	15943455	82,00
TL01_CT_Mono	23333095	15363306	65,84
TL01_CT_Poli	19649163	14917916	75,92
TL01_ADI_Total	13547492	10099467	74,55
TL01_ADI_Livre	12234077	5935227	48,51
TL01_ADI_Mono	14470966	4831549	33,39
TL01_ADI_Poli	17658467	12238539	69,31
TL01_OST_Total	17167026	12421820	72,36
TL01_OST_Livre	12818330	10756365	83,91
TL01_OST_Mono	14434613	10910730	75,59
TL01_OST_Poli	30457820	24111460	79,16
TL02_CT_Total	22269425	20320186	91,25
TL02_CT_Livre	24190750	20816597	86,05
TL02_CT_Mono	17404225	13350410	76,71
TL02_CT_Poli	18461466	16376781	88,71
TL02_ADI_Total	18760553	17437420	92,95
TL02_ADI_Livre	14861502	13120676	88,29
TL02_ADI_Mono	15623676	14386266	92,08
TL02_ADI_Poli	18476485	17139154	92,76
TL02_OST_Total	15180100	14108666	92,94
TL02_OST_Livre	12583722	11101517	88,22
TL02_OST_Mono	13887007	12702981	91,47
TL02_OST_Poli	31811986	28796870	90,52
TAL8_CT_Total	26310312	22537589	85,66
TAL8_CT_Livre	25057403	21848746	87,19

TAL8_CT_Mono	22117315	18278201	82,64
TAL8_CT_Poli	16438703	14100189	85,77
TAL8_ADI_Total	20870296	18821233	90,18
TAL8_ADI_Livre	21639126	18993665	87,77
TAL8_ADI_Mono	22842891	17914425	78,42
TAL8_ADI_Poli	32599890	28076716	86,13
TAL8_OST_Total	26406318	23701577	89,76
TAL8_OST_Livre	17580825	15143949	86,14
TAL8_OST_Mono	25574734	21874585	85,53
TAL8_OST_Poli	44271573	38471061	86,90
TAL10_CT_Total	26358504	21670899	82,22
TAL10_CT_Livre	15484134	13471362	87,00
TAL10_CT_Mono	21961128	15302950	69,68
TAL10_CT_Poli	16299496	14057869	86,25
TAL10_ADI_Total	17673116	15436770	87,35
TAL10_ADI_Livre	21632960	18745157	86,65
TAL10_ADI_Mono	22657003	15744744	69,49
TAL10_ADI_Poli	25469357	20803234	81,68
TAL10_OST_Total	16425484	13389961	81,52
TAL10_OST_Livre	4292457	3739582	87,12
TAL10_OST_Mono	16578042	13939477	84,08
TAL10_OST_Poli	19652104	16838969	85,69
	19869615,4		81,74031229

Table 3. Reads obtained for each sample, number of reads mapped onto the genome and percentage of mapped reads. These information's are expanded versions of descriptions in our related work(Robert *et al.*, 2018).

ANEXO II

MANUSCRITO

(submetido para a revista Scientific Reports em agosto de 2018)

Cell cycle genes are downregulated after adipogenic triggering in human adipose tissue-derived stem cells by regulation of mRNA abundance

Bruna H. Marcon¹, Patrícia Shigunov¹, Lucía Spangenberg², Isabela Tiemy Pereira¹, Alessandra Melo de Aguiar¹, Rocio Amorin², Carmen K. Rebelatto³, Alejandro Correa^{1*} and Bruno Dallagiovanna^{1*}

¹ Instituto Carlos Chagas, Fiocruz-Paraná. Rua Professor Algacyr Munhoz Mader, 3775, Curitiba, PR, 81350-010, Brazil

² Unidad de Bioinformática, Institut Pasteur Montevideo. Mataojo 2020, Montevideo, 11400, Uruguay

³ Núcleo de Tecnologia Celular, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Rua Imaculada Conceição, 1155, Curitiba, PR 80215-901, Brazil

*Correspondence should be addressed to Bruno Dallagiovanna, bruno.dallagiovanna@fiocruz.br; or to Alejandro Correa, alejandro.correa@fiocruz.br.

Keywords: hASCs, adipogenesis, cell cycle arrest, proliferation, mRNA regulation

Abstract

The adipogenic process is characterized by the expression of adipocyte differentiation markers that lead to changes in cell metabolism and to the accumulation of lipid droplets. Moreover, during early adipogenesis, cells undergo a strong downregulation of translational activity with a decrease in cell size, proliferation and migration. In the present study, we identified that after 24 hours of adipogenic induction, human adipose tissue-derived stem cells (hASCs) undergo a G1-cell cycle arrest consistent with reduced proliferation, and this effect was correlated with a shift in polysome profile with an enrichment of the monosomal fraction and a reduction of the polysomal fraction. Polysome profiling analysis also revealed that this change in the monosomal/polysomal ratio was related to a strong downregulation of cell cycle and proliferation genes, such as cyclins and cyclin-dependent kinases (CDKs). Comparing total and polysome-associated mRNA sequencing, we also observed that this downregulation was mostly due to a reduction of cell cycle and proliferation transcripts via control of total mRNA abundance, rather than by translational control.

Introduction

Sequential changes in the expression of several genes mark the adipogenic differentiation process and lead to the formation of mature adipocytes ¹. A complex and highly coordinated gene expression program controls adipogenesis triggered by factors that increase cellular cAMP, such as isobutylmethylxanthine (IBMX), insulin, and glucocorticoids in cell culture ^{2–5}. These specific inducers initiate the transduction of intracellular signals led by the

CCAAT/enhancer binding proteins (C/EBPs) and the peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ), which are considered master regulators of early adipogenesis 6,7. The cells can sustain their own differentiation once committed, and the minimum induction time required for the initiation of adipogenesis is three days 8.

Furthermore different groups showed that cells undergoing adipogenic differentiation have reduced proliferative activity 9–11. Although this is usually related to contact inhibition, other studies have demonstrated that cell–cell contact is not essential for the occurrence of growth arrest 5. Moreover, it has been demonstrated that cell cycle genes can regulate genes involved in adipogenic differentiation. The genetic deletion of cyclin D1 lead to a reduction of histone deacetylase (HDAC1) 12 and promoted the expression of PPAR γ and adipogenesis 12,13. On the other hand, cyclins D3 and G2 were identified as upregulated during adipogenic differentiation, acting as PPAR γ coactivators 14,15.

In our previous work, we used ribosome profiling to better understand the translational regulation involved during the early steps of adipogenesis. We observed that human adipose tissue-derived stem cells (hASCs) treated with adipogenic induction medium for 72 hours had a strong translational regulation. Genes involved in migration, actin cytoskeleton and translational activity were downregulated during early adipogenesis, and this finding correlated with a decrease in cell size, migration and proliferation. Using a methionine incorporation assay, we observed a strong reduction of translational activity that was detected after 24 hours of adipogenic induction 11. We then hypothesized that the reduction of translational activity previously observed could be related to a decrease in proliferation. Thus, the aim of this work was to analyze the proliferation status and the gene expression profile of the hASCs after 24 hours of adipogenic induction, by assessing both the total and the polysome-associated mRNA. We also investigated the potential role of mTOR inhibitor DEPTOR in this process. The correlation of these data may provide information about the early mechanisms of the adipogenic differentiation process and how it is regulated.

Results

Changes in polysome profile and cell cycle arrest occur in hASCs after 24 hours of adipogenic induction

We previously demonstrated that, after 72 hours of adipogenic induction, hASCs strongly downregulate genes related to ribosome biosynthesis and translation. Moreover, using a methionine incorporation assay, we also observed a reduction in translational activity of induced hASCs that could be detected at 12 and 24 hours of treatment with adipogenic medium 11. Then, to investigate if the reduction of global translational activity was related to the regulation of specific pathways in the first 24 hours of adipogenesis, we used the polysome profiling strategy. We analyzed the fractions of transcripts associated with heavy polysomes and light polysome/monosome, as well as total RNA of hASCs treated with maintenance (non-induced, NI) or induction (I) medium for 24 hours. The multipotency of the hASCs samples used in this study was confirmed by full adipogenic and osteogenic differentiation after 28 days of induction (Fig. S1).

Regarding the polysome profile of NI and I hASCs, there was a reduction of the polysomal fraction and an enrichment of the monosomal fraction when adipogenesis was induced (Fig. 1A and B). Previous studies have demonstrated that cells undergoing adipogenic differentiation have reduced proliferative activity 9,10. To verify if the observed change in the polysome profile correlated with changes in cell proliferative activity in the first 24 hours of adipogenesis,

we performed proliferation and cell cycle assays. In all samples, hASCs induced to undergo adipogenesis for 24 hours have a lower proliferative activity than non-induced cells. We found that in the first 24 hours of treatment 55.17% (SEM = ± 5.881) of the NI hASCs incorporated EdU while only 15.14% (SEM = ± 4.539) of the I hASCs incorporated EdU (Fig. 1C and S2A).

To elucidate which phase of the cell cycle was affected, we performed a cell cycle assay. We found that NI hASCs have a mean of 43.78% (SEM = ± 2.036) of cells in G1, 35.9% (SEM = ± 1.709) in S and 17.48% (SEM = ± 1.522) in G2. Alternatively, when adipogenesis was induced, 73.38% (SEM = ± 3.490) remained in G1 phase and only 14.73% (SEM = ± 1.928) and 8.5% (SEM = ± 2.530) continued to S and G2 phases, respectively (Fig. 1D and S2B). The results indicate that hASCs undergoing adipogenic differentiation for 24 hours present a change in the polysome profile, with an increase in the monosomal/polysomal ratio, a reduction of the proliferative activity, and an accumulation of cells in G1 phase.

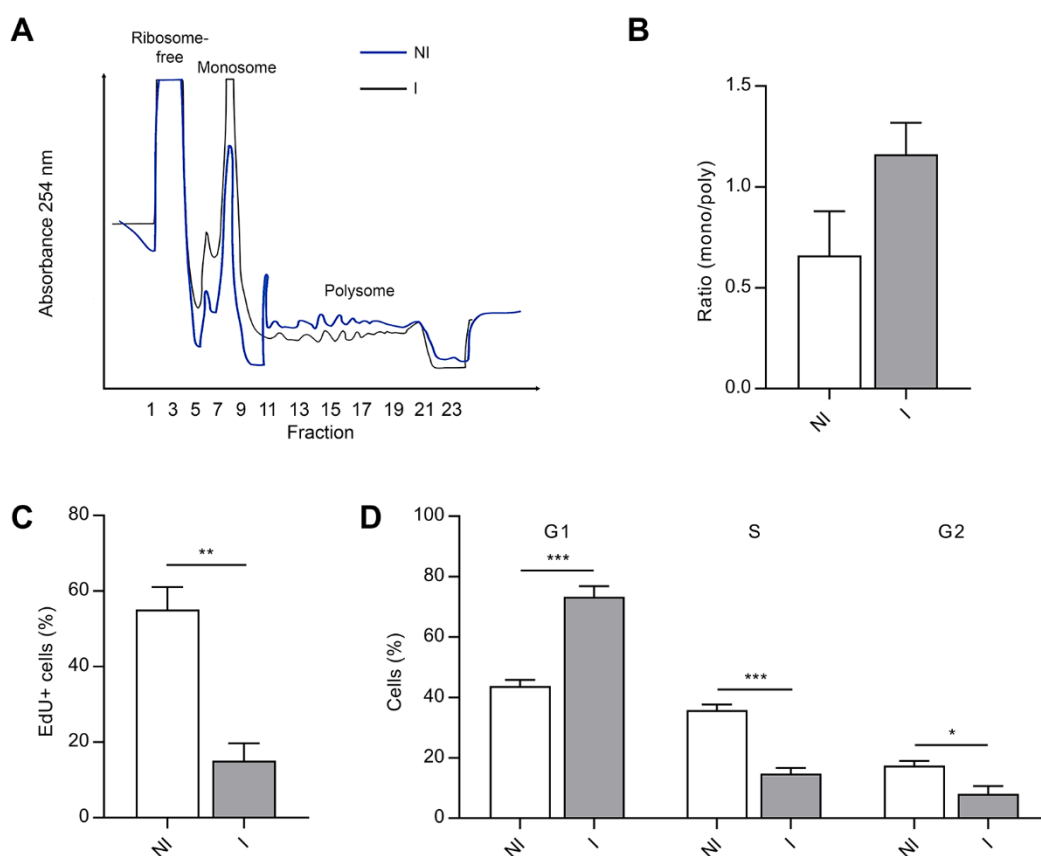


Fig. 1. hASCs induced to undergo adipogenesis for 24 hours show a change in the polysome/monosome ratio and have a reduction in proliferative activity. (A) The polysome profile obtained by sucrose density gradient of hASCs treated with control (NI, blue line) or adipogenic induction medium (I, black line) for 24 hours. (B) Quantification of the ratio between monosomal and polysomal areas (n=3). Mean with SEM; Shapiro-Wilk normality test: NI p=0.02; I p=0.90; Mann-Whitney test. (C) Cell proliferation analysis by EdU incorporation assay of hASCs treated with control or adipogenic induction medium for 24 hours (n=3). Mean with SEM; Student's unpaired t test analysis: **p < 0.01. (D) Cell cycle analysis of hASCs treated with control or adipogenic induction medium for 24 hours. The cells were stained with propidium iodide and analyzed by flow cytometry (n=4). Mean with SEM; Student's unpaired t test analysis: *p < 0.05; ***p<0.001.

Decrease in proliferation is DEPTOR-independent

One of the pathways considered a master regulator of translation and proliferation is mTOR 16–18. Therefore, we investigated if genes related to the mTOR pathway were differentially expressed in the first 24 hours of adipogenesis. By polysome profiling mRNA sequencing, no significant change was observed in the expression level of mTOR or mTOR pathway-related genes (Table S1), except for DEPTOR, a negative regulator of the mTOR pathway, which was upregulated after adipogenic induction ($\log_2(\text{FC})=1.58$; $\text{FDR}=1.64\text{E}-08$) (Table S1). To investigate if DEPTOR had a role in the cell cycle arrest observed in hASCs during adipogenesis, we used the siRNA methodology. hASCs were transfected with siRNA for 24 hours before adipogenic induction and silencing was confirmed by RT-PCR and Western Blot (Fig. 2A and B, and S3). At this time point, culture medium was changed to either maintenance or adipogenic culture medium and the cells were incubated for 24 hours. Then, the cells were subjected to cell cycle and proliferation assays. We found that DEPTOR silencing reduced cell proliferation in hASCs treated with either maintenance or induction medium (Fig. 2C and S4A). When transfection was performed with scramble siRNAs, 29.43% (SEM = ± 1.828) of NI hASCs and 20.73% (SEM = ± 0.733) of the ones treated with induction medium were proliferating (n=3). When silencing with DEPTOR was performed, 23.37% (SEM = ± 1.707) of NI hASCs and 14.39% (SEM = ± 3.541) of the ones induced for adipogenesis were proliferating (n=3). Notably, the decrease in proliferation after adipogenic induction was maintained after DEPTOR silencing (Fig. 2C and S4A). Alternatively, no significant change was observed in the cell cycle profile after DEPTOR silencing (Fig. 2D and S4B). The same pattern was observed for both treatments with maintenance and induction medium (n=3). However, there was a reduction of cells in S phase when DEPTOR was silenced (maintenance medium). These results suggest that the decrease in cell proliferation of hASCs during early adipogenesis is DEPTOR independent.

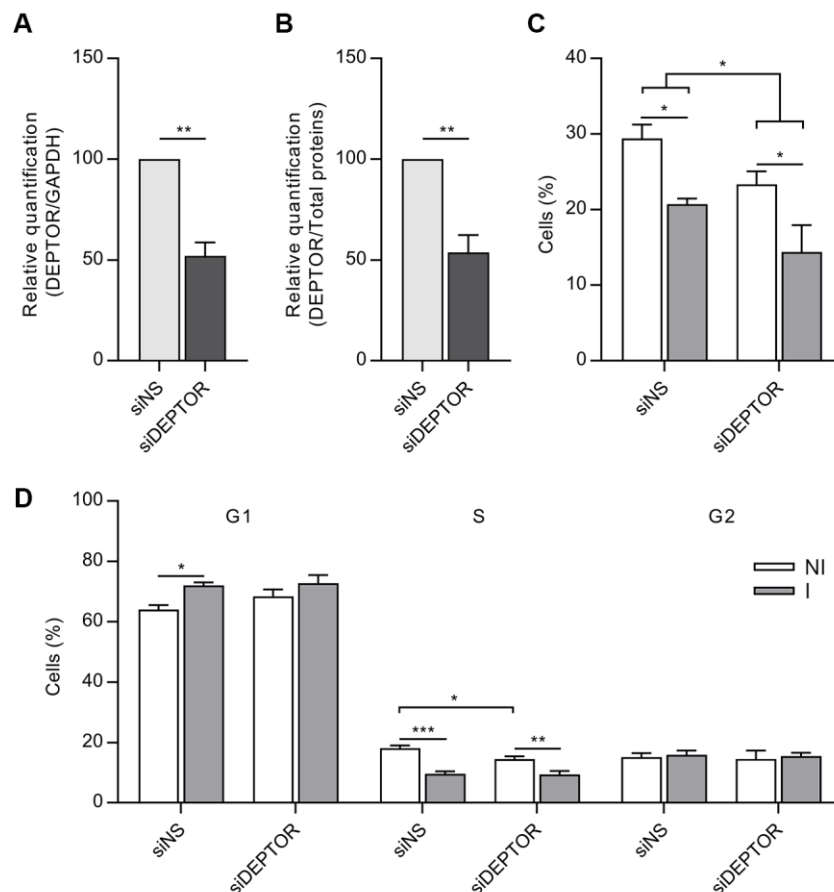


Fig. 2. mRNA silencing of DEPTOR in hASCs reduces cell proliferation. (A) qRT-PCR of DEPTOR from cells treated with siRNA for DEPTOR or siRNA nonsense (siNS) for 24 hours. The qRT-PCR results were normalized to GAPDH levels (n=3). Mean with SEM; Student's unpaired t test analysis: **p < 0.01. (B) Quantification of DEPTOR protein expression by Western Blot, results were normalized by total protein (n=3). Mean with SEM; Student's unpaired t test analysis: **p < 0.01. (C) EdU incorporation assay of hASCs subjected to DEPTOR knockdown for 24 hours and treated with control (NI) or adipogenic induction (I) medium for 24 hours (n=3). Mean with SEM; Two-way ANOVA, with multiple comparisons: *p < 0.05. (D) Cell cycle analysis of hASCs subjected to DEPTOR knockdown for 24 hours and treated with control (NI) or adipogenic induction (I) medium for 24 hours. Cells were stained with propidium iodide and analyzed by flow cytometry (n=3). Mean with SEM; Two-way ANOVA, with multiple comparisons: *p < 0.05; **p < 0.01; ***p<0.001.

Transcripts related to the cell cycle and proliferation are downregulated after 24 hours of adipogenic induction

Further investigating the polysome profiling data, we found that 727 genes were upregulated and 979 were downregulated at the polysomal level during early adipogenesis. Gene ontology (GO) analysis of transcripts identified as up- and downregulated was performed using gProfiler19 and DAVID20,21. Genes related to response to organic substance and chemical stimulus, system, tissue and multicellular organismal development, and lipid metabolism were upregulated after 24 hours of adipogenic induction (Fig. 3A and S5A, and Tables S4 and S5). Additionally, the transcripts of adipogenesis-related transcriptional factors C/EBP- β 6,22 and C/EBP- δ 6 increased their association with polysomes in the first 24 hours of adipogenesis (Tables S1).

Transcripts related to mitosis, chromosome and cytoskeleton organization, DNA replication and the cell cycle were downregulated after 24 hours of adipogenesis (Fig. 3B and S5B, and Tables S4 and S5). This notable downregulation of cell cycle-related genes was consistent with the observed reduction of the proliferative activity and cell cycle arrest observed in the first 24 hours of adipogenesis (Fig. 1C and D). The transcripts with reduced expression included cell cycle-related genes, as cyclins B1, B2, D1, E2 and F and the cyclin-dependent kinases (CDKs) 1 and 2. We also observed a downregulation of genes involved in the transcriptional control of cyclin D1, such as E2F-1 and JUN (Table S1). Moreover, we observed a downregulation of genes related to structural changes in the cell during cell cycle, as genes involved in DNA replication, components of DNA polymerase complex, DNA helicases, lamins, histones and kinesins (Table S1).

As the cell cycle arrest was correlated with a change in the polysome profile during early adipogenesis with an increase in the monosome/polysome ratio (Fig. 1A and B), we also analyzed sequencing data of the monosome-associated mRNA. This downregulation of cell cycle genes could be related to a reduced translational rate of these transcripts, with a shift from heavy to light polysomes/monosomes. In monosome associated mRNA, 29 and 14 genes were identified as up- and downregulated after adipogenic induction for 24 hours, respectively (Table S2). By qualitative analysis of differentially expressed genes in monosomal and polysomal fractions, we found that all of the transcripts identified as downregulated in monosomes were also downregulated in polysomes. A similar result was obtained for upregulated transcripts (Fig. S5E). Then, we selected only the genes up- or downregulated (identified by monosomal or polysomal mRNA sequencing) that were included in terms related to proliferation, mitosis or the cell cycle in the GO analysis, which yielded a list of 504 genes differentially expressed. By scatter plot analysis of log₂(FC), we found that most genes had a similar regulation in monosome and polysome associated mRNA (Fig. 4A), though with more variability in the monosomal fraction. Additionally, cell cycle arrest was correlated to a strong downregulation of cell cycle and proliferation-associated genes in both heavy and light polysome/monosome fractions.

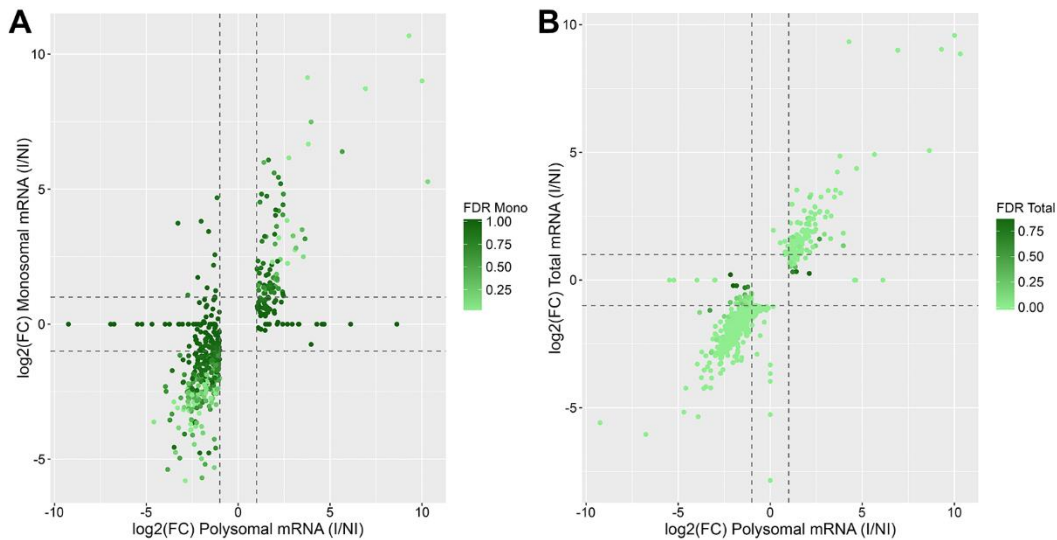


Fig. 4. Regulation of transcripts related to the cell cycle and proliferation. (A) Cell cycle and proliferation-related genes identified as up- or downregulated in monosome and/or polysome associated mRNA. Scatter plot of $\log_2(\text{FC})$ in each fraction. (B) Cell cycle and proliferation-related genes identified as up- or downregulated in total and/or polysome associated mRNA. Scatter plot of $\log_2(\text{FC})$ in each fraction.

Genes related to the cell cycle and proliferation are mainly regulated by control of total mRNA abundance

To verify if the change in the polysome profiling of cell cycle genes was related to mRNA abundance regulation, we analyzed sequencing of total mRNA. After 24 hours of adipogenic induction, 551 genes were identified as upregulated and 942 as downregulated in total mRNA (Table S3). GO analysis revealed that, similar to what was observed in polysomal mRNA, genes related to development and lipid metabolism were upregulated, and genes related to mitosis, chromatid segregation and the cell cycle were downregulated (Fig. 3C, D, S5C and S5D, and Tables S4 and S5). Additionally, as in the polysome profiling, cyclins A2, B1, B2, D1 and F and CDKs 1 and 2 were downregulated, and cyclins G1 and G2 were upregulated (Table S3) in total mRNA. The decrease in Cyclin D1 mRNA abundance during early adipogenesis of mesenchymal stem cells was previously reported 10,22. Here we observed that this downregulation correlated with a reduced association of cyclin D1 transcript with polysomes (Table S1) and lead to a decrease in the protein abundance (Fig. S6). Genes involved in transcriptional control of cyclin D1, such as E2F-1 and JUN, were also downregulated, as well as genes related to structural changes during mitosis, such as lamins, kinesins and histones (Table S3). Exploring the KEGG23–25 database, cell cycle related genes were downregulated in both total and polysome associated mRNA (Fig. 3E).

Next, we investigated if genes related to cell proliferation and/or the cell cycle were regulated both at the total mRNA and their translational levels (additive regulation) or if the reduced association to polysomes was only reflective of the decrease in the number of transcripts. For this purpose, similar to the analysis performed with the monosomal data, we selected genes up- or downregulated in total or polysomal mRNA that were related to proliferation, mitosis or the cell cycle in the GO analysis, obtaining a total of 584 genes. Using a scatter plot of $\log_2(\text{FC})$, we found that most genes had a similar regulation in total and polysome associated mRNA (Fig. 4B). This finding suggests that downregulation of cell cycle and proliferation related genes during early adipogenesis was mostly regulated by total mRNA abundance control.

Discussion

Cell cycle arrest and/or reduced proliferative activity during early adipogenesis have been previously described for 3T3 pre-adipocytes 9 and mesenchymal stem cells 10. However, we lack a complete understanding about this entire process and its regulation. Using a 3T3 pre-adipocyte model, different studies have conflicting results on this subject, having found that a prior step of clonal expansion is 26 and is not 27 necessary for adipogenic differentiation. Using adipose tissue-derived mesenchymal stem cells as a model, Marquez and collaborators observed that cells undergo a mitotic clonal expansion in the first 48 hours of adipogenic induction 10. Conversely, in the present work, we observed that reduced proliferative activity could be detected after 24 hours of adipogenic induction and that this reduction was caused by a cell cycle arrest in G1 phase. The differences observed in these studies may be related to the fact that Marquez and collaborators used a period of EdU treatment of 8 hours, while we performed a period of incubation of 24 hours with EdU. Our aim was to assess the balance of proliferation after this period and match with the polysome profiling analysis. Therefore, changes in the proliferation status in shorter periods of time may not be noticed in our model.

Working with hASCs induced to undergo adipogenesis for 72 hours, we previously showed that after 3 days of treatment cells have a reduced cell size and migration, proliferation and translational activities. Moreover, a decrease in the protein synthesis rate was observed 24 hours after induction and was correlated to a change in the phosphorylation pattern of translational inhibitor 4EBP1 11. This finding raised the possibility that the cell cycle arrest observed during early adipogenesis could be related to mTOR pathway inhibition. Using polysomal mRNA sequencing, we identified an upregulation of DEPTOR in cells treated with adipogenic medium for 24 hours. DEPTOR interacts with mTORC1 and mTORC2 and inhibits this signaling pathway 28. Additionally, DEPTOR positively regulates adipogenesis, as it stimulates adipocyte differentiation, leading to an increase in white adipose tissue (WAT) expansion in mice overexpressing this protein and is also upregulated in WAT of obese humans 29.

Then, we hypothesized that DEPTOR upregulation could be linked to cell cycle arrest during early adipogenesis and that its knockdown could abrogate this effect. We choose 24 hours to ensure DEPTOR silencing since Zhao and collaborators in 2011 have estimated that the half-life of endogenous DEPTOR was less than 12 hours 30. However, in our study, silencing DEPTOR 24 hours prior to adipogenic induction showed no significant reduction of cell proliferation, both in NI and I hASCs. This finding suggests that cell proliferation reduction is DEPTOR independent. However, we must consider the fact that DEPTOR knockdown might not be sufficient to affect its inhibitory role on the mTOR pathway or that the reduction of DEPTOR is circumvented by activation of other pathways that regulate mTOR and/or proliferation. Notably, in 2013, Zhang and collaborators have demonstrated that, in multiple myeloma cells, a reduction of 50% in DEPTOR mRNA lead to a similar decrease at the protein level and to changes in the profile of downstream elements of mTOR pathway (as in the phosphorylation of 4EBP1 and Akt), as well as a reduction of cell proliferation 31,32. A similar result was observed in studies with multiple myeloma 28 and osteosarcoma 33 cells, where higher levels of DEPTOR knockdown were obtained. On the other hand, DEPTOR influence on the cell cycle and proliferation varies in different cell types. Kazi and collaborators have demonstrated that DEPTOR knockdown in C2C12 myoblasts augmented phosphorylation of pRb, which stimulated G1-S transition 34. Although our analysis has suggested that cell cycle arrest during early adipogenesis is independent of DEPTOR upregulation, more studies are necessary to better understand this correlation.

To further understand cell cycle arrest during early adipogenesis, we investigated which other mRNAs were associated with total, polysome and monosome fractions after 24 hours of

adipogenic induction. Interestingly, we observed that several genes related to the cell cycle and/or proliferation were downregulated. Regarding the polysome profile of NI and I hASCs, there was a clear shift from heavy to light polysome and monosome fractions. The decrease in global translational activity may lead to a shift of mRNA from heavy polysome fractions to light ones 16. Then, we hypothesized that downregulation of cell cycle and proliferation genes could be related to a reduction of their translational rate and a shift to light polysomes and monosomes. But the monosomal fraction is not restricted to translationally downregulated transcripts. Using ribosome profiling, Heyer and Moore demonstrated that low expression transcripts or mRNAs containing short ORFs (smaller than 590 nt) being actively translated may be associated to monosomes. On the other hand, they also showed that mRNAs regulated by nonsense mediated decay, or containing uORFs that negatively regulates the canonical ORF may also be enriched in monosomal fraction 35. To investigate the regulation during early adipogenesis of hASCs, we compared the fold change of proliferation and/or cell cycle associated genes in polysome and monosome associated fractions. Almost all of the genes identified as downregulated in the monosomal fraction were also downregulated in the polysome fraction, with similar fold changes; additionally, genes upregulated in the monosome fraction were also upregulated in the polysome fraction. This result suggests that downregulation of cell cycle associated genes was not mainly related to a reduction of their translational rate. Consistent with this observation, there was a strong downregulation in the total mRNA levels of cell cycle transcripts, suggesting that control of mRNA abundance may be the major regulation point for cell cycle arrest during early adipogenesis.

We also demonstrated that cyclins A2, B1, B2, D1, E2 and F and CDKs 1 and 2 were downregulated while cyclins G1 and G2 were upregulated after 24 hours of adipogenesis. Cyclin D1 is a labile protein that participates in the cell cycle G1-S transition 36, and its expression may be regulated both at the transcriptional level by the MEK-ERK signaling pathway and at the translational level through the mTOR pathway 37. Interestingly, we have observed a downregulation of genes involved in the transcriptional control of cyclin D1, such as E2F-1 38 and JUN 39. This finding reinforces the idea that cell cycle genes are mainly regulated by control of mRNA abundance, via a DEPTOR/mTOR-independent mechanism, in hASCs during early adipogenesis.

The correlation between cell cycle genes and CT maintenance of stemness and differentiation has been explored by different groups. Recently, Liu and collaborators have demonstrated that G1 cyclins (D1, D2, D3, E1 and E2) are not necessary for embryonic stem cell proliferation, but their downregulation affects pluripotency 40. Furthermore, the involvement of cyclins in adipogenic differentiation has also been reported. While cyclin D1 was downregulated during early adipogenesis, promoting PPAR γ expression and adipogenic differentiation 12,13; cyclin D3 and cyclin G2 were upregulated, acting as coactivators of PPAR γ 14,15.

Our results showed that adipogenic triggering in hASCs leads to a strong downregulation of cell cycle and proliferation genes. This finding was correlated with a decrease in proliferation and G1-cell cycle arrest, which were DEPTOR independent. We also demonstrated that there is a shift in polysome profile with an increase in the monosome/polysome ratio when adipogenesis is induced. Moreover, our results revealed that cell cycle and proliferation transcripts are primarily regulated by control of mRNA abundance during early adipogenesis in hASCs. We have previously demonstrated that during early osteogenesis, genes related to cell cycle are differentially expressed, but no changes in the proliferation status was observed 24 and 72 hours of osteogenic induction⁴¹. Thus, the early cell cycle arrest and the reduction of the proliferation seem to be related specifically to adipogenesis at least when comparing with hASCs undergoing osteogenesis. Mesenchymal stem/stromal cells such as hASCs are being

extensively used in pre-clinical and clinical studies, understanding details on how these cells proliferate and differentiate are crucial for improving their used and manipulation.

Methods

Subjects and cell culture

hASCs were obtained from adipose tissue derived from lipoaspirate samples from donors between 17 and 56 years old (Table 1). Tissue collection and cell isolation were performed after donors and parent/legal guardian (for donors under the age of 18 years old) had given informed consent, in accordance with the guidelines for research involving human subjects and with the approval of the Ethics Committee of Fundação Oswaldo Cruz, Brazil (approval number CAAE: 48374715.8.0000.5248).

Table 1: Sex, age, weight, height and BMI of the donors of adipose tissue used in this study

Donor	Sex	Age (years)	Weight (kg)	Height (m)	BMI (kg/m ²)
A	Female	27	70.9	1.62	27.0157
B	Female	32	55	1.63	20.70082
C	Male	17	83	1.77	26.49303
D	Female	44	69	1.71	23.597
E	Female	17	64	1.58	25.63692
F	Female	46	57	1.58	22.83288
G	Female	56	80	1.79	24.96801
H	Female	27	53	1.6	20.70313

hASC isolation was performed as previously described 42. Briefly, 200 mL of adipose tissue were washed with sterile phosphate-buffered saline (PBS) (Gibco Invitrogen), digested with 1 mg/mL type I collagenase (Gibco Invitrogen) (30 min, 37°C, 5% CO₂) under constant shaking and filtered through a 100-µm then a 40-µm mesh filter (BD Biosciences). The cell suspension was centrifuged (10 min at 800 x g, 8°C) and treated with hemolysis buffer (ammonium chloride 0.83%, sodium bicarbonate 0.1% and EDTA 0.004%) for 5 minutes to remove erythrocytes. The cells obtained were plated at a density of 1x10⁵ cells/cm² with DMEM-F12 (Gibco Invitrogen), 10% fetal bovine serum (FBS), 100 U/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin and kept in a humid incubator at 37°C and 5% CO₂ for 24 hours. After, non-adherent cells were removed and the culture medium was changed twice a week. All of the tests and experiments were performed with cell cultures at passages 4 to 6.

To assess the differentiation potential of the isolated hASCs, the cells were submitted to adipogenesis and osteogenesis. The adipogenic differentiation was induced using hMSC Adipogenic Differentiation Medium for 3 days and hMSC Adipogenic Maintenance Medium (hMSC Adipogenic Bullet Kit, Lonza) for 4 days; and this cycle was repeated for a total of 28 days. Then cells were fixed and stained with Nile Red (NR) to identify lipid droplets. For osteogenesis, cells were treated with hMSC Mesenchymal Stem Cell Osteogenic Differentiation Medium (Lonza) for 21 days, fixed and stained with OsteoImage™ (Lonza) Mineralization kit, following manufacturer's instructions.

For 24 hours assays, adipogenic differentiation was performed using hMSC Adipogenic Differentiation Medium (hMSC Adipogenic Bullet Kit, Lonza), in accordance with the

manufacturer's instructions. hMSC Adipogenic Maintenance Medium without insulin was used as a control medium.

Sucrose density gradient separation and RNA isolation

When hASC cultures reached 70% confluence, treatment with maintenance or induction medium for 24 hours was performed. Next, cells were treated with 0.1 mg/mL cycloheximide (Sigma-Aldrich) (10 minutes, 37°C), detached with trypsin and washed twice with 0.1 mg/mL cycloheximide in PBS. After centrifugation (700 x g; 5 minutes), the cell pellet was resuspended in polysome lysis buffer (15 mM Tris HCl pH 7.4, 15 mM MgCl₂, 300 mM NaCl, 100 µg/mL cycloheximide, 1% Triton X-100) and incubated for 10 minutes on ice. The cell lysate was centrifuged at 12000 x g for 10 minutes at 4°C and the supernatant was loaded onto 10% to 50% sucrose gradients (previously prepared with BioComp model 108 Gradient Master). The samples were centrifuged at 150000 x g (SW40 rotor, HIMAC CP80WX HITACHI) for 160 minutes at 4°C and the sucrose gradient fractions were separated using the ISCO gradient fractionation system (ISCO Model 160 Gradient Former Foxy Jr. Fraction Collector), connected to a UV detector. Absorbance at 275 nm was monitored and the polysome profile was recorded. The monosome/polysome ratio was quantified by calculating the area beneath the monosome and polysome peaks using ImageJ software.

RNA from polysomal fractions was isolated using the Direct-zol™ RNA MiniPrep (Zymo Research), following the manufacturer's instructions. Total RNA from cells in the same conditions (treated with maintenance or induction medium for 24 hours) was also extracted using Direct-zol™ RNA MiniPrep.

cDNA library preparation and sequencing

For cDNA library preparation, 1 µg of total and polysome-associated RNA were used to perform three independent biological sample replicates. The cDNA libraries were prepared using the TruSeq Stranded Total RNA Sample Preparation kit (Illumina, Inc.) and RNA-seq was performed in an Illumina HiSeq platform using an RNA-seq kit, following the manufacturer's recommendation (Illumina, Inc.).

Data analysis

Mapping and counting sequencing data were performed with the Rsubread package 43. Hierarchical clustering of the samples (log of counts plus one) was performed to evaluate biological variability. Each sample was normalized to one million reads to account for library size.

Differential expression analysis was performed using the Bioconductor R package edgeR 44. For this analysis, we retained only those genes with at least one count per million in at least three samples.

We considered as upregulated the transcripts with $\log(\text{FC}) > 1$ and $\text{FDR} < 0.01$, and as downregulated the transcripts with $\log(\text{FC}) < -1$ and $\text{FDR} < 0.01$.

Gene ontology (GO) analysis was performed using gProfiler 19 and DAVID 20,21, exploring the KEGG database.

Cell cycle assay

Cells were detached with trypsin, washed with PBS and centrifuged (700 x g, 5 minutes). The cell pellet was resuspended in an ice-cold solution of 70% ethanol and 30% PBS and incubated for 2 hours at 4°C for fixation. Then, the cells were washed once with PBS and centrifuged.

The cells were resuspended in PBS and an equal volume of 2X staining solution (3.4 mM Tris-HCl pH 7.4; 0.1% NP40; 700 U/L RNase A DNase-free; 10 mM NaCl; 30 µg/mL propidium iodide) was added and incubated for 10 minutes. After centrifugation, the supernatant was discarded, and the cells were resuspended in 200 µL of PBS for cell cytometry analysis. Approximately 10,000 events were acquired with a FACSCanto II flow cytometer (BD Biosciences) and analysis was performed with Flow Jo software version 10.0.8r1.

EdU incorporation assay

For the proliferation assay, cells were treated with 10 µM EdU (in culture medium) for 24 hours. Then, the cells were detached with trypsin, washed, fixed and stained with the Click-iT® EdU Alexa Fluor® 647 Flow Cytometry Assay Kit (Molecular Probes, Thermo Fisher Scientific), following the manufacturer's instructions. Approximately 10,000 events were acquired with a FACSCanto II flow cytometer (BD Biosciences), and analysis was performed with Flow Jo software version 10.0.8r1.

Silencing through RNA interference

To reduce DEPTOR expression in the hASCs, RNA interference silencing was performed using Lipofectamine 2000 Transfection Reagent (Invitrogen™) according to the manufacturer's instructions. All double-stranded siRNAs were designed and synthesized by Origene (Maryland, USA). The cells were initially plated in 6-well plates at a density of 1x10⁵ cells/well in DMEM medium until they reached 80-90% confluence. The cells were transfected with 10 nM siRNA against DEPTOR (siDep - SR312133B) or universal scrambled negative control siRNA (siNC -SR30004). After six hours of transfection, the culture medium was changed to remove the transfectant agent. The cells were harvested 24 h after transfection to calculate the mRNA expression levels.

RNA extraction and qRT-PCR

Total RNA extraction from the hASCs was conducted according to the RNeasy mini kit (QIAGEN), following the manufacturer's instructions. Reverse transcription was performed from 1 µg total RNA using the ImProm-II™ Reverse Transcription System (Promega) according to the manufacturer's instructions. The relative gene expression levels of DEPTOR mRNA were assessed using qPCR with the LightCycler® 96 Instrument (Roche) and SYBR Select Master Mix (Life Sciences). The program with the cycles were as follows: initiation at 50°C for 2 min, denaturation at 95°C for 2 min, followed by 45 cycles of denaturation at 95°C for 15 sec, annealing at 60°C for 15 sec and extension at 72°C for 1 min. The primer sequences for human GAPDH (Forward 5'GGCGATGCTGGCGCTGAGTAC3' and Reverse 5'TGGTTCACCCATGACGA3') results in fragments with 149 base pairs whereas DEPTOR (Forward 5'AATCCAGTCAGAGCAGCGGA3' and Reverse 5'CCATGGTTTTAGGGCCGTGC 3') results in fragments with 134 base pairs and recognizes both isoforms (1 and 2). The reactions were run in triplicate, and the generated products were analyzed with the LightCycler® 96 software (Roche). The data were evaluated as 2- $\Delta\Delta C_q$ values (C_q indicates the cycle threshold). The results are expressed as the normalization ratio of the relative quantities of the DEPTOR mRNAs to those of the control (NC siRNA).

Western Blot

For Western Blot analysis, cells were washed with PBS and scraped after addition of denaturing buffer (160 mM Tris-HCl pH 6.8, 4% SDS, 10% b-mercaptoethanol, 24% glycerol and 0.02% bromophenol blue). Protein extracts were subjected to SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membrane and probed with rabbit anti-cyclin D1 (produced in rabbit, Neomarkers, cat#RB-4091-P1, 1:8000) and anti-DEPTOR/DEPDC6 (D9F5) (produced in rabbit, Cell Signaling,

cat#11816S, 1:1000) antibodies. After incubation with secondary antibody anti-rabbit IgG-peroxidase (produced in goat, Sigma, cat#A6154, 1:2500), membranes were analyzed with Novex® ECL HRP Chemiluminescent kit. The signals obtained were quantified with ImageJ software.

Statistical analysis

All experiments were performed with hASCs from 3 different donors (biological replicates), except for cell cycle analysis, which was performed with hASCs from 4 different donors. Bar graphs represent mean with standard error mean (SEM). Analyses were performed using GraphPad Prism 5 software. Before running statistical analysis, the distribution was assessed using Shapiro-Wilk Normality test. For experiments with two different conditions and gaussian distribution, Student's T test was performed. When non gaussian distribution was observed, Mann-Whitney test was used. For experiments with grouped analysis and gaussian distribution, two-way ANOVA with multiple comparisons followed by Sidak post hoc test was performed. Values of $p \leq 0.05$ were considered significant.

References

1. Moseti, D., Regassa, A. & Kim, W.-K. Molecular Regulation of Adipogenesis and Potential Anti-Adipogenic Bioactive Molecules. *Int. J. Mol. Sci.* 17, 124 (2016).
2. Chapman, A. B., Knight, D. M., Dieckmann, B. S. & Ringold, G. M. Analysis of gene expression during differentiation of adipogenic cells in culture and hormonal control of the developmental program. *J. Biol. Chem.* 259, 15548–55 (1984).
3. MacDougald, O. A. & Lane, M. D. Transcriptional Regulation of Gene Expression During Adipocyte Differentiation. *Annu. Rev. Biochem.* 64, 345–373 (1995).
4. Ringold, G. M., Chapman, A. B. & Knight, D. M. Glucocorticoid control of developmentally regulated adipose genes. *J. Steroid Biochem.* 24, 69–75 (1986).
5. Rosen, E. D., Walkey, C. J., Puigserver, P. & Spiegelman, B. M. Transcriptional regulation of adipogenesis. *Genes Dev.* 14, 1293–307 (2000).
6. Cao, Z., Umek, R. M. & McKnight, S. L. Regulated expression of three C/EBP isoforms during adipose conversion of 3T3-L1 cells. *Genes Dev.* 5, 1538–52 (1991).
7. Shao, D. & Lazar, M. A. Peroxisome proliferator activated receptor gamma, CCAAT/enhancer-binding protein alpha, and cell cycle status regulate the commitment to adipocyte differentiation. *J. Biol. Chem.* 272, 21473–8 (1997).
8. Spangenberg, L. et al. Polysome profiling shows extensive posttranscriptional regulation during human adipocyte stem cell differentiation into adipocytes. *Stem Cell Res.* 11, 902–912 (2013).
9. Reichert, M. & Eick, D. Analysis of cell cycle arrest in adipocyte differentiation. *Oncogene* 18, 459–466 (1999).
10. Marquez, M. et al. The Role of Cellular Proliferation in Adipogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells Dev.* scd.2017.0071 (2017). doi:10.1089/scd.2017.0071

11. Marcon, B. H. et al. Downregulation of the protein synthesis machinery is a major regulatory event during early adipogenic differentiation of human adipose-derived stromal cells. *Stem Cell Res.* 25, 191–201 (2017).
12. Fu, M. et al. Cyclin D1 inhibits peroxisome proliferator-activated receptor gamma-mediated adipogenesis through histone deacetylase recruitment. *J. Biol. Chem.* 280, 16934–41 (2005).
13. Wang, C. et al. Cyclin D1 repression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression and transactivation. *Mol. Cell. Biol.* 23, 6159–73 (2003).
14. Aguilar, V. et al. Cyclin G2 regulates adipogenesis through PPAR gamma coactivation. *Endocrinology* 151, 5247–54 (2010).
15. Sarruf, D. A. et al. Cyclin D3 promotes adipogenesis through activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Mol. Cell. Biol.* 25, 9985–95 (2005).
16. Courtes, F. C. et al. Understanding translational control mechanisms of the mTOR pathway in CHO cells by polysome profiling. *N. Biotechnol.* 31, 514–523 (2014).
17. Fingar, D. C. et al. mTOR controls cell cycle progression through its cell growth effectors S6K1 and 4E-BP1/eukaryotic translation initiation factor 4E. *Mol. Cell. Biol.* 24, 200–16 (2004).
18. Morita, M. et al. mTOR coordinates protein synthesis, mitochondrial activity and proliferation. *Cell Cycle* 14, 473–480 (2015).
19. Reimand, U. et al. g:Profiler—a web server for functional interpretation of gene lists (2016 update). *Nucleic Acids Res.* (2016). doi:10.1093/nar/gkw199
20. Huang, D. W., Sherman, B. T. & Lempicki, R. A. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat. Protoc.* 4, 44–57 (2009).
21. Huang, D. W., Sherman, B. T. & Lempicki, R. A. Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic Acids Res.* 37, 1–13 (2009).
22. Janderová, L., McNeil, M., Murrell, A. N., Mynatt, R. L. & Smith, S. R. Human Mesenchymal Stem Cells as an in Vitro Model for Human Adipogenesis. *Obes. Res.* 11, 65–74 (2003).
23. Kanehisa, M. & Goto, S. KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Res.* 28, 27–30 (2000).
24. Kanehisa, M., Sato, Y., Kawashima, M., Furumichi, M. & Tanabe, M. KEGG as a reference resource for gene and protein annotation. *Nucleic Acids Res.* 44, D457–D462 (2016).
25. Kanehisa, M., Furumichi, M., Tanabe, M., Sato, Y. & Morishima, K. KEGG: new perspectives on genomes, pathways, diseases and drugs. *Nucleic Acids Res.* 45, D353–D361 (2017).
26. Tang, Q.-Q., Otto, T. C. & Lane, M. D. Mitotic clonal expansion: A synchronous process required for adipogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100, 44–49 (2003).
27. Qiu, Z. et al. DNA Synthesis and Mitotic Clonal Expansion Is Not a Required Step for 3T3-L1 Preadipocyte Differentiation into Adipocytes. *J. Biol. Chem.* 276, 11988–11995 (2001).

28. Peterson, T. R. et al. DEPTOR is an mTOR inhibitor frequently overexpressed in multiple myeloma cells and required for their survival. *Cell* 137, 873–86 (2009).
29. Laplante, M. et al. DEPTOR Cell-Autonomously Promotes Adipogenesis, and Its Expression Is Associated with Obesity. *Cell Metab.* 16, 202–212 (2012).
30. Zhao, Y., Xiong, X. & Sun, Y. DEPTOR, an mTOR inhibitor, is a physiological substrate of SCF(β TrCP) E3 ubiquitin ligase and regulates survival and autophagy. *Mol. Cell* 44, 304–16 (2011).
31. Zhang, H.-R., Chen, J.-M., Zeng, Z.-Y. & Que, W.-Z. Knockdown of DEPTOR inhibits cell proliferation and increases chemosensitivity to melphalan in human multiple myeloma RPMI-8226 cells via inhibiting PI3K/AKT activity. *J. Int. Med. Res.* 41, 584–595 (2013).
32. ZHANG, H., CHEN, J., ZENG, Z., QUE, W. & ZHOU, L. Knockdown of DEPTOR induces apoptosis, increases chemosensitivity to doxorubicin and suppresses autophagy in RPMI-8226 human multiple myeloma cells in vitro. *Int. J. Mol. Med.* 31, 1127–1134 (2013).
33. Hu, B. et al. Downregulation of DEPTOR inhibits the proliferation, migration, and survival of osteosarcoma through PI3K/Akt/mTOR pathway. *Oncotargets. Ther.* Volume 10, 4379–4391 (2017).
34. Kazi, A. A., Hong-Brown, L., Lang, S. M. & Lang, C. H. Deptor knockdown enhances mTOR Activity and protein synthesis in myocytes and ameliorates disuse muscle atrophy. *Mol. Med.* 17, 925–36 (2011).
35. Heyer, E. E. & Moore, M. J. Redefining the Translational Status of 80S Monosomes. *Cell* 164, 757–769 (2016).
36. Baldin, V., Lukas, J., Marcote, M. J., Pagano, M. & Draetta, G. Cyclin D1 is a nuclear protein required for cell cycle progression in G1. *Genes Dev.* 7, 812–21 (1993).
37. Schwaederle, M. et al. Cyclin alterations in diverse cancers: Outcome and co-amplification network. *Oncotarget* 6, 3033–42 (2015).
38. Lee, R. J. et al. Cyclin D1 is required for transformation by activated Neu and is induced through an E2F-dependent signaling pathway. *Mol. Cell. Biol.* 20, 672–83 (2000).
39. Albanese, C. et al. Transforming p21ras mutants and c-Ets-2 activate the cyclin D1 promoter through distinguishable regions. *J. Biol. Chem.* 270, 23589–97 (1995).
40. Liu, L. et al. G1 cyclins link proliferation, pluripotency and differentiation of embryonic stem cells. *Nat. Cell Biol.* 19, 177–188 (2017).
41. Robert, A. W. et al. Gene expression analysis of human adipose tissue-derived stem cells during the initial steps of in vitro osteogenesis. *Sci. Rep.* 8, 4739 (2018).
42. Rebelatto, C. K. et al. Dissimilar differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, and adipose tissue. *Exp. Biol. Med.* (Maywood). 233, 901–13 (2008).
43. Liao, Y., Smyth, G. K. & Shi, W. The Subread aligner: fast, accurate and scalable read mapping by seed-and-vote. *Nucleic Acids Res.* 41, e108–e108 (2013).
44. Robinson, M. D., McCarthy, D. J. & Smyth, G. K. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* 26, 139–40 (2010).

Acknowledgments

We would like to thank the Program for Technological Development in Tools for Health-RPT-FIOCRUZ for use of the high throughput sequencing facility and flow cytometry facility, PDTIS/Carlos Chagas Institute, Fiocruz-Parana. We also would like to thank Dr Patricia Elizald for providing an aliquot of the anti-Cyclin D1 antibody.

Author contributions statement

BM performed the polysome profiling, data mining, and proliferation and cell cycle assays and drafted the manuscript. PS performed the RNA-Seq and DEPTOR silencing assays. IP performed the polysome profile analysis. LS and RA performed the bioinformatics analyses. CR isolated the hASCs. AA helped with flow-cytometer analysis. AC and BD conceived and coordinated the study and supervised the manuscript writing. All of the authors read and approved the final manuscript.

Data availability

The RNA-seq raw data are deposited in the ArrayExpress repository under the number E-MTAB-6298.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Funding

This study was supported by grants from Fundação Araucária (03/2012 - Programa de Fluxo Contínuo para Apoio a Projetos Especiais #34732.387.36341.22102012) and FIOCRUZ. BD received a fellowship from CNPq, and ITP received a fellowship from CAPES.

ANEXO III

TABELAS SUPLEMENTARES

As tabelas suplementares serão fornecidas em arquivo digital

Tabela S1. Resultado da análise por espectrometria de massas do primeiro teste de imunoprecipitação de DDX6 em hASCs.

Tabela S2. Resultado da análise por espectrometria de massas do segundo teste de imunoprecipitação de DDX6 em hASCs e dos controles realizados.

Tabela S3. Análise do *fold change* dos transcritos identificados por sequenciamento de RNAm total de hASCs não-induzidas e induzidas para osteogênese por 24 horas

Tabela S4. Análise do *fold change* dos transcritos identificados por sequenciamento de RNAm associado a polissomos pesados de hASCs não-induzidas e induzidas para osteogênese por 24 horas

Tabela S5. Análise de ontologia gênica (gProfiler) de transcritos identificados como regulados negativamente ($\log_2(\text{FC}) < -1$, $\text{FDR} < 0.01$) ou positivamente ($\log_2(\text{FC}) > 1$, $\text{FDR} < 0.01$) após 24 horas de indução osteogênica por sequenciamento de RNAm total e associado polissomos pesados

Tabela S6. Análise do *fold change* dos transcritos identificados por sequenciamento de RNAm total de hASCs não-induzidas e induzidas para adipogênese por 24 horas

Tabela S7. Análise do *fold change* dos transcritos identificados por sequenciamento de RNAm associado a polissomos pesados de hASCs não-induzidas e induzidas para adipogênese por 24 horas

Tabela S8. Análise do *fold change* dos transcritos identificados por sequenciamento de RNAm associado a monossomos/polissomos leves de hASCs não-induzidas e induzidas para adipogênese por 24 horas

Tabela S9. Análise de ontologia gênica (gProfiler) de transcritos identificados como regulados negativamente ($\log_2(\text{FC}) < -1$, $\text{FDR} < 0.01$) ou positivamente ($\log_2(\text{FC}) > 1$, $\text{FDR} < 0.01$) após 24 horas de indução adipogênica por sequenciamento de RNAm total e associado polissomos pesados

Tabela S10. Análise de ontologia gênica (KEGG) de transcritos identificados como regulados negativamente ($\log_2(\text{FC}) < -1$, $\text{FDR} < 0.01$) ou positivamente ($\log_2(\text{FC}) > 1$, $\text{FDR} < 0.01$) após 24 horas de indução adipogênica por sequenciamento de RNAm total e associado polissomos pesados

Tabela S11. Resultado da análise por espectrometria de massas da imunoprecipitação de DDX6 e do controle de pré-limpeza de hASCs não-induzidas e induzidas para adipogênese e osteogênese por 24 horas.

Tabela S12. Proteínas identificadas como associadas a DDX6 em hASCs não-induzidas e induzidas para adipogênese e osteogênese por 24 horas, após o processo de filtração.

Tabela S13. Análise de ontologia gênica (gProfiler) das proteínas identificadas como associadas a DDX6 em hASCs não-induzidas e induzidas para adipogênese e osteogênese por 24 horas.