

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

JAIESA ZYCH

ANÁLISE EPIGENÉTICA DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS NA INDUÇÃO
ADIPOGÊNICA

CURITIBA

2013

JAIESA ZYCH

ANÁLISE EPIGENÉTICA DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS NA INDUÇÃO
ADIPOGÊNICA

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Departamento de Biologia Celular e Molecular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Biologia Celular e Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Alejandro Correa

CURITIBA

2013

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas

Zych, Jaiesa

Análise epigenética de células-tronco mesenquimais na indução
adipogênica. / Jaiesa Zych. – Curitiba, 2013.

154 f.: il. ; 30cm.

Orientador: Alejandro Correa

Tese (doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências
Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

1. Células-tronco 2. Células - Diferenciação 3. Adipogenia I. Título II.
Correa, Alejandro III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências
Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

CDD (20. ed.) 574.8761

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Departamento de Biologia Celular e Departamento de Fisiologia
Setor de Ciências Biológicas - Universidade Federal do Paraná
Instituto Carlos Chagas (ICC/FIOCRUZ)

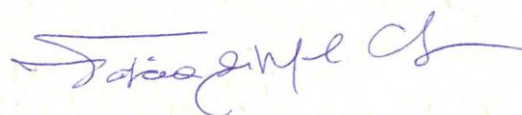
PARECER

A banca examinadora, instituída pelo colegiado do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, do Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná, composta por:

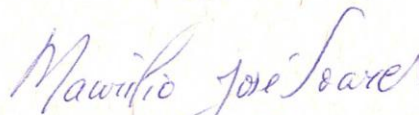
Prof. Dr. Alejandro Correa Dominguez
Orientador e presidente da banca
Instituto Carlos Chagas - ICC



Profa. Dra. Valéria de Mello Coelho
Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ



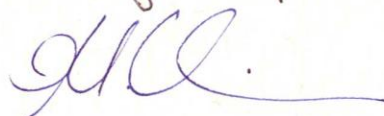
Prof. Dr. Maurílio José Soares
Instituto Carlos Chagas - ICC



Prof. Dr. Paulo Roberto Slud Brofman
Pontifícia Universidade Católica do Paraná - PUCPR



Profa. Dra. Olga Meiri Chaim
Universidade Federal do Paraná - UFPR



E tendo como suplentes,

Profa. Dra. Fabíola Barbieri Holetz
Instituto Carlos Chagas - ICC

Após arguir a candidata **Jaiesa Zych**, em relação ao seu trabalho intitulado: "Análise epigenética de células-tronco mesenquimais na indução adipogênica" são de parecer favorável à **APROVAÇÃO** da acadêmica, habilitando-a ao título de Doutora em Biologia Celular e Molecular, área de concentração Biologia Celular e Molecular.

A obtenção do título está condicionada à implementação das correções sugeridas pelos membros da banca examinadora, bem como ao cumprimento integral das exigências estabelecidas no Regimento Interno deste Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 25 de Março de 2013

Ao meu esposo Sandro e a minha família.

Por toda a compreensão e apoio.

Ao nosso bebê que está a caminho trazendo muita felicidade.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela capacidade de pensar e concretizar. Pela capacidade de discernir. Por acreditar.

Ao meu amado esposo, Sandro. “Na alegria e na tristeza, na saúde e na doença, durante todos os dias de nossas vidas”. Incluindo o doutorado! Agradeço principalmente pela paciência, pelo apoio nos momentos de desespero e pelas palavras de incentivo. Obrigada por ajudar sempre que possível, tentando tornar tudo mais fácil, especialmente nestes últimos tempos.

A minha família. Obrigada pelo incentivo. Por compreender a ausência, a falta de paciência, o mau humor.

Ao Alejandro Correa, meu querido orientador. Pelo excelente convívio, pelo auxílio prestado, por proporcionar um ambiente ótimo de se trabalhar.

Ao Samuel Goldenberg e ao Bruno Dallagiovanna por todo o apoio e confiança dispensados.

Aos colegas do Laboratório de Biologia Básica de Células-tronco (Labcet): Marco Augusto Stimamiglio, Crisciele Kuligovski, Patrícia Shigunov, Alessandra Aguiar, Andressa Schittini, Axel Cofré, Ana Paula Abud, Ana Carolina Origa, Anny Robert, Bruna Marcon e Elizabeth de Moraes. Pela parceria nos bons e maus momentos. Pelos conselhos profissionais e pessoais. Agradeço também por proporcionarem uma excelente convivência.

Aos pesquisadores Maurílio José Soares, Stênio Perdigão Fragoso e Christian Probst pelo auxílio científico e pela contribuição com o trabalho.

Ao colega Paulo Arauco pela contribuição com o trabalho.

Ao pessoal técnico, administrativo e de manutenção do Instituto Carlos Chagas por propiciarem excelentes condições de trabalho.

A toda a equipe do Núcleo de Tecnologia Celular da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, em especial Alexandra Senegaglia, Lidiane Maria Boldrini, Carmen Rebellato, Paula Hansen, Fabiane Barchick e ao Paulo Brofman.

À equipe da Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular da Universidade Federal do Paraná, em especial ao Edvaldo Trindade e à Marlene por toda a atenção dispensada.

À Lucía Spangenberg e a Hugo Naya, da Unidad de Bioinformática do Institut Pasteur de Montevideo, pela contribuição com o trabalho.

À Plataforma Multiusuários de Microscopia da Fundação Osvaldo Cruz do Rio de Janeiro, em especial à Suzana Côrte-Real Faria.

Às agências de fomento e de financiamento, Fiocruz e Fundação Araucária, e em especial ao CNPq, por financiar este trabalho através do edital CT-SAÚDE/MS/SCTIE/DECIT/MCT/CNPQ 17/2008.

“Dois homens olharam através das grades da prisão; um viu a lama, o outro as estrelas.”

Santo Agostinho

RESUMO

A diferenciação celular é acompanhada por mudanças no perfil da expressão gênica. Mecanismos epigenéticos envolvendo estrutura da cromatina e arquitetura nuclear regulam estas alterações. A diferenciação adipogênica de células-tronco mesenquimais isoladas da medula óssea (CTMs-MO) ou de tecido adiposo (CTMs-TA) foi utilizada como modelo para investigar estes mecanismos. A análise da lâmina nuclear, dos nucléolos e das histonas modificadas me/2me/3meH3K4, 3meH3K9, 3meH3K27, H2AZ e acH3 permitiu estabelecer um modelo inicial das alterações ocorridas. Os efeitos dos mecanismos epigenéticos na diferenciação adipogênica foram investigados utilizando-se os agentes modificadores de cromatina tricostatina A (TSA), um inibidor de histona desacetilases, e 5-aza-2'-deoxicitidina (5azadC), um agente desmetilante. Culturas subconfluentes de CTMs foram tratadas com 5, 50 ou 500 nM de TSA ou com 1, 10 ou 100 nM de 5azadC durante dois dias antes de se iniciar a indução da adipogênese. Após 14 dias, a diferenciação foi quantificada pela absorbância do corante Oil Red O e a expressão dos genes adipogênicos PPARG e FABP4, e do gene anti-adipogênico GATA2 foi avaliada por qPCR. O tratamento com 500 nM de TSA significativamente aumentou a expressão de acH3, embora a proliferação celular tenha diminuído nesta concentração. A TSA significativamente reduziu a adipogênese, exceto o tratamento com 5 nM em CTMs-MO. No entanto, houve associação parcial entre diferenciação e expressão gênica. O tratamento com 5azadC significativamente diminuiu a diferenciação adipogênica em todas as condições avaliadas e isto resultou na regulação negativa de PPARG e FABP4, e positiva de GATA2. Embora o conteúdo de DNA não tenha mudado nos tratamentos com 5azadC, a proliferação celular foi reduzida 24 horas após o término dos tratamentos. A resposta aos tratamentos foi mais acentuada em CTMs-TA do que em CTMs-MO, sugerindo a existência de distintas memórias epigenéticas conforme a origem celular. Como a assinatura epigenética afeta a diferenciação, ao se conhecer qual a linhagem-alvo preferencial daquela fonte de CTM, é possível direcionar seu uso nas terapias celulares. Assim, cada tipo celular teria uma aplicação específica visando melhorar a eficiência do processo de diferenciação.

Palavras-chave: células-tronco mesenquimais. Diferenciação adipogênica. Arquitetura nuclear. Tricostatina A. 5-aza-2'-deoxicitidina.

ABSTRACT

Cellular differentiation is followed by alterations in the pattern of gene expression. Epigenetic mechanisms involving chromatin structure and nuclear architecture regulate these changes. Adipocyte differentiation of mesenchymal stem cells isolated from bone marrow (BM-MSCs) or adipose tissue (ADSCs) were used to investigate these changes. Analysis of nuclear lamin, nucleoli, histone modifications me/2me/3meH3K4, 3meH3K9, 3meH3K27, H2AZ and acH3 resulted in an initial model of the changes found. The effects of these epigenetic mechanisms in adipocyte differentiation were investigated using the chromatin-modifying agents, trichostatin A (TSA), a histone deacetylases inhibitor, and 5-aza-2'-deoxycytidine (5azadC), a demethylating agent. Subconfluent MSCs cultures were treated with 5, 50 or 500 nM of TSA or with 1, 10 or 100 μ M of 5azadC for two days before starting adipogenesis induction. After 14 days, differentiation was quantified by absorbance of Oil Red O stain, and the expression of the adipocyte genes, PPARG and FABP4, and of the anti-adipocyte gene, GATA2, was evaluated by qPCR. Treatment with 500 nM of TSA significantly increased acH3 expression, although cell proliferation had been decreased in this concentration. TSA significantly reduced adipogenesis, except treatment with 5 nM in BM-MSCs. However, there was a partial association between differentiation and gene expression. 5azadC treatment significantly decreased adipocyte differentiation in all conditions evaluated, and this resulted in downregulation of PPARG and FABP4, and upregulation of GATA2. Although, DNA content did not change with 5azadC treatment, cell proliferation was reduced 24 h after completion of treatments. Treatment response was stronger in ADSCs than in BM-MSCs, suggesting the existence of distinct epigenetic memories according to cell origin. As epigenetic signatures affect differentiation, to know the preferential lineage target of the MSC source could direct the use of MSCs in cell therapies. Thereby, each cell source would have a specific application aiming to improve the differentiation process efficiency.

Keywords: Mesenchymal stem cells. Adipocyte differentiation. Nuclear architecture. Trichostatin A. 5-aza-2'-deoxycytidine.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2me	- dimetilação
3me	- trimetilação
5aza	- 5-azacitina
5azadC	- 5-aza-2'-deoxicitidina
ac	- acetilação
acH3	- acetilação da histona 3
BMP4	- <i>bone morphogenetic protein 4</i>
BrdU	- 5-bromo-2-deoxiuridina
BSA	- Albumina de soro bovino (<i>Bovine serum albumin</i>)
BSS	- Solução salina balanceada (<i>Balanced salt solution</i>)
BSS-CMF	- Solução salina balanceada livre de cálcio e magnésio (<i>Balanced salt solution, calcium and magnesium free</i>)
cDNA	- ácido desoxirribonucléico complementar (<i>complementary desoxiribonucleic acid</i>)
CF	- centro fibrilar
CFD	- componente fibrilar denso
CG	- componente granular
ChIP	- Imunoprecipitação da cromatina
CO ₂	- gás carbônico ou dióxido de carbono
COL1A1	- collagen, type I, alpha 1
COL2A1	- collagen, type II, alpha 1
CPN	- complexo do poro nuclear
CT	- célula-tronco
CTE	- célula-tronco embrionária
CTM	- células-tronco mesenquimal
CTM-MO	- células-tronco mesenquimais isoladas de medula óssea
CTMs-TA	- células-tronco mesenquimal isoladas de tecido adiposo
DAPI	- 4,6-diamidino-2-fenilindol
DMEM	- Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	- ácido desoxirribonucléico (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
DNase	- desoxirribonuclease
DES	- desmina
EDTA	- ácido etilenodiaminotetracético
EN	- envelope nuclear
FABP4	- <i>fatty acid-binding protein 4</i>
GAPDH	- gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GATA2	- <i>Gata binding protein 2</i>
H1	- histona 1
H3	- histona 3
H3K27	- lisina 27 da histona 3
H3K4	- lisina 4 da histona 3
H3K9	- lisina 9 da histona 3
HAT	- histona acetiltransferase
HDAC	- histona desacetilase
HDACi	- inibidor de histona desacetilase
K	- lisina

me	- metilação
MET	- microscopia eletrônica de transmissão
MNE	- membrana nuclear externa
MNI	- membrana nuclear interna
mRNA	- ácido ribonucléico mensageiro (<i>messenger ribonucleic acid</i>)
mRNP	- ribonucleoproteína mensageira
NaOH	- hidróxido de sódio
NBT	- cloreto de nitroazul de tetrazólio (<i>nitro blue tetrazolium</i>)
NPM1	- nucleofosmina
ORO	- <i>Oil Red O</i>
PBS	- solução salina fosfatada tamponada (<i>phosphated buffer solution</i>)
PCR	- reação em cadeia da polimerase (<i>polymerase chain reaction</i>)
PF	- paraformaldeído
PPARG	- <i>peroxisome proliferator-activated nuclear receptor gamma</i>
qPCR	- PCR quantitativo (<i>quantitative PCR</i>)
R	- arginina
RNA	- ácido ribonucléico (<i>ribonucleic acid</i>)
RNase	- ribonuclease
RNP	- ribonucleoproteína
rRNA	- RNA ribossomal
rRNP	- ribonucleoproteína ribossomal
SDS	- dodecil sulfato de sódio (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SDS-PAGE	- eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante
SFB	- soro fetal bovino
snoRNA	- pequenos RNAs nucleolares (<i>small nucleolar RNAs</i>)
snoRNP	- ribonucleoproteínas pequenas nucleares (<i>small nucleolar ribonucleoproteins</i>)
snRNP	- pequenas ribonucleoproteínas nucleares (<i>small nuclear ribonucleoproteins</i>)
TC	- território cromossômico
TP73	- <i>tumor protein p73</i>
Tris	- hidroximetil aminometano (<i>hydroxymethyl aminomethane</i>)
TSA	- Tricostatina A
VN	- Vermelho Nilo

LISTA DE SÍMBOLOS

%	- percentual
cm ²	- centímetro quadrado
d	- dia(s)
Da	- Dalton
g	- grama
h	- hora(s)
kb	- 1000 nucleotídeos em RNA ou 1000 pares nucleotídeos em DNA
M	- molar ou mol/L
Mb	- 1000 kb
mg	- miligrama
mg/ml	- migrama por mililitro
min	- minuto(s)
ml	- mililitro
mM	- milimolar
mm ³	- mililitro cúbico
ng	- nanograma
ng/ml	- nanograma por mililitro
nM	- nanomolar
°C	- graus celsius
p	- significância
pb	- pares de base
pH	- potencial hidrogeniônico
pmol	- picomolar
rpm	- rotações por minutos
s	- segundo(s)
U/ml	- unidades por mililitro
UI/ml	- unidades internacionais por mililitro
µg	- micrograma
µl	- microlitro
µm	- micrômetro
µM	- micromolar
x g	- multiplicação pela aceleração gravitacional

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS (CTMs)	14
1.2 ARQUITETURA NUCLEAR	18
1.2.1 Subcompartimentos nucleares	18
1.2.2 Territórios cromossômicos	23
1.2.3 Modificações da cromatina	25
1.2.3.1 Acetilação de histonas	27
1.2.3.2 Metilação de histonas	28
1.2.3.3 Metilação do DNA	29
1.2.4 Organização espacial da cromatina	30
1.3 A ARQUITETURA NUCLEAR E A CROMATINA DE CÉLULAS-TRONCO	31
1.4 AGENTES MODIFICADORES DA CROMATINA	35
1.4.1 Agente inibidor de HDACs: tricostatina A (TSA)	35
1.4.2 Agentes desmetilantes de DNA: 5-azacitidina e 5-aza-2'-deoxicitidina	35
2 JUSTIFICATIVA	37
3 HIPÓTESES	39
4 OBJETIVOS	40
4.1 OBJETIVO GERAL	40
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	40
5 MATERIAIS E MÉTODOS	41
5.1 OBTENÇÃO E CULTIVO DAS CTMs	41
5.1.1 Obtenção e cultivo das CTMs-MO	42
5.1.2 Obtenção e cultivo das CTMs-TA	43
5.2 INDUÇÃO ADIPOGÊNICA <i>IN VITRO</i> DAS CTMS	44
5.3 IMUNOFLUORESCÊNCIA	44
5.4 ANÁLISE DE PROTEÍNAS POR WESTERN BLOTTING	45
5.4.1 Preparo de extrato celular de proteínas	45
5.4.2 Quantificação de proteínas utilizando 2D-Quant	45
5.4.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida	46
5.4.4 <i>Immunoblotting</i>	46
5.4.5 Quantificação de bandas de <i>immunoblotting</i>	47
5.5 QUANTIFICAÇÃO DA DIMENSÃO NUCLEAR	47
5.6 QUANTIFICAÇÃO DO NÚMERO E ÁREA DOS NUCLÉOLOS	48
5.7 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO	49
5.8 TRATAMENTOS COM TSA E 5AZADC	50
5.9 MARCAÇÃO COM OIL RED O	50
5.10 MARCAÇÃO COM VERMELHO NILO	51
5.11 QUANTIFICAÇÃO DA DIFERENCIAÇÃO ADIPOGÊNICA	51
5.11.1 Análise da absorvância de <i>Oil Red O</i>	51
5.11.2 Contagem de células marcadas com Vermelho Nilo	52
5.12 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE GÊNICA POR PCR	52
5.12.1 Extração de RNA	52
5.12.2 Síntese de cDNA	53
5.12.3 Iniciadores	54
5.12.4 PCR	54
5.12.5 PCR em tempo real	54
5.13 ANÁLISE DO CONTEÚDO DE METILCITOSINA	55

5.13.1 Extração de DNA.....	55
5.13.2 SLOT BLOT.....	56
5.13.3 Imunomarcação.....	56
5.13.4 Revelação por quimioluminescência.....	56
5.14 ANÁLISE DA PROLIFERAÇÃO CELULAR PELA INCORPORAÇÃO DE BRDU	
57	
5.15 IMUNOPRECIPITAÇÃO DA CROMATINA.....	57
5.15.1 Fixação das células.....	58
5.15.2 Lise celular.....	59
5.15.3 Imunoprecipitação de proteína/DNA fixado.....	59
5.15.4 Eluição dos complexos proteína/DNA e purificação do DNA.....	60
5.16 SEQUENCIAMENTO.....	61
5.17 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	61
6 RESULTADOS.....	63
6.1 ANÁLISE DA ARQUITETURA NUCLEAR E DA CROMATINA DE CTMS NA	
DIFERENCIAÇÃO ADIPOGÊNICA.....	63
6.2 EFEITO DO TRATAMENTO COM TSA NA ADIPOGÊNESE DE CTMS.....	79
6.3 EFEITO DO TRATAMENTO COM TSA NA PROLIFERAÇÃO CELULAR.....	86
6.4 EFEITO DO TRATAMENTO COM 5AZADC NA ADIPOGÊNESE DE CTMS.....	86
6.5 EFEITO DO TRATAMENTO COM 5AZADC NA PROLIFERAÇÃO CELULAR.....	93
6.6 ANÁLISE DO PERFIL EPIGENÉTICO DAS CTMS NA DIFERENCIAÇÃO	
ADIPOGÊNICA.....	94
7 DISCUSSÃO.....	97
8 CONCLUSÃO.....	107
9 PERSPECTIVAS.....	108
REFERÊNCIAS.....	109
APÊNDICES.....	118
APÊNDICE A – LISTA DE INICIADORES.....	119
APÊNDICE B – LISTA DE ANTICORPOS.....	120
APÊNDICE C – PREPARO DE SOLUÇÕES E MEIOS DE CULTURA.....	122
ANEXOS.....	128
ANEXO A – APROVAÇÃO DO CEP.....	129
ANEXO B – ARTIGO SUBMETIDO.....	130

1 INTRODUÇÃO

1.1 CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS (CTMs)

As células-tronco (CTs) são células indiferenciadas caracterizadas pela capacidade de autorrenovação e diferenciação. A autorrenovação é consequência da divisão celular que ocorre dentro do microambiente onde a CT reside (nicho). Dentro do nicho o número de CT é mantido constante pelo balanço entre células quiescentes e ativadas. A divisão da CT pode ser assimétrica, resultando em uma célula-tronco e uma progenitora, ou simétrica, resultando em duas CTs-filhas. (MARTINO, D'ANGELO *et al.*, 2012).

As CTs podem ser derivadas do embrião, constituindo as chamadas células-tronco embrionárias (CTEs), do feto ou do adulto, estas duas últimas chamadas de células-tronco adultas (CTAs) ou somáticas. Adicionalmente, células adultas podem ser reprogramadas geneticamente para apresentar um comportamento similar ao de CTEs, constituindo as células-tronco pluripotente induzidas (*induced pluripotent stem cells*, iPSCs) (FIGURA 1).

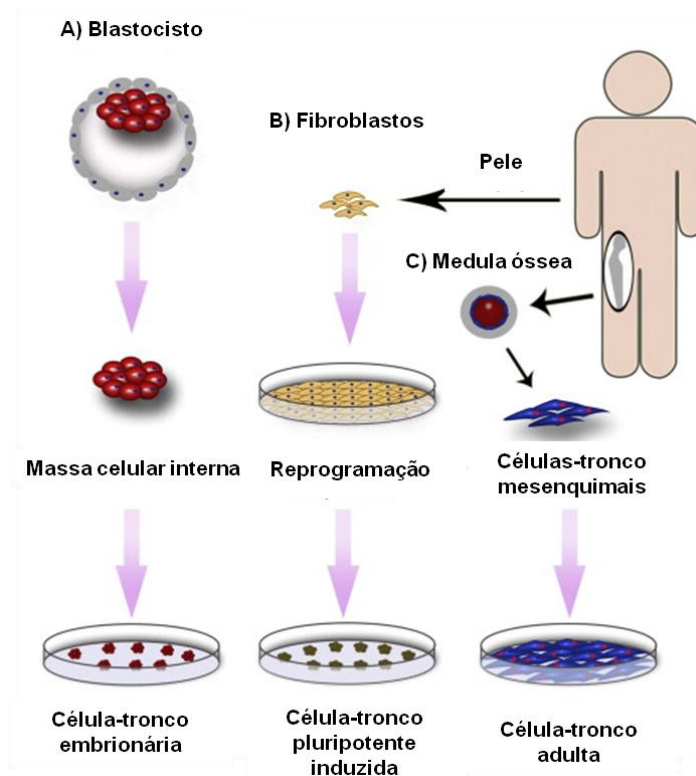


FIGURA 1 - Diferentes tipos de células-tronco e suas formas de obtenção. (A) As células-tronco embrionárias são derivadas da massa celular interna do blastocisto. (B) As células-tronco pluripotentes induzidas podem ser obtidas a partir da reprogramação de células já diferenciadas, como por exemplo, fibroblastos isolados da pele. (C) As células-tronco adultas podem ser isoladas de vários órgãos ou tecidos, tal como a medula óssea de onde, por exemplo, são obtidas as células-tronco mesenquimais.

FONTE: MARTINO, D'ANGELO *et al.* (2012).

As CTEs são células pluripotentes, ou seja, são capazes de se desenvolver em células e tecidos dos três folhetos germinativos (PASSIER E MUMMERY, 2003; SHUFARO E REUBINOFF, 2004). Já as CTAs apresentam uma capacidade mais restrita de diferenciação e são consideradas multipotentes. Estas células existem para assegurar que quando as células nos tecidos naturalmente expirem, possam ser eficientemente substituídas para proporcionar o balanço fisiológico no organismo. Além disso, servem como células de reserva para tecidos adultos comprometidos ou danificados que requerem regeneração, reparo ou expansão mais extensos. Portanto, tipicamente geram os tipos celulares do tecido no qual residem (WAGERS e WEISSMAN, 2004; CAPLAN e DENNIS, 2006).

Entre as diferentes populações de CTAs estão as células-tronco mesenquimais (CTMs), que podem ser isoladas praticamente de todos os órgãos e tecidos (DA SILVA MEIRELLES, CHAGASTELLES *et al.*, 2006).

As CTMs constituem uma subpopulação heterogênea de células estromais que podem diferenciar em células da linhagem mesodermal, tais como adipócitos, osteócitos e condrócitos, bem como em células de linhagens endodérmicas e neuroectodérmicas, em um processo conhecido como transdiferenciação. Esta capacidade pode ser explicada pela origem dos tecidos mesenquimais durante o desenvolvimento, que inclui a mesoderme e, em menor extensão, a crista neural craniana. Embora comumente se considere que as CTMs adultas possuem origem mesodermal, tem-se demonstrado que CTMs embrionárias derivam principalmente do neuroepitélio e da crista neural. Apesar da evidência que CTMs possam transdiferenciar em múltiplos tipos celulares *in vitro* e *in vivo*, a real contribuição das CTMs para o reparo tecidual, através do enxerto e da diferenciação significativos em tipos celulares tecido-específicos relevantes biologicamente e funcionalmente, ainda não é clara. A falta de transdiferenciação consistente *in vivo* pode ser resultado do número limitado de células precursoras celulares derivadas das linhagens embrionárias não mesodermis (UCCELLI, MORETTA *et al.*, 2008).

As CTMs são caracterizadas pela aderência ao plástico quando mantidas em condições padrão de cultura, têm morfologia fibroblastóide e formam colônias *in vitro*. Não possuem marcadores específicos e únicos, mas há um consenso geral que $\geq 95\%$ da população de CTMs humanas deve expressar CD105, CD73 e CD90, sendo que não devem expressar ($\leq 2\%$ positivas) CD45, CD34, CD14 ou CD11b, CD79 α ou CD19 e HLA-DR. (DOMINICI, LE BLANC *et al.*, 2006; UCCELLI, MORETTA *et al.*, 2008) (FIGURA 2).

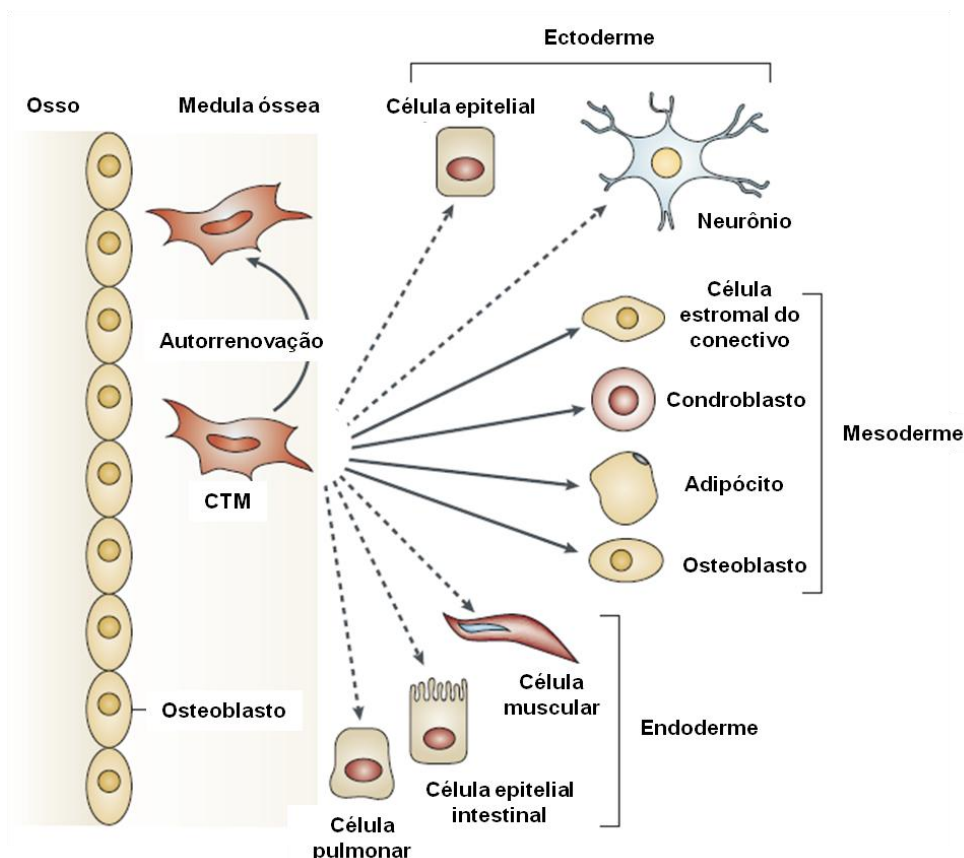


FIGURA 2 - Multipotencialidade das células-tronco mesenquimais (CTMs). CTMs obtidas de medula óssea são capazes de diferenciar em linhagens mesodermas *in vitro* e *in vivo* (setas sólidas). A transdiferenciação em linhagens endodermal e ectodermal (setas pontilhadas) é controversa *in vivo*. FONTE: UCCELLI, MORETTA *et al.* (2008).

O processo de diferenciação das CTs é acompanhado por mudanças na morfologia e função celular, as quais são determinadas em cada estágio por distintos modelos de expressão gênica que dão a cada tipo celular um perfil transcricional característico (WU e SUN, 2006). Alterações na organização nuclear e na estrutura da cromatina, uma vez que determinam uma configuração específica em genes regulatórios e regiões codificantes, estabelecem modelos herdáveis de expressão gênica em resposta aos sinais recebidos (ARNEY e FISHER, 2004; COLLAS, 2009).

1.2 ARQUITETURA NUCLEAR

1.2.1 Subcompartimentos nucleares

O núcleo de células de mamíferos é uma organela compartimentalizada que apresenta um alto grau de organização espacial e funcional (MISTELI, 2005; FEDOROVA e ZINK, 2008). Abriga os cromossomos, cada um consistindo de um polímero de DNA complexado com histonas e outras proteínas formando a cromatina. Em humanos, 22 pares de autossomos e dois cromossomos sexuais estão compactados dentro do volume nuclear. Eles estão separados do citoplasma por um envelope nuclear (EN) (MORRIS, CHOTALIA *et al.*, 2010).

O EN tem uma função primordial em organizar este arranjo. É composto de duas membranas, a membrana nuclear interna (MNI) e a membrana nuclear externa (MNE), e é atravessado por complexos de poro nuclear (CPN), responsáveis pelo tráfego de proteínas e RNA para dentro e fora do núcleo. Delineando e interagindo com a MNI encontra-se a lâmina nuclear (MORRIS, CHOTALIA *et al.*, 2010; HAMPOELZ e LECUIT, 2011).

A lâmina nuclear exerce diversas funções em muitos processos nucleares, incluindo a remontagem do núcleo após a mitose, organização da cromatina e expressão gênica (MORRIS, CHOTALIA *et al.*, 2010). É composta por uma malha de filamentos intermediários que incluem as laminas tipo A e tipo B. As laminas tipo A (A, C, AD10 e C2) são produtos do processamento alternativo do mesmo gene precursor, LMNA, que é regulado e expresso conforme o desenvolvimento em células diferenciadas e tecidos, mas ausente em CTEs. As laminas tipo B são expressas em todos os tipos celulares e são ou produtos do gene LMNB1, codificante de lamina B1, ou do gene LMNB2, codificante de lamina B2 e B3 (MÉJAT e MISTELI, 2010; HAMPOELZ e LECUIT, 2011).

Associações da cromatina com a lâmina nuclear estão envolvidas com a regulação negativa da expressão gênica para alguns, mas nem todos, os genes associados. É também uma área onde a heterocromatina facultativa tipicamente se acumula em células de mamíferos em diferenciação (MORRIS, CHOTALIA *et al.*, 2010).

Dentro do interior do núcleo, uma compartimentalização estrutural e funcional é observada pelo estabelecimento de complexos de ordem superior que se agregam para formar domínios referidos como corpos nucleares ou compartimentos nucleares (MORRIS, CHOTALIA *et al.*, 2010). Diferentemente das organelas citoplasmáticas convencionais, os corpos nucleares não são delineados por membranas lipídicas e sua integridade estrutural parece ser inteiramente mediada por interações proteína-proteína e possivelmente proteína-RNA (AUSTIN e BELLINI, 2010; DUNDR e MISTELI, 2010). Entre os principais corpos nucleares estão os nucléolos, os corpos de Cajal, os *splicing speckles* ou grânulos de intercromatina, os corpos *Polycomb*, os corpos de clivagem, os corpos *Promyelocytic leukemia* (PML) e os *Paraspeckles* (MISTELI, 2005; FEDOROVA e ZINK, 2008; AUSTIN e BELLINI, 2010; MORRIS, CHOTALIA *et al.*, 2010) (FIGURA 3).

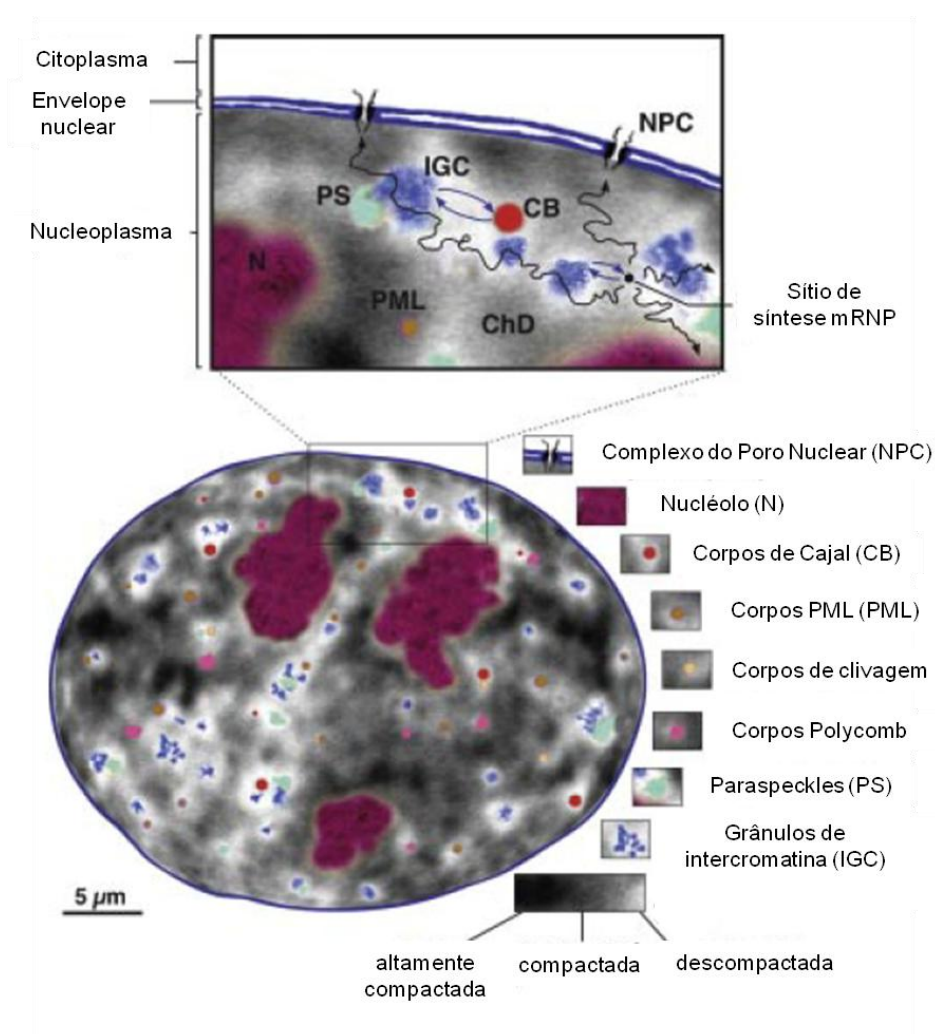


FIGURA 3 - Representação esquemática do núcleo celular. Os domínios da cromatina são mostrados em cinza/preto com regiões altamente condensadas em preto e menos condensadas em cinza. Regiões em branco correspondem a domínio de intercromatina. Exceto para o envelope nuclear e os

complexos de poro nuclear, todas as estruturas estão desenhadas em escala. A região nuclear delimitada pelo quadro está aumentada para ilustrar os movimentos randômicos da difusão de ribonucleoproteínas mensageiras (mRNPs) a partir de seu sítio de síntese (setas pretas) bem como os movimentos dos fatores de processamento de RNA (setas azuis).
FONTE: AUSTIN e BELLINI (2010).

O nucléolo é uma organela nuclear proeminente e altamente dinâmica onde as etapas iniciais da biogênese dos ribossomos ocorrem. É o sítio onde os genes de rDNA são transcritos pela RNA polimerase I em longos transcritos precursores, os pré-RNA ribossomais. Três dos quatro RNA ribossomais (rRNAs), os rRNAs 18S, 5.8S e 25/28S, residem nestes transcritos primários (THIRY, LAMAYE *et al.*, 2011).

A principal função do nucléolo é a rápida produção das subunidades maior e menor dos ribossomos. Em células de mamíferos, o nucléolo se desmonta quando a célula se divide e se remonta ao final da mitose ao redor de agrupamentos de genes rRNA repetidos em *tandem*, conhecidos como regiões organizadoras nucleolares. Isto resulta em um compartimento subnuclear que concentra os fatores envolvidos na transcrição de rRNA e processamento, bem como a montagem das subunidades ribossomais (BOULON, WESTMAN *et al.*, 2010).

A morfologia e tamanho dos nucléolos estão ligados à atividade nucleolar, que por sua vez depende do crescimento celular e metabolismo (AUSTIN e BELLINI, 2010; BOULON, WESTMAN *et al.*, 2010).

Adicionalmente, o nucléolo parece estar envolvido em funções adicionais que podem não estar diretamente relacionadas à biogênese das subunidades dos ribossomos. As diversas funções das mais de 4500 proteínas associadas ao nucléolo identificadas através de experimentos de proteômica são consistentes com funções adicionais. Somente cerca de 30% delas têm uma função claramente relacionada à produção das subunidades ribossomais, as outras funções incluem biogênese de múltiplas ribonucleoproteínas (RNPs), controle do ciclo celular, apoptose, infecção viral, replicação do DNA e reparo (BOULON, WESTMAN *et al.*, 2010).

Os três principais eventos que ocorrem dentro do nucléolo - transcrição do pré-rRNA, processamento e montagem de RNP ribossomais (rRNPs) - refletem na sua estrutura interna tripla. Estes eventos, ou pelo menos as moléculas que os medeiam, estão concentrados em três compartimentos subnucleolares distintos chamados centro fibrilar (CF), componente fibrilar denso (CFD) e o componente granular (CG). É geralmente aceito que o pré-rRNA é transcrito a partir do rDNA ou

no CF ou na borda entre CF e CFD. Os CFs estão enriquecidos em componentes da maquinaria da RNA polimerase I, enquanto o CFD abriga fatores de processamento de pré-rRNAs, tais como as proteínas snoRNAs (pequenos RNAs nucleolares) e snoRNPs (pequenas ribonucleoproteínas nucleolares), fibrilarina e Nop58 (BOULON, WESTMAN *et al.*, 2010).

A fibrilarina é uma componente das pequenas ribonucleoproteínas nucleares (snRNPs) e exerce função importante no processamento de pré-rRNA. Além disso, a fibrilarina se associa com os snRNAs (pequenos RNAs nucleares) U3, U8 e U13 (BÁRTOVÁ, HORÁKOVÁ *et al.*, 2010).

A nucleofosmina (*nucleophosmin*, NPM1) é uma fosfoproteína encontrada no CG. É capaz de se ligar a muitas parceiras em diferentes compartimentos celulares, incluindo fatores nucleolares (nucleolina, fibrilarina e snoRNPs), fatores de transcrição, histonas (H3, H4 e H2B), proteínas envolvidas na proliferação celular, mitose e resposta a estresse oncogênico, e também se associa a DNA e RNA (GRISENDI, MECUCCI *et al.*, 2006).

A NPM1 possui várias funções celulares, incluindo processamento de rRNA, duplicação do centrossomo e controle de processos celulares para assegurar a estabilidade genômica. Sua atividade de endoribonuclease, que preferencialmente cliva pré-rRNA, sugere que ela poderia participar nos estágios tardios da biogênese de ribossomos (GRISENDI, MECUCCI *et al.*, 2006; LIM e WANG, 2006).

A habilidade de transitar entre núcleo e citoplasma durante o ciclo celular está relacionada às suas atividades de chaperona molecular, tais como impedir a agregação de proteínas, proteger enzimas durante a desnaturação térmica e facilitar a renaturação de proteínas quimicamente desnaturadas (COLLAS e TARANGER, 2006; GRISENDI, MECUCCI *et al.*, 2006).

A NPM1 é expressa em altos níveis em CTEs humanas e murinas (JOHANSSON e SIMONSSON, 2010) e em células ativamente proliferativas e malignas (LI, SEJAS *et al.*, 2006). Sua síntese rapidamente aumenta em resposta a estímulos mitogênicos e sua expressão é regulada negativamente em células sofrendo diferenciação ou apoptose. A NPM1 aumenta o potencial proliferativo de CT hematopoiéticas e aumenta sua sobrevivência ao estresse. É requerida para o desenvolvimento embrionário e estabilidade genômica (LI, SEJAS *et al.*, 2006).

Corpos de Cajal são corpos nucleares distintos que funcionam coordenando a maturação de certos RNAs nucleares, incluindo snRNAs, snoRNAs, e o

processamento de mRNAs de histonas. Eles são caracterizados pela proteína coilina p80, um componente estrutural comumente utilizado como um marcador (BOULON, WESTMAN *et al.*, 2010). O núcleo de hCTEs não contém Corpos de Cajal. A coilina é observada como um sinal fraco e difuso distribuído através do nucleoplasma. Os corpos de Cajal são mais definidos e se localizam na borda com a diferenciação (MORRIS, CHOTALIA *et al.*, 2010).

Splicing speckles ou *splicing factor compartments* ou grânulos de intercromatina são os principais domínios nucleares enriquecidos em componentes da maquinaria de *splicing*, incluindo snRNPs, necessários para o processamento de pré-mRNAs. Análises ultraestruturais revelaram que os *splicing speckles* com agrupamentos de grânulos eletrondensos de 20-25 nm dentro de espaços de intercromatina. O tamanho e formato dos *splicing speckles* são variados e refletem seu estado dinâmico. Imagina-se que fatores de *splicing* são diretamente recrutados dos *speckles*, onde estão estocados, para sítios ativos de transcrição (AUSTIN e BELLINI, 2010). No núcleo de hCTEs, *speckles* marcados com SC35 estão distribuídos difusamente através do nucleoplasma, mas com a diferenciação se tornam mais concentrados em *foci* discretos (MORRIS, CHOTALIA *et al.*, 2010).

Os corpos *Polycomb* provavelmente estão envolvidos na regulação de genes alvos específicos por oferecer um meio repressivo. Estas estruturas tem um tamanho de 0,3-1 µm em diâmetro, estão distribuídas através do núcleo celular e são caracterizadas por um enriquecimento em proteínas do Grupo Polycomb (GPc) (AUSTIN e BELLINI, 2010). As proteínas GPc são vitais para a expressão gênica em muitos tipos celulares. Estão envolvidas no silenciamento de um grande número de genes alvo, incluindo muitos genes regulatórios do desenvolvimento. Os genes alvo silenciados pelas proteínas GPc colocalizam com corpos *Polycomb* (AUSTIN e BELLINI, 2010). O *Polycomb repressor complex 1* (PRC1) possui uma subunidade composta de proteínas da família CBX, as quais podem se ligar a 3meH3K27 *in vitro*. Diferentes membros da família CBX exibem distintas distribuições subnucleares em CTEs murinas, a maioria das proteínas CBX estão enriquecidas em *foci*, conhecidos como corpos Polycomb, enquanto que com a diferenciação, o *foci* desaparece assim que as proteínas se dispersam (MORRIS, CHOTALIA *et al.*, 2010).

Os corpos de clivagem foram inicialmente descritos como *foci* nucleares enriquecidos em dois fatores: o fator de estimulação de clivagem CstF64 e o fator de

estimulação de clivagem e poliadenilação CPSF, que estão envolvidos no processamento da extremidade 3' de pré-mRNAs. Corpos de clivagem acumulam RNAs recém-sintetizados. Esta composição fortemente sugere uma função direta no processamento pós-transcricional de pré-mRNAs (AUSTIN e BELLINI, 2010).

Corpos PML compreendem diversas proteínas regulatórias e tem sido implicados em uma diversidade de processos celulares, incluindo organização da cromatina, replicação do DNA e regulação da transcrição. Em células somáticas os corpos PML aparecem como estruturas uniformes e esféricas. Em hCTEs, uma pequena proporção de células contém somente poucos corpos PML esféricos enquanto uma fração substancial da população contém estruturas definidas com uma morfologia elaborada categorizada em dois tipos: hastes lineares longas ou grandes rosetas (>2 µm). As estruturas PML em CTEs não diferem somente em morfologia, mas também na composição de proteínas: não são enriquecidas para marcadores que definem corpos PML somáticos, incluindo SUMO, Sp100 e Daxx. Estas estruturas únicas surgem transientemente nos estágios iniciais do comprometimento e estão ausentes após o estabelecimento da diferenciação. Estão também frequentemente associadas ao envelope nuclear, uma característica que não é observada em células somáticas (MORRIS, CHOTALIA *et al.*, 2010).

Os *Paraspeckles* (PS), descobertos recentemente, ainda não possuem funções claras na regulação das atividades nucleares. São estruturas dinâmicas, cuja presença depende da atividade transcricional da RNA polimerase II. São compostos pelas proteínas: PSP1, que se distribui também no nucleoplasma mas se acumula nos PS; PSP2, uma proteína envolvida no splicing de RNA e correção de receptores de hormônios esteroides; P54nrb, uma proteína multifuncional envolvida em vários processos tais como splicing de RNA e transcrição e regulação da proliferação celular; PSF, uma componente do spliceossomo (AUSTIN e BELLINI, 2010).

1.2.2 Territórios cromossômicos

Além da formação dos subcompartimentos nucleares, há uma organização dos cromossomos interfásicos em territórios cromossômicos (TCs) que estão

distribuídos não randomicamente em relação ao núcleo e em relação a outros cromossomos (MESHORER e MISTELI, 2006). Os TCs, incluindo subregiões *locus* específicas, adotam determinadas posições no espaço nuclear que são conservadas em diferentes tipos celulares e em vários estágios do ciclo celular. Um indicador do posicionamento de um cromossomo ou *locus* dentro do núcleo interfásico é a posição radial, definida como a localização de um dado elemento genético em relação ao centro ou periferia nuclear (HARNICAROVÁ HORÁKOVÁ, BÁRTOVÁ *et al.*, 2010).

Esta organização radial dos TCs parece ser influenciada por diversos fatores, como tamanho do cromossomo e densidade gênica. Cromossomos maiores tendem a ocupar zonas periféricas, enquanto cromossomos menores preferencialmente ocupam o interior do núcleo. TCs densos em genes tendem a se localizar no centro do núcleo, enquanto cromossomos escassos em genes tendem a se localizar na periferia nuclear. Também há variação específica dos TCs conforme o tipo celular e ao longo da diferenciação. O arranjo dos genes dentro dos TCs é outro parâmetro importante: alguns trabalhos mostram que genes ativos ou potencialmente ativos estão localizados preferencialmente na periferia dos TCs, enquanto outros relatam que não há posição preferencial (MISTELI, 2005; FEDOROVA e ZINK, 2008; SCHÖFER e WEIPOLTSHAMMER, 2008; NUNEZ, FU *et al.*, 2009).

A localização dos cromossomos pode influenciar o potencial de interações *trans* e ditar se um *locus* genômico está em um ambiente nuclear ativo ou repressivo: genes ativos podem relocar para regiões subnucleares especializadas na transcrição, enquanto o silenciamento é acompanhado pelo recrutamento para estruturas nucleares repressivas. Assim, imagina-se que a organização nuclear seja importante na regulação da expressão gênica já que o posicionamento de cromossomos e genes se correlaciona a sua atividade funcional. Estas posições preferenciais são provavelmente importantes pois variam entre os tecidos, entre os tipos celulares e durante o desenvolvimento (MARSHALL, 2003; MESHORER e MISTELI, 2006; FEDOROVA e ZINK, 2008; VAN BORTLE e CORCES, 2012).

Estudos revelaram que domínios cromossômicos transcricionalmente silenciosos são mais prováveis de interagir com formações perinucleares tais como a lâmina nuclear. Estes domínios são escassos em marcas de cromatina ativa, são flanqueados por regiões enriquecidas em sítios de ligação da proteína insuladora e

frequentemente contém genes corregulados. Genes associados à lâmina podem ser delas liberados com a ativação transcricional após o tratamento com inibidores de histona deacetilase, sugerindo que o silenciamento promove associação perinuclear (MEKHAIL e MOAZED, 2010).

Tem-se relatado o reposicionamento de genes e cromossomos durante a diferenciação de diversos tipos celulares e também entre diferentes tecidos. Genes que se tornam ativos durante a diferenciação precisam ser liberados do ambiente repressivo. Esta liberação pode ser acompanhada por um movimento de genes alterando sua posição radial no núcleo (SCHÖFER e WEIPOLTSHAMMER, 2008). Vários genes-chave de CTEs sofrem significativas mudanças posicionais durante a diferenciação (WIBLIN, CUI *et al.*, 2005; MESHORER e MISTELI, 2006). Similarmente, em outros sistemas de diferenciação, o reposicionamento de genes foi relatado: a regulação positiva da expressão levou a uma alteração radical da localização de genes envolvidos na adipogênese de CTMs, os quais passaram a se localizar em regiões mais centrais no núcleo (SZCZERBAL, FOSTER *et al.*, 2009).

1.2.3 Modificações da cromatina

Em uma célula eucariótica o DNA está empacotado em um complexo nucleoprotéico denominado cromatina (BOŠKOVIĆ, BENDER *et al.*, 2012). A unidade básica da cromatina é o nucleossomo, onde 147 pares de bases de DNA envolvem um hetero-octâmero de histonas (duas cópias de H3, H4, H2A e H2B). H3 e H4 formam um hetero-tetrâmero que é flanqueado por heterodímeros de H2A e H2B (WYRICK e PARRA, 2009). Uma organização de ordem superior é provida pela ação da histona ligante H1 e de proteínas não-histônicas (BOŠKOVIĆ, BENDER *et al.*, 2012).

As histonas são proteínas básicas pequenas ricas em aminoácidos lisina (K) e arginina (R). As histonas que formam o nucleossomo possuem dois domínios: um domínio C-terminal globular localizado dentro do cerne e uma cauda N-terminal se estendendo para fora do nucleossomo (KOUZARIDES, 2007; LENNARTSSON e EKWALL, 2009).

Mudanças na estrutura da cromatina ocorrem através da ação de complexos remodeladores da cromatina dependentes de ATP, de modificações pós-traducionais de histonas, ou da incorporação de proteínas específicas da cromatina como variantes de histonas (BOŠKOVIĆ, BENDER *et al.*, 2012).

A substituição das histonas por variantes é um nível de regulação da cromatina. Do cerne de histonas, H2A tem o maior número de variantes. A mais estudada é a H2AZ, uma proteína altamente conservada que possui múltiplas funções, incluindo manutenção da heterocromatina telomérica, supressão de RNAs antisense e memória epigenética. Apesar da alta conservação da sequência primária de H2AZ na evolução, as funções da proteína sofreram adaptações em diferentes organismos. Assim como as histonas canônicas, H2AZ pode sofrer modificação pós-traducional (BOŠKOVIĆ, BENDER *et al.*, 2012). H2AZ é um componente da eucromatina que a protege do espalhamento ectópico da heterocromatina silenciada (MENEGHINI, WU *et al.*, 2003).

Há pelo menos oito tipos distintos de modificações encontradas nas histonas (QUADRO 1). Ainda, as histonas são modificadas em muitos sítios: há mais de 60 diferentes resíduos de aminoácido onde modificações foram detectadas (FIGURA 4). Uma complexidade extra é proveniente de certa forma do fato que a metilação em K ou R pode ser de três formas diferentes: mono-, di- ou trimetilação para K e mono- ou di- (assimétrica ou simétrica) para R. Este vasto arranjo de modificações fornece um enorme potencial para respostas funcionais (KOUZARIDES, 2007).

MODIFICAÇÕES NA CROMATINA	RESÍDUOS MODIFICADOS
Acetilação	ac K
Metilação (lisinas)	me K, 2me K, 3me K
Metilação (argininas)	me R, a2me R, s2me R
Fosforilação	ph S, ph T
Ubiquitinação	ub K
Sumoilação	su K
ADP ribosilação	ar E
Deiminação	R > Cit
Isomerização da prolina	cis P > trans P

QUADRO 1 - CLASSES DE MODIFICAÇÕES IDENTIFICADAS NAS HISTONAS.
FONTE: KOUZARIDES (2007).

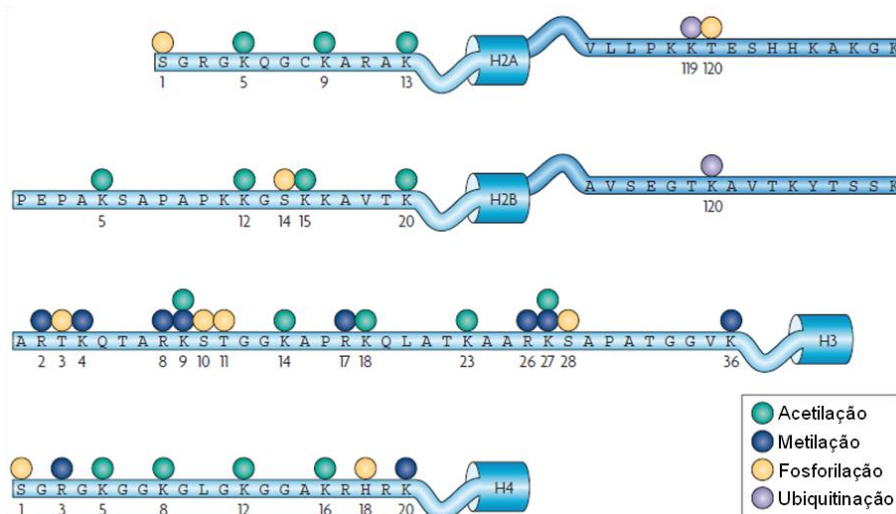


FIGURA 4 - Resíduos de aminoácidos nas caudas das histonas sujeitos a modificações. FONTE: SPIVAKOV e FISHER (2007).

Tendo em vista que a estrutura da cromatina pode influenciar a função gênica por afetar a acessibilidade de proteínas regulatórias a seus sítios-alvo e por modular a afinidade de reguladores transcricionais com seus alvos (MESHORER e MISTELI, 2006), as modificações nas histonas têm sido associadas com estado ativo ou inativo da cromatina, bem como com processos celulares específicos (KOUZARIDES, 2007).

1.2.3.1 Acetilação de histonas

A acetilação da cauda das histonas H3 e H4 geralmente está associada à cromatina ativa por aumentar a acessibilidade da maquinaria de transcrição, enquanto a desacetilação está associada à repressão (HARNICAROVÁ HORÁKOVÁ, BÁRTOVÁ *et al.*, 2010). O *turnover* da acetilação de histonas é altamente regulado pelo balanço de atividades opostas entre histona acetiltransferases (HATs) e histona desacetilases (HDACs) (KIM, CHOI *et al.*, 2009).

No genoma de mamíferos há 18 genes codificando para HDACs (KRETISOVALI, HADJIMICHAEL *et al.*, 2012). As HDACs que contêm zinco no seu sítio catalítico constituem a família clássica (classes I, II e IV, QUADRO 2), enquanto

as integrantes da família das sirtuínas (classe III) são dependentes de NAD⁺ e não possuem zinco no seu sítio catalítico (DOKMANOVIC, M., CLARKE, C. *et al.*, 2007; YANG e SETO, 2008). As HDACs classe I são ubiquamente expressas enquanto membros do grupo IIa mostram expressão tecido específica (KRETISOVALI, HADJIMICHAEL *et al.*, 2012).

GRUPO	MEMBROS	LOCALIZAÇÃO
I	HDAC1, HDAC2, HDAC3 e HDAC8	Núcleo
IIa	HDAC4, HDAC5, HDAC7 e HDAC9	Núcleo-citoplasma
IIb	HDAC6 e HDAC10	Citoplasma
IV	HDAC11	Núcleo-citoplasma

QUADRO 2 - CLASSIFICAÇÃO E LOCALIZAÇÃO DAS HISTONAS DESACETILASES (HDAC) CLÁSSICAS.
 FONTE: A Autora (2012).

1.2.3.2 Metilação de histonas

As metilações apresentam um efeito variado dependente dos aminoácidos envolvidos e de suas posições na cadeia protéica. Três sítios de metilação nas histonas estão normalmente envolvidos na ativação da transcrição: H3K4, H3K36 e H3K79. Outros sítios de metilação em lisinas estão relacionados ao silenciamento transcricional: H3K9, H3K27 e H4K20 (KOUZARIDES, 2007; BÁRTOVÁ, HORÁKOVÁ *et al.*, 2010).

A quantidade de grupos metil também especifica modelos de expressão gênica. Assim, a monometilação de H4K20 se correlaciona com transcrição contínua, enquanto a trimetilação de H4K20 é responsável pelo silenciamento mediado por heterocromatina (HARNICAROVÁ HORÁKOVÁ, BÁRTOVÁ *et al.*, 2010).

A região gênica onde a histona se encontra também influencia. Por exemplo, a metilação em H3K36 tem um efeito positivo quando é encontrada na região codificante e um efeito negativo quando está no promotor. A metilação em H3K9 é semelhante: negativa no promotor e positiva na região codificante (KOUZARIDES, 2007).

Portanto, é provável que qualquer modificação tenha o potencial de ativar ou reprimir sob diferentes condições. Quanto mais as modificações são estudadas, mais se elucida que o contexto em que elas se encontram é importante.

1.2.3.3 Metilação do DNA

A metilação do DNA consiste na adição de um grupo metil na posição 5 das citosinas em dinucleotídeos citosina-fosfato-guanina (CpG) e ocorre simetricamente em ambas as fitas de DNA (COLLAS, 2009; TEVEN, LIU *et al.*, 2011).

A metilação do DNA é geralmente considerada um marca de silenciamento gênico, porém, esta associação não é estrita, particularmente quando se leva em conta a densidade de CpG nos promotores. Promotores com baixo conteúdo CpG não apresentam correlação entre atividade e abundância de metilação. Assim, promotores com baixo conteúdo CpG ativos não são necessariamente desmetilados. Em promotores com conteúdo intermediário de CpG, a metilação está associada com repressão transcricional. Contrariamente, promotores com alto conteúdo CpG apresentam fraca ou nenhuma metilação mesmo quando inativos (COLLAS, 2009).

Catalisada por DNA metiltransferases (DNMTs), a metilação do DNA regula a expressão gênica e estabilidade cromossomal. Há três DNMTs cataliticamente ativas em humanos: DNMT1, DNMT3A e DNMT3B. A DNMT de manutenção, DNMT1, especificamente reconhece o DNA hemi-metilado após a replicação e metila a fita recém-sintetizada, assegurando a fidelidade no perfil de metilação após a replicação. DNMT3A e DNMT3B estão envolvidas na metilação *de novo* do DNA que ocorre durante o desenvolvimento embrionário e diferenciação celular como uma maneira de desligar genes cuja atividade não é mais requerida (COLLAS, 2009; KHAVARI, SEN *et al.*, 2010). No entanto, dados recentes sugerem que esta divisão clássica de funções deve ser uma supersimplificação, já que DNMTs parecem ser individualmente capazes de mediar ambas as funções (KHAVARI, SEN *et al.*, 2010).

1.2.4 Organização espacial da cromatina

A cromatina está organizada em um arranjo espacial de maior escala dentro do núcleo. Os domínios de cromatina mais óbvios do genoma nuclear são a eucromatina e a heterocromatina: a eucromatina consiste de regiões genômicas menos condensadas enquanto a heterocromatina contém regiões altamente condensadas. Embora sejam facilmente distinguidas pelo grau de condensação, torna-se cada vez mais evidente que a correlação em larga escala entre morfologia e função é uma mera simplificação. Em vez da correlação entre estrutura da cromatina e atividade gênica, foi encontrada uma forte associação entre morfologia da cromatina e densidade gênica: regiões ricas em genes estão presentes em regiões de cromatina menos condensada e regiões pobres em genes estão presentes em domínios mais condensados, indiferente a suas atividades (MISTELI, 2005; FEDOROVA e ZINK, 2008; MORRIS, CHOTALIA *et al.*, 2010).

A eucromatina está situada entre os domínios heterocromáticos e é geralmente enriquecida em histonas H3 e H4 hiperacetiladas (MISTELI, 2005; JOFFE, LEONHARDT *et al.*, 2010), possui níveis reduzidos de metilação do DNA e está metilada em H3K4, H3K36 e H3K79 (HARNICAROVÁ HORÁKOVÁ, BÁRTOVÁ *et al.*, 2010). A extensão das regiões de eucromatina varia dramaticamente através da diferenciação correlacionando-se estritamente com o aumento ou diminuição da atividade transcricional (SCHÖFER e WEIPOLTSHAMMER, 2008).

A heterocromatina é comumente caracterizada por baixos níveis de acetilação, abundante metilação do DNA e altos níveis de metilação em H3K9, H3K27 e H4K20 (HARNICAROVÁ HORÁKOVÁ, BÁRTOVÁ *et al.*, 2010).

A heterocromatina é classificada em facultativa e constitutiva, e diferem em vários aspectos. Ambas são tipicamente encontradas em determinadas regiões subnucleares. No núcleo de mamíferos, estas regiões incluem a periferia nuclear, com exceção das áreas ocupadas pelos poros nucleares, e também periferias nucleolares (MISTELI, 2005; FEDOROVA e ZINK, 2008).

A heterocromatina constitutiva consiste principalmente de sequências repetitivas de DNA. Inclui a heterocromatina centromérica e pericentromérica. É insensível à DNase I, pobre em genes, replica tardiamente e é altamente metilada. Cria um ambiente transcricionalmente repressivo e sua formação depende do

recrutamento da proteína 1 de heterocromatina (HP1), cujas variantes HP1 α , HP1 β e HP1 γ são componentes chave na formação e manutenção da heterocromatina. Contém nucleossomos hipoacetilados e enriquecidos em H3K9 metilada: H3K9 recruta HP1, que por sua vez se associa com outros fatores envolvidos no silenciamento e remodelamento da cromatina (MISTELI, 2005; FEDOROVA e ZINK, 2008; SCHÖFER e WEIPOLTSHAMMER, 2008; HARNICAROVÁ HORÁKOVÁ, BÁRTOVÁ *et al.*, 2010).

A heterocromatina facultativa representa regiões de eucromatina transcricionalmente silenciadas que podem se tornar ativas, por exemplo, durante a diferenciação celular, e sua formação é independente de HP1 (SCHÖFER e WEIPOLTSHAMMER, 2008). É formada por certas regiões cromossômicas, incluindo genes de cópia única e ocorre de modo específico conforme o tipo celular e o estágio do desenvolvimento. A metilação de H3K27 é frequentemente associada com heterocromatina facultativa (MISTELI, 2005; FEDOROVA e ZINK, 2008; SCHÖFER e WEIPOLTSHAMMER, 2008; HARNICAROVÁ HORÁKOVÁ, BÁRTOVÁ *et al.*, 2010).

1.3 A ARQUITETURA NUCLEAR E A CROMATINA DE CÉLULAS-TRONCO

Comparações de domínios de cromatina em CTEs e em células sob processo de diferenciação mostram que ocorrem drásticos rearranjos espaciais durante os estágios iniciais da diferenciação.

Acredita-se que a cromatina de células-tronco pluripotentes tenha características únicas, incluindo uma conformação mais frouxa e uma associação hiperdinâmica de proteínas da cromatina, refletindo a plasticidade do genoma em células pluripotentes e provavelmente contribuindo para a manutenção da pluripotência e autorrenovação (MATTOUT e MESHORER, 2010).

Consistente com um estado aberto global da cromatina em CTEs, *foci* de heterocromatina são mais frequentes em células progenitoras neurais diferenciadas do que nas CTEs, sugerindo que ocorre a formação e maturação de heterocromatina durante a diferenciação de CTEs (MATTOUT e MESHORER, 2010).

Uma característica específica da heterocromatina em CTEs é a distribuição nuclear de HP1 α , β e γ . A distribuição de HP1 é difusa no núcleo de CTEs humanas em contraste aos *foci* distintos observados no núcleo de células diferenciadas, onde as variantes de HP1 se associam principalmente à heterocromatina pericêntrica. Entretanto, em CTEs murinas o padrão difuso não foi observado: as variantes de HP1 formam foci e o número destes foci associados à heterocromatina aumenta durante a diferenciação. Estas observações indicam que algumas diferenças na organização da heterocromatina devem estar presentes entre CTEs humanas e murinas (MATTOUT e MESHORER, 2010).

A lâmina nuclear de CTEs compreende principalmente as proteínas lamina B, que são mais dinâmicas em CTEs do que em outro tipo celular e não possuem proteínas lamina A/C, que aparecem somente no início da diferenciação (MATTOUT e MESHORER, 2010). A ausência de lamina A/C em CTEs tem implicações na rigidez e morfologia nuclear. Sua falta provavelmente contribui para a plasticidade e mobilidade da cromatina observada no núcleo de CTEs, enquanto que sua expressão durante a diferenciação deve ser um fator importante no processo e/ou manutenção de um fenótipo diferenciado (MORRIS, CHOTALIA *et al.*, 2010; HAMPOELZ e LECUIT, 2011) (FIGURA 5 A).

Proteínas da cromatina tal como a histona ligante H1 estão mais dinamicamente associadas com a cromatina em CTEs do que em células diferenciadas. As proteínas nucleares HP1 α e lamina B também se ligam mais frouxamente em células pluripotentes (MATTOUT e MESHORER, 2010).

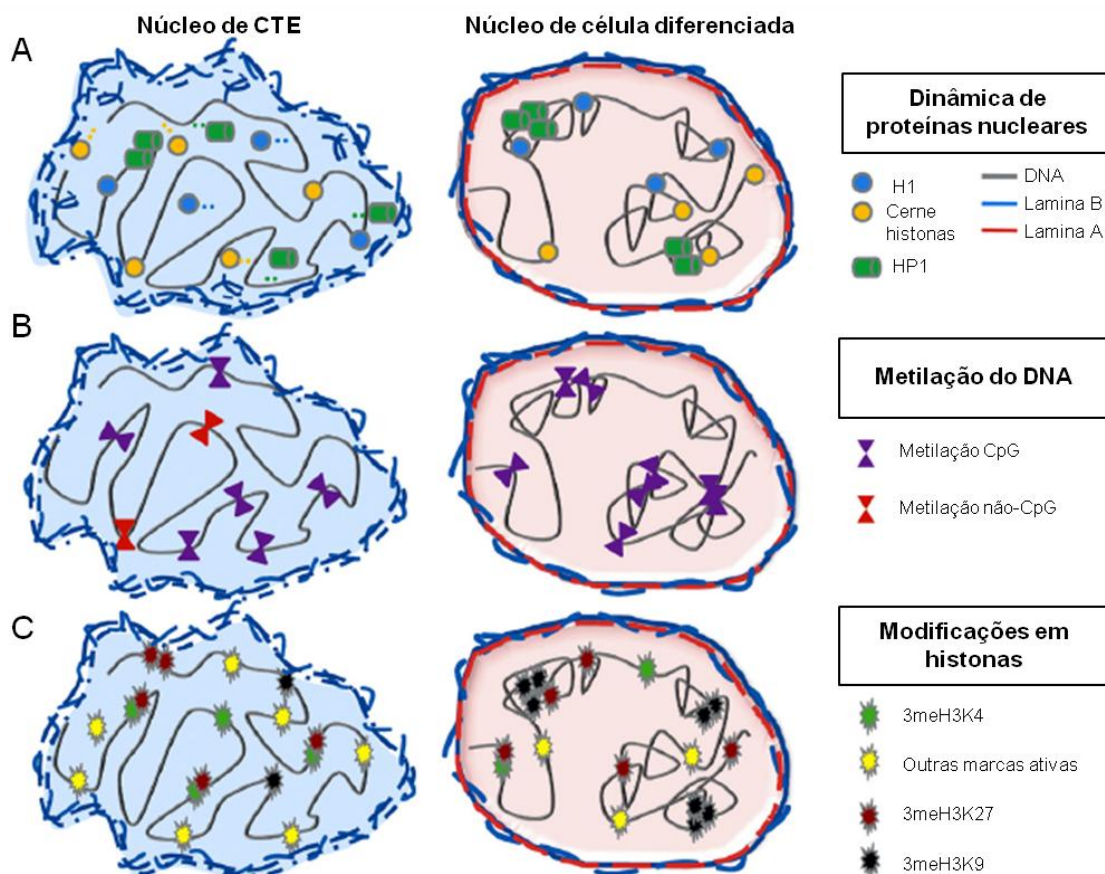


FIGURA 5 - Características da cromatina e do genoma de CTEs e no início da diferenciação. (A) Proteínas da cromatina estão mais dinamicamente associadas com a cromatina em CTEs do que em células diferenciadas. (B) Em células somáticas de mamíferos a metilação do DNA está presente nas citosinas em um contexto CpG; em CTEs 25% dos sítios de metilação de citosina no genoma são encontrados em um contexto não-CpG. (C) O nível global de diversas modificações de histonas difere entre CTEs e células diferenciadas.

FONTE: MATTOUT e MESHORER (2010).

Os promotores de fatores de transcrição envolvidos na pluripotência são geralmente metilados em células diferenciadas, mas hipometilados em CTEs e iPSCs. Porém, os níveis globais da metilação de DNA cobrindo a maioria das ilhas CpG não são substancialmente diferentes entre CTEs e células diferenciadas. Enquanto em células somáticas de mamíferos a metilação do DNA está presente nas citosinas em um contexto CpG, em CTEs 25% dos sítios de metilação de citosina no genoma são encontrados em um contexto não-CpG, sugerindo que CTEs utilizam um programa único de metilação do DNA (LISTER, PELIZZOLA *et al.*, 2009; MATTOUT e MESHORER, 2010) (FIGURA 5 B).

Consistentes com mudanças na atividade genômica global, mudanças nos perfis de modificações nas histonas acompanham a diferenciação de CTEs. Há o aumento na marca de cromatina silenciada 3meH3K9 em *foci* bem definidos, o

acúmulo progressivo de heterocromatina pericêntrica e a diminuição nos níveis globais das histonas H3 e H4 acetiladas. Estas observações indicam que a cromatina associada à CTEs é, de modo geral, mais ativa, ou pelo menos marcada com modificações associadas a histonas ativas, e que a diferenciação é acompanhada por uma transição para cromatina menos permissiva à transcrição (MESHORER e MISTELI, 2006; SPIVAKOV e FISHER, 2007; MATTOUT e MESHORER, 2010) (FIGURA 5 C).

Em CTEs, muitos genes regulatórios do desenvolvimento possuem domínios bivalentes: 3meH3K27 está associado à repressão da transcrição e 3meH3K4 está associado à ativação da transcrição. Durante a diferenciação celular, a marca bivalente desaparece: somente 3meH3K27 ou 3meH3K4 permanece no gene. Os genes bivalentemente marcados tem baixa expressão pois 3meH3K27 parece ser a marca dominante. Assim, 3meH3K27 silencia os genes do desenvolvimento em CTEs, enquanto 3meH3K4 mantém os genes prontos para ativação. 3meH3K4 foi encontrada tanto em genes transcritos como silenciados em CTEs, logo, esta marca parece levar a um estado permissivo transcricional ativado, mas não leva necessariamente à transcrição (BERNSTEIN, MIKKELSEN *et al.*, 2006; LENNARTSSON e EKWALL, 2009).

Deste modo, um modelo para regulação gênica em células pluripotentes foi estabelecido, no qual muitos genes regulatórios importantes estão preparados para a expressão, mas são mantidos pausados por uma modificação oposta (SPIVAKOV e FISHER, 2007).

Uma das duas modificações bivalentes, 3meH3K27, está enriquecida na periferia nuclear de CTEs murinas e embora os níveis de 3meH3K27 pareçam permanecer inalterados durante a diferenciação, a localização perinuclear diminui (MATTOUT e MESHORER, 2010).

Demonstrou-se que acH3K9 é mais prevalente em CTEs do que em células diferenciadas. Outras modificações associadas com cromatina ativa, incluindo acH3K14, 3meH3K4, 2meH3K36 e 3meH3K36 estão também enriquecidas em CTEs comparadas às células progenitoras neurais dela derivadas. Consistentemente, diversas marcas repressivas e de heterocromatina aumentam durante a diferenciação de CTEs, tais como meH3K9, 2meH3K9, 3meH3K9 e HP1 α , mas não 2meH4K20. Além disso, as marcas epigenéticas parecem se correlacionar com pluripotência. Enquanto em CTEs humanas pluripotentes 3meH3K9 está

significativamente difusa, em células diferenciadas ou menos pluripotentes 3meH3K9 está altamente enriquecida em *foci* de heterocromatina (MATTOUT e MESHORER, 2010).

1.4 AGENTES MODIFICADORES DA CROMATINA

1.4.1 Agente inibidor de HDACs: tricostatina A (TSA)

Os inibidores de HDAC (HDACi) são pequenas moléculas naturais ou sintéticas que podem inibir a atividade de HDACs (MINUCCI e PELICCI, 2006; KRETISOVALI, HADJIMICHAEL *et al.*, 2012). Podem ser divididos em diversas classes estruturais incluindo hidroxamatos, peptídeos cíclicos, ácidos alifáticos e benzamidas.

A tricostatina A (TSA) foi o primeiro hidroxamato natural descoberto, inicialmente isolada de *Streptomyces hygroscopicus* como um antibiótico antifúngico (MONNERET, 2005; DOKMANOVIC, CLARKE *et al.*, 2007). É um potente inibidor, ativo em concentração nanomolar *in vitro* ($K_i = 3,4$ nM) e age de forma reversível (MONNERET, 2005; TADDEI, ROCHE *et al.*, 2005).

A TSA inibe as HDACs que contêm zinco no seu sítio catalítico, ou seja, as classes I, II e IV (DOKMANOVIC, CLARKE *et al.*, 2007). A inibição de HDACs leva ao acúmulo de histonas acetiladas no núcleo e uma subsequente ativação da transcrição de genes alvo (KIM, CHOI *et al.*, 2009).

1.4.2 Agentes desmetilantes de DNA: 5-azacitidina e 5-aza-2'-deoxicitidina

A 5-azacitidina (5aza) e a 5-aza-2'-deoxicitidina (5azadc) são análogos de citidina que contém um nitrogênio no lugar do carbono 5 do anel de pirimidina, amplamente utilizados como agentes desmetilantes do DNA. Entram na célula via transportadores de nucleosídeos. Enquanto a 5azadC é incorporada somente no

DNA, a 5aza é incorporada tanto no DNA como RNA, afetando, portanto, a síntese de proteínas (CHRISTMAN, 2002; HOWELL, LIU *et al.*, 2010).

A incorporação de 5azadC ou 5aza no DNA de células proliferativas durante a síntese leva à ligação irreversível da DNMT1 aos resíduos de azacitosina no DNA, reduzindo a disponibilidade de DNMT1 no núcleo devido ao seu sequestro e subsequente degradação, levando a uma passiva inibição da metilação do DNA, de modo global e inespecífico (HOWELL, LIU *et al.*, 2010; KOMASHKO e FARNHAM, 2010). Após dois ou mais ciclos de replicação, ambas as fitas de DNA tornam-se desmetiladas (GHOSHAL e BAI, 2007).

Em doses suficiente baixas que não desencadeiam a morte celular, o tratamento com 5azadC ou 5aza resulta em várias mudanças nas células, incluindo ativação de genes silenciados, descondensação da cromatina e alteração do tempo de replicação (JÜTTERMANN, LI *et al.*, 1994). Já a incorporação excessiva pode levar à inibição da síntese de DNA, resultando na parada do ciclo celular e por fim na morte da célula (GHOSHAL e BAI, 2007).

2 JUSTIFICATIVA

Existem evidências de que as CTMs podem diferenciar em múltiplos tipos celulares tanto *in vitro* como em *in vivo*. Além disso, estas células induzem pouca resposta imune e apresentam notáveis propriedades de autorrenovação. Isto faz com que as CTMs apresentem-se como uma grande promessa no reparo tecidual (PARK, HUANG *et al.*, 2007; UCCELLI, MORETTA *et al.*, 2008).

Tendo em vista o potencial de utilização de CTMs em terapias celulares, é fundamental se conhecer detalhadamente os mecanismos envolvidos no processo de diferenciação, considerando-se tanto a eficiência do seu uso como também questões de segurança.

Ao diferenciar, a CT implementa seus programas de expressão gênica específicos, sequestra de modo dirigido genes em domínios de cromatina ativo e repressivo. Neste cenário, o cerne de histonas frouxamente ligado e as proteínas arquitetônicas da cromatina devem ser recrutados para regiões genômicas que são destinadas para o silenciamento quando a célula começa a diferenciar. Grandes regiões de cromatina silenciada sofrem mudanças de ordem superior na estrutura da cromatina e formam regiões abundantes de heterocromatina que são observadas quando a célula inicia a diferenciação. Ao mesmo tempo, a natureza dinâmica de proteínas associadas à cromatina deve também facilitar para que fatores regulatórios ganhem acesso a sequências regulatórias e rapidamente ativem programas complexos de expressão gênica linhagem-específicos (MESHORER e MISTELI, 2006).

A epigenética, definida como o estudo de mudanças na função gênica que são mitoticamente e/ou meioticamente herdáveis e que não ocasionam mudança na sequência do DNA (DUPONT, ARMANT *et al.*, 2009), apresenta uma função-chave nos processos de autorrenovação, manutenção de pluri/multipotência e especificação de linhagem.

Apesar do papel fundamental atribuído à epigenética nos mecanismos de diferenciação, ainda são poucos os trabalhos que abordam estudos epigenéticos durante a diferenciação de CTMs adultas.

Visando investigar o efeito da epigenética no processo de diferenciação de CTs adultas e também a arquitetura nuclear destas células, o modelo experimental

proposto envolve a diferenciação adipogênica de CTMs. Como as células-tronco retêm uma memória epigenética em relação a sua origem, o que influencia sua resposta biológica e seu potencial de diferenciação, foram avaliadas CTMs obtidas de duas fontes distintas, medula óssea e tecido adiposo.

A obtenção destes conhecimentos contribuirá para a compreensão dos mecanismos envolvidos na diferenciação de células-tronco adultas e poderá ser aplicada na otimização das terapias celulares. Uma vez que o perfil epigenético interfere na diferenciação, ao se conhecer qual a linhagem-alvo preferencial daquela fonte de CTM, é possível direcionar seu uso nas terapias celulares. Assim, cada tipo celular teria uma aplicação específica visando melhorar a eficiência do processo de diferenciação considerando as várias fontes disponíveis.

3 HIPÓTESES

A diferenciação leva a uma mudança na arquitetura nuclear e na estrutura da cromatina de CTMs. Essa mudança por sua vez é diferente da observada em CTEs.

Como a diferenciação envolve a ação de mecanismos epigenéticos, pode ser influenciada por agentes modificadores da cromatina, tais como inibidores de HDACs e DNMTs.

A pré-existência de uma memória epigenética resulta em respostas intrínsecas ao tipo celular conforme seu tecido de origem.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar a arquitetura nuclear na diferenciação adipogênica de CTMs e investigar o envolvimento de mecanismos epigenéticos.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar a arquitetura nuclear das CTMs induzidas à diferenciação em relação ao arranjo de proteínas nucleares e à presença de modificações de histonas;
- Analisar a influência da acetilação de histonas na diferenciação adipogênica;
- Analisar a influência da metilação do DNA na diferenciação adipogênica;
- Analisar o perfil epigenético quanto às modificações nas histonas (acetilações e metilações) no processo de diferenciação adipogênica das CTMs.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 OBTENÇÃO E CULTIVO DAS CTMs

As CTMs utilizadas neste estudo foram fornecidas pelo Núcleo de Tecnologia Celular da PUCPR. As amostras foram obtidas da medula óssea ou do tecido adiposo, após consentimento do doador, de acordo com normas para pesquisa envolvendo seres humanos e com a aprovação do Comitê de Ética da Fundação Oswaldo Cruz (número de aprovação 419/07, ANEXO A).

As CTMs isoladas tanto da medula óssea como de tecido adiposo já foram previamente caracterizadas imunofenotipicamente pelo nosso grupo utilizando citometria de fluxo (*FACS Calibur, BD Biosciences*). As células foram positivas para CD105, CD90, CD73, CD166, CD29 e CD44; negativas para marcadores de linhagem hematopoética, incluindo CD14, CD45 e CD31 e a porcentagem de CD34 foi de $2,16\% \pm 2,48$ (REBELATTO, AGUIAR *et al.*, 2008).

Também foram capazes de diferenciar nas três linhagens mesodermiais, atendendo os critérios exigidos para serem caracterizadas como CTMs (DOMINICI, LE BLANC *et al.*, 2006). A diferenciação foi confirmada através de colorações específicas.

Para a osteogênese, $2-3 \times 10^4$ células foram plaqueadas em placas de 6 poços. As culturas foram induzidas com *hMSC Osteogenic Differentiation Bullet Kit* (Lonza), conforme instruções do fabricante, após atingirem 60-70% de confluência. Os controles foram cultivados com o meio *MSC-BM* (Lonza). Os meios foram trocados duas vezes por semanas e o período de indução foi de 21 dias. Para a confirmação da diferenciação condrogênica, as culturas foram marcadas com *Alizarin Red S* (Sigma), que marca a deposição de cristais de cálcio no citoplasma do osteoblasto. Para isso, as culturas foram lavadas duas vezes com PBS, fixadas com solução de PF 4% por 30 min à TA, lavadas duas vezes com PBS e, então, marcadas com uma solução 2% de *Alizarin Red S*.

A indução condrogênica foi realizada pelo uso dos kits de indução *hMSC Chondrogenic Differentiation Bullet Kit* (Lonza), conforme instruções do fabricante. Para a condrogênese, 5×10^5 células foram distribuídas em tubos de polipropileno de 15 ml e centrifugadas. Após remoção do meio, as células foram ressuspensas em

meio de indução incompleto ou em meio controle (DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino). Uma nova centrifugação a 900 rpm por 5 min foi realizada e o meio removido. Por fim, as células foram ressuspensas em meio de indução completo (contendo TGF β 3) ou em meio controle e realizou-se a última centrifugação a 900 rpm por 5 min. O pellet formado não foi desfeito. Os tubos foram mantidos semi-tampados a fim de manter o pH do meio, em estufa de CO₂ a 37°C. Após um período em repouso (24h), ocorre a formação de uma micromassa, na qual há menor disponibilidade de oxigênio em seu interior, necessária para a diferenciação condrogênica. Os meios foram trocados duas vezes por semana e o período de indução foi de 21 dias. A diferenciação condrogênica foi verificada pela marcação com azul de toluidina (Sigma), o qual identifica o acúmulo de matriz extracelular de mucopolissacarídeos no interior do condrócito. Para isso, os agregados celulares foram pré-corados com azul de Trypan para facilitar a sua visualização. Em seguida foram lavados com PBS e fixados com formalina 10%. Posteriormente, foram desidratados em diluições seriadas de etanol e embebidos em blocos de parafina. Os cortes de parafina (4 μ m de espessura) foram corados com solução de azul de toluidina.

A indução adipogênica foi realizada como descrito no item 5.2 e a coloração conforme descrito no item 5.9.

5.1.1 Obtenção e cultivo das CTMs-MO

As amostras de medula óssea foram coletadas na Santa Casa de Misericórdia de Curitiba pelo Núcleo de Tecnologia Celular da PUCPR. Os doadores tinham entre 40 e 60 anos e eram portadores de cardiomiopatia.

O isolamento e o cultivo das CTMs-MO já foram previamente padronizados (REBELATTO, AGUIAR *et al.*, 2008). A coleta da medula óssea foi realizada através da punção da crista ilíaca posterior do doador. O material foi coletado com solução anticoagulante (heparina sódica) e inserido em bolsa de transferência contendo meio 199 (Gibco), diluído na proporção de 4 medula óssea: 1 meio 199. A medula óssea coletada foi utilizada para o "Estudo Multicêntrico Randomizado de Terapia Celular em Cardiopatias - Cardiopatia Dilatada", sendo que este já tem a liberação da

Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP- registro 11259). Deste material foram retirados cerca de 5 ml (medula óssea + meio) que foram destinados para o presente estudo, conforme aprovado pelo Comitê de ética em pesquisa com seres humanos da Fundação Oswaldo Cruz (número de aprovação: 419/07).

Para o isolamento de CTMs, o material foi cuidadosamente depositado em Histopaque (1,077 g/ml) (Sigma) para isolar células mononucleares da medula óssea por centrifugação em gradiente de densidade. A seguir, o anel de células mononucleares foi retirado e lavado duas vezes com meio.

Culturas primárias foram estabelecidas em frascos de cultivo celular a uma densidade de 1×10^4 células/cm², em DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino, penicilina (100 U/ml) e estreptomicina (100 µg/ml) (todos da GIBCO), a 37°C em atmosfera de CO₂ 5%. Dois dias após o plaqueamento inicial, o meio de cultura foi trocado para remover as células não aderentes. Durante o cultivo, o meio foi trocado duas vezes por semana (REBELATTO, AGUIAR *et al.*, 2008).

5.1.2 Obtenção e cultivo das CTMs-TA

As amostras de tecido adiposo foram coletadas no Instituto de Medicina e Cirurgia do Paraná pelo Núcleo de Tecnologia Celular da PUCPR, de doadores submetidos à cirurgia bariátrica seguida de dermolipectomia na região abdominal, com idades entre 30 e 50 anos.

O isolamento e o cultivo das CTMs-TA já foram previamente padronizados (REBELATTO, AGUIAR *et al.*, 2008). Logo após a retirada do tecido adiposo, este foi lavado com solução salina para remover resíduos contaminantes e hemácias. Em seguida o material foi digerido com 0,02 mg/ml de colagenase A (Roche Diagnostic) em meio HAM-F12 e meio de Dulbecco's (DMEM-F12, GIBCO), contendo 2% de soro albumina bovina por 45 min a 37°C. O tecido digerido foi filtrado duas vezes com um filtro membrana de nylon de 100 µm e outro de 25 µm, para eliminar os fragmentos não digeridos. Em seguida o material foi centrifugado a 600 x g por 10 min. As células que formam a fração vascular do estroma do tecido adiposo foram coletadas e as células vermelhas lisadas com um tampão contendo 155 mmol/L de NH₄Cl e 20 mmol/L de Tris pH 7,6, durante 5 min.

As células estromais isoladas foram plaqueadas em uma densidade de $3,2 \times 10^4$ células/cm² em meio DMEM-F12 suplementado com 15% de soro fetal bovino, penicilina (100 U/ml) e estreptomicina (100 µg/ml). Após 24 horas, as células não aderentes foram removidas e o meio foi trocado duas vezes por semana.

5.2 INDUÇÃO ADIPOGÊNICA *IN VITRO* DAS CTMS

Culturas de CTM-MO e CTMs-TA foram induzidas à adipogênese, após atingirem a confluência, utilizando meio indutor o qual consistia em meio de cultivo acrescido de 1 µM de dexametasona, 500 µM de IBMX, 1 µg/ml de insulina e 200 µM de indometacina (todos da Sigma). O meio foi trocado duas vezes por semana e, exceto quando especificado, o período de indução utilizado foi de 14 dias.

5.3 IMUNOFLUORESCÊNCIA

Cerca de 2×10^4 células foram plaqueadas sobre lamínulas de vidro em placas de 24 poços. Após o tempo especificado em cada experimento, as culturas foram lavadas três vezes com PBS e fixadas com 4% PF durante 15 minutos à temperatura ambiente. Novamente foram realizadas três lavagens com PBS. Para a permeabilização foi utilizado PBS/0,5% triton X-100 por 30 min à temperatura ambiente, sem agitar. Após três lavagens com PBS, foi realizado o bloqueio com PBS/5% BSA por 1 hora à temperatura ambiente sob agitação. A cultura foi então lavada duas vezes com PBS à temperatura ambiente, e incubada com 50 µl do anticorpo primário diluído (APÊNDICE B) em PBS/1% BSA por 1 hora a 37°C, em câmara úmida. Três lavagens com PBS, 5 min cada, foram realizadas à temperatura ambiente sob suave agitação. Incubou-se com 50 µl do anticorpo secundário diluído (APÊNDICE B) em PBS/1% BSA por 1 hora a 37°C. Novamente foram realizadas três lavagens de 5 minutos utilizando PBS à temperatura ambiente, sob suave agitação.

Para a marcação dos núcleos, a cultura foi incubada com uma solução de 5 µg/µl de dilactato DAPI (Invitrogen) diluído mil vezes em PBS durante 10 minutos à

temperatura ambiente. Três lavagens de 5 minutos, à temperatura ambiente e sob suave agitação, foram realizadas utilizando PBS.

O excesso de líquido foi retirado das lamínulas, as quais foram montadas sobre lâminas utilizando 5 μ l de glicerol como meio de montagem e seladas com esmalte.

As imagens foram obtidas utilizando o microscópio NIKON ECLIPSE E600 ou o microscópio confocal LEICA SP5 acoplado a um microscópio invertido LEICA DMI 6000B.

5.4 ANÁLISE DE PROTEÍNAS POR WESTERN BLOTTING

5.4.1 Preparo de extrato celular de proteínas

Foram plaqueadas $5 \cdot 10^5$ células em garrafas de 150 cm². As culturas foram lavadas duas vezes com PBS. Adicionou-se 1 ml do tampão de proteína (40 mM Tris-HCl pH 6,8, 1% SDS, 2,5% β -mercaptoetanol, 6% glicerol e 0,005% azul de bromofenol) contendo 1 μ l do coquetel de inibidores de protease (Sigma). As células foram rompidas e coletadas por raspagem em microtubos. O extrato foi então aquecido a 94°C por 10 minutos. Após o resfriamento, o extrato foi armazenado a -20°C.

5.4.2 Quantificação de proteínas utilizando 2D-Quant

Para a dosagem de proteínas foi utilizado o kit *2D-Quant* (GE Healthcare). Conforme instruções do fabricante, uma curva padrão foi construída a partir de concentrações conhecidas de soroalbumina bovina (BSA), sendo então determinada a absorbância a 480 nm. A partir da absorbância da amostra e tendo como referência a curva padrão, a concentração de proteínas na amostra foi determinada.

5.4.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida

Foram aplicados 10 µg de proteína total em géis de poliacrilamida 15% e submetidos à eletroforese em tampão SDS-PAGE. A separação proteica foi realizada a 20 mA, durante 90-120 min. Após a eletroforese, as proteínas no gel foram coradas com solução de Coomassie Blue por 30 minutos sob agitação. O gel foi então incubado com solução de descoloração (30% metanol, 10% ácido acético) até a visualização das bandas, seguido de sucessivas lavagens com água destilada.

5.4.4 Immunoblotting

Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas para uma membrana Hybond-ECL (GE Healthcare) utilizando 60 V durante duas horas a 4°C, em tampão de transferência que consistia de 25 mM de Trisma base, 192 mM glicina e 20% (v/v) metanol. Posteriormente, a membrana foi corada por 5 min com solução de Ponceau S (0,5% Ponceau S e 0,1% ácido acético) para verificar a qualidade da transferência. Em seguida, a membrana foi descorada com PBS/Tween 0,1% e incubada em solução de bloqueio (5% BSA em TBST) *overnight* a 4°C.

Após o bloqueio, a membrana foi incubada com o anticorpo primário (APÊNDICE B) diluído em TBST/5% BSA por 3 horas à temperatura ambiente sob agitação. Após três lavagens de 5 min com TBST, realizou-se a incubação com o anticorpo secundário (APÊNDICE B) diluído em TBST/5% BSA. Após 1 hora de incubação à temperatura ambiente, as membranas foram novamente lavadas três vezes com TBST durante 5 minutos. Para revelação pelo método colorimétrico, a membrana foi imersa em 10 ml de tampão para fosfatase alcalina (Tris-HCl 100 mM, pH 9,5, NaCl 100 mM e MgCl₂ 5mM) contendo 66 µl de nitroazul de tetrazólio (NBT, 50 mg/ml) e 33 µl de 5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato (BCIP, 50 mg/ml) (ambos da Promega). Uma vez que as bandas se tornavam visíveis, a reação era interrompida pela imersão da membrana em água.

5.4.5 Quantificação de bandas de *immunoblotting*

O programa *Image J* versão 1.46r foi utilizado para a quantificação da densidade das bandas. Foram utilizadas imagens escaneadas do gel. Os valores de cinza das bandas foram checados para confirmar se estavam maiores que os do fundo e, caso necessário, invertidos através do comando `<lookup tables>`, `<invert LUT>` e então `<edit>`, `<invert>`. As imagens foram transformadas em 8-bit e a região das bandas foi delimitada pelo uso do comando `<image>`, `<adjust>` e `<threshold>`. Na janela `<threshold>` ajustou-se de forma que somente as bandas ficassem vermelhas e o fundo do gel não, mexendo com a seta de cima, mas deixando a seta de baixo no valor máximo (255), em seguida clicou-se em `<apply>`.

Para a obtenção dos valores da quantificação, clicou-se em `<set measurements>` e marcaram-se os parâmetros de interesse (*integrated density; limit to threshold*). Em `<set scale>` foi definido o valor de distância para 1 e a unidade em pixels.

Em `<analyze>`, `<analyze particles>` foi gerada uma tabela com os valores de densidade integrada correspondentes a cada uma das bandas. A partir destes valores realizou-se a normalização por GAPDH ou actina e foram feitas as análises comparativas.

5.5 QUANTIFICAÇÃO DA DIMENSÃO NUCLEAR

Para a quantificação da área nuclear, foram analisadas de 10 a 20 imagens de culturas marcadas com DAPI, obtidas no microscópio de fluorescência NIKON ECLIPSE 80i com objetiva no aumento de 40 vezes. Nas culturas induzidas ou não por 1 dia, todos os núcleos foram avaliados e nas culturas induzidas por 14 dias, somente o núcleo de células apresentando vesículas foram considerados. Para cada condição, cerca de 100 núcleos foram analisados.

O programa *Image J* versão 1.46r foi utilizado para a quantificação da área nuclear. Utilizando a imagem de uma régua de escala conhecida obtida neste microscópio, foi realizada a calibração. Uma linha foi traçada sobre a imagem de modo a corresponder à escala conhecida. Em `<analyze>`, `<set scale>` foi

especificado em μm o valor de pixels correspondente a esta linha e também a unidade (μm).

As imagens foram transformadas em 8-bit e em seguida a área nuclear foi determinada pelo uso do comando *<image>*, *<adjust>* e *<threshold>*. Na janela *<threshold>* ajustou-se de forma que somente os núcleos ficassem vermelhos, mexendo com a seta de cima, mas deixando a seta de baixo no valor máximo (255) e então *<apply>*.

Para a obtenção dos valores da quantificação, clicou-se em *<analyze>*, *<set measurements>* e marcaram-se os parâmetros de interesse (*área; limit to threshold*).

Em *<analyze>*, *<analyze particles>*, foram especificados: a faixa de tamanho a ser considerada (0,2-infinity) e a circularidade (0,2-1,0). Foram excluídos núcleos nas extremidades (*exclude on edges*). Após a obtenção dos valores correspondentes à área em μm^2 de cada núcleo, foi realizada a verificação para descartar núcleos sobrepostos que o programa considerava como sendo um só. Entre 120 a 339 núcleos foram quantificados em condição.

5.6 QUANTIFICAÇÃO DO NÚMERO E ÁREA DOS NUCLÉOLOS

Para a quantificação do número e área de nucléolos, foram analisadas pelo menos 20 imagens de culturas marcadas com DAPI, fibrilarina e nucleofosmina, obtidas no microscópio de fluorescência NIKON ECLIPSE 80i com objetiva no aumento de 100 vezes. Nas culturas induzidas ou não por 1 dia, todos os núcleos foram avaliados e nas culturas induzidas por 14 dias, somente o núcleo de células apresentando vesículas foram considerados. Ao menos 100 nucléolos foram analisados em cada condição.

Para a análise da área dos nucléolos, utilizou-se o programa ImageJ versão 1.46r e procedeu-se a quantificação tanto da área do núcleo como da região fibrilar e da região granular dos nucléolos do mesmo modo como descrito no item 5.5.

5.7 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

Células cultivadas em garrafas de 150 cm² foram lavadas com PBS e fixadas por 1 hora com 5 ml de glutaraldeído a 2,5% em tampão cacodilato 0,1 M pH 7,2. Após a remoção da solução fixadora, foram adicionados à garrafa 10 ml de tampão cacodilato 0,1M pH 7,2 e, utilizando rodinho, as células foram delicadamente raspadas e coletadas para tubos de 15 ml. Seguiu-se centrifugação a 2500 rpm por 10 min. O sobrenadante foi descartado e foram adicionados 2 ml de tampão cacodilato ao agregado. Após homogeneização, a mistura foi transferida em alíquotas para microtubos. Decorridos 5 min, realizou-se nova centrifugação a 13000 rpm (rotação máxima) por 1 min. Removeu-se o máximo de sobrenadante.

Realizou-se a pós-fixação por 30 min: adicionou-se 500 µl por agregado de uma solução 1% tetróxido de ósmio, 0,8% ferricianeto de potássio e 5 mM CaCl₂ em tampão cacodilato 0,1 M pH 7,2. Centrifugou-se 2 min a 13000 rpm e descartou-se o sobrenadante. Foram realizadas duas lavagens de 5 min com 1 ml de tampão cacodilato, utilizando centrifugação a 13000 rpm. Os agregados foram desidratados pelo contato com uma série de soluções com concentrações crescentes de acetona: 50%, 70%, 90% (5 min em cada uma) e 100% (duas trocas, 5 min cada). Após cada período de incubação, realizou-se centrifugação a 13000 rpm por 2 min e o descarte do sobrenadante. Adicionou-se então 500 µl de uma mistura 1:1 de acetona 100% e resina Poly/Bed 812 (Polysciences, USA) e deixou-se *overnight*. A mistura foi trocada pela resina pura que permaneceu em contato com os agregados durante 4-6 h à temperatura ambiente. Finalmente, o material foi emblocado em resina pura e polimerizado a 60°C por 72 h.

Os blocos foram cortados no ultramicrótopo EM UC6 (Leica) a uma espessura de 70 nm e coletados em grades de cobre de 300 mesh (EMS, USA). Realizou-se o contraste das grades por 30 min em acetato de uranila e por 3 min em citrato de chumbo. As imagens foram obtidas no microscópio eletrônico de transmissão JEOL-1011 (Jeol), localizado na Plataforma Multiusuários da Fundação Osvaldo Cruz do Rio de Janeiro.

5.8 TRATAMENTOS COM TSA E 5AZADC

Para verificar o envolvimento de mecanismos epigenéticos no processo de diferenciação, mais especificamente o efeito das modificações em histonas e a metilação do DNA, foram analisados os efeitos da TSA e da 5azadC, respectivamente.

Para o tratamento com TSA (Sigma) foram utilizadas as concentrações de 5, 50 e 500 nM, enquanto que para o tratamento com 5azadC (Sigma) foram testadas as concentrações de 1, 10 e 100 μ M. As drogas dissolvidas em DMSO foram adicionadas às culturas dois dias antes de se iniciar a indução adipogênica (FIGURA 6). As culturas controle foram tratadas com a maior concentração de DMSO utilizada nos tratamentos.

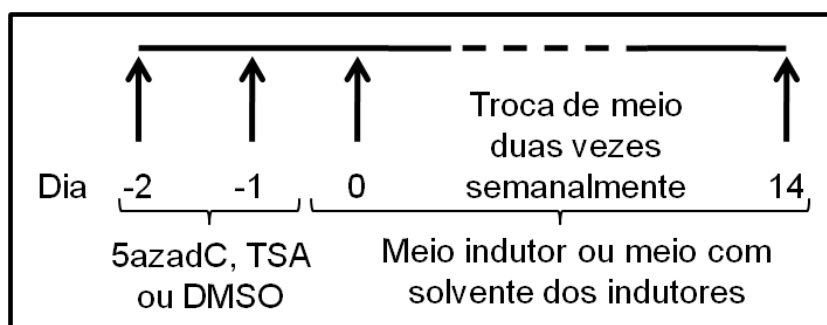


FIGURA 6 - Esquema temporal do tratamento com TSA e 5azadC.

5.9 MARCAÇÃO COM OIL RED O

As culturas foram lavadas duas vezes com PBS, fixadas com solução de paraformaldeído (PF) 4% por 30 min à temperatura ambiente, lavadas duas vezes com PBS. Foi feita a marcação com a solução de *Oil Red O* (ORO) por 1 hora. Para esta solução foram misturados 2 volumes de ORO 0,5% em isopropanol com 3 volumes de água. Após a marcação, as culturas foram lavadas intensivamente com água para remover o corante não ligado. As imagens foram obtidas utilizando o microscópio invertido NIKON ECLIPSE TE300.

5.10 MARCAÇÃO COM VERMELHO NILO

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

As culturas foram lavadas com PBS e fixadas com solução de PF 4% à temperatura ambiente por 10 min. Após duas lavagens com PBS, as células foram marcadas com uma solução de VN por 30 min à 4°C. A solução de VN foi preparada imediatamente antes do uso diluindo-se mil vezes em PBS uma solução-estoque que consistia de 1 mg/ml de VN dissolvido em DMSO (Sigma). Em seguida, as culturas foram lavadas duas vezes com PBS e marcadas com DAPI diluído em PBS por 20-30 min. Novamente foram realizadas três lavagens com PBS e as culturas armazenadas a 4°C se necessário.

5.11 QUANTIFICAÇÃO DA DIFERENCIAÇÃO ADIPOGÊNICA

5.11.1 Análise da absorvância de *Oil Red O*

Após marcação com *Oil Red O* (ITEM 5.9) das células cultivadas em placas de 24 poços, foi realizada a extração do corante absorvido nas vesículas lipídicas adicionando-se 200 µl de isopropanol a cada poço. Decorridos 30 min sob agitação, 50 µl da solução de cada amostra foram coletados em triplicata e distribuídos em placas de 96 poços. Realizou-se a leitura a 550 nm em leitor de Elisa Biotek modelo EL 800. Quanto maior a diferenciação, maior a absorção do corante pelas células e, conseqüentemente, maior a medida da absorvância.

5.11.2 Contagem de células marcadas com Vermelho Nilo

Dez imagens de campos aleatórios (aumento de 200X) de culturas marcadas com Vermelho Nilo (ITEM 5.10) e DAPI foram obtidas utilizando o microscópio invertido NIKON ECLIPSE TE300. O total de células de cada uma das dez imagens foi determinado, distinguindo-se entre células diferenciadas e não diferenciadas. Calculou-se, então, a porcentagem de células diferenciadas nas culturas induzidas.

5.12 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE GÊNICA POR PCR

5.12.1 Extração de RNA

O RNA total foi extraído das células em cultura utilizando o kit RNAeasy (QIAGEN), conforme instruções do fabricante.

Para o isolamento do material das células, o meio de cultivo foi retirado e a monocamada foi lavada rapidamente com PBS 1 M, pH 7,4, estéril, a 37°C em um volume suficiente para cobri-las.

A cada amostra foram adicionados 600 µl de tampão RLT (incluso no kit) acrescidos de β-mercaptoetanol (Sigma) e homogeneizou-se até desagregação da monocamada celular. O lisado foi recolhido para microtubos ao qual foram adicionados 600 µl de etanol 70%. Após nova homogeneização, o lisado foi aplicado sob as colunas. Centrifugou-se por 15 segundos a no mínimo 8000 x g e descartou-se o filtrado. Foram aplicados 350 µl de tampão RW1 (incluso no kit) sobre a coluna e centrifugou-se por 15 segundos a no mínimo 8000 x g. Descartou-se o filtrado.

Foi realizado o tratado do material retido na coluna com DNase I (Qiagen): 80 µl de DNase I foram aplicados sobre a coluna e incubou-se por 15 minutos a 20-30°C. Aplicou-se 350 µl de tampão RW1 (incluso no kit) sobre a coluna e centrifugou-se por 15 segundos a no mínimo 8000 x g. Descartou-se o filtrado com o tubo. Aplicou-se 500 µl de tampão RPE (incluso no kit) sobre a coluna e centrifugou-se por 15 segundos a no mínimo 8000 x g. Descartou-se o filtrado e aplicou-se 500

μ l de tampão RPE sobre a coluna. Centrifugou-se por 2 minutos a no mínimo 8000 x g. Descartou-se o filtrado com o tubo.

Foram adicionados 50 μ l de água livre de RNase (inclusa no kit) para solubilização do RNA. Decorridos 2 a 3 minutos, realizou-se a centrifugação por 1 minuto a 10000 x g. O RNA eluído foi dosado no espectrofotômetro Nanodrop ND-100 (Thermo Scientific) e em seguida foi congelado a -80°C ou utilizado para a síntese de cDNA.

5.12.2 Síntese de cDNA

Para a síntese de cDNA foi utilizado o kit de transcrição reversa ImProm-II (Promega), conforme instruções do fabricante.

Foi utilizado 1 μ g de RNA total, em um volume de 8,6 μ l de água. Foi adicionado 1 μ l de oligodT 10 μ M e incubou-se por 10 min à 70°C em equipamento termomixer Confort (Eppendorf). Após resfriamento, foram adicionados os outros componentes do kit: 4 μ l do tampão de reação ImProm II, 2,4 μ l de MgCl_2 (25mM), 1 μ l de dNTPs (10mM), 2 μ l de transcriptase reversa e também 1 μ l RNase Out (Promega). Em seguida à incubação por 2 h à 42°C no termomixer, procedeu-se a digestão do RNA com adição de 0,5 μ l de RNase H 2 U/ μ l (Promega) durante 30 min a 37°C .

Para a purificação do cDNA, foram adicionados 500 μ l de água ultrapura aos tubos, efetuou-se a transferência para colunas Amicon Ultra 30K (Millipore) e centrifugou-se a 14000 x g por 10 min a 25°C . Após a inversão das colunas em um novo tubo e recuperação do cDNA pela centrifugação a 1000 x g por 3 min, o material foi reconstituído com 300 μ l água ultrapura, dosado no espectrofotômetro Nanodrop ND-100 (Thermo Scientific) e aliquoteado. As amostras foram armazenadas a -20°C .

5.12.3 Iniciadores

Para as reações de PCR foram utilizados iniciadores desenhados com o uso da plataforma DNASTAR (Laser Gene) com base nas sequências dos genes humanos disponíveis no endereço eletrônico do *National Center of Biotechnology Information* (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) conforme APÊNDICE B. Para o desenho dos iniciadores, foram empregadas as seguintes características: cada iniciador localizado preferencialmente na junção de exons diferentes, a fim de não possibilitar a amplificação de DNA genômico, temperatura de anelamento entre 55 e 62°C, baixa taxa de formação de grampos.

5.12.4 PCR

A PCR foi realizada utilizando-se 20 ng de cDNA como molde, 10 pmol de primers, 5 mmol/l de MgCl₂, 0,25 mmol/l de dNTPs e 0,6 U de Taq polimerase. As condições de PCR incluíram um aquecimento inicial por 2 minutos à 94°C, seguido por 30 ou 35 ciclos à 94°C por 15 s, 30 s na temperatura de anelamento e 40s à 72°C e extensão final por 2 minutos à 72°C. 10 µl dos produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose. As bandas obtidas foram visualizadas por marcação com brometo de etídio e fotografadas com o transiluminador (L-Pix, Locus Biotecnologia).

Os primers utilizados e suas informações correspondentes se encontram no APÊNDICE A.

5.12.5 PCR em tempo real

As amplificações utilizaram o master mix SYBR Green (Applied Biosystems). Misturaram-se 10 µl desta solução, 1 µl de cada iniciador a 5 pmol e 3 µl de água ultrapura, totalizando 15 µl. Foi realizada a homogeneização e distribuição na placa de PCR (Applied Biosystems). Uma curva padrão contendo amostras positivas para o gene em análise diluídas em série foi incluída para avaliar a expressão gênica. 5

µl das amostras foram aplicados na placa, em triplicata. A placa foi vedada com filme selante (Applied Biosystems) e centrifugada a 2000 rpm por 1 min.

Para a PCR quantitativa utilizou-se o sistema de detecção ABI PRISM 7500 (Applied Biosystems). As condições de PCRs incluíram uma etapa inicial de desnaturação a 95°C por 15 s, seguida por 45 ciclos de 95°C por 15s, 60°C por 30 s e 72°C por 30 s. Foi incluída a análise da curva de dissociação após a corrida para verificar a especificidade da reação de amplificação.

Para o cálculo da expressão gênica, a média dos valores correspondentes aos genes alvos (PPARG, FABP4 e GATA2) foi normalizada dividindo-se pela média encontrada para o gene constitutivo GAPDH. As informações correspondentes aos primers utilizados se encontram no APÊNDICE A.

5.13 ANÁLISE DO CONTEÚDO DE METILCITOSINA

5.13.1 Extração de DNA

O kit Qiamp DNA mini (Qiagen) foi utilizado para a extração do DNA genômico. Foram plaqueadas 2×10^5 células em garrafas de 75cm². A monocamada foi lavada com PBS e coletada por raspagem para microtubo. Centrifugou-se a 300 x g por min, descartou-se o sobrenadante e adicionou-se 200 µl de PBS, 20 µl de proteinase K e 200 µl de tampão AL (incluso no kit). Após homogeneização por 15 s, seguiu-se incubação de 10 min a 56°C. Adicionou-se 500 µl de etanol 100% e homogeneizou-se por 15 s. A mistura foi transferida para uma coluna acoplada a um tubo de coleta (inclusos no kit). Realizou-se centrifugação a 6000 x g por 1 min. Descartou-se o tubo contendo o filtrado e adicionou-se à coluna 500 µl de tampão AW1 (incluso no kit). Novamente centrifugou-se a 6000 x g por 1 min e descartou-se o tubo contendo o filtrado. Adicionou-se 500 µl do tampão AW2 (incluso no kit) e centrifugou-se a 20000 x g (velocidade máxima) por 3 min. A coluna foi acoplada a um novo microtubo e adicionou-se 200 µl de tampão AE. Após 5 min à temperatura ambiente, o DNA foi eluído centrifugando-se a 6000 x g por 1 min. As amostras foram dosadas em triplicata utilizando o espectrofotômetro Nanodrop ND-100 (Thermo Scientific) e armazenadas a -20°C.

5.13.2 SLOT BLOT

Foi realizado *slot blotting* de 1 µg do DNA genômico de cada amostra. Após completar o volume para 100 µl com tampão TE pH 8,0, adicionou-se 0,1 volume de NaOH 3 M e incubou-se por 1 hora a 60°C para desnaturar o DNA. Após o resfriamento, adicionou-se 1 volume de SSC 6X. As amostras foram aplicadas em membrana de nitrocelulose Hybond-ECL (GE Healthcare) pré-umedecida em água destilada e pré-imersa em SSC 6X, utilizando o sistema de vácuo Minifold II Slot Dot (Schleicher & Schuell). pré-imersa em SSC 6X utilizando o aparato para *Slot Blotting* Mini Fold II (Schleicher&Schuell, Inc). Os poços foram pré-lavados com 500 µl de SSC 6X e as amostras foram então aplicadas. O DNA foi imobilizado na membrana durante 1 h a 80°C.

5.13.3 Imunomarcação

Foi realizado o bloqueio da membrana contendo as amostras utilizando TBST/BSA 5% durante 1 h a temperatura ambiente sob agitação. Incubou-se com anticorpo primário anti-metilcitosina (Abcam) durante 3 h a temperatura ambiente. Seguiram-se três lavagens de 5 minutos cada com TBST e incubou-se com o anticorpo secundário por 1 h a temperatura ambiente. Novamente foram realizadas três lavagens de 5 minutos cada com TBST.

5.13.4 Revelação por quimioluminescência

Foi utilizado o kit Novex ECL HRP Chemiluminescent Substrate Reagent (Invitrogen) e procedeu-se conforme instruções do fabricante. Após incubar a membrana por 1 minuto com as soluções, drenou-se o excesso e procedeu-se a exposição a filme autorradiográfico (Hyperfilm ECL, Amersham). O filme foi imerso em solução reveladora (Kodak), água e então em solução fixadora (Kodak).

5.14 ANÁLISE DA PROLIFERAÇÃO CELULAR PELA INCORPORAÇÃO DE BRDU

Culturas celulares com 80% de confluência foram tratados com 5azadC ou TSA por dois dias e então incubadas com 100 μ M de BrdU (Invitrogen) por 24 horas. Após a tripsinização, as células foram lavadas com PBS e fixadas com etanol 100% gelado durante 30 min no gelo. Seguindo a centrifugação a 2000 rpm por 5 min e ressuspensão em 100 μ l de água destilada, as células foram aquecidas por 5 min a 95°C a fim de desnaturar o DNA e em seguida foram rapidamente imersas em banho de gelo. Realizou-se a incubação com o anticorpo anti-BrdU conjugado a Alexa Fluor 488 (Invitrogen), diluído (1:200) em PBS/1% BSA, durante 30 min à temperatura ambiente. A aquisição de dados foi realizada no citômetro de fluxo BD FACSCanto II equipado com software de análise FACSDiva (BD Bioscience) e as análises foram realizadas utilizando o software Flow Jo versão 7.5.

5.15 IMUNOPRECIPITAÇÃO DA CROMATINA

Três amostras de CTMs-MO e três de CTMs-TA foram analisadas. Para cada uma delas, culturas induzidas e não induzidas foram avaliadas: uma alíquota foi reservada como *Input* e as alíquotas restantes foram imunoprecipitadas (IP) utilizando os anticorpos para acH3, 3meH3K9, 3meH3K27 além do isotipo. O desenho experimental da imunoprecipitação de cromatina (ChIP) está detalhado na FIGURA 7.

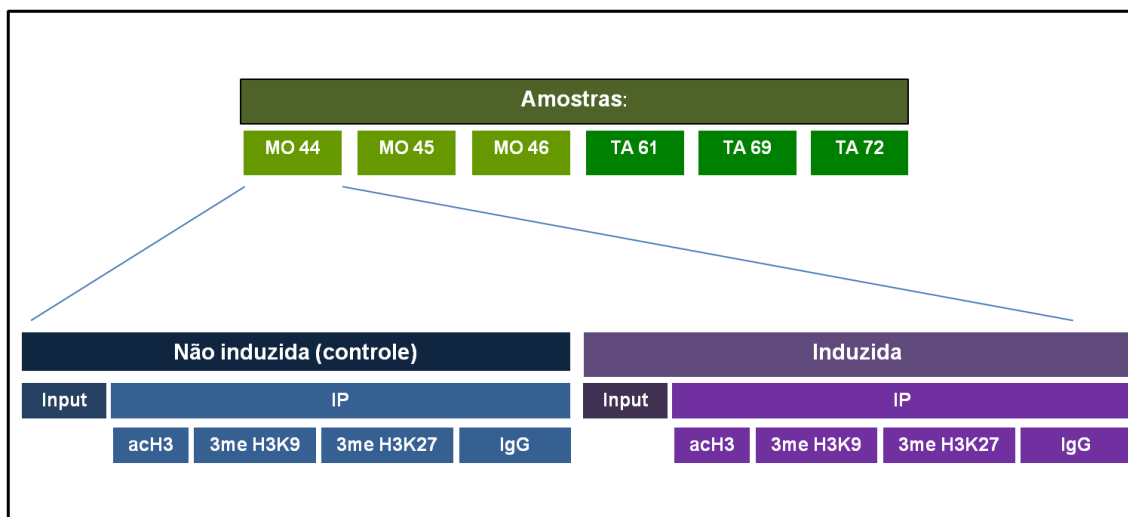


FIGURA 7 - Desenho experimental da ChIP.

5.15.1 Fixação das células

Para a ChIP de culturas de CTMs induzidas e não induzidas foi utilizado o kit *EZ-Magna Chip A* (Millipore), procedendo-se conforme instruções do fabricante. As células cultivadas em garrafas de 150 cm² foram fixadas adicionando-se PF 37% a 20 ml de meio de cultura de modo a se ter uma concentração final de 1% PF. Seguiu-se uma incubação de 10 min à temperatura ambiente. Adicionou-se 1 ml de glicina 10X (incluída no kit) para inativar o formaldeído que não reagiu, incubando por 5 min à temperatura ambiente. As garrafas foram então colocadas no gelo, o meio foi aspirado, removendo-se tanto quanto possível, sem perturbar as células. Foram adicionados 10 mL de PBS gelado para lavar as células. Repetiu-se a lavagem com PBS. Adicionou-se 1 mL de PBS gelado contendo 5 µl do *Protease Inhibitor Cocktail II* (incluído no kit) para cada garrafa. As células foram coletadas por raspagem para microtubos. Realizou-se centrifugação a 1000x g a 4°C por 10 minutos para sedimentar as células e descartou-se o sobrenadante. O centrifugado foi congelado a -80°C.

5.15.2 Lise celular

O centrifugado foi descongelado em gelo e foi ressuspenso adicionando-se a cada microtubo 500 μ l de *Lysis Buffer* (incluído no kit) contendo 2,5 μ l de *Protease Inhibitor Cocktail II*. Incubou-se no gelo por 15 min, misturando brevemente a suspensão celular em vortex a cada 5 min. A suspensão foi centrifugada a 800x g por 5 min a 4°C. O sobrenadante foi removido e o pellet celular foi ressuspenso em 500 μ l de *Nuclear Lysis Buffer* (incluído no kit) contendo 2,5 μ l do *Protease Inhibitor Cocktail II*.

Foram removidos 5 μ l do lisado celular para análise em gel de agarose do DNA não fragmentado. Foi realizada a fragmentação da cromatina por sonicação utilizando o Ultrasonic Processo modelo 500 W (Cole Parmer). Foram realizados pulsos de 5 segundos, potência de 20%. As amostras foram mantidas em gelo úmido durante a sonicação pois o calor produzido poderia desnaturar a cromatina. Respeitou-se um intervalo de 1 minuto entre os ciclos de sonicação para impedir o sobreaquecimento da amostra. As amostras foram sonicadas até se obterem fragmentos de 200-100 pb, ou seja, em torno de 10 a 15 pulsos foram utilizados.

As amostras foram analisadas em gel de agarose 2% para verificar o tamanho atingido juntamente com a alíquota previamente separada do DNA não fragmentado. Para isso, alíquotas das amostras diluídas para um volume final de 50 μ l de *ChIP Elution Buffer* foram tratadas com 1 μ l de RNase A (10 mg/ml, Invitrogen) por 30 min a 37°C e em seguida incubadas com 1 μ l de Proteinase K por 2 h a 62°C.

Uma vez atingido o tamanho adequado, as amostras foram centrifugadas a no mínimo 10000 x g, mas não excedendo 15000 x g, a 4°C por 10 min para remover material insolúvel. O sobrenadante foi distribuído em novos tubos de microcentrífuga em alíquotas de 50 μ l, os quais foram armazenados a -80°C.

5.15.3 Imunoprecipitação de proteína/DNA fixado

Para cada 50 μ l da cromatina fragmentada foram adicionados 450 μ l de *Dilution Buffer* (incluído no kit) contendo 2,25 μ l de *Protease Inhibitor Cocktail II*. Foram removidos 5 μ l (1%) do sobrenadante como *Input* e guardados a 4°C.

Os anticorpos foram adicionados aos microtubos. Para a imunoprecipitação foram utilizados 5 µg dos anticorpos acH3 (Millipore), 3meH3K9 (AbCam), 3meH3K27 (Millipore) e também o isotipo IgG (Millipore, incluído no kit) (APÊNDICE B). Foram também adicionados 20 µl de *Protein A Magnetic Beads* (incluídas no kit) completamente ressuspendidas.

Os complexos cromatina-anticorpo ligados às *Protein A Magnetic Beads* foram separados utilizando estante magnética (Promega): os microtubos foram encaixados na estante, as *beads* magnéticas se deslocaram para a lateral da estante atraídas pelo magnetismo, o sobrenadante foi coletado e descartado. Prosseguiu-se a lavagem dos complexos seguida pela separação magnética e cuidadosa remoção da fração sobrenadante, incubando-se em plataforma agitadora durante 5 min com 500 µl dos tampões gelados *Low Salt Immune Complex Wash Buffer*, *High Salt Immune Complex Wash Buffer*, *LiCl Immune Complex Wash Buffer*, *TE Buffer*.

5.15.4 Eluição dos complexos proteína/DNA e purificação do DNA

Foram adicionados 100 µl de *ChIP Elution Buffer* (incluído no kit) e 1 µl de Proteinase K (incluída no kit) em cada microtubo, incluindo o *Input*. As amostras foram incubadas a 62°C por 2 h com agitação no Thermomixer. Em seguida, foram incubadas a 95°C por 10 min e resfriadas à temperatura ambiente. As *beads* foram separadas usando a estante magnética e o sobrenadante foi removido para um novo microtubo.

Foram adicionados 500 µl de *Bind Reagent A* (incluído no kit) para cada 100 µl das amostras de DNA. A mistura foi transferida para uma coluna com membrana acoplada a um tubo coletor (incluídos no kit). Centrifugou-se por 30 s em um mínimo de 10000 x g, mas não excedendo 15000 x g. Removeu-se a coluna e descartou-se o filtrado do tubo coletor. Recolocou-se a coluna ao tubo coletor, adicionou-se 500 µl de *Wash Reagent B* (incluído no kit). Novamente centrifugou-se por 30 s a no mínimo 10000 x g, mas não excedendo 15000 x g, removeu-se a coluna e descartou-se o filtrado do tubo coletor. A coluna foi recolocada no tubo coletor e centrifugada por 30 s a no mínimo 10000 x g, mas não excedendo 15000 x g. O tubo

coletor contendo o líquido foi descartado e a coluna foi recolocada em um novo tubo coletor. Foram adicionados 50 µl de *Elution Buffer C* (incluído no kit) diretamente no centro da membrana branca da coluna. Realizou-se centrifugação por 30 s a no mínimo 10000 x g, mas não excedendo 15000 x g. A coluna foi removida e descartada e o eluato contendo o DNA purificado foi congelado a -20°C.

Como teste de qualidade do DNA obtido, foram realizadas PCR das amostras com os oligonucleotídeos contidos no kit, específicos para o promotor de GAPDH humano, conforme instruções do fabricante.

5.16 SEQUENCIAMENTO

O DNA eluído foi processado para o sequenciamento na plataforma SOLiD utilizando o protocolo descrito no *ChIP-Seq Kit Guide* (http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/global_marketing_group/document/generaldocuments/cms_079323.pdf), a partir da etapa 10, incluindo as modificações descritas em *ChIP-Seq Library Preparation with Barcodes* (http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/cms_091697.pdf). As bibliotecas foram então geradas seguindo o protocolo *Applied Biosystems SOLiD™ System Templated Bead Preparation Guide* (http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_support/documents/generaldocuments/cms_081748.pdf). As amostras geraram 4 bibliotecas que foram depositadas em uma lâmina segmentada em 4 poços e sequenciadas.

Para cada amostra uma análise de qualidade foi realizada usando o pacote NGSQC R.

5.17 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Amostras de distintos doadores foram avaliadas e o número analisado está especificado nos gráficos e figuras. Os dados foram expressos como “média ± desvio padrão”. Para a análise estatística foi utilizado o teste t de *Student*. As

diferenças foram consideradas significativas em $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) ou $p < 0,001$ (**).

6 RESULTADOS

6.1 ANÁLISE DA ARQUITETURA NUCLEAR E DA CROMATINA DE CTMS NA DIFERENCIAÇÃO ADIPOGÊNICA

A mudança na arquitetura nuclear ao longo do processo de diferenciação foi investigada pela análise morfológica da lâmina nuclear e dos nucléolos.

A marcação de lamina A/C, proteína constituinte da lâmina nuclear, inicialmente se apresentou uniforme em CTMs (FIGURA 8 A-D) e após a diferenciação em adipócitos, passou a apresentar uma morfologia irregular (FIGURA 8 E-H). Nas células diferenciadas o núcleo deslocou-se para a periferia celular (FIGURA 8 H) e sua área diminuiu em média 40% (FIGURA 9), o que pode ser atribuído à compressão pelas vesículas lipídicas ou à formação de heterocromatina, resultando na compactação nuclear.

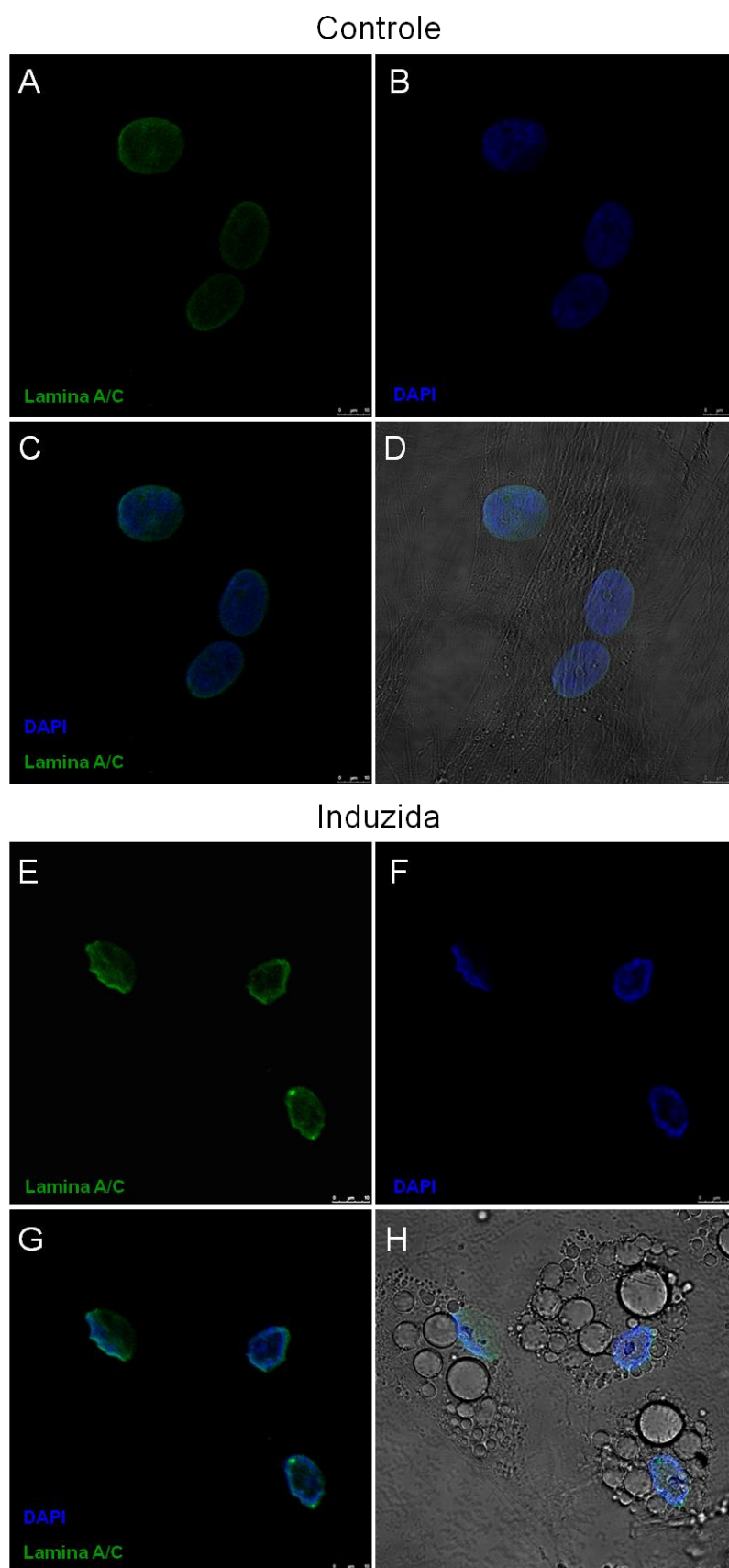


FIGURA 8 - Análise da morfologia nuclear CTMs induzidas à adipogênese. (A-H) Imagens de imunofluorescência de CTMs-MO marcadas com lamina A/C (verde) e DAPI (azul) após 14 dias na presença ou ausência de indução. (D e H) Sobreposições das marcações e DIC.

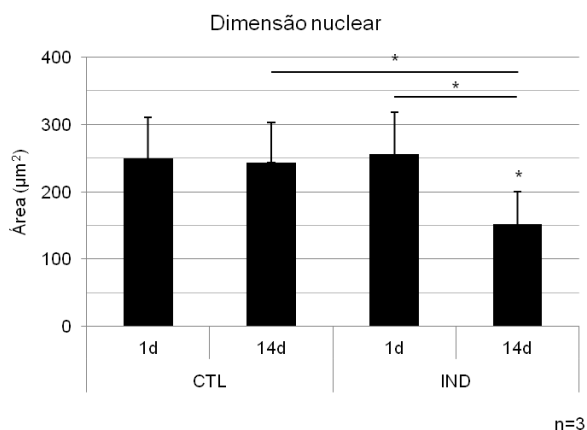


FIGURA 9 - Análise quantitativa da área nuclear após 1 e 14 dias de condições controle (CTL) ou de indução (IND). Os dados são expressos como médias \pm desvio padrão. O asterisco logo acima da barra de desvio padrão indica a significância estatística relativa às culturas controle após 1 dia. (*) $p < 0,05$.

Duas proteínas foram avaliadas no estudo dos nucléolos: a fibrilarina, presente no componente fibrilar denso dos nucléolos; e a nucleofosmina, encontrada em altos níveis no componente granular do nucléolo (GRISENDI, MECUCCI *et al.*, 2006).

A morfologia nucleolar mostrou-se distinta nas células diferenciadas em relação às culturas controle com 14 dias (FIGURA 10 A-H). Os nucléolos apresentaram formato arredondado nas células controle, enquanto as células diferenciadas possuíam nucléolos com formato irregular. Verificou-se um aumento da área nucleolar em relação à área nuclear nas células diferenciadas (FIGURA 11 B, gráfico). A área individual dos nucléolos demonstrou-se maior nas células diferenciadas em comparação a células controle com 1 dia ou 14 dias quando analisou-se a área ocupada pela fibrilarina e nucleofosmina (FIGURA 11 B, tabela) porém, não houve aumento significativo de nucleofosmina nas culturas induzidas (FIGURA 11 D). Além disso, os nucléolos estavam presentes em menor número nas células diferenciadas em comparação às células controle com 1 dia ou 14 dias (FIGURA 11 C). Logo, o aumento da área nucleolar deve-se provavelmente ao remodelamento nuclear resultante da diferenciação.

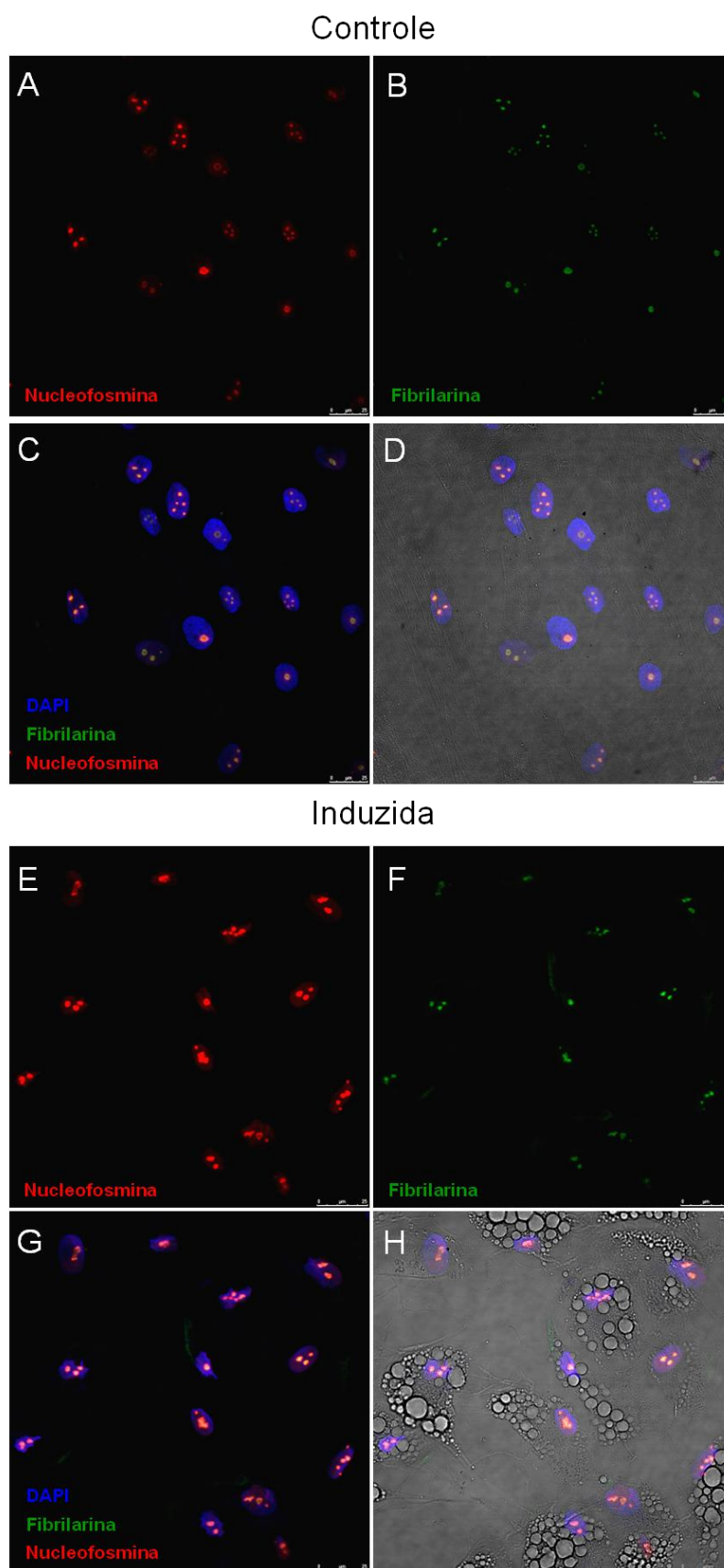


FIGURA 10 - Análise da morfologia nucleolar em CTMs induzidas à adipogênese. (A-H) Imagens de imunofluorescência de CTMs-MO marcadas com nucleofosmina (vermelho), fibrilarina (verde) e DAPI (azul) após 14 dias na presença ou ausência de indução. (D e H) Sobreposições das marcações e DIC.

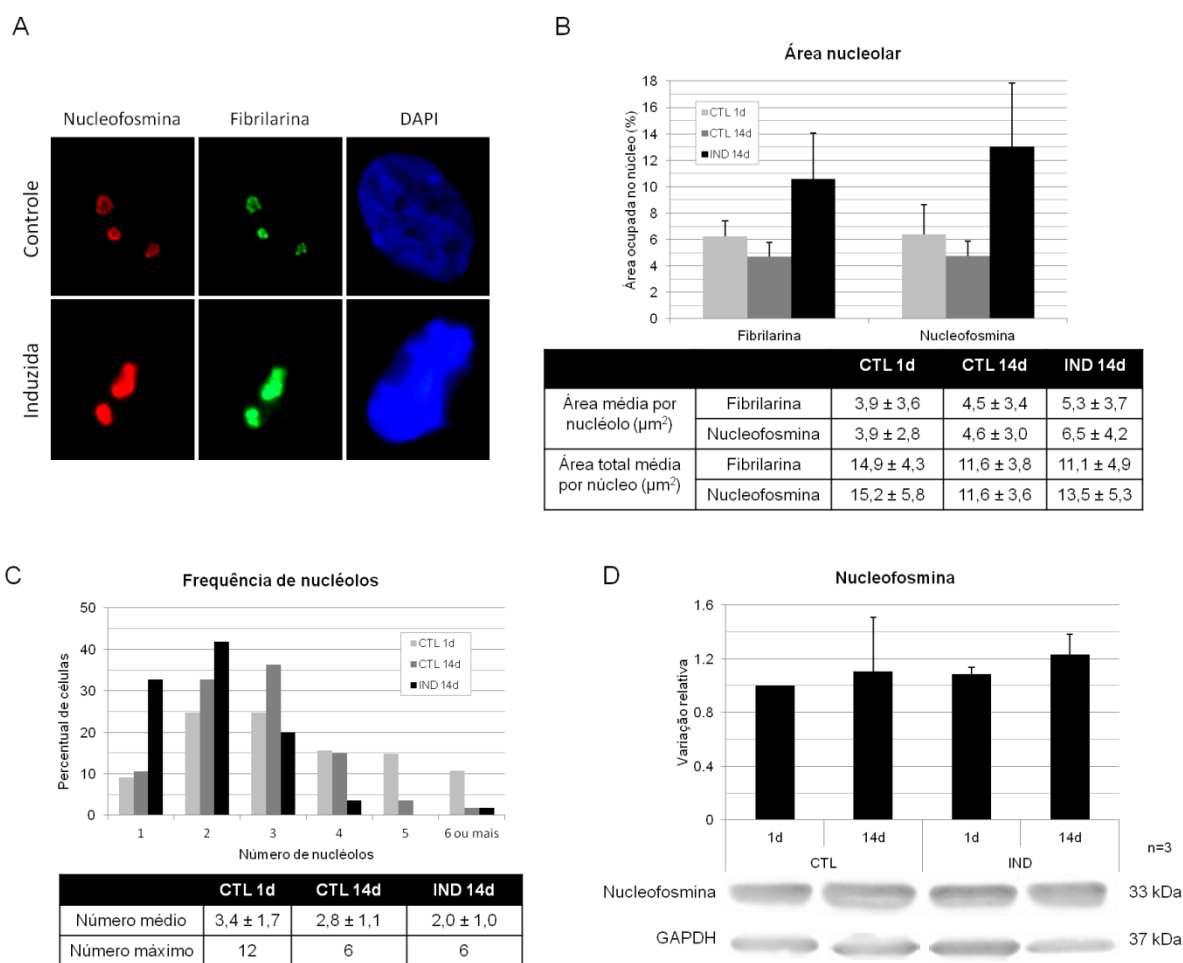


FIGURA 11 - Análise do perfil nucleolar na diferenciação adipogênica de CTMs. (A) Inseto contendo imagens representativas da morfologia nucleolar de CTMs controle e induzida após 14 dias. (B) Análise quantitativa da área nucleolar. No gráfico está representada a porcentagem da área ocupada pelos nucléolos em relação ao núcleo e na tabela logo abaixo são apresentadas as áreas médias de cada nucléolo bem como a área total ocupada pelos nucléolos em cada núcleo analisado. (C) Análise quantitativa da frequência nucleolar em relação ao percentual de células. A tabela logo abaixo do gráfico apresenta o número médio e o número máximo de nucléolos. Em ambas as tabelas os dados são apresentados como média \pm desvio padrão. (D) Análise quantitativa por *Western blot* de nucleofosmina em CTM-MO após 1 e 14 dias de condições controle (CTL) ou de indução (IND); GAPDH foi utilizado como controle. Os dados são expressos como médias \pm desvio padrão.

O arranjo nuclear também foi investigado em nível ultraestrutural por MET. As culturas foram induzidas por 21 dias para que as células diferenciadas estivessem bem maduras. Observou-se que o envoltório nuclear nas células controle era mais liso e regular (FIGURA 12, A e B), semelhante ao observado nas análises de imunofluorescências. Em células diferenciadas o núcleo foi remodelado ficando confinado em um espaço restrito, provavelmente devido à compressão causada pela formação das vesículas lipídicas. Pela análise da eletrondensidade, não foi constatada a formação de heterocromatina com a diferenciação (FIGURA 12 D).

CTM-MO

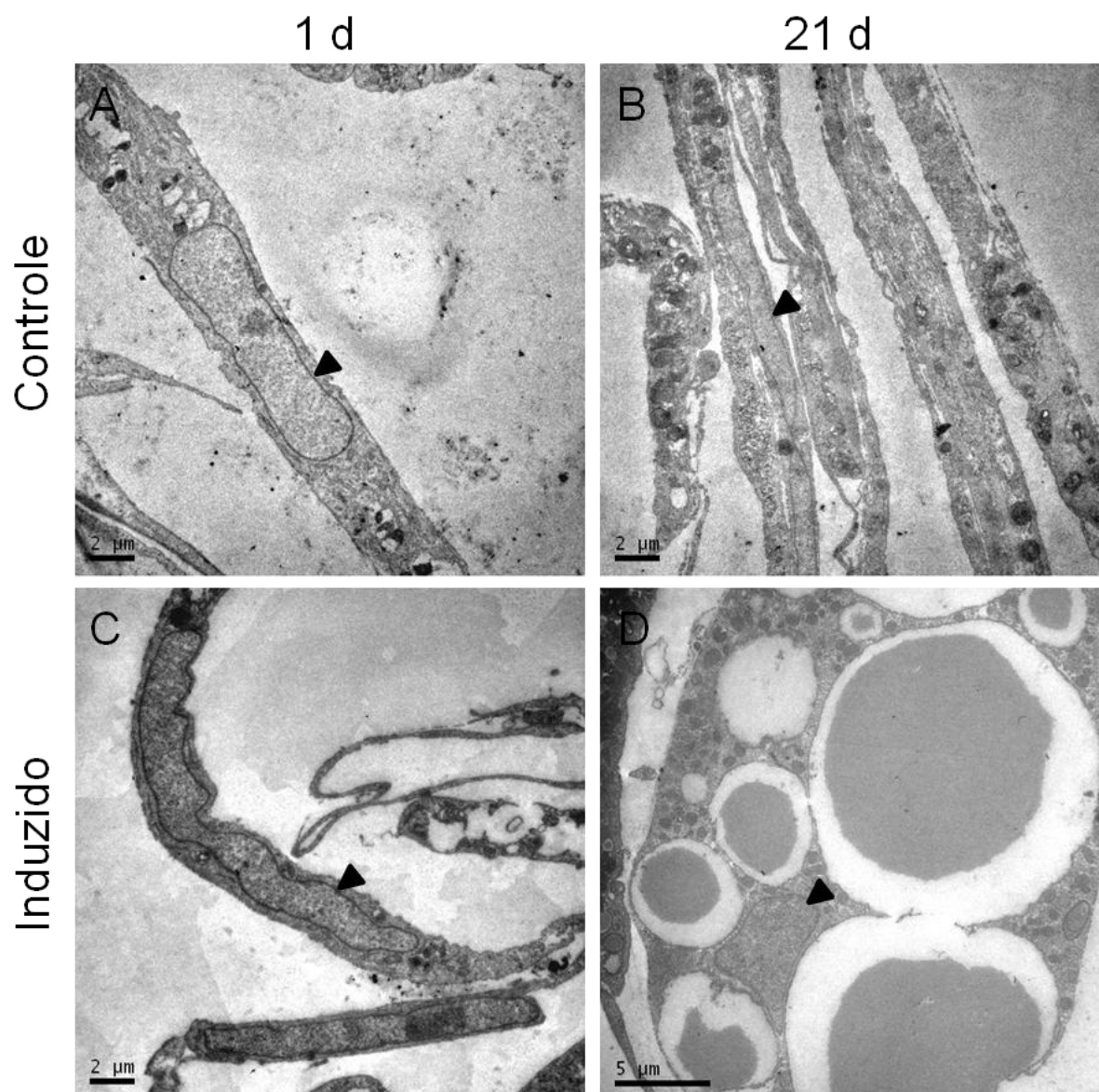


FIGURA 12 - Análise ultraestrutural por microscopia eletrônica de transmissão de CTMs induzidas à adipogênese. Culturas de CTMs-MO foram mantidas em condições controle (A-B) ou de indução (C-D) por 1 dia (A-C) ou 21 dias (B-D). As setas apontam para os núcleos das células.

Os níveis de 3meH3K9, 3meH3K27, H2AZ, me/2me/3meH3K4 e acH3, foram investigados em culturas de CTMs após a indução adipogênica por 1 e 14 dias e comparados às culturas controle mantidas durante os mesmos períodos.

Ao se analisar a distribuição de 3meH3K9 (FIGURA 13 A-H), verificou-se que a marcação estava concentrada em *foci* nas culturas controle com 1 e 14 dias e também após 24 h de indução (FIGURA 13 A, B e E). Houve um acúmulo na periferia nuclear nas células muito diferenciadas (FIGURA 13 F). Apesar de ter

ocorrido aumento de 3meH3K9 nas culturas induzidas e controle com 14 dias, não foi encontrada diferença estatisticamente significativa (FIGURA 14).

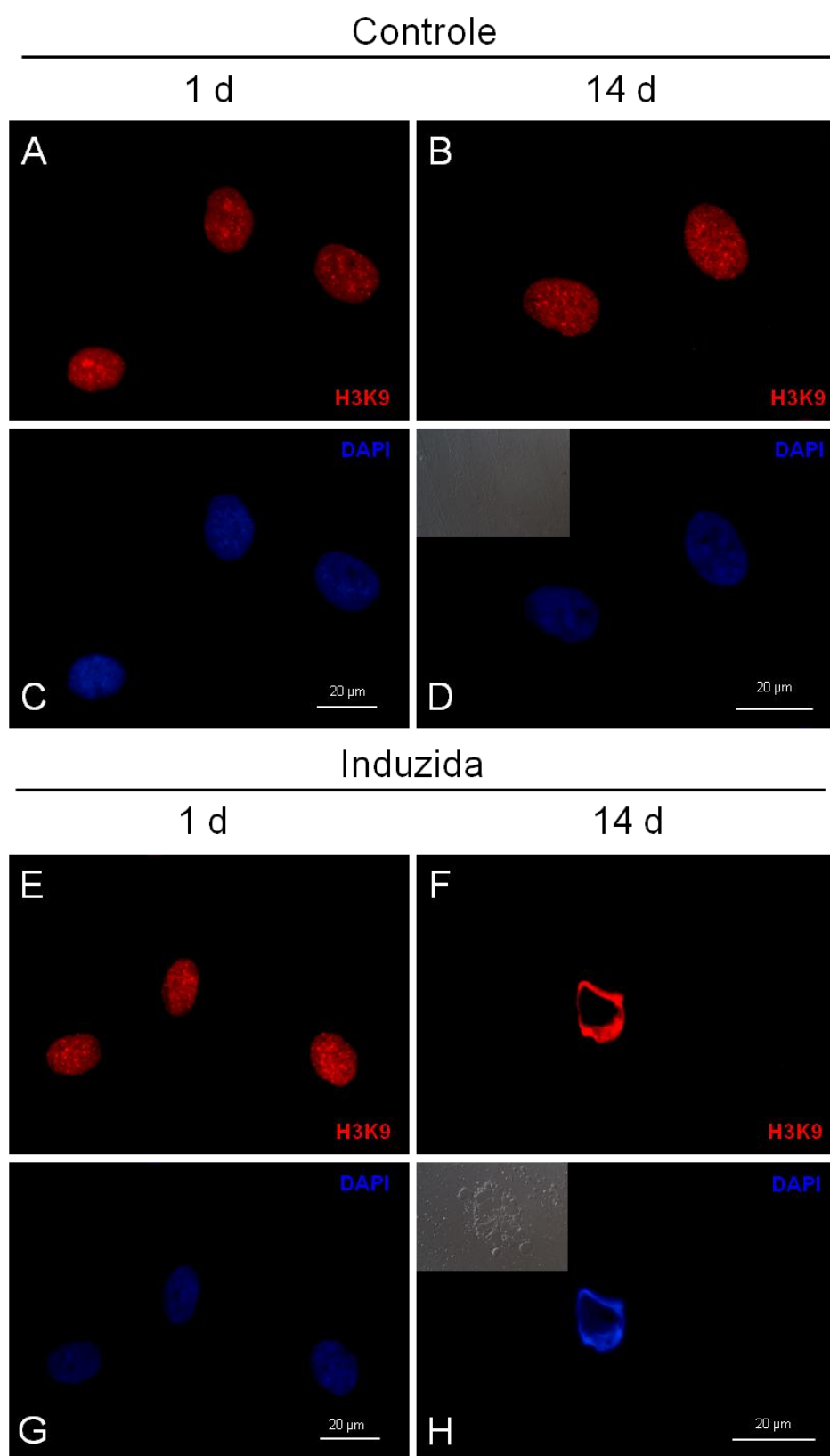


FIGURA 13 - Análise de 3meH3K9 na diferenciação adipogênica de CTMs-MO. (A-H) Imagens de imunofluorescência de CTMs-MO mostrando a marcação com 3meH3K9 (vermelho) e DAPI (azul) após 1 e 14 dias na presença ou ausência de indução. Nos quadros menores são apresentadas as imagens em DIC.

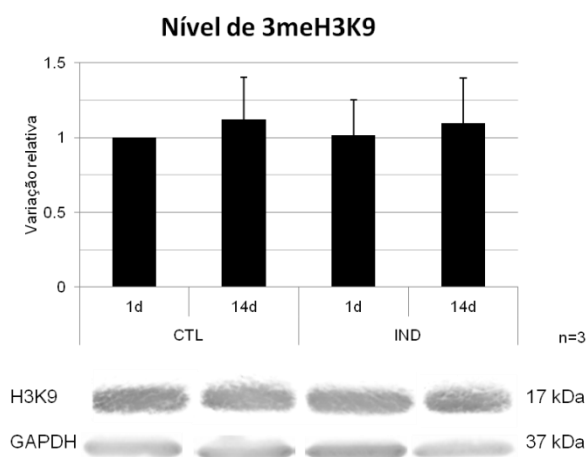


FIGURA 14 - Análise quantitativa mostrando mudanças nos níveis de 3meH3K9 após 1 e 14 dias de condições controle (CTL) ou de indução (IND). Os dados são expressos como médias \pm desvio padrão. Abaixo do gráfico são mostradas imagens representativas das análises por *Western blot*; GAPDH foi utilizado como controle.

A análise de 3meH3K27 mostrou que a proteína estava distribuída de forma granular por todo o núcleo nas culturas controle com 1 e 14 dias e na induzida por 24 horas (FIGURA 15 A, B e E). Da mesma maneira como foi observado para 3meH3K9, houve um acúmulo de 3meH3K27 na periferia nuclear (FIGURA 15 F). Embora tenha ocorrido aumento de 3meH3K27 nas culturas induzidas e controle com 14 dias, e queda após 24 horas de indução, as mudanças não foram estatisticamente significativo (FIGURA 16).

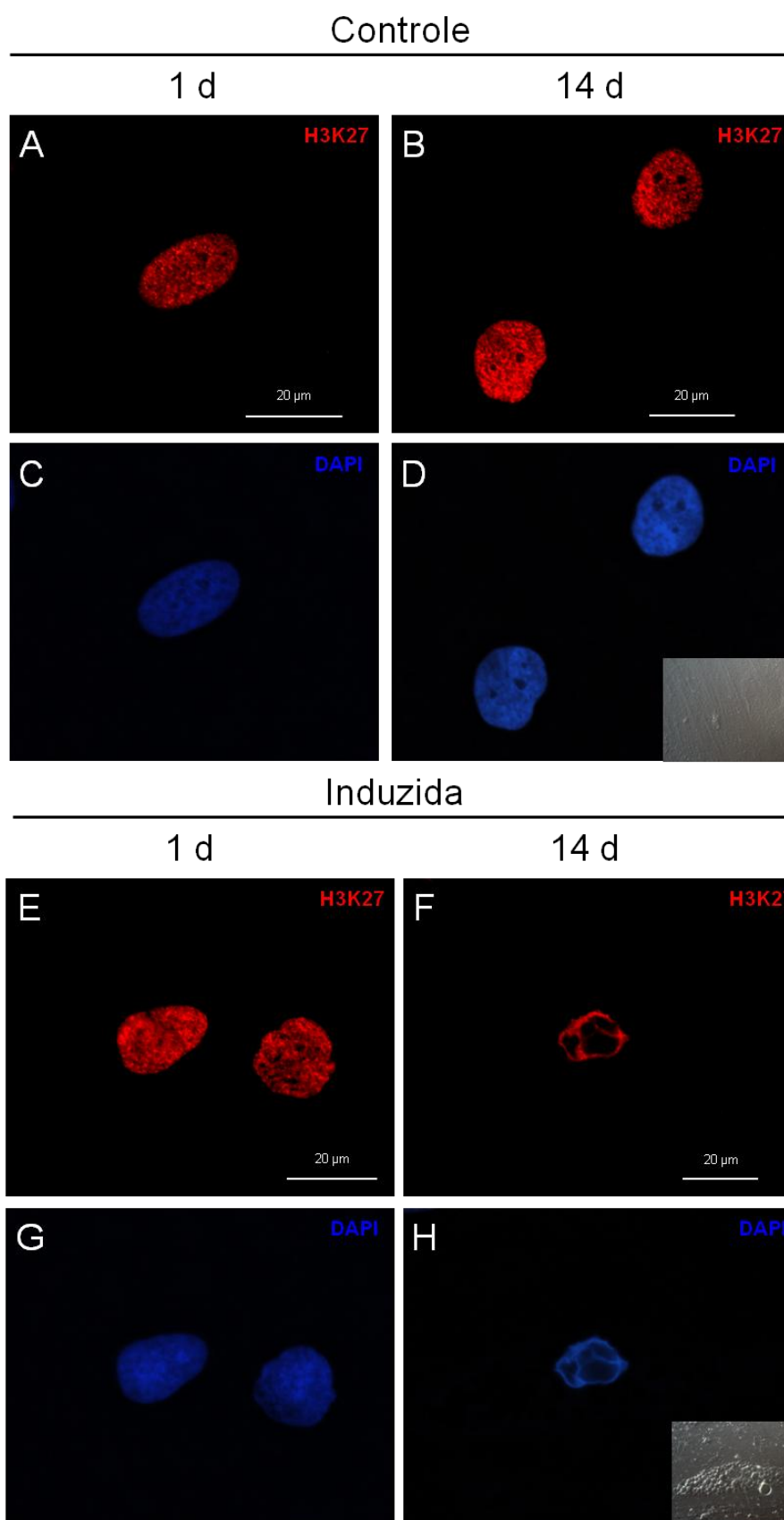


FIGURA 15 - Análise de 3meH3K27 na diferenciação adipogênica de CTMs-MO. (A-H) Imagens de imunofluorescência de CTMs-MO mostrando a marcação com 3meH3K27 (vermelho) e DAPI (azul) após 1 e 14 dias na presença ou ausência de indução. Nos quadros menores são apresentadas as imagens em DIC.

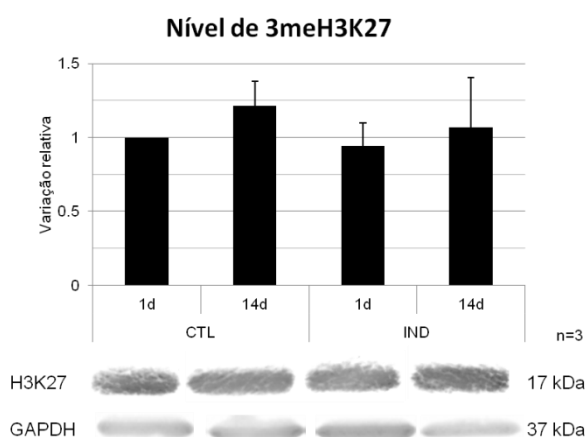


FIGURA 16 - Análise quantitativa mostrando mudanças nos níveis de 3meH3K27 após 1 e 14 dias de condições controle (CTL) ou de indução (IND). Os dados são expressos como médias \pm desvio padrão. Abaixo do gráfico são mostradas imagens representativas das análises por *Western blot*; GAPDH foi utilizado como controle.

Um aumento no nível de H2AZ foi observado após 24 horas de indução, embora não estatisticamente significativo (FIGURA 17).

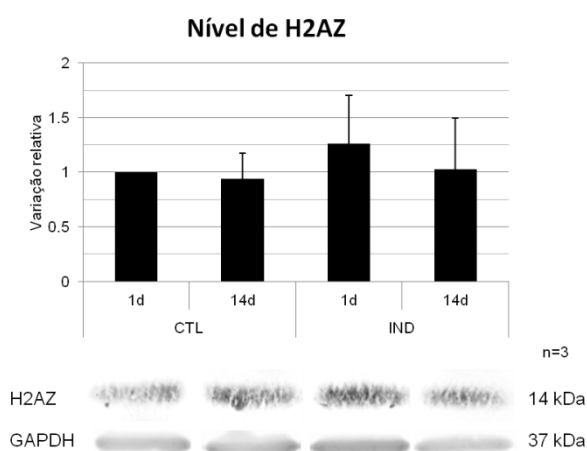


FIGURA 17 - Análise quantitativa de H2AZ na diferenciação adipogênica de CTMs-MO. Análise quantitativa mostrando mudanças nos níveis de H2AZ após 1 e 14 dias de condições controle (CTL) ou de indução (IND). Os dados são expressos como médias \pm desvio padrão. Abaixo do gráfico são mostradas imagens representativas das análises por *Western blot*; GAPDH foi utilizado como controle.

Não houve mudança estatisticamente significativa nos níveis de me/2me/3meH3K4 (FIGURA 18). Apesar disto, a modulação da diminuição de me/2me/3meH3K4 foi observada em imagens de imunofluorescência, onde células iniciando a diferenciação contendo poucas vesículas lipídicas apresentaram uma

marcação mais intensa enquanto células mais maduras possuem menos marcação (FIGURA 19 E).

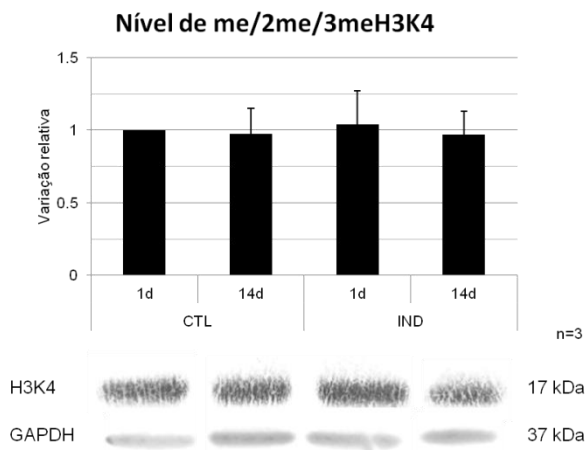


FIGURA 18 - Análise quantitativa por *Western blot* dos níveis relativos de H3K4 metilada em culturas de CTM-MO após 1 e 14 dias de condições controle (CTL) ou de indução (IND); GAPDH foi utilizado como controle. Os dados são expressos como médias \pm desvio padrão.

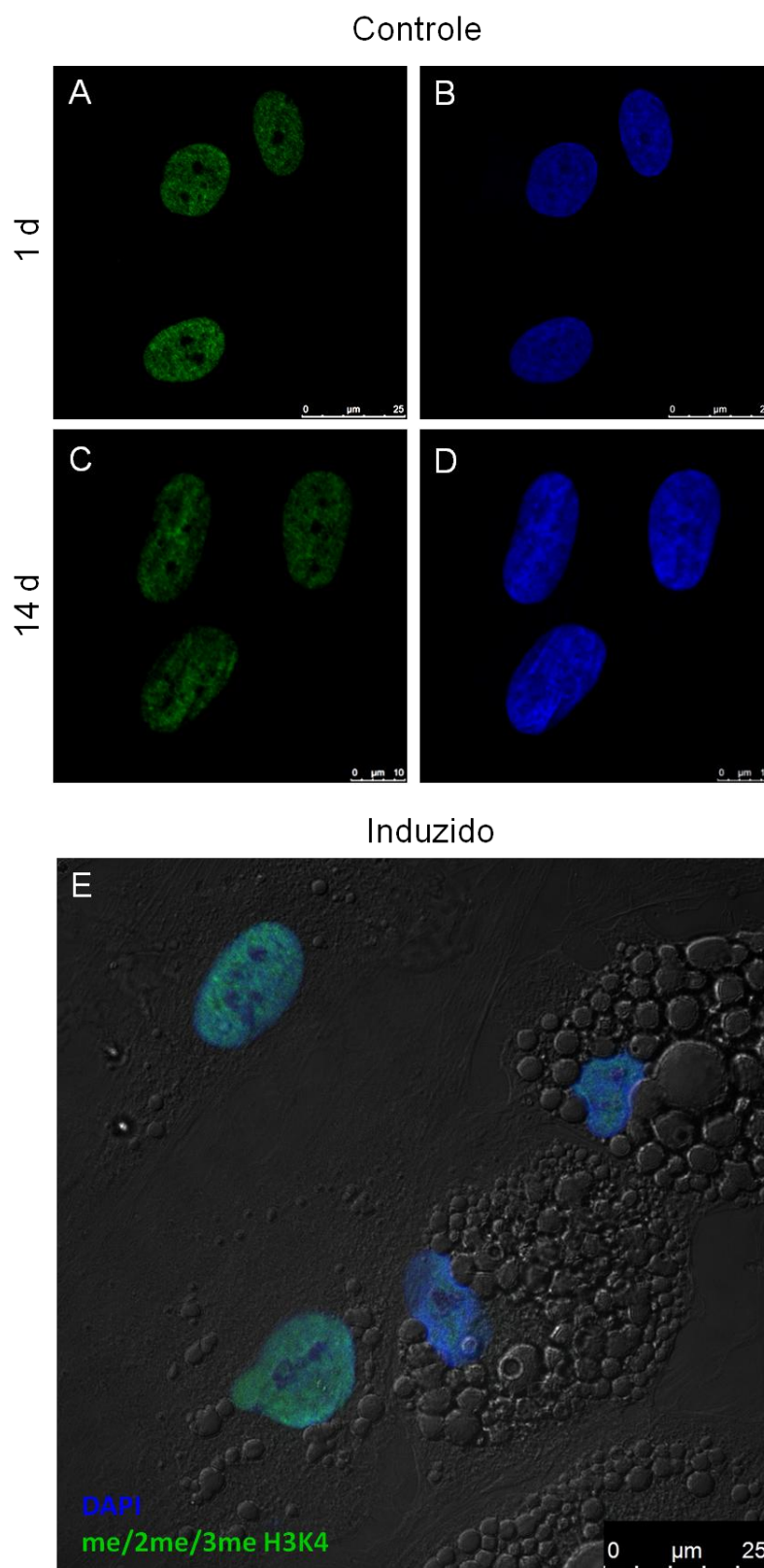


FIGURA 19 - Análise de me/2me/3meH3K4 durante a diferenciação adipogênica de CTMs. Imagens de imunofluorescência de CTMs-MO marcadas com anti-me/2me/3me H3K4 (verde) e DAPI (azul). (A-D) Culturas controle de CTMs-MO após 1 ou 14 dias. (E) Culturas de CTMs-MO induzidas à adipogênese após 14 dias; sobreposição das marcações com DIC.

A acetilação de histonas durante a diferenciação adipogênica foi investigada pela análise de acH3. As culturas controle com 14 dias apresentaram um aumento significativo de acH3 quando comparadas a culturas induzidas com 14 dias (FIGURA 20). A acetilação de histonas foi modulada durante a adipogênese: embora não significativo, houve um aumento na acetilação após 24 horas de indução da diferenciação, sugerindo um remodelamento da cromatina seguindo um estímulo; contrariamente, a acetilação foi significativamente diminuída em células diferenciadas. Uma distribuição distinta de acH3 foi observada com a diferenciação, sendo localizada preferencialmente na periferia nuclear. Porém, a alteração na morfologia nuclear, observada pela marcação com DAPI, coincide com a mudança na marcação de acH3 (FIGURA 21).

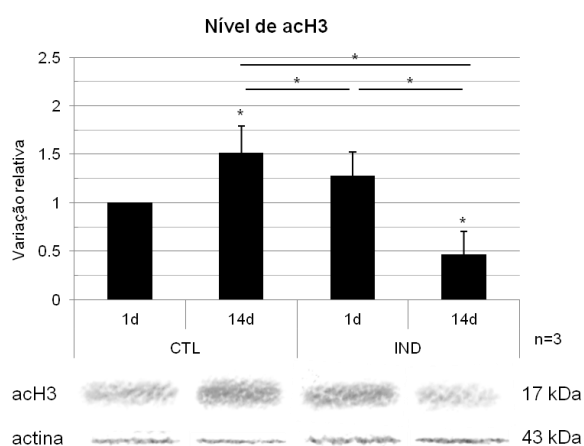


FIGURA 20 - Análise quantitativa por *Western blot* dos níveis relativos de acH3 na diferenciação adipogênica de CTMs após 1 e 14 dias de condições controle (CTL) ou de indução (IND); actina foi utilizada como controle. Os dados são expressos como médias \pm desvio padrão. Os asteriscos logo acima da barra de desvio padrão indicam a significância estatística relativa às culturas controle após 1 dia. (*) $p < 0,05$.

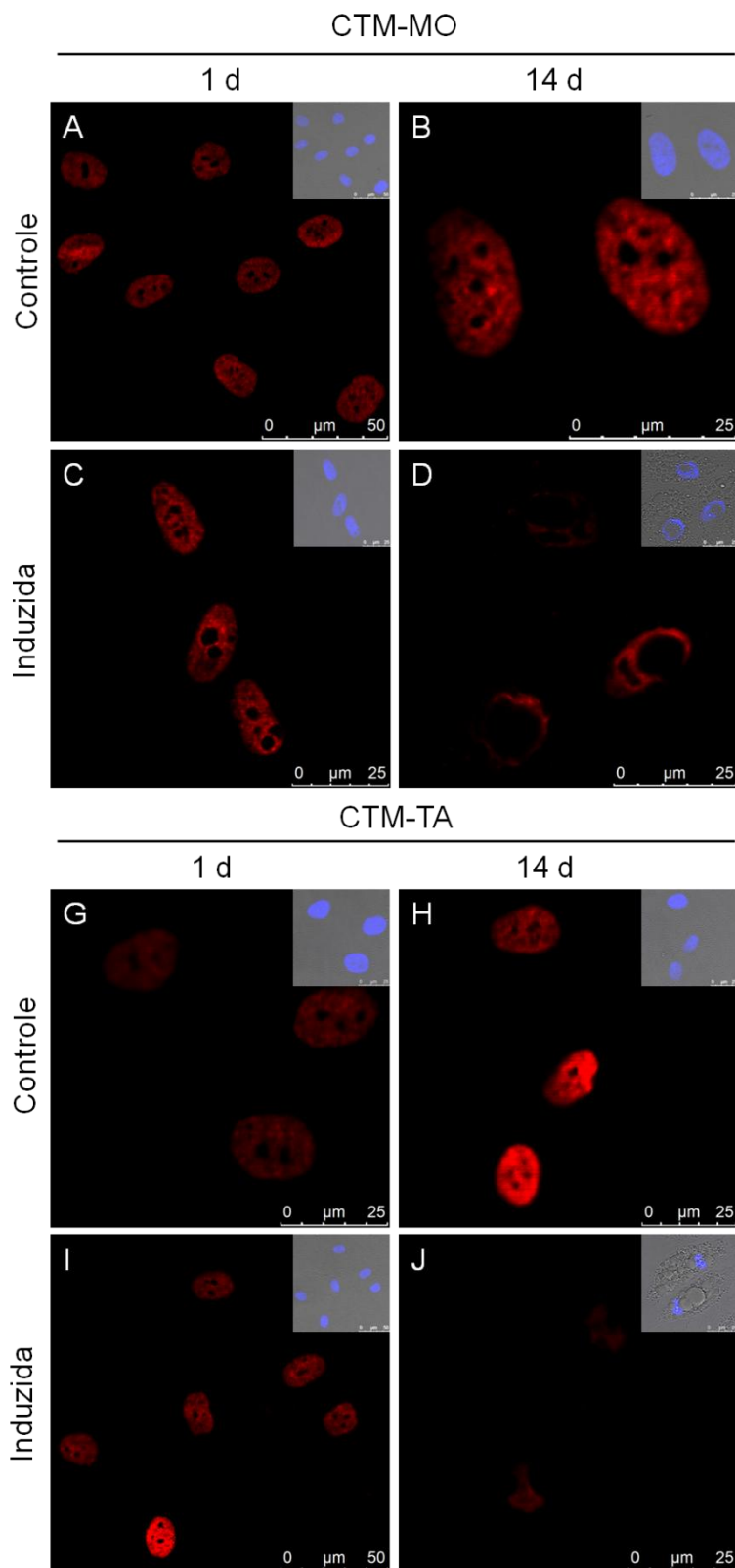


FIGURA 21 - Análise da acetilação de histonas durante a diferenciação adipogênica de CTMs. Imagens de imunofluorescência de CTMs-MO (A-D) e CTMs-TA (G-J) mostrando marcação com acH3 (vermelho) após 1 e 14 dias na presença ou ausência de indução. Nos quadros menores são apresentadas as sobreposições das imagens em DIC e marcadas com DAPI (azul).

A análise das modificações nas histonas estudadas está reunida na FIGURA 22. De modo geral verifica-se que houve uma modulação na cromatina após 24 h de indução, coerente com a necessidade de alteração no perfil transcricional. Assim, níveis de 3meH3K9 e 3meH3K27, que são marcas de cromatina inativa, tendem a aumentar, enquanto me/2me/3meH3K4 e acH3, marcas de cromatina ativa, tendem a diminuir. H2AZ, componente da eucromatina que a protege do espalhamento da heterocromatina silenciada, apresentou o mesmo comportamento que acH3 após 1 dia de indução, e a queda observada ao longo da indução parece ter sido influenciada pelo aumento das marcas de heterocromatina 3meH3K9 e 3meH3K27.

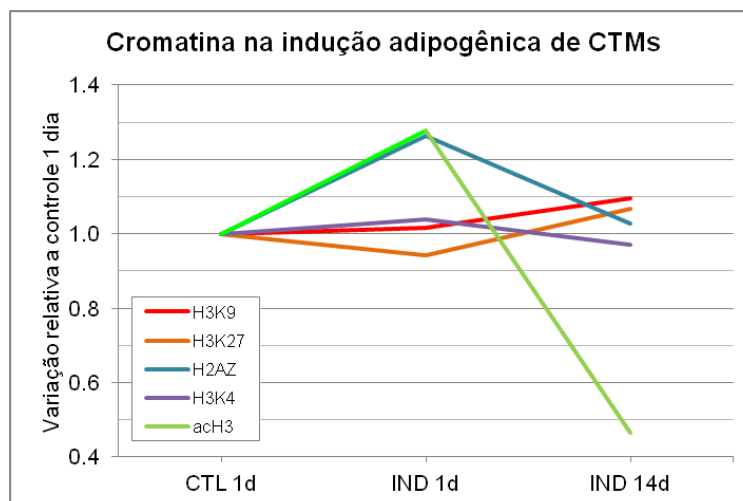


FIGURA 22 - Análise comparativa dos níveis da cromatina detectados por *Western Blot* na diferenciação adipogênica de CTMs.

Todos os parâmetros analisados e as mudanças observadas na diferenciação adipogênica das CTMs estão compilados no QUADRO 3.

	CTM	Adipócito (após 14 dias de indução)
Núcleo	Área média: $244 \pm 59 \mu\text{m}^2$	Área média: $152 \pm 48 \mu\text{m}^2$. Redução da área em 40% e deslocamento para a periferia celular.
Lâmina nuclear	Arredondada	Irregular
Nucléolos	Arredondados. Frequência de 2 a 3 por núcleo.	Irregular. Frequência de 1 a 2 por núcleo. Área individual aumentou, porém os níveis de nucleofosmina não se alteraram significativamente.
3meH3K9	Presente em todo nucleoplasma na forma de <i>foci</i> .	Marcação localizada preferencialmente na periferia nuclear. Não houve mudança significativa no seu nível.
3meH3K27	Marcação granular por todo nucleoplasma.	Marcação localizada preferencialmente na periferia nuclear. Não houve mudança significativa no seu nível.
H2AZ	-	Não houve mudança significativa no seu nível.
me/2me/3meH3K4	Marcação em todo nucleoplasma.	Marcação em todo nucleoplasma. Não houve mudança significativa no seu nível.
acH3	Marcação em todo nucleoplasma, concentrada em alguns <i>foci</i> .	Marcação localizada preferencialmente na periferia nuclear. Houve queda significativa em seu nível.

QUADRO 3 – SÍNTESE DAS MUDANÇAS OBSERVADAS NA ARQUITETURA NUCLEAR E NA CROMATINA DE CTM NA INDUÇÃO ADIPOGÊNICA.

6.2 EFEITO DO TRATAMENTO COM TSA NA ADIPOGÊNESE DE CTMS

Culturas de CTMs foram tratadas com três diferentes concentrações de TSA (5, 50 e 500 nM) durante dois dias e foram avaliadas em relação ao nível de acH3 (FIGURA 23 A-B). Um aumento significativo de acH3 foi detectado somente em CTMs-MO e CTMs-TA tratadas com 500 nM de TSA (FIGURA 23 C).

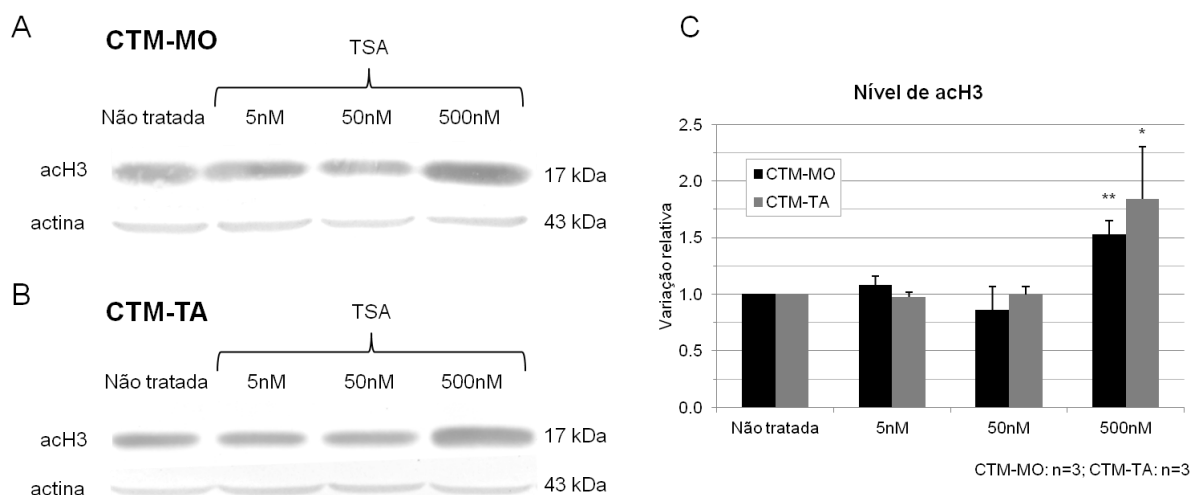


FIGURA 23 - Análise da acetilação de histonas em CTMs após dois dias de tratamento com TSA em CTMs-MO. (A-B) Análise por *Western blot* dos níveis de acH3 em culturas de CTMs-MO (A) e CTMs-TA (B); actina foi utilizada como controle. (C) Análise quantitativa dos níveis relativos de acH3 em culturas de CTMs-MO e CTMs-TA. Os dados são expressos como médias \pm desvio padrão. Os asteriscos logo acima da barra de desvio padrão indicam a significância estatística relativa às culturas não tratadas de CTMs-MO ou CTMs-TA. (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$.

A expressão de alguns genes relacionados e não relacionados à adipogênese foi analisada após o tratamento com TSA: PPARG, um regulador master da adipogênese, GATA2, um gene anti-adipogênico (ROSEN e MACDOUGALD, 2006), BMP4, envolvido na diferenciação osteogênica (CHEN, FENG *et al.*, 2011), COL1A1, um marcador inicial da osteogênese (SOLTANOFF, YANG *et al.*, 2009), desmina, um marcador muscular específico (FENG, CHEN *et al.*, 2012) e COL2A1 (DE CROMBRUGGHE, LEFEBVRE *et al.*, 2000), um marcador inicial de condrócitos (FIGURA 24).

Verificou-se que com os tratamentos houve um aumento na expressão de PPARG, embora os níveis de GATA2 não tenham mudado. Assim a adipogênese poderia ser favorecida. O nível transcricional de BMP4 foi aumentado com os tratamentos, portanto a osteogênese também poderia ser favorecida. Já a expressão de desmina foi distinta entre os dois tipos de CTMs: seus níveis aumentaram em CTMs-MO e diminuíram em CTMs-TA. Assim, a miogênese poderia ser favorecida em CTMs-MO e desfavorecida em CTMs-TA. Não se verificou mudança nos níveis de COL2A1.

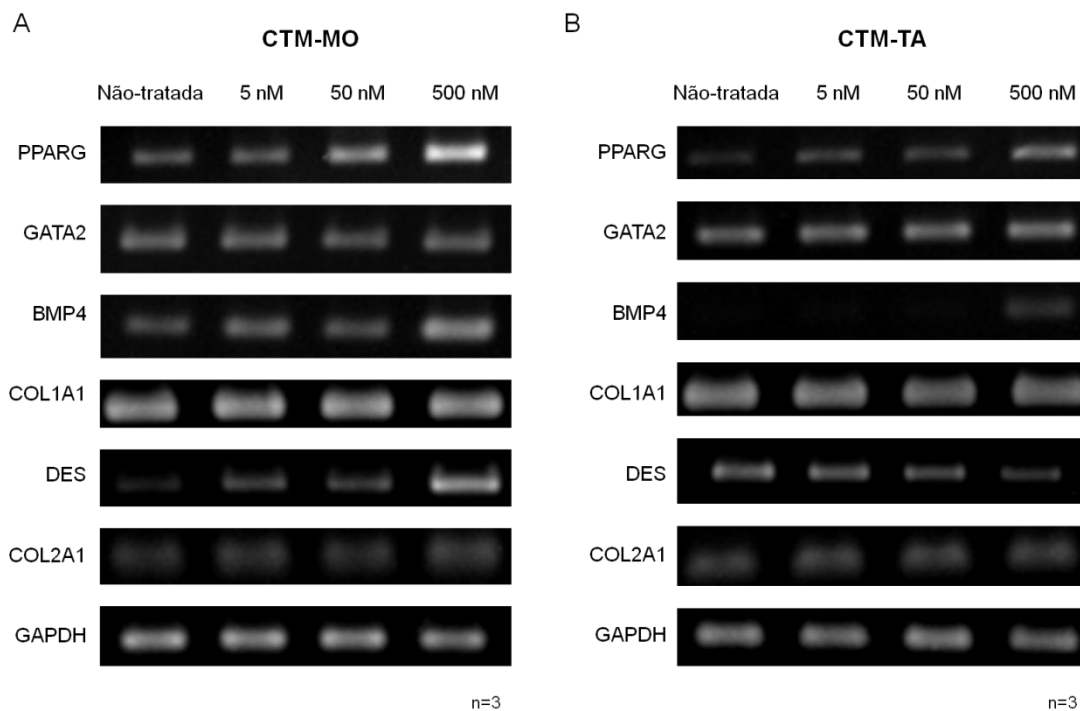


FIGURA 24 - Efeito da TSA na expressão gênica de CTMs. PPARG, GATA2, BMP4, COL1A1, desmina e COL2A1 foram analisados por RT-PCR após dois dias de tratamento. GAPDH foi usado como controle.

Visando investigar os efeitos da TSA na diferenciação adipogênica, culturas de CTMs foram tratadas com 5, 50 e 500 nM de TSA durante dois dias antes do início da indução adipogênica. Verificou-se que os tratamentos provocaram alterações na morfologia celular das culturas não induzidas, levando à diminuição de células diferenciadas bem como à redução no número de vesículas lipídicas (FIGURA 25 e FIGURA 26).

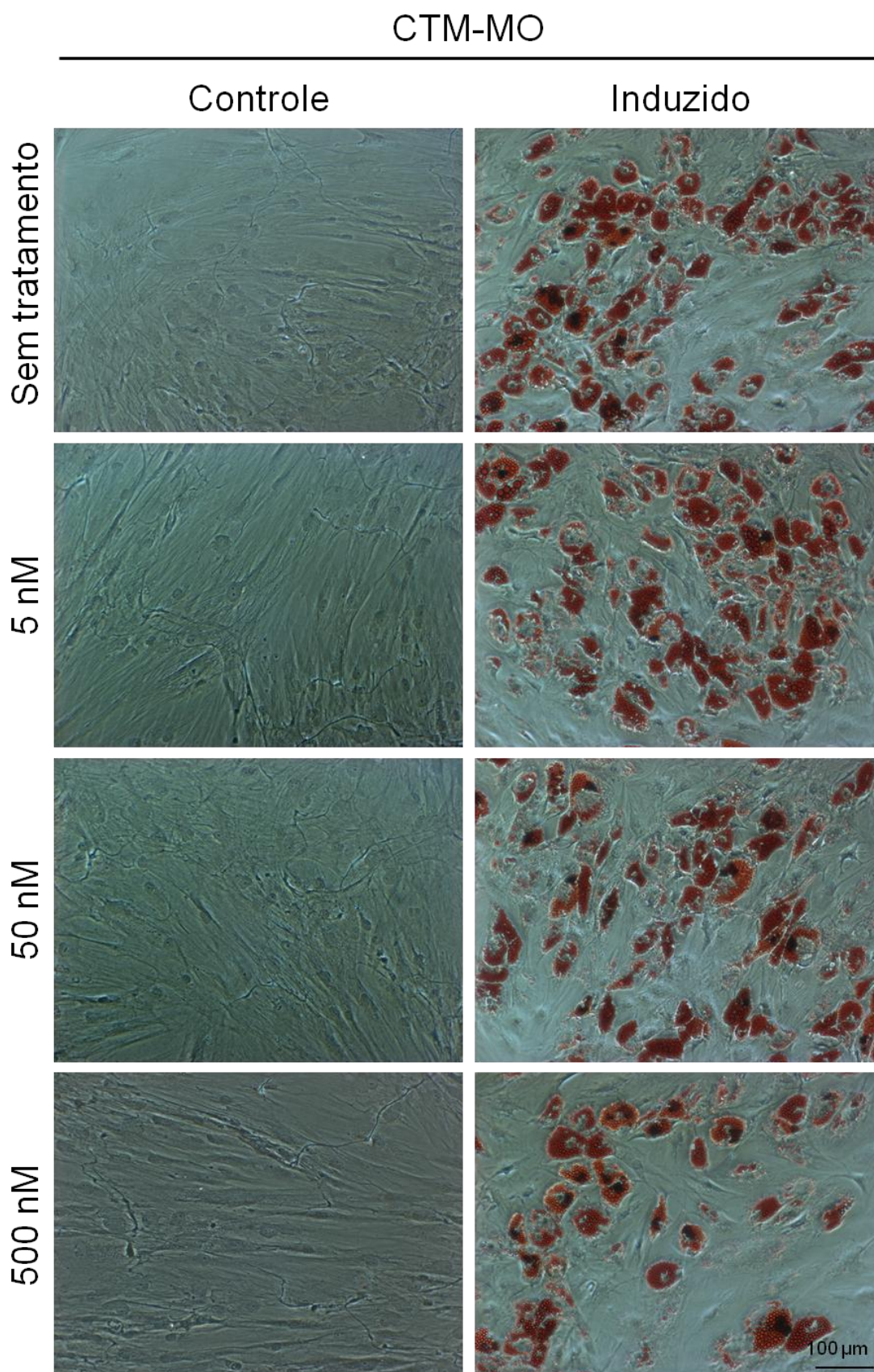


FIGURA 25 - Morfologia das culturas após tratamento com TSA e indução adipogênica. Culturas de CTM-MO foram tratadas durante dois dias com diferentes concentrações de TSA e induzidas à adipogênese. Após 14 dias, foi realizada a marcação com *Oil Red O* para identificar as células diferenciadas. Barra = 100 μm .

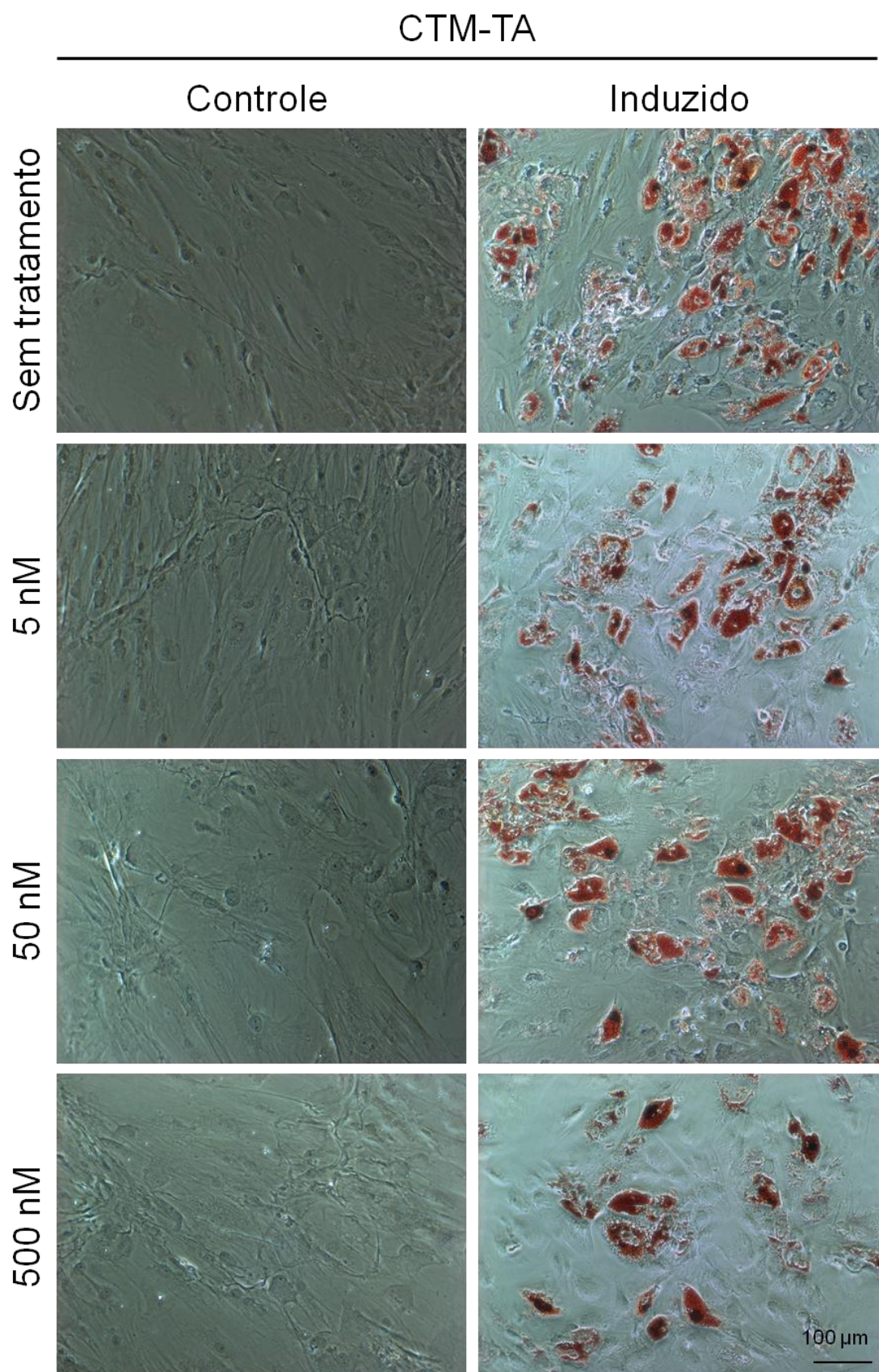


FIGURA 26 - Morfologia das culturas após tratamento com TSA e indução adipogênica. Culturas de CTM-TA foram tratadas durante dois dias com diferentes concentrações de TSA e induzidas à adipogênese. Após 14 dias, foi realizada a marcação com *Oil Red O* para identificar as células diferenciadas. Barra = 100 μm .

A análise da diferenciação mostrou que, exceto no tratamento com 5 nM, a TSA reduziu significativamente a adipogênese em CTMs-MO (FIGURA 27 A-B). A adipogênese foi também diminuída nas CTMs-TA em todos os tratamentos. A expressão dos genes adipogênicos PPARG e FABP4 foi avaliada e houve uma associação parcial com a diferenciação (FIGURA 27 C-D). O tratamento de CTMs-MO com 5 nM de TSA não causou uma mudança significativa na diferenciação ou na expressão de genes adipogênicos, entretanto, a expressão de PPARG foi aumentada em 4 de 5 amostras.

Curiosamente, CTMs-MO parecem resistir mais aos efeitos dos tratamentos pois 50 nM resultou em uma redução significativa na expressão gênica somente em CTMs-TA. No entanto, o tratamento com 500 nM teve um efeito negativo tanto em CTMs-MO como em CTMs-TA.

A expressão de GATA2 foi analisada em culturas não induzidas e induzidas à diferenciação (FIGURA 27 E-F). Não foi possível identificar uma clara correlação entre a expressão de GATA2 e diferenciação adipogênica, ou entre a expressão de GATA2, PPARG e FABP4, mesmo embora diferenças significativas tenham sido observadas em certas condições.

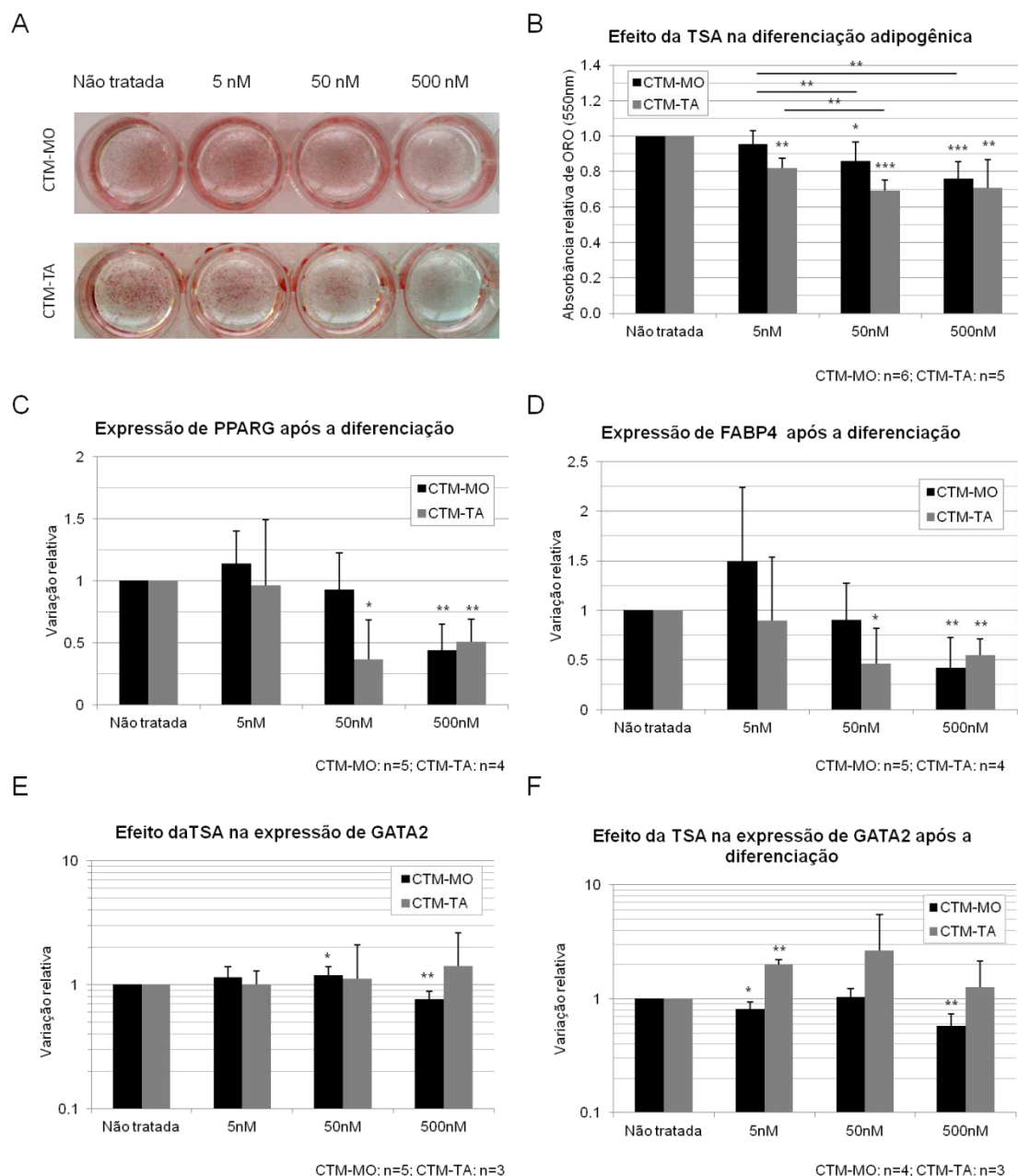


FIGURA 27 - Efeito do tratamento prévio com TSA na diferenciação de CTMs-MO e CTMs-TA. (A) O efeito de TSA na diferenciação adipogênica de CTMs-MO e CTMs-TA pode ser observado nas culturas após marcação com *Oil Red O*. (B) Quantificação relativa da diferenciação adipogênica pela absorbância de *Oil Red O*. Expressão de PPARG (C) e FABP4 (D) em culturas tratadas após 14 dias de diferenciação adipogênica. (E) Expressão de GATA2 em culturas não induzidas tratadas com 5azadC. (F) Expressão de GATA2 em culturas tratadas com TSA após 14 dias de indução. Os dados são expressos como médias \pm desvio padrão. Os asteriscos logo acima da barra de desvio padrão indicam a significância estatística relativa às culturas não tratadas de CTMs-MO ou CTMs-TA. (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$; (***) $p < 0,001$.

6.3 EFEITO DO TRATAMENTO COM TSA NA PROLIFERAÇÃO CELULAR

Como a diferenciação adipogênica poderia ser afetada pela proliferação, o efeito do tratamento com TSA sobre a proliferação foi investigado. O tratamento com 500 nM resultou em uma diminuição 90% na taxa de proliferação celular, enquanto o tratamento com 5 e 50 nM não apresentou efeitos significativos (FIGURA 28). Embora o efeito da TSA tenha sido dose-dependente na diferenciação, o mesmo não foi observado para a proliferação celular.

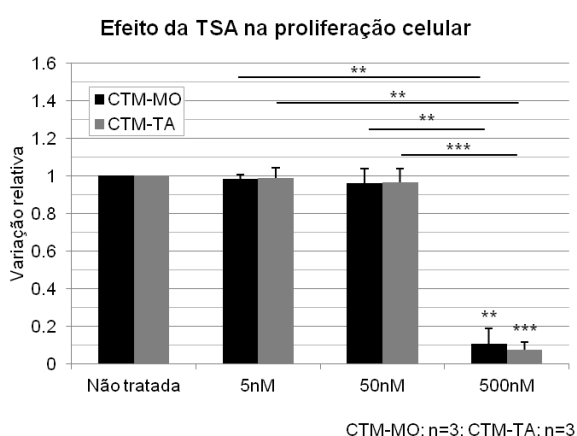


FIGURA 28 - Análise da proliferação celular após dois dias de tratamento com TSA. Durante as 24 horas seguintes aos dois dias de tratamento com TSA, a proliferação foi reduzida pelo tratamento com 500 nM, mas não foi afetada pelos tratamentos com 5 e 50 nM. Os dados são expressos como médias \pm desvio padrão. Os asteriscos logo acima da barra de desvio padrão indicam a significância estatística relativa às culturas não tratadas de CTMs-MO ou CTMs-TA. (**) $p < 0,01$; (***) $p < 0,001$.

6.4 EFEITO DO TRATAMENTO COM 5AZADC NA ADIPOGÊNESE DE CTMS

A fim de examinar os efeitos da 5azadC, culturas foram tratadas com 1, 10 e 100 μ M de 5azadC por dois dias antes do início da indução. Visando assegurar o efeito da 5azadC nas células, foram avaliados os níveis da metilcitosina e do transcrito TP73, um gene não expresso em CTM-MO e cuja expressão é reativada por 5azadC (LIANG, XIA *et al.*, 2012). A presença de metilcitosina foi reduzida de uma maneira global com os tratamentos e TP73 foi expresso em culturas tratadas de maneira dose-dependente (FIGURA 29).

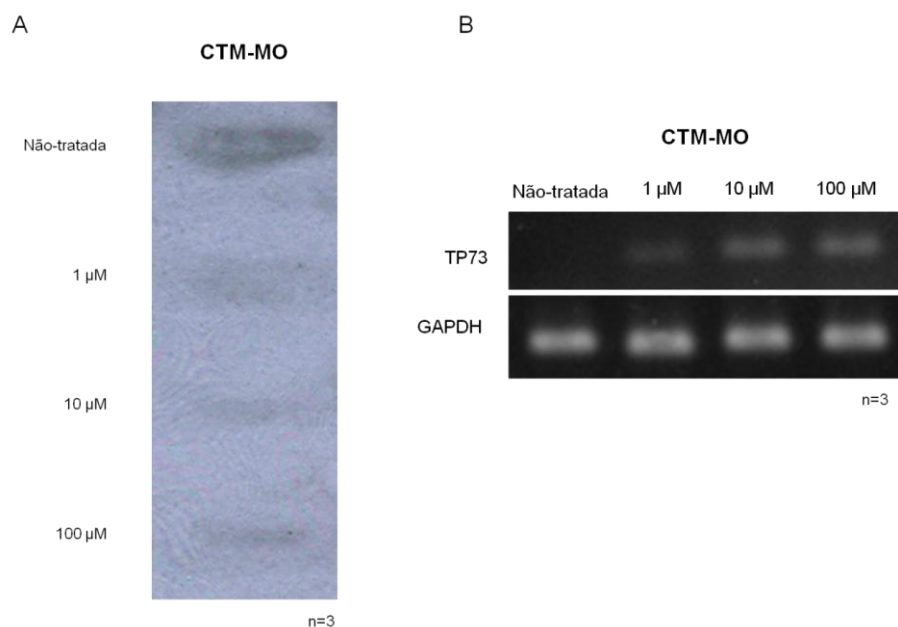


FIGURA 29 - Efeito global e específico da 5azadC na desmetilação do DNA. (A) CTM-MO foram tratadas com 5azadC por dois dias e a presença de metilcitosina foi avaliada por imunomarcagem de *slot blot*. (B) TP73 foi expresso de maneira dose-dependente em CTM-MO tratadas com 5azadC.

Após dois dias de tratamento com 5azadC, tanto em CTMs-MO como CTMs-TA houve aumento na expressão de PPARG enquanto GATA2 não mudou, o que sugere que a adipogênese seria favorecida. Em CTMs-MO nem BMP4 nem COL1A1 aumentaram, mas houve aumento de desmina, sugerindo que os tratamentos poderiam favorecer a miogênese em CTMs-MO. Já em CTMs-TA houve aumento na expressão de BMP4, mas não nos níveis de COL1A1, desmina ou COL2A1, sugerindo que os tratamentos poderiam favorecer a osteogênese nas CTMs-TA (FIGURA 30).

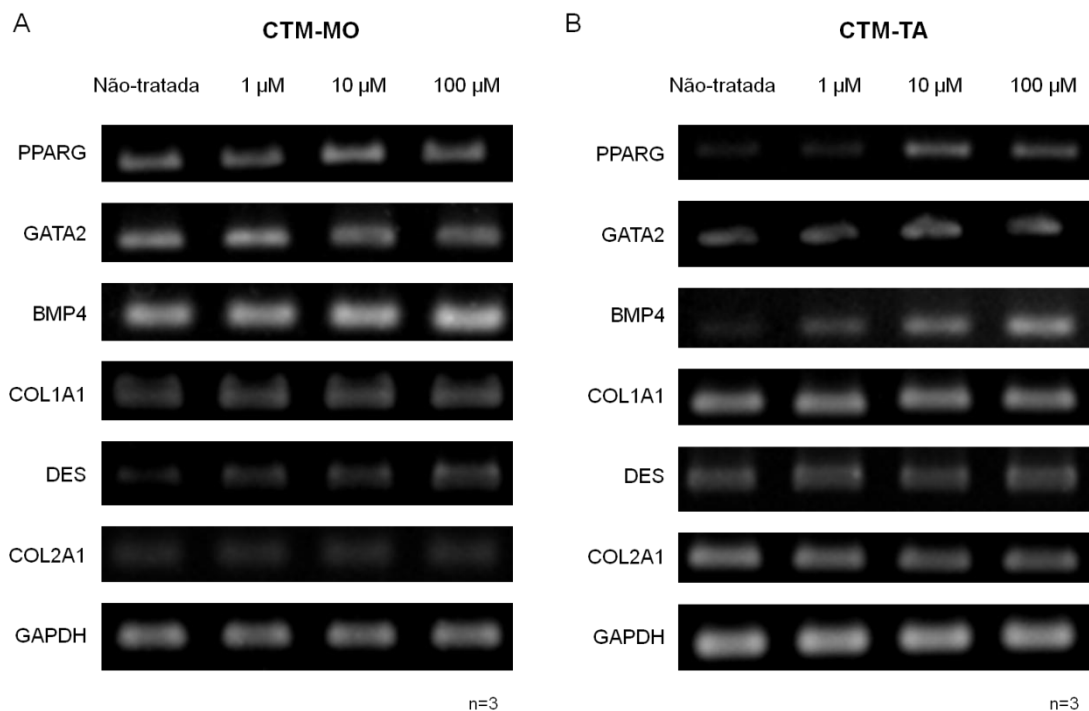


FIGURA 30 - Efeito da 5azadC na expressão gênica de CTMs. PPARG, GATA2, BMP4, COL1A1, desmina e COL2A1 foram analisados por RT-PCR após dois dias de tratamento. GAPDH foi usado como controle.

O efeito da 5azadC na adipogênese foi avaliado nas culturas de CTMs. Os tratamentos levaram a uma mudança na morfologia celular das culturas (FIGURA 31 e FIGURA 32) e uma redução significativa foi observada na diferenciação tanto de CTMs-MO como de CTMs-TA (FIGURA 33 A-B). Adicionalmente, a expressão de PPARG foi significativamente diminuída em todas as concentrações testadas. A expressão de FABP4 foi reduzida após os tratamentos, com valores significativos em 10 e 100 µM de 5azadC (FIGURA 33 C-D).

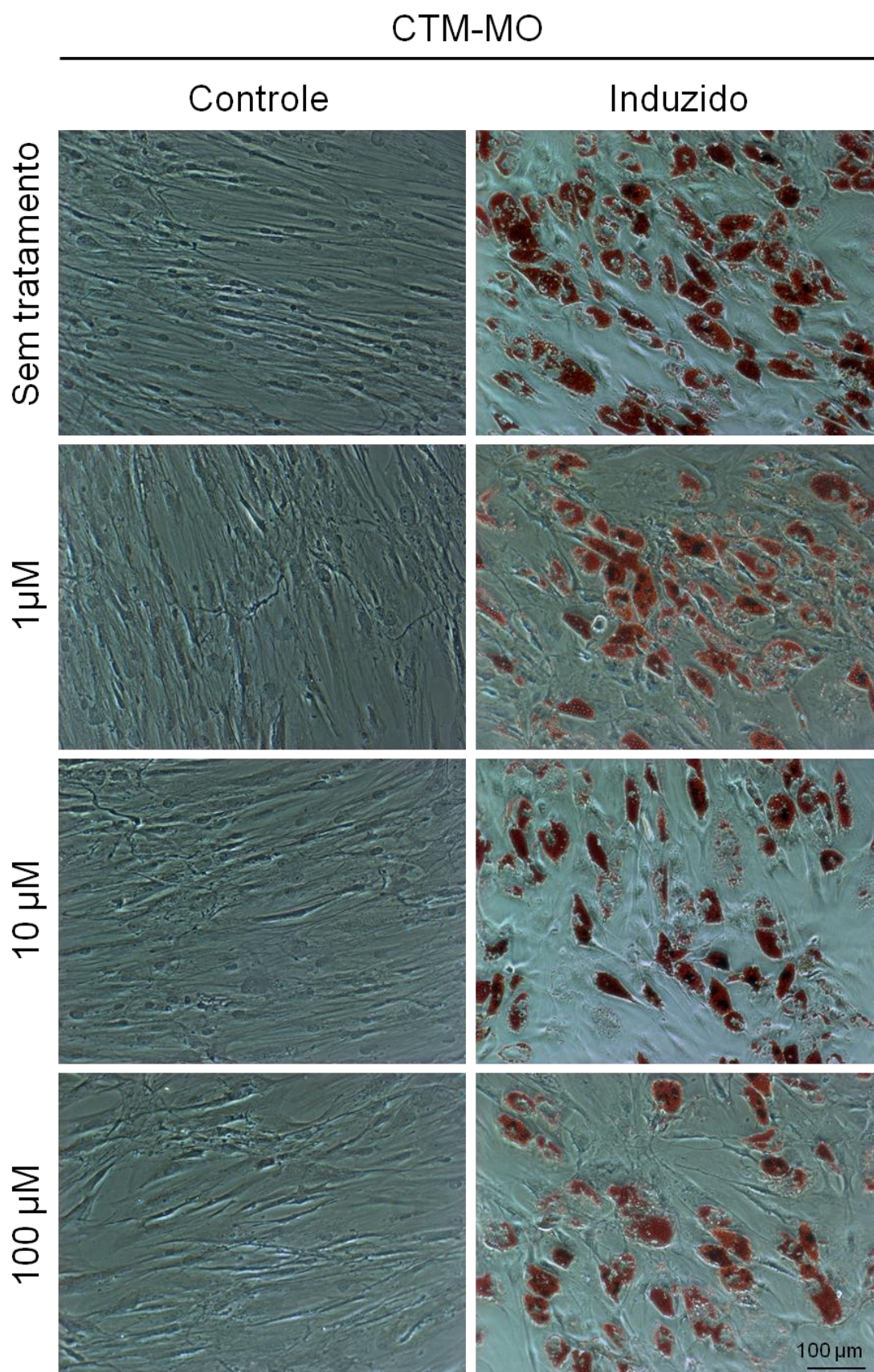


FIGURA 31 - Morfologia das culturas após tratamento com 5azadC e indução adipogênica. Culturas de CTM-MO foram tratadas durante dois dias com diferentes concentrações de 5azadC e induzidas à adipogênese. Após 14 dias, foi realizada a marcação com *Oil Red O* para identificar as células diferenciadas. Barra = 100 μm .

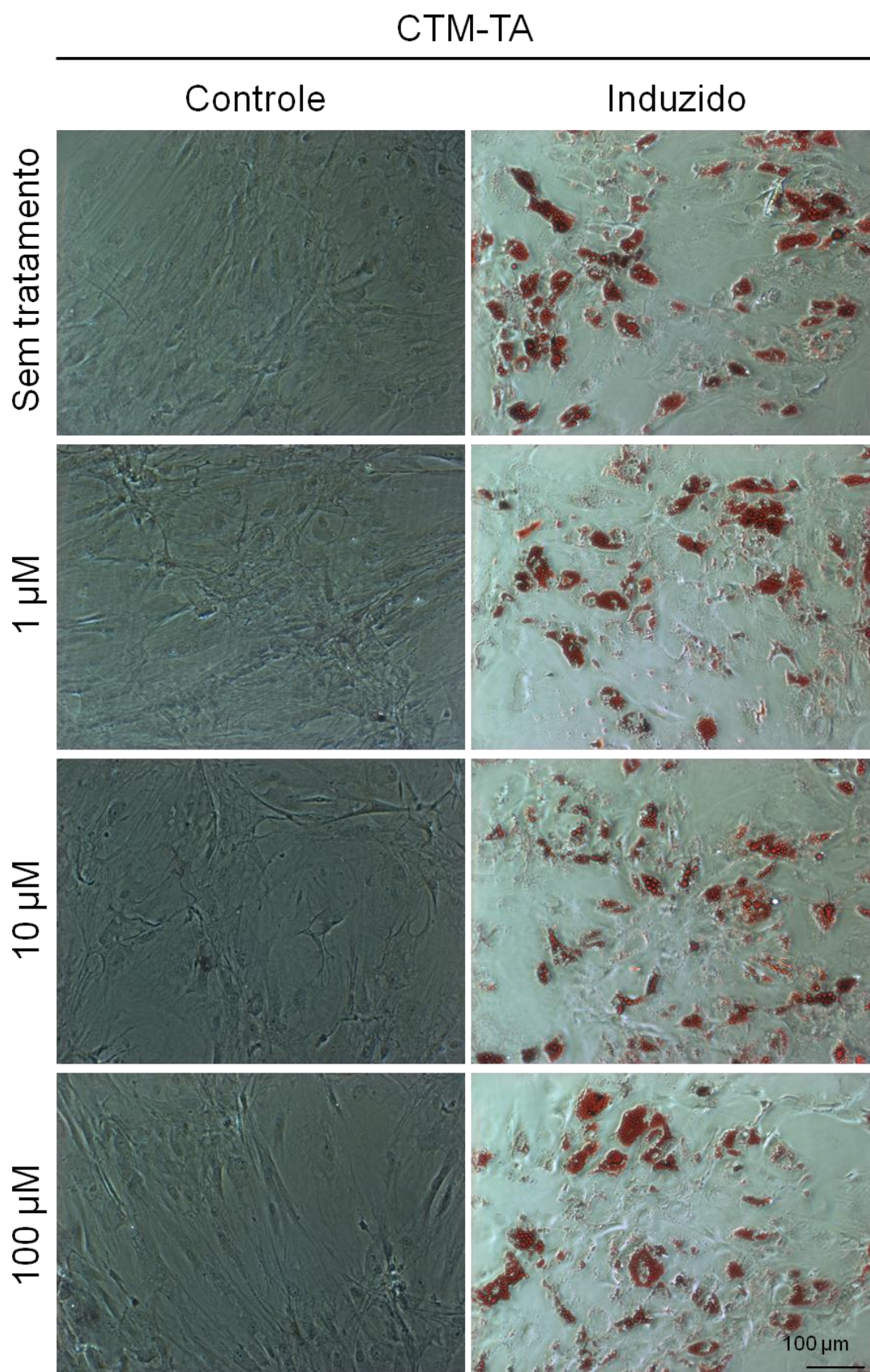


FIGURA 32 - Morfologia das culturas após tratamento com 5azadC e indução adipogênica. Culturas de CTM-TA foram tratadas durante dois dias com diferentes concentrações de 5azadC e induzidas à adipogênese. Após 14 dias, foi realizada a marcação com *Oil Red O* para identificar as células diferenciadas. Barra = 100 μm .

Quando GATA2 foi analisado, um aumento na expressão de culturas não induzidas tratadas com 5azadC foi verificado após 14 dias (FIGURA 33 E). A expressão de GATA2 foi também aumentada em culturas induzidas (FIGURA 33 F). Embora nem todas as diferenças tenham sido estatisticamente significativas, é possível observar que houve um aumento na variação relativa das amostras avaliadas (FIGURA 33 E-F, tabelas).

Uma relação inversa foi verificada entre a expressão de genes adipogênicos e GATA2 nas culturas induzidas. De modo geral, CTMs-TA foram mais afetadas pelos tratamentos do que CTMs-MO: a redução na adipogênese e na expressão de PPARG e FABP4, e o aumento na expressão de GATA2 foram mais intensos em CTMs-TA em comparação a CTMs-MO.

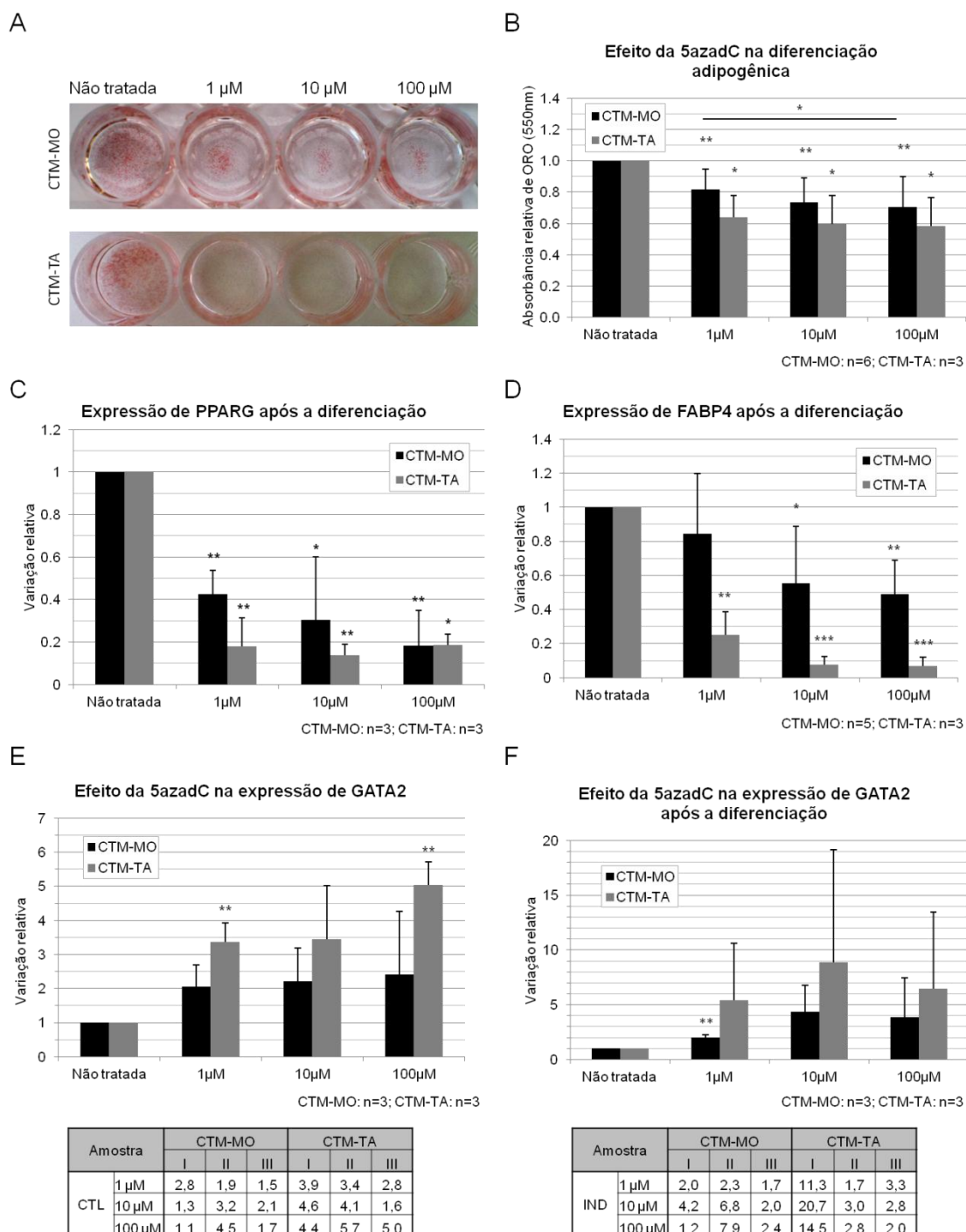


FIGURA 33 - O tratamento com 5azadC diminuiu a diferenciação adipogênica de CTMs-MO e CTMs-TA. (A) Os efeitos negativos do tratamento com 5azadC na diferenciação adipogênica de culturas induzidas de CTMs-MO e CTMs-TA observados pela coloração com *Oil Red O*. (B) Quantificação relativa da diferenciação adipogênica com base na absorbância de *Oil Red O*. Os níveis de expressão de PPARG (C) e de FABP4 (D) foram mais baixos em culturas tratadas do que não tratadas após 14 dias de diferenciação adipogênica. O tratamento com 5azadC aumentou a expressão de GATA2 em culturas não induzidas (E) e em culturas induzidas por 14 dias (F). Os dados são expressos como médias \pm desvio padrão. Os asteriscos logo acima da barra de desvio padrão indicam a significância estatística relativa às culturas não tratadas de CTMs-MO ou CTMs-TA. (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$; (***) $p < 0,001$.

6.5 EFEITO DO TRATAMENTO COM 5AZADC NA PROLIFERAÇÃO CELULAR

Inicialmente o conteúdo de DNA das culturas tratadas com 5azadC por dois dias foi determinado, mas não houve diferença significativa (FIGURA 34 A). Quando a incorporação de BrdU foi analisada, verificou-se uma queda de 40-50% na proliferação das culturas tratadas por dois dias com todas as concentrações de 5azadC após 24 horas da remoção dos inibidores (FIGURA 34 B). O efeito de 5azadC na proliferação celular foi dose-dependente, tal como observado na diferenciação.

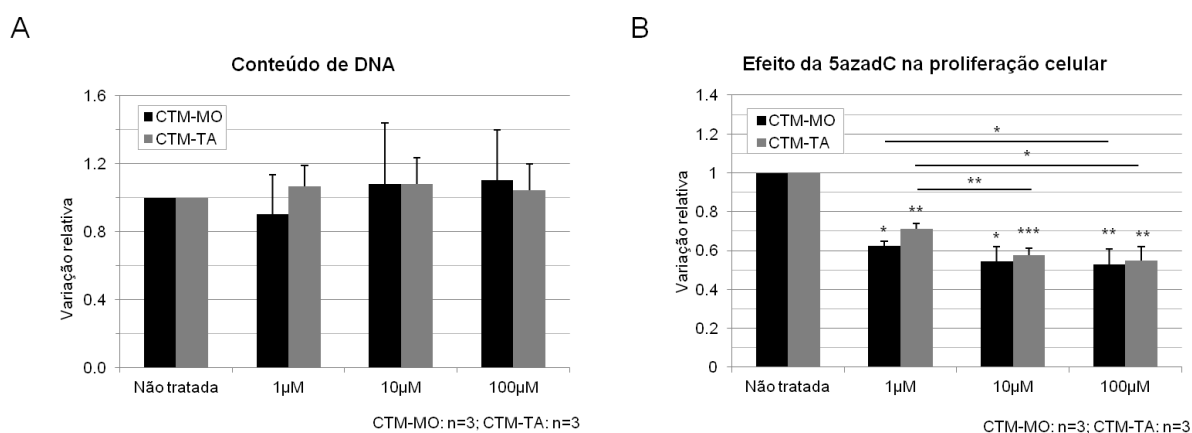


FIGURA 34 - Análise da proliferação celular após dois dias de tratamento com 5azadC. (A) O conteúdo de DNA não mudou com dois dias de tratamento com 5azadC. (B) O tratamento com 5azadC reduziu a proliferação celular nas 24 horas seguintes aos dois dias de tratamento. Os dados são expressos como médias \pm desvio padrão. Os asteriscos logo acima da barra de desvio padrão indicam a significância estatística relativa às culturas não tratadas de CTMs-MO ou CTMs-TA. (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$; (***) $p < 0,001$.

As observações relacionadas aos tratamentos das CTMs com TSA e 5azadC estão resumidas no QUADRO 4.

TRATAMENTO COM TSA		
Após tratamento		
	CTM-MO	CTM-TA
Expressão de PPARG	Aumentou	Aumentou
Expressão de GATA2	Não mudou	Não mudou
Expressão de BMP4	Aumentou	Aumentou
Expressão de COL1A1	Não mudou	Não mudou
Expressão de DES	Aumentou	Diminuiu
Expressão de COL2A1	Não mudou	Não mudou
Nível de acH3	Aumentou somente com 500 nM	Aumentou somente com 500 nM
Proliferação	Diminuiu somente com 500 nM	Diminuiu somente com 500 nM
Após tratamento e indução		
	CTM-MO	CTM-TA
Diferenciação adipogênica	Diminuiu com 50 e 500 nM	Diminuiu
Expressão de PPARG	Diminuiu 500 nM	Diminuiu com 50 e 500 nM
Expressão de FABP4	Diminuiu 500 nM	Diminuiu com 50 e 500 nM
Expressão de GATA2	Associação parcial	Associação parcial
TRATAMENTO COM 5AZADC		
Após tratamento		
	CTM-MO	CTM-TA
Expressão de PPARG	Aumentou	Aumentou
Expressão de GATA2	Não mudou	Não mudou
Expressão de BMP4	Não mudou	Aumentou
Expressão de COL1A1	Não mudou	Não mudou
Expressão de DES	Aumentou	Não mudou
Expressão de COL2A1	Não mudou	Não mudou
Proliferação	Diminuiu	Diminuiu
Após tratamento e indução		
	CTM-MO	CTM-TA
Diferenciação adipogênica	Diminuiu	Diminuiu
Expressão de PPARG	Diminuiu	Diminuiu
Expressão de FABP4	Diminuiu	Diminuiu
Expressão de GATA2	Aumentou	Aumentou

QUADRO 4 – SÍNTESE DOS EFEITOS CAUSADOS PELO TRATAMENTO COM TSA E 5AZADC NAS CTM.

6.6 ANÁLISE DO PERFIL EPIGENÉTICO DAS CTMS NA DIFERENCIAÇÃO ADIPOGÊNICA

Culturas de CTMs-MO e de CTMs-TA induzidas ou não à adipogênese por 14 dias foram submetidas à ChIP. A análise do promotor de GAPDH foi realizada

(FIGURA 35 A) como controle do processo. A quantificação da adipogênese revelou uma variabilidade intrínseca principalmente ao doador e não ao tipo celular (FIGURA 35 B).

As 60 amostras foram sequenciadas e estão sendo analisadas em colaboração com a Unidade de Bioinformática do Instituto Pasteur de Montevideo. O *Input* de cada amostra foi utilizado para eliminar as sequências inespecíficas. A análise da qualidade mostrou que 13-40% das amostras das bibliotecas foram mapeadas (FIGURA 35 C). Algumas análises iniciais mostraram que, após a diferenciação, acH3 que nas células controle se localizava em regiões *upstream* e *downstream* do gene passa a se localizar em regiões mais internas ao gene (FIGURA 35 D-G), sugerindo o reposicionamento das histonas contendo esta modificação. Isso fica evidenciado pelo estreitamento do pico nas culturas induzidas.

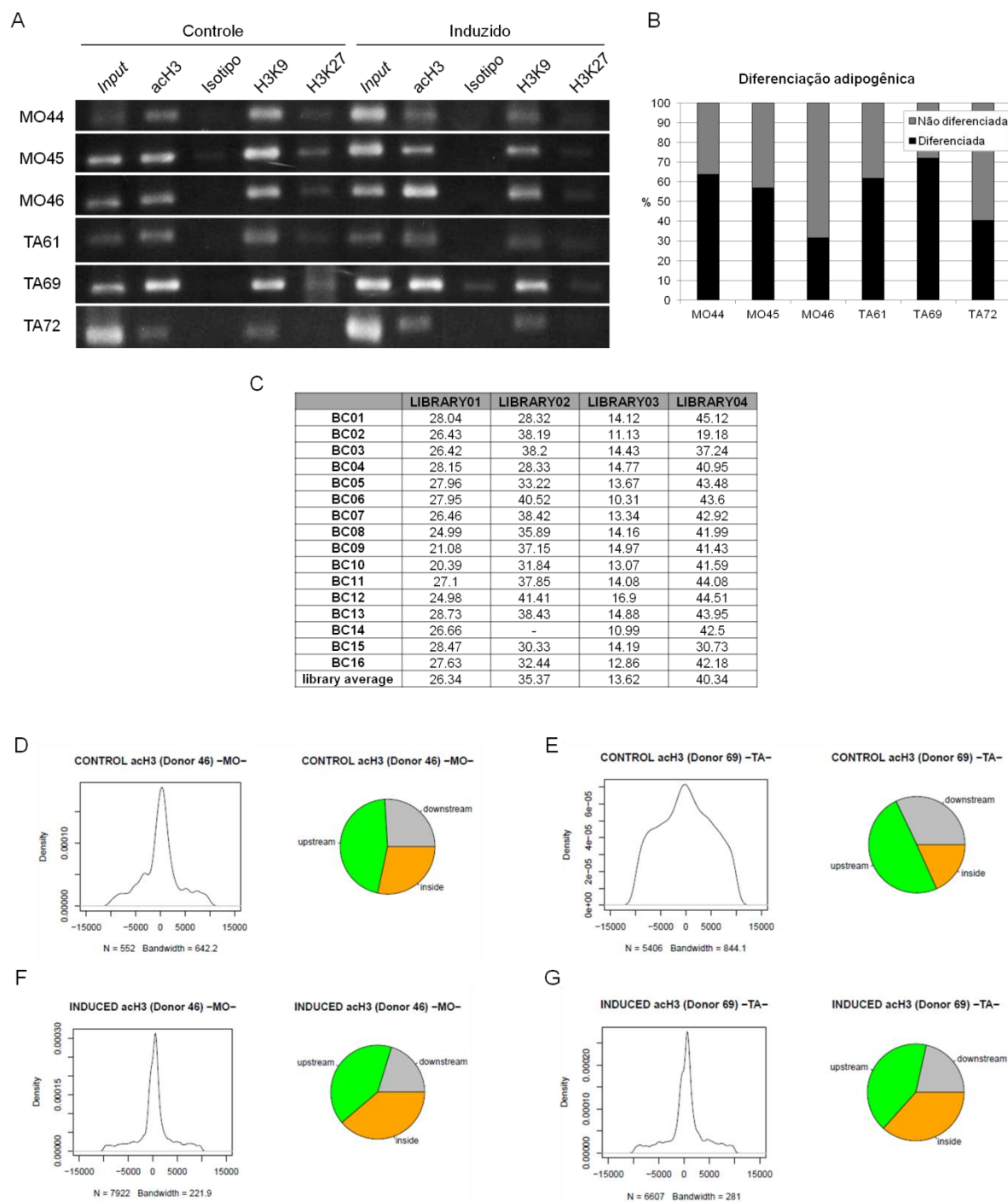


FIGURA 35 – Análise da imunoprecipitação de cromatina e sequenciamento de CTMs após 14 dias de indução adipogênica. (A) PCR do promotor de GAPDH. (B) Quantificação da diferenciação adipogênica. (C) Análise da qualidade das bibliotecas. (D-G) Análise da localização gênica de acH3 em culturas controle (D e E) e induzidas (F e G) das amostras de CTMs MO46 (D e F) e TA69 (E e G).

7 DISCUSSÃO

Diversas mudanças foram observadas na arquitetura nuclear nas CTMs que diferenciaram em adipócitos. Uma das propriedades fundamentais dos eucariotos é sua habilidade em manter o tamanho celular e o volume das organelas apropriados para diferentes crescimentos e estados de diferenciação. Embora a maioria das organelas possa variar muito em quantidades, tem-se observado que as células mantêm uma relação entre volume nuclear e volume celular (HUBER e GERACE, 2007). Nas CTMs diferenciadas, a área nuclear diminuiu, a área nucleolar aumentou e a quantidade de nucléolos diminuiu. Esta mudança acompanha as alterações observadas na morfologia celular, pois foi visualizada uma redução no tamanho da célula com a diferenciação.

Em nível fundamental, o volume nuclear é determinado pelo envelope nuclear. Em eucariotos superiores, tanto o tamanho nuclear como o formato são fortemente influenciados pela lâmina nuclear (Huber e Gerace, 2007). O aspecto da lâmina nuclear foi modificado após a diferenciação, passando de regular nas CTMs para um formato irregular nos adipócitos. Esta alteração parece estar associada à formação das vesículas lipídicas que pressionam o núcleo, além da própria compactação nuclear. Divergentemente, em CTEs a lâmina nuclear mal definida se torna arredondada e distinta após a diferenciação em células progenitoras neurais (MESHORER e MISTELI, 2006). Esta distinção provavelmente deve-se à ausência de lamina A nas CTEs, que passa a ser encontrada na lâmina nuclear após a diferenciação.

Enquanto na maioria dos tipos celulares verifica-se uma tendência na cromatina densa se acumular na periferia nuclear, há padrões e graus característicos de distintos tipos celulares. Por exemplo, fibroblastos tendem a ter uma distribuição mais uniforme de cromatina densa na periferia enquanto células epiteliais tendem a ter uma distribuição mais desigual. Neurônios tendem a ter pouca cromatina densa, enquanto linfoblastos tendem a ter uma enorme quantidade. Assim a distribuição da cromatina dentro do núcleo, particularmente em relação à periferia nuclear, é não randômica e tecido-específica (ZULEGER, ROBSON *et al.*, 2011).

Em CTEs a heterocromatina é parcialmente descondensada, observada como uma estrutura difusa, enquanto em células comprometidas ou diferenciadas os

domínios de heterocromatina são mais compactos e concentrados em distintos *foci* (MORRIS, CHOTALIA *et al.*, 2010). Pela análise ultraestrutural da densidade da cromatina não foi identificada a formação de heterocromatina na periferia nuclear após a diferenciação adipogênica das CTMs, mas houve um acúmulo de 3meH3K9 e 3meH3K27 na periferia nuclear.

A organização da estrutura nucleolar diretamente reflete sua função principal, que consiste na produção de subunidades ribossomais, e seu tamanho se correlaciona com os níveis da montagem de ribossomos (AUSTIN e BELLINI, 2010). Os nucléolos aparecem maiores nas CTEs em comparação a células progenitoras neurais (MESHORER e MISTELI, 2006). Análises genômicas da expressão gênica e marcação dos sítios de transcrição após incorporação de 5-bromouridina 5'-trifosfato (Br-UTP) sugerem que o genoma de CTEs seja mais ativo transcricionalmente do que sua progênie diferenciada (MORRIS, CHOTALIA *et al.*, 2010). Portanto, verifica-se uma associação entre tamanho dos nucléolos, atividade transcricional e montagem de ribossomos. Com a diferenciação, tanto a região fibrilar como a região granular dos nucléolos foram modificadas. Seus formatos passaram de arredondado para irregular e seus tamanhos relativos ao núcleo aumentaram. No entanto, o nível proteico de nucleofosmina não foi alterado. Supõe-se que a mudança na distribuição dos nucléolos deve-se principalmente ao remodelamento nuclear e não a uma mudança na montagem dos ribossomos, já que as áreas das células controle e induzidas foram discretamente alteradas. Além disso, dados do grupo demonstram que as CTMs possuem perfil polissomal similar ao de células com baixo nível de tradução. Portanto, os nucléolos foram mecanicamente forçados a se fundirem devido à compressão do espaço nuclear, o que fica evidenciado pela deformação da lâmina nuclear.

Os níveis de 3meH3K9 e 3meH3K27, associados respectivamente à heterocromatina constitutiva e facultativa (FEDOROVA e ZINK, 2008), aumentaram discretamente nas células induzidas por 14 dias. Em CTEs humanas pluripotentes, 3meH3K9 está significativamente difusa, mas em células diferenciadas encontra-se altamente enriquecida em *foci* de heterocromatina (MATTOU e MESHORER, 2010). Nas CTMs 3meH3K9 estava distribuída em pequenos *foci*, enquanto nos adipócitos concentrou-se na periferia nuclear, sem formar *foci*. A presença dos *foci* de 3meH3K9 nas CTMs não induzidas provavelmente se deve a sua inferior potência quando comparadas às CTEs.

O nível de H2AZ aumentou com 1 dia de indução, mas não se alterou nas células diferenciadas por 14 dias. H2AZ é incorporada em nucleossomos de promotores de genes recentemente reprimidos e é necessária para a rápida reativação destes genes. Além disso, H2AZ é requerida para a retenção dos genes na periferia nuclear após a repressão. Desta maneira, a localização mediada por H2AZ de genes recentemente reprimidos na periferia nuclear representa um estado epigenético que confere memória da ativação transcricional e promove reativação (BRICKNER, CAJIGAS *et al.*, 2007). É possível especular que o aumento de H2AZ após 24 horas de indução seria resultante da necessidade temporária da repressão de determinados genes na periferia nuclear que eventualmente poderiam ser reativados, seguindo-se uma queda aos níveis iniciais após 14 dias de diferenciação, relacionada a não mais necessária ativação de determinados genes.

A análise dos níveis de acH3 identificou um aumento transitório após 24 horas de indução, sendo que os níveis diminuíram significativamente nas células induzidas à adipogênese por 14 dias. De forma similar, foi constatado um aumento discreto nos níveis de me/2me/3meH3K4 após 1 dia de indução e em seguida uma queda suave. Certas modificações de histona associadas com cromatina ativa, incluindo 3meH3K4, estão enriquecidas em CTEs em comparação às células progenitoras neurais delas derivadas (MATTOU e MESHORER, 2010). Sendo acH3 e me/2me/3meH3K4 marcas de ativação transcricional, conclui-se que a cromatina inicialmente mais ativa nas CTMs passou a ter uma menor atividade nos adipócitos.

A investigação dos níveis de 3meH3K9, 3meH3K27, me/2me/3meH3K4, H2AZ e acH3, em adição à análise da distribuição da fibrilarina, nucleofosmina e lamina A/C na arquitetura nuclear permitiu a elaboração de um modelo inicial ilustrando as mudanças ocorridas na arquitetura nuclear após a diferenciação das CTMs em adipócitos (FIGURA 36). O estabelecimento deste modelo inicial é fundamental já que a maioria dos estudos sobre a arquitetura nuclear durante a diferenciação envolvem CTEs e não foi encontrado na literatura relato da investigação da arquitetura nuclear de CTMs no processo de diferenciação.

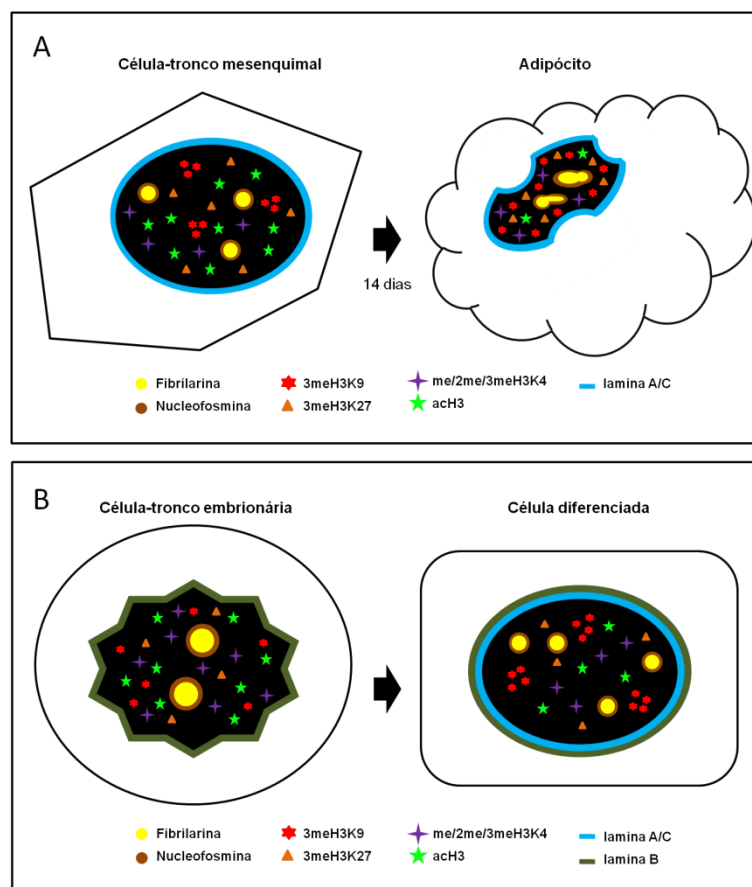


FIGURA 36 - Ilustração das mudanças na arquitetura nuclear e na cromatina ocorridas após a diferenciação. (A) Alterações observadas na diferenciação adipogênica de CTMs. (B) Alterações descritas na diferenciação de CTEs.

Como a diferenciação celular envolve modificações epigenéticas do genoma celular, torna-se importante investigar o efeito dos modificadores epigenéticos na diferenciação adipogênica de CTMs. Apesar da conhecida diferença na resposta celular devido à variabilidade genética, é necessário verificar se resultados encontrados em modelos clássicos de adipogênese utilizando linhagens celulares tais como 3T3-L1 também podem ser estendidos para outros tipos celulares. Além disso, são poucos os estudos envolvendo modificadores epigenéticos e adipogênese de CTMs.

A acetilação de histonas foi alterada durante a adipogênese: foi observado um aumento global logo após o início da indução e uma redução global significativa em células diferenciadas. Assim, surgiu a hipótese de que o tratamento de CTMs com um inibidor de HDAC afetaria a diferenciação adipogênica. A inibição das classes I, II e IV por TSA impede a desacetilação de lisinas nas caudas das histonas, resultando em uma hiperacetilação geral de histonas. Deste modo, uma

estrutura mais aberta da cromatina é induzida, facilitando o acesso da maquinaria de transcrição.

Neste sentido, as CTEs mantêm um programa transcricional competente e apresentam altos níveis de acetilação nas histonas H3 e H4 (MATTOUT e MESHORER, 2010). Além disso, a inibição da desacetilação em CTEs impede a diferenciação (LEE, HART *et al.*, 2004). Consistentemente, CTMs em seu estado multipotente apresentaram mais acH3 do que na condição diferenciada. Em adição, a inibição de HDACs pelo uso de TSA diminuiu a diferenciação adipogênica em quase todas as condições avaliadas. Um aumento no nível de acH3 foi verificado após 24 horas da indução da diferenciação, embora não tenha sido significativo. Interessantemente, um aumento sutil no nível de acH4 em CTEs 24 horas após o início da diferenciação foi observado em um trabalho prévio (MESHORER, YELLAJOSHULA *et al.*, 2006). Conforme os autores, o aumento concomitante de acH4 e 3meH3K9 durante os estágios bem iniciais da diferenciação sugere a formação de heterocromatina em paralelo com um transiente aumento no potencial de eucromatina, permitindo a ativação e repressão simultânea de diferentes partes do genoma para atender às necessidades da diferenciação.

Embora uma desacetilação global nas células diferenciadas tenha sido observada, a acetilação de histonas aumenta nos promotores de genes adipogênicos durante a diferenciação, correlacionando com o aumento da sua expressão (YOO, CHUNG *et al.*, 2006). O efeito dos inibidores de HDAC na expressão gênica envolve mudanças na transcrição de somente um subconjunto específico de genes (1-10%) (DE RUIJTER, VAN GENNIP *et al.*, 2003; TADDEI, ROCHE *et al.*, 2005; DOKMANOVIC, MILOS *et al.*, 2007). Assim, pode-se extrapolar que nas CTMs um subconjunto menor de genes associados à adipogênese também sofreu acetilação, porém, a maioria dos genes foi desacetilada. O balanço final resulta, portanto, em uma desacetilação global.

CTMs expressam pequenas quantidades de fatores adipogênicos juntamente com fatores osteogênicos. Os fatores de uma linhagem reprimem os fatores da outra linhagem, mantendo-as em um estado indiferenciado. Sob condições apropriadas, o balanço é perturbado levando a uma cascata que promove um alvo celular enquanto reprime outros alvos possíveis (ROSEN e MACDOUGALD, 2006).

PPARG e BMP4 foram regulados positivamente logo após o tratamento com TSA. Como a diferenciação adipogênica diminuiu, supõe-se que a osteogênese seja favorecida. De acordo, o tratamento de células 3T3-L1 com TSA durante a diferenciação leva a uma diminuição na adipogênese (LAGACE e NACHTIGAL, 2004; KIM, CHOI *et al.*, 2009). CTMs de tecido adiposo ou de sangue do cordão umbilical tratadas com os inibidores de HDACs ácido valpróico e butirato de sódio tiveram a eficiência da adipogênese, condrogênese e neurogênese diminuída, enquanto a diferenciação osteogênica foi aumentada (LEE, PARK *et al.*, 2009). O tratamento de uma linhagem de CTMs-MO com 1, 10 ou 100 nM de TSA resultou em um declínio na expressão de genes condrogênicos e na síntese de proteínas condrogênicas de uma maneira dose-dependente (WANG, WEN *et al.*, 2011). Contrariamente, o tratamento de CTMs-MO com 100 nM de TSA por 3 dias antes da indução favoreceu a condrogênese, mas não a osteogênese (EL-SERAFFI, OREFFO *et al.*, 2011).

A expressão transcricional de desmina foi aumentada em CTMs-MO e diminuída em CTMs-TA após o tratamento com TSA. Como TSA aumenta a miogênese em células C2C12 (HAGIWARA, SAITO *et al.*, 2011), supõe-se que a miogênese possa ser favorecida em CTMs-MO ao invés da adipogênese.

Tanto em CTMs-MO como em CTMs-TA a adipogênese foi diminuída pelos tratamentos com TSA, com exceção do tratamento com 5 nM. CTMs-MO diferenciam mais eficientemente em osso e cartilagem, enquanto CTMs-TA diferenciam melhor em adipócitos (LIU, MARTINA *et al.*, 2007). Assim, o epigenoma é diferente entre CTMs e poderia explicar a expressão gênica distinta e o efeito mais pronunciado na diferenciação adipogênica em CTMs-TA do que em CTMs-MO resultante do tratamento com TSA. Pode-se concluir que a ação dos inibidores de HDACs é dependente da concentração e do tempo de tratamento utilizados, do tipo celular e do modelo de diferenciação avaliados.

É importante notar que somente o tratamento com 500 nM de TSA causou um aumento significativo em acH3 detectável por *Western blot*, mas teve um efeito negativo na proliferação celular. Os tratamentos com 5 ou 50 nM de TSA não provocaram mudanças substanciais na expressão de acH3 ou na proliferação celular. Entretanto, o tratamento prévio com TSA em todas as condições resultou em uma diminuição da adipogênese, independente se a proliferação foi afetada ou não.

Os inibidores de HDACs induzem, em uma extensão variada, parada de crescimento, diferenciação ou apoptose *in vitro* e *in vivo*. Em alguns casos, a parada de crescimento é induzida em baixas doses e apoptose em doses elevadas; em outros casos, a parada de crescimento precede apoptose. Entretanto, as células devem sofrer apoptose sem significantes mudanças no perfil de seu ciclo celular (MINUCCI e PELICCI, 2006). A TSA é bem conhecida por causar a parada no ciclo celular de células de mamíferos nas fases G1 e G2 (MONNERET, 2005).

Embora a redução na adipogênese não tenha sido acompanhada por uma regulação negativa significativa de genes adipogênicos em todos os tratamentos, uma regulação positiva na expressão de genes anti-adipogênicos, tais como GATA2, poderia ter ocorrido. Assim, um balanço final entre os genes favorecendo e aqueles inibindo a diferenciação poderia resultar na redução da adipogênese. Entretanto, não foi encontrada uma resposta evidente envolvendo a regulação do gene anti-adipogênico GATA2 por TSA, embora outros genes anti-adipogênicos permaneçam a ser investigados.

É necessário enfatizar que HDACs também desacetilam diversas proteínas não-histônicas, incluindo aquelas que possuem funções regulatórias na proliferação, migração e morte celular (DOKMANOVIC, CLARKE *et al.*, 2007). Estes fatores podem ser os alvos primários de HDACs, desde que a evolução de HDACs precedeu a evolução das histonas (GREGORETTI, LEE *et al.*, 2004). GATA2 possui múltiplos sítios de acetilação os quais aumentam sua atividade de ligação ao DNA, fornecendo pontos de controle para a regulação (HAYAKAWA, 2003). GATA2 está presente em células precursoras como uma proteína acetilada (ORLIC, ANDERSON *et al.*, 1995; TONG, 2000). A expressão forçada de GATA2 reduz a adipogênese e sua expressão defectiva está associada com obesidade (TONG, 2000). Como GATA2 é um alvo nuclear da repressão mediada por HDAC3 (OZAWA, 2001), tratar as células com TSA deveria resultar em uma atividade aumentada de GATA2. Conseqüentemente, a adipogênese é desfavorecida pois GATA2 inibe a transcrição de PPARG e CEBPA (ROSEN e MACDOUGALD, 2006). Embora o nível transcricional de GATA2 não tenha mudado após o tratamento com TSA, o nível proteico ou a atividade de GATA2 pode ter se alterado. Assim, tratar as células com agentes tais como TSA que inibem HDACs e também afetam outros elementos regulatórios além das histonas resulta tanto em efeitos epigenéticos como não-

epigenéticos. O efeito final é consequência das ações combinada e é difícil distingui-las.

A desmetilação do DNA nas regiões promotoras pode levar à ativação e expressão gênica. Similarmente à TSA, a ação da 5azadC resulta na desmetilação global não específica e este processo pode afetar múltiplas vias regulatórias (KOMASHKO e FARNHAM, 2010). Entretanto, por razões ainda não claras, nem todos os genes são afetados por 5azadC. Somente cerca de 1% dos transcritos foram diferencialmente expressos em uma linhagem de câncer ovariano tratada com 5azadC (MENENDEZ, WALKER *et al.*, 2007).

O tratamento com 5azadC aumentou a expressão de PPARG. Embora altos níveis de GATA2 foram observados em culturas celulares de sangue de cordão tratadas concomitantemente com 5azadC e TSA (ARAKI, YOSHINAGA *et al.*, 2007), não foram observada mudanças evidentes na expressão de GATA2 após os tratamentos neste trabalho.

A diferenciação adipogênica foi reduzida de uma maneira dose-dependente concomitantemente com a regulação negativa de PPARG e FABP4 e positiva de GATA2 nas culturas induzidas por 14 dias. Uma relação inversa foi observada entre a intensidade de expressão dos genes adipogênicos e de GATA2. Culturas tratadas com 5azadC mas não induzidas tiveram uma expressão aumentada de GATA2 após 14 dias.

Neste mesmo sentido, o tratamento de células 3T3-L1 com inibidores da metilação de DNA tiveram um efeito negativo na diferenciação adipogênica, mas a magnitude dos efeitos foi distinta em resposta ao tempo de exposição e concentração das drogas. Os tratamentos com 1, 10 ou 100 μM de 5azadC durante os estágios iniciais tiveram efeitos mais intensos do que em estágios mais tardios ou tratamentos contínuos (SAKAMOTO, KOGO *et al.*, 2008). Células em estágios de inibição por contato foram altamente sensíveis ao tratamento com 0,2 μM de 5azadC ou 0,8 μM de 5-azacitidina previamente à indução, enquanto as células após a inibição por contato foram menos sensíveis (GUO, ZHANG *et al.*, 2009). Adicionalmente, o tratamento de CTMs-MO com 1 μM de 5azadC por 3 dias antes da indução estimula a osteogênese (EI-SERAFI, OREFFO *et al.*, 2011). Considerando que dentro da medula óssea a diferenciação de CTMs em adipócitos ou osteoblastos é competitivamente balanceada, mecanismos que promovem um alvo celular ativamente suprimem mecanismos que induzem a linhagem alternativa

(MURUGANANDAN, ROMAN *et al.*, 2009). Logo, em CTMs-MO tratadas com 5azadC a osteogênese é favorecida em comparação à adipogênese. Coerentemente, o tratamento com 5azadC regulou positivamente BMP4 em CTMs-TA, embora não tenha sido observado um aumento evidente em CTMs-MO. A 5-azacitidina promove a diferenciação miogênica de células C2C12 (HUPKES, JONSSON *et al.*, 2011; FENG, CHEN *et al.*, 2012). Como a expressão de desmina aumentou nas CTMs-MO tratadas, sugere-se que a miogênese é favorecida com o tratamento.

Embora o conteúdo de DNA não tenha mudado significativamente durante os dois dias de tratamento com 5azadC, a proliferação celular estava reduzida quando a indução foi iniciada. Como uma inibição significativa da síntese de DNA devido à falta de reparo da Dnmt1 ligada à 5azadC incorporada ao DNA não ocorre por pelo menos dois ciclos celulares (DAVIDSON, CROWTHER *et al.*, 1992), é razoável assumir que uma diferença inicial no conteúdo de DNA não tenha sido identificada. A redução na proliferação das culturas tratadas poderia ser um fator importante diminuindo a adipogênese, desde que uma relação proporcional foi verificada: concentrações mais elevadas de 5azadC resultaram em maior inibição da adipogênese e efeitos mais negativos na proliferação celular. A prévia privação de mitógeno impede a diferenciação adipogênica (GUO, ZHANG *et al.*, 2009), logo, a capacidade de proliferação é importante para a adipogênese.

Interessantemente, a resposta aos tratamentos foi mais pronunciada em CTMs-TA do que em CTMs-MO, sugerindo a existência de uma memória epigenética distinta de acordo com a origem celular. Os promotores de genes adipogênicos tais como PPARG e FABP4, LPL ou leptina estão desmetilados em isolados frescos e culturas de CTMs-TA e também em culturas diferenciadas; já promotores miogênicos e endoteliais estão metilados, indicando que estas células já estão comprometidas com um alvo adipogênico em vez de outras linhagens (NOER, SØRENSEN *et al.*, 2006; BOQUEST, NOER *et al.*, 2007). Tipicamente, o perfil epigenético de qualquer célula provavelmente seja um indicador sensível de seu passado, estado corrente de desenvolvimento e possa prever seu potencial futuro (MEISSNER, 2010). Portanto, uma comparação entre CTMs-MO e CTMs-TA em relação à metilação de genes adipogênicos permanece para ser investigada.

Os resultados de CHIP-Seq ainda estão sendo analisados. Algumas abordagens sugerem que há o reposicionamento de ach3 com a diferenciação para

regiões mais próximas ao sítio de início da transcrição. Como acH3 é uma marca de cromatina ativa, pode estar relacionada à ativação transcricional de genes envolvidos na adipogênese. No entanto, análises adicionais são necessárias para uma melhor compreensão.

8 CONCLUSÃO

A investigação do núcleo, nucléolos e lâmina nuclear mostrou que ocorreram mudanças na arquitetura nuclear das CTMs após a indução adipogênica. Adicionalmente, estas alterações foram distintas das descritas em CTEs.

Houve mudança na estrutura da cromatina das CTMs após a indução adipogênica, conforme a análise de 3meH3K9, 3meH3K27, H2AZ e me/2me/3meH3K4, acH3. Dentre elas, acH3 foi a única marca alterada significativamente, sendo reduzida após 14 dias de indução. Este foi o primeiro relato de mudanças na arquitetura nuclear de CTMs descrito na literatura.

O envolvimento dos mecanismos epigenéticos na diferenciação adipogênica de CTMs foi demonstrado pela investigação das modificações nas histonas e da metilação do DNA.

A influência das modificações nas histonas na diferenciação foi verificada pelo uso da TSA, que resulta no aumento da acetilação global. A TSA significativamente reduziu a adipogênese, com exceção do tratamento com 5 nM em CTMs-MO. No entanto, houve somente associação parcial entre diferenciação e expressão gênica. O tratamento com 500 nM de TSA significativamente aumentou os níveis de acH3, embora a proliferação celular tenha diminuído nesta concentração. Não houve relação do efeito causado pela TSA na proliferação com a diferenciação.

A influência da metilação do DNA na diferenciação foi confirmada pelo uso da 5azadC, que promove a desmetilação global. O tratamento com 5azadC significativamente diminuiu a diferenciação adipogênica em todas as condições avaliadas e isto resultou na regulação negativa de PPARG e FABP4, e positiva de GATA2. Embora o conteúdo de DNA não tenha mudado nos tratamentos com 5azadC, a proliferação celular foi reduzida 24 horas após seu término. Houve associação entre o efeito da 5azadC causado na proliferação e a diferenciação.

A análise de duas fontes distintas de CTMs, a medula óssea e o tecido adiposo, permitiu identificar diferenças na resposta aos tratamentos. Em CTMs-TA os efeitos observados pela ação dos agentes modificadores da cromatina foram mais acentuados do que em CTMs-MO, sugerindo a existência de memórias epigenéticas intrínsecas à origem celular.

9 PERSPECTIVAS

A diferenciação de células-tronco envolve mudanças na arquitetura nuclear. A organização nuclear é importante na regulação da expressão gênica e tem-se relatado o reposicionamento de genes durante a diferenciação de diversos tipos celulares. Assim, pretende-se aprofundar a análise da arquitetura nuclear utilizando técnicas como reconstrução 3D, tomografia e microscopia de força atômica. Além disso, está prevista a análise da organização espacial de genes associados à linhagem-alvo adipocítica no decorrer do processo de diferenciação utilizando FISH-3D.

O efeito dos agentes modificadores da cromatina TSA e 5azadC na expressão gênica foi avaliado somente para alguns genes. A próxima etapa consiste avaliar o efeito dos tratamentos na expressão gênica de modo geral. Para isso, as culturas serão tratadas e será realizada a análise dos transcritos por sequenciamento. A análise de diferentes fontes de CTMs adicionalmente permitirá avaliar o efeito da memória epigenética bem como um eventual potencial de diferenciação pré-existente.

Será concluída a análise dos resultados obtidos por ChIP-Seq e realizada a validação dos resultados por qPCR.

A memória epigenética também deverá ser investigada pela análise do padrão de metilação de determinados genes envolvidos na adipogênese, tanto em CTMs-MO como CTMs-TA. Portanto, as culturas serão tratadas com bisulfito de sódio para permitir a distinção das regiões metiladas e a análise por PCR.

Visando ampliar os resultados, outros modelos de diferenciação serão avaliados, em especial a osteogênese por haver uma regulação competitiva com a adipogênese.

REFERÊNCIAS

ARAKI, H. *et al.* Chromatin-modifying agents permit human hematopoietic stem cells to undergo multiple cell divisions while retaining their repopulating potential. **Blood**, v. 109, n. 8, p. 3570-3578, 2007.

ARNEY, K. L.; FISHER, A. G. Epigenetic aspects of differentiation. **Journal of Cell Science**, v. 117, n. 19, p. 4355-63, 2004.

AUSTIN, C. M.; BELLINI, M. The dynamic landscape of the cell nucleus. **Molecular Reproduction and Development**, v. 77, n. 1, p. 19-28, 2010.

BÁRTOVÁ, E. *et al.* Structure and epigenetics of nucleoli in comparison with non-nucleolar compartments. **The Journal of Histochemistry and Cytochemistry : Official Journal of the Histochemistry Society**, v. 58, n. 5, p. 391-403, 2010.

BERNSTEIN, B. E. *et al.* A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells. **Cell**, v. 125, n. 2, p. 315-26, 2006.

BOQUEST, A. *et al.* CpG methylation profiles of endothelial cell-specific gene promoter regions in adipose tissue stem cells suggest limited differentiation potential toward the endothelial cell lineage. **Stem cells**, v. 25, n. 4, p. 852-913, 2007.

BOŠKOVIĆ, A. *et al.* Analysis of active chromatin modifications in early mammalian embryos reveals uncoupling of H2A.Z acetylation and H3K36 trimethylation from embryonic genome activation. **Epigenetics**, v. 7, n. 7, p. 747-57, 2012.

BOULON, S. *et al.* The nucleolus under stress. **Molecular Cell**, v. 40, n. 2, p. 216-27, 2010.

BRICKNER, D. G. *et al.* H2A.Z-mediated localization of genes at the nuclear periphery confers epigenetic memory of previous transcriptional state. **PLoS Biology**, v. 5, n. 4, p. 704-16, 2007.

CAPLAN, A. I.; DENNIS, J. E. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 98, n. 5, p. 1076-84, 2006.

CHEN, P. Y. *et al.* A comparative analysis of DNA methylation across human embryonic stem cell lines. **Genome Biology**, v. 12, n. 7, p.1-12.

CHRISTMAN, J. K. 5-Azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine as inhibitors of DNA methylation: mechanistic studies and their implications for cancer therapy. **Oncogene**, v. 21, n. 35, p. 5483-95, 2002.

COLLAS, P. Epigenetic states in stem cells. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1790, n. 9, p. 900-5, 2009.

COLLAS, P.; TARANGER, C. K. Epigenetic reprogramming of nuclei using cell extracts. **Stem Cell Reviews**, v. 2, n. 4, p. 309-17, 2006.

DA SILVA MEIRELLES, L.; CHAGASTELLES, P. C.; NARDI, N. B. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. **Journal of Cell Science**, v. 119, n. Pt 11, p. 2204-13, 2006.

DAVIDSON, S. *et al.* Cytotoxicity of 5-aza-2'-deoxycytidine in a mammalian cell system. **European Journal of Cancer**, v. 28, n. 2-3, p. 362-370, 1992.

DE CROMBRUGGHE, B. *et al.* Transcriptional mechanisms of chondrocyte differentiation. **Matrix Biology: Journal of the International Society for Matrix Biology**, v. 19, n. 5, p. 389-94, 2000.

DE RUIJTER, A. *et al.* Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. **The Biochemical Journal**, v. 370, n. Pt 3, p. 737-86, 2003.

DOKMANOVIC, M.; CLARKE, C.; MARKS, P. Histone deacetylase inhibitors: overview and perspectives. **Molecular Cancer Research**, v. 5, n. 10, p. 981-90, 2007.

DOMINICI, M. *et al.* Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v. 8, n. 4, p. 315-7, 2006.

DUNDR, M.; MISTELI, T. Biogenesis of nuclear bodies. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 2, n. 12, p. 1-15, 2010.

DUPONT, C.; ARMANT, D. R.; BRENNER, C. A. Epigenetics: definition, mechanisms and clinical perspective. **Seminars in Reproductive Medicine**, v. 27, n. 5, p. 351-7, 2009.

EL-SERAFI, A.; OREFFO, R.; ROACH, H. Epigenetic modifiers influence lineage commitment of human bone marrow stromal cells: Differential effects of 5-aza-deoxycytidine and trichostatin A. **Differentiation**, v. 81, n. 1, p. 35-76, 2011.

FEDOROVA, E.; ZINK, D. Nuclear architecture and gene regulation. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1783, n. 11, p. 2174-84, 2008.

FENG, S.-W. *et al.* Restoration of muscle fibers and satellite cells after isogenic MSC transplantation with microdystrophin gene delivery. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 419, n. 1, p. 1-6, 2012.

GHOSHAL, K.; BAI, S. DNA methyltransferases as targets for cancer therapy. **Drugs of Today**, v. 43, n. 6, p. 395-422, 2007.

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

GREGORETTI, I. V.; LEE, Y. M.; GOODSON, H. V. Molecular evolution of the histone deacetylase family: functional implications of phylogenetic analysis. **Journal of Molecular Biology**, v. 338, n. 1, p. 17-31, 2004.

GRISENDI, S. *et al.* Nucleophosmin and cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 6, n. 7, p. 493-505, 2006.

GUO, W. *et al.* Adipogenesis licensing and execution are disparately linked to cell proliferation. **Cell Research**, v. 19, n. 2, p. 216-39, 2009.

HAGIWARA, H. *et al.* Histone deacetylase inhibitor trichostatin A enhances myogenesis by coordinating muscle regulatory factors and myogenic repressors. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 414, n. 4, p. 826-31, 2011.

HAMPOELZ, B.; LECUIT, T. Nuclear mechanics in differentiation and development. **Current opinion in Cell Biology**, v. 23, n. 6, p. 668-75, 2011.

HARNICAROVÁ HORÁKOVÁ, A.; BÁRTOVÁ, E.; KOZUBEK, S. Chromatin structure with respect to histone signature changes during cell differentiation. **Cell Structure and Function**, v. 35, n. 1, p. 31-44, 2010.

HAYAKAWA, F. Functional regulation of GATA-2 by acetylation. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 75, n. 3, p. 529-40, 2003.

HOWELL, P. M. J.; LIU, Z.; KHONG, H. T. Demethylating agents in the treatment of cancer. **Pharmaceuticals**, v. 3, n. 7, p. 2022-44, 2010.

HUBER, M. D.; GERACE, L. The size-wise nucleus: nuclear volume control in eukaryotes. **Journal of Cell Biology**, v. 179, n. 4, p. 583-4, 2007.

HUPKES, M. *et al.* Epigenetics: DNA demethylation promotes skeletal myotube maturation. **FASEB Journal**, v. 25, n. 11, p. 3861-72, 2011.

JOFFE, B.; LEONHARDT, H.; SOLOVEI, I. Differentiation and large scale spatial organization of the genome. **Current Opinion in Genetics & Development**, v. 20, n. 5, p. 562-9, 2010.

JOHANSSON, H.; SIMONSSON, S. Core transcription factors, Oct4, Sox2 and Nanog, individually form complexes with nucleophosmin (Npm1) to control embryonic stem (ES) cell fate determination. **Aging**, v. 2, n. 11, p. 815-22, 2010.

JÜTTERMANN, R.; LI, E.; JAENISCH, R. Toxicity of 5-aza-2'-deoxycytidine to mammalian cells is mediated primarily by covalent trapping of DNA methyltransferase rather than DNA demethylation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 91, n. 25, p. 11797-801, 1994.

KHAVARI, D. A.; SEN, G. L.; RINN, J. L. DNA methylation and epigenetic control of cellular differentiation. **Cell Cycle**, v. 9, n. 19, p. 3880-3, 2010.

KIM, S. N.; CHOI, H. Y.; KIM, Y. K. Regulation of adipocyte differentiation by histone deacetylase inhibitors. **Archives of Pharmacal Research**, v. 32, n. 4, p. 535-41, 2009.

KOMASHKO, V.; FARNHAM, P. 5-azacytidine treatment reorganizes genomic histone modification patterns. **Epigenetics**, v. 5, n. 3, p. 229-40, 2010.

KOUZARIDES, T. Chromatin modifications and their function. **Cell**, v. 128, n. 4, p. 693-705, 2007.

KRETSOVALI, A.; HADJIMICHAEL, C.; CHARMPILAS, N. Histone deacetylase inhibitors in cell pluripotency, differentiation, and reprogramming. **Stem Cells International**, v. 2012, p. 1-10, 2012.

LAGACE, D. C.; NACHTIGAL, M. W. Inhibition of histone deacetylase activity by valproic acid blocks adipogenesis. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 18, p. 18851-60, 2004.

LEE, J.-H.; HART, S.; SKALNIK, D. Histone deacetylase activity is required for embryonic stem cell differentiation. **Genesis**, v. 38, n. 1, p. 32-40, 2004.

LEE, S. *et al.* Histone deacetylase inhibitors decrease proliferation potential and multilineage differentiation capability of human mesenchymal stem cells. **Cell Proliferation**, v. 42, n. 6, p. 711-20, 2009.

LENNARTSSON, A.; EKWALL, K. Histone modification patterns and epigenetic codes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1790, n. 9, p. 863-8, 2009.

LI, J. *et al.* Nucleophosmin regulates cell cycle progression and stress response in hematopoietic stem/progenitor cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 24, p. 16536-45, 2006.

LIANG, W. *et al.* 5-Aza-2'-deoxycytidine increases the sensitivity of human bone marrow mesenchymal stem cells to chemotherapeutic agents by demethylation of p73. **Journal of Pediatric Hematology/Oncology**, v. 34, n. 2, p. 108-15, 2012.

LIM, M. J.; WANG, X. W. Nucleophosmin and human cancer. **Cancer Detection and Prevention**, v. 30, n. 6, p. 481-90, 2006.

LISTER, R. *et al.* Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. **Nature**, v. 462, n. 7271, p. 315-22, 2009.

LIU, T. M. *et al.* Identification of common pathways mediating differentiation of bone marrow- and adipose tissue-derived human mesenchymal stem cells into three mesenchymal lineages. **Stem Cells**, v. 25, n. 3, p. 750-60, 2007.

MARSHALL, W. F. Gene expression and nuclear architecture during development and differentiation. **Mechanisms of Development**, v. 120, n. 11, p. 1217-30, Nov 2003.

MARTINO, S. *et al.* Stem cell-biomaterial interactions for regenerative medicine. **Biotechnology advances**, v. 30, n. 1, p. 338-51, 2012.

MATTOU, A.; MESHORER, E. Chromatin plasticity and genome organization in pluripotent embryonic stem cells. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 22, n. 3, p. 334-41, 2010.

MEISSNER, A. Epigenetic modifications in pluripotent and differentiated cells. **Nature Biotechnology**, v. 28, n. 10, p. 1079-1167, 2010.

MÉJAT, A.; MISTELI, T. LINC complexes in health and disease. **Nucleus**, v. 1, n. 1, p. 40-52, 2010.

MEKHAIL, K.; MOAZED, D. The nuclear envelope in genome organization, expression and stability. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 11, n. 5, p. 317-28, 2010.

MENEGHINI, M. D.; WU, M.; MADHANI, H. D. Conserved histone variant H2A.Z protects euchromatin from the ectopic spread of silent heterochromatin. **Cell**, v. 112, n. 5, p. 725-36, 2003.

MENENDEZ, L. *et al.* Identification of candidate methylation-responsive genes in ovarian cancer. **Molecular Cancer**, v. 6, p. 1-10, 2007.

MESHORER, E. *et al.* Hyperdynamic plasticity of chromatin proteins in pluripotent embryonic stem cells. **Developmental cell**, v. 10, n. 1, p. 105-16, 2006.

MESHORER, E.; MISTELI, T. Chromatin in pluripotent embryonic stem cells and differentiation. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 7, n. 7, p. 540-6, 2006.

MINUCCI, S.; PELICCI, P. G. Histone deacetylase inhibitors and the promise of epigenetic (and more) treatments for cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 6, n. 1, p. 38-51, 2006.

MISTELI, T. Concepts in nuclear architecture. **Bioessays**, v. 27, n. 5, p. 477-87, 2005.

MONNERET, C. Histone deacetylase inhibitors. **European journal of medicinal chemistry**, v. 40, n. 1, p. 1-13, 2005.

MORRIS, K. J.; CHOTALIA, M.; POMBO, A. Nuclear architecture in stem cells. **Advances in experimental medicine and biology**, v. 695, p. 14-25, 2010.

MURUGANANDAN, S.; ROMAN, A.; SINAL, C. 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. 236-89, 2009.

NOER, A. *et al.* Stable CpG hypomethylation of adipogenic promoters in freshly isolated, cultured, and differentiated mesenchymal stem cells from adipose tissue. **Molecular Biology of the Cell**, v. 17, n. 8, p. 3543-99, 2006.

NUNEZ, E.; FU, X. D.; ROSENFELD, M. G. Nuclear organization in the 3D space of the nucleus - cause or consequence? **Current Opinion in Genetics & Development**, v. 19, n. 5, p. 424-36, 2009.

ORLIC, D. *et al.* Pluripotent hematopoietic stem cells contain high levels of mRNA for c-kit, GATA-2, p45 NF-E2, and c-myb and low levels or no mRNA for c-fms and the receptors for granulocyte colony-stimulating factor and interleukins 5 and 7. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 92, n.10, p. 4601-6, 1995.

OZAWA, Y. Histone deacetylase 3 associates with and represses the transcription factor GATA-2. **Blood**, v. 98, 2001.

PARK, J. S. *et al.* Mechanobiology of mesenchymal stem cells and their use in cardiovascular repair. **Frontiers in Bioscience**, v. 12, p. 5098-116, 2007.

PASSIER, R.; MUMMERY, C. Origin and use of embryonic and adult stem cells in differentiation and tissue repair. **Cardiovascular Research**, v. 58, n. 2, p. 324-35, 2003.

REBELATTO, C. K. *et al.* Dissimilar differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, and adipose tissue. **Experimental Biology and Medicine**, v. 233, n. 7, p. 901-13, 2008.

ROSEN, E.; MACDOUGALD, O. Adipocyte differentiation from the inside out. **Nature Reviews Molecular and Cell Biology**, v. 7, n. 12, p. 885-981, 2006.

SAKAMOTO, H. *et al.* Sequential changes in genome-wide DNA methylation status during adipocyte differentiation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 366, n. 2, p. 360-6, 2008.

SCHÖFER, C.; WEIPOLTSHAMMER, K. Gene dynamics and nuclear architecture during differentiation. **Differentiation**, v. 76, n. 1, p. 41-56, 2008.

SHUFARO, Y.; REUBINOFF, B. E. Therapeutic applications of embryonic stem cells. **Best practice and research. Clinical Obstetrics and Gynaecology**, v. 18, n. 6, p. 909-27, 2004.

SOLTANOFF, C. S. *et al.* Signaling networks that control the lineage commitment and differentiation of bone cells. **Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression**, v. 19, n. 1, p. 1-46, 2009.

SPIVAKOV, M.; FISHER, A. G. Epigenetic signatures of stem-cell identity. **Nature Reviews Genetics**, v. 8, n. 4, p. 263-71, 2007.

SZCZERBAL, I.; FOSTER, H. A.; BRIDGER, J. M. The spatial repositioning of adipogenesis genes is correlated with their expression status in a porcine mesenchymal stem cell adipogenesis model system. **Chromosoma**, v. 118, n. 5, p. 647-63, 2009.

TADDEI, A. *et al.* The effects of histone deacetylase inhibitors on heterochromatin: implications for anticancer therapy? **EMBO Reports**, v. 6, n. 6, p. 520-4, 2005.

TEVEN, C. M. *et al.* Epigenetic regulation of mesenchymal stem cells: a focus on osteogenic and adipogenic differentiation. **Stem Cells International**, v. 2011, p. 1-18, 2011.

THIRY, M.; LAMAYE, F.; LAFONTAINE, D. L. The nucleolus: When 2 became 3. **Nucleus**, v. 2, n. 4, p. 289-93, 2011.

TONG, Q. Function of GATA transcription factors in preadipocyte-adipocyte transition. **Science**, v. 290, n. 5489, p. 134-138, 2000.

UCCELLI, A.; MORETTA, L.; PISTOIA, V. Mesenchymal stem cells in health and disease. **Nature Reviews Immunology**, v. 8, n. 9, p. 726-36, 2008.

VAN BORTLE, K.; CORCES, V. G. Nuclear Organization and Genome Function. **Annual review of Cell and Developmental Biology**, 2012.

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

WANG, J. P. *et al.* Trichostatin A inhibits TGF-beta1 induced in vitro chondrogenesis of hMSCs through Sp1 suppression. **Differentiation**, v. 81, n. 2, p. 119-26, 2011.

WIBLIN, A. E. *et al.* Distinctive nuclear organisation of centromeres and regions involved in pluripotency in human embryonic stem cells. **Journal of Cell Science**, v. 118, n. Pt 17, p. 3861-8, 2005.

WU, H.; SUN, Y. E. Epigenetic regulation of stem cell differentiation. **Pediatric Research**, v. 59, n. 4 Pt 2, p. 21R-5R, 2006.

WYRICK, J. J.; PARRA, M. A. The role of histone H2A and H2B post-translational modifications in transcription: a genomic perspective. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1789, n. 1, p. 37-44, 2009.

YANG, X. J.; SETO, E. The Rpd3/Hda1 family of lysine deacetylases: from bacteria and yeast to mice and men. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 9, n. 3, p. 206-18, 2008.

YOO, E. *et al.* Down-regulation of histone deacetylases stimulates adipocyte differentiation. **Journal of Chemical Biology**, v. 281, n. 10, p. 6608-23, 2006.

ZULEGER, N.; ROBSON, M. I.; SCHIRMER, E. C. The nuclear envelope as a chromatin organizer. **Nucleus**, v. 2, n. 5, p. 339-49, 2011.

APÊNDICES

APÊNDICE A Lista de iniciadores

APÊNDICE B Lista de anticorpos

APÊNDICE C Preparo de soluções

APÊNDICE A – LISTA DE INICIADORES

SIGLA OFICIAL	NOME OFICIAL DO GENE	ID DO GENE NO NCBI	SEQUÊNCIA (5'→3')	TAMANHO DO PRODUTO (PB)	TEMPERATURA DE ANELAMENTO (°C)	NÚMERO DE CICLOS (RT-PCR)
BMP4	Bone morphogenetic protein 4	652	Forward: ACTTCGAGGGCGACACTTCTG Reverse: TCCAGATGTTCTTCGTGGTGG	214	60	30
COL1A1	Collagen, type I, alpha 1	1277	Forward: GGCCATCCAGCTGACCTTCC Reverse: CGTGCAGCCATCGACAGTGAC	205	60	35
COL2A1	Collagen, type II, alpha 1	1280	Forward: CCGGGCAGAGGGGCAATAGCAGGTT Reverse: CAATGATGGGGAGGCGTGAG	128	60	35
DES	Desmin	1674	Forward: CCAACAAGAACAACGACG Reverse: TGGTATGGACCTCAGAACC	408	60	35
FABP4	Fatty acid binding protein 4	2167	Forward: ATGGGATGGAAAATCAACCA Reverse: GTGGAAGTGACGCCTTTCAT	97	60	-
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	2597	Forward: GGCGATGCTGGCGCTGAGTAC Reverse: TGGTTCACACCCATGACGA	150	60	35
GATA2	GATA binding protein 2	2624	Forward: ATGGGATGGAAAATCAACCA Reverse: GTGGAAGTGACGCCTTTCAT	295	65	35
PPARG*	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma	5468	Forward: ATTACAGCAAACCCCTATTCC Reverse: GGCATCTCTGTGTCAACCAT	139	60	35
TP73	Tumor protein p73	7161	Forward: GCTGATGAGGACCACTACCG Reverse: CTCGCACCTGAAGGTAGTACG	172	60	35

* O primer amplifica somente a variante 2 do transcrito.

APÊNDICE B – LISTA DE ANTICORPOS

Anticorpo	Isotipo	Fabricante	Código	Diluição utilizada	
				IF	WB
Anticorpos primários					
acH3	Policlonal coelho IgG	Upstate/Millipore	06-599	1:400	1:2000
me/2me/3meH3K4	Monoclonal coelho IgG	Upstate/Millipore	05-791	1:400	1:2000
3meH3K9	Policlonal coelho IgG	Abcam	ab8898	1:400	1:2000
3meH3K27	Policlonal coelho IgG	Upstate/Millipore	07-449	1:200	1:2000
H2AZ	Policlonal coelho IgG	Abcam	ab4174	1:500	1:2000
HP1 α	Policlonal coelho IgG	Abcam	ab9057	1:50	
GAPDH	Monoclonal Coelho IgG	Cell Signaling	2118		1:1000
Lamina A/C	Policlonal cabra IgG	Santa Cruz	sc-6215	1:500	
Nucleofosmina	Monoclonal camundongo IgG1	Abcam	ab10530	1:400	
Fibrilarina	Policlonal coelho IgG	Abcam	ab5821	1:50	
Actina	Policlonal coelho IgG	Santa Cruz	sc-7210	-	1:100
5-Metilcitosina	Monoclonal camundongo IgM	Abcam	ab73938	-	1:1000
Anticorpos secundários					
anti-coelho conjugado a Alexa fluor 488	cabra IgG	Invitrogen	A11008	1:400	-
anti-coelho conjugado a AlexaFluor 546	cabra IgG	Invitrogen		1:400	-
anti-camundongo conjugado a Alexa fluor 488	cabra IgG	Invitrogen	A11001	1:400	-
anti-cabra conjugado a Alexa fluor 488	rabbit	Invitrogen	A11078	1:400	-

anti-coelho conjugado à fosfatase				-	1:10000
anti-camundongo conjugado à fosfatase					1:1000
anti-camundongo conjugado à peroxidase	cabra IgM	Sigma	A8787	-	1:2000

APÊNDICE C – PREPARO DE SOLUÇÕES E MEIOS DE CULTURA

Alizarin Red S

Alizarin Red S 2 g

Água deionizada 100 ml

Ajustar pH para 4,1-4,3 com uma solução de hidróxido de amônio 1%;

Estocar a temperatura ambiente protegido da luz por até 3 meses.

Dexametasona 10 mM

Dissolver 39,25 mg de Dexametasona em 10 ml de água.

Esterilizado por filtração em membrana 0,22 µm.

IBMX 500 mM

Dissolver 1,111 g de IBMX em 10 ml de DMSO.

Esterilizado por filtração em membrana 0,22 µm.

Indometacina 50 mM

Dissolver 178,89 mg em 10 ml de etanol.

Esterilizado por filtração em membrana 0,22 µm.

Insulina Bovina 1 mg/ml

Dissolver 10 mg em 10 ml de água com pH 2-3 ajustado com HCl. Em seguida ajustar para pH 7. Aeração e formação de espuma devem ser evitadas durante a solubilização e a filtração pois podem causar a desnaturação da proteína.

Esterilizado por filtração em membrana 0,22 μm usando filtro de baixa ligação de proteína.

L-glutamina 200 mM

L-glutamina (1131404, Gibco) 29,23 g

Água ultrapura qsp 1000 ml

Esterilizado por filtração em membrana 0,22 μm

Aliquotado e estocado a -20°C .

Meio DMEM (Sigma)

Meio DMEM (Gibco)

Solução C 50 ml

Água ultrapura qsp 1000 ml

Ajustar pH 7 – 7,5

Esterilizado por filtração em membrana 0,22 μm .

Estocado de 2 a 8°C .

Meio F12

Meio F12 (21700-026, Gibco) 1 envelope com 10,6 g

Bicarbonato de Sódio 1,176 g

Água ultrapura qsp 1000 ml

Ajustar pH 7,0 – 7,5

Esterilizado por filtração em membrana 0,22 μm .

Estocado de 2 a 8°C .

Oil Red O

Solução-estoque:

Oil Red O 50mg

Isopropanol 10ml

Estocado a temperatura ambiente protegido da luz por até 3 meses.

Solução de trabalho:

Misturar 3 volumes da solução-estoque e 2 volumes de água;

Misturar e esperar 10 min;

Filtrar o corante através de uma unidade de filtro estéril.

Esperar 10 min antes de utilizar. Não agitar a solução previamente ao uso ou precipitados podem ser ressuspensos. Usar em 2h. Descartar qualquer sobra.

Paraformaldeído 4%

Paraformaldeído 20g

Solução NaOH 1M 5 ml

Solução de PBS 10x

Água ultrapura qsp 500 ml

Aquecer 200 ml de água ultrapura em um becker de vidro até 65°C.

Em capela química de exaustão, adicionar 20 gramas de paraformaldeído sob agitação.

Adicionar 5 ml de solução de NaOH 1M, lentamente até que a solução fique transparente. Deixar dissolver completamente sob agitação.

Deixar resfriar a temperatura ambiente.

Adicionar 50 ml de solução de PBS 10x.

pH 7,0 – 7,5, sob agitação.

Completar até 500 ml com água ultrapura.

Caso haja precipitado, filtrar em papel de filtro.

Aliquotado e estocado a -20°C.

PS 100 x

Penicilina G Potássica 1,2 g
Sulfato de Estreptomicina 2,0 g
Água ultrapura qsp 200 ml
Esterilizada por filtração em membrana 0,22 μm .
Aliquotado e estocado a -20°C .

Solução A (estoque 20x)

NaCl 160 g
KCl 8 g
 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 5,84 g
 KH_2PO_4 3,0 g
Água ultrapura qsp 1000 ml
Esterilizada por autoclavação 121°C por 15 min
Estocada de 2 a 8°C .

Solução B (estoque 20x)

$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,16 g
 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 3,9 g
 H_2O deionizada qsp 500 ml
Esterilizada por autoclavação a 121°C por 15 min.
Estocada a 4°C .

Solução C (estoque 20x)

Glicose 22 g
Água ultrapura qsp 1000 ml
Esterilizada por filtração em membrana 0,22 μm .
Estocada de 2 a 8°C .

Solução D (estoque 500x)

Vermelho de Fenol 1 g

H₂O deionizada qsp 100 ml

Solubilizar em água alcalinizada com NaOH 1M e completar o volume.

Estocada a 4°C.

Solução E (estoque 20x)

Na₂SO₄ 2g

Água ultrapura qsp 1000 ml

Esterilizada por autoclavação 121°C por 15 min.

Estocada de 2 a 8°C.

Solução Salina Balanceada (BSS)

Solução A 50 ml

Solução B 50 ml

Solução C 50 ml

Solução D 0,85 ml

Água ultrapura qsp 1000 ml

Ajustar pH 7,0 - 7,5 com fita indicadora de pH

Esterilizada por filtração em membrana 0,22 µm.

Estocada de 2 a 8°C.

Solução Salina Balanceada sem cálcio e magnésio (BSS.CMF)

Solução A 50 ml

Solução C 50 ml

Solução E 50 ml

Solução D 0,85 ml
Água ultrapura qsp 1000 ml
Ajustar pH 7,0 - 7,5 com fita indicadora de pH
Esterilizada por filtração em membrana 0,22 μm
Aliquotada e estocada de 2 a 8°C.

Soro Fetal bovino

Soro Fetal bovino (GIBCO)
Inativado a 56°C por 30 min.
Aliquotado e estocado a -20°C

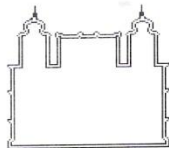
Tripsina 0,05%/EDTA 0,02%

Solução A 50 ml
Solução C 50 ml
Solução E 50 ml
Solução D 0,85 ml
EDTA 0,2 g
Tripsina 0,5 g
Água ultrapura qsp 1000 ml
Ajustar pH 7,0 -7,5 com fita indicadora de pH
Esterilizado por filtração em membrana 0,22 μm .
Aliquotado e estocado a -20°C.

ANEXOS

ANEXO A Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa

ANEXO B Artigo submetido

ANEXO A – APROVAÇÃO DO CEP

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

Rio de Janeiro, 22 de agosto de 2011.

PARECER

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

Protocolo CEP: 419/07

Pesquisador Responsável: Samuel Goldenberg

Instituição: ICC – Instituto Carlos Chagas/Fiocruz/PR

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

Patrícia T. Bozza

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

ANEXO B – ARTIGO SUBMETIDO

The epigenetic modifiers 5-aza-2'-deoxycytidine and trichostatin A influence adipocyte differentiation in human mesenchymal stem cells

J. Zych¹, M.A. Stimamiglio¹, A.C. Senegaglia², P.R.S. Brofman², B. Dallagiovanna¹, S. Goldenberg¹, A. Correa¹

¹ Laboratório de Biologia Básica de Células-Tronco, Instituto Carlos Chagas, FIOCRUZ, Curitiba, Paraná, Brasil

² Núcleo de Tecnologia Celular, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, Paraná, Brasil

Corresponding author:

Jaiesa Zych

Laboratório de Biologia Básica de Células-Tronco, Instituto Carlos Chagas, Fiocruz-PR

Rua Prof Algacyr Munhoz Mader, 3775, Curitiba, Paraná, Brasil, CEP 81350-010.

Tel.: +55 41 2104-3231

Fax: +55 41 3316-3267

jzych@tecpar.br

Acknowledgments

This work was supported by grants from *Ministério da Saúde and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico* - CNPq (CT-Saúde/MS/SCTIE/DECIT/MCT/CNPq N^o. 17/2008). J. Zych, S. Goldenberg and B. Dallagiovanna hold fellowships from CNPq.

Key words: Mesenchymal stem cells; Trichostatin A; 5-aza-2'-deoxycytidine; Adipocyte differentiation; Epigenetics.

Running title: 5azadC and TSA influence adipocyte differentiation in hMSCs

Abstract

Epigenetic mechanisms, such as DNA methylation and histone modification, are important in stem cell differentiation. Methylation is principally associated with transcriptional repression, and histone acetylation is correlated with an active chromatin state. We investigated the effects of these epigenetic mechanisms on adipocyte differentiation in mesenchymal stem cells (MSCs) derived from bone marrow (BM-MSCs) and adipose tissue (ADSCs) using the chromatin modifying agents trichostatin A (TSA), a histone deacetylase inhibitor, and 5-aza-2'-deoxycytidine (5azadC), a demethylating agent. Subconfluent MSC cultures were treated with 5, 50 or 500 nM TSA or with 1, 10 or 100 μ M 5azadC for two days before the initiation of adipogenesis. The differentiation was quantified and expression of the adipocyte genes PPARG and FABP4 and of the anti-adipocyte gene GATA2 was evaluated. TSA decreased adipogenesis, except in BM-MSCs treated with 5 nM TSA. Only treatment with 500 nM TSA decreased cell proliferation. 5azadC treatment decreased proliferation and adipocyte differentiation in all conditions evaluated, resulting in the downregulation of PPARG and FABP4 and the upregulation of GATA2. Treatment response was stronger in ADSCs than in BM-MSCs, suggesting that epigenetic memories may differ between cells of different origins. As epigenetic signatures affect differentiation, it should be possible to direct cell the use of MSCs in cell therapies to improve process efficiency by considering the various sources available.

Introduction

Mesenchymal stem cells (MSCs) can give rise to multiple cell lineages, including chondrocytes, osteoblasts and adipocytes (1). The differentiation process involves changes in morphology and cell function that are determined by different patterns of gene expression (2). The implementation of these gene expression programs is regulated by epigenetic mechanisms, such as histone modification and DNA methylation. Both types of mechanism can modify chromatin structure, thereby influencing gene expression by affecting the accessibility of target sites to regulatory proteins and modifying the affinity of transcriptional regulators for their targets (3).

Histone modifications have been associated with the activity status of chromatin and with specific cellular processes. Histone acetylation is associated with the activation of transcription, (4) and is regulated by the balance between the opposing activities of histone acetyltransferases (HATs) and histone deacetylases (HDACs) (5).

Trichostatin A (TSA) is one of the most potent known inhibitors of HDACs. This hydroxamic acid is active at nanomolar concentrations *in vitro* (6) and inhibits HDACs with zinc-containing catalytic sites (7), leading to the accumulation of acetylated histones in the nucleus and the subsequent activation of target gene (8).

DNA methylation is generally associated with transcriptional silencing and chromatin condensation (9). It involves the addition of a methyl group to cytosine bases and is catalyzed by DNA methyltransferases (DNMTs). The maintenance DNMT, DNMT1, specifically recognizes hemi-methylated DNA after replication and methylates the daughter strand, ensuring faithful conservation of the methylation profile after replication. 5-aza-2'-deoxycytidine (5azadC) is a cytidine analog whose presence in DNA prevents DNMT1 from faithfully replicating the DNA methylation code during cell division. Instead, DNMT1 is inactivated by covalent binding to azacytosine residues in the CpG sites of DNA (10), leading to a passive loss of methylation.

Given the role of these epigenetic mechanisms in the regulation of gene expression, we investigated the effects of TSA and 5azadC on the differentiation of MSCs obtained from two distinct sources into adipocytes. As epigenetic signatures affect differentiation (11), it should be possible to direct cell the use of MSCs in cell therapies to improve process efficiency by considering the various sources available.

Materials and Methods

Cell culture

MSCs were obtained and isolated from bone marrow and adipose tissue as described previously (12). All samples were collected after informed consent had been obtained, in accordance with guidelines for research involving human subjects, and with the approval of the Ethics Committee of Fundação Oswaldo Cruz, Brazil (approval number 419/07). BM-MSCs donors had between 40 and 60 years old and had cardiomyopathy; ADSCs were obtained from donors undergoing selective bariatric surgery and dermolipectomy procedures, aging between 30 and 50 years old. Seven BM-MSCs samples and nine ADSCs samples were used in this work. Cell isolation protocols yielded populations rich in adult MSCs: the cultures were evaluated by flow cytometry, and differentiated into adipocytes, chondrocytes and osteoblasts, according to criteria defined by (1). MSCs were cultured in DMEM supplemented with 10% fetal calf serum (Gibco Invitrogen) plus 100 U/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin (Sigma-Aldrich). All cultures were maintained at 37°C, in a humidified atmosphere containing 5% CO₂, and the culture medium was changed twice weekly. All samples were used at passages 4 to 6.

Adipocyte differentiation and treatment with TSA or 5azadC

TSA and 5azadC exert their effects mostly during replication. We therefore cultured BM-MSCs and ADSCs to 80% confluence and treated them with 5, 50 or 500 nM TSA or with 1, 10 or 100 µM 5azadC (both from Sigma-Aldrich) for two days. The cytotoxicity of the drugs was evaluated by MTT assay (Supplemental Material, Materials and Methods and Figure S1). For adipocyte induction, ADSCs or BM-MSCs were treated with culture medium supplemented with 1 µM dexamethasone, 500 µM IBMX, 1 µg/mL insulin and 200 µM indomethacin (all from Sigma-Aldrich). In control cultures the same quantity of solvents used to dissolve TSA, 5azadC or adipogenic inductors was added to culture medium, one control culture for each drug treatment, and the medium exchanges were carried out in parallel with treated cultures. The medium was changed twice weekly for 14 days (Supplemental Material, Figure S2).

Quantification of adipocyte differentiation by Oil Red O staining

Cells were washed with PBS, fixed by incubation with 4% paraformaldehyde for 30 min and washed with PBS. They were then stained with a filtered solution of 0.5% Oil Red O (Sigma-Aldrich) for 1 h. The cells were thoroughly washed in water and allowed to dry in the air. The Oil Red O retained in the cells was extracted with isopropanol and quantified by measuring absorbance at 550 nm.

RT-PCR and real time RT-PCR analyses

Total RNA was extracted with RNAeasy (Qiagen) and the samples were treated with DNase I (QIAGEN), according to the manufacturers' instructions. Complementary DNA was synthesized from 1 µg of total RNA, with oligo-dT primers and the IMPROM II reverse transcriptase kit (Promega), according to the manufacturers' instructions. PCR was carried out with 20 ng of cDNA as the template, 10 pmol of primers, 5 mmol/L of MgCl₂, 0.25 mmol/L of dNTPs and 0.6 U Taq polymerase. PCR conditions included initial heating at 95°C for 2 min, followed by 30 or 35 cycles of 94°C for 15 s, annealing at the appropriate temperature for 30 s, and 72°C for 40 s. We subjected 10 µL of PCR products to electrophoresis in a 2% agarose gel. The bands obtained were visualized by ethidium bromide staining and photographed under ultraviolet transillumination.

Quantitative real time PCR was performed as described previously (12). We used SYBR Green master mix (Applied Biosystems) according to the manufacturer's instructions and the ABI PRISM 7000 sequence detection system (Applied Biosystems) in the analyses. PCR conditions included initial heating at 95°C for 10 min, followed by 45 cycles of 95°C for 15 s, annealing at the appropriate temperature for 30 s, and 72°C for 30 s. The melting curves were acquired after PCR to confirm the specificity of the amplified products. A standard curve based on cycle threshold values was used to evaluate gene expression levels. In brief, we used 1:5 dilutions of known concentrations of cDNA in triplicate to generate curves. We generated standard curves for each gene, including the housekeeping gene (GAPDH). Relative gene expression for each sample was normalized by dividing the value obtained for the gene evaluated by that obtained for the housekeeping gene. The primer sets, amplicon size and annealing temperature are listed in Table S1.

Western blotting

Cell extracts were prepared by adding lysis buffer (40 mM Tris-HCl pH 6.8, 1% SDS, 2.5% β-mercaptoethanol, 6% glycerol, 0.005% bromophenol blue) supplemented with protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich) to the cultures. Cells were detached with a cell scraper and heated in the lysis buffer for 10 min at 94°C. Protein content was quantified with the 2-D Quant kit (GE Healthcare) and 10 µg of protein was used in each experiment. Western blot analyses were performed with rabbit polyclonal anti-ach3 antibody (1:2000; Millipore) and rabbit polyclonal anti-actin antibody (1:100). ImageJ software was used for quantitative analyses.

Immunofluorescence

MSCs growing on glass coverslips were fixed by incubation with 4% formaldehyde for 10 min and washed with PBS. The cells were permeabilized by incubation with 0.5% Triton X-100 in PBS for 30 min. They were then blocked with 5% BSA in PBS for 1 h and incubated with the primary antibody, rabbit polyclonal anti-acH3 antibody (1:400; Millipore), diluted in PBS plus 1% BSA, for 1 h at 37°C. The cells were rinsed with PBS and incubated for 1 h at 37°C with the AlexaFluor 546-conjugated goat anti-rabbit secondary antibody (Invitrogen), at a dilution of 1:400. Cell nuclei were stained with DAPI. Images were obtained with a SP5 laser-scanning confocal microscope (Leica).

DNA content

We plated the same number of MSCs on 75cm² culture flasks and treated them with 5azadC for two days. Genomic DNA was extracted with the Qiap DNA mini kit (Qiagen) and its concentration was measured, in triplicate, with a NanoDrop ND-100 Spectrophotometer (Thermo Scientific).

Cell proliferation assay

Cell cultures (at 80% confluence) were treated with 5azadC or TSA for two days and then incubated with 100 µM BrdU (Invitrogen) for 24 h. The cells were detached with trypsin and fixed by incubation with 100% ethanol for 30 min on ice. The cells were collected by centrifugation and resuspended in 100 µL of distilled water. They were then heated for 5 min at 95°C to denature the DNA and rapidly chilled in an ice-water bath. Cells were incubated with an Alexa Fluor 488-conjugated anti-BrdU antibody (Invitrogen) for 30 min at room temperature. Quantitative analyses of BrdU-labeled cells were performed with a FACSCanto II flow cytometer (BD Bioscience) and Flow Jo software.

Statistical analysis

At least three samples from three donors were evaluated for each experiment. Student's *t* test was used for statistical analysis and differences were considered significant if $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**) or $p < 0.001$ (**).

Results

Changes in histone acetylation during adipocyte differentiation

We investigated histone acetylation status during the differentiation of MSCs into adipocytes, by evaluating acH3 levels 1 or 14 days after induction (Figure 1A-J). Control cells cultured for 14 days contained significantly larger amounts of acH3 than

control cells cultured for one day and then induced cells after 14 days in culture (Figure 1B). Histone acetylation was modulated during adipogenesis: although not significant, an increase in acH3 was observed 24 hours after the induction of differentiation, suggesting that chromatin remodeling was induced by this stimulus. Conversely, acH3 levels were significantly lower in differentiated cells (Figure 1B). We also investigated acH3 levels in cells by immunofluorescence techniques. A clear pattern was observed, with chromatin remodeling beginning one day after induction and differentiated cells displaying a staining pattern very different from that of non induced cells on day 14 (Figure 1C-J).

Effect of TSA treatment on adipogenesis and proliferation of MSCs

In order to evaluate the global effect of TSA on histone acetylation, we treated MSC cultures with 5, 50 or 500 nM of TSA for two days and evaluated acH3 levels (Figure 2A and B). A significant increase in acH3 was detected only in BM-MSCs and ADSCs treated with 500 nM (Figure 2C).

We analyzed expression the expression of four genes after TSA treatments, two related and two unrelated to adipogenesis: PPARG, a master regulator of adipogenesis (13), GATA2, an anti-adipogenic gene (13), BMP4, involved in osteoblast differentiation (14) , and desmin, a muscle-specific marker (15). BM-MSCs and ADSCs had distinct profiles of gene expression. TSA treatment increased BMP4 and PPARG expression in BM-MSCs and ADSCs, although GATA2 did not change; desmin transcript level was increased in BM-MSCs and decreased in ADSCs (Figure 3A and B). Thus, TSA has distinct effects in BM-MSCs and ADSCs gene expression.

We investigated the effects of TSA in adipocyte differentiation, by treating MSCs with 5, 50 or 500 nM TSA for two days before the initiation of differentiation.

We analyzed differentiation and found that, with the exception of the 5 nM treatment, TSA significantly reduced adipogenesis in BM-MSCs, and all treatments decreased adipogenesis in ADSCs (Figure 4A and B; Supplemental Material, Figure S3). In addition, we investigated the expression of PPARG and FABP4 - adipocyte gene expressed during terminal differentiation (16) - after TSA treatment and differentiation (Figure 4C and D). The treatment of BMSCs with 5 nM TSA did not significantly modify differentiation or adipogenic gene expression, but PPARG expression levels were found to have increased in four of the five samples. BM-MSCs seemed to be more resistant to the effects of treatment, as the 50 nM treatment significantly

decreased gene expression only in ADSCs. Nevertheless, 500 nM TSA treatment had a negative effect in both BM-MSCs and ADSCs. The expression of GATA2 was also analyzed in uninduced and induced cultures after 14 days (Figure 4E and F). We found no clear correlation between GATA2 expression and adipocyte differentiation, or between the levels of expression of GATA2, PPARG and FABP4. We investigated whether the treatments interfered with proliferation. Analyses 24 h after inhibitor removal showed that 500 nM treatment decreased the cell proliferation rate by a factor of 10, whereas treatment with 5 or 50 nM had no significant effect (Figure 4G). The effect of TSA on differentiation was dose-dependent, whereas that on cell proliferation was not.

Effect of 5azadC treatment on adipogenesis and proliferation of MSCs

We investigated the effects of 5azadC on adipogenesis, by evaluating cultures treated with 1, 10 or 100 μ M of 5azadC for two days before induction. In order to assure the effect of 5azadC on the cells we evaluated the overall levels of methylcytosine and the transcript levels of TP73, a gene that is not expressed in BM-MSCs and its expression is reactivated by 5azadC (17). Methylcytosine was reduced in a global manner with the drug treatments and TP73 was expressed in treated cultures in a dose dependent manner (Supplemental Material, Figure S4A and B; Supplemental Materials and Methods).

After two days of the treatment with 5azadC, PPARG expression was increased while GATA2 did not change in both BM-MSCs and ADSCs. Desmin expression was increased only in BM-MSCs while BMP4 was increased only in ADSCs (Figure 5A and B). After analyzing the expression of genes related and not related to adipogenesis in response to 5azadC treatment, we carried out assays to determine the effects of the drug on adipocyte differentiation. Adipogenesis was significantly decreased in both BM-MSCs and ADSCs (Figure 6A and B; Supplemental Material, Figure S3B). Furthermore, PPARG expression was significantly decreased by all the concentrations tested in the induced cultures. FABP4 expression was also decreased by treatment, significantly for concentrations of 10 and 100 μ M 5azadC (Figure 6C and D). GATA2 expression was found to have increased in non induced cultures treated with 5azadC (Figure 6E) and in induced cultures (Figure 6F) after 14 days. Not all the differences were statistically significant, but a fold-change increase with treatment was noted for all the samples evaluated (Figure 6E and F, tables). An inverse correlation between the expression levels of the adipogenic genes and those

of GATA2 was confirmed. Overall, ADSCs were more strongly affected by treatment than BM-MSCs: the decrease in adipogenesis, the downregulation of PPARG and FABP4 and the upregulation of GATA2 were more intense in ADSC cultures than in BM-MSCs.

We determined the DNA content of cultures treated with 5azadC for two days, but no significant difference was found (Figure 4G). Analyses 24 h after inhibitor removal showed that cell proliferation rates fell by about 40 to 50% in MSCs treated for two days with any concentration of 5azadC (Figure 4H). The effect of 5azadC on cell proliferation, like that on differentiation, was dose-dependent.

Discussion

Cell differentiation involves epigenetic modifications of the cellular genome (18, 19). We therefore investigated the effect of various concentrations of the epigenetic modifiers TSA and 5azadC on the differentiation of MSCs isolated from two distinct sources into adipocytes.

We observed changes in acH3 during adipogenesis, with a global increase just after the start of induction, and a significant global reduction in differentiated cells.

Embryonic stem cells (ESCs) display high levels of acH3 and acH4 (20).

Interestingly, a slight increase in acH4 level in ESCs was reported 24 hours after the onset of differentiation in a previous study (21). According to the authors, concurrent increases in acH4 and 3meH3K9 levels very early in differentiation suggest that heterochromatin is formed, with a transient increase in the transcriptional potential of euchromatin, allowing simultaneous activation and repression to occur in different parts of the genome, according to the needs of the cell for differentiation.

An overall decrease in acetylation has been observed in differentiated cells, but histone acetylation of the promoters of adipogenic genes increases during adipocyte differentiation, and this increase is correlated with an increase in the expression of these genes (22). The effect of HDAC inhibitors on gene expression involves changes in the transcription of only a specific subset of genes (1-10%) (5-7). Thus, although the acetylation of a subset of genes associated with adipogenesis occurs in MSCs undergoing adipogenesis, most of the other genes probably remaining deacetylated.

MSCs express small amounts of adipogenic factors in addition to osteogenic factors. Factors of one lineage repress factors of the other lineages, thereby maintaining the

undifferentiated state. Under appropriate conditions the balance is tipped leading to a cascade that promotes one cell fate while repressing other possible fates (13).

We found that PPAR γ and BMP4 were upregulated after TSA treatment. As adipocyte differentiation was decreased, we supposed that osteogenesis is favored. Accordingly, the treatment of 3T3-L1 cells with TSA during differentiation led to a decrease in adipogenesis (8, 23). MSCs from adipose tissue or umbilical cord blood treated with the HDAC inhibitors valproic acid and sodium butyrate had decreased the efficiency of adipogenic, chondrogenic, and neurogenic differentiation, while osteogenic differentiation was augmented (24). Conversely, the treatment of BM-MSC cultures with TSA before the induction favored chondrogenesis, but not osteogenesis (25).

We observed that desmin was increased in BM-MSCs and decreased in ADSCs after the TSA treatment. As TSA enhances myogenesis in C2C12 cells (26), we suppose that myogenesis could be favored in BM-MSCs instead of adipogenesis.

We found that adipogenesis in both ADSCs and BM-MSCs, with the exception of the 5 nM treatment, was decreased by the treatments. BM-MSCs differentiate more efficiently in bone and cartilage, whereas ADSCs differentiate better into adipocytes (2). Therefore, the epigenome is different between MSCs, and could explain the distinct gene expression and the more pronounced effect on adipocyte differentiation in ADSCs than in BM-MSCs resulting from TSA treatment. We can conclude from our findings and those of previous studies investigating the effect of HDAC inhibitors on the differentiation that the action of TSA and others HDAC inhibitors is dependent on the concentration used, cell type and the cell differentiation model evaluated.

Only treatment with 500 nM TSA significantly increased the amount of acH3 detectable by western blotting, but this concentration had a negative effect on cell proliferation. Treatments with 5 or 50 nM TSA had no major effect on acH3 levels or cell proliferation. Nevertheless, prior treatment with TSA in all the conditions tested resulted in a decrease in adipogenesis, regardless of the effect on proliferation. The decrease in adipogenesis was not accompanied by a significant downregulation of adipogenic gene expression in all treatments, but there may have been an upregulation of anti-adipogenic genes, such as GATA2. However, we found no evidence of a response involving the regulation of GATA2 by TSA, although other anti-adipogenic genes have yet to be investigated.

It should be stressed that HDACs also deacetylate several non histone proteins, including some with regulatory roles in cell proliferation, cell migration and cell death (7). These factors may be the primary targets of HDACs, because HDACs evolved before histones (27). GATA2 protein has multiple acetylation sites, which increase its DNA-binding activity, providing control points for regulation (28). GATA2 is present as an acetylated protein in precursor cells (29, 30). As GATA2 is a nuclear target for HDAC3-mediated repression (31), the treatment of cells with TSA should increase the protein activity, inhibiting adipogenesis because GATA2 inhibits the transcription of PPARG and CEBPA (13). Although we observed that GATA2 transcript level did not change after TSA treatments, the protein level and/or activity could have been increased. Thus, the treatment of cells with agents such as TSA that inhibit HDAC and affect regulatory elements other than histones results in both epigenetic and non epigenetic effects.

The demethylation of promoter region DNA by 5azadC can lead to gene activation and expression. Like TSA, 5azadC causes the general, nonspecific demethylation of DNA, and this process may affect multiple regulatory pathways (32). However, for unknown reasons, not all genes are affected by 5azadC. Only about 1% of transcripts were found to be differentially expressed in a cell line treated with 5azadC (33).

We found that 5azadC treatment increased PPARG immediately following the treatments. Although higher levels of GATA2 were observed in cord blood cell cultures treated concomitantly with 5azadC and TSA (34) we do not observe evident change in GATA2 expression following the treatments.

Adipogenic differentiation was decreased in a dose-dependent manner concomitantly with the downregulation of PPARG and FABP4 expression, and the upregulation of GATA2 in induced cultures. An inverse relationship was observed between the strength of expression of adipogenic genes and that of GATA2. The treatment of cultures with 5azadC only increased the expression of GATA2 after 14 days of induced differentiation.

The treatment of 3T3-L1 cells with inhibitors of DNA methylation decreases adipocyte differentiation, but the magnitude of the effect depends on exposure time and drug concentration. Treatment in early stages of differentiation has a stronger effect than treatments at later stages or continuous treatments (35, 36). In addition, the treatment of BM-MSC cultures with 5azadC before induction stimulated osteogenesis

(25). The balanced differentiation of MSCs in the bone marrow into adipocytes or osteoblasts is controlled in a competitive manner, with mechanisms promoting one cell fate actively suppressing mechanisms inducing the other lineage (37). Thus, osteogenesis is favored over adipogenesis in BM-MSCs treated with 5azadC. In agreement, 5azadC treatment upregulated BMP4 in ADSCs, although no evident increase was observed in BM-MSCs. The demethylating agent 5-azacytidine promotes myogenic differentiation of C2C12 cells (38) (15). As desmin was increased in treated BM-MSCs, we suggest that myogenesis is favored with the treatment. DNA content did not change significantly during the two days of treatment with 5azadC, but cell proliferation rates were lower when differentiation was induced. Significant inhibition of DNA synthesis due to a lack of repair of Dnmt1 linked to the incorporation of 5azadC into DNA does not occur for at least two cell cycles (39). It is therefore reasonable to assume that no early difference in DNA content has been identified. The decrease in the proliferation of treated cultures may be an important factor in the observed decrease in adipogenesis, as it was found to be proportional: higher concentrations of 5azadC resulted in greater inhibition of adipogenesis and stronger negative effects on cell proliferation.

We showed in this study that TSA and 5azadC treatments influence adipogenic differentiation of MSCs. We cannot rule out an indirect mechanism. The effects on differentiation should be taken carefully, because the whole epigenome is being affected. Our observations could be a cascade of indirect effects.

ADSCs were more sensitive to the treatments than BM-MSCs, probably related to epigenetic memory, that is dependent on their origin. The epigenetic landscape of any cell is likely to be a sensitive indicator of its past and current developmental state and may predict its future potential (40). It is therefore important to investigate differences and similarities between same cell types from distinct sources.

Author contributions

JZ and AC conceived and designed the experiments, analyzed and interpreted the results; JZ performed the experiments; MAS assisted with BrdU experiments and confocal images; ACS and PRSB obtained and supplied MSC samples; JZ wrote the manuscript; AC, MAS, ACS, BD and SG reviewed the manuscript.

Acknowledgments

We would like to thank Criscielle Kuligovski, Lidiane Maria Boldrini, Maurilio José Soares, Stenio Perdigão Fragoso, Patrícia Shigunov, Ana Carolina Origa, Axel Cofré,

Ana Paula Abud, Alessandra Aguiar and Andressa Schittini for technical assistance and scientific advice.

References

1. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006; 8: 315-322.
2. Liu TM, Martina M, Hutmacher DW, Hui JH, Lee EH, Lim B. Identification of common pathways mediating differentiation of bone marrow- and adipose tissue-derived human mesenchymal stem cells into three mesenchymal lineages. *Stem Cells* 2007; 25: 750-760.
3. Meshorer E, Misteli T. Chromatin in pluripotent embryonic stem cells and differentiation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006; 7: 540-546.
4. Kouzarides T. Chromatin modifications and their function. *Cell* 2007; 128: 693-1398.
5. de Ruijter A, van Gennip A, Caron H, Kemp S, van Kuilenburg A. Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. *Biochem J* 2003; 370: 737-786.
6. Taddei A, Roche D, Bickmore WA, Almouzni G. The effects of histone deacetylase inhibitors on heterochromatin: implications for anticancer therapy? *EMBO Rep* 2005; 6: 520-524.
7. Dokmanovic M, Clarke C, Marks P. Histone deacetylase inhibitors: overview and perspectives. *Mol Cancer Res* 2007; 5: 981-990.
8. Kim SN, Choi HY, Kim YK. Regulation of adipocyte differentiation by histone deacetylase inhibitors. *Arch Pharm Res* 2009; 32: 535-541.
9. Jones P, Takai D. The role of DNA methylation in mammalian epigenetics. *Science* 2001; 293: 1068-1138.
10. Christman J. 5-Azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine as inhibitors of DNA methylation: mechanistic studies and their implications for cancer therapy. *Oncogene* 2002; 21: 5483-5578.
11. Kim K, Zhao R, Doi A, Ng K, Unternaehrer J, Cahan P, et al. Donor cell type can influence the epigenome and differentiation potential of human induced pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol* 2011; 29: 1117-1119.

12. Rebelatto CK, Aguiar AM, Moretao MP, Senegaglia AC, Hansen P, Barchiki F, et al. Dissimilar differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, and adipose tissue. *Exp Biol Med (Maywood)* 2008; 233: 901-913.
13. Rosen E, MacDougald O. Adipocyte differentiation from the inside out. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006; 7: 885-981.
14. Chen G, Deng C, Li YP. TGF- β and BMP signaling in osteoblast differentiation and bone formation. *Int J Biol Sci* 2012; 8: 272-288.
15. Feng SW, Chen F, Cao J, Yu MJ, Liang YY, Song XM, et al. Restoration of muscle fibers and satellite cells after isogenic MSC transplantation with microdystrophin gene delivery. *Biochem Biophys Res Commun* 2012; 419: 1-6.
16. Cristancho AG, Lazar MA. Forming functional fat: a growing understanding of adipocyte differentiation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2011; 12: 722-734.
17. Liang W, Xia H, Li J, Zhao RC. 5-Aza-2'-deoxycytidine increases the sensitivity of human bone marrow mesenchymal stem cells to chemotherapeutic agents by demethylation of p73. *J Pediatr Hematol Oncol* 2012; 34: 108-115.
18. Arney K, Fisher A. Epigenetic aspects of differentiation. *J Cell Sci* 2004; 117: 4355-4418.
19. Wu H, Sun YE. Epigenetic regulation of stem cell differentiation. *Pediatr Res* 2006; 59: 21R-25R.
20. Mattout A, Meshorer E. Chromatin plasticity and genome organization in pluripotent embryonic stem cells. *Curr Opin Cell Biol* 2010; 22: 334-341.
21. Meshorer E, Yellajoshula D, George E, Scambler PJ, Brown DT, Misteli T. Hyperdynamic plasticity of chromatin proteins in pluripotent embryonic stem cells. *Dev Cell* 2006; 10: 105-116.
22. Yoo E, Chung J-J, Choe S, Kim K, Kim J. Down-regulation of histone deacetylases stimulates adipocyte differentiation. *J Biol Chem* 2006; 281: 6608-6623.
23. Lagace DC, Nachtigal MW. Inhibition of histone deacetylase activity by valproic acid blocks adipogenesis. *J Biol Chem* 2004; 279: 18851-18860.
24. Lee S, Park JR, Seo MS, Roh KH, Park SB, Hwang JW, et al. Histone deacetylase inhibitors decrease proliferation potential and multilineage differentiation capability of human mesenchymal stem cells. *Cell Prolif* 2009; 42: 711-720.

25. El-Serafi A, Oreffo R, Roach H. Epigenetic modifiers influence lineage commitment of human bone marrow stromal cells: Differential effects of 5-azadeoxycytidine and trichostatin A. *Differentiation* 2011; 81: 35-76.
26. Hagiwara H, Saito F, Masaki T, Ikeda M, Ohkuma AN, Shimizu T, et al. Histone deacetylase inhibitor trichostatin A enhances myogenesis by coordinating muscle regulatory factors and myogenic repressors. *Biochem Biophys Res Commun* 2011; 414: 826-831.
27. Gregoretz IV, Lee YM, Goodson HV. Molecular evolution of the histone deacetylase family: functional implications of phylogenetic analysis. *J Mol Biol* 2004; 338: 17-31.
28. Hayakawa F. Functional regulation of GATA-2 by acetylation. *J Leukoc Biol* 2003; 75: 529-540.
29. Orlic D, Anderson S, Biesecker L, Sorrentino B, Bodine D. Pluripotent hematopoietic stem cells contain high levels of mRNA for c-kit, GATA-2, p45 NF-E2, and c-myb and low levels or no mRNA for c-fms and the receptors for granulocyte colony-stimulating factor and interleukins 5 and 7. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 4601-4606.
30. Tong Q. Function of GATA transcription factors in preadipocyte-adipocyte transition. *Science* 2000; 290: 134-138.
31. Ozawa Y. Histone deacetylase 3 associates with and represses the transcription factor GATA-2. *Blood* 2001; 98.
32. Komashko VM, Farnham PJ. 5-azacytidine treatment reorganizes genomic histone modification patterns. *Epigenetics* 2010; 5.
33. Menendez L, Walker D, Matyunina LV, Dickerson EB, Bowen NJ, Polavarapu N, et al. Identification of candidate methylation-responsive genes in ovarian cancer. *Mol Cancer* 2007; 6: 10.
34. Araki H, Yoshinaga K, Boccuni P, Zhao Y, Hoffman R, Mahmud N. Chromatin-modifying agents permit human hematopoietic stem cells to undergo multiple cell divisions while retaining their repopulating potential. *Blood* 2007; 109: 3570-3578.
35. Sakamoto H, Kogo Y, Ohgane J, Hattori N, Yagi S, Tanaka S, et al. Sequential changes in genome-wide DNA methylation status during adipocyte differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 366: 360-366.

36. Guo W, Zhang K-M, Tu K, Li Y-X, Zhu L, Xiao H-S, et al. Adipogenesis licensing and execution are disparately linked to cell proliferation. *Cell Res* 2009; 19: 216-239.
37. Muruganandan S, Roman A, Sinal C. Adipocyte differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells: cross talk with the osteoblastogenic program. *Cell Mol Life Sci* 2009; 66: 236-289.
38. Hupkes M, Jonsson M, Scheenen W, van Rotterdam W, Sotoca A, van Someren E, et al. Epigenetics: DNA demethylation promotes skeletal myotube maturation. *FASEB J* 2011; 25: 3861-3872.
39. Davidson S, Crowther P, Radley J, Woodcock D. Cytotoxicity of 5-aza-2'-deoxycytidine in a mammalian cell system. *Eur J Cancer* 1992; 28: 362-370.
40. Meissner A. Epigenetic modifications in pluripotent and differentiated cells. *Nat Biotechnol* 2010; 28: 1079-1167.

Figure legends

Figure 1. Analysis of histone acetylation during the differentiation of MSCs into adipocytes. (A) Western blot analyses showing changes in acH3 levels after 1 and 14 days of control culture conditions (CTL) or adipocyte differentiation induction (IND); an actin probe was used as a loading control. (B) Quantitative analyses of relative acH3 levels. Data are expressed as means \pm SD. Asterisks just above standard deviation bars show the statistical significance of the difference with respect to control cultures after 1 day. (*) $p < 0.05$. (c-j) Immunofluorescence images of BM-MSCs (C-F) and ADSCs (G-J), showing acH3 staining (red) after 1 and 14 days of induction or non induction. Minor boxes show merged images of DIC and nuclei counterstained with DAPI.

Figure 2. Analysis of histone acetylation in MSCs after two days of treatment with TSA. (A-B) Western blot analysis of acH3 levels in cultured BM-MSCs (A) and ADSCs (B); an actin probe was used as a loading control. (C) Quantitative analysis of relative levels of acH3 in cultured BM-MSCs and ADSCs. Data are expressed as means \pm SD. Asterisks just above the standard deviation bars indicate a statistically significant difference with respect to untreated cultures of BM-MSCs or ADSCs. (*) $p < 0.05$; (**) $p < 0.01$.

Figure 3. Effect of TSA treatment on gene expression in MSCs. PPARG, GATA2 and BMP4 were analyzed by RT-PCR after two days of treatment. GAPDH was used as control.

Figure 4. Effect of treatment with TSA on differentiation and proliferation of MSCs.

(A) The effect of TSA on the adipogenic differentiation of BM-MSCs and ADSCs observed in cell cultures after staining with Oil Red O. (B) Relative quantification of adipocyte differentiation. (C) PPARG and (D) FABP4 expression in the cultures after 14 days of adipocyte differentiation. GATA2 expression in non-induced (E) or induced (F) cultures treated with TSA. (G) Cell proliferation analysis after treatment with TSA. Data are expressed as means \pm SD. Asterisks just above the standard deviation bars indicate statistically significant differences with respect to untreated cultures of BM-MSCs or ADSCs. (*) $p < 0.05$; (**) $p < 0.01$; (***) $p < 0.001$.

Figure 5. Effect of 5azadC treatment on gene expression in MSCs. PPARG, GATA2 and BMP4 were analyzed by RT-PCR after two days of treatment. GAPDH was used as control.

Figure 6. Effect of treatment with 5azadC on differentiation and proliferation of MSCs. (A) The effect of 5azadC on the adipogenic differentiation of BM-MSCs and ADSCs cultures observed after staining with Oil Red O. (B) Relative quantification of adipocyte differentiation. (C) PPARG and (D) FABP4 expression in the cultures after 14 days of adipocyte differentiation. GATA2 expression in non-induced (E) or induced (F) cultures treated with 5azadC. (G) DNA content was not modified by two days of 5azadC treatment. (H) Cell proliferation analysis after treatment with 5azadC. Data are expressed as means \pm SD. Asterisks just above standard deviation bars indicate statistically significant differences with respect to untreated cultures of BM-MSCs or ADSCs. (*) $p < 0.05$; (**) $p < 0.01$; (***) $p < 0.001$.

Figure S1. Cytotoxicity analysis of BM-MSCs, ADSCs and HeLa cells treated with TSA (A) and 5azadC (B) for two days by MTT assay. BM-MSCs and ADSCs are more resistant than HeLa cells to 5azadC and TSA effects. 500 nM TSA treatment decreased the proliferation of BM-MSCs, while the same treatment resulted in death of HeLa cells. In addition, 10 μ M and 100 μ M 5azadC treatments significantly reduced proliferation of HeLa when compared to untreated cultures, nevertheless, no significantly effect was observed in MSCs. Data are expressed as means and asterisks indicate statistically significant differences with respect to untreated cultures. (*) $p < 0.05$; (**) $p < 0.01$.

Figure S2. Timing of treatments and adipocyte induction.

Figure S3. DIC images obtained from BM-MSCs and ADSCs cultures treated with 5azadC for two days and induced or non-induced to adipogenesis for 14 days after staining with Oil Red O. Bar = 100 μ m.

Figure S4. DIC images obtained from BM-MSCs and ADSCs cultures treated with TSA for two days and induced or non-induced to adipogenesis for 14 days after staining with Oil Red O. Bar = 100 μ m.

Figure S5. Global and specific effects of 5azadC on DNA demethylation. (A) BM-MSCs were treated with 5azadC for two days and methylcytosine was evaluated by slot blot immunoassay, as described in Supplemental Materials and Methods. (B) TP73 was expressed in a dose-dependent manner with 5azadC treatments as evaluated by RT-PCR.

Table S1. Primer sets used for RT-PCR and quantitative RT-PCR analyses.

Supplemental Materials and Methods

Cytotoxicity analysis

We evaluated cytotoxicity of 5azadC and TSA by MTT assay. MSCs and HeLa cells (ATCC CCL2) were seeded on 96-wells flatten bottom plates. After the cultures achieved 80% confluence, they were treated with 5azadC or TSA (both from Sigma) for two days. After removing the medium and replace it with 100 μ L of fresh medium, cells were incubated with 10 μ L of a 12 mM MTT (Sigma) solution for 4 hours at 37°C. The resulting formazan was solubilized with 100 μ L of DMSO. After mixing for 10 min, absorbance was measured at 550 nm using Synergy H1 Hybrid Multi-Mode microplate reader (Biotek).

Slot blot immunoassay

We plated same number of MSCs on 75 cm² culture flasks and treated them with 5azadC for two days. Cells were collected and genomic DNA was extracted with the Qiamp DNA mini kit (Qiagen), according to the manufactures' instructions. DNA concentration was measured, in triplicate, with a NanoDrop ND-100 Spectrophotometer (Thermo Scientific). 1 μ g of DNA samples was denatured with the addition of 0.1 volume of 3 M NaOH and incubated for 1 h at 60°C. After cooling, 1 volume of 6X SSC was added to samples. The mixture containing DNA was transferred to nitrocellulose membrane Hybond-ECL (GE Healthcare) by vacuum with the Minifold II Slot Dot System (Schleicher & Schuell). DNA was immobilized by

baking at 80°C for 1 h. Membrane was blocked with 5% BSA in TBST for 1 h and incubated with mouse monoclonal anti-methylcytosine antibody (1:1000; Abcam), diluted in TBST plus 1% BSA, for 3 h at room temperature. The membrane was rinsed three times with TBST and incubated for 1 h at room temperature with the peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgM secondary antibody (1:2000; Sigma). Again, the membrane was washed three times with TBST and the blot was processed using the detection reagents supplied in the chemiluminescence kit Novex ECL HRP (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions.

Table S1

Primer sets used for RT-PCR and quantitative RT-PCR analyses

Official Symbol	Sequence (5' - 3')	Size (bp)	Annealing (°C)	Reference
BMP4	Forward: ACTTCGAGGCGACACTTCTG Reverse: TCCAGATGTTCTTCGTGGTGG	214	60	
DES	Forward: CCAACAAGAACAACGACG Reverse: TGGTATGGACCTCAGAACC	408	60	
FABP4	Forward: ATGGGATGGAAAATCAACCA Reverse: GTGGAAGTGACGCCTTTCAT	97	60	(1)
GAPDH	Forward: GGCGATGCTGGCGCTGAGTAC Reverse: TGGTTCACACCCATGACGA	150	60	(1)
GATA2	Forward: ATGGGATGGAAAATCAACCA Reverse: GTGGAAGTGACGCCTTTCAT	295	65	
PPARG*	Forward: ATTACAGCAAACCCCTATTCC Reverse: GGCATCTCTGTGTCAACCAT	139	60	
TP73	Forward: GCTGATGAGGACCACTACCG Reverse: CTCGCACCTGAAGGTAGTACG	172	60	

BMP4, bone morphogenetic protein 4; DES, desmin; PPARG, peroxisome proliferator-activated nuclear receptor gamma; FABP4, fatty acid binding protein 4; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; GATA2, GATA binding protein 2; TP73, tumor protein p73.

* Primers amplify only transcript variant 2.

Reference:

1. Rebelatto CK, Aguiar AM, Moretao MP, Senegaglia AC, Hansen P, Barchiki F, et al. Dissimilar differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, and adipose tissue. *Exp Biol Med (Maywood)* 2008; 233: 901-913.

Figure 1

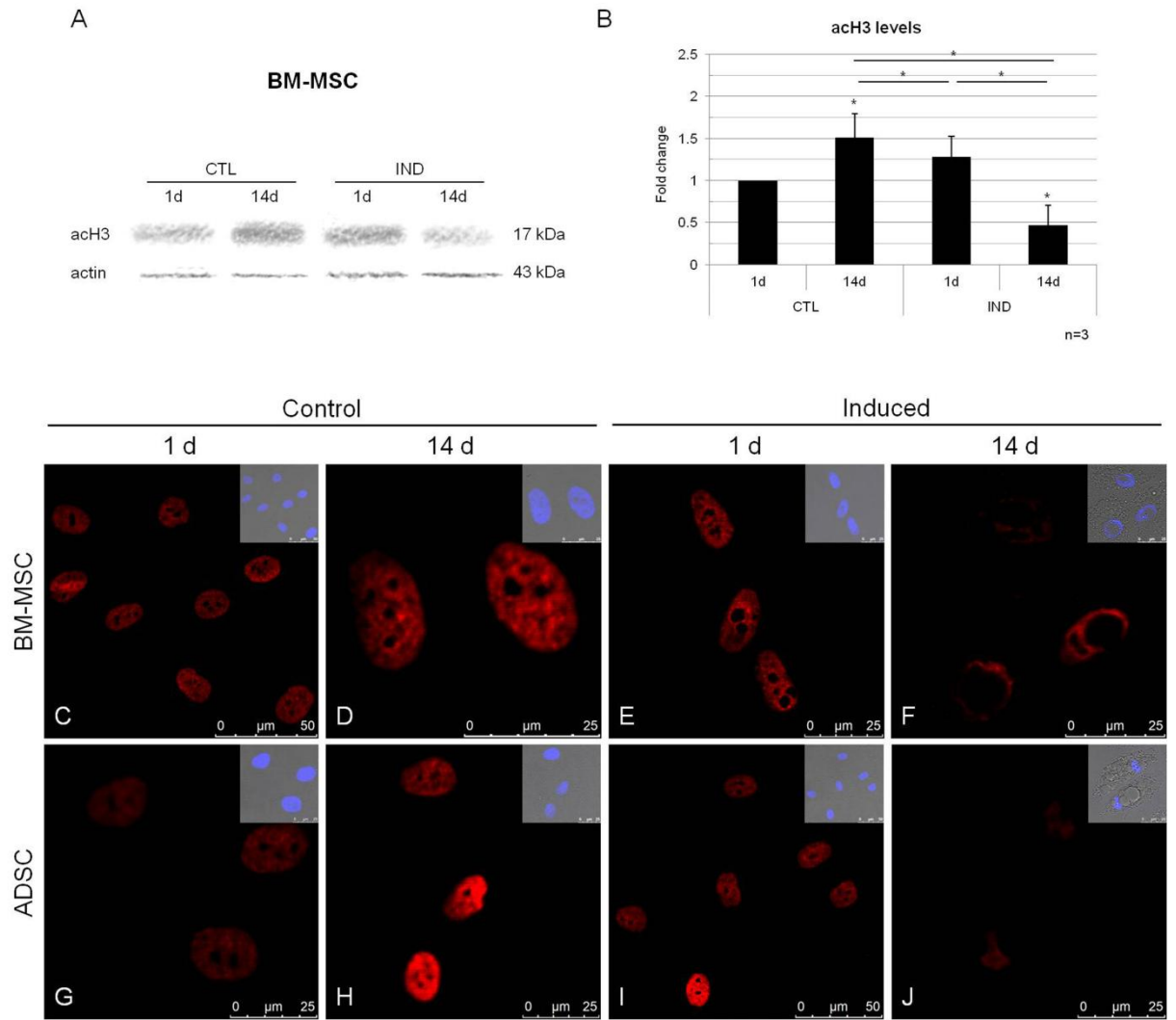


Figure 2

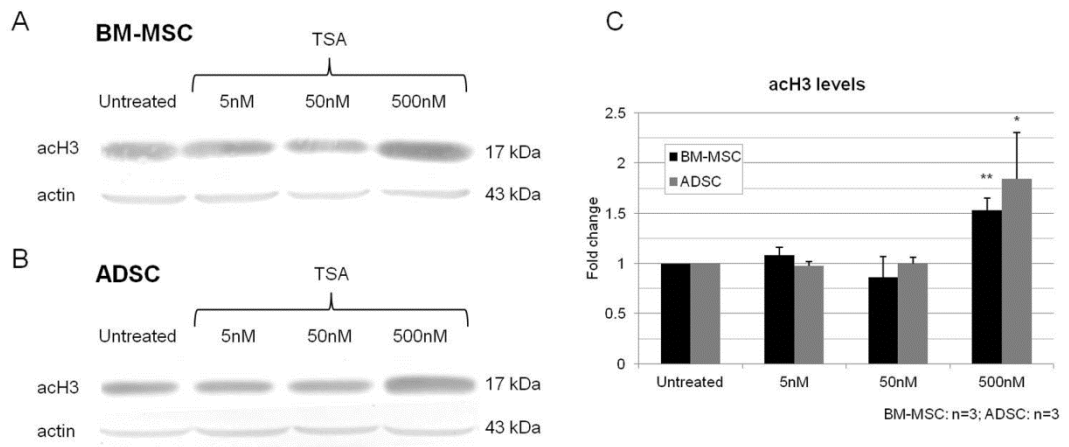


Figure 3

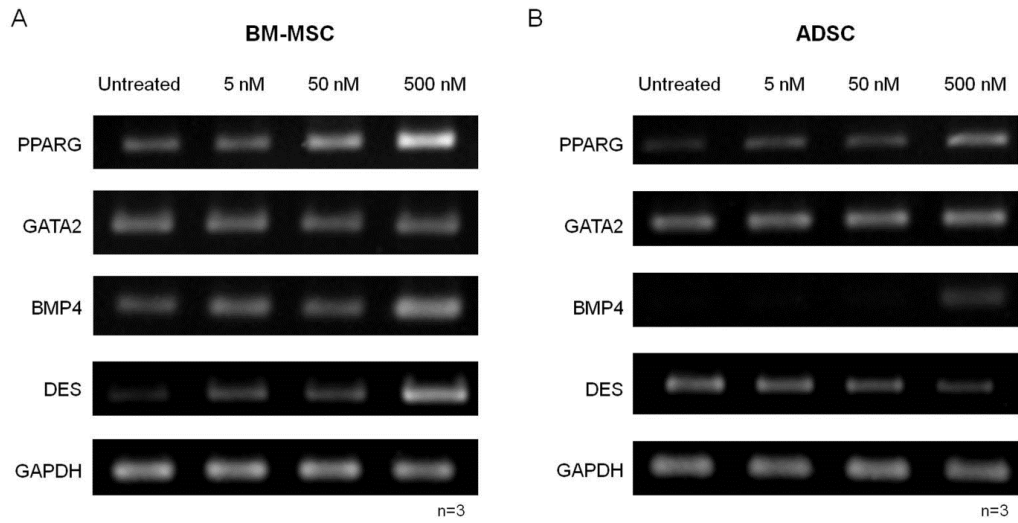


Figure 4

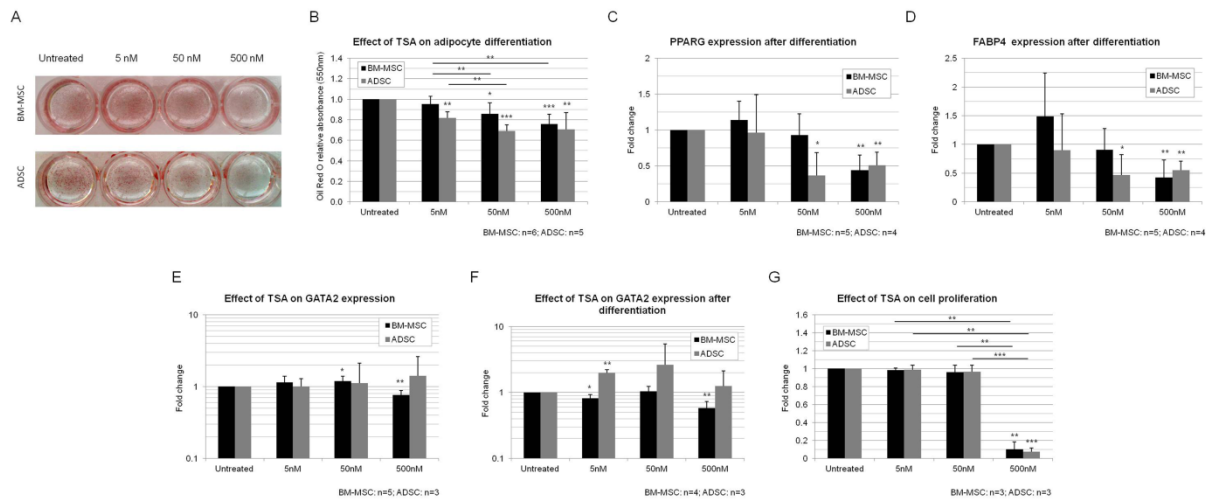


Figure 5

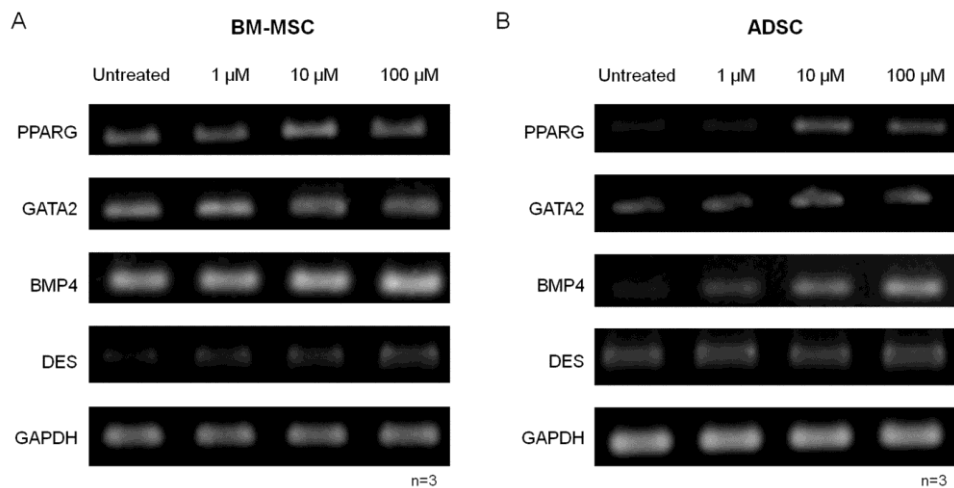


Figure 6

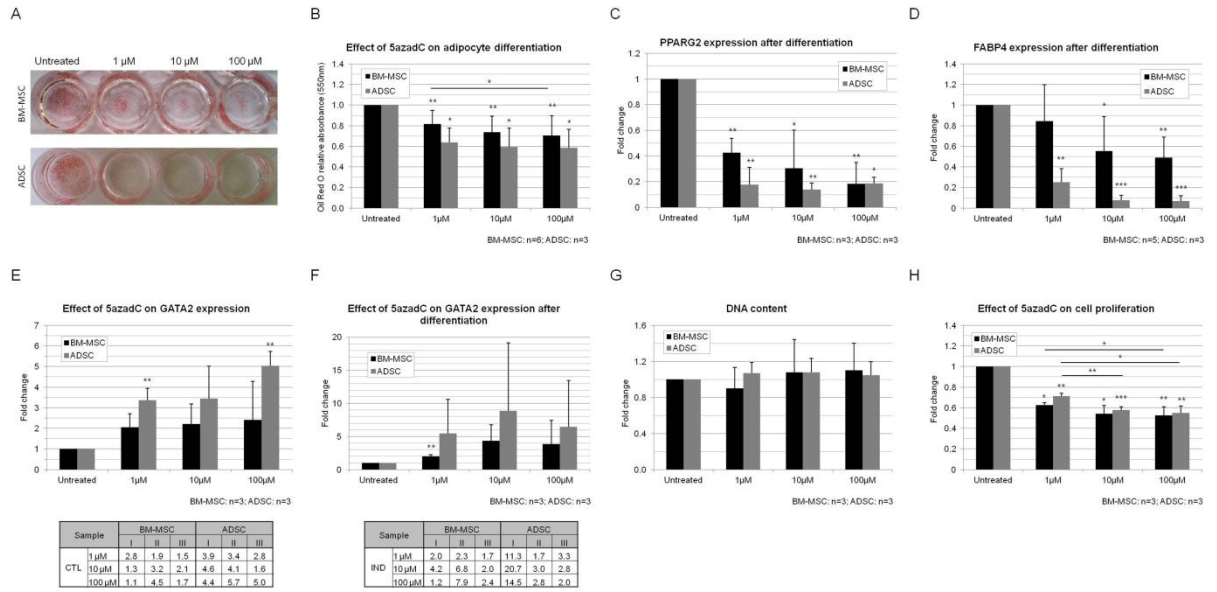


Figure S1

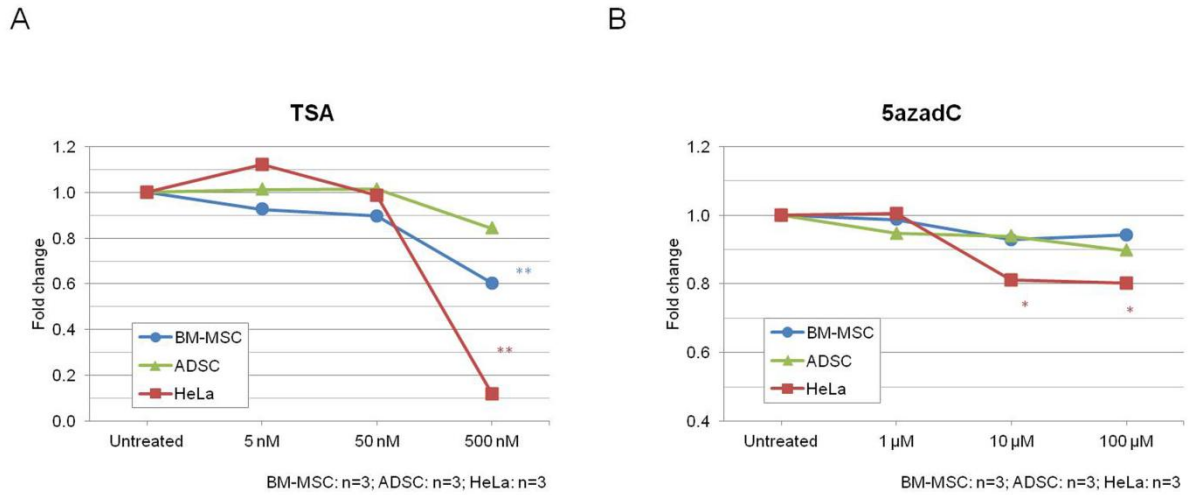


Figure S2

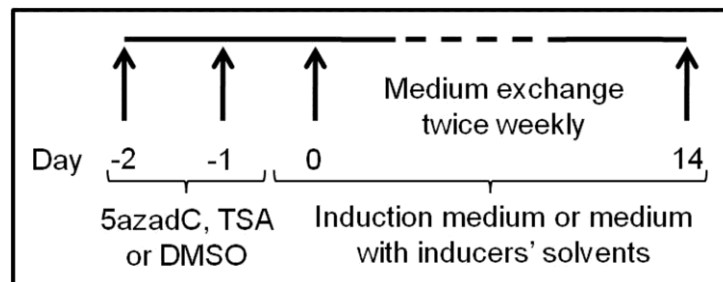


Figure S3

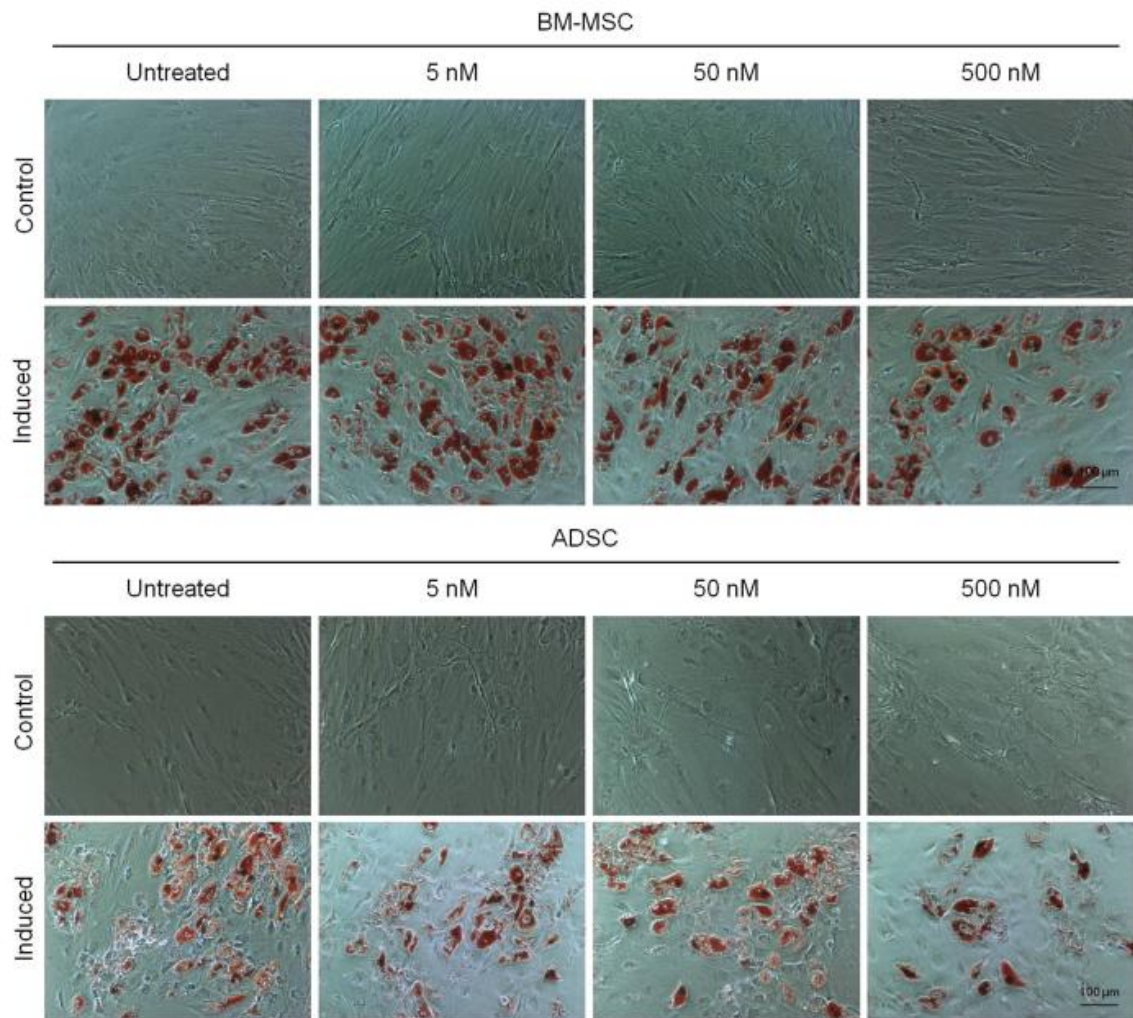


Figure S4

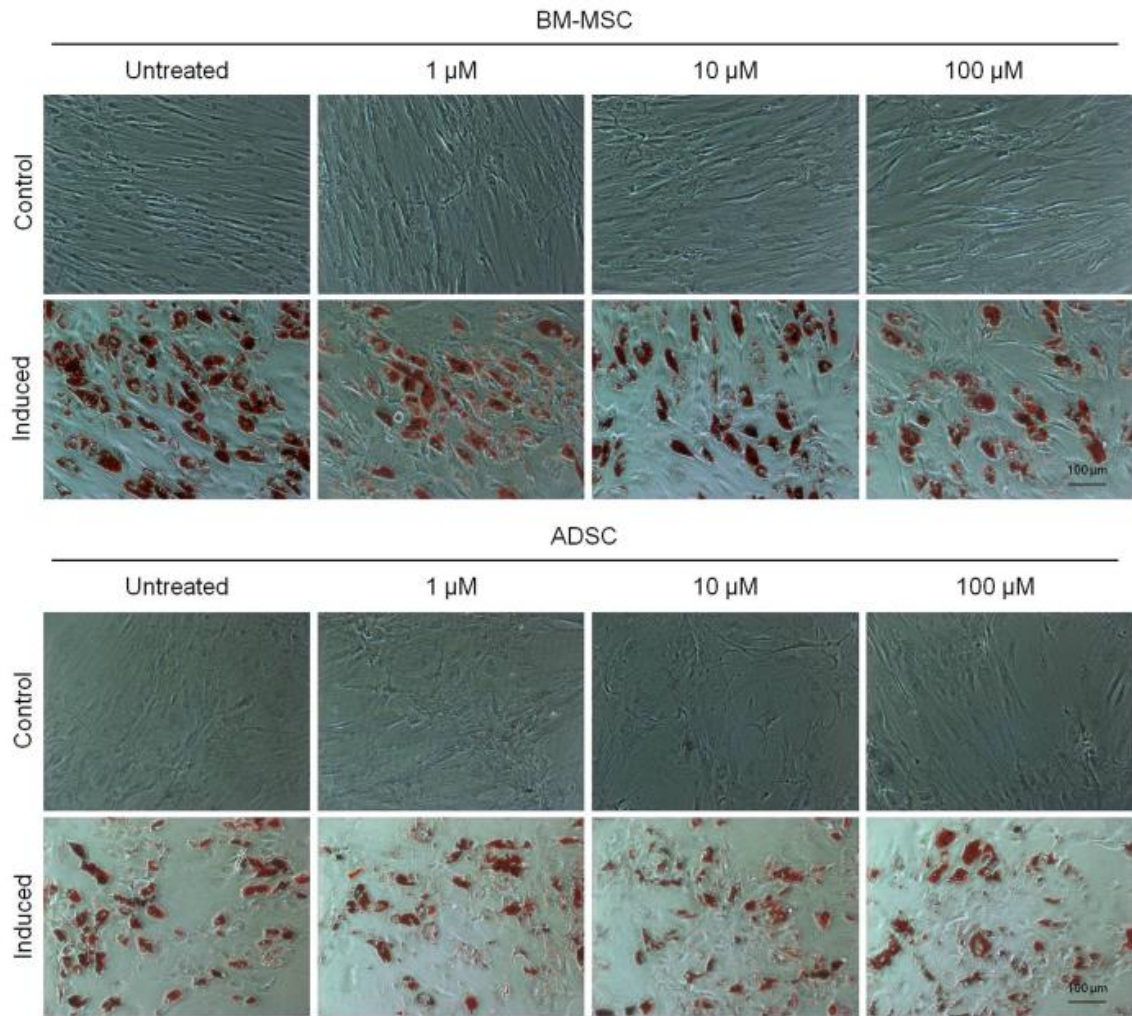


Figure S5

