UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM GENÉTICA

AMANDA CRISTINA CORVELONI

Mecanismos moleculares envolvidos na transição entre o
estado *primed* e *naïve* de células-tronco embrionárias

Ribeirão Preto

2020

AMANDA CRISTINA CORVELONI

Mecanismos moleculares envolvidos na transição entre o estado *primed* e *naïve* de células-tronco embrionárias

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Genética

Orientador: Rodrigo Alexandre Panepucci

Ribeirão Preto

2020

AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Corveloni, Amanda Cristina

Mecanismos moleculares envolvidos na transição entre o estado *primed* e *naïve* de células-tronco embrionárias. Ribeirão Preto, 2020.

93 p. : il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Genética.

Orientador: Panepucci, Rodrigo Alexandre.

1. Células-Tronco. 2. Pluripotência. 3. Notch 4. *Naïve*. 5. *Primed*.

Apoio e suporte financeiro:

Este trabalho foi realizado com o apoio financeiro das seguintes instituições:

- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP
(Processo No: 2017/15929-6)
- Conselho Nacional de Pesquisas (CNPq)
- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)
- Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – FMRP/USP
- Hemocentro de Ribeirão Preto

FOLHA DE APROVAÇÃO

Amanda Cristina Corveloni.

Mecanismos moleculares envolvidos na transição entre o estado *primed* e *naïve* de células-tronco embrionárias.

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Genética

Aprovado em ____/____/____

Banca examinadora

Prof. Dr. Rodrigo Alexandre Panepucci

Instituição _____

Assinatura _____

Prof. Dr(a) _____

Instituição _____

Assinatura _____

Prof. Dr(a) _____

Instituição _____

Assinatura _____

Prof. Dr. _____

Instituição _____

Assinatura _____

Dedico este trabalho à minha família

e a todos que contribuíram com a minha formação.

AGRADECIMENTOS

Agradeço inicialmente ao meu orientador Prof. Dr. Rodrigo Alexandre Panepucci, por ter me recebido no laboratório de Biologia Funcional, por todo tempo e atenção dedicados, e por todas as oportunidades que me proporcionou. Agradeço a todos os meus colegas de laboratório, em especial à Josiane Schiavinato, Ildercilio Lima e Hudson Bezerra, que me deram suporte fundamental na execução do meu trabalho. Agradeço meus companheiros, Vitor Leão, Helder Freitas, Felipe Canto, Igor Coqueiro e a querida Amélia Goes. Obrigada por me acolherem e por toda maravilhosa convivência e amizade, vocês tornaram este período mais leve.

Agradeço imensamente minha família, de forma especial minha mãe, Ivete Corveloni, que sempre sonhou meus sonhos comigo e acreditou em mim, meu pai Wilson Corveloni que sempre me apoiou, e meu irmão, Juliano Corveloni. Tudo que conquistei em minha vida foi graças ao esforço de vocês, obrigado por me apoiarem e confiarem em mim. Sintam-se também agradecidos todos os meus demais familiares pelo apoio, carinho e torcida.

Agradeço a todos meus amigos, aos que trouxe da graduação (Guilherme, Marcos, Carlos, Mikhael, Felipe, Igor) e aos que tive oportunidade de conhecer aqui (Jonathan Milhomens, Romario Mascarenhas, Kelly Duarte, Isabela Ichihara, Danielle Brotto, Camila Baldin, Jéssica Santis, Reginaldo Alves), a todos os primos, e meu namorado Raul Siloto de Lima. Dividir a vida com vocês tornou esta fase mais engrandecedora e divertida.

Ao Laboratório de Terapia Celular, em especial Maristela Orellana e Sâmia Rigotto, por todo auxílio sempre que precisei. Ao laboratório de Citometria de Fluxo, em particular Camila C. O. M. Bonaldo e Patricia V. B. Palma. A Natália Pelisson por todo auxílio com o equipamento e a técnica de *High Content Screening*.

Agradeço a Universidade de São Paulo e ao Programa de Pós Graduação em Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), ao Conselho Nacional de Pesquisas (CNPq), a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Hemocentro de Ribeirão Preto e à FAEPA, agradeço todos recursos financeiros e estrutura oferecidos.

A jornada da pós graduação é longa e árdua, mas termino esta etapa com a convicção que levo muito aprendizado, crescimento e amadurecimento, e devo isto a todos vocês. Obrigada.

RESUMO

CORVELONI, A.C. **Mecanismos moleculares envolvidos na transição entre o estado *primed* e *naïve* de células-tronco embrionárias.** Dissertação de Mestrado - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, 2020.

Células-tronco embrionárias (CTE) pluripotentes são definidas como células com potencial de diferenciação para os três folhetos embrionários (ectoderma, mesoderma e endoderma). CTE pluripotentes de camundongos (mESCs) são consideradas possuidoras de um estado de pluripotência “*naïve*”, definida pela habilidade de se auto-renovar, mantendo o potencial de diferenciação (sem tendências), enquanto as células do epiblasto (EpiSCs) formado após a implantação sofrem mudanças marcantes, tornando-se preparadas (*primed*) para responder a sinais indutores de diferenciação. As CTE humanas (hESCs) são consideradas, com base em características transcricionais, morfológicas e de dependência de vias de sinalização, mais próximas das EpiSCs de camundongo do que das mESCs, compreendidas como no estado *primed*. Nosso grupo mostrou recentemente que o miR-363 promove a pluripotência em hESCs por inibição pós-transcricional de componentes da sinalização de Notch. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar o papel da via de sinalização Notch no contexto dos estados *naïve* e *primed* de pluripotência em hESCs. Para isso foram utilizadas as linhagens de CTEh H1 e H9, e foram explorados diversos métodos de conversão do estado *primed* para *naïve in vitro*, com inibidores (LIF-5i/3i) com dois meios distintos e com meio comercial RSeT™ em condições de hipóxia e normóxia, além da inibição da sinalização de Notch com um inibidor da gama-secretase (DAPT). Foram avaliados parâmetros característicos de cada estado (marcadores de superfície e genes associados aos estados *primed* e *naïve*) por microscopia de imunofluorescência quantitativa (*High Content Analysis/Microscopy*), citometria de fluxo e expressão gênica. As alterações sobre esses marcadores variaram de acordo com o método de conversão utilizado, porém as alterações mais marcantes foram o aumento dos transcritos de DPPA3 e KLF4, importantes genes associados ao estado *naïve*, efeito também provocado pela inibição a sinalização de Notch em diferentes abordagens avaliadas. Adicionalmente ainda foi observado um aumento do transcrito de DNMT3L (também importante marcador *naïve*) e a diminuição da marcação de H3K27me3 nas condições de cultura *naïve* assim como com a inibição da sinalização de Notch. Nossos dados demonstram que inibição da sinalização de Notch regula positivamente a rede transcricional relacionada ao estado *naïve*, além de possivelmente estar relacionado a uma modulação epigenética, sustentando nossa hipótese que a sinalização de Notch está envolvida no processo de transição *primed/naïve*, no entanto o mecanismo por qual atua ainda não totalmente elucidado. Demonstramos, ainda, que a associação de uma droga inibidora da sinalização de Notch pode ser explorada como um método mais eficaz para o processo de transição *primed/naïve in vitro*.

Palavras-chaves Células-Tronco Embrionárias, Pluripotência, Notch, *Naïve*, *Primed*.

ABSTRACT

CORVELONI, A.C. **Molecular mechanisms involved in the transition between the *primed* and naïve state of embryonic stem cells.** Master's Thesis - Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, 2020.

Pluripotent embryonic stem cells (ESCs) are defined as cells with differentiation potential for the three embryonic leaflets (ectoderm, mesoderm and endoderm). Mouse pluripotent ESCs (mESCs) are considered to have a “naïve” pluripotent state, defined by the ability to self-renew, maintaining the potential for differentiation (without tendencies), while the epiblast cells (EpiSCs) formed after implantation undergo marked changes, becoming “*primed*” to respond to differentiating inducing signals. Human ESCs (hESCs) are considered, based on transcriptional, morphological and signaling-dependent characteristics, closer to mouse EpiSCs than to mESCs, understood as in the *primed* state. Our group recently showed that miR-363 promotes pluripotency in hESCs by post-transcriptional inhibition of Notch signaling components. Thus, the objective of this work was to evaluate the role of the Notch signaling pathway in the context of the naïve and *primed* states of pluripotency hESCs. For this, hESCs cell lines H1 and H9 were used, and several methods of conversion from *primed* to naïve state were explored, with inhibitors (LIF-5i/3i) with two different culture mediums and with commercial medium RSeT™ in hypoxia and normoxic conditions, in addition to inhibiting Notch signaling with a gamma secretase inhibitor (DAPT). Characteristic parameters of each state (surface markers and genes associated with *primed* and naïve states) were evaluated by quantitative immunofluorescence microscopy (High Content Analysis/Microscopy), flow cytometry and gene expression. The changes on these markers varied according to the conversion method used, but the most striking changes were the increase in DPPA3 and KLF4 transcripts, important genes associated with naïve status, an effect also caused by the inhibition of Notch signaling in different evaluated approaches. Furthermore, an increase in the DNMT3L transcript (also an important naïve marker) and a decrease in the H3K27me3 labeling under naïve culture conditions were observed, as well as with the inhibition of Notch signaling. Our data demonstrate that inhibition of Notch signaling positively regulates the transcriptional network related to the naïve state, in addition to possibly being related to an epigenetic modulation, supporting our hypothesis that Notch signaling is involved in the *primed* / naïve transition process, however the mechanism by which it acts has not yet been fully elucidated. We also demonstrate that the association of a drug that inhibits Notch signaling can be explored as a more effective method for the *primed*/naïve transition process in vitro.

Key-words: Embryonic Stem Cells, Pluripotency, Notch, Naïve, Primed.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Ilustração do desenvolvimento humano inicial, da fertilização à implantação. Adaptado de BOGGIO, Andrea et al., 2020.....	20
Figura 2. Imagem das principais vias de sinalização atuantes nos estados <i>naïve</i> e <i>primed</i> em células tronco embrionárias de camundongos. Adaptado de Weinberger e colaboradores (2016).....	23
Figura 3. Ilustração da via de sinalização de Notch. Adaptado de BOUCHER, Joshua et al., 2012.....	27
Figura 4. Fotomicrografias de células das linhagens H9 (A) e H1 (B) realizadas em microscópio invertido com contraste de fase em aumento de 10 x.....	35
Figura 5. Esquema do delineamento do ensaio do processo de conversão entre os estados de pluripotência <i>primed-naïve</i> na linhagem celular H9 ao longo de 6 passagens método LIF-5i/3i com o meio de cultivo basal mTeSR-1™.....	37
Figura 6. Esquema do delineamento do ensaio do processo de conversão entre os estados de pluripotência <i>primed-naïve</i> na linhagem celular H9 ao longo de 7 passagens com método LIF-5i/3i com o meio de cultivo basal DMEM/F-12.....	38
Figura 7. Esquema do delineamento do ensaio do processo de conversão entre os estados de pluripotência <i>primed-naïve</i> na linhagem celular H9 ao longo de 8 passagens com método RSeT™.....	38
Figura 8. Esquema do delineamento do ensaio do tratamento com um inibidor da sinalização de Notch (DAPT 2 µM) na linhagem celular H9 ao longo de 5 passagens.....	40
Figura 9. Esquema do delineamento do ensaio do processo de conversão entre os estados de pluripotência <i>primed-naïve</i> na linhagem H1 ao longo de 6 passagens com os métodos: RSeT™ + DMSO/ PD 10 nM/DAPT 2 µM/ PD 10 nM+DAPT em hipóxia, DMEM/F-12 + LIF 5i/3i em hipóxia e normóxia e mTeSR-1™ + DMSO/ DAPT 2 µM/ em hipóxia e normóxia.....	41
Figura 10. Figura 10 – Esquema do delineamento do ensaio do processo de conversão entre os estados de pluripotência <i>primed-naïve</i> na linhagem H1 ao longo de 6 passagens com método RSeT™ + PD 10nM e seguido para as condições RSeT™ + DAPT 2 µM/PD 10nM + DAPT 2 µM ou mantidas em RSeT™ + PD 10nM até a décima passagem.....	42
Figura 11. Células H9 marcadas com Hoechst 33342 e CellMask®Blue. Visualização de parte de uma imagem com a ferramenta <i>Viewer</i> do <i>software CellProfiler</i> , aplicando-se o modo Heatmap e normalização em log (A). Observação das região com maior intensidade de fluorescência (entre vermelho e amarelo), utilizado para identificar o núcleo, determinando pela linha vermelha, e para as regiões de menor intensidade (entre verde e azul) para identificar a célula, delimitada pela linha preta (B). A partir destas delimitações, são gerados os objetos núcleo (C), célula (D) e citoplasma (E).....	46

Figura 12. Gráficos representativos da expressão relativa na linhagem celular H9 na condição controle (mTeSR-1™) e na 5ª e 6ª passagem durante o processo de conversão para *naïve*, cultivadas com mTeSR/LIF-5i/3i. Foram avaliados os genes *DNMT3A/B*, *ZIC2*, *OTX2*, *KLF4*, *NANOG*, *OCT4*, *REX1* e *DPPA3*. Foi utilizado o teste não paramétrico ANOVA - *Kruskal-Wallis*, com *Dunn's Multiple Comparison Test* entre o controle e as células na 5ª ou 6ª passagem. $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, com $N=4$ 49

Figura 13. Análise quantitativa das imagens de imunofluorescência em relação ao número de células e intensidade mediana de OCT4 utilizando o *software CellProfiler* em imagens de cada sítio (pontos pretos) das replicatas (poço) de células H9 controle (mTeSR-1™) e na 5ª e 6ª passagem do processo de conversão *primed/naïve*, cultivadas com mTeSR-LIF-5i/3i. O teste estatístico utilizado foi não paramétrico *Mann Whitney test*. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, com $N=3$ 50

Figura 14. Análise quantitativa da intensidade mediana de fluorescência dos marcadores *primed* (CD90 e SSEA3) e *naïve* (CD7 e CD130) utilizando o *software CellProfiler* em imagens de cada sítio (pontos pretos) das replicatas (poço) das células H9 controle (mTeSR-1™) e H9 na 5ª e 6ª passagem do processo de conversão *primed/naïve*, cultivadas em mTeSR-LIF-5i/3i. O teste estatístico utilizado foi não paramétrico *Mann Whitney test*. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, com $N=3$ 51

Figura 15. Gráficos representativos da expressão relativa na linhagem celular H9 na condição controle (DMEM/F-12) na 7ª passagem durante o processo de conversão para *naïve*, cultivadas com DMEM/F-12 /LIF-5i/3i. Foram avaliados os genes *DNMT3A/B*, *ZIC2*, *OTX2*, *KLF4*, *NANOG*, *OCT4*, *REX1* e *DPPA3*. O teste estatístico utilizado foi não paramétrico *Mann Whitney test*. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, com $N=4$ 52

Figura 16. Fotomicrografias das células H9 na condição controle (DMEM/F-12) e durante o processo de conversão *primed/naïve* com 1, 6 e 8 dias com método LIF-5i/3i com DMEM/F-12..... 53

Figura 17. Gráficos representativos da expressão relativa na linhagem celular H9 na condição controle (mTeSR-1™) e na 7ª e 8ª passagem durante o processo de conversão *naïve*, cultivadas em RSeT™. Foram avaliados os genes *OCT4*, *NANOG*, *KLF4*, *DPPA3*, *ZIC2*, *OTX2*, *DNMT3A/B*, *NOTCH1/2* e *HES1*. Foi utilizado o teste não paramétrico ANOVA - *Kruskal-Wallis*, com *Dunn's Multiple Comparison Test* entre o controle e as células na 7ª ou 8ª passagem. $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, com $N=4$ 54

Figura 18. Análise quantitativa das imagens de imunofluorescência de cada sítio (pontos pretos) das replicatas (poço) em relação ao número de células e a intensidade mediana de fluorescência dos fatores de pluripotência OCT4 e NANOG, de células H9 controle (mTeSR-1™) e na 7ª e 8ª passagem do processo de conversão *primed/naïve*, cultivadas com o meio RSeT™. Foi utilizado o *software CellProfiler* e o teste estatístico utilizado foi não paramétrico *Mann Whitney test*. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ 55

Figura 19. Análise quantitativa dos marcadores *primed* (CD90 e SSEA3) e *naïve* (CD7 e CD130) utilizando o *software CellProfiler* em imagens de cada sítio (pontos pretos) das

replicatas (poço) de células H9 controle (mTeSR-1™) e na 7ª e 8ª passagem do processo de conversão *primed/naïve*, cultivadas com o meio RSeT™. O teste estatístico utilizado foi não paramétrico *Mann Whitney test*. * p <0,05, ** p <0,01, *** p <0,001..... 55

Figura 20. Fotomicrografias das células H9 na condição controle (mTeSR-1™) e na 8ª passagem do processo de conversão *primed/naïve* com o meio RSeT™ com aumento de 20x56

Figura 21. Imagens e gráficos de citometria de fluxo de células H9 controle (mTeSR™1) e na 14ª e 15ª passagem do processo de conversão *primed/naïve*, cultivadas com o meio RSeT™, foram avaliados os marcadores *primed* CD90 e CD172a e *naïve* CD7 e CD130..... 57

Figura 22. Expressão relativa na linhagem celular H9 tratada ou não com DAPT nas concentrações 1, 2 ou 5µM durante 5 dias. Foram avaliados os genes *NOTCH1/2*, *HEY1*, *DNMT3A/B*, *REX1*, *OCT4*, *KLF4* e *DPPA3*. O teste estatístico utilizado foi não paramétrico *Mann Whitney test* comparando cada concentração da droga DAPT (1, 2 ou 5µM) com seu respectivo controle DMSO na mesma concentração do tratamento (1, 2 ou 5µM). * p <0,05, ** p <0,01, *** p <0,001, com N=4..... 58

Figura 23. Expressão relativa na linhagem celular H9 tratada ou não com DAPT 2µM por 22 dias. Foram avaliados os genes *NOTCH1/2*, *HEY1*, *DNMT3A/B*, *REX1*, *OCT4*, *KLF4*, *DPPA3*, *ZIC2* e *OTX2*. O teste estatístico utilizado foi não paramétrico *Mann-Whitney test*. * p <0,05, ** p <0,01, *** p <0,001, N=4..... 59

Figura 24. Análise quantitativa de imagens de imunofluorescência do número total de células e células OCT4 positivas através do *software MetaXpress* das replicatas (poço) de células da linhagem H9 tratadas ou não com DAPT 2µM por 22 dias. Foi utilizado o teste não paramétrico ANOVA - *Kruskal-Wallis*, com *Dunn's Multiple Comparison Test*. p <0,05, ** p <0,01, *** p <0,001, com N=5..... 60

Figura 25. Análise quantitativa da intensidade mediana de fluorescência dos marcadores *primed* (CD90 e SSEA3) e *naïve* (CD7 e CD130) utilizando o *software CellProfiler* em imagens de cada sítio (pontos pretos) das replicatas (poço) de células H9, tratadas ou não com DAPT 2 µM, por 22 dias. O teste estatístico utilizado foi não paramétrico *Mann-Whitney test*. * p <0,05 ** p <0,01 *** p <0,001..... 61

Figura 26. Análise de viabilidade celular através do *software MetaXpress* das replicatas (poço) das células H9 (condições RSeT™, mTeSR-1™ hipóxia e normóxia) tratadas ou não com DAPT 2µM por 24 e 48 horas. As células foram consideradas viáveis quando negativas para marcação com AnexinaV e Iodeto de Propídeo, e mortas células AnexinaV e Iodeto de Propídeo positivas. O teste estatístico utilizado foi não paramétrico *Mann-Whitney test*. * p <0,05 ** p <0,01 *** p <0,001, N=6..... 62

Figura 27. Figura 27 - Análise quantitativa de medidas de número e área de células e colônias da linhagem H9 tratadas ou não com DAPT 2µM, por 24 e 48 horas, utilizando o *software CellProfiler* em imagens de cada sítio (pontos pretos) das replicatas (poço). As alterações foram significativas quando comparadas as condições *primed* (mTeSR-1™) em relação as condições *naïve* (RSeT™), porém não entre os tratamentos avaliados na mesma condição. O

teste estatístico utilizado foi não paramétrico *Mann-Whitney test*. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ 63

Figura 28. Gráficos representativos da expressão relativa na linhagem celular H1 na 7ª passagem em condições de cultivo em mTeSR-1™ (normóxia e hipóxia) tratadas ou não com DAPT 2μM, e RSeT™ (hipóxia) com adição ou não de PD0325901 10nM. Foram avaliados os genes *OCT4*, *NANOG*, *REX1*, *KLF4*, *DPPA3*, *IL6ST*, *NR5A2*, *OTX2*, *ZIC2* e *DNMT3A/B*. Foi utilizado o teste não paramétrico ANOVA - *Kruskal-Wallis*, com *Dunn's Multiple Comparison Test* para as condições em meio mTeSR-1™ e *Mann-Whitney test* para condições com meio RSeT™, sendo: $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, com N=3..... 65

Figura 29. Gráficos representativos da expressão relativa do gene *DNMT3L* na linhagem celular H1 na 7ª passagem em condições de cultivo em mTeSR-1™ (hipóxia) tratadas ou não com DAPT 2μM, e RSeT™ (hipóxia) com adição ou não de PD0325901 10nM. Foi utilizado o teste não paramétrico ANOVA - *Kruskal-Wallis*, com *Dunn's Multiple Comparison Test* para a condição em meio mTeSR-1™ e *Mann-Whitney test* para a condição com meio RSeT™, sendo: $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, com N=3..... 65

Figura 30. Gráficos representativos da expressão relativa na linhagem celular H1 na 7ª passagem em condições de cultivo em mTeSR-1™ (normóxia e hipóxia) tratadas ou não com DAPT 2μM, e RSeT™ (hipóxia) com adição ou não de PD0325901 10 nM. Foram avaliados os genes *NOTCH1/2*, *HES1*, *MAML3*, *DLL1* e *DTX1*. Foi utilizado o teste não paramétrico ANOVA - *Kruskal-Wallis*, com *Dunn's Multiple Comparison Test* para as condições em meio mTeSR-1™ e *Mann-Whitney test* para condições com meio RSeT™, sendo: $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, com N=3..... 66

Figura 31. Análise quantitativa de medidas morfológicas de número e área de celular utilizando o *software* CellProfiller em imagens de cada sítio (pontos pretos) das replicatas (poço) da linhagem H1 na 7ª passagem em condições de cultivo em mTeSR-1™ (normóxia e hipóxia) tratadas ou não com DAPT 2μM, e RSeT™ (hipóxia) com adição ou não de PD0325901 10 nM. Foi utilizado o teste não paramétrico ANOVA - *Kruskal-Wallis*, com *Dunn's Multiple Comparison Test* para as condições em meio mTeSR-1™ e *Mann-Whitney test* para condições com meio RSeT™, sendo: $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ 67

Figura 32. Análise quantitativa da intensidade de fluorescência do marcadores de pluripotência OCT4 e NANOG utilizando o *software* CellProfiller em imagens de cada sítio (pontos pretos) das replicatas (poço) na linhagem H1 na 7ª passagem em condições de cultivo em mTeSR-1™ (normóxia e hipóxia) tratadas ou não com DAPT 2μM, e RSeT™ (hipóxia) com adição ou não de PD0325901 10 nM. Foi utilizado o teste não paramétrico ANOVA - *Kruskal-Wallis*, com *Dunn's Multiple Comparison Test* para as condições em meio mTeSR-1™ e *Mann-Whitney test* para condições com meio RSeT™, sendo: $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ 67

Figura 33. Análise quantitativa da intensidade de fluorescência do marcadores de pluripotência *primed* (CD90 e SSEA3) e *naïve* (CD130 e CD7) utilizando o *software* CellProfiller em imagens de cada sítio (pontos pretos) das replicatas (poço) na linhagem H1 na 7ª passagem em condições de cultivo em mTeSR-1™ (normóxia e hipóxia) tratadas ou não com DAPT 2μM, e RSeT™ (hipóxia) com adição ou não de PD0325901 10 nM. Foi utilizado o teste não

paramétrico ANOVA - *Kruskal-Wallis*, com *Dunn's Multiple Comparison Test* para as condições em meio mTeSR-1™ e *Mann-Whitney test* para condições com meio RSeT™, sendo: $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ 68

Figura 34. Análise quantitativa da intensidade de fluorescência do marcador H3K27me3 utilizando o *software CellProfiler* em imagens de cada sítio (pontos pretos) das replicatas (poço) na linhagem H1 na 7ª passagem em condições de cultivo em mTeSR-1™ (normóxia e hipóxia) tratadas ou não com DAPT 2μM, e RSeT™ (hipóxia) com adição ou não de PD0325901 10 nM. O teste estatístico utilizado foi não paramétrico *Kruskal Wallis*, e *Dunn's* como pós teste. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ 69

Figura 35. Gráficos representativos da expressão relativa na linhagem celular H1 na 11ª passagem em condições de cultivo com o meio RSeT™ com os inibidores PD0325901 10nM e/ou DAPT 2μM. Foram avaliados os genes *OCT4*, *NANOG*, *REX1*, *KLF4*, *DPPA3*, *IL6ST*, *NR5A2*, *OTX2*, *ZIC2* e *DNMT3A/B/L*. Foi utilizado o teste não paramétrico ANOVA - *Kruskal-Wallis*, com *Dunn's Multiple Comparison Test*. $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, com N=3..... 70

Figura 36. Gráficos representativos da expressão relativa na linhagem celular H1 na 11ª passagem em condições de cultivo com o meio RSeT™ com os inibidores PD0325901 10nM e/ou DAPT 2μM. Foram avaliados os genes *NOTCH1/2*, *HES1*, *DLL1*, *DTX1* e *MAML3*. Foi utilizado o teste não paramétrico ANOVA - *Kruskal-Wallis*, com *Dunn's Multiple Comparison Test*. $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, com N=3..... 70

Figura 37. I Análise quantitativa de medidas morfológicas de número e área de celular e de intensidade de fluorescência dos marcadores de pluripotência OCT4 e NANOG utilizando o *software CellProfiler* em imagens de cada sítio (pontos pretos) das replicatas (poço) na linhagem H1 nas 9ª e 10ª passagens em condições de cultivo com o meio RSeT™ com os inibidores PD0325901 10nM e/ou DAPT 2μM. Foi utilizado o teste não paramétrico ANOVA - *Kruskal-Wallis*, com *Dunn's Multiple Comparison Test*. $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$...71

Figura 38. Análise quantitativa da intensidade de fluorescência dos marcadores de pluripotência *primed* (CD90 e SSEA3) e *naïve* (CD130 e CD7) utilizando o *software CellProfiler* em imagens de cada sítio (pontos pretos) das replicatas (poço) na linhagem H1 nas 9ª e 10ª passagens em condições de cultivo com o meio RSeT™ com os inibidores PD0325901 10nM e/ou DAPT 2μM. Foi utilizado o teste não paramétrico ANOVA - *Kruskal-Wallis*, com *Dunn's Multiple Comparison Test*. $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ 72

Figura 39. Análise quantitativa da intensidade de fluorescência do marcador H3K27me3 utilizando o *software CellProfiler* em imagens de cada sítio (pontos pretos) das replicatas (poço) na linhagem H1 nas 9ª e 10ª passagens em condições de cultivo com o meio RSeT™ com os inibidores PD0325901 10nM e/ou DAPT 2μM. Foi utilizado o teste não paramétrico ANOVA - *Kruskal-Wallis*, com *Dunn's Multiple Comparison Test*. $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ 72

Figura 40. Imagens de citometria de fluxo utilizando software FlowJo 10.0.4, da linhagem H1 na 15ª passagem em condições de cultivo com o meio mTeSR-1™ e RSeT™ com o inibidor PD0325901 10nM. Foram avaliados os marcadores *naïve* CD7 e CD130, e *primed* CD90..... 73

Figura 41. Gráfico com valores de citometria de fluxo obtidos com software FlowJo 10.0.4, da linhagem H1 na 15ª passagem em condições de cultivo com o meio mTeSR-1™ e RSeT™ com o inibidor PD0325901 10nM. Foram avaliados os marcadores *naïve* CD7 e CD130, e *primed* CD90..... 73

Figura 42. Imagens de citometria de fluxo utilizando *software* FlowJo 10.0.4, na linhagem H1 na 15ª passagem em condições de cultivo com o meio mTeSR-1™ e RSeT™ com o inibidor PD0325901 10nM. Foram avaliados os marcadores *primed* CD24, CD166, CD172A, CD271, CD57 e CD56..... 74

Figura 43. Gráfico com valores de citometria de fluxo na linhagem H1 na 15ª passagem em condições de cultivo com o meio mTeSR-1™ e RSeT™ com o inibidor PD0325901 10nM. Foram avaliados os marcadores *primed* CD24, CD166, CD172A, CD271, CD57 e CD56..... 75

SUMÁRIO

1. Introdução.....	18
1.1. Células Tronco Embrionárias	19
1.2. Estados de pluripotência <i>primed e naïve</i>	21
1.3. Conversão <i>in vitro</i> entre os estados <i>primed e naïve</i>	24
1.4. Via de sinalização de Notch	27
2. Hipótese/Justificativa	30
3. Objetivos.....	32
3.1. Objetivo geral	33
3.2. Objetivos específicos	33
4. Materiais e Métodos	34
4.1. Linhagens celulares e condições de cultivo	35
4.2. Padronização do protocolo de conversão do estado <i>primed</i> para <i>naïve</i> na linhagem H9..	36
4.2.1. Método mTeSR-1™-LIF-5i/3	36
4.2.2. Método DMEM/F-12-LIF-5i/3i	37
4.2.3. Meio de cultivo comercial RSeT™.....	38
4.3. Inibição Farmacológica da via Notch.....	39
4.4. Associação do protocolo de conversão do estado <i>Primed</i> para <i>Naïve</i> com inibição de Notch na linhagem H1.....	40
4.4.1. Meio de cultivo comercial RSeT™ associado à inibidores.....	40
4.5. Caracterizações.....	42
4.5.1. Caracterização transcricional.....	42
4.5.2. Microscopia de imunofluorescência.....	43
4.5.3. Viabilidade Celular.....	44
4.5.4. Análise das imagens com o CellProfiler.....	45
4.5.5. Citometria de Fluxo.....	46
5. Resultados.....	48
5.1. Método LIF-5i/3i com mTeSR™1.....	49
5.2. Método LIF-5i/3i com DMEM/F-12.....	51

5.3. Método RSeT™.....	53
5.4. Caracterização dos efeitos da inibição de Notch.....	57
5.4.1. Viabilidade Celular.....	61
5.5. Associação do protocolo de conversão do estado <i>primed para naïve</i> com inibição de Notch na linhagem H1.....	63
6. Discussão.....	76
7. Conclusão.....	83
8. Referências Bibliográficas	85
9. Anexos	93

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 Células Tronco Embrionárias

A embriogênese é um processo dinâmico e altamente minucioso. Uma questão central na biologia do desenvolvimento é como um zigoto se desenvolve a partir de uma única célula em um organismo multicelular complexo (CHAZAUD; YAMANAKA, 2016).

Originado a partir da fertilização do oócito com uma célula espermática o zigoto se divide em dois blastômeros, os quais por sucessivas divisões originam a mórula, por sua vez, esta se reorganiza e origina o blastocisto composto (em sua fase pré-implantação) de uma camada externa chamada trofoectoderme (TE) e uma massa celular interna (ICM, do inglês *inner cell mass*) (CONDIC, 2014). Posteriormente, com a eclosão do blastocisto da zona pelúcida e diferenciação das células da TE em trofoblasto, responsável pela implantação, o embrião se implanta no útero. Em paralelo, enquanto as células da ICM originam o epiblasto (EPI) e a endoderme primitiva (PrE, ou hipoblasto), as células da TE contribuem para a formação da placenta, e as da PrE para o saco vitelínico. Em seguida, as células epiblasticas sofrem transformações morfológicas acompanhadas de alterações transcricionais e epigenéticas dinâmicas, porém, permanecendo pluripotentes até o final da gastrulação e originando as três camadas germinativas do embrião (ectoderma, mesoderma e endoderma) (CHAZAUD; YAMANAKA, 2016; CONDIC, 2014; KINOSHITA; SMITH, 2018). Desta forma, as células do embrião podem ser caracterizadas com base em seu potencial de diferenciação, sendo totipotência a capacidade de uma única célula de proceder com o desenvolvimento embrionário completo de forma independente, uma propriedade, além do zigoto, demonstrada apenas para os blastômeros na fase de clivagem precoce (possivelmente até o estágio de quatro células). As células na fase tardia da mórula ou no início do blastocisto na fase pré-implantação são consideradas plenipotentes, capazes de originar todas as células do corpo bem como os tecidos extraembrionários, porém, sendo incapazes de se desenvolverem num organismo adulto de forma independente. Por fim, as células consideradas pluripotentes são aquelas com o potencial de diferenciação em células de todos os tecidos do organismo, mas não dá TE ou PrE, correspondendo às células do EPI no blastocisto tardio (CONDIC, 2014; DE PAEPE et al., 2014).

Figura 1 – Ilustração do desenvolvimento humano inicial, da fertilização à implantação. Adaptado de BOGGIO, Andrea et al., 2020.

Além do blastocisto, células-tronco pluripotentes também pode ser encontradas em tumores germinativos, os carcinomas embrionários (CCE) ou teratocarcinomas (ANDREWS, 2002). A identificação e cultivo destas células permitiram a derivação das primeiras linhagens de células-tronco embrionárias (CTE) pluripotentes de camundongos (mESCs), estabelecidas a partir do cultivo de células da ICM de blastocistos cultivadas sobre uma camada de fibroblastos embrionários murinos (MEFs, do inglês *mouse embryonic fibroblasts*), utilizadas como células alimentadoras (“*feeders*”), na presença ou não de meio de cultura condicionado por CCE (EVANS; KAUFMAN., 1981; MARTIN, 1981). O mesmo sendo feito, posteriormente, estabelecido em células embrionárias humanas (hESCs) (THOMSON et al., 1998).

O sucesso na derivação das mESCs decorreu em especial da secreção do fator inibitório de leucemia (LIF, do inglês *leukemia inhibitory factor*) pelas MEFs (WILLIAMS et al., 1988), o que resultou na ativação de JAK quinases e, conseqüentemente, do fator transcricional (FT) STAT3, inibindo a diferenciação e promovendo a sobrevivência e auto-renovação (MATSUDA et al., 1999; NIWA et al., 1998).

É importante ressaltar que, embora uma das características atribuídas às CTE ser sua capacidade de auto-renovação *in vitro* (i.e. sua capacidade de se dividir indefinidamente mantendo-se indiferenciada e pluripotente), isto não seria uma propriedade fisiológica natural das células (totipotentes, plenipotentes ou pluripotentes) encontradas no embrião (CONDIC,

2014). Apesar disto, originalmente (e comumente) para a derivação de mESC, os embriões têm sua implantação retardada num processo conhecido como diapausa (que ocorre naturalmente em decorrência da amamentação persistente de filhotes, ou induzido por ovariectomia ou, ainda, antagonistas de estrogênio). Ainda que impeça a implantação, este processo faz com que o blastocisto continue a se desenvolver até a diferenciação da ICM em PrE e EPI, levando as células do EPI a proliferarem de forma análoga à da auto-renovação *in vitro*. Acredita-se que a capacidade de auto-renovação *in vitro* das mESC derivaria desta propriedade transiente adquirida por algumas células do EPI em blastocistos obtidos na fase pré-implantação, durante a diapausa (BOROVIK et al., 2014). Por outro lado, durante o desenvolvimento normal o EPI, formado após a implantação, sofre mudanças marcantes com a ativação da via ERK por β FGF e a repressão de marcadores de pluripotência, tornando-se preparado para responder a sinais indutores de especificação para diferentes camadas germinativas (BOROVIK et al., 2014). Assim, enquanto as mESCs em cultura dependem de LIF e, na ausência de soro, também de BMP4 (de forma a induzir genes *Id* via Smad, inibindo diferenciação neural) (YING et al., 2003), as células-tronco derivadas do epiblasto de blástulas já implantadas numa fase pré-gastrulação (EpiSCs) dependem da presença de β FGF e Activina (BRONS, I. G. M. et al., 2007; GREBER et al., 2010), refletindo a sinalização atuante nestas células, *in vivo*.

Tendo em vista as diferenças no estado de pluripotência das mESCs e EpiSCs, inferiu-se que a pluripotência abrange mais de um estágio no desenvolvimento, sendo estabelecidos os estágios "*naïve*" mais anterior no processo do desenvolvimento, constituído pelas células presentes na massa celular interna pré-implantação (mESCs), e "*primed*", constituído por células do epiblasto pós-implantação, tipificado por mEpiSCs (BOROVIK et al., 2014; BRONS, I. G. M. et al., 2007; NICHOLS; SMITH, 2009; TESAR et al., 2007).

1.2 Estados de pluripotência *primed* e *naïve*

A hipótese de existência de dois estados distintos de pluripotência em células-tronco embrionárias (ESCs) foi fundamentada em 2007 com a derivação de células-tronco a partir do epiblasto pós-implantação de embrião murino (mEpiSCs) (BRONS, I. G. et al., 2007), evidenciando as diferenças transcricionais, morfológicas e de dependência de vias de sinalização específicas entre as células derivadas do embrião pré e pós implantação.

Em camundongos, o epiblasto formado após a implantação sofre mudanças significativas rapidamente, como a ativação da via ERK por β FGF e a repressão de marcadores de pluripotência, como *Rex1*, *Klf2*, *Klf4*, *Tbx3* e *Tfcp2l1*, tornando o EPI preparado ("*primed*")

para responder a sinais indutores de especificação para as diferentes camadas germinativas (BOROVIK et al., 2014). Assim, como citado, enquanto as mESCs em cultura dependem de LIF e BMP4, as mEpiSCs, dependem da presença de β FGF e Activina (BRONS, I. G. et al., 2007; GREBER et al., 2010), refletindo a sinalização atuante nestas células *in vivo*. Nos seres humanos, as hESCs são derivadas de blastocistos obtidos por fertilização *in vitro* e, com base em múltiplas características como a morfologia, a dependência de fatores de crescimento (β FGF e Activina) e a inativação de um dos cromossomos X (no caso de células de embriões do sexo feminino), elas são consideradas mais próximas das mEpiSCs do que das mESCs, desta forma, mais próximas do estado *primed* de pluripotência (TESAR et al., 2007).

De uma forma geral, diversas características divergem entre células no estágio *naïve* e *primed*. Como já citado, as vias de sinalização ativas *in vivo*, e necessárias para cultivo *in vitro*: enquanto as células *naïve* necessitam da sinalização JAK/STAT para manutenção de seu estágio, as *primed* possuem uma dependência da sinalização de TGF β /Activina A (MENCHERO et al., 2017; WEINBERGER et al., 2016).

Em relação a características fenotípicas, as células *naïve* possuem uma morfologia abaulada, já as *primed* possuem uma morfologia achatada. Além disso, as células *naïve* possuem maior capacidade de passagem em células únicas, processo este desfavorável às *primed*, que possuem preferência por uma conformação em colônias (TESAR et al., 2007).

Embora os principais marcadores de pluripotência como OCT4, SOX2 e NANOG permaneçam com níveis aproximadamente semelhantes, os estados *primed* e *naïve* possuem assinaturas transcricionais distintas, sendo característicos do estado *naïve* genes expressos na embriogênese inicial e período pré-implantação, relacionados principalmente com manutenção da pluripotência e repressão da diferenciação, como KLF4, TFCEP2L1, KLF17, DPPA5, DNMT3L, GATA6, TBX3, IL6ST, DPPA3 e KLF5. Já no estado *primed*, encontra mais expressos genes relacionados com o início do processo de diferenciação de forma direta ou através da modulação de vias de sinalização (como ERK e WNT) que regulam este processo, como por exemplo DUSP6, OTX2, ZIC2 e SFRP2 (CHAN et al., 2013; MESSMER et al., 2019; PASTOR et al., 2016; WARE et al., 2014). Ainda, além do perfil transcricional, marcadores como THY1 (CD90), B3GAT1 (CD57), SIRPA (CD172a), HLA-A, B,C e SSEA3 foram associados às células *primed*; enquanto, marcadores como CD75, LAMP2 (CD107b), CD7, LY9 (CD229), CD130 (IL6ST, co-receptor de LIF) às células *naïve* (COLLIER et al., 2017).

Outro importante fator divergente entre os estados pluripotentes é o comportamento metabólico, pois, embora células *naïve* usem tanto a glicólise quanto a fosforilação oxidativa

para gerar energia, as células *primed* dependem quase exclusivamente da glicólise (CHOI et al., 2015; MATHIEU; RUOHOLA-BAKER, 2017).

A regulação epigenética é um fator fundamental no controle transcricional e na diferenciação no desenvolvimento embrionário inicial. Já foi demonstrado que as células em seu estado *naïve* possuem um menor comprometimento epigenético, ocorrendo um aumento das marcas repressivas de metilação do DNA e histona H3K27me3, durante a progressão do estágio *naïve* para o *primed*, além do processo de inativação do cromossomo X nas células femininas, de forma que as células *naïve* possuem os dois cromossomos X ativos, enquanto as *primed* já houve o processo de inativação, tornando-se um X inativado (MARGUERON; REINBERG, 2011; MATHIEU; RUOHOLA-BAKER, 2017; ZIMMERLIN et al., 2016).

Por fim, uma das diferenças mais significativas em relação a aplicação dessas células é que, embora em ambos os estágios exibam habilidades pluripotentes clássicas *in vitro*, essas habilidades não são paralelas *in vivo*: enquanto as células *naïve* têm a capacidade de produzir quimeras da linha germinativa, as células *primed* não possuem esta capacidade em situação comum, apenas em condições modificadas, como implantação em embriões em estágio posterior (KANG et al., 2018; MASCETTI; PEDERSEN, 2016).

Embora *in vivo* o processo de transição do estado *naïve* para *primed* seja natural e irreversível, *in vitro* estes estágios são interconvertíveis, porém, enquanto a mudança do estado *naïve* para *primed* é facilmente obtida em cultura, o inverso depende de um intenso processo de reprogramação (BAO et al., 2009; GUO et al., 2017; GUO et al., 2009).

Figura 2 – Principais vias de sinalização atuantes nos estados *naïve* e *primed* em células tronco embrionárias de camundongos. Adaptado de WEINBERGER, Leehee et al., 2016.

1.3 Conversão *in vitro* entre os estados *primed* e *Naïve*

Classicamente, o uso de duas pequenas moléculas inibidoras das vias MEK/ERK (PD0325901) e de GSK3 β (CHIR99021), em combinação com LIF, conhecido como LIF-2i, permitiram que as mESCs em cultura permanecessem em condição *feeder free* e independentes de BMP4, caracterizando o que foi chamado de “*Ground State of Pluripotency*” (YING et al., 2008). Este trabalho abriu caminho para muitos outros que buscavam estabelecer maneiras de capturar o estado *naïve in vitro* em hESCs, seja pela derivação direta a partir do embrião ou, alternativamente, pela reversão de hESCs do estado *primed* para *naïve*, de forma a obter células com as características das mESC, em particular, o seu maior potencial de diferenciação sem tendências, mais homogêneo e com cinética acelerada; propriedades desejáveis para o estabelecimento de protocolos de diferenciação eficientes e seu eventual uso clínico posterior (ZIMMERLIN; PARK; ZAMBIDIS, 2017).

As tentativas iniciais de estabelecer uma cultura de hESCs *naïve* utilizaram a expressão ectópica dos fatores de transcrição de pluripotência OCT4, KLF4 e KLF2 e/ou moduladores de vias de sinalização exógenas, obtendo algumas características *naïve* esperadas, porém com baixa eficiência e instabilidade, demonstrando que diferente do que ocorre com mESCs, apenas 2i/LIF é insuficiente para manter hESCs em um estado *naïve* (COLLIER et al., 2017; HANNA; SAHA; JAENISCH, 2010). Com base nesses conhecimentos, diversos trabalhos buscaram desenvolver protocolos para estabelecimento de hESCs *naïve* estáveis e livres de transgênicos, sendo grande parte baseados em 2i/LIF, complementados com moléculas adicionais. (THEUNISSEN et al., 2014; WARE et al., 2014; ZIMMERLIN et al., 2017).

Com objetivo de promover a reversão e manutenção de hESCs no estado *naïve*, Gafni e colaboradores (2013) utilizaram uma abordagem inibindo a via das MAP quinases através da inibição de p38 e JNK, além da adição de TGF β , obtendo células com características moleculares e propriedades funcionais semelhantes às mESCs (GAFNI et al., 2013).

Theunissen e colaboradores (2014) avaliaram um conjunto diversificado de 230 inibidores de quinase quanto à sua capacidade de manter as células em um estado *naïve* após a remoção da expressão ectópica de KLF2 e NANOG, sendo identificado uma combinação de cinco inibidores capazes de gerar um fenótipo *naïve* quando utilizado diretamente em hESCs convencionais (*primed*) na ausência completa de fatores de reprogramação. Este sistema

denominado 5i/L/A, composto além dos tradicionais inibidores de MEK e GSK3, por inibidores adicionais das vias BRAF, ROCK e SRC, em conjunto com LIF e Activina A, resultou em células com maior expressão de NANOG. Uma análise de ChIP-seq das células convertidas demonstrou uma redução global na marcação de H3K27me3 consistente com o menor comprometimento epigenético característico do estado *naïve*. No entanto, exibiram uma regulação positiva de XIST, indicando reativação incompleta do cromossomo, bem como cariotipagem anormal após a conversão (THEUNISSEN et al., 2014).

Empregando uma outra abordagem, Ware e colaboradores testaram um passo adicional de pré-exposição a inibidores de histona desacetilase (HDAC), e posteriormente a condição 2i, demonstrando que este passo auxiliou o processo de conversão em hESCs, e mesmo em mEpiSCs auxiliou a sobrevivência à exposição inicial ao 2i (WARE et al., 2014).

Corroborando a importância dos fatores epigenéticos no processo de reversão, Guo e colaboradores (2017) demonstraram que populações de células com uma gama de propriedades consistentes com pluripotência *naïve* podem ser geradas a partir de hESCs *primed* por inibição transitória de HDAC seguida por cultura em t2iLGö ou tt2iLGö, meios de manutenção de células *naïve* compostos pelo meio de cultura N2B27 complementados com os inibidores das vias GSK-3, ERK e PKC, podendo ser adicionado a ambos o inibidor de Rock (Y-27632) (GUO et al., 2017).

Chan e colaboradores (2013) também utilizaram pequenas moléculas para modular oito principais vias de sinalização, identificando uma combinação de três moléculas que, juntamente com LIF (3iL), promovem alterações condizentes com um estado *naïve* em hESCs, como aumento da expressão NANOG, DPPA3, KLF4 e TBX3, além de um menor *background* epigenético. Além disso, mapeando o perfil de ligação de OCT4, NANOG e p300 por ChIP-Seq, demonstrou inúmeros locais regulatórios próximos a genes específicos do epiblasto que não são detectados em hESCs *primed*, indicando que o método 3iL tem potencial para modelar a regulação transcricional e epigenética em hESCs (CHAN et al., 2013).

Zimmerlin e colaboradores (2016) desenvolveram um trabalho que apresentou bom potencial, utilizando apenas o uso dos clássicos 2i juntamente com LIF (LIF-2i) e com o modulador da via WNT (XAV939) (Método LIF-3i) – além de um inibidor de tankyrase que potencializa a estabilização da Beta-catenina mediada por Axin. Este protocolo proporcionou uma rápida reversão de hESCs e múltiplas linhagens de iPSCs de maneira uniforme, dando origem a colônias compactas em forma de cúpula e com cariótipo normal após múltiplas passagens, além de características transcricionais, epigenéticas, imunofenotípicas e funcionais condizentes com células *naïve*, incluindo: independência da sinalização FGF/MEK/ERK;

dependência da sinalização de LIF/JAK/STAT3 e BMP4; alta expressão de marcadores de superfície como TRA-1-81 e SSEA4 em mais de 95% das células; aumento nos níveis de mRNA e proteína de fatores como NANOG, E-cadherin (CDH1), NR5A2, DPPA3, KLF2, KLF4 e KLF5; ativação de ambos cromossomos X (em células XX de fêmea), redução nos níveis globais de 5-metilcitosina CpG (5mC) e aumento nos níveis de 5-hidroximetilcitosina (5hmC) (ZIMMERLIN et al., 2016).

Uma outra abordagem que está sendo explorada é o meio comercial RSeT™ (STEMCELL Technologies), um meio de cultura para a reversão de hESCs *primed* para um estado *naïve* e manutenção das células nesse estado, compatível com células-tronco embrionárias humanas e células-tronco pluripotentes induzidas, não contendo β FGF ou TGF β , segundo o fabricante. Alguns trabalhos têm analisado o potencial deste meio de reversão, demonstrando que o cultivo tanto de hESCs como hiPSCs em RSeT™ resultam em mudanças morfológicas condizentes com o estado *naïve*, como colônias em forma de cúpula em contraste com colônias planas na condição *primed*. Em relação às mudanças transcricionais, foi observado que, embora centenas de genes tenham sido diferencialmente expressos entre as células cultivadas em RSeT™ e em condições de cultura *primed*, a regulação positiva dos genes relacionados à pluripotência *naïve* (KLF4, KLF5, DPPA3, TBX3, TFCEP2L1, MAEL, UTF1 e ZFP57) nas hiPSCs foi moderada, e os níveis globais de metilação do DNA se mantiveram semelhantes aos de hiPSCs *primed*. Em resumo, foi observado que as células cultivadas em RSeT™ se encontravam em um estado intermediário, porém o processo é cariotipicamente estável; diferente de outros métodos que foram avaliados (t2iLGöY e 5iLAF), os quais mostraram fenótipos mais próximos do estado *naïve*, no entanto se mostraram cariotipicamente instáveis (KILENS et al., 2018; LIU et al., 2017).

Embora exista uma ampla gama de fatores que diferenciem as células nos estados *primed* e *naïve*, elas compartilham a existência de uma heterogeneidade entre populações, levantando a hipótese de que as células pluripotentes não existam simplesmente nos dois estados distintos, mas sim em um *continuum* de vários estados celulares intermediários, explicando a grande heterogeneidade transcricional presente nos variados processos de transição (KUMAR et al., 2014; SMITH, 2017).

Como exemplificado acima, o processo de transição é muito complexo e envolve diversos mecanismos e vias de sinalizações, e por ser um assunto relativamente ainda recente não existe apenas um único protocolo validado, mas sim muitos caminhos que estão sendo abordados e explorados.

1.4 Via de sinalização de Notch

Descoberta há mais de um século em *Drosophila melanogaster* e atualmente conhecida por sua alta conservação evolutiva e atividade em diversas espécies, de esponjas a seres humanos, a sinalização de Notch representa uma das vias mais importantes que regulam a embriogênese, sendo responsável por muitas decisões-chaves sobre o destino celular e outros processos essenciais durante o desenvolvimento embrionário e em tecidos adultos (ANDERSSON; SANDBERG; LENDAHL, 2011; REICHRATH; REICHRATH, 2012).

De maneira geral, a sinalização da via Notch se inicia com a interação de ligantes da família Delta ou Jagged, com os receptores Notch, levando à clivagem do receptor (pelo complexo da Gama-secretase), com a liberação do domínio intracelular de Notch (NICD), que é translocado para o núcleo, onde forma um complexo com RBP-Jk (CSL/CBF1/Su (H)/Lag1), podendo ligar-se ao DNA e ativar a transcrição de seus alvos juntamente com proteínas coativadoras, como p300 (proteína de ligação) e proteínas da família MAML (BOUCHER; GRIDLEY; LIAW, 2012; MAZUMDAR; DONDETI; SIMON, 2009).

Figura 3 – Ilustração da via de sinalização de Notch. Adaptado de BOUCHER, Joshua et al., 2012.

Nas últimas décadas, foi demonstrado que Notch desempenha papéis fundamentais em uma infinidade de processos. A sinalização célula-célula mediada por Notch está envolvida em muitos aspectos do desenvolvimento embrionário e controle da homeostase tecidual em uma variedade de tecidos adultos, atuando também sobre a regulação da manutenção de células-tronco, diferenciação e homeostase celular (KOCH; LEHAL; RADTKE, 2013).

O papel de Notch pró-diferenciação de CTE foi demonstrado por Yu e colaboradores, onde foi observado que sua inibição (com a droga GSI-18) promoveu o crescimento de células indiferenciadas, prevenindo a diferenciação espontânea (YU et al., 2008). Em CTEh, a ativação de Notch contribuiria com a diferenciação celular em diferentes tipos celulares pela ação de HES1, um de seus alvos transcricionais que teria um papel de regular negativamente a via Notch, levando a um comportamento cíclico e oscilatório da via (KOBAYASHI; KAGEYAMA, 2010). Digno de nota, em mESCs, OCT4 interage fisicamente com o fator transcricional RBP-Jk, que intermedeia a atividade de Notch (VAN DEN BERG et al., 2010).

Em relação ao contexto da transição *naïve/primed*, o papel de Notch ainda não está totalmente claro. Um estudo realizado por Annab e colaboradores (2012) identificou duas subpopulações, que denominou pequenas e grandes, coexistentes em culturas de hESC (incluindo as linhagens H1 e H9), onde as pequenas (esféricas, entre 4 e 8µm de diâmetro) eram resistentes à diferenciação induzida por atRA e expressavam níveis mais elevados de NANOG e KLF4, enquanto as grandes (diâmetro entre 10 e 20µm e com formatos mais heterogêneos) expressavam níveis elevados de componentes da via Notch, incluindo NOTCH1, NOTCH2, JAG1, DLL1, HES1 e DTX1 (ANNAB et al., 2012). Tendo em vista que CTEs revertidas para o estado *naïve* expressam níveis mais elevados de NANOG e KLF4, e possuem tamanho reduzido (PASTOR et al., 2016), isto indicaria que as células pequenas identificadas por Annab seriam células *naïve*, enquanto as grandes (expressando componentes de Notch) seriam *primed*.

Importantemente, um estudo em busca de marcadores de superfície capazes de diferenciar as CTE nos estados *naïve* e *primed*, identificou os receptores Notch 1 e 2 como sendo especificamente expressos em hESC no estado *primed* (COLLIER et al., 2017; COLLIER; RUGG-GUNN, 2018).

Recentemente, um trabalho demonstrou, através do desenvolvimento de embriões de camundongos, que a via Notch foi ativada após as duas primeiras divisões celulares, quando o embrião consiste em apenas quatro células. Além disso, análises em larga escala da atividade gênica nesses embriões também revelou que a sinalização de Notch estava funcionando de uma maneira anteriormente desconhecida: desligava os genes que mantêm a pluripotência, levando as células a se tornarem mais especializadas. O RNAseq de células únicas do embrião apontou

para repressores que bloqueiam marcadores de pluripotência *naïve* como alvos de Notch, entre os genes regulados foi encontrado DPPA3 e PRDM14 (MENCHERO et al., 2019).

Porém, enquanto outras vias de sinalização que também possuem papéis determinantes no desenvolvimento embrionário (ex. WNT, FGF, BMP4, TGF β) têm seu papel mais esclarecido durante o processo de transição *naïve/primed*, o papel de Notch ainda não está totalmente claro durante este processo.

HIPÓTESE/JUSTIFICATIVA

2. HIPÓTESE/JUSTIFICATIVA

Tais quais os FT os microRNAs (miRNAs) apresentam diferentes padrões de expressão nas células-tronco embrionárias humanas e em células diferenciadas e têm papéis descritos na pluripotência e no processo de diferenciação celular (STADLER et al., 2010; TAY et al., 2008; XU et al., 2009). Os miRNAs são moléculas de RNAs endógenos não codificantes com aproximadamente 21-23 nucleotídeos (nt) de comprimento em sua forma madura que, quando associados ao complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC), podem reprimir a tradução de um grande conjunto de mRNAs alvo de forma a regular múltiplos processos biológicos e vias de sinalização (BARTEL, 2009; ROTTIERS; NAAR, 2012). Diferentes microRNAs vem sendo associados ao estado *naïve* ou *primed*, no entanto, a avaliação funcional destes microRNAs, bem como dos mecanismos de regulação pós-transcricionais potencialmente envolvidos, continuam poucos explorados (DU et al., 2018; LEE, Y. J. et al., 2016).

Tendo em vista o amplo potencial regulatório dos miRNAs, nosso grupo identificou recentemente, utilizando a abordagem de *High Content Analysis*, microRNAs com efeitos pró-pluripotência ou pró-diferenciação nas linhagem H1 de CTEh (também conhecida como WA01) (THOMSON et al., 1998) e em uma linhagem pluripotente NTera-2 Cl.D1, um clone da Tera-2, (ANDREWS, 2002). Este estudo levou à identificação de microRNAs com efeitos imunofenotípicos e morfométricos relacionados à manutenção/indução de pluripotência; em particular, a expressão elevada de OCT4 e Ciclina B1, assim como redução do tamanho celular. Interessantemente, análises dos alvos preditos compartilhados entre estes microRNAs levaram à identificação de vias de sinalização enriquecidas para estes alvos, em especial, a via Notch. Estes resultados indicaram que a inibição desta via, por mecanismos pós-transcricionais mediados por microRNAs, teria um papel na modulação de características relacionadas à manutenção e à indução da pluripotência (DE SOUZA LIMA et al., 2019).

Como um todo, os resultados do nosso grupo, em conjunto com os dados da literatura, indicam que a via Notch estaria associada ao estado *primed* nas CTEh. Uma patente (Patente WO2014174470) do grupo de pesquisa de Jacob Hanna, definindo condições (referidas como WIS-NHSM) para geração de células *naïve* sugere que inibidores de Notch poderiam contribuir para a consolidação do estado *naïve* de pluripotência das CTEs (HANNA, NOVERSHTERN, RAIS, 2014). No entanto, até o momento, a função da via Notch no contexto da transição entre os estados *naïve* e *primed*, não foi investigada diretamente na literatura.

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar o papel da via de sinalização Notch no contexto dos estados *naïve* e *primed* de pluripotência em células-tronco embrionárias humanas.

3.2 Objetivos Específicos

- Estabelecer a conversão da linhagem H1 e H9 de hESC do estado de pluripotência *primed* para *naïve*;
- Avaliar as características moleculares, imunofenóticas e epigenéticas específicas dos estados *naïve* e *primed* de pluripotência, especialmente da via Notch;
- Caracterizar os efeitos da inibição da via Notch sobre as propriedades fenotípicas, transcricionais e epigenéticas tipicamente associadas ao estado *naïve* de pluripotência.

MATERIAIS E MÉTODOS

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Linhagens celulares e condições de cultivo

Para realização deste trabalho foi utilizada as linhagens de células-tronco embrionárias humanas H9 Cre-LoxP (XX) e H1 (XY) (Figura 2).

Figura 4 - Fotomicrografias de células das linhagens H9 (A) e H1 (B) realizadas em microscópio invertido com contraste de fase. Aumento de 10 x.

Ambas as linhagens foram adquiridas da WiCell e cedida pelo Laboratório de Terapia Celular do Hemocentro de Ribeirão Preto. Inicialmente, as células foram cultivadas e expandidas para produção de um banco de células, em condição *feeder free* (cultivo livre de células “alimentadoras”/MEFs), utilizando-se a matriz Matrigel (Corning®, #354277) e o meio de cultura mTeSR-1™ (STEMCELL Technologies, #5850), em placas de 6 poços. Para manutenção e expansão dessas células, o meio de cultura foi trocado diariamente e o repique foi realizado com uma solução em PBS de EDTA à 0,5 mM (ThermoFisher Scientific, #AM9261) quando a confluência celular atingia aproximadamente 80%. O uso deste método de dissociação não enzimático é importante pois solta e fragmenta delicadamente as colônias, mantendo as células parcialmente agrupadas, garantindo a manutenção dos sinais derivados das interações celulares. Entretanto, para os experimentos que necessitaram do plaqueamento em células únicas, como as análises em HCA ou os protocolos de conversão abordados, foi utilizado o método de dissociação enzimático com a enzima StemPro® Accutase® Cell Dissociation Reagent (Thermo Fisher Scientific, #A1110501) ou TrypLE™ Express (Thermo Fisher Scientific, #12604013) o qual dissocia as células em células únicas ou pequenos clumps de 2-3 células. Sempre que realizada a dissociação em células únicas, o inibidor de Rock (Cloridrato Y-27632, Abcam, #ab120129) foi adicionado ao meio de cultivo, na concentração de 10 μ M, para favorecer a viabilidade celular. Após a expansão das linhagens as células foram

estocadas em nitrogênio líquido em solução de congelamento, composta de mTeSR-1™ (90%) e de DMSO (10%) (SIGMA), além do inibidor de Rock (10 µM). Para os processos de transição *primed-naïve* a matriz utilizada foi Vitronectina (ThermoFisher Scientific, #A14700) e as condições de cultura alteradas conforme serão descritas nos respectivos protocolos. Ambas as linhagens celulares foram mantidas em incubadora umidificada, com umidade relativa do ar (85%), temperatura (37°C) e concentração de CO₂ (5%) controladas durante o cultivo e expansão, porem também para alguns protocolos utilizou-se incubadora umidificada (85%), temperatura (37°C) e concentração de O₂ (5%) controladas, condição a qual denominamos hipóxia durante os protocolos. Ambas as linhagens apresentaram resultado negativo no teste para contaminação com micoplasma (MycoAlert™ Mycoplasma Detection Kit, Lonza, #LT07).

4.2 Padronização do protocolo de conversão do estado *Primed* para *Naïve* na linhagem H9

Os protocolos iniciais foram realizados com a linhagem H9. Foram testados dois protocolos distintos para o processo de transição, e um destes protocolos com dois meios de cultura diferentes.

4.2.1 Método mTeSR-1™-LIF-5i/3i

Para conversão das células H9 *primed* para o estado *naïve* foi utilizado o método LIF-5i/3i (PARK et al., 2018; ZIMMERLIN et al., 2016) que consiste no uso de um meio de cultura contendo uma combinação de LIF recombinante humano (hLIF) (20 ng/ml; Peprotech, 300-05) e das moléculas CHIR99021 (3 µM, Stemgent, 04-0004), PD0325901 (1 µM, Stemgent, 04-0006) e XAV939 (4 µM, Stemgent, 04-0046) para LIF-3i, e para o LIF-5i estas mesmas moléculas e adicionalmente purmorphamine (2 µM; Stemgent, 04-0009) e forskolin (10 µM; Stemgent, 04-0025).

Para este protocolo o meio de cultivo utilizado foi o mTeSR-1™, o qual foi complementado com as moléculas.

Figura 5 – Esquema do delineamento do ensaio do processo de conversão entre os estados de pluripotência *primed-naïve* na linhagem celular H9 ao longo de 6 passagens método LIF-5i/3i com o meio de cultivo basal mTeSR-1™.

Após a cultura atingir aproximadamente 50% de confluência (2 a 3 dias após o plaqueamento inicial), o meio de cultura padrão mTeSR-1™ foi substituído por mTeSR-1™ contendo o coquetel LIF-5i e mantido assim em condições de cultura normais (37°C, 85% umidade e 5% CO₂) até o dia seguinte. No dia posterior, o meio das células foi retirado, estas foram lavadas uma vez com meio KnockOut™ DMEM (ThermoFisher Scientific, #10829018) e uma vez com PBS, e incubadas com Accutase por 5 minutos; posteriormente as células foram coletadas do poço, ressuspensas em 5 mL de KnockOut™ DMEM e centrifugadas a 300 g por 8 minutos. O *pellet* de células foi ressuspendido em 1 mL do meio mTeSR-1™ suplementados com o coquetel LIF-5i e adicionalmente foi utilizado o inibidor de Rock. As células foram contadas e plaqueadas $3,5 \times 10^5$ células/poço em uma placa de 12 poços com 1 mL do meio mTeSR-1™-LIF-5i. As células foram mantidas em condições de cultura convencionais (normóxia) com troca de meio diária com o meio mTeSR-1™-LIF-5i. Quando atingido 80% de confluência (em torno de 3 dias), foi realizado o processo de passagem, as células foram novamente lavadas e incubadas com EDTA 0,5 mM por 3 minutos, após a incubação o EDTA foi retirado da placa e o meio mTeSR-1™-LIF-3i foi adicionado em um jato para as células desgrudarem da placa, esta solução foi então passada para um novo poço na proporção de 25% (1 poço para 4 poços). As células foram mantidas em condições de cultura convencionais cultivadas com mTeSR-1™-LIF-3i com troca diária ao longo de 6 passagens (20 dias), sendo estas realizadas como descrito acima quando a cultura atingia aproximadamente 80% de confluência. Na quinta e na sexta passagem as células foram coletadas e foi realizada a caracterização da conversão.

4.2.2 Método DMEM/F-12-LIF-5i/3i

Visto que o meio de cultivo mTeSR-1™ possui componentes que favorecem o estado *primed* de pluripotência, uma outra abordagem utilizada foi com o mesmo método de reversão

LIF-5i/3i, porém com o meio de cultivo basal DMEM/F-12 (Invitrogen #11320033) suplementado com 20% Knock-Out Serum Replacement (KOSR; Life Technologies), 0.1 mM MEM non-essential amino acids (Life Technologies), L-Glutamina (Life Technologies), 0.1 mM β -mercaptoethanol (Sigma), LIF recombinante humano (hLIF) (20ng/ml; Peprotech, 300-05) e como já citados as moléculas CHIR99021 (3 μ M, Stemgent, 04-0004), PD0325901 (1 μ M, Stemgent, 04-0006) e XAV939 (4 μ M, Stemgent, 04-0046), purmorphamine (2 μ M; Stemgent, 04-0009) e forskolin (10 μ M; Stemgent, 04-0025), em incubadora umidificada (85%), temperatura (37°C) e concentração de CO₂ (5%).

Novamente após a cultura atingir aproximadamente 50% de confluência (2 a 5 dias após o plaqueamento inicial), o meio de cultura padrão mTeSR-1™ foi substituído por DMEM/F-12 contendo o coquetel LIF-5i e foi mantido assim em condições normais de cultura até o dia seguinte. Todo protocolo a seguir foi realizado de forma semelhante, porém a caracterização foi realizada apenas na 7ª passagem.

Figura 6 – Esquema do delineamento do ensaio do processo de conversão entre os estados de pluripotência *primed-naïve* na linhagem celular H9 ao longo de 7 passagens com método LIF-5i/3i com o meio de cultivo basal DMEM/F-12.

4.2.3 Meio de cultivo comercial RSeT™

Um segundo método utilizado foi com o meio comercial RSeT™ (STEMCELL Technologies, #05978), como citado, um meio de cultura definido para a reversão de hESCs *primed* para um estado *naïve* e manutenção das células nesse estado.

Figura 7 – Esquema do delineamento do ensaio do processo de conversão entre os estados de pluripotência *primed-naïve* na linhagem celular H9 ao longo de 8 passagens com método RSeT™.

Neste protocolo, para a passagem as células foram lavadas com PBS, incubadas com TrypLE™ (250 µL quando em placa de 12 poços e 500 µL em placa de 6 poços) por 3 minutos, após este período foi neutralizado com o meio RSeT™ (750µL em quando em placa de 12 poços e 1500µL em placa de 6 poços), e homogeneizado até as células se dissociarem, posteriormente as células foram centrifugadas 300 g por 8 minutos, ressuspensas em RSeT™ e distribuídas na proporção 1 poço para 4 poços (25%), nos volumes 750 µL/poço em placa de 12 poços e 1500 µL/poço em placa de 6 poços. O meio foi trocado diariamente e as células foram mantidas em condições de hipóxia. As caracterizações foram realizadas na 7ª e na 8ª passagem.

4.3 Inibição Farmacológica da via Notch

Para avaliação do efeito da sinalização de Notch no processo de conversão *primed-naïve*, utilizamos uma abordagem farmacológica que consiste no uso de um inibidor indireto da via de sinalização Notch, o DAPT (Merck #565770), um inibidor da γ -secretase, enzima que atua na clivagem da porção interna do receptor (KORNILOVA; DAS; WOLFE, 2003).

Inicialmente, realizamos um ensaio testando três concentrações de DAPT: 1, 2 e 5 µM. Em placa de 12 poços, foram plaqueadas 8×10^4 células/poço e cultivadas em mTeSR-1™ suplementado com DAPT nas concentrações citadas por um período de 5 dias, em condições convencionais de cultura e troca de meio (suplementado com DAPT) diariamente. Como a droga utilizada é eluída em DMSO, no controle foi utilizado meio suplementado com DMSO nas concentrações correspondentes a cada tratamento. No quinto dia o RNA total foi coletado e foi realizado o ensaio de RT-qPCR para avaliação dos efeitos desse tratamento.

Após esse experimento inicial, foi selecionada a concentração de 2 µM para os demais ensaios, por apresentar o efeito inibitório sem apresentar diferenças significativas em relação a concentração de 5 µM.

Desta forma, um segundo ensaio foi realizado por um período maior de tempo, visando uma abordagem similar ao processo de conversão *primed-naïve*. Este ensaio foi realizado em placa de 24 poços, sendo plaqueadas $2,7 \times 10^4$ células por poço. As células foram cultivadas em mTeSR™ contendo 2 µM de DAPT, com troca de meio diária, em condições normais de cultura por um período de 19 dias. Ao longo desse período as células passaram por 5 procedimentos de passagem, realizados com solução de PBS e EDTA descrita previamente, mantendo a conformação de colônias. No décimo nono dia uma fração das células foi dissociada com Accutase, contada e plaqueada em placa de 96 poços (5×10^3 célula/poço) e mantidas durante

3 dias, ainda com troca diárias de meio com DAPT, período suficiente para alcançar confluência de aproximadamente 80%. Após este período as células foram fixadas e marcadas segundo o protocolo descrito no item 4.5.2.

Outra parcela das células passou por mais uma passagem com solução de PBS e EDTA e, foi mantida na placa de 24 poços por mais 3 dias, com troca diária de meio com DAPT. Após esse período o RNA das células foi extraído, e as amostras prosseguiram para avaliação de expressão gênica por RT-qPCR segundo o protocolo descrito no 4.5.1.

Figura 8 – Esquema do delineamento do ensaio do tratamento com um inibidor da sinalização de Notch (DAPT 2 μ M) na linhagem celular H9 ao longo de 5 passagens.

4.4 Associação do protocolo de conversão do estado *Primed* para *Naïve* com inibição de Notch na linhagem H1

Com base nos resultados dos experimentos anteriores novos experimentos foram realizados, porém com a linhagem H1. Foi selecionada a melhor condição entre os protocolos testados para conversão na H9, sendo com o meio RSeT™ e passagem em células únicas (com Tryple no cultivo com o meio RSeT™ e Accutase com o meio mTeSR-1™), e foi seguido o protocolo de passagens semelhante ao descrito anteriormente. Foi testada também uma nova abordagem com utilização do meio RSeT™ acompanhado do inibidor das vias MEK/ERK (PD0325901), para aumentar a eficiência do processo (WARD; TWAROSKI; TOLAR, 2017), além da droga DAPT para averiguar o efeito da inibição de Notch neste processo. Como controle de veículo foi utilizado DMSO.

4.4.1 Meio de cultivo comercial RSeT™ associado à inibidores

Inicialmente foram testadas as condições: RSeT™ + DMSO, RSeT™ + PD 10 nM, RSeT™ + DAPT 2 μ M, RSeT™ + PD 10 nM + DAPT 2 μ M em condições de cultivo de hipóxia; e as condições mTeSR™, mTeSR™ + DMSO e mTeSR™ + DAPT 2 μ M e DMEM/F-12 + LIF 5i/3i em hipóxia e normóxia.

Figura 9 – Esquema do delineamento do ensaio do processo de conversão entre os estados de pluripotência *primed-naïve* na linhagem H1 ao longo de 6 passagens com os métodos: RSeT™ + DMSO/ PD 10 nM/DAPT 2 µM/ PD 10 nM+DAPT em hipóxia, DMEM/F-12 + LIF 5i/3i em hipóxia e normóxia e mTeSR-1™ + DMSO/DAPT 2 µM/ em hipóxia e normóxia.

Para as condições DMEM/F-12 + LIF 5i/3i (hipóxia e normóxia), RSeT™ + DAPT 2 µM e RSeT™ + PD 10 nM + DAPT 2 µM não foi possível realizar as caracterizações pois não sobreviveram em cultivo por um período considerável, apresentando baixa proliferação, alterações morfológicas condizentes com processo de diferenciação e alta mortalidade, sendo encerrado o cultivo. As condições mTeSR-1™, mTeSR-1™ + DMSO e mTeSR-1™ + DAPT 2 µM (hipóxia e normóxia) e RSeT™ + DMSO e RSeT™ + PD 10 nM (hipóxia) foram caracterizadas transcricional e imunofenotipicamente na 7ª passagem.

Uma nova abordagem foi testada, onde as células passaram por um período de adaptação inicial cultivadas em RSeT™ + PD 10 nM por 5 passagens, e posteriormente transferidas para as condições com os tratamentos RSeT™ + DAPT 2 µM e RSeT™ + PD 10 nM + DAPT 2 µM, ou mantidas ainda em RSeT™ + PD 10 nM por mais 6 passagens. A caracterização imunofenotípica foi realizada na 9 e 10 passagem (5 em RSeT™ + PD e 4/5 em RSeT™ + DAPT 2 µM e RSeT™ + PD 10 nM), a caracterização transcricional na 11ª passagem (5 em RSeT™ + PD e 6 em RSeT™ + DAPT 2 µM e RSeT™ + PD 10 nM), e uma análise de citometria de fluxo nas 14ª e 15ª passagem de algumas condições.

Figura 10 – Esquema do delineamento do ensaio do processo de conversão entre os estados de pluripotência *primed-naïve* na linhagem H1 ao longo de 6 passagens com método RSeT™ + PD 10nM e seguido para as condições RSeT™ + DAPT 2 μM/PD 10nM + DAPT 2 μM ou mantidas em RSeT™ + PD 10nM até a décima passagem.

4.5 Caracterizações

4.5.1 Caracterização transcricional

Amostras das células (H9 e H1) em processo de conversão *primed-naïve* ou tratadas com inibidor de Notch foram coletadas na passagem que variou de 5 a 11 de acordo com método de conversão, e armazenadas em Trizol™ para posterior extração de RNA total e avaliação da expressão gênica de genes envolvidos nesta transição ou relacionados com a sinalização de Notch, por RT-qPCR.

Mais detalhadamente, o meio de cultura foi removido e os poços foram lavados duas vezes com PBS, foi então adicionado 250 μL de PBS/DEPC (Dietilpirocarbonato; Sigma-Aldrich, #D-5758; 0,01%) e 750 μL de TRIZOL LS™ (solução monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina, Life Technologies, #10296028); a mistura foi totalmente homogeneizada e transferida para microtubos e mantidos em freezer (-80°C). Após as amostras serem descongeladas, foi adicionado 10 μL de glicogênio e 200 μL de clorofórmio por microtubo, estes foram vortexados e em seguida centrifugados (1200 x g, 15 minutos, 4°C). A fase aquosa foi transferida para um novo tubo, no qual foi adicionado 500 μL de isopropanol (Merck, #1096341000) gelado e deixado para precipitar em temperatura ambiente por 15 minutos. Os microtubos foram novamente centrifugados (1200 x g, 15 minutos, 4°C) e o sobrenadante descartado, o RNA foi ressuspensionado em 700 μL de etanol 70% seguido de nova centrifugação (1200 x g, 15 minutos, 4°C) e descarte do sobrenadante, o pellet de RNA foi eluído em 20 μL de água livre de nucleases (Invitrogen, #10977-023) e estocado em freezer a -80°C. Posteriormente a extração, o RNA total foi quantificado utilizando 2 μL em espectrofotômetro Nanovue (GE Healthcare Life Sciences), e a pureza estimada pela razão (A260/280nm), sendo consideradas válidas as amostras que apresentaram valores entre 1,6 e 1,8.

O cDNA de cada amostra foi obtido a partir da transcrição reversa de 1 µg de RNA utilizando o High Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems, #4368813), seguindo as instruções do fabricante. As amostras de cDNA foram diluídas para uma concentração final de 10 ng/µL em água livre de nucleases e essas foram utilizadas nas reações de qPCR para avaliação dos níveis de mRNA na transição dos estados *primed-naïve*. As reações de qPCR foram executadas em duplicatas por amostra em placas ópticas para PCR em tempo real de 96 poços (Applied Biosystems, #N8010560), utilizando primers específicos para qPCR, e o aparelho 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems). A normalização foi realizada utilizando um controle endógeno (GAPDH). A expressão relativa foi calculada pela fórmula $2^{-\Delta\Delta CT}$ (PFAFFL, 2001) e a apresentação dos dados e as análises estatísticas foram feitas com o uso do *software* GraphPad Prism 5 (*GraphPad Software*).

Os genes avaliados foram: DLL1, DNMT3A, DNMT3B, DNMT3L, DPPA3/STELLA, DTX1, HES1, HEY1, IL6ST, KLF4, MAML3, NANOG, NOTCH1, NOTCH2, NR5A2, OTX2, POU5F1/OCT4 REX1/ZFP42 e ZIC2. A lista completa com os primers utilizados no presente trabalho, bem como as concentrações e condições de ciclagem para cada um, se encontra na Tabela 1.

4.5.2 Microscopia de imunofluorescência

Da mesma forma as amostras das células H9/H1 em processo de conversão *primed-naïve* ou tratadas com inibidor de Notch foram coletadas na passagem que variou da 5 a 10 de acordo com meio de conversão para a caracterização imunofenotípica. Para isso, as células foram dissociadas com Accutase ou TrypLE™, contadas e plaqueadas em placa de 96 poços (5-10 x 10³ célula/poço) e mantidas durante 3 dias ainda com troca diária de meio, período suficiente para alcançarem confluência de aproximadamente 80%.

Para a fixação, o meio de cultura foi retirado e, os poços foram lavados duas vezes com PBS (50µL/poço), e posteriormente adicionada a solução de fixação composta por 2% de formol em MeOH, em *freezer* (-20°C) durante 20 minutos. A solução com MeOH, além de fixadora, também permeabiliza as células já que o solvente causa rompimentos das membranas biológicas, dispensando a etapa de permeabilização. Em seguida os poços são lavados novamente com PBS por duas vezes e é realizado o quenching, onde é adicionado 50 µL/poço de uma solução de glicina a 0,1 M por 10 minutos. Após a incubação as células são lavadas novamente, e o passo posterior é o bloqueio com 50 µL da solução 1% de SBF (soro bovino fetal) em PBS por poço, por 30 minutos. Após o bloqueio passa-se para a etapa de marcação,

onde foi feita a incubação *overnight* (em geladeira, de 2°C a 8°C) com uma solução contendo os anticorpos primários diluídos na solução de bloqueio. Finalizada a marcação com os anticorpos primários, os poços foram lavados três vezes com PBS e foram utilizados anticorpos secundários próprios para imunofluorescência. A fim de permitir a identificação das células, realizamos também a marcação com Hoechst 33342 (1 µM) (marcador nuclear; Trihidrocloreto de bisBenzimida H 33258; Thermo Scientific, #62249, 1:10000), que marca apenas o núcleo, e com o corante CellMask® Blue (0,25 µL/10mL) (Life Technologies, #H32720, 1:5000) que marca o citoplasma. Essa incubação foi realizada em temperatura ambiente, por 45 minutos, seguidas de outras três lavagens com PBS.

Para verificação do status pluripotente das células foi utilizado anticorpos primários para OCT4 (Santa Cruz Biotechnology, #sc-9081, 1:200) e NANOG (Merck #AB5731), e para acompanhamento do processo de conversão os anticorpos CD90 (BD Biosciences, #550402) e SSEA3 (Santa Cruz Biotechnology, #sc-21703) marcadores do estágio *primed*, e CD130 (BD Biosciences, # 564151) e CD7 (BD Biosciences, #555359) marcadores de células no estado *naïve* (COLLIER; RUGG-GUNN, 2018). Também foi utilizado o anticorpo H3K27me3, uma marca que indica a tri-metilação no 27º resíduo de lisina na histona H3, estando associada à regulação negativa de genes próximos através da formação de regiões heterocromáticas.

Ao final, os poços foram mantidos com 100 µL de PBS para a visualização das imagens utilizando o microscópio de fluorescência automatizado HCS ImageXpress^{micro} (Molecular Devices) e as análises e quantificações foram realizadas utilizando-se o *software CellProfiler 2.2* (Molecular Devices).

4.5.3 Viabilidade Celular

Para avaliar se ocorria um processo de seleção inicial entre as células tratadas com DAPT nós realizamos um teste de viabilidade celular. As células H9 cultivadas em mTeSR-1TM (condição de hipóxia e normóxia) e RSeTTM (hipóxia, durante 10 passagens), foram plaqueadas ($7,5 \times 10^3$ célula/poço) em uma placa de 96 poços e avaliadas com 24 e 48 horas de tratamento com DAPT 2 µM e controle de veículo DMSO na mesma quantidade da droga DAPT. Para o tratamento de 48 horas o meio (com suplemento) foi trocado após 24 horas. Após este período de incubação foi adicionado uma solução de 9,5 µL de PBS + 0,5 µL de Anexina V (Thermofisher #A23204) totalizando 10 µL por poço e incubado por 2 horas, na respectiva condição de cultura. Após este intervalo foi adicionado uma nova solução contendo 2 µL de Iodeto de Propídio (Sigma #P4170), 0,2 µL de Hoechst e 7,8 µL de PBS (novamente 10 µL de

volume), e incubado novamente nas condições convencionais de cultura de cada condição por 45 minutos. Após este período foi feita a aquisição das imagens utilizando-se o sistema de HCS ImageXpress^{micro} (Molecular Devices) e as análises e quantificações foram realizadas utilizando-se o *software CellProfiler 2.2* (Molecular Devices).

4.5.4 Análise das imagens com o CellProfiler

As imagens de imunofluorescência obtidas no microscópio automatizado de fluorescência invertido do sistema de HCS ImageXpress^{micro} XLS foram analisadas utilizando o software de licença aberta *CellProfiler 2.2* (<http://cellprofiler.org>). O *CellProfiler* é um *software* que possui algoritmos avançados para identificar e medir objetos e características biológicas, bem como analisar intensidade de fluorescência, permitindo a quantificação de dados do fenótipo celular em imagens de microscopia de luz transmitida ou fluorescência, automaticamente. Neste trabalho nós o utilizamos para quantificação dos níveis de expressão (com base na intensidade de fluorescência) e localização (núcleo e citoplasma) dos marcadores *primed* e *naïve* estudados e para avaliação da viabilidade celular através da marcação com Anexina e PI, além de dados morfológicos das células quando possível, visto que em alguns experimentos estas análises foram prejudicadas devido à conformação em colônia da cultura, que impossibilitou uma segmentação precisa dos objetos.

Como citado, este *software* possibilita a identificação de objetos presentes na imagem. Para nossas análises, foi segmentado os objetos núcleo, célula e citoplasma, além de, em determinadas análises, uma segmentação adicional de colônias. Estes objetos são identificados através da determinação de diversos parâmetros, como limites mínimos e máximos de tamanho (pixels) e marcação (intensidade dos marcadores celulares Hoechst e CellMeskBlue), estratégia e método de distinção entre *foreground* e *background*, e estratégias que o *software* adota para segmentar objetos muito próximos, entre outras configurações que determinam a segmentação dos objetos.

Finalizado a etapa de segmentação dos compartimentos celulares, o próximo passo é o módulo de quantificação. Para os ensaios os quais utilizamos marcadores tanto do estado *naïve* como *primed*, como marcadores de pluripotência, este módulo extrai as medidas de intensidade de fluorescência de cada marcador em cada objeto segmentado. Para os ensaios de viabilidade, foi avaliado a presença dos marcadores de viabilidade e morte celular (anexina e PI) nas células, desta forma, as células que apresentavam marcação negativa foram consideradas viáveis, enquanto as células Anexina/PI positivas foram classificadas como em morte celular.

Figura 11 – Células H9 marcadas com Hoechst 33342 e CellMask®Blue. Visualização de parte de uma imagem com a ferramenta *Viewer* do *software CellProfiler*, aplicando-se o modo Heatmap e normalização em log (A). Observação das região com maior intensidade de fluorescência (entre vermelho e amarelo), utilizado para identificar o núcleo, determinando pela linha vermelha, e para as regiões de menor intensidade (entre verde e azul) para identificar a célula, delimitada pela linha preta (B). A partir destas delimitações, são gerados os objetos núcleo (C), célula (D) e citoplasma (E).

4.5.5 Citometria de Fluxo

Baseados no trabalho de Collier e colaboradores (2017), onde buscaram avaliar um abrangente perfil de proteínas de superfície celular específicos de cada estado (*primed/naïve*) através de citometria de fluxo, nós incluímos em nossa análise os marcadores relatados como mais presente no estado *primed* CD24, CD56, CD57, CD172a, CD271, além do marcador já utilizado CD90, e os marcadores *naïve* já avaliados neste trabalho CD130 e CD7 (COLLIER et al., 2017). Para isso determinadas condições testadas neste trabalho foram avaliadas imunofenotipicamente pela técnica de citometria de fluxo (FACScalibur, Becton Dickinson), em que alíquotas com cerca de 1×10^6 células foram separadas e incubadas com 2 μ L de anticorpos dos marcadores *primed* e *naïve* por 15 minutos, lavadas com 5ml de PBS, centrifugadas a 300 g por 5 minutos e posteriormente ressuspensas em 400 μ L de PBS e então analisadas pelo citômetro FACScalibur (BD Pharmingen) e pelo *software* FlowJo 10.0.4 (BD Pharmingen). Os anticorpos marcadores do estado *primed* utilizados foram anti-CD24 (BD Biosciences, #555428), anti-CD56 (BD Biosciences, #555516), anti-CD57 (BD Biosciences, #555619), anti-CD90 (BD Biosciences, #559869), anti-CD172a (BD Biosciences, #171729-

42), anti-CD271 (BD Biosciences, #557196), e os marcadores *Naïve* anti-CD7 (BD Biosciences, #340581) e anti-CD130 (BD Biosciences, #555757), conjugados aos fluoróforos Fluorescein(FITC), R-phycoerythrin (PE) ou allophycocyanin (APC).

RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1 Método LIF-5i/3i com mTeSR™1

Para avaliação do protocolo LIF-5i/3i foi feita a caracterização transcricional e imunofenotípica na quinta e na sexta passagem após o início do tratamento.

Na avaliação transcricional, na quinta passagem foi possível observar uma pequena redução dos transcritos de DNMT3A e DNMT3B, que foi estatisticamente significativa na sexta passagem. Em relação aos genes associados ao estado *primed*, observamos um perfil semelhante ao das enzimas DNA metiltransferases, tendo o ZIC2 uma sutil redução já na 5ª passagem, alcançando relevância estatística na sexta passagem enquanto, que o OTX2 apesar de apresentar-se menos expresso na quinta passagem, teve um aumento na sexta passagem, contrariamente ao esperado (PASTOR et al., 2016). Concordantemente com o perfil *naïve*, observamos aumento estatisticamente significativo na quinta e sexta passagem, do transcrito de KLF4; o gene DPPA3 também apresentou incremento de expressão na quinta passagem ($p < 0,01$), porém este não foi mantido na passagem seguinte. Não foi observada alterações estatisticamente significativas em relação aos demais genes avaliados (OCT4, NANOG e REX1).

Figura 12 - Gráficos representativos da expressão relativa na linhagem celular H9 na condição controle (mTeSR-1™) e na 5ª e 6ª passagem durante o processo de conversão para *naïve*, cultivadas com mTeSR/LIF-5i/3i. Foram avaliados os genes *DNMT3A/B*, *ZIC2*, *OTX2*, *KLF4*, *NANOG*, *OCT4*, *REX1* e *DPPA3*. Foi utilizado o teste não paramétrico ANOVA - *Kruskal-Wallis*, com *Dunn's Multiple Comparison Test* entre o controle e as células na 5ª ou 6ª passagem. $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, com $N=4$.

Na avaliação imunofenotípica, na 5ª e na 6ª passagem verificou-se um aumento no número de células, sem alteração da intensidade mediana de OCT4 na 5ª e com um aumento na 6ª, demonstrando que as células tratadas com LIF-3i possuíram uma maior atividade proliferativa sem perda da pluripotência (Figura 13).

Figura 13 - Análise quantitativa das imagens de imunofluorescência em relação ao número de células e intensidade mediana de OCT4 utilizando o *software CellProfiler* em imagens de cada sítio (pontos pretos) das replicatas (poço) de células H9 controle (mTeSR-1™) e na 5ª e 6ª passagem do processo de conversão *primed/naïve*, cultivadas com mTeSR-LIF-5i/3i. O teste estatístico utilizado foi não paramétrico *Mann Whitney test*. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, com $N=3$.

No que se refere aos marcadores *primed*, na 5ª observamos uma redução estatisticamente significativa da intensidade de CD90 e SSEA3; porém na avaliação dos marcadores *naïve*, CD7 não apresentou alteração e, opostamente ao esperado, houve uma redução significativa da intensidade do CD130. Na passagem seguinte o perfil dos marcadores do estado *primed* mostrou-se bastante similar ao da 5ª passagem, com redução estatisticamente significativa, tanto para o CD90, quando para o SSEA3. Nesta passagem, concordantemente ao processo de conversão *primed/naïve*, observamos aumento significativo da intensidade de CD130, no entanto, novamente, não verificamos nenhuma alteração em relação ao marcador CD7 (Figura 14).

Figura 14 - Análise quantitativa da intensidade mediana de fluorescência dos marcadores *primed* (CD90 e SSEA3) e *naïve* (CD7 e CD130) utilizando o *software* CellProfiller em imagens de cada sítio (pontos pretos) das replicatas (poço) das células H9 controle (mTeSR-1™) e H9 na 5ª e 6ª passagem do processo de conversão *primed/naïve*, cultivadas em mTeSR-LIF-5i/3i. O teste estatístico utilizado foi não paramétrico *Mann Whitney test*. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, com $N=3$.

5.2 Método LIF-5i/3i com DMEM/F-12

Com o intuito de otimizar o processo de transição do estado *primed* ao *naïve*, executamos o tratamento das células H9 com o método LIF-5i/3i baseado no meio DMEM/F12, uma vez que este não contém componentes que prejudicam a indução/manutenção do estado *naïve* de pluripotência.

No experimento com o meio DMEM/F-12 não foi possível realizar as caracterizações na 5ª e 6ª passagem pois as células apresentaram taxa de duplicação reduzida quando comparada a condição anterior, desta forma, não havia célula suficiente para prosseguirmos com as mesmas avaliações (caracterização transcricional e imunofenotípica) realizadas no tratamento LIF-5i/3i com mTeSR™1. Desta forma, para este tratamento avaliamos a 7ª passagem, na qual foi feito a caracterização transcricional. Nesta foi possível observar um aumento bastante evidente dos transcritos de KLF4 e DPPA3, ambos genes associados ao

estado *naïve*; contudo, os demais genes não foram modulados significativamente (Figura 15).

Figura 15 - Gráficos representativos da expressão relativa na linhagem celular H9 na condição controle (DMEM/F-12) na 7ª passagem durante o processo de conversão para *naïve*, cultivadas com DMEM/F-12 /LIF-5i/3i. Foram avaliados os genes *DNMT3A/B*, *ZIC2*, *OTX2*, *KLF4*, *NANOG*, *OCT4*, *REX1* e *DPPA3*. O teste estatístico utilizado foi não paramétrico *Mann Whitney test*. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, com $N=4$.

Apesar da caracterização transcricional não evidenciar intensas alterações associadas ao ganho do perfil *naïve*, por meio das fotomicrografias, apresentadas na figura 16, é possível observar algumas alterações morfológicas consistentes com a transição do estado *primed* ao *naïve*: como uma compactação maior das colônias em relação a colônias mais planas do estado *primed*. No entanto, mesmo com os indícios apresentados, este método apresentou diversas dificuldades de execução impedindo que mais caracterizações fossem realizadas.

Figura 16 - Fotomicrografias das células H9 na condição controle (DMEM/F-12) e durante o processo de conversão *primed/naïve* com 1, 6 e 8 dias com método LIF-5i/3i com DMEM/F-12.

5.3 Método RSeT™

Como alternativa aos meios anteriormente avaliados, realizamos o cultivo das células H9 em meio comercial RSeT™, indicado à conversão e manutenção das células *naïve*.

Inicialmente este protocolo foi testado tanto em condição de hipóxia (5% de O²), quanto de normóxia (5% de CO²). A cultura em normóxia com este meio de cultivo não se mostrou promissora, apresentando baixa sobrevivência celular, de forma que foi dada continuidade apenas na condição em hipóxia, e as análises foram efetuadas na 7^a e 8^a passagem seguindo as orientações do fabricante.

A caracterização transcricional (figura 17) demonstrou que não houve modulação dos transcritos de OCT4, e uma pequena redução de NANOG na sétima passagem, porém não se manteve na oitava. De acordo com o esperado em um processo de reversão houve um aumento bastante significativo dos transcritos marcadores *naïves* (DPPA3 e KLF4), e uma redução do marcador *primed* (ZIC2). Os transcritos das DNA metiltransferases A e B não foram modulados, e houve um pequeno aumento do marcador *primed* OTX2.

Neste tratamento, além dos transcritos avaliados nas três condições descritas até o momento, realizamos a análise da expressão de genes relacionados com a via de sinalização de Notch, observando uma redução significativa no transcrito de NOTCH1, porém não de NOTCH2, apesar de ter menor expressão na oitava passagem quando comparado à condição controle. Além disso, verificamos uma diminuição do transcrito direto desta via de sinalização, o HES1, tendo significância estatística na sétima passagem.

Figura 17 - Gráficos representativos da expressão relativa na linhagem celular H9 na condição controle (mTeSR-1™) e na 7ª e 8ª passagem durante o processo de conversão *naíve*, cultivadas em RSeT™. Foram avaliados os genes *OCT4*, *NANOG*, *KLF4*, *DPPA3*, *ZIC2*, *OTX2*, *DNMT3A/B*, *NOTCH1/2* E *HES1*. Foi utilizado o teste não paramétrico ANOVA - *Kruskal-Wallis*, com *Dunn's Multiple Comparison Test* entre o controle e as células na 7ª ou 8ª passagem. $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, com $N=4$.

Na caracterização por imunofluorescência nós observamos que tanto na 7ª como na 8ª passagem houve uma redução do número de células. Os marcadores de pluripotência não foram alterados na 7ª passagem, porém na 8ª houve um aumento da marcação de OCT4 e NANOG (figura 18). Em relação aos marcadores *primed* ao contrário do esperado, na sétima passagem ocorreu um pequeno aumento de CD90, porém uma redução de SSEA3, já na 8ª passagem houve um pequeno aumento de SSEA3 e uma redução significativa de CD90 (figura 19).

Figura 18 - Análise quantitativa das imagens de imunofluorescência de cada sítio (pontos pretos) das replicatas (poço) em relação ao número de células e a intensidade mediana de fluorescência dos fatores de pluripotência OCT4 e NANOG, de células H9 controle (mTeSR-1™) e na 7ª e 8ª passagem do processo de conversão *primed/naïve*, cultivadas com o meio RSeT™. Foi utilizado o *software CellProfiler* e o teste estatístico utilizado foi não paramétrico *Mann Whitney test*. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Figura 19 - Análise quantitativa dos marcadores *primed* (CD90 e SSEA3) e *naïve* (CD7 e CD130) utilizando o *software CellProfiler* em imagens de cada sítio (pontos pretos) das replicatas (poço) de células H9 controle (mTeSR-1™) e na 7ª e 8ª passagem do processo de conversão *primed/naïve*, cultivadas com o meio RSeT™. O teste estatístico utilizado foi não paramétrico *Mann Whitney test*. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Independentemente das sutis alterações observadas na caracterização transcricional, as alterações morfológicas deste tratamento são bastantes evidentes, como é possível observar nas imagens (figura 20). No início do processo de conversão (P0), as células apresentam-se maiores e as colônias mais achatadas (característica *primed*), enquanto, com o meio RSeT™ verificamos a formação de colônias mais compactas e abauladas (característica *naïve*) na oitava passagem.

Figura 20 - Fotomicrografias das células H9 na condição controle (mTeSR-1™) e na 8ª passagem do processo de conversão *primed/naïve* com o meio RSeT™. Aumento de 20x.

Devido às mudanças morfológicas promissoras, adicionalmente a estes resultados, a foi realizado uma caracterização posterior por citometria de fluxo na 14ª e 15ª passagem para os marcadores de superfície celular *primed* CD90 e CD172a, e os marcadores *naïve* CD130 e CD7. Na 14ª passagem é possível observar uma diminuição de 99,57 para 68,49% de células positivas para CD90 no controle para no meio RSeT™, e uma observável mudança no perfil de marcação, sendo as do meio mTeSR-1™ visivelmente expressas de forma mais intensa (*high*), enquanto no meio RSeT™ mesmo as células positivas se encontravam com menor intensidade (*low*); além disso também houve significativa redução de CD172a de 68,41 para 8,38%. Na 15ª passagem houve ainda um redução de células CD90 positivas, porém menos expressiva de 98,89 para 96,94%, no entanto, o padrão de marcação mais intenso (*high*) para as células mTeSR-1™ permaneceu; a redução de CD172a também foi menor, de 92,53 para 85,56%. Os marcadores *naïves* não apresentaram marcação significativa em nenhuma das duas passagens avaliadas.

Figura 21 – Imagens e gráficos de citometria de fluxo de células H9 controle (mTeSR™1) e na 14ª e 15ª passagem do processo de conversão *primed/naïve*, cultivadas com o meio RSeT™, foram avaliados os marcadores *primed* CD90 e CD172a e *naïve* CD7 e CD130.

5.4 Caracterização dos efeitos da inibição de Notch

Para analisar os efeitos da inibição da via de sinalização Notch avaliamos genes diretamente ligados com a via, como NOTCH1, NOTCH2 e HEY1, além de genes

marcadores de pluripotência que são alterados durante o processo de transição *naïve/primed*, como DNMT3A, DNMT3B, REX1, OCT4, KLF4 e DPPA3, em presença ou ausência de um inibidor desta sinalização, o DAPT. Os níveis de mRNA do gene de NOTCH1 foi reduzido nas três concentrações de DAPT avaliadas em relação ao respectivo controle, porém esta redução foi estatisticamente significativa apenas para as concentrações de 1 e 2 μ M (figura 22). Em relação aos genes associados a pluripotência, contrariamente ao esperado, houve redução do transcrito de OCT4 com 1 μ M de DAPT, contudo isso não ocorreu nas concentrações mais elevadas, nas quais praticamente não houve alteração da expressão deste fator transcricional. Por outro lado, observamos aumento dos genes KLF4, na concentração de 1 μ M e do principal marcador das células em estado *naïve*, o DPPA3 nas concentrações de 2 e 5 μ M, nesta última o aumento atingiu 50%. Os demais genes avaliados (NOTCH2, HEY1, DNMT3A, DNMT3B e REX1) sofreram oscilações em relação às condições controles, entretanto, essas não foram estatisticamente significativas, e nem sempre apresentaram um comportamento definido (Figura 22).

Figura 22 – Expressão relativa na linhagem celular H9 tratada ou não com DAPT nas concentrações 1, 2 ou 5 μ M durante 5 dias. Foram avaliados os genes *NOTCH1/2*, *HEY1*, *DNMT3A/B*, *REX1*, *OCT4*, *KLF4* e *DPPA3*. O teste estatístico utilizado foi não paramétrico *Mann-Whitney test* comparando cada concentração da droga DAPT (1, 2 ou 5 μ M) com seu respectivo controle DMSO na mesma concentração do tratamento (1, 2 ou 5 μ M). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, com $N=4$.

Devido às alterações na expressão dos componentes da sinalização de Notch e ao aumento do principal marcador de células no estado *naïve* de pluripotência, *DPPA3*, avaliamos o efeito a longo prazo da inibição desta sinalização. Como pode ser observado na figura 23 o ensaio realizado com maior tempo de tratamento (22 dias) evidenciou uma tendência a redução dos componentes da sinalização de Notch, porém esta não foi significativa para *NOTCH1/2*, contudo um dos principais alvos desta via (*HEY1*) mostrou redução estatisticamente significativa de sua expressão na condição tratada com DAPT (2 μ M) em relação ao controle. Além disso, não foi constatada nenhuma alteração expressiva na modulação dos fatores de pluripotência (*OCT*, *KLF4*, *REX1*), nos marcadores *primed* (*ZIC2* e *OTX2*), nem sobre os genes das *DNMT3A/B*, entretanto, houve um aumento significativo (3x) nos níveis de *DPPA3*, importante marcador de pluripotência *naïve*.

Figura 23 – Expressão relativa na linhagem celular H9 tratada ou não com DAPT 2 μ M por 22 dias. Foram avaliados os genes *NOTCH1/2*, *HEY1*, *DNMT3A/B*, *REX1*, *OCT4*, *KLF4*, *DPPA3*, *ZIC2* e *OTX2*. O teste estatístico utilizado foi não paramétrico *Mann-Whitney test*. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, $N=4$.

O ensaio de imunofluorescência para avaliar o papel da sinalização de Notch na transição *primed/naïve* foi realizado apenas para o segundo ensaio, que foi avaliado por maior período utilizando apenas a concentração de 2 μ M de DAPT.

Na avaliação imunofenotípica, foi verificado um aumento expressivo no número de células cultivadas com DAPT, acompanhado de uma elevada quantidade de células OCT4 positivas, em relação em relação ao controle (Figura 24).

Figura 24 - Análise quantitativa de imagens de imunofluorescência do número total de células e células OCT4 positivas através do *software MetaXpress* das replicatas (poço) de células da linhagem H9 tratadas ou não com DAPT 2 μ M por 22 dias. Foi utilizado o teste não paramétrico ANOVA - *Kruskal-Wallis*, com *Dunn's Multiple Comparison Test*. p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001, com N=5.

Na avaliação dos marcadores *primed*, houve uma redução de CD90, porém a intensidade de SSEA3 não foi alterada, já em relação aos marcadores *naïve* foi verificado um aumento do CD7 porém, houve redução de CD130 (Figura 25).

Figura 25 - Análise quantitativa da intensidade mediana de fluorescência dos marcadores *primed* (CD90 e SSEA3) e *naïve* (CD7 e CD130) utilizando o *software* CellProfiler em imagens de cada sítio (pontos pretos) das replicatas (poço) de células H9, tratadas ou não com DAPT 2 μM, por 22 dias. O teste estatístico utilizado foi não paramétrico *Mann-Whitney test*. * p < 0,05 ** p < 0,01 *** p < 0,001.

5.4.1 Viabilidade Celular

Uma hipótese sobre o processo de transição entre os estados *primed* para *naïve* é que as células passam por um processo inicial de seleção, onde as células mais próximas do estado *naïve*, quando cultivadas em condição que favorecem este estado, possuem uma taxa de sobrevivência maior quando comparadas com as *primed*, de forma a ir selecionando as células com características *naïve*, no entanto o tratamento com DAPT não ocasionou nenhuma alteração de morte ou viabilidade celular como pode ser observado na figura 26.

Figura 26 - Análise de viabilidade celular através do *software MetaXpress* das replicatas (poço) das células H9 (condições RSeT™, mTeSR-1™ hipóxia e normóxia) tratadas ou não com DAPT 2μM por 24 e 48 horas. As células foram consideradas viáveis quando negativas para marcação com AnexinaV e Iodeto de Propídeo, e mortas células AnexinaV e Iodeto de Propídeo positivas. O teste estatístico utilizado foi não paramétrico *Mann-Whitney test*. * p < 0,05 ** p < 0,01 *** p < 0,001, N=6.

Também avaliamos alterações morfológicas e sob o número de células nessas condições, onde é possível verificar que as células cultivadas nas condições *naïve* (RSeT™) possuem uma menor quantidade de células e menor área celular, além de maior número e área das colônias, quando comparadas com as células cultivadas nas condições *primed* (mTeSR-1™), condizente com a morfologia de células *naïve*, como menor tamanho e colônias mais condensadas. Além disso é possível notar uma tendência da condição mTeSR-1™ tratada com DAPT por 48 horas de acompanhar essas mudanças morfológicas, apresentando uma menor área celular e menor quantidade de colônias (Figura 27).

Figura 27 - Análise quantitativa de medidas de número e área de células e colônias da linhagem H9 tratadas ou não com DAPT 2 μ M, por 24 e 48 horas, utilizando o *software* CellProfiler em imagens de cada sítio (pontos pretos) das replicatas (poço). As alterações foram significativas quando comparadas as condições *primed* (mTeSR-1TM) em relação as condições *naïve* (RSeTTM), porém não entre os tratamentos avaliados na mesma condição. O teste estatístico utilizado foi não paramétrico *Mann-Whitney test*. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$.

Com base nos resultados apresentados é possível verificar que o meio RSeTTM ocasionou alterações condizentes com um processo de transição do estado *primed* para *naïve*. Para testar nossa hipótese que a via Notch está envolvida neste processo, utilizamos uma nova abordagem conciliando este meio com nossa droga inibidora da sinalização de Notch.

Com o intuito de avaliar a reprodutibilidade do comportamento das células pluripotentes durante a conversão do estado *primed* para *naïve*, utilizamos uma outra linhagem embrionária (H1) para verificar se produziria também os mesmos efeitos verificados na linhagem H9. Desta forma, para os resultados apresentados a seguir foi utilizada a linhagem embrionária H1.

5.5 Associação do protocolo de conversão do estado *primed* para *naïve* com inibição de Notch na linhagem H1

O cultivo da linhagem celular H1 em DMEM F12 + LIF 5i/3i (hipóxia e normóxia) na condição *feeder free*, de forma semelhante a linhagem H9, se mostrou difícil porém, nesta

linhagem, esta condição de cultivo se mostrou ainda mais prejudicial, não sendo possível a realização das caracterizações pois não havia células suficientes devido à alta mortalidade já nas passagens iniciais.

As condições RSeT™ + DAPT 2 µM e RSeT™ + PD 10 nM + DAPT 2 µM também se mostraram altamente deletérias para as células H1, não tendo continuidade seu cultivo. Desta forma foi feita a caracterização na sexta passagem do cultivo das condições mTeSR-1™, mTeSR-1™ + DMSO e mTeSR-1™ + DAPT 2 µM (hipóxia e normóxia), e RSeT™ + DMSO e RSeT+ PD 10 nM (hipóxia).

Na avaliação transcricional dessas condições, demonstrada na figura 28, podemos observar um aumento dos transcritos dos marcadores de pluripotência OCT4, NANOG e REX1 na condição RSeT™ + PD quando comparado ao seu controle RSeT™ DMSO, além do aumento do transcrito genes associados ao estado *naïve* (KLF4, DPPA3 e IL6ST) e redução do marcador *primed* OTX2, no entanto houve um aumento dos transcritos de DNMT3B.

O transcrito de DNMT3L não foi identificado nas condições em meio mTeSR-1™ em normóxia, porém em hipóxia foi possível identificar seus transcritos nas condições mTeSR-1™ DMSO e mTeSR-1™ DAPT, podendo ser observado que o tratamento com DAPT provocou uma tendência ao aumento (1,5x) deste transcrito. Já nas condições com o meio RSeT™ o transcrito foi identificado em maiores quantidades (ciclos mais anteriores), tendo o tratamento com DAPT induzido uma maior expressão deste transcrito cerca de 4 vezes (figura 29).

Figura 28 - Gráficos representativos da expressão relativa na linhagem celular H1 na 7ª passagem em condições de cultivo em mTeSR-1™ (normóxia e hipóxia) tratadas ou não com DAPT 2µM, e RSeT™ (hipóxia) com adição ou não de PD0325901 10nM. Foram avaliados os genes *OCT4*, *NANOG*, *REX1*, *KLF4*, *DPPA3*, *IL6ST*, *NR5A2*, *OTX2*, *ZIC2* e *DNMT3A/B*. Foi utilizado o teste não paramétrico ANOVA - *Kruskal-Wallis*, com *Dunn's Multiple Comparison Test* para as condições em meio mTeSR-1™ e *Mann-Whitney test* para condições com meio RSeT™, sendo: $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, com $N=3$.

Figura 29 - Gráficos representativos da expressão relativa do gene *DNMT3L* na linhagem celular H1 na 7ª passagem em condições de cultivo em mTeSR-1™ (hipóxia) tratadas ou não com DAPT 2µM, e RSeT™ (hipóxia) com adição ou não de PD0325901 10nM. Foi utilizado o teste não paramétrico ANOVA - *Kruskal-Wallis*, com *Dunn's Multiple Comparison Test* para a condição em meio mTeSR-1™ e *Mann-Whitney test* para a condição com meio RSeT™, sendo: $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, com $N=3$.

As condições com o meio mTeSR-1™ não apresentaram alterações significativas. Os transcritos de componentes da sinalização de Notch, MAML3 e HES1, foram modulados negativamente na condição RSeT+ PD 10 nM quando comparado com seu controle RSeT + DMSO (Figura 30).

Figura 30 - Gráficos representativos da expressão relativa na linhagem celular H1 na 7ª passagem em condições de cultivo em mTeSR-1™ (normóxia e hipóxia) tratadas ou não com DAPT 2µM, e RSeT™ (hipóxia) com adição ou não de PD0325901 10 nM. Foram avaliados os genes *NOTCH1/2*, *HES1*, *MAML3*, *DLL1* e *DTX1*. Foi utilizado o teste não paramétrico ANOVA - *Kruskal-Wallis*, com *Dunn's Multiple Comparison Test* para as condições em meio mTeSR-1™ e *Mann-Whitney test* para condições com meio RSeT™, sendo: p <0,05, ** p <0,01, *** p <0,001, com N=3.

Na análise imunofenotípica foi possível observar que o tratamento com DAPT diminuiu o número de células na condição mTeSR-1™ em normóxia, porém não ocorreu este mesmo efeito em hipóxia (houve uma redução apenas devido ao DMSO), além disso o tratamento RSeT™ + PD provocou um aumento no número de células em relação a condição RSeT™ + DMSO. Em relação a área celular, houve um aumento da área no tratamento com DAPT em relação ao controle na condição mTeSR-1™ em normóxia, porém em hipóxia DAPT não provocou este efeito (houve apenas um aumento na condição DMSO), e também foi observado uma redução da área celular na condição RSeT™ + PD (Figura 31).

Figura 31 - Análise quantitativa de medidas morfológicas de número e área de celular utilizando o *software* CellProfiler em imagens de cada sítio (pontos pretos) das replicatas (poço) da linhagem H1 na 7ª passagem em condições de cultivo em mTeSR-1™ (normóxia e hipóxia) tratadas ou não com DAPT 2μM, e RSeT™ (hipóxia) com adição ou não de PD0325901 10 nM. Foi utilizado o teste não paramétrico ANOVA - *Kruskal-Wallis*, com *Dunn's Multiple Comparison Test* para as condições em meio mTeSR-1™ e *Mann-Whitney test* para condições com meio RSeT™, sendo: $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Analisando os fatores de pluripotência OCT4 e NANOG, verificamos que o tratamento com DAPT na condição mTeSR-1™ normóxia ocasionou um aumento da marcação de ambos, efeito que não foi acompanhado pela mesma condição em hipóxia. Houve uma pequena redução na marcação de NANOG na condição RSeT™ + PD comparado com o controle RSeT™ DMSO, porém um aumento de OCT4 (Figura 32).

Figura 32 - Análise quantitativa da intensidade de fluorescência dos marcadores de pluripotência OCT4 e NANOG utilizando o *software* CellProfiler em imagens de cada sítio (pontos pretos) das replicatas (poço) na linhagem H1 na 7ª passagem em condições de cultivo em mTeSR-1™ (normóxia e hipóxia) tratadas ou não com DAPT 2μM, e RSeT™ (hipóxia) com adição ou não de PD0325901 10 nM. Foi utilizado o teste não paramétrico ANOVA - *Kruskal-Wallis*, com *Dunn's Multiple Comparison Test* para as condições em meio mTeSR-1™ e *Mann-Whitney test* para condições com meio RSeT™, sendo: $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Como é possível observar na figura 33, o marcador *primed* CD90 sofreu uma redução da marcação com o tratamento com DAPT em ambas as condições (hipóxia e normóxia), também foi possível observar uma redução de SSEA3 em normóxia (quando comparada com controle apenas mTeSR-1™) e em hipóxia (comparado com controle DMSO). O marcador *naïve* CD7 não foi modulado, enquanto o CD130 apresentou um aumento na condição de tratamento com DAPT na condição de normóxia (comparado ao controle DMSO), porém uma redução em hipóxia, além disso o tratamento com RSeT™ + PD também provou uma redução da marcação de CD130.

Figura 33 - Análise quantitativa da intensidade de fluorescência dos marcadores de pluripotência *primed* (CD90 e SSEA3) e *naïve* (CD130 e CD7) utilizando o *software* CellProfiler em imagens de cada sítio (pontos pretos) das replicatas (poço) na linhagem H1 na 7ª passagem em condições de cultivo em mTeSR-1™ (normóxia e hipóxia) tratadas ou não com DAPT 2μM, e RSeT™ (hipóxia) com adição ou não de PD0325901 10 nM. Foi utilizado o teste não paramétrico ANOVA - Kruskal-Wallis, com Dunn's Multiple Comparison Test para as condições em meio mTeSR-1™ e Mann-Whitney test para condições com meio RSeT™, sendo: p <0,05, ** p <0,01, *** p <0,001.

Na avaliação do anticorpo H3K27me3 nós utilizamos uma abordagem para avaliar a marcação do anticorpo apenas nas células pluripotentes (OCT4 positivas). É possível observar na figura 34 que nas condições *primed* (mTeSR-1™) em normóxia houve um aumento da marcação no tratamento com DAPT, enquanto em hipóxia uma redução. Na condição *naïve* (RSeT™) o tratamento com PD também ocasionou um aumento da marcação.

Figura 34 - Análise quantitativa da intensidade de fluorescência do marcador H3K27me3 utilizando o *software CellProfiler* em imagens de cada sítio (pontos pretos) das replicatas (poço) na linhagem H1 na 7ª passagem em condições de cultivo em mTeSR-1™ (normóxia e hipóxia) tratadas ou não com DAPT 2μM, e RSeT™ (hipóxia) com adição ou não de PD0325901 10 nM. O teste estatístico utilizado foi não paramétrico *Kruskal Wallis*, e *Dunn's como pós teste*. * p <0,05, ** p <0,01, *** p <0,001.

Na abordagem com um período inicial de adaptação em cultivo apenas com RSeT™ + PD 10 nM por (4 e/ou 5) passagens, e posteriormente nas condições RSeT™ + DAPT 2 μM e RSeT™ + PD 10 nM + DAPT 2 μM, foi possível observar que o tratamento com DAPT isoladamente aumentou os transcritos de DPPA3, no entanto também das DNMTs A e B; já a condição de associação de DAPT + PD elevou os níveis dos transcritos de IL6ST e DNMT3L, ambos característicos do estado *naïve* (Figura 35), e também dos genes relacionados a sinalização de Notch, MAML3 E DLL1 (Figura 36).

Figura 35 - Gráficos representativos da expressão relativa na linhagem celular H1 na 11ª passagem em condições de cultivo com o meio RSeT™ com os inibidores PD0325901 10nM e/ou DAPT 2μM. Foram avaliados os genes *OCT4*, *NANOG*, *REX1*, *KLF4*, *DPPA3*, *IL6ST*, *NR5A2*, *OTX2*, *ZIC2* e *DNMT3A/B/L*. Foi utilizado o teste não paramétrico ANOVA - *Kruskal-Wallis*, com *Dunn's Multiple Comparison Test*. $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, com $N=3$.

Figura 36 - Gráficos representativos da expressão relativa na linhagem celular H1 na 11ª passagem em condições de cultivo com o meio RSeT™ com os inibidores PD0325901 10nM e/ou DAPT 2μM. Foram avaliados os genes *NOTCH1/2*, *HES1*, *DLL1*, *DTX1* e *MAML3*. Foi utilizado o teste não paramétrico ANOVA - *Kruskal-Wallis*, com *Dunn's Multiple Comparison Test*. $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, com $N=3$.

Na avaliação imunofenotípica, 9ª passagem houve uma redução do número de células, e um aumento da área celular. Os marcadores de pluripotência OCT4 e NANOG foram modulados positivamente em ambas as condições. Já na 10ª passagem houve uma diminuição do número de células acompanhado por uma redução da área celular em ambos os tratamentos, em linha com uma morfologia *naïve* (mais compactada). O marcador de pluripotência OCT4 permaneceu aumentado também em ambos os tratamentos, porem houve uma redução de NANOG na condição RSeT™ + DAPT (figura 37).

Figura 37 - Análise quantitativa de medidas morfológicas de número e área de celular e de intensidade de fluorescência dos marcadores de pluripotência OCT4 e NANOG utilizando o *software CellProfiler* em imagens de cada sítio (pontos pretos) das replicatas (poço) na linhagem H1 nas 9ª e 10ª passagens em condições de cultivo com o meio RSeT™ com os inibidores PD0325901 10nM e/ou DAPT 2μM. Foi utilizado o teste não paramétrico ANOVA - Kruskal-Wallis, com Dunn's Multiple Comparison Test. p <0,05, ** p <0,01, *** p <0,001.

Já em relação aos marcadores *primed*, quando comparados com a condição RSeT™ + PD a condição RSeT™ + DAPT ocasionou uma redução da marcação de CD90 na nona passagem no entanto houve um aumento na décima, enquanto SSEA3 teve um pequeno aumento na nona porém uma redução em ambas as condições na décima passagem. Nos marcadores *naïve*, houve uma modulação positiva de CD130 em ambas as condições quando comparadas ao tratamento RSeT™ + PD na nona passagem, no entantando a condição RSeT™ + DAPT + PD provocou uma pequena redução na décima, enquanto o marcador CD7 foi modulado positivamente por DAPT na nona passagem (Figura 38).

Figura 38 - Análise quantitativa da intensidade de fluorescência dos marcadores de pluripotência *primed* (CD90 e SSEA3) e *naïve* (CD130 e CD7) utilizando o *software CellProfiler* em imagens de cada sítio (pontos pretos) das replicatas (poço) na linhagem H1 nas 9ª e 10ª passagens em condições de cultivo com o meio RSeT™ com os inibidores PD0325901 10nM e/ou DAPT 2μM. Foi utilizado o teste não paramétrico ANOVA - *Kruskal-Wallis*, com *Dunn's Multiple Comparison Test*. $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Na nona passagem não houve alteração da marcação de H3K27me3, no entanto, na décima passagem nas condições com DAPT houve redução da marcação.

Figura 39 - Análise quantitativa da intensidade de fluorescência do marcador H3K27me3 utilizando o *software CellProfiler* em imagens de cada sítio (pontos pretos) das replicatas (poço) na linhagem H1 nas 9ª e 10ª passagens em condições de cultivo com o meio RSeT™ com os inibidores PD0325901 10nM e/ou DAPT 2μM. Foi utilizado

o teste não paramétrico ANOVA - *Kruskal-Wallis*, com *Dunn's Multiple Comparison Test*. $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Na 15ª passagem foi realizada uma caracterização adicional através de citometria de fluxo; nas condições mTeSR-1™, RSeT™ + PD, RSeT™ + DAPT e RSeT™ + PD + DAPT nós avaliamos o marcador *primed* CD90, e foi possível observar que a condição RSeT™ + PD + DAPT reduziu de forma significativa a quantidade de células positivas, também avaliamos os marcadores *naïve* CD7 e CD130, porém estes permaneceram sem alterações.

Figura 40 – Imagens de citometria de fluxo utilizando *software* FlowJo 10.0.4, da linhagem H1 na 15ª passagem em condições de cultivo com o meio mTeSR-1™ e RSeT™ com o inibidor PD0325901 10nM. Foram avaliados os marcadores *naïve* CD7 e CD130, e *primed* CD90.

Figura 41 – Gráfico com valores de citometria de fluxo obtidos com *software* FlowJo 10.0.4, da linhagem H1 na 15ª passagem em condições de cultivo com o meio mTeSR-1™ e RSeT™ com o inibidor PD0325901 10nM. Foram avaliados os marcadores *naïve* CD7 e CD130, e *primed* CD90.

Também foi realizada uma caracterização com diversos marcadores do estado *primed* ainda não avaliados (CD24, CD166, CD172A, CD271, CD57 e CD56) além dos marcadores clássicos que avaliamos ao longo deste trabalho, nas condições RSeT™ + PD e RSeT™ + DAPT. É possível observar em ambas as condições uma baixa marcação de CD166, CD57 e CD271, uma alta expressão de CD24; quando comparada a condição RSeT™ + PD com RSeT™ + DAPT, o marcador CD172A teve uma expressão menor (RSeT™ PD = 38,9%; RSeT™ + DAPT = 82,6), no entanto o marcador CD56 se apresentou maior (RSeT™ PD = 65,3%; RSeT™ + DAPT = 49,9).

Figura 42 – Imagens de citometria de fluxo utilizando *software* FlowJo 10.0.4, na linhagem H1 na 15ª passagem em condições de cultivo com o meio mTeSR-1™ e RSeT™ com o inibidor PD0325901 10nM. Foram avaliados os primos CD24, CD166, CD172A, CD271, CD57 e CD56.

Figura 43 – Gráfico com valores de citometria de fluxo na linhagem H1 na 15ª passagem em condições de cultivo com o meio mTeSR-1™ e RSeT™ com o inibidor PD0325901 10nM. Foram avaliados os marcadores *primed* CD24, CD166, CD172A, CD271, CD57 e CD56.

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

O destino das células durante o processo de diferenciação é determinado através das vias de sinalização atuantes neste momento. Durante a embriogênese, as células do epiblasto são induzidas a diferenciação nos três folhetos embrionários, como ectodérmico por meio da inibição de TGF β /Nodal/Activina (HAYASHI et al., 2008; HONG et al., 2011), epidérmico por meio dos sinais indutores de BMP e WNT, além da inibição das vias Notch e FGF (MACARTHUR et al., 2012; REYNOLDS et al., 2012; YING et al., 2008). *In vitro* o processo de diferenciação pode ser direcionado ou inibido por meio de moduladores das vias de sinalização que o regulam. Um exemplo desta alteração é a via WNT que, quando ativada promove diferenciação com propensão ao mesoderma, por outro lado, quando inibida pode favorecer a permanência no estado pluripotente ou promover a diferenciação para o tecido ectodérmico (MURAYAMA et al., 2015; SUGIMOTO et al., 2015; TSAKIRIDIS et al., 2014).

Como já mencionado (item 1.2 deste trabalho), em camundongos, células presentes na ICM (pré-implantação) e no epiblasto (pós-implantação) apresentam diferenças morfológicas, transcricionais, epigenéticas e metabólicas, assim como hESCs nos estados *naïve* e *primed*; fatores estes que podem influenciar o processo de diferenciação. Murayama e colaboradores ressaltam que, no estado *primed* tais células apresentam maior tendência à diferenciação, sugerindo que populações destas células respondam preferencialmente a vias de sinalização específicas, impulsionando o processo de diferenciação para determinadas linhagens (MURAYAMA et al., 2015; SUGIMOTO et al., 2015; SUMI et al., 2013; TSAKIRIDIS et al., 2014).

Como citado anteriormente (item 1.3), o uso de inibidores das vias MEK/ERK (PD0325901) e de GSK3 β (CHIR99021), conhecido como 2i, proporcionaram uma condição de cultivo celular capaz de manter mESCs em cultura em seu chamado “*Ground State of Pluripotency*”, posteriormente caracterizado como o estado *naïve* (NICHOLS et al., 2009; SIM et al., 2017; YING et al., 2008), direcionando diversos estudos na busca por uma condição de cultivo *in vitro* capaz de reverter e manter hESCs no estado *naïve* (CHAN et al., 2013; THEUNISSEN et al., 2014; ZIMMERLIN et al., 2017).

Dessa forma, tendo como base o trabalho de Zimmerlin e colaboradores (2016), buscamos adaptar o referido protocolo (MÉTODO LIF-5i/3i) com inibidores das vias MEK/ERK, GSK-3 β e Tankyrase (3i), além de moduladores de PKA/cAMP e Hedgehog (5i), e em condição *feeder free*, com uso de matriz extracelular Matrigel.

Utilizando a linhagem embrionária H9, inicialmente testamos o método LIF-5i/3i com o meio basal mTeSR-1™, meio utilizado para cultivo de células *primed* (contendo β FGF e TGF β), sendo observadas alterações concordantes com um perfil *naïve* (aumento do transcrito de KLF4, redução de CD90 e SSEA3); no entanto, alguns efeitos não foram constantes entre as passagens (aumento de DPPA3 e redução de OTX e DNMTA e B). Estes resultados nos permitiram observar que o conjunto de inibidores utilizado em associação com o meio mTeSR-1™, induziu pequenas alterações condizentes com a transição *primed/naïve*, porém foram transientes entre as passagens, além de produzir alguns efeitos contrários ao esperado no processo de transição.

O mesmo protocolo foi testado com o meio DMEM/F-12 (sem os componentes β FGF e TGF β) nas linhagens H9 e H1, porém não demonstrou ser uma boa condição de cultivo. Esses dados nos indicam que apenas este tratamento não seria capaz de manter a sobrevivência das células na ausência dos componentes β FGF e TGF β em condição *feeder free*, característica de células *naïve* (GAFNI et al., 2013; LANNER; ROSSANT, 2010; VALLIER; ALEXANDER; PEDERSEN, 2005).

Observando alterações morfológicas condizentes com células do estado *naïve*, além do aumento dos marcadores OCT4 e NANOG, Ward e colaboradores (2017) relataram um protocolo em condição *feeder free* com utilização da matriz vitronectina e do meio comercial RSeT™ (WARD et al., 2017). Do mesmo modo, com uso do meio RSeT™ em linhagem H9, observamos alterações morfológicas consistentes com o estado *naïve*, aumento dos transcritos de DPPA3 e KLF4, além de redução de ZIC2. Contudo, contrário ao observado por Ward, obtivemos pequena redução de NANOG e aumento do marcador *primed*, OTX2; em avaliação posterior, por meio de citometria de fluxo, observamos redução bastante significativa dos marcadores *primed* CD90 e CD175, com redução menos significativa em passagem subsequente, porém, com perfil semelhante entre as passagens. Estes resultados, somados à capacidade de sobrevivência em passagens com células únicas e na ausência de β FGF e TGF β , indicam melhor potencial para promover o processo de transição *primed naïve* dos que os testados anteriormente.

Com o intuito de avaliarmos se, além da indução de características *naïve*, o cultivo com o meio RSeT™ também estaria interferindo na sinalização de Notch, avaliamos a expressão de genes relacionados a esta via, na qual verificamos uma redução nos transcritos de NOTCH1 e HES1, sendo indicativo de possível relação entre o processo de transição *primed/naïve* e atuação da sinalização de Notch.

A via de sinalização de Notch atua em diversos processos do desenvolvimento, sendo fundamental durante a diferenciação celular (ANDROUTSELLIS-THEOTOKIS et al., 2006; KAGEYAMA; OHTSUKA; KOBAYASHI, 2007; KOBAYASHI; KAGEYAMA, 2010; KOBAYASHI et al., 2009; KOCH et al., 2013; RAYON et al., 2014); no entanto, durante o período pré-implantação seu papel ainda não é totalmente elucidado.

Recentemente, um estudo desenvolvido por nosso grupo demonstrou que o miR-363 auxilia a manutenção da pluripotência, inibindo a diferenciação por meio da inibição de componentes da sinalização de Notch (NOTCH1 e PSEN1), mecanismo que pode estar envolvido na transição entre os estados *primed* e *naïve* (DE SOUZA LIMA et al., 2019).

Para investigar esta relação de forma mais direta, inibimos a sinalização de Notch em hESCs (H9) cultivadas em condição de cultura *primed* (mTeSR-1™), e observamos que apenas a inibição de Notch, mesmo na presença dos componentes β FGF e TGF β , foi capaz de aumentar o transcrito de DPPA3, além da redução de CD90; resultados também obtidos nos experimentos com o método LIF-5i/3i e com o meio RSeT™. Outro resultado observado foi a contraditória redução do marcador *naïve* CD130, também observado nos métodos testados anteriormente (LIF-5i-3i e RSeT™). Porém, o tratamento com DAPT promoveu aumento do marcador *naïve* CD7, efeito este não observado nos demais métodos. Visto que grande parte dos protocolos utilizados para reversão *primed/naïve* abordam diversas vias de sinalização (Ex. MEK/ERK, GSK-3 β , Tankyrase, PKA/cAMP e Hedgehog), nossos resultados demonstram que apenas a inibição de Notch foi capaz de produzir efeitos indicativos desse processo.

Repetindo o protocolo de inibição de Notch por um maior período, na linhagem H1, com uso do meio mTeSR-1™, e em paralelo com o cultivo em RSeT™, observamos que esta condição em hipóxia demonstrou uma tendência em se aproximar da condição de cultivo *naïve* (RSeT™), com redução de CD90 e aumento do transcrito DPPA3.

O inibidor da sinalização de ERK, PD325901, classicamente já utilizado nos protocolos de reversão 2i, foi apresentado como capaz de, em associação com o meio RSeT™, otimizar este processo de transição (WARD et al., 2017), resultado também encontrado no nosso estudo onde, comparado com apenas RSeT™ + DMSO, ocasionou aumento da marcação de OCT4 e NANOG, e dos transcritos de KLF4, DPPA3 e IL6ST na linhagem de hESCs H1.

Assim, buscando estabelecer um protocolo de transição mais eficiente, utilizando a linhagem de hESC (H1), testamos uma condição de cultivo com período de adaptação inicial em RSeT™ + PD e, posteriormente, substituído para RSeT™ + DAPT ou RSeT™ + PD + DAPT. Ambos os tratamentos aumentaram a expressão de genes associados ao estado *naïve* quando comparados com RSeT™ + PD, além de um aumento da marcação de OCT4 nas duas

passagens avaliadas; RSeTTM + DAPT elevou os níveis dos transcritos de genes associados ao estado *naïve*, DPPA3, NR2A5, KLF4 e IL6ST, estes dois últimos também observados na condição RSeT/DAPT/PD, além de uma redução do transcrito de HES1, alvo da sinalização de Notch. Curiosamente, os transcritos de DNMTA e B tiveram aumento na condição RSeT/DAPT, no entanto DNMTL apresentou-se significativamente aumentado.

Embora seja claro que, como mencionado, existem diversas propriedades específicas de células *naïve* e *primed*, e muitos estudos buscando características para identificar essas populações celulares (COLLIER et al., 2017; COLLIER; RUGG-GUNN, 2018; LIU et al., 2017), as redes transcricionais que regulam este processo ainda não estão totalmente esclarecidas (WARE, 2017; WEINBERGER et al., 2016).

Alguns estudos demonstram que existe uma variabilidade entre populações nos diferentes estados de pluripotência (KLEIN et al., 2015; KUMAR et al., 2014). Enquanto alguns genes possuem um perfil característico em cada estado, por exemplo, DPPA3, atuante no processo de diferenciação de ESC em células germinativas primordiais (PGCs), sendo notoriamente associado ao estado *naïve* (TESAR et al., 2007; WEINBERGER et al., 2016), e significativamente aumentado em todas condições de cultivo *naïve* que exploramos, inclusive na inibição da sinalização de Notch. Outras redes de regulação genica podem apresentar variações, por exemplo KLF4, embora já tenha sido descrito como um marcador de pluripotência (de ambos estados) (JIANG et al., 2008; LI et al., 2005; NAKAMURA et al., 2016), neste trabalho foi observado um aumento de sua expressão em condições de cultivo *naïve*, assim como relatado em outros estudos (GUO et al., 2009; MESSMER et al., 2019; WEINBERGER et al., 2016).

Além da variação transcricional, a assinatura epigenética é bastante distinta entre os estados *naïve* e *primed*. Em mESCs (*naïve*) diversos promotores encontram-se hipometilados, de forma que a metilação do DNA aumenta em mEpiSC (*primed*), tornando-se estável em células totalmente diferenciadas (BORGEL et al., 2010). Porém, também nesse aspecto, Rulands e colaboradores (2018) demonstraram uma dinâmica oscilatória da metilação genômica do DNA durante a transição do estado *naïve* para *primed*, com grande heterogeneidade entre populações de células *primed* (RULANDS et al., 2018).

Entre os responsáveis pelo controle epigenético nesta transição estão as enzimas metiltransferases de DNA (Dnmts), principalmente da família Dnmt3, responsáveis pela metilação *de novo*. (BESTOR, 2000; JURKOWSKA; JURKOWSKI; JELTSCH, 2011). Durante o processo de reversão *in vitro*, diversos estudos observaram uma redução da expressão das DNMTs A e B (LEE, H. J.; HORE; REIK, 2014; TAKASHIMA et al., 2015; TOSOLINI

et al., 2018), enquanto DNMT3L é relatada como altamente expressa em mESCs, e seu nível diminui com o decorrer do processo de diferenciação. Seu papel foi demonstrado durante a diferenciação de ESC em células germinativas primordiais (PGCs), assim como DPPA3, de forma que ambos são altamente expressos no estado *naïve*, considerados marcadores deste estado (GUO et al., 2017; MESSMER et al., 2019; NERI et al., 2013).

Embora no nosso estudo a expressão de DNMT3A/B tenha sido variada de acordo com as condições testadas, quando avaliamos a expressão de DNMT3L não foi possível identificar níveis de seu transcrito em condições de cultivo *primed* (mTeSR-1™) em normóxia e apenas em pequenas quantidades em hipóxia, havendo uma tendência a ser aumentado na condição com inibidor da sinalização de Notch já, nas condições *naïve* foi constatado sua expressão, também, de forma mais significativa nas condições com o inibidor da sinalização de Notch.

Em um estudo recente, Menchero e colaboradores (2019) demonstraram que os níveis de expressão de marcadores de pluripotência *naïve*, PRDM14 e DPPA3, se correlacionavam negativamente com a atividade de Notch, de forma que repressores que bloqueiam estes marcadores são alvos desta sinalização. Em linha com estes achados, no nosso estudo foi possível observar que a inibição da sinalização de Notch ocasionou um aumento dos transcritos de DPPA3. Ainda no estudo desenvolvido por Menchero, é sugerido que Notch age promovendo a perda gradual de pluripotência no embrião inicial, sendo posteriormente reforçada por mecanismos adicionais, como a formação de heterocromatina antes do estágio da mórula, também de acordo com nossos dados onde a inibição de Notch está relacionado com aumento da expressão de DNMT3L e com a diminuição da marcação de H3K27me3 (MENCHERO et al., 2019).

Ao longo dos últimos anos, diversos protocolos usando diferentes indutores/inibidores foram desenvolvidos com intuito de reverter células do estado *primed* para o estado *naïve* de pluripotência *in vitro*. À luz disso, levantou-se a questão da possibilidade da existência de várias vias pelas quais uma célula possa ser redefinida ou mantida em um estado *naïve* (KILENS et al., 2018; LINNEBERG-AGERHOLM et al., 2019). As análises de algumas populações de hESCs em cultura tem demonstrado uma instabilidade e interconvertibilidade entre as condições *primed* e *naïve*, de forma que uma composição mista e dinâmica dessas culturas pode obscurecer os limites que permitem caracterizar os dois estados (SMITH, 2017). Nós obtivemos diferentes alterações de acordo com os métodos explorados neste trabalho, no entanto nossos dados demonstram que a inibição desta sinalização favorece uma condição de cultivo que induz as células para um perfil *naïve*.

Messmer e colaboradores levantaram a ideia de possíveis relações de co-regulação por meio de correlações gene-gene dentro de cada população, principalmente moduladores epigenéticos, visto seu importante papel durante o desenvolvimento embrionário inicial, indicando que a expressão da maquinaria epigenética estaria ligada à rede de expressão gênica *naïve*, sobretudo aos reguladores relacionados a metilação *de novo* do DNA por histonas. Como um todo, apesar do mecanismo pelo qual a sinalização de Notch atua sobre o processo de transição *primed/naïve* ainda não ser totalmente elucidado, nossos dados sugerem que sua inibição promove aumento da expressão de genes que regulam o processo epigenético, visto que sua inibição (em meio RSeT™ e mTeSR-1™ em hipóxia) aumentou a expressão do transcrito DNMT3L e diminuiu a marcação de H3K27me3, importantes reguladores deste processo, e simultaneamente aumentando a expressão de genes relacionados ao estado *naïve* como DPPA3.

CONCLUSÃO

7. CONCLUSÃO

Diferente de algumas vias de sinalização envolvidas no processo de diferenciação e de transição *naïve/primed* (Ex. TGF β /Nodal/Activina/BMP/WNT/FGF), com papéis conhecidos e já utilizadas para estabelecimento de condições de cultivo que favorecem o estado *naïve*, a sinalização de Notch segue menos explorada neste contexto. Nossos dados demonstram que a inibição da sinalização de Notch regula positivamente a rede transcricional relacionada ao estado *naïve*, incluindo DPPA3 e DNMT3L, que pode estar modulando a regulação epigenética, visto uma diminuição de H3K27me3, levando estas células para um estado mais próximo à pluripotência *naïve*. Demonstramos, ainda, que a associação de uma droga inibidora da sinalização de Notch (DAPT), com o meio de cultivo RSeT™, foi capaz de produzir efeitos mais significativos para o processo de reversão de hESCs do estado *primed* para *naïve*, podendo ser explorada como um método mais eficaz para o processo de transição *primed/naïve in vitro*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8. Referências Bibliográficas

- ANDERSSON, E. R.; SANDBERG, R.; LENDAHL, U. Notch signaling: simplicity in design, versatility in function. **Development**, v. 138, n. 17, p. 3593-612, Sep 2011.
- ANDREWS, P. W. From teratocarcinomas to embryonic stem cells. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, v. 357, n. 1420, p. 405-17, Apr 29 2002.
- ANDROUTSELLIS-THEOTOKIS, A. et al. Notch signalling regulates stem cell numbers in vitro and in vivo. **Nature**, v. 442, n. 7104, p. 823-6, Aug 17 2006.
- ANNAB, L. A. et al. Differential responses to retinoic acid and endocrine disruptor compounds of subpopulations within human embryonic stem cell lines. **Differentiation**, v. 84, n. 4, p. 330-43, Nov 2012.
- BAO, S. et al. Epigenetic reversion of post-implantation epiblast to pluripotent embryonic stem cells. **Nature**, v. 461, n. 7268, p. 1292-5, Oct 29 2009.
- BARTEL, D. P. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. **Cell**, v. 136, n. 2, p. 215-33, Jan 23 2009.
- BESTOR, T. H. The DNA methyltransferases of mammals. **Hum Mol Genet**, v. 9, n. 16, p. 2395-402, Oct 2000.
- BORGEL, J. et al. Targets and dynamics of promoter DNA methylation during early mouse development. **Nat Genet**, v. 42, n. 12, p. 1093-100, Dec 2010.
- BOROVIAK, T. et al. The ability of inner-cell-mass cells to self-renew as embryonic stem cells is acquired following epiblast specification. **Nat Cell Biol**, v. 16, n. 6, p. 516-28, Jun 2014.
- BOUCHER, J.; GRIDLEY, T.; LIAW, L. Molecular pathways of notch signaling in vascular smooth muscle cells. **Front Physiol**, v. 3, p. 81, 2012.
- BRONS, I. G. et al. Derivation of pluripotent epiblast stem cells from mammalian embryos. **Nature**, v. 448, n. 7150, p. 191-5, Jul 12 2007.
- BRONS, I. G. M. et al. Derivation of pluripotent epiblast stem cells from mammalian embryos. **Nature**, v. 448, p. 191, 06/27/online 2007.
- CHAN, Y. S. et al. Induction of a human pluripotent state with distinct regulatory circuitry that resembles preimplantation epiblast. **Cell Stem Cell**, v. 13, n. 6, p. 663-75, Dec 5 2013.
- CHAZAUD, C.; YAMANAKA, Y. Lineage specification in the mouse preimplantation embryo. **Development**, v. 143, n. 7, p. 1063-74, Apr 1 2016.

- CHOI, H. W. et al. Mitochondrial and metabolic remodeling during reprogramming and differentiation of the reprogrammed cells. **Stem Cells Dev**, v. 24, n. 11, p. 1366-73, Jun 1 2015.
- COLLIER, A. J. et al. Comprehensive Cell Surface Protein Profiling Identifies Specific Markers of Human *Naïve* and *Primed* Pluripotent States. **Cell Stem Cell**, v. 20, n. 6, p. 874-890 e7, Jun 1 2017.
- COLLIER, A. J.; RUGG-GUNN, P. J. Identifying Human *Naïve* Pluripotent Stem Cells - Evaluating State-Specific Reporter Lines and Cell-Surface Markers. **Bioessays**, v. 40, n. 5, p. e1700239, May 2018.
- CONDIC, M. L. Totipotency: what it is and what it is not. **Stem Cells Dev**, v. 23, n. 8, p. 796-812, Apr 15 2014.
- DE PAEPE, C. et al. Totipotency and lineage segregation in the human embryo. **Mol Hum Reprod**, v. 20, n. 7, p. 599-618, Jul 2014.
- DE SOUZA LIMA, I. M. et al. High-content screen in human pluripotent cells identifies miRNA-regulated pathways controlling pluripotency and differentiation. **Stem Cell Res Ther**, v. 10, n. 1, p. 202, Jul 8 2019.
- DU, P. et al. An Intermediate Pluripotent State Controlled by MicroRNAs Is Required for the *Naïve*-to-*Primed* Stem Cell Transition. **Cell Stem Cell**, v. 22, n. 6, p. 851-864 e5, Jun 1 2018.
- EVANS, M. J.; KAUFMAN, M. H. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. **Nature**, v. 292, n. 5819, p. 154-156, 1981.
- GAFNI, O. et al. Derivation of novel human ground state *naïve* pluripotent stem cells. **Nature**, v. 504, n. 7479, p. 282-6, Dec 12 2013.
- GREBER, B. et al. Conserved and divergent roles of FGF signaling in mouse epiblast stem cells and human embryonic stem cells. **Cell Stem Cell**, v. 6, n. 3, p. 215-26, Mar 5 2010.
- GUO, G. et al. Epigenetic resetting of human pluripotency. **Development**, v. 144, n. 15, p. 2748-2763, Aug 1 2017.
- GUO, G. et al. Klf4 reverts developmentally programmed restriction of ground state pluripotency. **Development**, v. 136, n. 7, p. 1063-9, Apr 2009.
- HANNA, J. H.; SAHA, K.; JAENISCH, R. Pluripotency and cellular reprogramming: facts, hypotheses, unresolved issues. **Cell**, v. 143, n. 4, p. 508-25, Nov 12 2010.
- HAYASHI, K. et al. Dynamic equilibrium and heterogeneity of mouse pluripotent stem cells with distinct functional and epigenetic states. **Cell Stem Cell**, v. 3, n. 4, p. 391-401, Oct 9 2008.
- HONG, S. H. et al. Cell fate potential of human pluripotent stem cells is encoded by histone modifications. **Cell Stem Cell**, v. 9, n. 1, p. 24-36, Jul 8 2011.
- JIANG, J. et al. A core Klf circuitry regulates self-renewal of embryonic stem cells. **Nat Cell Biol**, v. 10, n. 3, p. 353-60, Mar 2008.

JURKOWSKA, R. Z.; JURKOWSKI, T. P.; JELTSCH, A. Structure and function of mammalian DNA methyltransferases. **Chembiochem**, v. 12, n. 2, p. 206-22, Jan 24 2011.

KAGEYAMA, R.; OHTSUKA, T.; KOBAYASHI, T. The Hes gene family: repressors and oscillators that orchestrate embryogenesis. **Development**, v. 134, n. 7, p. 1243-51, Apr 2007.

KANG, Y. et al. Improving Cell Survival in Injected Embryos Allows *Primed* Pluripotent Stem Cells to Generate Chimeric Cynomolgus Monkeys. **Cell Rep**, v. 25, n. 9, p. 2563-2576 e9, Nov 27 2018.

KILENS, S. et al. Parallel derivation of isogenic human *primed* and *naïve* induced pluripotent stem cells. **Nat Commun**, v. 9, n. 1, p. 360, Jan 24 2018.

KINOSHITA, M.; SMITH, A. Pluripotency Deconstructed. **Dev Growth Differ**, v. 60, n. 1, p. 44-52, Jan 2018.

KLEIN, A. M. et al. Droplet barcoding for single-cell transcriptomics applied to embryonic stem cells. **Cell**, v. 161, n. 5, p. 1187-1201, May 21 2015.

KOBAYASHI, T.; KAGEYAMA, R. Hes1 oscillation: making variable choices for stem cell differentiation. **Cell Cycle**, v. 9, n. 2, p. 207-8, Jan 15 2010.

KOBAYASHI, T. et al. The cyclic gene Hes1 contributes to diverse differentiation responses of embryonic stem cells. **Genes Dev**, v. 23, n. 16, p. 1870-5, Aug 15 2009.

KOCH, U.; LEHAL, R.; RADTKE, F. Stem cells living with a Notch. **Development**, v. 140, n. 4, p. 689-704, Feb 2013.

KORNILOVA, A. Y.; DAS, C.; WOLFE, M. S. Differential effects of inhibitors on the gamma-secretase complex. Mechanistic implications. **J Biol Chem**, v. 278, n. 19, p. 16470-3, May 9 2003.

KUMAR, R. M. et al. Deconstructing transcriptional heterogeneity in pluripotent stem cells. **Nature**, v. 516, n. 7529, p. 56-61, Dec 4 2014.

LANNER, F.; ROSSANT, J. The role of FGF/Erk signaling in pluripotent cells. **Development**, v. 137, n. 20, p. 3351-60, Oct 2010.

LEE, H. J.; HORE, T. A.; REIK, W. Reprogramming the methylome: erasing memory and creating diversity. **Cell Stem Cell**, v. 14, n. 6, p. 710-9, Jun 5 2014.

LEE, Y. J. et al. Dissecting microRNA-mediated regulation of stemness, reprogramming, and pluripotency. **Cell Regen (Lond)**, v. 5, p. 2, 2016.

LI, Y. et al. Murine embryonic stem cell differentiation is promoted by SOCS-3 and inhibited by the zinc finger transcription factor Klf4. **Blood**, v. 105, n. 2, p. 635-7, Jan 15 2005.

LINNEBERG-AGERHOLM, M. et al. *Naïve* human pluripotent stem cells respond to Wnt, Nodal and LIF signalling to produce expandable *naïve* extra-embryonic endoderm. **Development**, v. 146, n. 24, Dec 16 2019.

LIU, X. et al. Comprehensive characterization of distinct states of human *naïve* pluripotency generated by reprogramming. **Nat Methods**, v. 14, n. 11, p. 1055-1062, Nov 2017.

MACARTHUR, B. D. et al. Nanog-dependent feedback loops regulate murine embryonic stem cell heterogeneity. **Nat Cell Biol**, v. 14, n. 11, p. 1139-47, Nov 2012.

MARGUERON, R.; REINBERG, D. The Polycomb complex PRC2 and its mark in life. **Nature**, v. 469, n. 7330, p. 343-9, Jan 20 2011.

MARTIN, G. R. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 78, n. 12, p. 7634-7638, 1981.

MASCETTI, V. L.; PEDERSEN, R. A. Contributions of Mammalian Chimeras to Pluripotent Stem Cell Research. **Cell Stem Cell**, v. 19, n. 2, p. 163-175, Aug 4 2016.

MATHIEU, J.; RUOHOLA-BAKER, H. Metabolic remodeling during the loss and acquisition of pluripotency. **Development**, v. 144, n. 4, p. 541-551, Feb 15 2017.

MATSUDA, T. et al. STAT3 activation is sufficient to maintain an undifferentiated state of mouse embryonic stem cells. **EMBO J**, v. 18, n. 15, p. 4261-9, Aug 2 1999.

MAZUMDAR, J.; DONDETI, V.; SIMON, M. C. Hypoxia-inducible factors in stem cells and cancer. **J Cell Mol Med**, v. 13, n. 11-12, p. 4319-28, Nov-Dec 2009.

MENCHERO, S. et al. Signaling pathways in mammalian preimplantation development: Linking cellular phenotypes to lineage decisions. **Dev Dyn**, v. 246, n. 4, p. 245-261, Apr 2017.

MENCHERO, S. et al. Transitions in cell potency during early mouse development are driven by Notch. **Elife**, v. 8, Apr 8 2019.

MESSMER, T. et al. Transcriptional Heterogeneity in *Naïve* and *Primed* Human Pluripotent Stem Cells at Single-Cell Resolution. **Cell Rep**, v. 26, n. 4, p. 815-824 e4, Jan 22 2019.

MURAYAMA, H. et al. Successful reprogramming of epiblast stem cells by blocking nuclear localization of beta-catenin. **Stem Cell Reports**, v. 4, n. 1, p. 103-113, Jan 13 2015.

NAKAMURA, T. et al. A developmental coordinate of pluripotency among mice, monkeys and humans. **Nature**, v. 537, n. 7618, p. 57-62, Sep 1 2016.

NERI, F. et al. Dnmt3L antagonizes DNA methylation at bivalent promoters and favors DNA methylation at gene bodies in ESCs. **Cell**, v. 155, n. 1, p. 121-34, Sep 26 2013.

NICHOLS, J. et al. Suppression of Erk signalling promotes ground state pluripotency in the mouse embryo. **Development**, v. 136, n. 19, p. 3215-22, Oct 2009.

- NICHOLS, J.; SMITH, A. Naive and *primed* pluripotent states. **Cell Stem Cell**, v. 4, n. 6, p. 487-92, Jun 5 2009.
- NIWA, H. et al. Self-renewal of pluripotent embryonic stem cells is mediated via activation of STAT3. **Genes Dev**, v. 12, n. 13, p. 2048-60, Jul 1 1998.
- PARK, T. S. et al. Chemical Reversion of Conventional Human Pluripotent Stem Cells to a *Naïve*-like State with Improved Multilineage Differentiation Potency. **J Vis Exp**, n. 136, Jun 10 2018.
- PASTOR, W. A. et al. *Naïve* Human Pluripotent Cells Feature a Methylation Landscape Devoid of Blastocyst or Germline Memory. **Cell Stem Cell**, v. 18, n. 3, p. 323-329, Mar 3 2016.
- PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic acids research**, v. 29, n. 9, p. e45-e45, 2001.
- RAYON, T. et al. Notch and hippo converge on Cdx2 to specify the trophectoderm lineage in the mouse blastocyst. **Dev Cell**, v. 30, n. 4, p. 410-22, Aug 25 2014.
- REICHRATH, J.; REICHRATH, S. Notch-signaling and nonmelanoma skin cancer: an ancient friend, revisited. **Adv Exp Med Biol**, v. 727, p. 265-71, 2012.
- REYNOLDS, N. et al. NuRD suppresses pluripotency gene expression to promote transcriptional heterogeneity and lineage commitment. **Cell Stem Cell**, v. 10, n. 5, p. 583-94, May 4 2012.
- ROTTIERS, V.; NAAR, A. M. MicroRNAs in metabolism and metabolic disorders. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 13, n. 4, p. 239-50, Mar 22 2012.
- RULANDS, S. et al. Genome-Scale Oscillations in DNA Methylation during Exit from Pluripotency. **Cell Syst**, v. 7, n. 1, p. 63-76 e12, Jul 25 2018.
- SIM, Y. J. et al. 2i Maintains a *Naïve* Ground State in ESCs through Two Distinct Epigenetic Mechanisms. **Stem Cell Reports**, v. 8, n. 5, p. 1312-1328, May 9 2017.
- SMITH, A. Formative pluripotency: the executive phase in a developmental continuum. **Development**, v. 144, n. 3, p. 365-373, Feb 1 2017.
- STADLER, B. et al. Characterization of microRNAs involved in embryonic stem cell states. **Stem Cells Dev**, v. 19, n. 7, p. 935-50, Jul 2010.
- SUGIMOTO, M. et al. A simple and robust method for establishing homogeneous mouse epiblast stem cell lines by wnt inhibition. **Stem Cell Reports**, v. 4, n. 4, p. 744-57, Apr 14 2015.
- SUMI, T. et al. Epiblast ground state is controlled by canonical Wnt/beta-catenin signaling in the postimplantation mouse embryo and epiblast stem cells. **PLoS One**, v. 8, n. 5, p. e63378, 2013.
- TAKASHIMA, Y. et al. Resetting Transcription Factor Control Circuitry toward Ground-State Pluripotency in Human. **Cell**, v. 162, n. 2, p. 452-453, Jul 16 2015.

TAY, Y. et al. MicroRNAs to Nanog, Oct4 and Sox2 coding regions modulate embryonic stem cell differentiation. **Nature**, v. 455, n. 7216, p. 1124-8, Oct 23 2008.

TESAR, P. J. et al. New cell lines from mouse epiblast share defining features with human embryonic stem cells. **Nature**, v. 448, n. 7150, p. 196-9, Jul 12 2007.

THEUNISSEN, T. W. et al. Systematic identification of culture conditions for induction and maintenance of *naïve* human pluripotency. **Cell Stem Cell**, v. 15, n. 4, p. 471-487, Oct 2 2014.

THOMSON, J. A. et al. Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts. **Science**, v. 282, n. 5391, p. 1145-1147, 1998.

TOSOLINI, M. et al. Contrasting epigenetic states of heterochromatin in the different types of mouse pluripotent stem cells. **Sci Rep**, v. 8, n. 1, p. 5776, Apr 10 2018.

TSAKIRIDIS, A. et al. Distinct Wnt-driven primitive streak-like populations reflect in vivo lineage precursors. **Development**, v. 141, n. 6, p. 1209-21, Mar 2014.

VALLIER, L.; ALEXANDER, M.; PEDERSEN, R. A. Activin/Nodal and FGF pathways cooperate to maintain pluripotency of human embryonic stem cells. **J Cell Sci**, v. 118, n. Pt 19, p. 4495-509, Oct 1 2005.

VAN DEN BERG, D. L. et al. An Oct4-centered protein interaction network in embryonic stem cells. **Cell Stem Cell**, v. 6, n. 4, p. 369-81, Apr 2 2010.

WARD, E.; TWAROSKI, K.; TOLAR, J. Feeder-Free Derivation of *Naïve* Human Pluripotent Stem Cells. **Stem Cells Dev**, v. 26, n. 15, p. 1087-1089, Aug 1 2017.

WARE, C. B. Concise Review: Lessons from *Naïve* Human Pluripotent Cells. **Stem Cells**, v. 35, n. 1, p. 35-41, Jan 2017.

WARE, C. B. et al. Derivation of *naïve* human embryonic stem cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 111, n. 12, p. 4484-9, Mar 25 2014.

WEINBERGER, L. et al. Dynamic stem cell states: *naïve* to *primed* pluripotency in rodents and humans. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 17, n. 3, p. 155-69, Mar 2016.

WILLIAMS, R. L. et al. Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. **Nature**, v. 336, n. 6200, p. 684-7, Dec 15 1988.

XU, N. et al. MicroRNA-145 regulates OCT4, SOX2, and KLF4 and represses pluripotency in human embryonic stem cells. **Cell**, v. 137, n. 4, p. 647-58, May 15 2009.

YING, Q. L. et al. BMP induction of Id proteins suppresses differentiation and sustains embryonic stem cell self-renewal in collaboration with STAT3. **Cell**, v. 115, n. 3, p. 281-92, Oct 31 2003.

YING, Q. L. et al. The ground state of embryonic stem cell self-renewal. **Nature**, v. 453, n. 7194, p. 519-23, May 22 2008.

YU, X. et al. Notch signaling activation in human embryonic stem cells is required for embryonic, but not trophoblastic, lineage commitment. **Cell Stem Cell**, v. 2, n. 5, p. 461-71, May 8 2008.

ZIMMERLIN, L. et al. Tankyrase inhibition promotes a stable human *naïve* pluripotent state with improved functionality. **Development**, v. 143, n. 23, p. 4368-4380, Dec 1 2016.

ZIMMERLIN, L.; PARK, T. S.; ZAMBIDIS, E. T. Capturing Human *Naïve* Pluripotency in the Embryo and in the Dish. **Stem Cells Dev**, v. 26, n. 16, p. 1141-1161, Aug 15 2017.

ANEXOS

Tabela 1 – Primers, concentrações e condições de ciclagem para os genes utilizados no trabalho:

Primers			
Gene	Sequência do Primer (5' – 3')	Concentração	TM
DLL1	F: CTAAGTGCACAGAGCCGATC R: GATAGCGGATACACTCGTCAC	0,13 µM	62
DNMT3A	F: GGAGAAGCCCAAGGTCAAG R: TTCCAGGGTAACATTGAGGC	0,4 µM	62
DNMT3B	F: CCCATTTCGAGTCCTGTCATTG R: TTGATATTCCCCTCGTGCTTC	0,4 µM	62
DNMT3L	F: TTCGATCTTGTGTACGGCG R: TGTCCACGAACATCCAGAAG	0,13 µM	62
DPPA3	F: TCGAAGATGAGTGGCTTTACAG R: CTTAACTCCCTTAGGCTCCTTG	0,06 µM	62
DTX1	F: AGTTCACCGCAAGAGGATTC R: GTGCCGATAGTGAAGATGAGTC	0,13 µM	62
GAPDH	F: GAAGGTGAAGGTCGGAGTC R: GAAGATGGTGATGGGATTTC	0,26 µM (0,4	60
IL6ST	F: GCAACATTCTTACATTCGGACAG R: TCCCCTCACACCTCATTTTC	0,18 µM	62,5
KLF4	F: GATGAACTGACCAGGCACTA R: GTGGGTCATATCCACTGTCT	0,4 µM	60
MAML3	F: CAGCAATCACATCTACCCCG R: TGACGTTTCGCATGCTCTG	0,13 µM	62.
NANOG	F: GAAATACCTCAGCCTCCAGC R: GCGTCACACCATTGCTATTC	0,4 µM	62
NOTCH1	F: TGCCTGGACAAGATCAATGAG R: CAGGTGTAAGTGTGGGTCC	0,06 µM	62
NOTCH2	F: CATGGAACTGTACTGGAGGTC R: TCTGGCATGGATTTCGAAAGG	0,13 µM	62,5
NR5A2	F: AATCCTCGACCACATTTACCG R: CACTAACTCCTGTGCATGACTC	0,26 µM	62
OCT4	F: GAGAATTTGTTCTGTCAGTGC R: TCGTTGTGCATAGTCGCTG	0,4 µM	62
OTX2	F: CCAGACATCTTCATGCGAGAG R: GGCAGGTCTCACTTTGTTTTG	0,13 µM	62
ZFP42 (REX1)	F: GGGAAATTCAGACCTAACCATCG R: TAGTGATCTGAGTAAGCTGTCTTC	0,13 µM	62
ZIC2	F: TCAAGATCCACAAAAGGACCC R: CTTGCAGAGATAGGGCTTATCG	0,06 µM	62
Sondas			
Gene			
HEY1	Hs00232618_m1		