UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA

SARAH BLIMA PAULINO LEITE

**Papel do miR-29a na regulação epigenética de células pluripotentes
humanas**

Ribeirão Preto

2017

SARAH BLIMA PAULINO LEITE

Papel do miR-29a na regulação epigenética de células pluripotentes humanas

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte dos pré-requisitos para obtenção do título de Doutora em Genética.

Área de concentração: Genética

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Alexandre Panepucci

Ribeirão Preto

2017

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Leite, Sarah Blima Paulino

Papel do miR-29a na regulação epigenética de células pluripotentes humanas. Ribeirão Preto, 2017.

150 p. : il. ; 30 cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Genética.

Orientador: Panepucci, Rodrigo Alexandre.

1. Pluripotência. 2. Família miR-29. 3. Metilação do DNA. 4. Desmetilação do DNA.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Sarah Blima Paulino Leite

Papel do miR-29a na regulação epigenética de células pluripotentes humanas

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte dos pré-requisitos para obtenção do título de Doutor em Genética.

Área de concentração: Genética

Aprovado em: ____ / ____ / ____

Banca Examinadora:

Prof. Dr. _____
Instituição: _____
Assinatura: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____
Assinatura: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____
Assinatura: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____
Assinatura: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____
Assinatura: _____

*Dedico este trabalho à Deus,
à minha família e à Sarah de 2006,
pois aqui finalizo meu compromisso com ela.*

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos a todos aqueles que contribuíram de alguma forma e doaram um pouco de si para que a conclusão deste trabalho fosse possível.

Agradeço ao meu amado Pai Celestial, por acreditar que sem a força e o consolo divino eu não teria sido capaz de enfrentar todas as adversidades.

Ao meu marido e companheiro Henrique Diniz, por seu amor, seu apoio e sua paciência para dividir minhas alegrias e frustrações diárias durante esses anos. Aos meus pais, Joaquim e Roselena, e minhas irmãs, Suzan e Stephanie, por todo amor e carinho e por serem minha rocha para que eu continuasse firme em meus objetivos mesmo quando os obstáculos pareciam intransponíveis.

Ao meu orientador Profº Dr. Rodrigo A. Panepucci, por sua orientação e oportunidade de trabalhar em seu grupo de pesquisa. Assim como por sua compreensão e apoio nos momentos mais difíceis e decisivos da minha jornada acadêmica que foram de imenso valor para mim.

Aos meus queridos amigos Josiane e Ildercílio pela amizade, carinho e suporte que foram imprescindíveis para me reerguer quando tudo parecia perdido. Aos amigos especiais, Hudson, Helder, Vitor, Bruno, Felipe e Igor, assim como Danuta e Lara, serei eternamente grata pela amizade e pela troca de experiências diárias que foram de valor imensurável para mim durante esses anos.

À minha “mãezona” do laboratório, Amélia, por seu amor e carinho incondicionais, assim como a Cláudia e Elisabete, cujo acolhimento e amizade foram fundamentais para que eu pudesse me manter firme nesta caminhada.

Às minhas lindas amigas de pós graduação, Karina, Larissa, Cristiana, Alexandra e Flávia, por compartilharem comigo as aventuras e desventuras dessa minha jornada de sete anos de USP Ribeirão Preto.

À querida Susie do Programa de Pós Graduação em Genética por seu trabalho, dedicação e valor insubstituíveis.

Aos funcionários e colegas do Hospital das Clinicas e da Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto pela disponibilidade e receptividade.

Ao apoio financeiro da CAPES e FAPESP que foram essenciais para o desenvolvimento deste trabalho.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que esperava ser, mas graças a Deus, não sou o que era antes”

Martin Luther King Jr.

RESUMO

LEITE, S. B. P. **Papel do miR-29a na regulação epigenética de células pluripotentes humanas.** 2017. 150 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

As células-tronco embrionárias (CTEs), extraídas da massa celular interna do blastocisto, tem como características principais a capacidade de auto-renovação e a pluripotência. Durante o desenvolvimento, as células perdem seu potencial de diferenciação e adquirem um perfil de expressão gênica mais restrito, modulado por mecanismos epigenéticos, assim como por microRNAs. Membros da família miR-29 têm como transcritos alvos enzimas responsáveis pela metilação da citosina em 5mC (*DNMT3a* e *3b*) e também da desmetilação (*TET1*, 2 e 3) do DNA, pela hidroxilação de 5mC em 5hmC. Recentes trabalhos sugerem que a modulação do miR-29 sobre estes alvos teria um papel no início da diferenciação em CTEs de camundongos e no aumento de eficiência da geração de iPS em células humanas. No presente trabalho, buscou-se compreender o papel regulatório do miR-29a em seus alvos epigenéticos no contexto da pluripotência e no início da diferenciação com atRA. Para tanto, duas linhagens celulares pluripotentes humanas (H1 e NTera-2) foram submetidas a indução de diferenciação com atRA e ao ganho de função do miR-29a durante quatro dias de cultivo para análises de expressão gênica. Ademais, em NT2, realizamos ensaios funcionais por microscopia de imunofluorescência quantitativa para avaliar os efeitos do ganho e perda de função do miR-29a, DNMT3b e TET1, sobre a expressão nuclear de OCT4 e os perfis globais de 5mC e 5hmC após 96 horas de transfecção. Neste ensaio, também avaliamos o papel específico da regulação pós-transcricional de DNMT3b e TET1 pelo miR-29a, utilizando moléculas bloqueadoras dos sítios alvo (TSB) do miR-29a nestes transcritos. Observamos que sob a indução do atRA, os níveis de expressão do miR-29a e de seus genes alvos (com exceção de DNMT3b), assim como dos marcadores de endoderme e ectoderme, aumentaram, seguido da diminuição dos marcadores de pluripotência em ambas as linhagens. A transfecção de moléculas mímicas do miR-29a, reduziu os níveis de seus transcritos alvos após dois e quatro dias em NT2 e H1, além de reduzir os níveis nucleares de DNMT3b em NT2. Ainda, ocorreu um aumento na expressão de genes da endoderme, mesoderme e ectoderme em H1 e a queda da expressão gênica e nuclear de OCT4 em NT2. Com o uso de siRNA específicos, demonstramos que o knockdown dos níveis nucleares de DNMT3b foi acompanhado de uma queda nos níveis globais de 5mC e um aumento de OCT4 e de 5hmC. Já o *knockdown* de TET1, elevou os níveis de 5mC, mas também os níveis de 5hmC e OCT4 nuclear. As avaliações com o uso de TSB contra os sítios de ligação do miR-29a em seus transcritos alvo, TET1 e DNMT3b, demonstraram que em células NT2, o bloqueio da ligação do miR endógeno aos seus alvos resultam no aumento dos níveis globais de 5hmC, indicando que a regulação pós-transcricional destes alvos pelo miR-29 teria um importante papel na regulação epigenética de células pluripotentes.

Palavras-chave: pluripotência, microRNA-29, metilação do DNA, desmetilação ativa do DNA.

ABSTRACT

LEITE, S. B. P. **The role of miR-29a in epigenetic regulation of human pluripotent cells.** 2017. 150 f. Thesis (Doctorate) - Medical School of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

Embryonic stem cells (CTEs), extracted from the internal cell mass of the blastocyst, are mainly characterized by the capacity for self-renewal and pluripotency. During development, the cells lose their differentiation potential and acquire a restricted gene expression profile, modulated by epigenetic mechanisms, as microRNAs. Members of the miR-29 family have as target transcripts enzymes for cytosine methylation in 5mC (DNMT3a and 3b) and for DNA demethylation (TET1, 2 and 3), by hydroxylation of 5mC in 5hmC. Recent studies suggest that the modulation of miR-29 on these targets plays a role in early differentiation of mouse CTEs and in increasing human iPS cell generation efficiency. In the present study, we sought to understand the regulatory role of miR-29a in its epigenetic targets in the context of pluripotency and in early differentiation with atRA. For this, two human pluripotent cell lines (H1 and NTera-2) were submitted to differentiation induction with atRA and function gain of miR-29a during four days of culture for gene expression analysis. Furthermore, in NT2, we performed functional assays by quantitative immunofluorescence microscopy to evaluate the gain- and loss-of-function of miR-29a, DNMT3b and TET1 in the OCT4 nuclear expression and global profiles of 5mC and 5hmC, 96 hours post-transfection. In this assay, we also evaluated the specific role of post-transcriptional regulation of DNMT3b and TET1 by miR-29a, using target site blocking molecules (TSB) of miR-29a. We observed that under the induction of atRA, the miR-29a expression levels and its target genes (except of DNMT3b), further the markers of endoderm and ectoderm, increased, followed by decreased pluripotency markers in both cell lines. Transfection of mimic molecules of miR-29a reduced the levels of their target transcripts after two and four days in NT2 and H1, and reduced nuclear levels of DNMT3b in NT2. In addition, the expression of endoderm, mesoderm and ectoderm genes increased in H1 and gene and nuclear expression of OCT4 decreased in NT2. With the use of specific siRNA, we demonstrated that the knockdown of nuclear levels of DNMT3b was accompanied by a drop in global 5mC levels and an increase of OCT4 and 5hmC. While, the knockdown of TET1 increased the levels of 5mC, 5hmC and nuclear OCT4. Evaluations using TSB against the miR-29a binding sites in their target transcripts, TET1 and DNMT3b, show that in NT2 cells blocking the binding of endogenous miR to their targets results in an increase in global 5hmC levels, indicating that the post-transcriptional regulation of these targets by miR-29 would play an important role in the epigenetic regulation of pluripotent cells.

Key words: pluripotency, microRNA-29, DNA methylation, active DNA demethylation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Padrões de cromatina e regulação da expressão gênica.....	23
Figura 2 – Processos de desmetilação do DNA.....	27
Figura 3 – Biogênese e mecanismo de ação dos miRNAs.....	32
Figura 4 – Inibidores de miRNAs (Anti-miRs) versus Target Site Blockers (TSB).....	36
Figura 5 – Fotomicrografia de contraste de fase da linhagem celular H1.	42
Figura 6 – Fotomicrografia de contraste de fase da linhagem celular NTera-2.....	43
Figura 7 – Delineamento experimental da indução de diferenciação celular com atRA em H1.....	44
Figura 8 – Delineamento experimental da indução de diferenciação celular com atRA em NT2.....	45
Figura 9 – Caracterização Imunofenotípica da linhagem H1.....	47
Figura 10 – Caracterização Imunofenotípica da linhagem NT2.....	48
Figura 11 – Sítios de interação dos membros da família miR-29 e seus mRNA alvos epigenéticos.	53
Figura 12 – Representação do ensaio funcional para análise de imunofluorescência.	54
Figura 13 – Segmentação de núcleos.....	57
Figura 14 – Expressão de marcadores de pluripotência em NT2 e H1 tratadas com atRA.	65
Figura 15 – Expressão de marcadores de endoderme em NT2 e H1 tratadas com atRA.	66
Figura 16 – Expressão de marcadores de mesoderme em NT2 e H1 tratadas com atRA.	67
Figura 17 – Expressão de marcadores de ectoderme em NT2 e H1 tratadas com atRA.	68
Figura 18 – Expressão dos membros da família miR-29 em NT2 e H1 tratadas com atRA.	69
Figura 19 – Valores de $1/\Delta Ct$ para membros da família miR-29 em NT2 e H1 tratadas com atRA.....	69
Figura 20 – Expressão dos alvos epigenéticos do miR-29a em NT2 e H1 tratadas com atRA.....	71

Figura 21 – Expressão dos alvos epigenéticos do miR-29a em NT2 e H1 transfectadas com moléculas mímicas do miR-29a.	72
Figura 22 – Expressão de marcadores de pluripotência em NT2 e H1 transfectadas com moléculas mímicas do miR-29a.....	73
Figura 23 – Expressão de marcadores de endoderme em NT2 e H1 transfectadas com moléculas mímicas do miR-29a.....	74
Figura 24 – Expressão de marcadores de mesoderme em NT2 e H1 transfectadas com moléculas mímicas do miR-29a.....	75
Figura 25 – Expressão de marcadores de ectoderme em NT2 e H1 transfectadas com moléculas mímicas do miR-29a.....	75
Figura 26 – Contagem de núcleos e expressão nuclear de OCT4 após ganho ou perda de função do miR-29a.....	77
Figura 27 – Contagem de núcleos e expressão nuclear de OCT4 após <i>knockdown</i> da proteína DNMT3b ou TET1.	79
Figura 28 – Expressão nuclear de DNMT3b e perfil de metilação e hidroximetilação global após <i>knockdown</i> de DNMT3b.....	80
Figura 29 – Perfis globais de metilação e hidroximetilação após <i>knockdown</i> de TET1	81
Figura 30 – Perfis globais de metilação e hidroximetilação após ganho ou perda de função do miR-29a.....	82
Figura 31 – Expressão nuclear de OCT4 após inibição regulatória do sítio alvo do miR-29a em DNMT3b.	84
Figura 32 – Expressão nuclear de DNMT3b após inibição regulatória do sítio alvo do miR-29a em DNMT3b.	85
Figura 33 – Perfis globais de metilação e hidroximetilação após inibição regulatória do sítio alvo do miR-29a em DNMT3b.	86
Figura 34 – Expressão Nuclear de OCT4 e DNMT3b e perfis globais de metilação e hidroximetilação após bloqueio da interação do miR-29a endógeno com DNMT3b.	88
Figura 35 – Expressão nuclear de OCT4 após inibição regulatória dos sítios alvos do miR-29a em TET1.....	89
Figura 36 – Perfis globais de metilação e hidroximetilação após inibição regulatória do sítio alvo do miR-29a em TET1.....	91
Figura 37 – Expressão Nuclear de OCT4 e DNMT3b e perfis globais de metilação e hidroximetilação após bloqueio da interação do miR-29a endógeno com TET1.....	93

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Anticorpos primários e secundários utilizados na caracterização imunofenotípica	46
Tabela 2 – Informações dos microRNAs membros da família miR-29.	51
Tabela 3 – Alvos epigenéticos do miR-29a.	51
Tabela 4 – Sequência dos oligonucleotídeos Target Site Blockers.	53
Tabela 5 – Anticorpos primários e secundários utilizados nos ensaios funcionais de transfecção.	55
Tabela 6 – Sondas TaqMan	59
Tabela 7 – Sondas TaqMan.	60
Tabela 8 – Pares de primers para Sybr Green.	61

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5cac	5-carboxilcitosina
5fC	5-formilcitosina
5hmC	5-hidroximetilcitosina
5hmU	5-hidroximetiluracila
5mC	5-metilcitosina
5mU	5-metiluracila
ACP	Promotores gênicos com alto conteúdo CpG
AID/APOBEC	do inglês, <i>Activation-induced cytidine deaminase /Apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like</i>
AGO	Proteínas Argonautas
atRA	Ácido trans-retinóico (do inglês, <i>all trans retinoic acid</i>)
BCP	Promotores gênicos com baixo conteúdo CpG
CCE	Células de Carcinoma Embrionário
cDNA	DNA complementar
c-MYC	do inglês, <i>c-Myc Avian Myelocytomatosis Viral Oncogene Homolog</i>
CpG	Dinucleotídeo formado por uma base Citosina seguida de uma base Guanina
Ct	do inglês, <i>Cycle Threshold</i>
CTE	Célula-tronco Embrionária
CTRL	Controle
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DEPC	Dietilpirocarbonato
Dicer	Enzima endoribunuclease
DMEM	do inglês <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNMT	DNA metiltransferases
dNTP	Desoxiribonucleotídeo fosfatado
Drosha	Enzima Ribonuclease III de classe 2
EDTA	Etilenodiamino tetra-acético (do inglês, <i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>)
FOXA2	do inglês, <i>Forkhead Box A2</i>

GAPDH	do inglês, <i>Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase</i>
GATA	do inglês, <i>GATA Binding Protein</i>
GSC	do inglês, <i>Goosecoid Homeobox</i>
HCS	do inglês <i>High Content Screening</i>
hCTE	Célula-tronco Embrionária Humana
iPS	Célula-tronco de pluripotência induzida (do inglês, <i>Induced Pluripotent Stem Cells</i>)
KLF4	do inglês, <i>Kruppel Like Factor 4</i>
LEFTY	do inglês, <i>Left-Right Determination Factor</i>
miRNA	microRNA
MIXL1	do inglês, <i>Mix Paired-Like Homeobox</i>
mRNA	RNA mensageiro
NANOG	do inglês, <i>Nanog Homeobox</i>
NES	do inglês, <i>Nestin</i>
NODAL	do inglês, <i>Nodal Growth Differentiation Factor</i>
OCT4	do inglês, <i>Octamer-binding transcription factor 4</i>
OTX2	do inglês, <i>Orthodenticle Homeobox 2</i>
PBS	Tampão Fosfato Salino (do inglês, <i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase (do inglês, <i>Polimerase Chain Reaction</i>)
pré-miRNA	Precursor de miRNA
pri-miRNA	Primário de miRNA
RISC	Complexo de Silenciamento Induzido pro RNA (do inglês, <i>RNA-induced Silencing Complex</i>)
SFB	Soro Fetal Bovino
SOX2	do inglês, <i>SRY-Box 2</i>
TDG	do inglês, <i>Thymine DNA Glycosylase</i>
TET	do inglês, <i>Ten-eleven-translocation</i>
TRIzol LS	Solução monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina
tRNA	RNA transportador
TSB	Target Site Blockers
TUBB3	do inglês, <i>Tubulin Beta 3 Class III</i>
UTR	Região Não-traduzida (do inglês, <i>Untranslated region</i>)

SUMÁRIO

1.	Introdução	19
1.1.	Células-tronco pluripotentes	19
1.2.	Mecanismos Epigenéticos	21
1.3.	microRNAs e a Família miR-29	31
2.	Objetivo Geral	38
2.1.	Objetivos Específicos	38
3.	Material e Métodos	41
3.1.	Cultivo celular	41
3.1.1.	Linhagem H1	41
3.1.2.	Linhagem NT2	42
3.1.3.	Diferenciação celular induzida com atRA	43
3.2.	Caracterização Imunofenotípica (Fixação e Imunomarcação)	45
3.3.	Transfecção Reversa	48
3.4.	Avaliação da modulação epigenética do miR-29a na manutenção da pluripotência em NT2	50
3.4.1.	Análise das imagens e gerenciamento dos dados obtidos	56
3.5.	Análise de Expressão Gênica	57
3.5.1.	Extração do RNA	57
3.5.2.	Transcrição reversa: RT-PCR	58
3.5.3.	Avaliação da Expressão Gênica	59
3.6.	Análise estatística	61
4.	Resultados	64
4.1.	Família miR-29 nos contextos de pluripotência e diferenciação induzida por atRA	64
4.1.1.	Expressão de marcadores de pluripotência	64
4.1.2.	Expressão de marcadores de diferenciação	65
4.1.3.	Expressão dos membros da família miR-29	68
4.1.1.	Expressão dos alvos epigenéticos da família miR-29	70

4.2. Efeitos do ganho de função do miR-29a sobre seus alvos epigenéticos, a pluripotência e a diferenciação	71
4.2.1. Efeito do miR-29a sobre a expressão de seus alvos epigenéticos ..	71
4.2.2. Efeito do miR-29a sobre a expressão de marcadores de pluripotência e diferenciação	73
4.3. Avaliação funcional dos eixos de regulação miR-29a/DNMT3b e miR-29a/TET1	76
4.3.1. Efeito do ganho e perda de função do miR-29a sobre a proliferação e expressão nuclear de OCT4	76
4.3.2. Efeito do knockdown de DNMT3b e TET1 sobre a proliferação e expressão nuclear de OCT4	78
4.3.3. Efeito do knockdown de DNMT3b sobre a metilação e hidroximetilação global	79
4.3.4. Efeito do knockdown de TET1 sobre a metilação e hidroximetilação global	80
4.3.5. Efeito do ganho e perda de função do miR-29a nos perfis globais de metilação e hidroximetilação.....	81
4.3.6. Efeito do ganho de função do miR-29a sobre a expressão nuclear de Oct4 e o papel específico da regulação pós-transcricional de DNMT3b neste contexto	83
4.3.7. Efeito do ganho de função do miR-29a sobre a expressão de DNMT3b e o papel específico da regulação pós-transcricional de DNMT3b neste contexto	84
4.3.8. Efeito do ganho de função do miR-29a sobre a metilação e hidroximetilação global e o papel específico da regulação pós-transcricional de DNMT3b neste contexto	85
4.3.9. Efeito do miR-29a endógeno sobre a expressão de DNMT3b e OCT4 nuclear, metilação e hidroximetilação global e o papel específico da regulação pós-transcricional de DNMT3b neste contexto	87
4.3.10. Efeito do ganho de função do miR-29a sobre a expressão nuclear de Oct4 e o papel específico da regulação pós-transcricional de TET1 neste contexto	88
4.3.11. Efeito do ganho de função do miR-29a sobre a metilação e hidroximetilação global e o papel específico da regulação pós-transcricional de TET1 neste contexto.....	89
4.3.12. Efeito do miR-29a endógeno sobre a expressão de DNMT3b e OCT4 nuclear, metilação e hidroximetilação global e o papel específico da regulação pós-transcricional de TET1 neste contexto.....	91

5.	Discussão	95
6.	Conclusões	111
7.	Referências Bibliográficas	113
8.	Anexo 1: Manuscrito	126

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Células-tronco pluripotentes

O primeiro grande evento do desenvolvimento embrionário em vertebrados ocorre a partir da formação do zigoto, que por repetidas divisões mitóticas formará o blastocisto. As células da massa celular interna do blastocisto, também conhecidas como células-tronco embrionárias (CTEs), possuem importantes características como a prolongada proliferação em estado indiferenciado (auto-renovação) e o potencial para formar derivados de todos os três folhetos embrionários assim como a linhagem germinativa (pluripotência) (MARTIN, 1981; THOMSON, 1998).

O isolamento de CTEs de camundongos (EVANS; KAUFMAN, 1981) e de humanos (THOMSON, 1998) permitiu o estabelecimento das condições de cultivo celular necessárias para os avanços na tecnologia de reprogramação nuclear somática e o surgimento das células tronco de pluripotência induzida ou iPS (TAKAHASHI; YAMANAKA, 2006), abrindo um vasto campo de oportunidades para a terapia celular personalizada.

De fato, as primeiras células pluripotentes cultivadas foram derivadas de teratocarcinomas, conhecidas como células de carcinoma embrionário (CCE) (MARTIN; EVANS, 1974). Diversas características são compartilhadas entre as CCEs e as CTEs, como a alta expressão de marcadores de pluripotência e a capacidade de dar origem aos três folhetos embrionários, tornando as CCEs bons modelos experimentais para estudos *in vitro* sobre a pluripotência e diferenciação celular, uma vez que o cultivo de CTEs, principalmente humanas, apresentam um elevado custo e complexidade (ANDREWS, 2002; CHAMBERS; SMITH, 2004; MARTIN, 1975).

O surgimento das células iPS trouxe consigo a promessa de suplantar as questões éticas envolvidas no uso das CTEs humanas, já que a introdução de quatro fatores de reprogramação (OCT4, SOX2, KLF4 e c-MYC) em células diferenciadas foi capaz de promover a geração de células com as mesmas propriedades de auto-renovação e pluripotência das CTEs. Nas últimas décadas,

tanto as CTEs quanto as iPS vem sendo utilizadas em estudos para o desenvolvimento de novas drogas, na avaliação da citotoxicidade de novos fármacos, na medicina regenerativa, na modelagem de doenças, assim como na pesquisa básica que busca entender melhor a base do desenvolvimento embrionário e de formação dos tecidos (TAKAHASHI; YAMANAKA, 2015).

De acordo com Young (2011), grande parte das pesquisas com CTEs procuram compreender como a pluripotência e a auto-renovação são transcricionalmente controladas pelos fatores genéticos, epigenéticos, bioquímicos e ambientais. Os principais reguladores destas propriedades são os fatores de pluripotência OCT4, SOX2 e NANOG que formam um “core” regulatório, coordenando e mantendo a auto-renovação por ocupar seus próprios promotores gênicos e o de outros fatores de transcrição, que participam das vias de sinalização do desenvolvimento e enzimas modificadores da cromatina (BOYER et al., 2005).

Para manter suas propriedades intrínsecas, as CTEs também apresentam uma arquitetura cromatínica única na qual seu perfil transcricional encontra-se em um estado de equilíbrio dinâmico (no inglês, *poised*) entre a pluripotência e o comprometimento com a diferenciação em uma linhagem específica devido a presença de domínios bivalentes (BERNSTEIN et al., 2006).

Os domínios bivalentes são caracterizados pela presença de marcas de modificação de histonas relacionadas ao silenciamento (H3K27me3) ou ativação gênica (H3K4me3). A maior parte destes domínios está enriquecida em regiões promotoras e/ou sítios de início de transcrição de genes que codificam fatores de transcrição, que por sua vez regulam o desenvolvimento e a pluripotência (BERNSTEIN et al., 2006). Além dos fatores de pluripotência, estes domínios também são ocupados pelo grupo de proteínas Policombe, um complexo repressivo que catalisa a trimetilação H3K27me3, responsável por silenciar epigeneticamente os genes do desenvolvimento (BOYER et al., 2006).

Logo, os genes bivalentes podem ser silenciados ou ativados em resposta aos estímulos ambientais, fatores transcricionais e mecanismos epigenéticos, determinando o programa transcricional gênico das CTEs. A ordem temporal da ativação e repressão de diversos genes durante o desenvolvimento é decisiva para assegurar o surgimento das linhagens, o destino celular e por fim a organogênese (BOLAND; NAZOR; LORING, 2014).

1.2. Mecanismos Epigenéticos

Em 1957, Conrad H. Waddington publicava sua mais famosa figura na qual demonstrava os caminhos pelos quais o desenvolvimento embrionário tomava ao partir de um estado pluripotente até o estado diferenciado. A representação da origem dos diferentes tecidos se dava pela esquematização de uma pequena bola descendo por algumas colinas (WADDINGTON, 1957). Surge então a Epigenética, classicamente definida como heranças fenotípicas estáveis resultantes de mudanças no cromossomo sem alterações na sequência do DNA. No entanto, Bird (2007) revisando esta definição questionou o aspecto restritivo desta herança e redefiniu epigenética como o conjunto de adaptações estruturais de regiões cromossômicas com a função de registrar, sinalizar e perpetuar os estados de atividade alterados (BIRD, 2007).

De acordo com Reik (2007), o desenvolvimento embrionário por definição é epigenético, já que progressivamente as células vão perdendo seu potencial de diferenciação devido a alterações na arquitetura nuclear criando um ambiente cada vez mais restritivo transcricionalmente. Alterações epigenéticas globais são altamente reguladas durante o desenvolvimento para permitir as transições entre diferentes estados celulares, que como já demonstrado pela tecnologia das iPS não é restritivo ou irreversível (HANNA; SAHA; JAENISCH, 2010).

Por ser o substrato da transcrição gênica, a cromatina está sujeita a diferentes mecanismos epigenéticos, como a metilação e a hidroximetilação do DNA, as modificações pós-traducionais de histonas, os RNA não codificadores e o remodelamento da cromatina e do nucleossomo, atuando em conjunto na coordenação dos eventos que determinam a assinatura epigenética das CTEs (BOLAND; NAZOR; LORING, 2014).

Nas modificações pós-traducionais de histonas, a cauda N-terminal pode sofrer uma variedade de modificações covalentes, incluindo: metilação, acetilação, ubiquitinação, fosforilação, deaminação. Tais modificações interferem nas interações proteína:proteína e DNA:proteína ou criam superfícies de ligação para outros reguladores (KOUZARIDES, 2007).

A distribuição global das marcas de histonas no genoma humano demonstrou que a presença das modificações apresenta um padrão de localização que está intimamente relacionado a um elemento genético e ao estado da cromatina. Deste

modo, entre as marcas associadas à eucromatina encontram-se H3K4me3 (presente em regiões promotoras); H3K9ac e H3K27ac (presente em *enhancers* ativos); e H3K36me3 (presente dentro de corpos gênicos transcritionalmente ativos). Enquanto isso, as marcas H3K9me3 e H3K27me3 estão relacionadas ao silenciamento gênico e estão localizadas na heterocromatina constitutiva e facultativa, respectivamente (ERNST et al., 2011; ZHU et al., 2014).

No caso das CTEs, a presença dos domínios bivalentes combinada a um enriquecimento de H3K4me3, conferem as CTEs uma cromatina mais aberta e permissiva transcritionalmente em relação às células somáticas (BARSKI et al., 2007; BERNSTEIN et al., 2006; MIKKELSEN et al., 2007). À medida que o desenvolvimento embrionário avança, as alterações nas modificações de histonas precedem a deposição ou remoção da metilação do DNA, conduzindo assim a definição do tipo celular e da linhagem para estabelecer a memória celular somática (APOSTOLOU; HOCHEDLINGER, 2013; SMITH; MEISSNER, 2013).

A metilação no carbono 5 da citosina no DNA ou 5-metilcitosina (5mC) é considerada uma das principais e mais estáveis modificações epigenéticas do genoma e, está diretamente envolvida na modulação da atividade transcritional relacionada ao silenciamento a longo termo e outras funções gênicas, como o *imprinting* genômico, a inativação de um dos cromossomos X em fêmeas e à repressão de elementos transponíveis do genoma (JAENISCH; BIRD, 2003).

Em mamíferos a presença da 5mC ocorre predominantemente no contexto de dinucleotídeos CpG (Citosina seguida de Guanina) e está distribuída ao longo do genoma de forma isolada ou em sequência com regiões de alta densidade CpG, conhecidas como ilhas CpG, que sobrepõem aproximadamente 70% dos promotores de genes humanos (JONES, 2012). Porém, a metilação do DNA em mamíferos também pode ser encontrada fora do contexto CpG (CpT, CpA ou CpC) e apesar de não ter sua função bem determinada, aproximadamente 25% das citosinas metiladas no genoma de CTEs ocorrem neste contexto, localizadas principalmente no corpo gênico de genes transcritionalmente ativos (RAMSAHOYE et al., 2000). Além disso, Lister e colaboradores (2009) demonstraram que durante a diferenciação, essa metilação não-CpG é perdida e durante o processo de reprogramação somática é restaurada, evidenciando o caráter único deste tipo de metilação nas CTEs.

As ilhas CpG que são encontradas próximas ou dentro dos promotores gênicos estão geralmente desmetiladas, porém a geração de mapas da distribuição global de CpG mostrou que existe uma correlação do status de metilação do promotor, a densidade de CpG e sua atividade gênica (MEISSNER et al., 2008). Foi visto que promotores com baixo conteúdo CpG (BCP) estavam frequentemente inativos e apresentavam 5mC, enquanto promotores com alto conteúdo CpG (ACP) eram constantemente desmetilados; já promotores com conteúdo intermediário poderiam estar metilados ou não (MEISSNER et al., 2008; WEBER et al., 2007; ZHOU; GOREN; BERNSTEIN, 2011) (Figura 1).

Figura 1 – Padrões de cromatina e regulação da expressão gênica

Promotores podem ser classificados de acordo com o seu conteúdo CpG. Promotores com alto (ACP) ou baixo (BCP) conteúdo CpG estão sujeitos a diferentes padrões de cromatina e de regulação gênica. Em a) promotores com ACP com cromatina ativa ou “acessível” (presença de H3K4me3) e sujeitas a iniciação pela RNA polimerase II (RNAPII), por exemplo, genes *housekeeping*. Em b) promotores ACP em equilíbrio são marcados pela presença de domínios bivalentes (H3K4me3 e H3K27me3). Eles podem estar sujeitos à iniciação pela RNAPII, mas não tendem a elongar ou produzir mRNA, por exemplo, genes reguladores do desenvolvimento em CTEs. Em c) promotores ACP possuem modificações de histonas repressivas (H3K27me3) e são relativamente inacessíveis a RNAPII. Em d), promotores BCP ativos são enriquecidos por H3K4me3 e são transcritos. Geralmente, a cromatina dos promotores BCP parece ser seletivamente ativada, por exemplo, por fatores de transcrição. Em e), promotores BCP em equilíbrio podem estar marcados com H3K4me2 e quando marcados por H3K4me3 serem induzidos. Em f), promotores BCP geralmente não possuem marcas

de modificações de histonas mas podem estar metiladas (Me). Adaptado de Zhou, Goren e Bernstein (2011).

Essa classificação dos promotores permitiu explorar de forma mais detalhada o papel da metilação no controle da expressão gênica. Em CTEs, foi visto que promotores bivalentes, presentes em genes determinantes do destino celular durante a diferenciação, compreendem 20% de todos os promotores ACP em CTEs e estão sujeitos a uma regulação mais complexa realizada pelo grupo de proteínas repressivas Polycomb (BERNSTEIN et al., 2006; BOYER et al., 2006; MIKKELSEN et al., 2008). Além disso, estudos em CTEs de camundongos, por exemplo, demonstrou que o fator MYC possui um importante papel na “liberação” da RNA polymerase II para a elongação do transcrito em promotores ACP (RAHL et al., 2010). Juntos estes dados demonstram que a regulação efetiva de promotores ACP requer, além da metilação, passos adicionais de controle para modular a expressão dos genes associados com esta classe de promotores.

Enquanto isso, os promotores BCP parecem ser, por padrão, transcrionalmente inativos em CTEs e outros tipos celulares diferenciados, sendo apenas uma pequena parcela (promotores marcados com H3K4me3), que são completamente expressos em relação às demais classes de promotores BCP (MEISSNER et al., 2008; WEBER et al., 2007). Sua regulação depende em grande parte do conteúdo de modificações de histonas presentes que irá regular o início da transcrição destes genes. Estudos realizados em linhagens celulares hematopoiéticas demonstraram que a troca específica da marca H3K4me2 por H3K4me3 induziam a transcrição gênica em promotores BCP durante a diferenciação hematopoiética (ORFORD et al., 2008). Geralmente, são promotores presentes em genes que codificam proteínas estruturais ou produzidas exclusivamente por células terminalmente diferenciadas (ZHOU; GOREN; BERNSTEIN, 2011)

Outra aparente contradição encontra-se na metilação presente em corpos gênicos que é positivamente correlacionada com a expressão gênica, mostrando que em mamíferos, a elongação do transcrito é menos sensível a metilação do DNA do que a existente nos sítios de início de transcrição. Deste modo, ao contrário da premissa de que a metilação do DNA estaria sempre associada ao silenciamento gênico, é importante compreender que as funções da 5mC no genoma podem variar de acordo com o seu contexto genômico (JONES, 1999, 2012).

Em mamíferos, são encontradas cinco enzimas metiltransferases: DNMT1, DNMT2, DNMT3a, DNMT3b e DNMT3L. A DNMT1 é predominante em todas as células em proliferação e responsável pela restauração dos sítios hemi-metilados resultantes da replicação do DNA, copiando o padrão de metilação da fita original, processo conhecido como metilação de manutenção (BESTOR et al., 1988). A DNMT2, diferentemente das demais metiltransferases, apresenta uma atividade metiltransferase de tRNA (GOLL; BESTOR, 2005). Já as enzimas DNMT3a e DNMT3b estão relacionadas à metilação *de novo* pela geração de novos sítios metilados (DNA não-metilado previamente) (OKANO et al., 1999) enquanto DNMT3L parece não ter uma atividade catalítica de metiltransferase e por isso atua como co-fator de DNMT3a e 3b no imprinting materno (BOURC'HIS et al., 2001).

A metilação do DNA é um importante mecanismo para o controle temporal da diferenciação, porém diferente das células somáticas, as CTEs podem tolerar a hipometilação causada pela inativação de Dnmt1 ou de Dnmt3a/3b para manter sua habilidade proliferativa e a pluripotência em CTEs de camundongos (LI; BESTOR; JAENISCH, 1992; OKANO et al., 1999). No entanto, tanto a inativação de Dnmt1 ou Dnmt3a/3b ou ainda a tripla inativação das enzimas, prejudica o processo de diferenciação celular, demonstrando que o estabelecimento do padrão de metilação no embrião é primordial para a especificação das linhagens e formação dos folhetos germinativos em CTEs de camundongos (PAWLAK; JAENISCH, 2011; TSUMURA et al., 2006).

Em CTEs humanas, um estudo de Liao e colaboradores (2015) demonstrou que diferente das CTEs murinas, a ablação de DNMT1 resultava em rápida letalidade celular e que a depleção de DNMT3a e 3b individualmente geravam efeitos distintos na metilação global do DNA apesar de não afetarem a pluripotência nem o potencial de diferenciação das três camadas germinativas (mesmo no duplo *knockout*). Outra importante informação deste estudo é que DNMT3b é a enzima mais expressa em CTEs e sua expressão diminui durante a diferenciação sugerindo que esta seria a responsável por manter a metilação não-CpG do genoma das CTEs (LIAO et al., 2015).

Além da 5mC, outra modificação nucleotídica tem mostrado importante papel no panorama epigenético de CTEs, a 5-hidroximetilcitosina (5hmC). A sexta base do genoma, como também é conhecida, foi primeiramente descrita em CTEs e em células adultas neuronais, e constitui um dos primeiros passos no processo de

desmetilação ativa do DNA (KOHLI; ZHANG, 2013). A hidroximetilação do DNA é originada pelas proteínas da família TET (do inglês, *Ten-eleven-translocation*) que contém um domínio C-terminal de dioxigenase dependente de Fe(II) e 2-oxoglutarato que é o responsável por catalisar a conversão 5mC a 5hmC *in vitro* e *in vivo* (ITO et al., 2010; KRIAUCIONIS; HEINTZ, 2009; TAHILIANI et al., 2009).

A via de desmetilação do DNA no genoma de mamíferos pode ocorrer de duas formas: ativa ou passiva (Figura 2). A desmetilação passiva, ocorre ao longo dos vários ciclos de replicação devido à ausência ou redução da atividade da DNMT1 assim como pela inabilidade desta enzima em reconhecer a presença da 5hmC, levando à perda passiva da metilação no decorrer das divisões celulares (BHUTANI; BURNS; BLAU, 2011). Por sua vez, a forma ativa é realizada por um grupo de enzimas que participam da remoção da 5mC: TET, AID/APOBEC e TDG (BHUTANI; BURNS; BLAU, 2011; CORTELLINO et al., 2011; FICZ et al., 2011; HE et al., 2011).

Neste processo, as enzimas TET catalisam a hidroxilação de 5mC a 5hmC e por oxidação, formando a 5-formilcitosina (5fC) e 5-carboxicitosina (5caC). Outro caminho também pode ser dado nesta via por meio da família AID/APOBEC, responsável por desaminar a 5mC a 5-metiluracila (5mU) ou a 5hmC a 5-hidroximetiluracila (5hmU) para que ao final, por meio da via de Reparo por Excisão de Bases, a enzima Timina DNA Glicosilase (TDG), leve à substituição por uma base citosina sem modificação (BHUTANI; BURNS; BLAU, 2011).

Figura 2 – Processos de desmetilação do DNA.

Esquema representativo dos processos de desmetilação do DNA em mamíferos. Em A) Processo de desmetilação passiva do DNA. b) Processo de desmetilação ativa do DNA catalisada pelas enzimas TET. (i) hidroxilação de 5-mC a 5-hmC, seguida pela (ii) deaminação mediada por AID/APOBEC de 5-hmC a 5-hmU ou ainda pela (iii) oxidação pelas enzimas TET e subsequente clivagem pelas DNA glicosilases (como TDG) e substituição por uma citosina pela (iv) via de Reparo por Excisão de Base. Adaptado de Cimmino e colaboradores (2011).

A família TET possui três representantes, TET1, TET2 e TET3 que possuem diferentes papéis durante o desenvolvimento. As enzimas TET1 e TET2 são altamente expressas em CTEs e não apenas compartilham a regulação de genes envolvidos com a pluripotência, mas também possuem funções mutualmente exclusivas na diferenciação das linhagens embrionária e extra-embrionária (ITO et al., 2010; TAHILIANI et al., 2009). Enquanto isso, TET3 parece ter sua função relacionada, principalmente, ao processo de desmetilação ativa do pró-núcleo masculino no início da embriogênese (GU et al., 2011).

Os altos níveis de Tet1 e 5hmC em CTEs sugerem que estes fatores poderiam participar da modulação da pluripotência e da autorenovação (MOHR et al., 2011). Modelos *knockout* individuais para Tet1 e Tet2 em CTEs de camundongos, demonstraram que Tet1 pode estar altamente relacionada com a pluripotência, já que sua transcrição é diretamente modulada por Oct4 e Sox2 (ITO

et al., 2010). Foi observado também que a depleção de Tet1 leva à redução dos níveis globais de hidroximetilação e a diminuição de Nanog (KOH et al., 2011). No entanto, outros estudos não observaram alterações morfológicas ou na expressão dos fatores de pluripotência em CTEs depletadas de Tet1 (DAWLATY et al., 2011). Em compensação, os mesmos estudos notaram que a ausência destas enzimas afetava de diferentes formas o comprometimento das linhagens ao longo do processo de diferenciação (DAWLATY et al., 2011, 2013, 2014; ITO et al., 2010; KOH et al., 2011). Tais resultados mostram que a participação de Tet1 na pluripotência necessitam de maiores investigações.

A importância da família TET também está evidenciada em seu papel na regulação de genes bivalentes no genoma de CTE's de camundongos, no qual foi visto que Tet1 pode-se ligar tanto a genes que estão sendo ativamente transcritos (presença da marca H3K4me3) como também genes reprimidos pelo complexo Policombe ricos em ilhas CpG (no qual a 5hmC associa-se a um estado repressivo) (FICZ et al., 2011; WU et al., 2011b). Outros estudos também demonstraram ainda que os níveis de 5-hmC aumentam durante o desenvolvimento pré-implantacional do embrião e são enriquecidos na massa celular interna do blastocisto, entretanto, diminuem gradativamente durante a diferenciação das CTE's (exceto na diferenciação neural) (ITO et al., 2010; KOH et al., 2011).

Desde os primeiros métodos utilizados para a detecção e quantificação destas variantes de bases do genoma (com enzimas endonucleases sensíveis à metilação ou cromatografia líquida associada à espectrometria de massas), a disponibilidade de novas tecnologias tem sido capaz de gerar mapas globais da distribuição de 5mC e 5hmC cada vez mais precisos, permitindo assim a revisão da função destas bases no genoma. A técnica de modificação do DNA por tratamento com bissulfito, seguida de sequenciamento, permitiu um grande avanço no campo, uma vez que as bases 5mC podiam ser identificadas comparando-se as sequências tratadas com as não tratadas (mediante o tratamento com bissulfito, somente as citosinas não metiladas eram deaminadas, modificadas para uracila e sequenciadas como timinas). Com o advento do sequenciamento de nova geração, o foco saiu das ilhas CpG e outras regiões passaram a ser estudada mais detalhadamente. No entanto, apesar do grande avanço desta técnica, o crescente interesse no papel das bases 5hmC levou a uma descoberta impactante que exigiu dos pesquisadores da área a revisar muitas de suas conclusões baseadas no sequenciamento de

bissulfito. Atualmente, sabe-se que o método de bissulfito não é capaz de distinguir bases 5mC de 5hmC. De fato, após o tratamento com bissulfito de sódio, as bases 5hmC são convertidas para bases citosinas 5-metilenesulfonato (CMS), sendo sequenciadas como citosinas; além disso, as bases CMS prejudicam a ação da polimerase, limitando ou anulando muitas conclusões relativas dos estudos realizados até então (HUANG et al., 2010).

Assim, o estudo das bases 5hmC ainda estava limitado a técnicas de enriquecimento por afinidade. As metodologias baseadas em afinidade consistem no enriquecimento de regiões genômicas contendo 5hmC por meio de anticorpos específicos (hMeDIP) ou pela modificação desta base pela enzima β -glicosiltransferase, seguida por oxidação com periodato de sódio e biotinilação (GLIB) (PASTOR et al., 2011). Posteriormente, a avaliação desta fração de DNA enriquecida com 5hmC pode ser feita por PCR quantitativa (*in loco*) ou sequenciamento de nova geração (global) (SONG; YI; HE, 2012). No entanto, estes métodos falham por não fornecer mapas de alta resolução por base no genoma.

Outro grande salto neste campo veio com o surgimento dos métodos que utilizavam as tecnologias de sequenciamento de base única, o que permitiu a distinção entre bases 5hmC de 5mC como por exemplo o TAB-Seq (YU et al., 2012a) e o oxBS-Seq (BOOTH et al., 2012). Associadas à abordagem convencional de sequenciamento de bissulfito, estas novas técnicas permitiram refinar os mapas de distribuição de 5mC e 5hmC resultando em um enorme influxo de novas e complexas informações sobre o papel destas modificações em função de sua distribuição no genoma (SONG; YI; HE, 2012).

Devido a presença de todos os componentes da maquinaria de desmetilação ativa do DNA (TET, TDG e BER) e das três formas oxidadas da 5mC (5hmC, 5fC e 5caC) no genoma de CTEs, grande parte dos estudos tem utilizados estas células como modelos para a geração de mapas de alta resolução da distribuição da 5hmC no genoma de mamíferos. Sobre esta distribuição, foi visto que promotores ACP (geralmente marcados por H3K4me3) apresentam baixos níveis de 5hmC, o que é esperado, visto ser uma região praticamente ausente de 5mC e serem genes altamente expressos (WILLIAMS et al., 2011; WU et al., 2011a; XU et al., 2011; YU et al., 2012b). Por outro lado, promotores que apresentam níveis baixos ou intermediários de CpG e os genes bivalentes possuem altos níveis de 5hmC em CTEs (PASTOR et al., 2011; WU et al., 2011a; XU et al., 2011; YU et al., 2012b).

Outro importante fator na distribuição da 5hmC no genoma de CTEs é sua presença principalmente em corpos gênicos (transcricionalmente ativos), desde o sítio de início de transcrição (do inglês, *transcriptional start site* – TSS) até o sítio de término de transcrição (do inglês, *transcription termination site* – TTS), sugerindo um possível acoplamento da oxidação da 5mC com a elongação da transcrição (WU et al., 2011a; XU et al., 2011). Além disso, também foi visto o enriquecimento de 5hmC em elementos regulatórios distais como os enhancers e em regiões marcadas com H3K4me1 e com sítios de ligação de fatores de transcrição (FICZ et al., 2011; PASTOR et al., 2011; STROUD et al., 2011; SZULWACH et al., 2011; WILLIAMS et al., 2011; WU et al., 2011a; YU et al., 2012b). Porém, quando comparado a distribuição de 5mC, observou-se um padrão de localização mutualmente exclusivo, principalmente em elementos cis-regulatórios com interação proteína:DNA, que estava geralmente depletado de 5mC e enriquecido por 5hmC (WU et al., 2011b).

Dessa forma, apesar da presença da 5hmC estar intimamente relacionada com a via de desmetilação ativa do DNA, o advento dos novos métodos de investigação e os dados acima demonstram que a 5hmC não se trata apenas de uma base intermediária do processo, mas que é reconhecida como uma marca epigenética estável do genoma, com importante papel regulatório na modulação da expressão gênica (BOLAND; NAZOR; LORING, 2014).

Embora existam fortes evidências dos papéis das enzimas TETs e da hidroximetilação no genoma durante a diferenciação das CTEs, os mecanismos regulatórios subjacentes a estes processos ainda são pouco conhecidos. Nesta linha, o trabalho de Ito e colaboradores (2011) sugeriu que Tet1 está envolvida não apenas na regulação do status de metilação do DNA que mantém o estado pluripotente, mas que a repressão desta enzima estaria diretamente ligada a um viés no processo de diferenciação das CTEs para a trofoderme.

Koh e colaboradores (2011), investigando a função de Tet no comprometimento dos três folhetos germinativos no início do processo de desenvolvimento, sugeriram que Tet1 poderia afetar o direcionamento da diferenciação por meio da via de sinalização Nodal e fatores transcricionais envolvidos no desenvolvimento da endoderme/mesoderme. Mais recentemente, Dai e colaboradores (2016) demonstraram que a formação de 5hmC por Tet1 modula a sinalização Lefty-Nodal por privilegiar a desmetilação ao invés da metilação por Dnmt3a e Dnmt3b, revelando um mecanismo epigenético fundamental nas vias de

sinalização que regulam a formação do eixo corporal no início do desenvolvimento do embrião.

1.3. microRNAs e a Família miR-29

Os miRNAs são uma classe abundante de pequenos RNAs (18 a 25 nucleotídeos) não codificantes que regulam a expressão gênica de maneira pós-transcricional através da degradação ou inibição da tradução de RNAs mensageiros (mRNA) alvos (BARTEL, 2004). Em sua biogênese (Figura 3), os miRNAs têm sua transcrição no núcleo e, posteriormente, são exportados para o citoplasma onde são processados e amadurecem. Os transcritos primários dos miRNAs (pri-miRNA) formam estruturas secundárias, nas quais dois segmentos consecutivos com bases complementares são pareados, e a região de bases não complementares entre os segmentos, constituem alças circulares (SINGH et al., 2008).

No núcleo, os pri-miRNA são processados por um complexo proteico que inclui a enzima Drosha resultando na estrutura do miRNA precursor (pré-miRNA), que é exportada para o citoplasma por meio da exportina-5. No citoplasma, os pré-miRNAs são processados por outra enzima, a Dicer, que remove a alça, resultando na formação de um dúplex de RNA. Pela atividade das proteínas Argonautas (AGO), o dúplex de RNA é incorporado ao complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC), no qual as duas fitas de RNA são separadas (BARTEL, 2004; SINGH et al., 2008).

Uma destas fitas permanece associada ao RISC e constitui o miRNA maduro, ao passo que a fita complementar (comumente referida como “passenger” ou fita “*”) é degradada. Por fim, dependendo do grau de complementaridade (total ou parcial), o miRNA maduro se ligará a regiões nos mRNAs alvos, induzindo sua clivagem total, inibindo a tradução proteica ou desestabilizando o mRNA por deadenilação e consequente degradação (AMBROS, 2004; EICHHORN et al., 2014; SINGH et al., 2008).

Figura 3 – Biogênese e mecanismo de ação dos miRNAs.

Esquema representativo da biogênese de miRNAs. A transcrição dos microRNAs ocorre no núcleo, originando estruturas secundárias denominadas pri-miRNA. Essas são processadas pelo complexo contendo Drosha, resultando na formação dos pre-miRNAs. Os pre-miRNAs são exportados do núcleo pela Exportina 5. No citoplasma, o complexo Dicer processa os pre-miRNAs originando duplex de microRNA. Enquanto uma das fitas é degradada, a outra se associa as proteínas argonautas formando o complexo RISC. Quando há complementaridade total entre o miRNA e mRNA alvo ocorre a clivagem do mRNA, enquanto que complementaridade parcial reprime a tradução ou leva a degradação do mRNA por deadenilação. Adaptado Winter e colaboradores (2009).

Enquanto a clivagem direta do transcrito (quando há complementariedade total entre o miRNA e o mRNA alvo) ocorre principalmente em plantas (ACHARD et al., 2004; KASSCHAU et al., 2003; VAUCHERET et al., 2004), a repressão da tradução e desestabilização do mRNA alvo por complementariedade parcial constituem os principais mecanismos de silenciamento pós-transcricional mediado por miRNAs em animais (FABIAN; SONENBERG; FILIPOWICZ, 2010; HAUSSER et al., 2009; HENDRICKSON et al., 2009; SIOMI; SIOMI, 2010; XU et al., 2016). Nestes últimos processos, o complexo miRISC (formado pelos miRNAs maduros ligados as proteínas AGO) reconhecem os mRNA alvos e por complementariedade parcial de bases ligam-se às suas regiões 3'UTR. Em seguida, as proteínas AGO associadas a proteína GW182 se ligam a complexos deadenilases no citoplasma que irão catalisar

a deadenilação da cauda poli(A) do mRNA alvo. Por sua vez, estes mRNA deadenilados terão sua extremidade 5'CAP removidas, sendo assim, consequentemente degradados por uma exoribonuclease 5'-3' (JONAS; IZAURRALDE, 2013; WAHLE; WINKLER, 2013). Em relação ao mecanismo de repressão traducional, embora o processo como um todo ainda não seja claro, sabe-se que esta inibição do miRNA ocorreria por sua interferência no início da tradução por impedir a atividade ou reunião do fator eIF4F (que formará o complexo de início de tradução para o recrutamento do ribossomo) (JACKSON; HELLEN; PESTOVA, 2010; JONAS; IZAURRALDE, 2015).

A capacidade de se ligar aos seus alvos por complementariedade parcial de bases permite que um único miRNA possa regular até centenas de alvos e da mesma forma, um mesmo mRNA possa ser alvo de diversos miRNAs (FRIEDMAN et al., 2009; LIM et al., 2005). Dessa forma, miRNAs são capazes de regular mais de um terço de todas as proteínas codificadas e possuem influência direta na maioria dos processos biológicos, incluindo a auto-renovação das CTEs, a especificação de linhagens durante o desenvolvimento, bem como o surgimento de doenças tais como o câncer (ANOKYE-DANSO et al., 2011; GARZON et al., 2009; JACOBSEN et al., 2013; LIN et al., 2008; MALLANNA; RIZZINO, 2010).

Nas últimas décadas, diversos estudos tem demonstrado que os miRNAs participam ativamente na regulação de inúmeros processos celulares e no desenvolvimento, incluindo a organogênese e a diferenciação (GANGARAJU; LIN, 2009; LI et al., 2017). Em relação à pluripotência, foi observado que existem grupos de miRNAs que agem exclusivamente em favor da manutenção do estado pluripotente em detrimento do processo de diferenciação celular (STADLER et al., 2010; SUH et al., 2004).

Dentre os miRNAs altamente expressos em células pluripotentes estão o cluster miR-290/295, que promove a pluripotência por assegurar uma alta taxa de proliferação celular (LICHNER et al., 2011), e o cluster 302/367, que atua em colaboração com os fatores OCT4 e SOX2 para a manutenção da pluripotência (ROSA; BRIVANLOU, 2011) além de favorecer reprogramação somática (LIAO et al., 2011; MIYOSHI et al., 2011).

miRNAs também estão envolvidos na regulação direta dos fatores de pluripotência, como o miR-145 que pode reprimir a pluripotência por ter como alvo o mRNA de OCT4, SOX2 e KLF4 (XU et al., 2009). De fato, a inibição da biogênese

de miRNAs pela depleção das enzimas Dicer e Drosha em CTEs de camundongos prejudicam o desenvolvimento embrionário normal e reduzem o potencial de diferenciação destas células (KANELLOPOULOU et al., 2005; MELTON; JUDSON; BLELLOCH, 2010; WANG et al., 2007).

Alguns microRNAs também podem atuar sobre transcritos codantes de componentes da maquinaria epigenética, adicionando mais uma camada de controle na complexa rede de regulação dos diferentes processos biológicos, incluindo o controle da pluripotência e diferenciação. Neste contexto, os membros da família miR-29 se destacam por terem como alvos as enzimas metiltransferases DNMT3a e 3b (FABBRI et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2015; ROBAINA et al., 2015) e as proteínas da família TET bem como TDG (MORITA et al., 2013; ZHANG et al., 2013) que estão envolvidas no processo de desmetilação do DNA.

Na espécie humana, a família do miR-29, compreende três variantes que estão agrupadas em dois clusters da seguinte forma: miR-29b-1/miR-29a localizados no cromossomo 7q32.3; e miR-29b-2/miR-29c localizados no cromossomo 1q32.2 (MOTT et al., 2010). Diversos estudos demonstram a importância dos membros desta família em muitos tipos de câncer e seus papéis na regulação da proliferação, diferenciação e apoptose, destacando vários mecanismos alternativos, já que, ora aparecem exercendo o papel de onco-miRNAs, ora de supressores tumorais, a depender do contexto (CUMMINS et al., 2006; FABBRI et al., 2007; GARZON et al., 2009; GASQUE SCHOOF et al., 2015; NGUYEN et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2015; WANG et al., 2013).

No processo de reprogramação somática, sabe-se que superar a barreira epigenética é um passo crítico para alcançar o estado pluripotente das iPS e, portanto, desvendar os mecanismos moleculares subjacentes a esta regulação, aumentariam a eficiência da geração destas células. Logo, sendo o miR-29 um miRNA central na modulação de alvos epigenéticos, alguns estudos demonstraram que a modulação do miR-29 durante o processo de reprogramação somática afeta o processo de desmetilação do DNA e subsequentemente a distribuição global de metilação e hidroximetilação e que, de fato, as iPS geradas a partir de células depletadas do miR-29a apresentavam um perfil epigenético mais próximo ao das CTEs (HYSOLLI et al., 2016; YANG; LI; RANA, 2011).

Não apenas na reprogramação, o papel do eixo formado entre o miR-29 e seus alvos epigenéticos também vem sendo investigados no início do processo de

diferenciação. Em trabalho recente, Tu e colaboradores (2015) demonstraram que o eixo regulatório formado por miR-29b e Tet1 estaria envolvido na formação da mesendoderme durante o processo de diferenciação em CTEs murinas. Essa tendência na especificação da linhagem seria dada pela ativação da via de sinalização Nodal por meio da supressão dos genes inibitórios dessa via, *Lefty1* e *Lefty2*. Nesta mesma linha, o estudo de Cui e colaboradores (2016) também demonstrou que a superexpressão do miR-29 afeta seletivamente os marcadores de linhagens celulares e orientam a diferenciação de CTEs murinas de forma similar ao que ocorre com CTEs após *knockdown* de Tet1.

Porém, o que estes trabalhos reunidos não puderam identificar é se as alterações observadas no perfil epigenético de metilação e hidroximetilação global do genoma realmente se devem pela ação específica do miR-29 sobre seus alvos DNMT ou TET ou por outros mecanismos moleculares ainda não desvendados. Desta forma, para avaliar de forma mais detalhada os efeitos da regulação pós-transcricional das enzimas DNMT3b e TET1 mediada pelo miR-29a, serão utilizadas moléculas bloqueadoras sintéticas conhecidas como Target Site Blockers (TSB, EXIQON). O TSB permite avaliar os efeitos do bloqueio dos sítios de ligação de um miRNA em seu mRNA alvo, podendo ser até mais específico por bloquear somente um dos sítios alvos. Deste modo, enquanto o ganho de função decorrente da introdução de um miR mimico de um miR endógeno tem efeito inibitório sobre todos seus alvos (Figura 4A) e a perda de função do miRNA endógeno, pelo uso de moléculas inibitórias (anti-miRs), impede a ação do miR sobre todos os seus mRNA alvos (Figura 4B), o TSB permite o estudo dos efeitos individuais do miRNA em apenas um dos seus alvos (Figura 4C). Logo, o presente trabalho buscou investigar o papel regulatório pós transcricional do miR-29a sobre seus alvos epigenéticos, DNMT3b e TET1, e os impactos desta modulação na manutenção da pluripotência e no perfil global de metilação ou hidroximetilação.

Figura 4 – Inibidores de miRNAs (Anti-miRs) versus Target Site Blockers (TSB).

Esquema representativo do mecanismo de atuação dos TSB em relação ao miRNA endógeno e um anti-miR sintético. A) Ação de um miRNA hipotético (miR-X) endógeno sobre seus inúmeros alvos. B) Quando o miR-X é inibido por uma molécula sintética inibidora, como uma anti-miR, o fenótipo observado pode ser devido a muitos dos seus alvos que foram up-regulados. C) Quando o miR-X é inibido por uma molécula TSB apenas um de seus alvos será up-regulado e dessa forma o fenótipo observado pode ou não ser o mesmo para quando todos seus alvos são up-regulados. Fonte: (EXIQON, 2017).

OBJETIVOS

2. OBJETIVO GERAL

Avaliar o papel do miR-29a na regulação epigenética em células pluripotentes humanas.

2.1. Objetivos Específicos

- Avaliar a expressão gênica dos marcadores de pluripotência e de representantes da endoderme, mesoderme e ectoderme nas linhagens pluripotentes H1 e NT2 após a diferenciação com atRA.
- Avaliar a expressão gênica dos membros da família miR-29 e de seus alvos epigenéticos envolvidos nos processos de metilação e desmetilação do DNA nas linhagens pluripotentes H1 e NT2 após a diferenciação com atRA.
- Avaliar a expressão gênica dos marcadores de pluripotência e de representantes dos três folhetos embrionários (endoderme, mesoderme e ectoderme) nas linhagens pluripotentes H1 e NT2 após o ganho de função do miR-29a.
- Avaliar a expressão gênica dos membros da família miR-29 e de seus alvos epigenéticos envolvidos nos processos de metilação e desmetilação do DNA nas linhagens pluripotentes H1 e NT2 após o ganho de função do miR-29a.
- Avaliar o impacto do ganho e perda de função do miR-29a na proliferação celular, pluripotência e nos perfis globais de metilação e hidroximetilação do DNA em NT2.
- Avaliar os efeitos depleção transiente das enzimas DNMT3b e TET1 na proliferação celular, pluripotência e nos perfis globais de metilação e hidroximetilação do DNA em NT2.
- Avaliar o papel específico da regulação pós-transcricional de DNMT3b e TET1 pelo miR-29a na proliferação celular e na pluripotência em NT2.

- Avaliar o papel específico da regulação pós-transcricional de DNMT3b e TET1 pelo miR-29a nos perfis globais de metilação e hidroximetilação do DNA em NT2.

MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Cultivo celular

Para o presente estudo foram escolhidas duas linhagens celulares pluripotentes: NTERA-2 (NT2) e H1. A linhagem de carcinoma embrionário humano NTERA-2 cl.D1 foi adquirida do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ) enquanto, a linhagem de célula tronco embrionária humana (hCTE) H1 (WA01, WiCell Research Institute) foi cedida pela Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto.

3.1.1. Linhagem H1

Para o cultivo da linhagem H1, os tubos criogênicos contendo as colônias de hCTE adaptadas às condições de cultivo *feeder-free* (sem a necessidade de células alimentadoras) foram descongelados em banho-maria (37° C) e em seguida transferidas para um tubo de centrifuga contendo 9 ml de meio basal de cultivo KnockOut™ DMEM/F-12 (Thermo Fischer Scientific). Os fragmentos de colônias foram submetidos à centrifugação (220 g, 5 minutos, 4° C) e após o descarte do sobrenadante, ressuspensos em meio de cultivo mTeSR™1 (Stem Cell Technologies) acrescido de inibidor de Rock/Y-27632 (10 µM; Sigma Aldrich) e 1% de penicilina-estreptomicina (Thermo Fisher Scientific).

O plaqueamento das colônias foi feito em um poço (10 cm²) previamente cobertos com a matriz extracelular comercial Geltrex® (Thermo Fisher Scientific) e o meio de cultivo substituído diariamente (sem a suplementação com inibidor de Rock). Em confluência próxima a 60-80%, as colônias previamente lavadas com tampão fosfato salino (PBS, do inglês *Phosphate Buffered Saline*) eram repicadas para novos poços (na proporção de 1 poço para 3 poços) utilizando uma solução de 0,5mM EDTA em PBS durante 5 minutos de incubação em temperatura ambiente. Após a incubação, as colônias de hCTEs foram fragmentadas com um jato de meio de cultura sobre o poço, formando pequenos agregados de células que foram transferidos para novos poços e cultivados até a passagem seguinte (Figura 5a).

Além do cultivo em colônias, a linhagem H1 também foi adaptada para a forma de cultivo em monocamada visando ampliar a expansão das células e a

estabilidade do fenótipo pluripotente, visto que a formação em colônias exibe lenta expansão clonal e, frequentemente, o surgimento de heterogeneidade celular (CHEN et al., 2012). Para esta metodologia, as colônias foram desagregadas utilizando StemPro® Accutase® Cell Dissociation Reagent (Thermo Fisher Scientific) por 10 minutos a 37° C e em seguida, a suspensão de células desagregadas foi diluída com o meio basal de cultivo. Após a centrifugação (220 g, 5 minutos, 25° C), as células foram ressuspensas em meio de cultivo mTeSR™1 com 1% de penicilina-estreptomicina (suplementado com inibidor de Rock a 10 µM), contadas e plaqueadas na densidade de $1,5 \times 10^5$ a 2×10^5 células por cm² em novo poço (10 cm²) previamente tratado com Geltrex®. Da mesma forma que o cultivo em colônias, o meio foi trocado todos os dias com mTeSR™1 sem inibidor de Rock até que atingissem 90-95% de confluência. Para a passagem, as células foram submetidas ao repique com a enzima StemPro® Accutase® Cell Dissociation Reagent e plaqueadas sempre numa passagem de 1:3 em poços (10 cm²) previamente tratados com Geltrex® (Figura 5b).

Figura 5 – Fotomicrografia de contraste de fase da linhagem celular H1.

Em A), células H1 apresentando crescimento em colônia e em B), células H1 apresentando crescimento em monocamada.

3.1.2. *Linhagem NT2*

Para o cultivo da linhagem NT2, os tubos criogênicos foram parcialmente descongelados em banho-maria (37° C) e em seguida as células foram transferidas para um tubo de centrífuga contendo 9 ml de meio de cultura DMEM high glucose (Thermo Fischer Scientific) com 10% de soro fetal bovino (Hyclone; SFB) aquecido. As células em suspensão foram centrifugadas (180 g, 10 minutos, 25° C) e após o

descarte do sobrenadante, o *pellet* foi gentilmente ressuspensionado em 5 ml de meio de cultura, transferido para uma garrafa de cultura (25 cm²) e mantido em incubadora a 37° C e 5% CO₂. A cada dois dias foram realizadas as trocas de meio para a manutenção do cultivo e quando a confluência celular aproximava-se a 85% da área, era feito o repique mecânico. Este repique foi realizado com a aspiração do meio de cultivo, lavagem com PBS, adição de novo meio e o uso de *cell scrapers* para soltar as células, já que o repique enzimático induz a diferenciação celular espontânea desta linhagem. Após a centrifugação (180 g, 10 minutos, 25° C), o sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspensionado em meio fresco e transferido para novas garrafas de cultivo na proporção de 1:2. Após a terceira passagem, as garrafas apresentando as células mais uniformes morfologicamente foram selecionadas para os experimentos (Figura 6).

Figura 6 – Fotomicrografia de contraste de fase da linhagem celular NTera-2.

Células NT2 apresentando morfologia epitelial.

3.1.3. Diferenciação celular induzida com atRA

Para a indução da diferenciação celular foi adicionado o ácido trans-retinóico (atRA) ao meio de cultivo de ambas as linhagens. O atRA, um metabólito da vitamina A, está relacionado ao desenvolvimento da região posterior do embrião e na especificação da linhagem de células-tronco neurais assim como na diferenciação neural (ZHANG et al., 2015).

Para a indução da diferenciação na linhagem H1 com atRA, as células em colônias foram plaqueadas em poços (10cm²) de placas de 6 (cobertos previamente com Geltrex®), em confluência próxima a 25% e em triplicata experimental para

cada condição. As condições avaliadas foram: “CTRL” (Controle) na qual as colônias foram mantidas em meio mTeSR™1 com 1% de penicilina-estreptomicina e “atRA”, na qual foi acrescido ao meio de cultivo o indutor atRA (Sigma-Aldrich) a 5 µM. Para ambas as condições a troca de meio foi diária, mantendo a administração de 5 µM de atRA na condição tratada. As coletas para a extração de RNA foram realizadas no segundo (D2) e quarto (D4) dia pós plaqueamento conforme esquema representativo abaixo (Figura 7).

Figura 7 – Delineamento experimental da indução de diferenciação celular com atRA em H1.

Para a diferenciação com atRA, as colônias de hCTEs foram plaqueadas em confluência próxima a 25% com mTeSR™1 (D0) e após 24 horas (D1), o meio foi substituído por mTeSR™1 acrescido de atRA (5 µM), assim como nos dias subsequentes. Paralelamente à condição tratada, foi feita uma condição controle na qual as células foram mantidas apenas em mTeSR™1. As coletas de material para a extração de RNA foram realizadas em D2 e D4.

Para a linhagem NT2, as células foram plaqueadas em poços (10cm²) de placas de 6 que foram divididos em dois grupos: “CTRL” (Controle) e “atRA” com 10 µM de ácido trans-retinóico (Sigma-Aldrich). No dia do plaqueamento (D0), as células foram semeadas na densidade de 4×10^5 por poço (em triplicata experimental) com meio DMEM High Glucose 10% SFB. Após 24 horas, o meio de cultivo foi retirado dos poços e substituído por meio novo no grupo CTRL e por meio novo acrescido do indutor de diferenciação atRA a 10 µM no grupo tratado. As coletas para a extração de RNA foram realizadas nos dias 2 e 4 pós plaqueamento conforme esquema representativo abaixo (Figura 8).

Figura 8 – Delineamento experimental da indução de diferenciação celular com atRA em NT2.

Para a diferenciação com atRA em NT2, as células foram plaqueadas com DMEM High Glucose (D0) e após 24 horas (D1), o meio foi substituído por novo meio acrescido de atRA (10 µM) e no D2, para as células mantidas até o D4. Paralelamente à condição tratada, foi feita uma condição controle na qual as células foram mantidas apenas em DMEM. As coletas de material para a extração de RNA foram realizadas em D2 e D4.

3.2. Caracterização Imunofenotípica (Fixação e Imunomarcção)

A caracterização fenotípica das linhagens pluripotentes H1 e NT2 foi realizada por imunofluorescência em plataforma de aquisição e análise HCS (*High Content Screening*) com os marcadores de pluripotência OCT4, SOX2, TRA-1-60 e TRA-1-81. Para tanto, inicialmente foi necessário realizar um teste para determinar a densidade ideal de células para o plaqueamento em placas de 96 poços (0,3 cm²) (3603, Corning® Costar®), para que fosse possível obter uma imagem em que os núcleos estivessem bem individualizados.

Após 72 horas de cultivo e, determinadas as densidades iniciais de $6,0 \times 10^3$ células/poço (previamente cobertos com Geltrex®) para H1 e de 4×10^3 células/poço para NT2, as placas foram submetidas ao mesmo protocolo de fixação. Em suma, foi retirado o meio de cultura dos poços, realizadas duas lavagens de 100 µl com PBS e adicionado 50 µl da solução fixadora composta de formol 2% em Metanol gelado por 20 minutos a -20° C. A seguir, os poços foram novamente lavados com PBS e então submetidos às etapas de *quenching*, com 50 µl de Glicina 0,1 M por 15 minutos e, de bloqueio, com 50 µl da solução de 1% SFB em PBS por 30 minutos.

Para a imunomarcção, as células foram incubadas com 50 µl da diluição dos anticorpos primários (Tabela 1) na solução de bloqueio e deixadas *overnight* a 4° C. No dia seguinte, os poços foram lavados por duas vezes com PBS e foram novamente incubados, agora, com 50 µl da diluição do anticorpo secundário específico (Tabela 1) e de 1 µM do marcador nuclear Hoechst 33342 (Thermo Fisher Scientific, #62249) na solução de bloqueio por 1 hora. Por fim, as células foram

lavadas por mais três vezes e mantidas com 100 µl de PBS até o momento da aquisição. As imagens foram adquiridas pelo sistema de *HCS ImageXpress^{micro} XLS* (Molecular Devices), e as análises e quantificações foram realizadas utilizando-se o software *MetaXpress* (Molecular Devices).

Tabela 1 – Anticorpos primários e secundários utilizados na caracterização imunofenotípica

Linhagem Celular	Anticorpos primários / Diluição	Anticorpos Secundários / Diluição
H1	OCT4 (#sc-9081, Santa Cruz Biotechnology) / 1:200 SOX2 (#sc-365823, Santa Cruz Biotechnology) / 1:200 TRA-1-81 (#sc-21706, Santa Cruz Biotechnology) / 1:200	DyLight 488 - FITC (#35503, Thermo Fisher Scientific) / 1:300
NTera-2	OCT4 (#sc-9081, Santa Cruz Biotechnology) / 1:200 SOX2 (#sc-17320, Santa Cruz Biotechnology) / 1:200 TRA-1-60 (#sc-17320, Santa Cruz Biotechnology) / 1:200	DyLight 488 - FITC (#35503, Thermo Fisher Scientific) / 1:300

Na Figura 9, observa-se a imunomarcagem dos fatores de pluripotência OCT4 (99,7%), SOX2 (97,3%) e TRA-1-81 (86,1%), demonstrando o estado pluripotente da linhagem celular H1 e na Figura 10 observam-se as imunomarcações para os marcadores OCT4 (85,5%), SOX2 (85,5%) e TRA-1-60 (75,2%) na linhagem NT2.

Figura 9 – Caracterização Imunofenotípica da linhagem H1.

Fotomicrografia de fluorescência da cultura de hESCs imunomarcada com o Hoechst 33342 (marcador nuclear) e anticorpos anti-OCT4, SOX2 e TRA-1-81 (DyLight 488 – verde). (Escala: 100 μ m)

Figura 10 – Caracterização Imunofenotípica da linhagem NT2.

Fotomicrografia de fluorescência da linhagem NT2 imunomarcadas com o Hoechst 33342 (marcador nuclear) e anticorpos anti-OCT4, SOX2 e TRA-1-60 (Escala: 100 μ m).

3.3. Transfecção Reversa

Para a realização dos ensaios funcionais de ganho e perda do miR-29a assim como de outros oligonucleotídeos sintéticos nas linhagens H1 e NT2, foi utilizado o protocolo de transfecção reversa, que inicialmente foi padronizado nas placas de 96 poços (0,3 cm²) para os ensaios de imunomarcção e posteriormente adaptado para as placas de 6 (10 cm²) e 12 (4 cm²) poços para a avaliação da expressão gênica.

Na linhagem H1, a princípio foram testados os reagentes de transfecção DharmaFECT-1 e DharmaFECT-4 (GE Healthcare Dharmacon), em diferentes concentrações (0,05; 0,075; 0,1) para avaliar a toxicidade e eficiência. Os testes

foram realizados em placas de 96 poços (Corning® Costar®, 3603) próprias para imageamento e leitura em sistema HCS.

Juntamente aos reagentes de transfecção comerciais foram utilizadas as moléculas siGENOME Human UBC siRNA (#M-019408-01, Thermo Scientific) utilizada como controle positivo funcional por induzir a morte celular (concentração final de 30 nM); e o Silencer® Negative Control N° 1 siRNA (#4390844, Thermo Fisher Scientific) que não possui ação específica sobre o metabolismo celular (concentração final de 10 nM).

Para isso, os oligonucleotídeos controle e os reagentes de transfecção foram diluídos separadamente em meio Opti-MEM (Gibco, #31985-088) no equivalente a 10% do volume final da reação. De acordo com as instruções do fabricante, cada reagente de transfecção foi incubado por cinco minutos antes de ser misturado a solução com os oligonucleotídeos sintéticos.

Após este intervalo, foram adicionados 10 µl da solução contendo os oligonucleotídeos e 10 µl da solução com o reagente de transfecção em cada poço, seguido por um período de incubação de 30 minutos sob condições de cultivo. Posteriormente, foram adicionados 80 µl de suspensão celular contendo $6,0 \times 10^3$ células em meio mTeSR™1 acrescido de iRock (10 µM). As células utilizadas para este protocolo foram previamente incubadas com iRock (10 µM) por uma hora antes da dissociação enzimática e plaqueamento.

Após 24 horas de cultivo, o meio de transfecção foi substituído por 100 µl de meio mTeSR™1, porém sem iRock. A troca de meio ocorreu mais uma vez com 48 horas e 72 horas pós transfecção, as células foram lavadas duas vezes com PBS e submetidas à solução fixadora 2% de formol em Metanol (gelado). Em seguida, foram realizadas as marcações para o núcleo com Hoechst 33342, seguida da aquisição das imagens em sistema de HCS (Molecular Devices) de acordo com os protocolos já descritos.

A partir da quantificação da viabilidade celular foi determinado que o reagente com melhor eficiência de transfecção foi o DharmaFECT-4 com o volume de 0,1 µl para o volume final de 100 µl de transfecção.

Para a linhagem NT2, o protocolo de transfecção reversa em placa de 96 poços (0,3 cm²) foi realizado com o reagente de transfecção Lipofectamina 2000 (#11668030, Thermo Scientific). Resumidamente, a primeira parte do protocolo consistiu na diluição de 0,08 µl de Lipofectamina 2000 em 10 µl de Opti-MEM e em

separado, a diluição dos oligonucleotídeos também em 10 µl de Opti-MEM nas concentrações determinadas para cada molécula (descritas no próximo tópico). Após a incubação de cada diluição por 5 minutos, as soluções foram misturadas em cada poço e incubadas por 30 minutos. Adiante, foram adicionados 80 µl de suspensão celular contendo $4,0 \times 10^3$ células em meio DMEM High Glicose (sem antibiótico). Após 72 horas de transfecção, as células foram lavadas duas vezes com PBS e submetidas à solução fixadora 2% de formol em Metanol (gelado).

3.4. Avaliação da modulação epigenética do miR-29a na manutenção da pluripotência em NT2

A linhagem NT2 foi submetida a um conjunto de transfecções para avaliar o comportamento de alguns fatores epigenéticos e sua modulação pelo miR-29a no contexto de pluripotência. Para tanto, foram realizados ensaios de ganho e perda de função do miR-29a, perda de função das enzimas DNMT3b e TET1 e de moléculas bloqueadoras dos sítios alvo do miR-29a na região 3'UTR de mRNA alvos específicos.

Para o embasamento das análises posteriores, foram coletadas informações da família miR-29a (Tabela 2) e a identificação de alvos transcricionais envolvidos nos mecanismos de metilação e demetilação do DNA (Tabela 3) nas bases de dados MicroRNA.org (<http://www.microrna.org/microrna/home.do>) e MiRBase (<http://www.mirbase.org/>) em humanos.

Tabela 2 – Informações dos microRNAs membros da família miR-29.

microRNA	Número de acesso pré-miR	ID pré-miR	Localização no genoma	Posição no genoma	Número de acesso miR-maduro	Sequência miR maduro
hsa-miR-29a-3p	MI0000087	hsa-miR-29a	Cromossomo 7	Intragênico	MIMAT0000086	5' AGCACCAUCUGAAAUCGGUUA 3'
hsa-miR-29b-3p	MI0000105	hsa-miR-29b-1	Cromossomo 7	Intragênico	MIMAT0000100	5' UAGCACCAUUUGAAAUCAGUGUU 3'
	MI0000107	hsa-miR-29b-2	Cromossomo 1	Intergênico		
hsa-miR-29c-3p	MI0000735	hsa-miR-29c	Cromossomo 1	Intergênico	MIMAT0000681	5' UAGCACCAUUUGAAAUCGGUUA 3'

Fonte: <http://www.mirbase.org/>

Tabela 3 – Alvos epigenéticos do miR-29a.

Gene	Nº de sítios de interação	Posição na região 3'UTR do mRNA (direção 5' – 3')
DNMT3a	1	1189
DNMT3b	1	847
TET1	3	268; 386; 1524
TET2	4	433; 577; 1139; 1697
TET3	2	3794; 4458
TDG	4	1; 864; 1049; 1403

Fonte: <http://www.microrna.org/microrna/home.do>

Nos estudos de ganho de função do miR-29a foram utilizados o Pre-miR™ miRNA Precursor hsa-miR-29a (ID PM12499, Thermo Fisher Scientific), um oligonucleotídeo sintético mímico ao miRNA endógeno e, como controle o Pre-miR™ miRNA Precursor Negative Control (AM17110, Thermo Fisher Scientific), ambos na concentração de 50 nM.

Com o intuito de avaliar a perda da função do miR-29a endógeno foram utilizados o miRCURY LNA™ microRNA inhibitor hsa-miR-29a-3p (4100170-001, Exiqon) e como controle miRCURY LNA™ microRNA inhibitor control (199006-002, Exiqon) ambos também na concentração de 50 nM.

Já para avaliar o efeito de perda de função das enzimas DNMT3b e TET1 foram utilizados as moléculas Silencer® Selected Validated siRNA DNMT3b (ID s4221) e Silencer® Pre-designed siRNA TET1 (ID 147892, Thermo Fisher Scientific) tendo como controle Silencer® Negative Control Nº 1 siRNA (#4390844, Thermo Fisher Scientific) em concentração final de 30 nM.

Com a finalidade de avaliar a atuação específica do miR-29a sobre seus alvos DNMT3b e TET1 foi utilizada a tecnologia Target Site Blockers (TSB) que é resultado da síntese de oligonucleotídeos *antisense* que se ligam ao sítio alvo do miRNA na região 3' UTR de seu mRNA alvo bloqueando, portanto, a ação deste miRNA sobre um alvo específico. Deste modo, ao contrário do fenótipo observado na repressão do miRNA endógeno que resulta na depleção de todos os seus mRNA alvos, o TSB permite o estudo dos efeitos individuais do miRNA em apenas um dos seus alvos (EXIQON, 2017).

Para o desenho dos oligonucleotídeos, foi realizada a pesquisa *in silico* no site <http://www.microrna.org/> dos sítios alvos do miR-29a nas regiões 3'UTR dos mRNAs de DNMT3b e TET1 (Figura 11). Com base na sequência nucleotídica de aproximadamente 20 pares de bases acima e abaixo da região de interação miRNA:mRNA e do “mirSVR score” (que indica a probabilidade de redução do mRNA pelo miRNA em cada sítio de interação, sendo considerada forte a interação de mirSVR score < -1), a empresa realizou a síntese dos oligonucleotídeos TSB específicos do miR-29a para um sítio alvo de DNMT3b e três sítios alvo de TET1 (Tabela 4).

Figura 11 – Sítios de interação dos membros da família miR-29 e seus mRNA alvos epigenéticos.

A) Alinhamento DNMT3b : hsa-miR-29a

<pre> 3' auUGGCUAAAGUCUACCACGAu 5' hsa-miR-29a : : 1189:5' uuACUCUUCUUA-CUGGUGCUa 3' DNMT3B </pre>	<p>mirSVR score: -1.1597 PhastCons score: 0.6499</p>
---	--

B) Alinhamento TET1 : hsa-miR-29a

<pre> 3' auuggcuaaaAGUC-UACCACGAu 5' hsa-miR-29a 268:5' uagaaucaacUCAGUUUGGUGCUu 3' TET1 </pre>	<p>mirSVR score: -0.9262 PhastCons score: 0.6801</p>
<pre> 3' auuggcuaaaagucuACCACGAu 5' hsa-miR-29a 386:5' cucuacacagcuucUGGUGCUu 3' TET1 </pre>	<p>mirSVR score: -0.3796 PhastCons score: 0.7368</p>
<pre> 3' auuggcuaaaagucUACCACGAu 5' hsa-miR-29a 1524:5' uauaggaaaaccuaAUGGUGCUu 3' TET1 </pre>	<p>mirSVR score: -0.2997 PhastCons score: 0.7025</p>

Em A), alinhamento entre o hsa-miR-29a e o mRNA de DNMT3b apresentando um sítio de interação. Em B), alinhamento entre o hsa-miR-29a e o mRNA de TET1 apresentando três sítios de interação. Fonte: www.microrna.org/.

Tabela 4 – Sequência dos oligonucleotídeos Target Site Blockers.

RNA mensageiro	Sequência do TSB
DNMT3b	CUCUUCUUACUGGUGCUA
TET1 (sítio 1)	UCACUCAGUUUGGUGCUU
TET1 (sítio 2)	ACACAGCUUCUGGUGCUU
TET1 (sítio 3)	GAAAACCUA AUGGUGCUU

Em realce a região “seed sequence” do miR-29a.

Deste modo, para a transfecção reversa dos TSBs foi utilizada a concentração final de 50 nM do miRCURY LNA™ microRNA Target Site Blocker DNMT3b e 0,16 nM de cada um dos miRCURY LNA™ microRNA Target Site Blocker TET1, assim como 50 nM do controle negativo miRCURY LNA™ microRNA Target Site Blocker Scramble Control.

Todas as transfecções foram realizadas em placas de 96 poços (Corning® Costar®, 3603) próprias para imageamento e em triplicata de acordo com o protocolo já citado para a linhagem NT2. O desenho da placa com as diferentes condições propostas assim como a combinação entre tratamentos está esquematizado na Figura 12.

Figura 12 – Representação do ensaio funcional para análise de imunofluorescência.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS
B	PBS	mmiR-29a	TSB-TET1	TSB-DNMT3b	mmiR-29a + TSB-TET1	mmiR-29a + TSB-DNMT3b	mmiR-29a + TSB-CTRL	amiR-29a	siTET1	siDNMT3b	siUBC	PBS
C	PBS	mmiR-29a	TSB-TET1	TSB-DNMT3b	mmiR-29a + TSB-TET1	mmiR-29a + TSB-DNMT3b	mmiR-29a + TSB-CTRL	amiR-29a	siTET1	siDNMT3b	siUBC	PBS
D	PBS	mmiR-29a	TSB-TET1	TSB-DNMT3b	mmiR-29a + TSB-TET1	mmiR-29a + TSB-DNMT3b	mmiR-29a + TSB-CTRL	amiR-29a	siTET1	siDNMT3b	siUBC	PBS
E	PBS	mmiR-CTRL	amiR-CTRL	TSB-CTRL	mmiR-CTRL + TSB-CTRL	siCTRL						PBS
F	PBS	mmiR-CTRL	amiR-CTRL	TSB-CTRL	mmiR-CTRL + TSB-CTRL	siCTRL						PBS
G	PBS	mmiR-CTRL	amiR-CTRL	TSB-CTRL	mmiR-CTRL + TSB-CTRL	siCTRL						PBS
H	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS

As células NT2 foram submetidas a diferentes condições de transfecção em placa de 96 poços e após 96 horas de cultivo foram fixadas e imunomarcadas. Siglas: mmiR-29a (mímico do miR-29a endógeno); mmiR-CTRL (mímico controle); amiR-29a (anti-miR-29a); amiR-CTRL (anti-miR controle); siTET1 (siRNA contra TET1); siDNMT3b (siRNA contra DNMT3b); siCTRL (siRNA controle negativo); TSB-DNMT3b (Target Site Blocker DNMT3b); TSB-TET1 (Target Site Blocker TET1); TSB-CTRL (Target Site Blocker controle); siUBC (siRNA contra Ubiquitina, controle positivo de transfecção).

Os fatores epigenéticos escolhidos para esta avaliação funcional foram: presença da proteína DNMT3b e das marcas epigenéticas 5mC e 5hmC, cada um paralelamente associado a presença do fator de pluripotência OCT4. Após 96 horas mantidas sob condições de cultivo controlada em incubadora umidificada (5% CO₂; 37° C; 85% umidade relativa do ar) e sem trocas de meio, todas as placas foram submetidas aos protocolos de fixação e imunomarcagem já descritos anteriormente com algumas modificações.

Para a avaliação de DNMT3b, as etapas de fixação, *quenching*, bloqueio e de imunomarcagem foram as mesmas, com o adendo de que a marcação dos anticorpos foi multiplexada, ou seja, a diluição dos dois anticorpos primários OCT4 e DNMT3b (com diferentes hospedeiros) ocorreu na mesma solução de bloqueio e da

mesma maneira transcorreu com seus respectivos anticorpos secundários (Tabela 5).

Tabela 5 – Anticorpos primários e secundários utilizados nos ensaios funcionais de transfecção.

Fator epigenético	Anticorpos primários / Hospedeiro / Diluição	Anticorpos Secundários / Diluição
DNMT3b	OCT4 (#sc-5279, Santa Cruz Biotechnology) / Mouse / 1:200	Goat-Anti-Mouse DyLight 488 - FITC (#35503, Thermo Fisher Scientific) / 1:300
	DNMT3b (#sc-20704, Santa Cruz Biotechnology) / Rabbit / 1:200	Goat-Anti-Rabbit DyLight 594 - Texas Red (#35561, Thermo Fisher Scientific) / 1:300
5mC	OCT4 (#sc-9081, Santa Cruz Biotechnology) / Rabbit / 1:200	Goat-Anti-Rabbit DyLight 594 - Texas Red (#355613, Thermo Fisher Scientific) / 1:300
	5-Methylcytidine (#sc-56615, Santa Cruz Biotechnology) / Mouse / 1:400	Goat-Anti-Mouse DyLight 488 - FITC (#35503, Thermo Fisher Scientific) / 1:300
5hmC	OCT4 (#sc-5279, Santa Cruz Biotechnology) / Mouse / 1:200	Goat-Anti-Mouse DyLight 488 - FITC (#35503, Thermo Fisher Scientific) / 1:300
	5-Hydroxymethylcytosine (39791, Active Motif) / Rabbit / 1:400	Goat-Anti-Rabbit DyLight 594 - Texas Red (#35561, Thermo Fisher Scientific) / 1:300

Para as avaliações de 5mC e 5hmC, os ensaios de imunofluorescência seguiram as etapas de fixação com 2% formol em metanol, permeabilização, desnaturação do DNA, de bloqueio e por fim, a imunomarcação dos anticorpos de interesse. Após a fixação, as células foram submetidas à permeabilização pela incubação com 50 µl de Glicina 0,1 M por 15 minutos, seguido de 50 µl de solução de 0,025% Triton X-100 em PBS por 30 minutos e finalizada com 50 µl de solução de Tween 20 em PBS por 10 minutos. Por último, os poços foram lavados uma vez com PBS, mas sem lavagens entre os passos citados.

Posteriormente, na etapa de desnaturação do DNA, as células foram incubadas em 50 µl de solução de 0,1% Triton X-100 em HCl por 10 minutos e para neutralizar o ácido, retirou-se esta solução e foram adicionados 50 µl de solução Tris-HCl 100 mM (pH 8,5) durante 30 minutos. Após duas lavagens, foram realizadas

as etapas de bloqueio e imunomarcação multiplexada dos anticorpos primários e secundários (Tabela 6) como já descrito anteriormente.

Simultaneamente à marcação dos anticorpos secundários, foi realizada a marcação nuclear com 1 μ M de Hoechst 33342. Os poços foram mantidos com 100 μ l de PBS até o momento da aquisição das imagens, e as análises e quantificações foram realizadas utilizando-se o software Cell Profiler.

3.4.1. *Análise das imagens e gerenciamento dos dados obtidos*

A aquisição das imagens foi realizada no microscópio de fluorescência invertido do sistema de *HCS ImageXpress^{micro} XLS* (Molecular Devices), utilizando os cubos para detecção de fluorescência DAPI (Hoechst 33342), FITC (DyLight 488) e Texas Red (DyLight 594). Empregando a objetiva de 10X, foram obtidas nove imagens por poço para cada um dos cubos de fluorescência, totalizando 27 imagens por poço e 1134 imagens por placa a serem quantificadas.

Para a análise das imagens geradas foi utilizado o software de licença aberta CellProfiler 2.2 (<http://cellprofiler.org>) que permite a obtenção de dados quantitativos a partir de fotomicrografias obtidas em microscópios de luz transmitida ou de fluorescência. Para as quantificações, as imagens foram inseridas no programa e em seguida, módulos de metadados do software extraíram as informações que descrevem as imagens. Um dos primeiros módulos, o módulo “Input”, refere-se a designação dos marcadores visualizados pelos diferentes cubos de fluorescência, sendo “w1” para o cubo DAPI, “w2” para o cubo FITC e “w3” para o cubo Texas Red. Deste modo, será possível que o software identifique corretamente cada conjunto de imagens que serão utilizados nos módulos de análises.

Os módulos de análise compreendem a identificação dos objetos, quantificação das medidas morfométricas do núcleo e a intensidade de fluorescência dos marcadores. A identificação do objeto primário refere-se à delimitação do núcleo da célula para obter dados de área, perímetro, raio, solidez e excentricidade (Figura 13). Já no módulo das marcações fluorescentes, foram realizadas as análises de intensidade das marcações dos canais “w2” e “w3” na região nuclear, que reporta a quantidade de proteína marcada neste compartimento nos diferentes tratamentos.

Figura 13 – Segmentação de núcleos.

Etapas do processo de segmentação e identificação dos núcleos pelo software CellProfiler. Em A) Imagem adquirida no canal de fluorescência DAPI; B) Identificação do objeto primário (núcleo) baseando-se nas diferenças de intensidade entre a marcação e o *background*; e, C) Máscara do objeto que determina a região utilizada para a quantificação dos parâmetros definidos.

Uma vez definidos todos os parâmetros para a detecção do núcleo e escolhidos os módulos de análise, criou-se um “pipeline” que pôde ser aplicado a todas as imagens, de todos os poços e placas, garantindo assim uma análise equiparável em todos os tratamentos, de maneira não-supervisionada. Por fim, as tabelas geradas a partir dos resultados de cada um dos módulos, foram utilizadas para avaliar o perfil fenotípico induzido por cada uma das condições estabelecidas no ensaio funcional de transfecção reversa na linhagem NT2.

Para o gerenciamento do volume de informações gerado pelas análises do software CellProfiler foi utilizado o software de licença aberta KNIME (www.knime.org), que realiza diversas funções matemáticas por meio de módulos (nodes) que são desenvolvidos para a realização de funções específicas, como leitura de arquivos, agrupamento dos dados, substituição ou filtragem dos dados.

3.5. Análise de Expressão Gênica

3.5.1. Extração do RNA

Para a obtenção do RNA total (incluindo miRNAs) foi utilizado o protocolo de extração com TRIzol LS® (solução monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina – Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) resumido a seguir. No dia da coleta, o meio foi

aspirado e os poços lavados uma vez com uma solução de PBS contendo 0,1% de DEPC (Dietilpirocarbonato, um inibidor de RNase – Invitrogen). Posteriormente, foram adicionados 250 µl da solução de PBS-DEPC (gelado) e 750 µl de TRIzol LS diretamente no poço, pipetando para homogeneizar bem e transferindo as amostras para um tubo, o qual foi armazenado em freezer -80° C.

Para a extração do RNA, foi adicionado 10 µL de glicogênio (20 mg/ml), e 200 µL de clorofórmio, homogeneizando as amostras em vortex para seguir com a centrifugação (435 g, 15 minutos, 4° C). Em seguida, foi possível visualizar a separação da fase aquosa contendo o RNA total e outra contendo o DNA e proteínas. Transferiu-se a fase aquosa para um novo tubo acrescentando 500 µL de isopropanol gelado e após 15 minutos à temperatura ambiente o precipitado foi novamente centrifugado (435 g, 15 minutos, 4° C). Após a centrifugação, o precipitado de RNA foi ressuspensionado em etanol 70% seguido de nova centrifugação (435 g, 15 minutos, 4° C).

Por fim, o sobrenadante foi descartado, o pellet de RNA foi eluído em 10 µL de água livre de RNase e estocado em freezer a -80° C até a quantificação. A quantificação e integridade da amostra foi obtida utilizando 2 µL da amostra, com o espectrofotômetro *NanoVue Plus* (GE Healthcare Life Sciences) baseado na leitura de 260nm e razões 260/280nm e 260/230nm. Apenas as amostras com razões acima de 1,6 foram utilizadas nas análises posteriores.

3.5.2. *Transcrição reversa: RT-PCR*

Para a análise de expressão de miRNAs maduros por PCR em tempo real, a síntese do cDNA foi realizada pelo kit *TaqMan miRNA assays Human* (Applied Biosystems). O protocolo deste kit requer transcrição reversa com um oligonucleotídeo específico em alça, seguida de PCR em tempo real com oligonucleotídeos sense/anti-sense e sondas *Taqman*, também específicos para o miRNA de interesse. Para a confecção do cDNA, as reações foram realizadas em volume final de 15 µL, sendo: 0,15 µL de dNTPs 100 mM, 1 µL de MultiScribe Reverse Transcriptase (50 U/µL), 1,5 µL de 10 X Reverse Transcription Buffer, 0,19 µL de RNaseInhibitor (20 U/µL), 1 µL de cada sonda (Tabela 6), 5 µL da amostra de RNA e 4,16 µL de água livre de RNase. As condições da reação compreenderam as etapas de 30 minutos a 16° C, 30 minutos a 42° C e 5 minutos a 85° C.

Para a síntese de cDNA dos demais genes, foi utilizado o kit *High-Capacity cDNA Archive* (AppliedBiosystems) seguindo as instruções do fabricante. Cada reação foi realizada nas seguintes condições: 1 µL de buffer 10 X; 0,4 µL de dNTPs 25 X; 1 µL de Random Primers; 0,5 µL da enzima MultiScribe, 0,4 µL de RNase Inibitor, 1 µg de RNA e água DEPC para completar o volume final de 10 µL. As reações foram submetidas a temperatura de 25° C por 10 minutos e 37° C por 2 horas e após o término, as amostras foram diluídas para a concentração final de 10 ng/µL em água livre de RNase.

Tabela 6 – Sondas TaqMan

Gene	TaqMan	miRBase Accession Number
miR-29a-3p	ID 002112	MIMAT0000086
miR-29b-3p	ID 002166	MIMAT0000100
miR-29c-3p	ID 000587	MIMAT0000681
RNU24	ID 001001	ID: 26820
RNU48	ID 001006	ID: 26801

3.5.3. Avaliação da Expressão Gênica

Os níveis de expressão gênica dos miRNAs maduros foram avaliados utilizando sondas TaqMan (AppliedBiosystems) adquiridas pelo sistema “AssayOnDemand” conforme especificado na Tabela 7. Para a avaliação da expressão gênica dos genes envolvidos na via de desmetilação ativa do DNA foram desenhados *primers* com o auxílio da ferramenta online do site IDT (Integrated DNA Technologies, Skokie, IL, USA) apresentados na Tabela 8.

A avaliação da expressão dos miRNAs maduros deu-se nas seguintes condições: 2 µL de água ultra pura; 0,5 µL de sonda TaqMan 20 X e 5 µL de MasterMix e 2,5 µL de cDNA (10 ng/µL) para um volume final de 10 µL. A reação foi submetida ao ciclo de temperaturas: 50° C por 2 minutos, 95° C por 10 minutos e 40 ciclos de 95° C por 15 segundos e 60° C por 1 minuto.

Para os demais genes, as reações foram submetidas às seguintes condições: 6,4 µL de água ultra pura, 10 µL Master Mix Power SYBR Green, 0,8 µL de cada par

de *primers* (10 μ M), 2,0 μ L de cDNA (10 ng/ μ L) em volume final de 20 μ L. Para a ciclagem, foram determinadas as seguintes temperaturas: 50° C por 2 minutos, 95° C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos de 95° C por 15 segundos e 60° C (ou 62° C) por 1 minuto, acompanhado do ciclo para curva de *melting* com 95° C por 15 segundos, 60° C por 30 segundos e 95° C por 15 segundos.

As reações foram realizadas em duplicatas no equipamento de detecção de PCR em tempo real 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA) e analisadas com o software Sequence Detection System V1.3. A expressão gênica relativa foi calculada pelo método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (PFAFFL, 2004) sendo normalizada pelo gene endógeno GAPDH (para os mRNAs) e pela média geométrica dos genes RNU24 e RNU48 (para os miRNAs).

Tabela 7 – Sondas TaqMan.

Gene	TaqMan	RefSeq
miR-29a-3p	ID 002112	ID: 407021
miR-29b-3p	ID 002166	ID: 407024 ID: 407025
miR-29c-3p	ID 000587	ID: 407026
RNU24	ID 001001	ID: 26820
RNU48	ID 001006	ID: 26801

Tabela 8 – Pares de primers para Sybr Green.

Gene	Sequência dos <i>Primers</i>	TM °C
GAPDH	F: GAAGGTGAAGGTCGGAGTC R: GAAGATGGTGATGGGATTTC	60
OCT4	F: GAGAATTTGTTCTCCTGCAGTGC R: TCGTTGTGCATAGTCGCTG	62
NANOG	F: GAAATACCTCAGCCTCCAGC R: GCGTCACACCATTGCTATTC	62
GATA4	F: CTTGCAATGCGGAAAGAGG R: TGCTGGAGTTGCTGGAAG	62
GATA6	F: AACACAACCTACAGCCTCAG R: TCTTGACCCGAATACTTGAGC	62
GSC	F: GAGGGAAGAGGAAGGTAAAAGC R: AAGTAATACGGGCAAGTGTCC	62
MIXL1	F: GTACCCCGACATCCACTTG R: GATTTCCCACTCTGACGCC	62
NES	F: GGTCTCTTTTCTCTTCCGTCC R: CTCCACATCTGAAACGACTC	62
OTX2	F: CCAGACATCTTCATGCGAGAG R: GGCAGGTCTCACTTTGTTTTG	62
TUBB3	F: TTTGGACATCTCTTCAGGCC R: TTTCACACTCCTTCCGCAC	62
NOTCH1	F: TGCCTGGACAAGATCAATGAG R: CAGGTGTAAGTGTTGGGTCC	62
TET1	F: ACCTATTCCCCGAATCAAGC R: TTGCACGGTCTCAGTGTTACTC	60
TET2	F: ACTTGCCCTTTGCTCCTGTTG R: AGCCCCATCACGTACAAAAC	60
TET3	F: CACAAGGACCAGGATAACT R: AGCGATTGTCTTCCTTGGTC	60
TDG	F: GACTCTCCCGATATTTTGACC R: CACTGAGCCCTGACATAAACA	60
DNMT1	F: GAATCAGTTATGTGACTTGGAAC R: CTAGACGTCCATTCACTTCCC	62
DNMT3a	F: GGAGAAGCCCAAGGTCAAG R: TTCCAGGGTAACATTGAGGC	62
DNMT3b	F: CCCATTGAGTCCTGTCATTG R: TTGATATTCCCCTCGTGCTTC	62

TM: Temperatura de *melting*; F: *primer Forward*; R: *primer Reverse*

3.6. Análise estatística

A análise estatística e os gráficos foram gerados a partir do software GraphPad Prism 5.0. Para as análises de expressão gênica foi utilizado o teste estatístico não paramétrico Mann-Whitney não-pareado adotando o nível de

significância de 5%. Para os ensaios funcionais realizados por microscopia de fluorescência, os dados obtidos do software KNIME (após a quantificação das imagens pelo software CellProfiler) foram submetidos aos testes paramétricos t de Student ou ANOVA com pós teste de Tukey, adotando $p < 0,05$ estatisticamente significativo.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Família miR-29 nos contextos de pluripotência e diferenciação induzida por atRA.

Para investigar os níveis de expressão dos membros da família miR-29 nos contextos de pluripotência e diferenciação, as linhagens NT2 e H1 foram submetidas ao protocolo de indução de diferenciação com atRA. As análises de expressão gênica foram realizadas em dois momentos, no segundo e quarto dia após o início do tratamento com atRA. Quanto à caracterização das linhagens no modelo de diferenciação proposto, foram avaliadas as expressões de alguns marcadores de pluripotência e de representantes dos três folhetos embrionários (endoderme, mesoderme e ectoderme).

4.1.1. *Expressão de marcadores de pluripotência*

Na linhagem NT2, foi observada uma diminuição na expressão dos genes *OCT4* e *NANOG*, em relação à condição controle (sem tratamento com atRA), no segundo e quarto dia de diferenciação (Figura 14A). Do mesmo modo, na linhagem H1, notou-se a diminuição, estatisticamente significativa, na expressão do gene *OCT4* ($p < 0,05$), tanto no segundo quanto no quarto dia de diferenciação, enquanto para o gene *NANOG*, a redução foi observada apenas no quarto dia ($p < 0,05$) (Figura 14B).

Figura 14 – Expressão de marcadores de pluripotência em NT2 e H1 tratadas com atRA.

Expressão dos genes *OCT4* e *NANOG* em NT2 (A) e em H1 (B) após dois e quatro dias de cultivo. CTRL D2 e D4, células mantidas em meio basal de cultivo; atRA D2 e D4, células mantidas em meio basal de cultivo acrescidas de 10 μ M atRA em NT2 e 5 μ M atRA em H1. As barras indicam média e desvio padrão (N=3). Para a análise foi utilizado o teste estatístico não paramétrico Mann-Whitney não pareado, sendo estatisticamente significativo, * p = < 0,05; ** p = < 0,01 e *** p = < 0,001.

4.1.2. Expressão de marcadores de diferenciação

Em relação à formação da endoderme, foram avaliadas as expressões de três genes, *GATA4* e *GATA6* relacionados à endoderme primitiva e, *FOXA2* associado à endoderme definitiva. Na linhagem NT2, verificou-se o aumento, estatisticamente significativo, do marcador *GATA6* (no segundo e quarto dia) e a diminuição da expressão de *FOXA2* apenas para o segundo dia após a indução do atRA (Figura 15A). Enquanto isso, na linhagem H1 pôde se observar um aumento expressivo na expressão de *GATA4* e *GATA6* no segundo e quarto dia, assim como um aumento de *FOXA2* no quarto dia (Figura 15B).

Figura 15 – Expressão de marcadores de endoderme em NT2 e H1 tratadas com atRA.

Expressão dos genes *GATA4*, *GATA6* e *FOXA2* em NT2 (A) e em H1 (B) após dois e quatro dias de cultivo. CTRL D2 e D4, células mantidas em meio basal de cultivo; atRA D2 e D4, células mantidas em meio basal de cultivo acrescidas de 10 μ M atRA em NT2 e 5 μ M atRA em H1. As barras indicam média e desvio padrão (N=3). Para a análise foi utilizado o teste estatístico não paramétrico Mann-Whitney não pareado, sendo estatisticamente significativo, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

Também foram avaliados os marcadores relacionados à formação da mesoderme tendo como representante o gene *Goosecoid* (*GSC*) e o gene *MIXL1* que é expresso durante o processo de gastrulação na linha primitiva, marcando as células destinadas a formação da mesendoderme (NAUJOK; DIEKMANN; LENZEN, 2014). Em NT2, foi constatada a diminuição, estatisticamente significativa, na expressão do gene *GSC* no segundo e quarto dia de diferenciação (Figura 16A), enquanto em H1 observou-se o aumento de *GSC* no segundo dia e, apesar da diminuição aparente de *MIXL1* ($p=0,1667$), esta não foi estatisticamente significativa (Figura 16B).

Figura 16 – Expressão de marcadores de mesoderme em NT2 e H1 tratadas com atRA.

Expressão dos genes *MIXL1* e *GSC* em NT2 (A) e em H1 (B) após dois e quatro dias de cultivo. CTRL D2 e D4, células mantidas em meio basal de cultivo; atRA D2 e D4, células mantidas em meio basal de cultivo acrescidas de 10 μ M atRA em NT2 e 5 μ M atRA em H1. As barras indicam média e desvio padrão (N=3). Para a análise foi utilizado o teste estatístico não paramétrico Mann-Whitney não pareado, sendo estatisticamente significativo, *p = < 0,05; **p = < 0,01 e ***p = < 0,001.

Por fim, para a formação da ectoderme, foram analisadas as expressões dos marcadores *TUBB3*, *NES* e *NOTCH1*, todos envolvidos na formação do sistema nervoso central e do comprometimento com a formação neural. De acordo com a literatura científica, a indução da diferenciação com atRA está relacionada à especificação da linhagem de células-tronco neurais (ZHANG et al., 2015). Em linha com o papel do atRA na diferenciação de células-tronco neurais, na linhagem NT2 foi observado o aumento estatisticamente significativo na expressão dos genes *TUBB3* e *NES* no segundo e quarto dia de diferenciação (Figura 17A). Porém, para H1, não foram constatadas alterações significativas na expressão de nenhum dos marcadores, mesmo que tenha sido possível notar o aumento de *NES* (p=0,1667) e *NOTCH1* (p=0,1667) no segundo dia (Figura 17B).

Figura 17 – Expressão de marcadores de ectoderme em NT2 e H1 tratadas com atRA.

Expressão dos genes *TUBB3*, *NES* e *NOTCH1* em NT2 (A) e em H1 (B) após dois e quatro dias de cultivo. CTRL D2 e D4, células mantidas em meio basal de cultivo; atRA D2 e D4, células mantidas em meio basal de cultivo acrescidas de 10 μ M atRA em NT2 e 5 μ M atRA em H1. As barras indicam média e desvio padrão (N=3). Para a análise foi utilizado o teste estatístico não paramétrico Mann-Whitney não pareado, sendo estatisticamente significativo, *p = < 0,05; **p = < 0,01 e ***p = < 0,001.

4.1.3. Expressão dos membros da família miR-29

Os níveis de expressão dos genes miR-29a-3p, miR-29b-3p e miR-29c-3p foram avaliados nas linhagens NT2 (Figura 18A) e H1 (Figura 18B) nas condições controle (CTRL; sem adição de atRA) e tratada com o indutor atRA. De acordo com os resultados obtidos, foi possível observar que dos membros da família miR-29, miR-29a-3p e miR-29b-3p apresentaram aumento, estatisticamente significativos, nos níveis de expressão no segundo dia de diferenciação com atRA em ambas as linhagens. Em particular, na linhagem H1 o aumento da expressão do gene miR-29a-3p também foi observado no quarto dia de diferenciação. No entanto, para o gene miR-29c-3p não foram observadas alterações significativas ao longo da diferenciação. Digno de nota, tendo em vista que o miR-29b pode ser transcrito tanto do cluster miR-29b-1/miR-29a como miR-29b-2/miR-29c, a expressão observada poderia derivar de um ou ambos clusters; no entanto, uma vez que as alterações nos níveis do miR-29c (presente no mesmo cluster que miR-29b-2) não foram significativas, isto poderia ser indicativo de que o cluster induzido foi o miR-29b-1/miR-29a localizados no cromossomo 7q32.3.

Figura 18 – Expressão dos membros da família miR-29 em NT2 e H1 tratadas com atRA.

Expressão gênica dos genes miR-29a-3p, miR-29b-3p e miR29c-3p em NT2 (A) e em H1 (B) após dois e quatro dias de cultivo. CTRL D2 e D4, células mantidas em meio basal de cultivo; atRA D2 e D4, células mantidas em meio basal de cultivo acrescidas de 10 μ M atRA em NT2 e 5 μ M atRA em H1. As barras indicam média e desvio padrão (N=3). Para a análise foi utilizado o teste estatístico não paramétrico Mann-Whitney não pareado, sendo estatisticamente significativo, *p = < 0,05; **p = < 0,01 e ***p = < 0,001.

Interessante notar que entre os membros da família miR-29, o miR-29a-3p foi o que apresentou os menores valores de Δ Ct em relação aos outros miRs após normalização com os miRNAs controles RNU24 e RNU48, indicando que o miR-29a é o miRNA mais expresso da família miR-29 nas linhagens NT2 e H1. Estas observações foram válidas para as condições com e sem atRA em ambas as linhagens como pode ser visto na Figura 19.

Figura 19 – Valores de $1/\Delta$ Ct para membros da família miR-29 em NT2 e H1 tratadas com atRA.

Valores de $1/\Delta Ct$ para miR-29a-3p, miR-29b-3p e miR29c-3p em NT2 (A) e em H1 (B) após dois e quatro dias de cultivo. A normalização foi feita com os controles RNU24 e RNU48. CTRL D2 e D4, células mantidas em meio basal de cultivo; atRA D2 e D4, células mantidas em meio basal de cultivo acrescidas de 10 μM atRA em NT2 e 5 μM atRA em H1. As barras indicam média e desvio padrão (N=3).

4.1.1. Expressão dos alvos epigenéticos da família miR-29

A próxima etapa consistiu na análise da expressão gênica dos alvos epigenéticos do miR-29a no modelo de diferenciação proposto para ambas as linhagens pluripotentes. Sobre a família de metiltransferases, apesar do aumento do miR-29a-3p, foi visto que apenas a enzima DNMT3b apresentou diminuição, estatisticamente significativa, da expressão no segundo e quarto dia da diferenciação na linhagem NT2 (Figura 20A), e apenas no quarto dia para a linhagem H1 (Figura 20B). Quanto a enzima DNMT3a, foi observada alteração significativa apenas para a linhagem H1, mas diferentemente da redução esperada, foi constatado um aumento da expressão no segundo dia de diferenciação (Figura 20B).

Em relação à família das proteínas TET, foram observadas alterações apenas para o gene *TET2*, com aumento estatisticamente significativo da expressão no segundo e quarto dia de diferenciação em ambas as linhagens, e no gene *TET3* no quarto dia em NT2 (Figura 20C e 20D). Para o gene *TET1*, assim como para *TDG*, não foram observadas mudanças significativas na expressão tanto para NT2 quanto para H1 (Figura 20C e 20D).

Figura 20 – Expressão dos alvos epigenéticos do miR-29a em NT2 e H1 tratadas com atRA.

Expressão gênica dos genes *DNMT3a*, *DNMT3b*, *TET1*, *TET2*, *TET3* e *TDG* em NT2 (A e C) e em H1 (B e D) após dois e quatro dias de cultivo. CTRL D2 e D4, células mantidas em meio basal de cultivo; atRA D2 e D4, células mantidas em meio basal de cultivo acrescidas de 10 μ M atRA em NT2 e 5 μ M atRA em H1. As barras indicam média e desvio padrão (N=3). Para a análise foi utilizado o teste estatístico não paramétrico Mann-Whitney não pareado, sendo estatisticamente significativo, *p = < 0,05; **p = < 0,01 e ***p = < 0,001.

4.2. Efeitos do ganho de função do miR-29a sobre seus alvos epigenéticos, a pluripotência e a diferenciação

Para investigar a influência do ganho de função do miR-29a no contexto pluripotente, foi realizado um ensaio funcional com a transfecção de moléculas mímicas ao miR-29a endógeno (mmiR-29a). A seguir, foram feitas coletas de RNA total para avaliação da expressão gênica que foram realizadas no segundo e quarto dia após a transfecção.

4.2.1. Efeito do miR-29a sobre a expressão de seus alvos epigenéticos

Como esperado, a presença do mmiR-29a levou a diminuição da expressão de seus alvos epigenéticos, porém com algumas ressalvas. Para a família DNMT, verificou-se uma queda na expressão das enzimas DNMT3a e DNMT3b no segundo dia pós transfecção tanto para NT2 quanto para H1, no entanto, apenas em NT2 esta queda também pôde ser observada no quarto dia (Figuras 21A e 21B). Em relação à família TET, constatou-se que a expressão de TET1 foi reduzida em NT2 (no segundo dia) em H1 (no segundo e quarto dia), assim como os níveis de TET3 que foram menores em ambas as linhagens no segundo dia (Figura 21C e 21D). Entretanto, peculiarmente, observou-se que as alterações referentes a TET2 não foram condizentes com os outros alvos, já que em NT2, não notaram-se mudanças significativas mas em H1, teve um aumento da expressão do gene no segundo dia, que contrastou com sua diminuição no quarto dia pós transfecção (Figura 21C e 21D). Por fim, a expressão da proteína TDG foi reduzida em NT2 no segundo e quarto dia, enquanto em H1, a redução foi observada apenas no segundo dia (Figura 21C e 21D).

Figura 21 – Expressão dos alvos epigenéticos do miR-29a em NT2 e H1 transfectadas com moléculas mímicas do miR-29a.

Expressão gênica dos genes *DNMT3a*, *DNMT3b*, *TET1*, *TET2*, *TET3* e *TDG* em NT2 (A e C) e em H1 (B e D) após dois e quatro dias de cultivo. mmiR-29a D2 e D4, células mantidas em meio de cultivo basal transfectadas com mimic-miR-29a (50nM); mmiR-Ctrl D2 e D4, células mantidas em meio de

cultivo basal transfectadas com mimic-miR-29a. As barras indicam média e desvio padrão (N=3). Para a análise foi utilizado o teste estatístico não paramétrico Mann-Whitney não pareado, sendo estatisticamente significativo, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

4.2.2. Efeito do miR-29a sobre a expressão de marcadores de pluripotência e diferenciação

No tocante aos marcadores de pluripotência, foi visto que o ganho de função do miR-29a não interferiu na expressão do gene *NANOG* das linhagens, enquanto que para *OCT4*, foi observada uma ligeira, porém estatisticamente significativa, diminuição da expressão no quarto dia em NT2 (Figura 22).

Figura 22 – Expressão de marcadores de pluripotência em NT2 e H1 transfectadas com moléculas mímicas do miR-29a.

Expressão dos genes *OCT4* e *NANOG* em NT2 (A) e em H1 (B) após dois e quatro dias de cultivo. mmiR-29a D2 e D4, células mantidas em meio de cultivo basal transfectadas com mimic-miR-29a (50nM); mmiR-Ctrl D2 e D4, células mantidas em meio de cultivo basal transfectadas com mimic-miR-29a. As barras indicam média e desvio padrão (N=3). Para a análise foi utilizado o teste estatístico não paramétrico Mann-Whitney não pareado, sendo estatisticamente significativo, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

Para os marcadores de endoderme, a adição do mmiR-29a promoveu um aumento significativo nos níveis de expressão do gene *GATA4* no segundo e quarto dias de transfecção, observável nas duas linhagens. Porém, para o gene *GATA6*, houve uma contradição, pois enquanto notou-se a diminuição, estatisticamente significativa, do marcador (no segundo dia) para NT2, o oposto foi visto em H1 (no segundo e quarto dias). Da mesma forma, o efeito inverso também foi observado com o gene *FOXA2*, o qual apresentou redução dos níveis de expressão em NT2 e o aumento em H1 no quarto dia (Figura 23).

Figura 23 – Expressão de marcadores de endoderme em NT2 e H1 transfectadas com moléculas mímicas do miR-29a.

Expressão dos genes *GATA4*, *GATA6* e *FOXA2* em NT2 (A) e em H1 (B) após dois e quatro dias de cultivo. mmiR-29a D2 e D4, células mantidas em meio de cultivo basal transfectadas com mimic-miR-29a (50nM); mmiR-Ctrl D2 e D4, células mantidas em meio de cultivo basal transfectadas com mimic-miR-29a. As barras indicam média e desvio padrão (N=3). Para a análise foi utilizado o teste estatístico não paramétrico Mann-Whitney não pareado, sendo estatisticamente significativo, *p = < 0,05; **p = < 0,01 e ***p = < 0,001.

Quanto aos marcadores de mesoderme, novamente foi observado um contraste entre as linhagens, visto que em NT2 notou-se uma redução significativa do nível de expressão de *MIXL1* (no quarto dia), enquanto que para H1, viu-se um aumento nos níveis deste marcador (no segundo e quarto dias). Do mesmo modo, para o marcador *GSC*, enquanto que para o segundo dia de transfecção foi observado o aumento da expressão em ambas as linhagens, no quarto dia, verificou-se que o aumento foi mantido apenas na linhagem H1, já que para NT2 houve uma diminuição estatisticamente significativa (Figura 24).

Figura 24 – Expressão de marcadores de mesoderme em NT2 e H1 transfectadas com moléculas mímicas do miR-29a.

Expressão dos genes MIXL1 e GSC em NT2 (A) e em H1 (B) após dois e quatro dias de cultivo. mmiR-29a D2 e D4, células mantidas em meio de cultivo basal transfectadas com mimic-miR-29a (50nM); mmiR-Ctrl D2 e D4, células mantidas em meio de cultivo basal transfectadas com mimic-miR-29a. As barras indicam média e desvio padrão (N=3). Para a análise foi utilizado o teste estatístico não paramétrico Mann-Whitney não pareado, sendo estatisticamente significativo, *p = < 0,05; **p = < 0,01 e ***p = < 0,001.

A avaliação do ganho de função do miR-29a também foi investigada nos marcadores de ectoderme. Destes, TUBB3 apresentou um aumento estatisticamente significativo dos níveis de expressão em relação ao mmiR-CTRL no segundo dia tanto em H1 como para NT2 e, NES também exibiu alterações, no entanto, apenas em H1 (Figura 25).

Figura 25 – Expressão de marcadores de ectoderme em NT2 e H1 transfectadas com moléculas mímicas do miR-29a.

Expressão dos genes *TUBB3*, *NES* e *NOTCH1* em NT2 (A) e em H1 (B) após dois e quatro dias de cultivo. mmiR-29a D2 e D4, células mantidas em meio de cultivo basal transfectadas com mimic-miR-29a (50nM); mmiR-Ctrl D2 e D4, células mantidas em meio de cultivo basal transfectadas com mimic-miR-29a. As barras indicam média e desvio padrão (N=3). Para a análise foi utilizado o teste estatístico não paramétrico Mann-Whitney não pareado, sendo estatisticamente significativo, *p = < 0,05; **p = < 0,01 e ***p = < 0,001.

4.3. Avaliação funcional dos eixos de regulação miR-29a/DNMT3b e miR-29a/TET1

Além da análise por expressão gênica, foram realizados novos ensaios funcionais em placas de 96 poços, utilizando microscopia de imunofluorescência quantitativa automatizada, para avaliar os efeitos do ganho e perda de função do miR-29a, DNMT3b e TET1, sobre a proliferação e expressão nuclear de OCT4, assim como sobre a metilação e hidroximetilação global. Neste ensaio, também foi avaliado o papel específico da regulação pós-transcricional de DNMT3b e TET1 pelo miR-29a neste contexto, pelo uso de moléculas bloqueadoras dos sítios alvo (TSB) do miR-29a em seus alvos (TSB-DNMT3b e TSB-TET1). Após quatro dias de cultivo, as células NT2 submetidas às diferentes condições de transfecção, foram fixadas e imunomarcadas para as proteínas OCT4 e DNMT3b, para as marcas epigenéticas 5mC e 5hmC, assim como a marcação com Hoechst, para delimitação e quantificação das imunomarcações no compartimento nuclear.

4.3.1. *Efeito do ganho e perda de função do miR-29a sobre a proliferação e expressão nuclear de OCT4*

Os dados obtidos das análises de imunofluorescência em NT2, demonstraram que apenas na condição com ganho de função do miR-29a houve uma ligeira diminuição, estatisticamente significativa, sobre a proliferação celular no contexto pluripotente por meio da contagem de núcleos ($p < 0,05$) (Figura 26A e 26B). Ao observar a intensidade mediana da marcação nuclear da proteína OCT4, observou-se que o ganho de função do miR-29a promoveu a diminuição nos níveis do fator OCT4 ($p < 0,0001$) enquanto a ablação do miR-29a pelo anti-miR, levou a um aumento dos níveis de OCT4 em relação ao controle ($p < 0,0001$), ambas as variações estatisticamente significativas (Figura 26C e 26D).

Figura 26 – Contagem de núcleos e expressão nuclear de OCT4 após ganho ou perda de função do miR-29a.

Células NT2 transfectadas com mmiR-29a (A e C) e amiR-29a (B e D) (50 nM). Após 96 horas, as células foram fixadas e imunomarcadas com anticorpo contra OCT4 e com o corante nuclear Hoechst. As imagens foram adquiridas em sistema de HCS com uso de objetiva de 10X e cubos com filtro de detecção para a marcação de núcleo (Hoescht) e marcação de OCT4 (FITC ou Texas Red). As imagens foram quantificadas por meio do software CellProfiler e os parâmetros analisados foram contagem de núcleos (A e B) e intensidade de fluorescência da marcação de OCT4 (C e D). Os valores apresentados em porcentagem são relativos aos seus respectivos controles. As barras indicam média e desvio padrão (N=3). Para a análise estatística foi utilizado o teste paramétrico *t* de Student, sendo estatisticamente significativo, **p* = < 0,05; ***p* = < 0,01, ****p* = < 0,001 e *****p* = < 0,0001.

4.3.2. *Efeito do knockdown de DNMT3b e TET1 sobre a proliferação e expressão nuclear de OCT4*

Pelas análises de imunofluorescência, foi possível observar que a ablação temporária da proteína DNMT3b por meio de siRNA em NT2, não promoveu alterações significativas no número de células em relação ao siRNA controle (Figura 27A), enquanto a inibição de TET1 causou uma redução, estatisticamente significativa ($p < 0,05$) (Figura 27B). Ainda, a ausência destas enzimas proporcionou um aumento na intensidade mediana do fator OCT4 após quatro dias de tratamento com siDNMT3b ($p < 0,01$) ou siTET1 ($p < 0,001$) (Figura 27C e 27D).

Figura 27 – Contagem de núcleos e expressão nuclear de OCT4 após *knockdown* da proteína DNMT3b ou TET1.

Células NT2 transfectadas com siDNMT3b (A e C) e siTET1 (B e D) (30 nM). Após 96 horas, as células foram fixadas e imunomarcadas com anticorpo contra OCT4 e com o corante nuclear Hoechst. A aquisição das imagens foi realizada em sistema HCS com uso de objetiva de 10X e cubos com filtro de detecção para a marcação de núcleo (Hoescht) e marcação de OCT4 (FITC ou Texas Red). As imagens foram quantificadas por meio do software CellProfiler e os parâmetros analisados foram contagem de núcleos (A e B) e intensidade de fluorescência da marcação de OCT4 (C e D). Os valores apresentados em porcentagem são relativos aos seus respectivos controles. As barras indicam média e desvio padrão (N=3). Para a análise estatística foi utilizado o teste paramétrico *t* de Student, sendo estatisticamente significativo, **p* = < 0,05; ***p* = < 0,01, ****p* = < 0,001 e *****p* = < 0,0001.

4.3.3. Efeito do *knockdown* de DNMT3b sobre a metilação e hidroximetilação global

Quando se induziu a depleção temporária da enzima DNMT3b por meio de um siRNA na linhagem NT2 no contexto pluripotente, notou-se que a porcentagem da

intensidade mediana de 5mC e da proteína DNMT3b foram reduzidas em relação ao controle ($p < 0,0001$) (Figuras 28A e 28B), enquanto o efeito inverso foi observado nos níveis de hidroximetilação ($p < 0,001$) (Figura 28C).

Figura 28 – Expressão nuclear de DNMT3b e perfil de metilação e hidroximetilação global após *knockdown* de DNMT3b

Células NT2 transfectadas com siDNMT3b (30 nM). Após 96 horas, as células foram fixadas e imunomarcadas com os anticorpos contra DNMT3b, 5mC e 5hmC e com o corante nuclear Hoechst. A aquisição das imagens foi realizada em sistema HCS com uso de objetiva de 10X e cubos com filtro de detecção para a marcação de DNMT3b (Texas Red), 5mC (FITC) e 5hmC (Texas Red). As imagens foram quantificadas por meio do software CellProfiler e os parâmetros analisados foram intensidade de fluorescência da marcação de DNMT3b (A), 5mC (B) e 5hmC (C). Os valores apresentados em porcentagem são relativos aos seus respectivos controles. As barras indicam média e desvio padrão (N=3). Para a análise estatística foi utilizado o teste paramétrico *t* de Student, sendo estatisticamente significativo, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$.

4.3.4. Efeito do *knockdown* de TET1 sobre a metilação e hidroximetilação global

A depleção transiente promovida pelo siRNA contra TET1 na linhagem NT2, levou a um ligeiro aumento da hidroximetilação ($p < 0,01$) (Figura 29B) após quatro dias de cultivo, enquanto que a metilação global sofreu um aumento ($p < 0,01$) (Figura 29A), ambas mudanças estatisticamente significativas.

Figura 29 – Perfis globais de metilação e hidroximetilação após *knockdown* de TET1

Células NT2 transfectadas com siTET1 (30 nM). Após 96 horas, as células foram fixadas e imunomarcadas com os anticorpos contra 5mC e 5hmC e com o corante nuclear Hoechst. A aquisição das imagens foi realizada em sistema HCS com uso de objetiva de 10X e cubos com filtro de detecção para a marcação de 5mC (FITC) e 5hmC (Texas Red). As imagens foram quantificadas por meio do software CellProfiler e os parâmetros analisados foram intensidade de fluorescência da marcação de 5mC (A) e 5hmC (B). Os valores apresentados em porcentagem são relativos aos seus respectivos controles. As barras indicam média e desvio padrão (N=3). Para a análise estatística foi utilizado o teste paramétrico *t* de Student, sendo estatisticamente significativo, **p* = < 0,05; ***p* = < 0,01, ****p* = < 0,001 e *****p* = < 0,0001.

4.3.5. Efeito do ganho e perda de função do miR-29a nos perfis globais de metilação e hidroximetilação

Para avaliar os efeitos decorrentes do ganho ou perda da função do miR-29a nos perfis globais de metilação e hidroximetilação em NT2, foram realizados ensaios funcionais em placas de 96 poços com moléculas mímicas ao miR-29a endógeno, assim como um anti-miR para bloquear a ação deste. Após quatro dias de cultivo, as células foram fixadas e imunomarcadas com anticorpos para 5mC e 5hmC.

A Figura 30 apresenta os perfis de metilação para NT2 após o tratamento com mmiR-29a (Figura 30A) e amiR-29a (Figura 30B), no qual observa-se uma diminuição na metilação, estatisticamente significativa, apenas após a depleção do miR-29a endógeno ($p < 0,0001$). Em relação à hidroximetilação, em ambos os tratamentos foi possível observar a diminuição na intensidade mediana de 5hmC em relação às respectivas condições controle ($p < 0,0001$) (Figura 30C e 30D).

Figura 30 – Perfis globais de metilação e hidroximetilação após ganho ou perda de função do miR-29a.

Células NT2 transfectadas com mmiR-29a (A e C) e amiR-29a (B e D) (50 nM). Após 96 horas, as células foram fixadas e imunomarcadas com os anticorpos contra 5mC e 5hmC e com o corante nuclear Hoechst. A aquisição das imagens foi realizada em sistema HCS com uso de objetiva de 10X e cubos com filtro de detecção para a marcação de 5mC (FITC) e 5hmC (Texas Red). As imagens foram quantificadas por meio do software CellProfiler e os parâmetros analisados foram intensidade de fluorescência da marcação de 5mC (A e B) e 5hmC (C e D). Os valores apresentados em porcentagem são relativos aos seus respectivos controles. As barras indicam média e desvio padrão (N=3). Para a análise estatística foi utilizado o teste paramétrico *t* de Student, sendo estatisticamente significativo, **p* = < 0,05; ***p* = < 0,01, ****p* = < 0,001 e *****p* = < 0,0001.

4.3.6. *Efeito do ganho de função do miR-29a sobre a expressão nuclear de Oct4 e o papel específico da regulação pós-transcricional de DNMT3b neste contexto*

De forma a avaliar mais detalhadamente se a repressão de DNMT3b mediada pelo miR-29a afeta o estado pluripotente e o perfil de metilação global em NT2, foram realizados ensaios de transfecção conjunto de moléculas mímicas ao miR-29a e de moléculas bloqueadoras do sítio de interação do miR-29a no mRNA de DNMT3b. Como controles, foram estabelecidas as condições conjuntas do mmiR-CTRL e TSB-CTRL, a qual não possui ação efetiva de regulação sobre o miR-29a endógeno e nem sobre o mRNA de DNMT3b e, mmiR-29a e TSB-CTRL, cuja ação está relacionada ao ganho de função do miR-29a mas sem distinção regulatória dos seus transcritos alvos. Como pode ser observado na Figura 31, a expressão nuclear de OCT4 sofreu reduções, estatisticamente significativas, em ambas as condições contendo o mmiR-29a em relação ao mmiR-CTRL+TSB-CTRL, assim como já demonstrado na Figura 26C. No entanto, a ausência de alterações significativas entre as condições que incluem mmiR-29a e a inibição do sítio alvo em DNMT3b (TSB-DNMT3b) em relação ao mmiR-29a+TSB-CTRL, sugerem que a modulação de DNMT3b pelo miR-29a não interfere na expressão nuclear de OCT4 (Figura 31).

Figura 31 – Expressão nuclear de OCT4 após inibição regulatória do sítio alvo do miR-29a em DNMT3b.

Células NT2 transfectadas com mmiR-CTRL, mmiR-29a, TSB-CTRL e TSB-DNMT3b (50 nM). Após 96 horas, as células foram fixadas e imunomarcadas com anticorpo contra OCT4 e com o corante nuclear Hoechst. As imagens foram adquiridas em sistema de HCS com uso de objetiva de 10X e cubos com filtro de detecção para a marcação de OCT4 (FITC ou Texas Red). As imagens foram quantificadas por meio do software CellProfiler e o parâmetro analisado foi a intensidade de fluorescência da marcação de OCT4. Os valores apresentados em porcentagem são relativos aos seus respectivos controles. As barras indicam média e desvio padrão (N=3). Para a análise estatística foi utilizado o teste paramétrico ANOVA com pós teste de Tukey, sendo estatisticamente significativo, *p = < 0,05; **p = < 0,01, ***p = < 0,001 e ****p = < 0,0001.

4.3.7. Efeito do ganho de função do miR-29a sobre a expressão de DNMT3b e o papel específico da regulação pós-transcricional de DNMT3b neste contexto

De forma a avaliar o efeito do miR-29a sobre os níveis de DNMT3b, células NTera-2 foram transfectadas com este miR. A transfecção com mmiR-29a levou à diminuição, estatisticamente significativa, da intensidade mediana da proteína DNMT3b (dados concordantes com a expressão gênica) (Figura 32A). De forma a avaliar se este efeito foi mediado especificamente pela regulação pós-transcricional do miR-29a sobre o transcrito DNMT3b, utilizamos um TSB específico para este sítio de ligação. No entanto, ao avaliar a atuação do tratamento mmiR-29a+TSB-DNMT3b em relação ao controle mmiR-29a+TSB-CTRL, não foram observadas alterações estatisticamente significativas na intensidade mediana da proteína DNMT3b, demonstrando que, nas condições experimentais utilizadas, a repressão de DNMT3b

não foi mediada pela ligação e inibição direta do miR-29a sobre o mRNA de DNMT3b (Figura 32B).

Figura 32 – Expressão nuclear de DNMT3b após inibição regulatória do sítio alvo do miR-29a em DNMT3b.

Células NT2 transfectadas com mmiR-CTRL, mmiR-29a, TSB-CTRL e TSB-DNMT3b (50 nM). Após 96 horas, as células foram fixadas e imunomarcadas com anticorpo contra DNMT3b e com o corante nuclear Hoechst. As imagens foram adquiridas em sistema de HCS com uso de objetiva de 10X e cubos com filtro de detecção para a marcação de DNMT3b (Texas Red). As imagens foram quantificadas por meio do software CellProfiler e o parâmetro analisado foi a intensidade de fluorescência da marcação de DNMT3b na transfecção isolada do mmiR-29a (A) ou somada às moléculas Target Site Blockers (B). Os valores apresentados em porcentagem são relativos aos seus respectivos controles. As barras indicam média e desvio padrão (N=3). Para a análise estatística foi utilizado o teste paramétrico *t* de Student (1) e ANOVA com pós teste de Tukey (2), sendo estatisticamente significativo, **p* = < 0,05; ***p* = < 0,01, ****p* = < 0,001 e *****p* = < 0,0001.

4.3.8. Efeito do ganho de função do miR-29a sobre a metilação e hidroximetilação global e o papel específico da regulação pós-transcricional de DNMT3b neste contexto

A investigação sobre os efeitos do papel modulatório do miR-29a sobre a enzima DNMT3b nos perfis de metilação e hidroximetilação global em NT2 podem ser observadas na Figura 33. Foi visto que com o ganho de função do miR-29a sem distinção de alvos (TSB-CTRL) houve um aumento, estatisticamente significativo, da metilação global em relação ao controle mmiR-CTRL+TSB-CTRL (Figura 33A). Da mesma forma, observou-se que o ganho de função do miR-29a associado ao bloqueio de sua ação no mRNA de DNMT3b, também conduziu ao aumento da metilação global em NT2 em relação ao controle mmiR-CTRL+TSB-CTRL (Figura 33A). Estes resultados contrastam com o observado anteriormente, nas avaliações

com o ganho de função do miR-29a sem a adição de TSB-CTRL, nas quais o miR-29a não promoveu alterações no perfil de metilação global da linhagem NT2 nas condições experimentais utilizadas (Figura 30A).

No entanto, não foram observadas alterações significativas entre as condições de ganho de função do miR-29a com e sem distinção de alvos, demonstrando que não foi possível estabelecer uma relação modulatória do miR-29a sobre o perfil de metilação global por meio de seu alvo epigenético DNMT3b no modelo aqui proposto para a linhagem NT2.

Do mesmo modo, foram avaliados os perfis de hidroximetilação global após a intervenção na modulação do miR-29a sobre a proteína DNMT3b. Para todas as condições avaliadas, não foram notadas variações significativas na intensidade mediana de 5hmC em NT2 (Figura 33B). Estes resultados também contrastam com os obtidos sem TSB, onde o miR-29a causou uma redução nos níveis globais de hidroximetilação da linhagem NT2. Dessa forma, os resultados demonstram que o perfil de hidroximetilação global não foi influenciado pela interferência do TSB-DNMT3b na regulação pós-transcricional da enzima DNMT3b pelo miR-29a.

Figura 33 – Perfis globais de metilação e hidroximetilação após inibição regulatória do sítio alvo do miR-29a em DNMT3b.

Células NT2 transfectadas com mmiR-CTRL, mmiR-29a, TSB-CTRL e TSB-DNMT3b (50 nM). Após 96 horas, as células foram fixadas e imunomarcadas com os anticorpos contra 5mC e 5hmC e com o corante nuclear Hoechst. A aquisição das imagens foi realizada em sistema HCS com uso de objetiva de 10X e cubos com filtro de detecção para a marcação de 5mC (FITC) e 5hmC (Texas Red). As imagens foram quantificadas por meio do software CellProfiler e os parâmetros analisados foram intensidade de fluorescência da marcação de 5mC (A) e 5hmC (B). Os valores apresentados em

porcentagem são relativos aos seus respectivos controles. As barras indicam média e desvio padrão (N=3). Para a análise estatística foi utilizado o teste paramétrico ANOVA com pós teste de Tukey, sendo estatisticamente significativo, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$.

4.3.9. Efeito do miR-29a endógeno sobre a expressão de DNMT3b e OCT4 nuclear, metilação e hidroximetilação global e o papel específico da regulação pós-transcricional de DNMT3b neste contexto

A seguir, investigou-se o efeito do bloqueio da interação do miR-29a endógeno com os transcritos de DNMT3b. Foi visto que a intensidade mediana de DNMT3b não sofreu alteração com o tratamento do TSB-DNMT3b, demonstrando que a modulação do miR-29a sobre o mRNA de DNMT3b não refletiu na produção da proteína (Figura 34B). Em relação à pluripotência, observou-se a diminuição da expressão nuclear do fator OCT4 ($p < 0,0001$) (Figura 34A). Quanto ao perfil epigenético, viu-se que após a adição de TSB-DNMT3b, houve uma diminuição no perfil de metilação global (Figura 34C), enquanto, o inverso ocorreu com a hidroximetilação (Figura 34D), ambas as variações estatisticamente significativas ($p < 0,0001$).

Figura 34 – Expressão Nuclear de OCT4 e DNMT3b e perfis globais de metilação e hidroximetilação após bloqueio da interação do miR-29a endógeno com DNMT3b.

Células NT2 transfectadas com TSB-CTRL e TSB-DNMT3b (50 nM). Após 96 horas, as células foram fixadas e imunomarcadas com os anticorpos contra OCT4, DNMT3b, 5mC e 5hmC e com o corante nuclear Hoechst. A aquisição das imagens foi realizada em sistema HCS com uso de objetiva de 10X e cubos com filtro de detecção para a marcação de OCT4 (FITC ou Texas Red), DNMT3b (Texas Red), 5mC (FITC) e 5hmC (Texas Red). As imagens foram quantificadas por meio do software CellProfiler e os parâmetros analisados foram intensidade de fluorescência da marcação de OCT4 (A), DNMT3b (B), 5mC (C) e 5hmC (D). Os valores apresentados em porcentagem são relativos aos seus respectivos controles. As barras indicam média e desvio padrão (N=3). Para a análise estatística foi utilizado o teste paramétrico *t* de Student, sendo estatisticamente significativo, **p* = < 0,05; ***p* = < 0,01, ****p* = < 0,001 e *****p* = < 0,0001.

4.3.10. Efeito do ganho de função do miR-29a sobre a expressão nuclear de Oct4 e o papel específico da regulação pós-transcricional de TET1 neste contexto

Da mesma forma que para DNMT3b, também investigou-se os efeitos da modulação da enzima TET1 pelo miR-29a sobre o estado pluripotente das células NT2. Para isso, foi realizado um ensaio funcional com a transfecção do TSB-TET1, que permite o bloqueio de três sítios de interação do miR-29a com a região 3'UTR do mRNA de TET1. De acordo com os dados obtidos da imunomarcagem do fator

OCT4, foi observado que após o ganho de função do miR-29a (com ou sem distinção de seus alvos) ocorre uma diminuição na expressão nuclear de OCT4 em relação ao controle mmiR-CTRL+TSB-CTRL (Figura 35). Dados esses que reafirmam a atuação do miR-29a na redução da pluripotência (como já visto na figura 26C). No entanto, não foram observadas alterações significativas entre as condições que incluem mmiR-29a e o bloqueio dos seus sítios alvos em TET1 em relação ao mmiR-29a+TSB-CTRL (Figura 35).

Figura 35 – Expressão nuclear de OCT4 após inibição regulatória dos sítios alvos do miR-29a em TET1.

Células NT2 transfectadas com mmiR-CTRL, mmiR-29a, TSB-CTRL e TSB-TET1 (50 nM). Após 96 horas, as células foram fixadas e imunomarcadas com anticorpo contra OCT4 e com o corante nuclear Hoechst. As imagens foram adquiridas em sistema de HCS com uso de objetiva de 10X e cubos com filtro de detecção para a marcação de OCT4 (FITC ou Texas Red). As imagens foram quantificadas por meio do software CellProfiler e o parâmetro analisado foi a intensidade de fluorescência da marcação de OCT4. Os valores apresentados em porcentagem são relativos aos seus respectivos controles. As barras indicam média e desvio padrão (N=3). Para a análise estatística foi utilizado o teste paramétrico ANOVA com pós teste de Tukey, sendo estatisticamente significativo, *p = < 0,05; **p = < 0,01, ***p = < 0,001 e ****p = < 0,0001.

4.3.11. Efeito do ganho de função do miR-29a sobre a metilação e hidroximetilação global e o papel específico da regulação pós-transcricional de TET1 neste contexto

Para avaliar os efeitos da regulação pós-transcricional do miR-29a sobre a enzima TET1 nos perfis de metilação e hidroximetilação global em NT2, utilizamos moléculas que bloqueiam três sítios alvos do miR-29a no mRNA de TET1 (TSB-TET1). Em relação a metilação global, foi possível observar que o ganho de função do miR-29a sem a distinção de alvos (mmiR-29a+TSB-CTRL), levou a um aumento

significativo da intensidade de fluorescência de 5mC em relação ao controle mmiR-CTRL+TSB-CTRL (Figura 36A). Do mesmo modo, a condição mmiR-29a+TSB-TET1 apresentou aumento de metilação, estatisticamente significativo, em relação ao controle mmiR-CTRL+TSB-CTRL (Figura 36A).

Em relação a condição que avaliou a atuação específica do ganho de função do miR-29a associado ao TSB-TET1, não foram observadas alterações significativas em relação ao controle mmiR-29a+TSB-CTRL (Figura 36A). Logo, assim como observado para a modulação específica do miR-29a sobre a enzima DNMT3b, o perfil de metilação global não foi alterado pela interferência do TSB-TET1 na regulação pós-transcricional do mRNA de TET1 pelo miR-29a.

Digno de nota, a avaliação do perfil de hidroximetilação global em NT2 após o ganho de função do miR-29a associado ao TSB-TET1 demonstrou um aumento, estatisticamente significativo, das marcas 5hmC em relação ao controle mmiR-CTRL+TSB-CTRL ($p<0,0001$) e ao controle mmiR-29a+TSB-CTRL ($p<0,0001$) (Figura 36B). Neste último caso, o resultado foi capaz de evidenciar o papel direto do miR-29a sobre a hidroximetilação global, já que ao bloquear a atuação deste miRNA em TET1, viu-se o aumento de 5hmC, possivelmente, devido à ausência da enzima da regulação pós-transcricional negativa do miR-29a sobre TET1. Assim como já visto anteriormente (Figura 30C), as condições envolvendo apenas o ganho de função do miR-29a (sem distinção de alvos pelo TSB) apresentaram uma redução dos níveis globais de hidroximetilação ($p<0,0001$) (Figura 36B).

Figura 36 – Perfis globais de metilação e hidroximetilação após inibição regulatória do sítio alvo do miR-29a em TET1.

Células NT2 transfectadas com mmiR-CTRL, mmiR-29a, TSB-CTRL e TSB-TET1 (50 nM). Após 96 horas, as células foram fixadas e imunomarcadas com os anticorpos contra 5mC e 5hmC e com o corante nuclear Hoechst. A aquisição das imagens foi realizada em sistema HCS com uso de objetiva de 10X e cubos com filtro de detecção para a marcação de 5mC (FITC) e 5hmC (Texas Red). As imagens foram quantificadas por meio do software CellProfiler e os parâmetros analisados foram intensidade de fluorescência da marcação de 5mC (A) e 5hmC (B). Os valores apresentados em porcentagem são relativos aos seus respectivos controles. As barras indicam média e desvio padrão (N=3). Para a análise estatística foi utilizado o teste paramétrico ANOVA com pós teste de Tukey, sendo estatisticamente significativo, *p = < 0,05; **p = < 0,01, ***p = < 0,001 e ****p = < 0,0001.

4.3.12. Efeito do miR-29a endógeno sobre a expressão de DNMT3b e OCT4 nuclear, metilação e hidroximetilação global e o papel específico da regulação pós-transcricional de TET1 neste contexto

Por fim, investigou-se o efeito do bloqueio da interação do miR-29a endógeno com os transcritos de TET1, pela transfecção com TSB-DNMT3b. Em relação à pluripotência, notou-se que a interferência do TSB-TET1 na regulação pós transcricional do miR-29a endógeno sobre TET1 levou a uma diminuição, estatisticamente significativa (p<0,0001), da expressão nuclear de OCT4 (Figura 37A). Esse resultado sugere que o estado pluripotente de NT2 (nas condições experimentais avaliadas) pode estar associando diretamente a atuação regulatória pós transcricional do miR-29a sobre os transcritos de TET1, no entanto estes resultados contrastam com os obtidos com o uso do siRNA contra TET1.

Quanto à expressão nuclear da enzima DNMT3b e o perfil de metilação global, não foram constatadas alterações estatisticamente significativas após a intervenção

do TSB-TET1 sobre a modulação do miR-29a no mRNA de TET1 (Figuras 37B e 37C).

Novamente, a avaliação do perfil de hidroximetilação global, demonstrou a importância do eixo regulatório miR-29a-TET1, pois foi visto que após a transfecção do TSB-TET1, houve um aumento, estatisticamente significativo ($p < 0,0001$), da marca epigenética 5hmC em relação ao controle (Figura 37D). Somado aos achados anteriores (Figura 36B), estes resultados também demonstram o papel do miR-29a endógeno sobre o perfil de hidroximetilação global em NT2 (nas condições experimentais abordadas) após o bloqueio dos seus sítios alvos nos transcritos de TET1.

Figura 37 – Expressão Nuclear de OCT4 e DNMT3b e perfis globais de metilação e hidroximetilação após bloqueio da interação do miR-29a endógeno com TET1.

Células NT2 transfectadas com TSB-CTRL e TSB-TET1 (50 nM). Após 96 horas, as células foram fixadas e imunomarcadas com os anticorpos contra OCT4, DNMT3b, 5mC e 5hmC e com o corante nuclear Hoechst. A aquisição das imagens foi realizada em sistema HCS com uso de objetiva de 10X e cubos com filtro de detecção para a marcação de OCT4 (FITC ou Texas Red), DNMT3b (Texas Red), 5mC (FITC) e 5hmC (Texas Red). As imagens foram quantificadas por meio do software CellProfiler e os parâmetros analisados foram intensidade de fluorescência da marcação de OCT4 (A), DNMT3b (B), 5mC (C) e 5hmC (D). Os valores apresentados em porcentagem são relativos aos seus respectivos controles. As barras indicam média e desvio padrão (N=3). Para a análise estatística foi utilizado o teste paramétrico *t* de Student, sendo estatisticamente significativo, **p* = < 0,05; ***p* = < 0,01, ****p* = < 0,001 e *****p* = < 0,0001.

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

O presente trabalho apresenta importantes achados referentes ao papel do miR-29a na regulação epigenética de células pluripotentes humanas por meio de sua modulação de componentes da maquinaria de desmetilação ativa do DNA, em especial, a enzima TET1. Por nossa abordagem experimental, utilizando moléculas bloqueadoras dos sítios alvos do miR-29a em seus transcritos alvos (TSB), foi possível distinguir a atuação fundamental do eixo miR-29a-TET1 na regulação da pluripotência e do perfil de hidroximetilação global em NT2 no contexto pluripotente.

Devido a importância dos processos de diferenciação e manutenção da pluripotência em CTEs, avaliamos os papéis do miR-29a, membro da família miR-29, e de seus alvos epigenéticos nos contextos de pluripotência e de diferenciação. Para isso, foram utilizadas duas linhagens celulares pluripotentes, as células-tronco embrionária H1 (H1) e a de carcinoma embrionário NTera-2 (NT2). Baseado na literatura, elegemos como modelo de diferenciação o tratamento com atRA, uma importante molécula sinalizadora derivada da vitamina A, que atua na regulação do processo de proliferação celular além de impactar de diferentes formas o desenvolvimento embrionário (RONN et al., 2015).

Durante a embriogênese, o atRA entra na célula para se ligar à família de receptores nucleares do ácido retinóico (RAR) no DNA ativando genes de resposta primária, como os genes do cluster HOX. Em seguida, fatores de transcrição ativados pelo atRA se ligam a diversos genes alvos gerando a resposta secundária que resultará na modificação dos circuitos transcricionais envolvidos na fixação das linhagens celulares diferenciadas (GUDAS; WAGNER, 2011). Assim, o uso do atRA em modelos de diferenciação *in vitro* torna-se interessante para a compreensão dos mecanismos moleculares relacionados ao comprometimento celular na especificação das linhagens.

Portanto, inicialmente caracterizamos as células NT2 e H1 quanto à expressão gênica dos principais marcadores de pluripotência e de representantes dos três folhetos embrionários (endoderme, mesoderme e ectoderme), tanto na presença, quanto na ausência de atRA. Após a adição do indutor de diferenciação atRA, verificamos que ambas as linhagens apresentaram uma redução nos níveis de expressão dos fatores relacionados à pluripotência (OCT4 e NANOG). Contudo, a

diminuição de NANOG não foi estatisticamente significativa em H1. É importante ressaltar que em avaliações semelhantes, outros grupos de pesquisa também constataram a redução nos níveis de expressão do fator OCT4 em NT2 após três e sete dias (BOCKER et al., 2012) e em H1 após seis e doze dias de diferenciação sob o tratamento de 1 μ M de atRA (ANNAB et al., 2012). Desta forma, a redução de NANOG a níveis não significativos, em H1, pode-se ser explicada pelo tempo escolhido para as avaliações do presente trabalho, visto que nosso interesse foi investigar os mecanismos responsáveis pelo início do processo de diferenciação.

Adicionalmente, a modulação do atRA *in vitro* para a indução da diferenciação depende, em parte, das concentrações utilizadas e do estágio do desenvolvimento da sua aplicação. Por exemplo, em protocolos que induzem a diferenciação após a formação de corpos embrioides de CTEs de camundongos, a alta concentração ($> 10^{-6}$ M) de atRA está relacionada a formação de tecidos neurais, enquanto baixas concentrações ($10^{-9} - 10^{-8}$ M) induzem a diferenciação da mesoderme e o desenvolvimento de cardiomiócitos (BAIN et al., 1996; OKADA et al., 2004).

Assim, em relação à diferenciação na linhagem NT2, após o tratamento com 10 μ M (ou 10×10^{-6} M) de atRA (STADLER et al., 2010) foram observadas alterações estatisticamente significativas no aumento da expressão dos marcadores GATA6 (endoderme), TUBB3 e NES (ectoderme) e a redução do marcador FOXA2 (endoderme) e GSC (mesoderme). Já para a linhagem H1, o tratamento com 5 μ M de atRA promoveu alterações estatisticamente significativas dos marcadores de diferenciação, como o aumento de GATA4, GATA6 e FOXA2 (endoderme) e GSC (mesoderme), e apesar de terem sido observadas variações nos níveis de expressão de MIXL1 (mesoderme) e NES e NOTCH1 (ectoderme), estas não foram estatisticamente significativas.

Portanto, apesar da administração de atRA estar geralmente associada a promoção da diferenciação neural em células pluripotentes, este comprometimento depende das concentrações utilizadas, do tempo de exposição e do momento em que o atRA é adicionado (TONGE; ANDREWS, 2010). Deste modo, como demonstrado neste estudo e em trabalhos anteriores, a indução da diferenciação pelo atRA na linhagem NT2 não está relacionada apenas à formação de tecidos neurais, mas também apresenta a expressão de marcadores endodermis e mesodermis (ANDREWS, 2002; BOCKER et al., 2012; PAL; RAVINDRAN, 2006).

No entanto, a ausência de alterações estatisticamente significativas dos marcadores de diferenciação na linhagem H1 podem ser devidas ao pequeno tamanho amostral do estudo ou ainda pela escolha da concentração utilizada (5 μM) e ao curto período de tempo que as células foram expostas ao atRA (quatro dias). Em 2012, Annab e colaboradores também conduziram um estudo sobre os efeitos do atRA sobre as células H1 e observaram que a heterogeneidade celular inerente às CTEs foi responsável por produzir diferentes respostas ao atRA. Foram encontradas duas populações com distintos perfis transcricionais, que incluíam a expressão diferencial de marcadores de pluripotência e de diferenciação após seis dias de diferenciação com 10^{-6} M de atRA (ANNAB et al., 2012).

Em particular, Annab e colaboradores (2012) identificaram duas subpopulações de células coexistentes, sendo uma população de células pequenas (aproximadamente entre 4 e 8 μm) e esféricas (“*aspect ratio*” próximo a 1) e uma outra subpopulação de células grandes (entre 10 e 20 μm) com formatos mais heterogêneos. As pequenas eram resistentes à diferenciação induzida por atRA, não sofrendo reduções significativas nos níveis de OCT4 e no número de células, em contraste ao observado na população de células grandes. Ainda, comparado às células grandes, as pequenas expressavam níveis mais elevados de NANOG e KLF4 e níveis mais baixos de TRA-1–60, TRA-1–81 e SSEA-4, uma observação em linha com um perfil mais primitivo (“*Naive*”) de pluripotência das células pequenas, em contraste com o estado “*Primed*” das células grandes, como sugerido nos estudos de Pastor e colaboradores (2016). Ainda, as células grandes expressavam níveis mais elevados de componentes da via Notch (incluindo os receptores Notch 1 e 2 e seus alvos), em linha com o observado no trabalho de Collier e colaboradores (2016). Logo, as condições de cultivo, podem alterar significativamente a proporção relativa de células *Naive* e *Primed*, podendo causar uma resposta diferente ao atRA.

Posteriormente à caracterização das linhagens quanto ao estado pluripotente e diferenciado, foi avaliada a expressão dos membros da família miR-29. Os miRNAs são pequenos RNAs (~22 nt) que regulam a estabilidade e a tradução de mRNAs por meio do pareamento das bases de sua região “*seed sequence*” com seu alvo. Estas regiões são altamente conservadas e miRNAs que compartilham a mesma sequência formam famílias ou *clusters* que funcionam como importantes ferramentas regulatórias de inúmeros processos intracelulares, dentre eles a pluripotência e o desenvolvimento embrionário (AMBROS, 2004).

Em 2010, Stadler e colaboradores conduziram um estudo em nove linhagens de CTEs, incluindo H1 e NT2, e identificaram a presença de miRNAs e famílias de miRNAs que foram altamente enriquecidos em células pluripotentes e que logo após o início da diferenciação tiveram sua expressão reduzida drasticamente, sugerindo papéis específicos na pluripotência. Ademais, foi demonstrado também os conjuntos de miRNAs que foram enriquecidos nos estágios iniciais da diferenciação em diferentes espécies (STADLER et al., 2010).

Neste mesmo estudo, o miR-29-3p foi identificado dentro do conjunto de miRNAs induzidos em H1 no início da diferenciação (STADLER et al., 2010). Em nossas análises também constatamos o aumento, estatisticamente significativo, da expressão tanto do miR-29a quanto do miR-29b após o início da diferenciação com atRA tanto para a linhagem H1 quanto para NT2.

Porém, estudos em CTEs de camundongos apresentaram contradições quanto a expressão dos membros da família miR-29 após a indução com atRA. Enquanto Zhang e colaboradores (2015) observaram a redução do miR-29a após quatro dias de tratamento com atRA (10^{-6} M), o trabalho de Tu e colaboradores (2015) mostrou que o miR-29b teve um aumento da expressão, após a adição de 10^{-7} M de atRA.

Além da diferença de até 100x na concentração de atRA utilizada por cada autor (em relação à utilizada por nós), o contraste observado nos resultados pode ser devido a estratégia de diferenciação adotada por cada um, visto que Tu e colaboradores (2015) optaram pela formação espontânea do corpo embrióide antes da adição do atRA, ao passo que Zhang e colaboradores (2015), mantiveram as células em monocamada para o tratamento com atRA, além de fazê-lo na ausência de LIF, fator fundamental para a manutenção da pluripotência das CTE murinas em cultura e que contribui para se manterem no estado “*Naive*” (OHTSUKA; NAKAI-FUTATSUGI; NIWA, 2015). De fato, outro trabalho similar que também adotou a estratégia de formação do corpo embrióide para diferenciação (porém sem adição posterior de atRA), constatou que o cluster do pri-miR-29b-1/a foi o mais expresso dentre os membros da família miR-29 em CTEs de camundongos (CUI et al., 2016).

Sabe-se que apesar da estratégia com corpos embrióides ser muitas vezes utilizada em protocolos de diferenciação com atRA, geralmente ela requer muito mais cuidados para garantir que as condições de cultura sejam consistentes (SERRA et al., 2007). Procedimentos como a composição inicial das CTEs

utilizadas, o tamanho dos fragmentos das colônias no momento da agregação e o tamanho dos corpos embrióides formados devem ser o mais reprodutíveis possível, visto que o tamanho e a integridade dos esferóides podem direcionar a diferenciação para uma linhagem em particular, assim como a posição de uma célula dentro da esfera será fortemente influenciada pela sinalização recebida das células vizinhas (BAUWENS et al., 2008). Portanto, a estratégia inicial empregada no processo de diferenciação de CTEs pode estar envolvida na atuação diferencial dos membros da família miR-29, pelo menos em camundongos.

Como a família miR-29 é caracterizada por sua “*seed sequence*”, todos os seus membros compartilham praticamente os mesmos mRNAs alvos, incluindo as enzimas participantes dos mecanismos de metilação e desmetilação do DNA. A metilação do DNA, em mamíferos, é realizada por três enzimas metiltransferases: DNMT1, responsável pela metilação de manutenção durante a replicação do DNA; e, DNMT3a e DNMT3b, que são encarregadas das novas marcas de metilação do genoma.

Dessa forma, investigamos os níveis de expressão das enzimas alvo do miR-29 durante o início da diferenciação com atRA. A avaliação dos genes DNMT3a e DNMT3b durante quatro dias de diferenciação com atRA mostrou que tanto na linhagem NT2 como para H1 houve uma redução, estatisticamente significativa, dos níveis de DNMT3b no segundo e quarto dias. Porém, para DNMT3a, apesar de não terem sido observadas alterações em sua expressão na NT2, em H1 foi possível notar um aumento estatisticamente significativo no quarto dia. Em (2002), o grupo de Watanabe e colaboradores observou que a enzima Dnmt3b é a mais expressa em CTEs de camundongos, e que durante a embriogênese ocorre uma transição na expressão gênica da enzima Dnmt3b para Dnmt3a, que aparece mais tardiamente no desenvolvimento embrionário. De fato, em outro trabalho do mesmo grupo, verificou-se que durante a diferenciação de células progenitoras neurais em camundongos, a proteína Dnmt3a era transientemente expressa nas células neurais imaturas, mas não nas CTEs ou neurônios terminalmente diferenciados, sugerindo funções distintas destas enzimas ao longo do desenvolvimento em camundongos (WATANABE; UCHIYAMA; HANAOKA, 2006).

Em 2015, Zhang e colaboradores (2015) também demonstraram que na linhagem murina J1 de CTE sob indução de atRA, os níveis de expressão de Dnmt3b (e também Dnmt3l) e a metilação global diminuem. Em outro estudo, foi

observado que as alterações na metilação observadas no genoma de NT2 após o tratamento com atRA eram dinâmicas e ocorriam de forma sítio-específica, envolvendo o aumento de metilação em ilhas CpG e suas sequências flanqueadoras, a hipometilação de enhancers e a diminuição da metilação não-CpG (BOCKER et al., 2012).

A queda de DNMT3b também está associada a perda do estado pluripotente (ADEWUMI et al., 2007; ENVER et al., 2005), assim, a diminuição na expressão de DNMT3b em NT2 e H1 durante a diferenciação pode não estar necessariamente diretamente ligada ao tratamento com atRA, mas poderia ser decorrente do aumento nos níveis do miR-29a e miR-29b, já que se trata de um alvo direto destes miRNAs. Não está claro, no entanto, se este mecanismo ocorreria nas CTE murinas, uma vez que a redução de Dnmt3b observada por Zhang e colaboradores (2015) após quatro dias de tratamento com atRA, ocorreu em paralelo à redução do miR-29a.

Em mamíferos, o processo de desmetilação do DNA conta com a participação da família TET que compreende três importantes enzimas envolvidas no processo de oxidação de 5mC a 5hmC. A presença da hidroximetilação está associada às vias de desmetilação passiva (replicação dependente) e ativa do DNA. Ademais, recentes estudos tem sugerido o papel de marca epigenética por ser substrato de ligação para fatores de transcrição e proteínas remodeladoras da cromatina influenciando a estrutura cromatínica e a expressão gênica (PASTOR et al., 2011; SPRUIJT et al., 2013; TAHILIANI et al., 2009).

No presente estudo, apenas TET2 e TET3 apresentaram mudanças significativas na expressão após a indução com atRA nas linhagens pluripotentes. Foi observada a elevação nos níveis de TET2 no segundo e quarto dias para NT2 e H1, enquanto para TET3 o aumento foi observado apenas em NT2. Em linha com nossos resultados, Bocker e colaboradores (2012) também verificaram que após a diferenciação com 10 μ M atRA em NT2, os níveis de expressão de TET2 e TET3 aumentaram em relação a TET1 ao longo de 10 dias de tratamento. Uma investigação semelhante do papel da indução do atRA nos genes da família TET foi realizado em CTEs de camundongo, no qual após 24 horas de tratamento com 1 μ M de atRA, as células apresentaram uma redução nos níveis de Tet1 e Tet2 contrastando com o aumento nos níveis de Tet3 (ZHANG et al., 2015). Também neste último estudo, um aumento nos níveis globais de 5hmC foi observado. A diferença no efeito do atRA sobre a expressão dos membros da família TET nestes

estudos pode ser devida ao papel diferencial destas enzimas em CTEs humanas e de camundongos.

Posteriormente, após a avaliação da expressão dos membros da família miR-29 e de seus alvos sob a indução de atRA, avaliamos o efeito do ganho de função do miR-29a em células H1, por expressão gênica, e em NT2 por expressão gênica e por imunofluorescência no contexto pluripotente. Para expressão gênica, as moléculas mímicas do miR-29a foram transfectadas nas linhagens e as coletas realizadas após dois e quatro dias de cultivo, para avaliação da expressão gênica dos marcadores de pluripotência e diferenciação além de seus alvos epigenéticos. Observamos que com exceção de TET2 na linhagem H1, todos os outros transcritos alvos apresentaram reduções estatisticamente significativas em seus níveis de expressão, pelo menos em um dos dias avaliados para ambas as linhagens. Estes resultados estão em linha com a ação desestabilizante dos miRNAs desta família nestes mRNAs alvos, assim como já demonstrado em outros estudos (CUI et al., 2016; HYSOLLI et al., 2016; MORITA et al., 2013; TU et al., 2015; ZHANG et al., 2013).

Em relação ao início do processo de diferenciação em CTEs, observamos que o ganho de função do miR-29a apresentou diferentes resultados para os marcadores de diferenciação nas linhagens H1 e NT2. No que diz respeito aos marcadores de endoderme, constatamos que GATA4, GATA6 e FOXA2 tiveram aumento em seus níveis de expressão após a adição do mímico do miR-29a na linhagem H1. Nossos resultados estão em linha com outros trabalhos recentes, onde a expressão constitutiva do miR-29b, por um plasmídeo de expressão inserido em linhagem de CTEs de camundongos, apresentou aumento significativo nos níveis de expressão de GATA6 e FOXA2 (TU et al., 2015). Do mesmo modo, Cui e colaboradores (2016) observaram que a transfecção dos precursores dos clusters do miR-29a e miR-29b elevou a expressão dos genes GATA4 e GATA6. Contudo, na linhagem NT2, observamos uma discordância na expressão do gene GATA4 que exibiu aumento de expressão no segundo dia, mas teve uma queda no quarto dia (ambas estatisticamente significativas); ao passo que para os genes GATA6 e FOXA2 foram observadas a redução nos níveis de expressão apenas no quarto dia.

Para os marcadores de mesoderme, verificou-se que na linhagem H1, tanto GSC quanto *MIXL1* apresentaram aumento em seus níveis de expressão para o segundo e quarto dias. Em linha, em CTEs de camundongos, a expressão de *Mixl1*

apresentou um aumento após a inserção de mínicos dos miRNAs da família miR-29 (CUI et al., 2016). Todavia, para NT2 observamos uma divergência novamente, agora para o gene *GSC* que teve um aumento de expressão no segundo dia e diminuição no quarto dia, enquanto para o gene *MIXL1* a redução nos níveis de expressão ocorreram apenas no quarto dia.

Com relação aos marcadores de ectoderme, apenas TUBB3 e NES exibiram alterações estatisticamente significativas, sendo que TUBB3 mostrou aumento de sua expressão no segundo dia em ambas as linhagens, enquanto NES apresentou o mesmo resultado, porém apenas em H1. Diferente de nossos resultados, o ganho de função do miR-29b em CTEs de camundongos reduziu os níveis de expressão do marcador de ectoderme Nestin (TU et al., 2015).

De acordo com estes estudos, a família do miR-29 pode direcionar o processo de diferenciação em CTEs de camundongos por meio de seus alvos epigenéticos (CUI et al., 2016; TU et al., 2015). Tu e colaboradores (2015) sugeriram a existência de um eixo regulatório formado pelo miR-29b e Tet1, que estaria envolvido na formação da mesendoderme durante o processo de diferenciação. Esse direcionamento na especificação da linhagem seria dado pela ativação da via de sinalização Nodal por meio da supressão dos genes inibitórios da via, *Lefty1* e *Lefty2*. A via de sinalização Nodal está intimamente ligada com a formação da mesendoderme e é essencial para a determinação do eixo embrionário no início do desenvolvimento (SHEN, 2007).

Dessa forma, Tu e colaboradores (2015) afirmam que a modulação negativa do miR-29b em Tet1 seria a responsável pela diminuição na hidroximetilação da região promotora dos genes *Lefty1* e *Lefty2*, levando à diminuição de sua expressão e, portanto, afetando seu efeito inibitório sobre a via Nodal, permitindo sua ativação. Nesta mesma linha, Cui e colaboradores (2016), demonstraram que a superexpressão dos precursores de cada um dos membros da família miR-29 afeta seletivamente os marcadores de linhagens celulares e orientam a diferenciação de CTEs de camundongos de forma similar ao que ocorre com as CTEs depletadas de Tet1. Em nossas análises, o ganho de função do miR-29a, pelo menos na linhagem H1, também levou ao aumento na expressão para todos os marcadores relacionados a formação da endoderme e a mesoderme, assim como para dois dos marcadores referentes à formação da ectoderme.

No que concerne aos marcadores de pluripotência, não foram observados efeitos significativos nos genes OCT4 e NANOG em H1, porém em NT2 foi possível observar a diminuição de OCT4 no quarto dia por PCR quantitativa. Em linha, a avaliação por imunofluorescência do ganho de função do miR-29a também demonstrou a queda da expressão nuclear de OCT4 no quarto dia pós-transfecção, assim como uma redução na proliferação celular em relação ao controle.

Estudos prévios sobre o papel da família miR-29 na reprogramação somática, observaram que a depleção destes miRNAs estavam envolvidas no aumento da eficiência de geração de iPS em fibroblastos de camundongos (FRÁGUAS et al., 2017; YANG; LI; RANA, 2011) e humanos (HYSOLLI et al., 2016). Os estudos propuseram, contudo, mecanismos alternativos para explicar os efeitos da família miR-29 sobre a reprogramação. Em camundongos, Yang, Li e Rana (2011) sugeriram um modelo pelo qual a supressão do miR-29a pelo fator de reprogramação c-Myc, elevaria os níveis de CDC42 e p85alpha, que por sua vez, inibiriam a via p53, que funciona como uma barreira na reprogramação. Já em humanos, Hysolli e colaboradores (2016) indicaram que o efeito da família miR-29 na reprogramação se daria pela repressão de seus alvos epigenéticos das famílias DNMT e TET, já que a desmetilação do DNA é um importante evento durante o processo de geração de iPS. De fato, este trabalho também evidenciou que as iPS geradas de fibroblastos depletados do miR-29a apresentavam um perfil epigenético mais semelhante a CTE do que quando originado de uma célula com o miR-29a presente (HYSOLLI et al., 2016). Ainda, no estudo realizado por nosso grupo, foram mostrados indícios de que a inibição dos transcritos da família TET poderiam contribuir para a redução de eficiência na reprogramação decorrente da introdução de microRNAs miméticos da família miR-29 e que, além disto, o miR-29 ativaria a via Wnt/TCF/LEF, por meio da inibição direta de seu alvo Gsk3beta (apenas em murinos), prejudicando a fase inicial da reprogramação (FRÁGUAS et al., 2017).

Intrigantemente, Guo e colaboradores demonstraram que a expressão de miR-29b por vetores virais ao longo de todo o processo aumentou a eficiência de reprogramação, um efeito que eles demonstraram como sendo resultante da inibição de Dnmt3a e Dnmt3b e da consequente desmetilação passiva (GUO et al., 2013). Logo, apesar do miR-29a não atuar diretamente sobre os fatores OCT4 e NANOG, existem outros mecanismos pelos quais este miRNA pode atuar sobre a pluripotência.

De fato, em CTEs de camundongos, dois grupos avaliaram os efeitos da depleção das enzimas Tet1 e Tet2 (alvos diretos do miR-29a) em genes de pluripotência, incluindo Oct4 e Nanog, e enquanto Ito e colaboradores (2010) observaram uma diminuição na expressão de Nanog e Oct4, Koh e colaboradores (2011) não notaram quaisquer alterações na expressão destes genes após a depleção transiente de Tet1 por meio de siRNA. Em nosso estudo, promovemos o *knockdown* da enzima TET1 por quatro dias, e diferentemente das CTEs de camundongo, vimos um aumento na expressão nuclear do fator OCT4 e a redução na proliferação celular.

Em 2013, Costa e colaboradores demonstraram que tanto a proteína Tet1 quanto Tet2 interagem fisicamente com o fator Nanog e que essa interação promovia o aumento da expressão de um conjunto de genes de pluripotência, entre eles Oct4, por promover o aumento da hidroximetilação nestes promotores, atuando de forma sinérgica durante a reprogramação da pluripotência. Quando avaliaram a interação entre Nanog e uma enzima Tet1 mutante (sem o domínio catalítico), observaram o aumento nos níveis de Tet2 endógeno e que essa reativação de Tet2 compensava a ausência de atividade catalítica de Tet1 mutante associada com Nanog durante a reprogramação de células-tronco neurais adultas (COSTA et al., 2013). De fato, apesar destas enzimas compartilharem duas regiões C-terminais conservadas, responsáveis por sua atividade catalítica, somente TET1 e TET3 possuem um domínio CXXC (de ligação ao DNA) em sua cauda N-terminal, enquanto TET2 pode ter uma ou mais proteínas parceiras para auxiliar em sua ligação no DNA (TAHILIANI et al., 2009). Dessa forma, visto que nossos dados revelaram um aumento de OCT4 após a depleção de TET1, podemos inferir, diante do exposto, que possivelmente o aumento na expressão nuclear de OCT4 pode ter sido devido à atuação compensatória de TET2.

Sobre o papel da enzima DNMT3b na pluripotência, o *knockdown* da enzima por quatro dias levou a diminuição da expressão nuclear de DNMT3b (como esperado) e, apesar de nenhum efeito sobre a proliferação celular, apresentou um aumento na expressão do fator OCT4. Estudos em camundongos demonstraram que apesar das proteínas Dnmt3a e Dnmt3b não estarem diretamente relacionadas na manutenção da pluripotência, a ablação das enzimas metiltransferases resulta em morte do embrião (Dnmt3a ou Dnmt3b) (LI; BESTOR; JAENISCH, 1992; OKANO et al., 1999), além de prejudicar o início do processo de diferenciação celular

(PAWLAK; JAENISCH, 2011; TSUMURA et al., 2006). Com efeito, foi visto que a inativação de Dnmt3b em CTEs de camundongos, gerou clones que não apresentaram alterações na expressão dos genes Nanog e Oct4 (TSUMURA et al., 2006).

No entanto, o uso do siRNA específico contra DNMT3b para a depleção transiente da enzima em nossa abordagem, apresentou o aumento na expressão nuclear de OCT4 em NT2. Em células humanas, Liao e colaboradores (2015) promoveram a depleção de DNMT3b (pela técnica de CRISPR/Cas9) em hCTEs e não observaram quaisquer alterações em sua morfologia ou potencial de diferenciação e além disso, as células mantiveram-se positivas para os marcadores NANOG e TRA-1-60. Em linha, o trabalho de Wongtrakoongate, Li e Andrews (2014) constataram que o *knockdown* da enzima DNMT3b, por meio de um shRNAi associado ao tratamento com doxíciclina, não apresentou alterações estatisticamente significativas na expressão dos genes OCT4 e NANOG na linhagem de CTE humana H7. No entanto, o mesmo estudo demonstrou que durante a reprogramação destes mesmos clones (após a indução de diferenciação com atRA por 14 dias) a redução de DNMT3b aumentou a eficiência de geração das iPS e os níveis de expressão dos genes OCT4 e NANOG, sugerindo que a proteína DNMT3b poderia atuar como uma barreira na reprogramação (WONGTRAKOONGATE; LI; ANDREWS, 2014). Logo, apesar de nossos resultados estarem em discordância quanto a participação de DNMT3b na expressão de OCT4, podemos afirmar que a presença de DNMT3b teria um efeito negativo na pluripotência no modelo aqui proposto para NT2.

Para enriquecer a discussão deste tema, torna-se evidente a importância de avaliar em mais detalhes a atuação da regulação pós-transcricional do miR-29a sobre seus alvos epigenéticos nos fenótipos relacionados à pluripotência e aos perfis globais de metilação e hidroximetilação em células pluripotentes humanas. Para isso, de forma a avaliar especificamente o papel da regulação pós-transcricional do miR-29a, utilizamos a tecnologia Target Site Blockers que permitiu o bloqueio dos sítios alvos do miR-29a na região 3'UTR dos mRNAs de DNMT3b e TET1.

Em relação à pluripotência, não foram observadas alterações significativas na expressão nuclear de OCT4 devidas ao eixo miR-29a-DNMT3b, nem quando avaliamos apenas a atuação do miR-29a endógeno sobre os transcritos de

DNMT3b. Tais resultados demonstram que a diminuição nos níveis de OCT4 após o ganho de função do miR-29a são devidas a outros mecanismos moleculares que não sua regulação pós-transcricional sobre DNMT3b. A mesma constatação pode ser feita em relação à atividade do miR-29a endógeno sobre DNMT3b, que também não apresentou alterações na expressão de OCT4. Logo, nossos dados sugerem que o eixo miR-29a-DNMT3b não exerce papel sobre a expressão de Oct4 em células pluripotentes humanas.

Da mesma forma, analisamos o papel do eixo miR-29a-TET1 na pluripotência e não foi possível observar efeitos na expressão nuclear de OCT4, porém, a interferência do TSB-TET1 sobre o miR-29a endógeno provocou uma redução nos níveis de OCT4 em relação ao controle. Recentemente foi demonstrado que Tet1 pode substituir eficientemente o fator Oct4 no coquetel de reprogramação OKSM, revelando um importante papel da hidroximetilação na reprogramação, visto que Tet1 promoveu a reativação do Oct4 endógeno por meio da desmetilação de seu loco (GAO et al., 2013). Do mesmo modo, as evidências em CTEs humanas e de camundongos sobre a regulação direta do mRNA de Tet1 pelos fatores de pluripotência Oct4, Sox2 e Nanog (COSTA et al., 2013; KOH et al., 2011; NERI et al., 2015; SOHNI et al., 2015), conduziram o grupo de Olariu, Lovkvist e Sneppen (2016) a propor o modelo de uma rede regulatória sobre a aquisição ou manutenção da pluripotência integrando Nanog, Tet1 e Oct4. Nesta, o fator Oct4 possui um papel central por atuar em ambos os promotores de Tet1 e Nanog, estes por sua vez, formam complexo proteico que regulará positivamente Oct4, e também Tet1, por meio da desmetilação ativa de seus promotores. Neste aspecto, nossos resultados em relação à atividade regulatória do miR-29a endógeno em NT2, discordam do modelo proposto por Olariu, em particular, no tocante à redução de OCT4 após bloqueio do sítio do miR-29a no transcrito de TET1, uma vez que esperaríamos que isto levaria a um aumento dos níveis de TET1 e consequentemente, a um aumento na expressão de Oct4. No entanto, o fato de não termos acessado a expressão de TET1 impede maiores conclusões.

Em CTEs, o perfil epigenético é caracterizado por uma cromatina mais aberta com a presença de domínios bivalentes e outras modificações de histonas que junto ao padrão de distribuição da 5mC e 5hmC compõem a paisagem da cromatina no estado pluripotente (APOSTOLOU; HOCHEDLINGER, 2013). Dessa forma, visto que o miR-29a tem como alvos duas proteínas essenciais na maquinaria epigenética

relacionadas à metilação e desmetilação do DNA, e que estas possuem, à princípio, funções distintas e opostas, investigamos os efeitos da regulação pós-transcricional do miR-29a nas enzimas DNMT3b e TET1 sobre os perfis globais de metilação e hidroximetilação no contexto pluripotente em NT2.

Como esperado, o *knockdown* de DNMT3b por siRNA levou a uma redução na metilação global (5mC), além de resultar num aumento dos níveis globais de 5hmC. Por sua vez, também em linha com o esperado, o *knockdown* de TET1 causou um aumento nos níveis de metilação global, porém, também observamos um leve aumento nos níveis de hidroximetilação global.

Em CTEs de camundongos, inúmeros estudos já demonstraram que a inativação da enzima DNMT3b, por diferentes metodologias, está envolvida na redução dos níveis globais de metilação no genoma (CHEN et al., 2003; LI; BESTOR; JAENISCH, 1992; OKANO et al., 1999; TSUMURA et al., 2006). Da mesma forma, em estudo recente, Liao e colaboradores (2015) geraram mapas de alta resolução da distribuição da 5mC após a inativação das três enzimas metiltransferases (por CRISPR/Cas9) em CTEs humanas e observaram que, nas linhagens *knockouts* individuais para cada enzima, a perda de metilação foi apenas ligeiramente afetada e regiões satélites (com alta densidade CpG) foram as mais sensíveis pela perda de DNMT3b.

Em linhagens de células tumorais humanas, Putiri e colaboradores (2014) estudaram o padrão de distribuição da 5mC no genoma após a depleção individual das proteínas da família TET. Em relação a abundância genômica de 5mC, os autores não observaram alterações após a depleção de TET1, mas viram que a depleção de TET2 ou TET3 levava o aumento de 5hmC, sugerindo que essas proteínas poderiam desempenhar um papel importante na remoção de 5hmC em células tumorais, pela atividade de oxidação de 5hmC a 5fC e 5caC. Ademais, o estudo demonstrou que todas as TETs tiveram a habilidade de impedir a hipermetilação do genoma, especialmente em margens de ilhas CpG, propondo desta forma que as proteínas TETs poderiam promover a metilação, já que a hipometilação foi associada a redução de 5hmC (PUTIRI et al., 2014).

Após o ganho de função do miR-29a, verificamos o aumento da metilação global e a redução na hidroximetilação global, enquanto que, após a perda de função, identificamos a queda nos níveis de 5mC e, novamente, a diminuição nos níveis de 5hmC. Da mesma forma que em nosso estudo, Hysolli e colaboradores

(2016) também observaram que a depleção do miR-29a estava envolvida na redução da metilação global em fibroblastos humanos e sugeriram que as enzimas TETs e TDG seriam fortes candidatas a essa regulação. Em linha com nossos resultados, os autores também observaram que a transfecção de moléculas mímicas do miR-29a levaram a diminuição global dos níveis de 5hmC, 5fC e 5caC em fibroblastos humanos (HYSOLLI et al., 2016).

No tocante ao impacto da regulação pós-transcricional do miR-29a em DNMT3b sobre os níveis de 5mC, não observamos alterações significativas após a intervenção do TSB-DNMT3b sobre a atividade do miR-29a endógeno, indicando que, nas condições experimentais utilizadas em nosso estudo, este eixo regulatório não teria um papel relevante no perfil de metilação global. Durante a reprogramação somática celular humana, Hysolli e colaboradores (2015) afirmaram que as alterações observadas no perfil de metilação global eram devidas ao papel do miR-29a sobre a enzima DNMT3b. Da mesma forma, Guo e colaboradores (2013) sugeriram que o eixo miR-29b-DNMT3 estaria envolvido na regulação da metilação do DNA relacionada aos eventos de reprogramação somática em camundongos. No entanto, diferentemente, nossos resultados demonstram que os efeitos observados no perfil de metilação global em NT2 no contexto pluripotente não foi devido a regulação pós-transcricional da proteína DNMT3b pelo miR-29a.

Em contraste, os níveis de hidroximetilação global aumentaram após a transfecção do TSB-DNMT3b. Esses resultados sugerem o envolvimento do eixo miR-29a-DNMT3b na determinação do perfil global de hidroximetilação do DNA em NT2. Estes resultados, a princípio inesperados, podem estar relacionados também com trabalhos recentes que revelaram propriedades anteriormente desconhecidas das DNMTs, em particular, suas atividades de de-hidroximetilases (CHEN; WANG; SHEN, 2012). Por uma série de ensaios *in vitro*, os pesquisadores demonstraram que as enzimas DNMT3a e DNMT3b, mas não DNMT1, poderiam efetivamente converter 5hmC a uma citosina sem modificação. Ademais, observaram que as reações de metilação e de-hidroximetilação ocorreriam no mesmo sítio catalítico, mas que seria o estado redox da enzima que determinaria sua função (CHEN; WANG; SHEN, 2012).

Na avaliação da regulação pós-transcricional de TET1 pelo miR-29a, vimos que, as alterações observadas nos níveis de 5mC após o ganho de função do miR-29a não tem relação com a sua regulação pós-transcricional sobre seu alvo

epigenético TET1. Por outro lado, interessante, os níveis de 5hmC sofreram um aumento estatisticamente significativo. Quando analisamos a regulação mediada apenas pelo miR-29a endógeno, novamente constatamos que apesar dos níveis de 5mC não terem variado, os níveis globais de 5hmC apresentaram um aumento estatisticamente significativo.

Em estudos anteriores, foi proposto que a regulação da família miR-29a nas proteínas da família TET poderiam contribuir com a regulação epigenética durante o início da diferenciação em CTEs de camundongos (CUI et al., 2016; TU et al., 2015). No entanto, a abordagem experimental dos referidos trabalhos consistiu na geração de linhagens de CTEs de camundongos estáveis para a superexpressão do miR-29b (TU et al., 2015) ou dos precursores dos três clusters da família miR-29 (CUI et al., 2016). Porém, apesar de observarem um paralelo nos resultados obtidos pelo *knockdown* de Tet1 e o ganho de função do miR-29 em relação aos perfis de hidroximetilação e marcadores de diferenciação, o delineamento experimental utilizado não considerou a atividade inibitória individual do miR-29 em seus alvos, o que leva ao questionamento sobre a prevalência do eixo miR-29-Tet1 nos fenótipos observados. Portanto, diferentemente, nossos resultados demonstram claramente que o miR-29a tem de fato um papel na regulação pós-transcricional de TET1, e consequentemente dos níveis de hidroximetilação global, num contexto fisiológico do controle epigenético envolvido na manutenção do equilíbrio entre a pluripotência e a diferenciação.

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

Neste estudo apresentamos novas informações referentes ao papel do miR-29a na regulação epigenética de células pluripotentes humanas por meio de sua modulação de componentes da maquinaria de metilação e desmetilação ativa do DNA, no contexto da pluripotência e no início da diferenciação com atRA. Como principais contribuições deste trabalho, podemos citar:

- Sob a indução de atRA, os níveis de expressão do miR-29a e de seus genes alvos (com exceção de DNMT3b), assim como dos marcadores de endoderme e ectoderme, aumentaram, seguido da diminuição dos marcadores de pluripotência em células pluripotentes humanas H1 e NT2.
- O ganho de função do miR-29a em NT2 e H1 está relacionado a redução da expressão gênica de seus transcritos alvos por expressão gênica em NT2 e H1, e a diminuição da marcação de DNMT3b por imunofluorescência em NT2.
- O ganho de função do miR-29a leva a queda na expressão gênica e nuclear de OCT4 em NT2, enquanto promove o aumento da expressão de marcadores da endoderme, mesoderme e ectoderme em H1.
- O perfil de metilação global foi reduzido após a perda de função do miR-29a endógeno, no entanto, não foram observadas alterações após o ganho de função deste miRNA. Ademais, o perfil de hidroximetilação global foi reduzido após o ganho e perda de função do miR-29a em NT2.
- Ensaios *knockdown* das enzimas DNMT3b e TET1 promoveram o aumento da expressão nuclear de OCT4, evidenciando seu efeito negativo sobre a pluripotência em NT2.
- A depleção transiente de TET1 promoveu o aumento dos níveis globais de 5mC e 5hmC, enquanto a ausência de DNMT3b reduziu a metilação global, porém levou ao aumento do perfil de hidroximetilação global em NT2.
- Por nossa abordagem experimental, utilizando moléculas bloqueadoras dos sítios alvos do miR-29a em seus transcritos alvos (TSB), não observamos a participação do eixo miR-29-DNMT3b na modulação dos efeitos observados, mas destacamos a atuação fundamental do eixo miR-29a-TET1 na regulação da pluripotência e do perfil de hidroximetilação global em NT2 no contexto pluripotente.

REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHARD, P. et al. Modulation of floral development by a gibberellin-regulated microRNA. **Development**, v. 131, n. 14, p. 3357–3365, 15 jul. 2004.

ADEWUMI, O. et al. Characterization of human embryonic stem cell lines by the International Stem Cell Initiative. **Nature biotechnology**, v. 25, n. 7, p. 803–16, jul. 2007.

AMBROS, V. The functions of animal microRNAs. **Nature**, v. 431, n. 7006, p. 350–5, 2004.

ANDREWS, P. W. From teratocarcinomas to embryonic stem cells. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, v. 357, n. 1420, p. 405–417, 29 abr. 2002.

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. 330–343, 2012.

ANOKYE-DANSO, F. et al. Highly efficient miRNA-mediated reprogramming of mouse and human somatic cells to pluripotency. **Cell stem cell**, v. 8, n. 4, p. 376–88, 8 abr. 2011.

APOSTOLOU, E.; HOCHEDLINGER, K. Chromatin dynamics during cellular reprogramming. **Nature**, v. 502, n. 7472, p. 462–471, 2013.

BAIN, G. et al. Retinoic acid promotes neural and represses mesodermal gene expression in mouse embryonic stem cells in culture. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 223, p. 691–694, 1996.

BARSKI, A. et al. High-Resolution Profiling of Histone Methylations in the Human Genome. **Cell**, v. 129, n. 4, p. 823–837, 2007.

BARTEL, D. P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. **Cell**, v. 116, n. 2, p. 281–97, 23 jan. 2004.

BAUWENS, C. L. et al. Control of Human Embryonic Stem Cell Colony and Aggregate Size Heterogeneity Influences Differentiation Trajectories. **Stem Cells**, v. 26, n. 9, p. 2300–2310, 2008.

BERNSTEIN, B. E. et al. A Bivalent Chromatin Structure Marks Key Developmental Genes in Embryonic Stem Cells. **Cell**, v. 125, n. 2, p. 315–326, 2006.

BESTOR, T. et al. Cloning and sequencing of a cDNA encoding DNA methyltransferase of mouse cells. The carboxyl-terminal domain of the mammalian enzymes is related to bacterial restriction methyltransferases. **Journal of Molecular Biology**, v. 203, n. 4, p. 971–983, 1988.

BHUTANI, N.; BURNS, D. M.; BLAU, H. M. DNA demethylation dynamics. **Cell**, v. 146, n. 6, p. 866–72, 16 set. 2011.

BIRD, A. Perceptions of epigenetics. **Nature**, v. 447, n. May, p. 396–398, 2007.

BOCKER, M. T. et al. Hydroxylation of 5-methylcytosine by TET2 maintains the active state of the mammalian HOXA cluster. **Nature Communications**, v. 3, n. May, p. 818, 2012.

BOLAND, M. J.; NAZOR, K. L.; LORING, J. F. Epigenetic regulation of pluripotency and differentiation. **Circulation Research**, v. 115, n. 2, p. 311–324, 2014.

BOOTH, M. J. et al. Quantitative sequencing of 5-methylcytosine and 5-hydroxymethylcytosine at single-base resolution. **Science (New York, N.Y.)**, v. 336, n. 6083, p. 934–7, 18 maio 2012.

BOURC'HIS, D. et al. Dnmt3L and the establishment of maternal genomic imprints. **Science**, v. 294, n. 5551, p. 2536–2539, 2001.

BOYER, L. A. et al. Core Transcriptional Regulatory Circuitry in Human Embryonic Stem Cells. **Cell**, v. 122, n. 6, p. 947–956, 2005.

BOYER, L. A. et al. Polycomb complexes repress developmental regulators in murine embryonic stem cells. **Nature**, v. 441, n. 7091, p. 349–53, 2006.

CHAMBERS, I.; SMITH, A. Self-renewal of teratocarcinoma and embryonic stem cells. **Oncogene**, v. 23, n. 43, p. 7150–60, 20 set. 2004.

CHEN, C.-C.; WANG, K.-Y.; SHEN, C.-K. J. The mammalian de novo DNA methyltransferases DNMT3A and DNMT3B are also DNA 5-hydroxymethylcytosine dehydroxymethylases. **The Journal of biological chemistry**, v. 287, n. 40, p. 33116–21, 28 set. 2012.

CHEN, K. G. et al. Non-colony type monolayer culture of human embryonic stem cells. **Stem Cell Research**, v. 9, n. 3, p. 237–248, 2012.

CHEN, T. et al. Establishment and maintenance of genomic methylation patterns in mouse embryonic stem cells by Dnmt3a and Dnmt3b. **Molecular and cellular biology**, v. 23, n. 16, p. 5594–605, 2003.

CIMMINO, L. et al. TET family proteins and their role in stem cell differentiation and transformation. **Cell stem cell**, v. 9, n. 3, p. 193–204, 2 set. 2011.

COLLIER, A. J. et al. Comprehensive Cell Surface Protein Profiling Identifies Specific Markers of Human Naive and Primed Pluripotent States. **Cell Stem Cell**, v. 20, n. 6, p. 874–890.e7, 2016.

CORTELLINO, S. et al. Thymine DNA glycosylase is essential for active DNA demethylation by linked deamination-base excision repair. **Cell**, v. 146, n. 1, p. 67–79, 8 jul. 2011.

COSTA, Y. et al. NANOG-dependent function of TET1 and TET2 in establishment of pluripotency. **Nature**, v. 495, n. 7441, p. 370–374, 2013.

CUI, Y. et al. miR-29 regulates Tet1 expression and contributes to early differentiation of mouse ESCs. **Oncotarget**, v. 7, n. 40, 3 out. 2016.

CUMMINS, J. M. et al. The colorectal microRNAome. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 10, p. 3687–3692, 2006.

DAI, H.-Q. et al. TET-mediated DNA demethylation controls gastrulation by regulating Lefty–Nodal signalling. **Nature**, v. 538, n. 7626, p. 528–532, 19 out. 2016.

DAWLATY, M. M. et al. Tet1 is dispensable for maintaining pluripotency and its loss is compatible with embryonic and postnatal development. **Cell stem cell**, v. 9, n. 2, p. 166–75, 5 ago. 2011.

DAWLATY, M. M. et al. Combined Deficiency of Tet1 and Tet2 Causes Epigenetic Abnormalities but Is Compatible with Postnatal Development. **Developmental Cell**, v. 24, n. 3, p. 310–323, 2013.

DAWLATY, M. M. et al. Loss of tet enzymes compromises proper differentiation of embryonic stem cells. **Developmental Cell**, v. 29, n. 1, p. 102–111, 2014.

EICHHORN, S. W. et al. mRNA Destabilization Is the Dominant Effect of Mammalian MicroRNAs by the Time Substantial Repression Ensues. **Molecular Cell**, v. 56, n. 1, p. 104–115, 2014.

ENVER, T. et al. Cellular differentiation hierarchies in normal and culture-adapted human embryonic stem cells. **Human Molecular Genetics**, v. 14, n. 21, p. 3129–3140, 2005.

ERNST, J. et al. Mapping and analysis of chromatin state dynamics in nine human cell types. **Nature**, v. 473, n. 7345, p. 1–9, 2011.

EVANS, M. J.; KAUFMAN, M. H. **Establishment in culture of pluripotent cells from mouse embryos.** **Nature**, 1981.

EXIQON. **Target Site Blockers**. Disponível em: <<http://www.exiqon.com/mirna-target-site-blocker>>. Acesso em: 5 fev. 2017.

FABBRI, M. et al. MicroRNA-29 family reverts aberrant methylation in lung cancer by targeting DNA methyltransferases 3A and 3B. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 40, p. 15805–10, 2 out. 2007.

FABIAN, M. R.; SONENBERG, N.; FILIPOWICZ, W. Regulation of mRNA translation and stability by microRNAs. **Annual review of biochemistry**, v. 79, p. 351–79, 2010.

FICZ, G. et al. Dynamic regulation of 5-hydroxymethylcytosine in mouse ES cells and during differentiation. **Nature**, v. 473, n. 7347, p. 398–402, 3 abr. 2011.

FRÁGUAS, M. S. et al. MicroRNA-29 impairs the early phase of reprogramming process by targeting active DNA demethylation enzymes and Wnt signaling. **Stem Cell Research**, v. 19, p. 21–30, 2017.

FRIEDMAN, R. C. et al. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. **Genome Research**, v. 19, n. 1, p. 92–105, 2009.

GANGARAJU, V. K.; LIN, H. MicroRNAs: key regulators of stem cells. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 10, n. 2, p. 116–25, 2009.

GAO, Y. et al. Replacement of Oct4 by Tet1 during iPSC induction reveals an important role of DNA methylation and hydroxymethylation in reprogramming. **Cell stem cell**, v. 12, n. 4, p. 453–69, 4 abr. 2013.

GARZON, R. et al. MicroRNA 29b functions in acute myeloid leukemia. v. 114, n. 26, p. 5331–5341, 2009.

GASQUE SCHOOF, C. R. et al. The roles of MIR-26, MIR-29, and MIR-203 in the silencing of the epigenetic machinery during melanocyte transformation. **BioMed Research International**, v. 2015, 2015.

GOLL, M. G.; BESTOR, T. H. Eukaryotic cytosine methyltransferases. **Annual review of biochemistry**, v. 74, p. 481–514, jan. 2005.

GU, T.-P. et al. The role of Tet3 DNA dioxygenase in epigenetic reprogramming by oocytes. **Nature**, v. 477, n. 7366, p. 606–610, 2011.

GUDAS, L. J.; WAGNER, J. A. Retinoids regulate stem cell differentiation. **Journal of Cellular Physiology**, v. 226, n. 2, p. 322–330, fev. 2011.

GUO, X. et al. microRNA-29b is a novel mediator of Sox2 function in the regulation of somatic cell reprogramming. **Cell research**, v. 23, n. 1, p. 142–56, jan. 2013.

HANNA, J. H.; SAHA, K.; JAENISCH, R. Pluripotency and cellular reprogramming: facts, hypotheses, unresolved issues. **Cell**, v. 143, n. 4, p. 508–25, 12 nov. 2010.

HAUSSER, J. et al. Relative contribution of sequence and structure features to the mRNA binding of Argonaute/EIF2C-miRNA complexes and the degradation of miRNA targets. **Genome research**, v. 19, n. 11, p. 2009–20, nov. 2009.

HE, Y.-F. et al. Tet-mediated formation of 5-carboxylcytosine and its excision by TDG in mammalian DNA. **Science (New York, N.Y.)**, v. 333, n. 6047, p. 1303–7, 2 set. 2011.

HENDRICKSON, D. G. et al. Concordant Regulation of Translation and mRNA Abundance for Hundreds of Targets of a Human microRNA. **PLoS Biology**, v. 7, n. 11, p. e1000238, 10 nov. 2009.

HU, W. et al. MiR-29a maintains mouse hematopoietic stem cell self-renewal by regulating Dnmt3a. **Blood**, v. 125, n. 14, p. 2206–16, 2015.

HUANG, Y. et al. The behaviour of 5-hydroxymethylcytosine in bisulfite sequencing. **PLoS ONE**, v. 5, n. 1, p. 1–9, 2010.

HYSOLLI, E. et al. Regulation of the DNA Methylation Landscape in Human Somatic Cell Reprogramming by the miR-29 Family. **Stem Cell Reports**, v. 7, n. 1, p. 43–54, 2016.

ITO, S. et al. Role of Tet proteins in 5mC to 5hmC conversion, ES-cell self-renewal and inner cell mass specification. **Nature**, v. 466, n. 7310, p. 1129–33, 26 ago. 2010.

JACKSON, R. J.; HELLEN, C. U. T.; PESTOVA, T. V. The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 11, n. 2, p. 113–127, fev. 2010.

JACOBSEN, A. et al. Analysis of microRNA-target interactions across diverse cancer types. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 20, n. 11, p. 1325–1332, 2013.

JAENISCH, R.; BIRD, A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. **Nature genetics**, v. 33 Suppl, n. march, p. 245–54, mar. 2003.

JONAS, S.; IZAURRALDE, E. The role of disordered protein regions in the assembly of decapping complexes and RNP granules. **Genes & development**, v. 27, n. 24, p. 2628–41, 15 dez. 2013.

JONAS, S.; IZAURRALDE, E. Towards a molecular understanding of microRNA-mediated gene silencing. **Nature Reviews Genetics**, v. 16, n. 7, p. 421–433, 2015.

JONES, P. A. The DNA methylation paradox. **Trends in Genetics**, v. 15, n. 1, p. 34–37, 1999.

JONES, P. A. Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. **Nature reviews. Genetics**, v. 13, n. 7, p. 484–92, 2012.

KANELLOPOULOU, C. et al. Dicer-deficient mouse embryonic stem cells are defective in differentiation and centromeric silencing. **Genes and Development**, v. 19, n. 4, p. 489–501, 2005.

KASSCHAU, K. D. et al. P1/HC-Pro, a viral suppressor of RNA silencing, interferes with Arabidopsis development and miRNA unction. **Developmental cell**, v. 4, n. 2, p. 205–17, fev. 2003.

KOH, K. P. et al. Tet1 and Tet2 regulate 5-hydroxymethylcytosine production and cell lineage specification in mouse embryonic stem cells. **Cell stem cell**, v. 8, n. 2, p. 200–13, 4 fev. 2011.

KOHLI, R. M.; ZHANG, Y. TET enzymes, TDG and the dynamics of DNA demethylation. **Nature**, v. 502, n. 7472, p. 472–479, 2013.

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

693–705, 23 fev. 2007.

KRIAUCIONIS, S.; HEINTZ, N. The Nuclear DNA Base 5-Hydroxymethylcytosine Is Present in Purkinje Neurons and the Brain. **Science**, v. 324, n. 5929, p. 929–930, 15 maio 2009.

KRIEGER, A. J. et al. The miR-29 family: genomics, cell biology, and relevance to renal and cardiovascular injury. **Physiological genomics**, v. 44, n. 4, p. 237–44, 27 fev. 2012.

LI, E.; BESTOR, T. H.; JAENISCH, R. Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. **Cell**, v. 69, n. 6, p. 915–926, 1992.

LI, N. et al. microRNAs: important regulators of stem cells. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 8, n. 1, p. 110, 2017.

LIAO, B. et al. MicroRNA cluster 302-367 enhances somatic cell reprogramming by accelerating a mesenchymal-to-epithelial transition. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 19, p. 17359–17364, 2011.

LIAO, J. et al. Targeted disruption of DNMT1, DNMT3A and DNMT3B in human embryonic stem cells. **Nature genetics**, v. 47, n. 5, p. 469–478, 2015.

LICHNER, Z. et al. The miR-290-295 cluster promotes pluripotency maintenance by regulating cell cycle phase distribution in mouse embryonic stem cells. **Differentiation**, v. 81, n. 1, p. 11–24, 2011.

LIM, L. P. et al. Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. **Nature**, v. 433, n. 7027, p. 769–773, 2005.

LIN, S.-L. et al. Mir-302 reprograms human skin cancer cells into a pluripotent ES-cell-like state. **RNA (New York, N.Y.)**, v. 14, n. 10, p. 2115–24, out. 2008.

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

LÜNINGSSCHRÖR, P. et al. MicroRNAs in pluripotency, reprogramming and cell fate induction. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, v. 1833, n. 8, p. 1894–1903, 2013.

MALLANNA, S. K.; RIZZINO, A. Emerging roles of microRNAs in the control of embryonic stem cells and the generation of induced pluripotent stem cells. **Developmental biology**, v. 344, n. 1, p. 16–25, 1 ago. 2010.

MARTIN, G. R. Teratocarcinomas as a model system for the study of embryogenesis and neoplasia. **Cell**, v. 5, p. 229–243, 1975.

MARTIN, G. R. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells *Developmental Biology*: v. 78,

n. 12, p. 7634–7638, 1981.

MARTIN, G. R.; EVANS, M. J. The morphology and growth of a pluripotent teratocarcinoma cell line and its derivatives in tissue culture. **Cell**, v. 2, n. 3, p. 163–172, 1974.

MEISSNER, A. et al. Genome-scale DNA methylation maps of pluripotent and differentiated cells. **Nature**, v. 454, n. 7205, p. 766–770, 2008.

MELTON, C.; JUDSON, R. L.; BLELLOCH, R. Opposing microRNA families regulate self-renewal in mouse embryonic stem cells. **Nature**, v. 463, n. 7281, p. 621–626, 2010.

METZELER, K. H. et al. TET2 mutations improve the new European LeukemiaNet risk classification of acute myeloid leukemia: a Cancer and Leukemia Group B study. **Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 29, n. 10, p. 1373–81, 1 abr. 2011.

MIKKELSEN, T. S. et al. Genome-wide maps of chromatin state in pluripotent and lineage-committed cells. **Nature**, v. 448, n. 7153, p. 553–560, 2007.

MIKKELSEN, T. S. et al. Dissecting direct reprogramming through integrative genomic analysis. **Nature**, v. 454, n. 7200, p. 49–55, 2008.

MIYOSHI, N. et al. Reprogramming of mouse and human cells to pluripotency using mature microRNAs. **Cell stem cell**, v. 8, n. 6, p. 633–8, 3 jun. 2011.

MOHR, F. et al. TET genes: new players in DNA demethylation and important determinants for stemness. **Experimental hematology**, v. 39, n. 3, p. 272–81, mar. 2011.

MORITA, S. et al. miR-29 represses the activities of DNA methyltransferases and DNA demethylases. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 7, p. 14647–14658, 2013.

MOTT, J. L. et al. Transcriptional suppression of mir-29b-1/mir-29a promoter by c-Myc, hedgehog, and NF-kappaB. **Journal of cellular biochemistry**, v. 110, n. 5, p. 1155–64, 1 ago. 2010.

NAUJOK, O.; DIEKMANN, U.; LENZEN, S. The generation of definitive endoderm from human embryonic stem cells is initially independent from activin A but requires canonical Wnt-signaling. **Stem cell reviews**, v. 10, n. 4, p. 480–493, 2014.

NERI, F. et al. TET1 is controlled by pluripotency-associated factors in ESCs and downmodulated by PRC2 in differentiated cells and tissues. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. 14, p. 6814–6826, 2015.

NGUYEN, T. et al. Downregulation of microRNA-29c is associated with hypermethylation of tumor-related genes and disease outcome in cutaneous melanoma. **Epigenetics**, v. 6, n. 3, p. 388–394, 2011.

OHTSUKA, S.; NAKAI-FUTATSUGI, Y.; NIWA, H. LIF signal in mouse embryonic stem cells. **JAK-STAT**, v. 4, n. 2, p. 1–9, 3 abr. 2015.

OKADA, Y. et al. Retinoic-acid-concentration-dependent acquisition of neural cell identity during in vitro differentiation of mouse embryonic stem cells. **Developmental Biology**, v. 275, n. 1, p. 124–142, 2004.

OKANO, M. et al. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. **Cell**, v. 99, n. 3, p. 247–57, 29 out. 1999.

OLARIU, V.; LÖVKVIST, C.; SNEPPEN, K. Nanog, Oct4 and Tet1 interplay in establishing pluripotency. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 25438, 2016.

OLIVEIRA, L. H. et al. Potential roles of microRNA-29a in the molecular pathophysiology of T-cell acute lymphoblastic leukemia. **Cancer Science**, v. 106, n. 10, p. 1264–1277, 2015.

ORFORD, K. et al. Differential H3K4 Methylation Identifies Developmentally Poised Hematopoietic Genes. **Developmental Cell**, v. 14, n. 5, p. 798–809, 2008.

PAL, R.; RAVINDRAN, G. Assessment of pluripotency and multilineage differentiation potential of NTERA-2 cells as a model for studying human embryonic stem cells. **Cell Prolif**, v. 39, n. 6, p. 585–598, 2006.

PASTOR, W. A. et al. Genome-wide mapping of 5-hydroxymethylcytosine in embryonic stem cells. **Nature**, v. 473, n. 7347, p. 394–7, 19 maio 2011.

PASTOR, W. A. et al. Naive Human Pluripotent Cells Feature a Methylation Landscape Devoid of Blastocyst or Germline Memory. **Cell Stem Cell**, v. 18, n. 3, p. 323–329, 2016.

PAWLAK, M.; JAENISCH, R. De novo DNA methylation by Dnmt3a and Dnmt3b is dispensable for nuclear reprogramming of somatic cells to a pluripotent state. **Genes & Development**, v. 25, n. 10, p. 1035–1040, 15 maio 2011.

PFAFFL, M. Quantification strategies in real-time PCR Michael W . Pfaffl. **A-Z of quantitative PCR**, p. 87–112, 2004.

PUTIRI, E. L. et al. Distinct and overlapping control of 5-methylcytosine and 5-hydroxymethylcytosine by the TET proteins in human cancer cells. **Genome Biology**, v. 15, n. 6, p. R81, 2014.

RAHL, P. B. et al. c-Myc Regulates Transcriptional Pause Release. **Cell**, v. 141, n. 3, p. 432–445, abr. 2010.

RAMSAHOYE, B. H. et al. Non-CpG methylation is prevalent in embryonic stem cells and may be mediated by DNA methyltransferase 3a. v. 97, n. 10, 2000.

REIK, W. Stability and flexibility of epigenetic gene regulation in mammalian

development. **Nature**, v. 447, n. 7143, p. 425–32, 24 maio 2007.

RIBEIRO, A. O. et al. MicroRNAs: modulators of cell identity, and their applications in tissue engineering. **MicroRNA (Shāriqah, United Arab Emirates)**, v. 3, n. 1, p. 45–53, 2014.

ROBAINA, M. C. et al. Deregulation of DNMT1, DNMT3B and miR-29s in Burkitt lymphoma suggests novel contribution for disease pathogenesis. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 98, n. 2, p. 200–207, 2015.

RONN, R. E. et al. Retinoic acid regulates hematopoietic development from human pluripotent stem cells. **Stem Cell Reports**, v. 4, n. 2, p. 269–281, 2015.

ROSA, A.; BRIVANLOU, A. H. A regulatory circuitry comprised of miR-302 and the transcription factors OCT4 and NR2F2 regulates human embryonic stem cell differentiation. **The EMBO Journal**, v. 30, n. 2, p. 237–248, 2011.

SERRA, M. et al. Novel culture strategy for human stem cell proliferation and neuronal differentiation. **Journal of Neuroscience Research**, v. 85, n. 16, p. 3557–3566, dez. 2007.

SHEN, M. M. Nodal signaling : developmental roles and regulation. v. 1034, p. 1023–1034, 2007.

SINGH, S. K. et al. MicroRNAs - micro in size but macro in function. **FEBS Journal**, v. 275, n. 20, p. 4929–4944, 2008.

SIOMI, H.; SIOMI, M. C. Posttranscriptional regulation of microRNA biogenesis in animals. **Molecular cell**, v. 38, n. 3, p. 323–32, 14 maio 2010.

SMITH, Z. D.; MEISSNER, A. DNA methylation: roles in mammalian development. **Nature Reviews Genetics**, v. 14, n. 3, p. 204–220, 2013.

SOHNI, A. et al. Dynamic switching of active promoter and enhancer domains regulates Tet1 and Tet2 expression during cell state transitions between pluripotency and differentiation. **Molecular and cellular biology**, v. 35, n. 6, p. 1026–42, 2015.

SONG, C.-X.; YI, C.; HE, C. Mapping recently identified nucleotide variants in the genome and transcriptome. **Nature Biotechnology**, v. 30, n. 11, p. 1107–1116, 2012.

SPRUIJT, C. G. et al. Dynamic readers for 5-(Hydroxy)methylcytosine and its oxidized derivatives. **Cell**, v. 152, n. 5, p. 1146–1159, 2013.

STADLER, B. et al. Characterization of microRNAs involved in embryonic stem cell states. **Stem cells and development**, v. 19, n. 7, p. 935–50, 2010.

STROUD, H. et al. 5-Hydroxymethylcytosine is associated with enhancers and gene bodies in human embryonic stem cells. **Genome biology**, v. 12, n. 6, p. R54, jan. 2011.

SUH, M.-R. et al. Human embryonic stem cells express a unique set of microRNAs. **Developmental biology**, v. 270, n. 2, p. 488–98, 15 jun. 2004.

SZULWACH, K. E. et al. Integrating 5-Hydroxymethylcytosine into the Epigenomic Landscape of Human Embryonic Stem Cells. **PLoS Genetics**, v. 7, n. 6, p. e1002154, 2011.

TAHILIANI, M. et al. Conversion of 5-Methylcytosine to 5-Hydroxymethylcytosine in Mammalian DNA by MLL Partner TET1. **Science**, v. 324, n. 5929, p. 930–935, 15 maio 2009.

TAKAHASHI, K.; YAMANAKA, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. **Cell**, v. 126, n. 4, p. 663–76, 25 ago. 2006.

TAKAHASHI, K.; YAMANAKA, S. A developmental framework for induced pluripotency. **Development**, v. 142, n. 19, p. 3274–3285, 2015.

THOMSON, J. A. et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. **Science (New York, N.Y.)**, v. 282, n. 5391, p. 1145–7, nov. 1998.

THOMSON, J. A. Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts. **Science**, v. 282, n. 5391, p. 1145–1147, 6 nov. 1998.

TONGE, P. D.; ANDREWS, P. W. Retinoic acid directs neuronal differentiation of human pluripotent stem cell lines in a non-cell-autonomous manner. **Differentiation**, v. 80, n. 1, p. 20–30, 2010.

TSUMURA, A. et al. Maintenance of self-renewal ability of mouse embryonic stem cells in the absence of DNA methyltransferases Dnmt1, Dnmt3a and Dnmt3b. **Genes to Cells**, v. 11, n. 7, p. 805–814, 2006.

TU, J. et al. MicroRNA-29b/Tet1 regulatory axis epigenetically modulates mesendoderm differentiation in mouse embryonic stem cells. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. 16, p. 7805–7822, 18 set. 2015.

VAUCHERET, H. et al. The action of ARGONAUTE1 in the miRNA pathway and its regulation by the miRNA pathway are crucial for plant development. **Genes & development**, v. 18, n. 10, p. 1187–97, 15 maio 2004.

WADDINGTON, C. H. The Strategy of the Genes. A Discussion of Some Aspects of Theoretical Biology. **London**, 1957.

WAHLE, E.; WINKLER, G. S. RNA decay machines: Deadenylation by the Ccr4–Not and Pan2–Pan3 complexes. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms**, v. 1829, n. 6–7, p. 561–570, jun. 2013.

WANG, Y. et al. DGCR8 is essential for microRNA biogenesis and silencing of embryonic stem cell self-renewal. **Nature Genetics**, v. 39, n. 3, p. 380–385, 2007.

WANG, Y. et al. The role of miRNA-29 family in cancer. **European journal of cell biology**, v. 92, n. 3, p. 123–8, mar. 2013.

WATANABE, D. et al. Stage- and cell-specific expression of Dnmt3a and Dnmt3b during embryogenesis. **Mechanisms of Development**, v. 118, n. 1–2, p. 187–190, 2002.

WATANABE, D.; UCHIYAMA, K.; HANAOKA, K. Transition of mouse de novo methyltransferases expression from Dnmt3b to Dnmt3a during neural progenitor cell development. **Neuroscience**, v. 142, n. 3, p. 727–737, 2006.

WEBER, M. et al. Distribution, silencing potential and evolutionary impact of promoter DNA methylation in the human genome. **Nature genetics**, v. 39, n. 4, p. 457–66, 2007.

WILLIAMS, K. et al. TET1 and hydroxymethylcytosine in transcription and DNA methylation fidelity. **Nature**, v. 473, n. 7347, p. 343–8, 19 maio 2011.

WINTER, J. et al. Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. **Nature cell biology**, v. 11, n. 3, p. 228–234, 2009.

WONGTRAKOONGATE, P.; LI, J.; ANDREWS, P. W. DNMT3B inhibits the re-expression of genes associated with induced pluripotency. **Experimental Cell Research**, v. 321, n. 2, p. 231–239, 2014.

WU, H. et al. Genome-wide analysis of 5-hydroxymethylcytosine distribution reveals its dual function in transcriptional regulation in mouse embryonic stem cells. **Genes & development**, v. 25, n. 7, p. 679–84, 1 abr. 2011a.

WU, H. et al. Dual functions of Tet1 in transcriptional regulation in mouse embryonic stem cells. **Nature**, v. 473, n. 7347, p. 389–93, 19 maio 2011b.

XU, K. et al. MicroRNA-mediated target mRNA cleavage and 3'-uridylation in human cells. **Scientific reports**, v. 6, p. 30242, 21 jul. 2016.

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, 15 maio 2009.

XU, Y. et al. Genome-wide regulation of 5hmC, 5mC, and gene expression by Tet1 hydroxylase in mouse embryonic stem cells. **Molecular cell**, v. 42, n. 4, p. 451–64, 20 maio 2011.

YANG, C.-S. C.-S.; LI, Z.; RANA, T. M. microRNAs modulate iPS cell generation. **RNA (New York, N.Y.)**, v. 17, n. 8, p. 1451–60, ago. 2011.

YOUNG, R. A. Control of the Embryonic Stem Cell State. **Cell**, v. 144, n. 6, p. 940–954, mar. 2011.

YU, M. et al. Tet-assisted bisulfite sequencing of 5-hydroxymethylcytosine. **Nature**

protocols, v. 7, n. 12, p. 2159–70, 2012a.

YU, M. et al. Base-resolution analysis of 5-hydroxymethylcytosine in the mammalian genome. **Cell**, v. 149, n. 6, p. 1368–80, 8 jun. 2012b.

ZHANG, J. et al. Retinoic Acid Induces Embryonic Stem Cell Differentiation by Altering Both Encoding RNA and microRNA Expression. **PLOS ONE**, v. 10, n. 7, p. e0132566, 10 jul. 2015.

ZHANG, P. et al. Ten-eleven translocation (Tet) and thymine DNA glycosylase (TDG), components of the demethylation pathway, are direct targets of miRNA-29a. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 437, n. 3, p. 368–373, 2013.

ZHOU, V. W.; GOREN, A.; BERNSTEIN, B. E. Charting histone modifications and the functional organization of mammalian genomes. **Nature Reviews Genetics**, v. 12, n. 1, p. 7–18, 2011.

ZHU, J. et al. Genome-wide chromatin state transitions associated with developmental and environmental cues. v. 152, n. 3, p. 642–654, 2014.

ANEXOS

8. ANEXO 1: MANUSCRITO

Artigo a ser publicado resultante da tese

The role of miR-29a in the epigenetic regulation of cell differentiation in human pluripotent stem cells

Sarah Blima Paulino Leite¹, Ildercílio Mota de Souza Lima¹, Hudson Lenormando de Oliveira Bezerra¹, Josiane Lilian dos Santos Schiavinato¹, Amélia Goes Araújo¹, Dimas Tadeu Covas², Rodrigo Alexandre Panepucci^{1,2}.

¹Department of Genetics, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil. ²National Institute of Science and Technology in Stem Cell and for Cell Therapy (INCTC) Center for Cell Therapy (CTC) and Regional Blood Center. Ribeirão Preto, SP, Brazil.

Correspondence:

Rodrigo Alexandre Panepucci, PhD.
Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto
R. Tenente Catão Roxo, 2501
14051-140 Ribeirão Preto, Brazil
Telephone + 55.16.3602.2223
Fax + 55.16.2101.9309
e-mail: rapane@gmail.com

Author Contribution:

SBPL: Collection and/or assembly of data, data analysis and interpretation, manuscript writing

IMSL: Collection and/or assembly of data, data analysis and interpretation

HLOB: Collection and/or assembly of data

JLSS: Collection and/or assembly of data

AGA: Collection and/or assembly of data

DTC: Provision of study material or patients, final approval of manuscript.

RAP: Conception and design, provision of study material or patients, collection and/or assembly of data, data analysis and interpretation, manuscript writing, final approval of manuscript.

Abstract

Embryonic stem cells (ESCs) are obtained from the inner cell mass of the blastocyst and they have the capability of self-renewal and pluripotency, as they can originate cells of all three germ layers (ectoderm, mesoderm and endoderm), as well as germ cells. During development, pluripotent cells lose their potential of differentiation by acquiring a more restrict gene expression profile, modulated by several factors, orchestrated specially by epigenetic mechanisms. Similarly, the regulatory action of microRNAs (small RNA molecules with post transcriptional regulators activity) is as essential for the maintenance of pluripotency and also for cell differentiation. It is known that members of the miR-29 family have among their target transcripts DNA methylation (*DNMT3a* and *3b*) and demethylation machineries (*TET1*, *2* e *3* and *TDG*) components. Recent studies suggest that miR-29 epigenetic targets modulation may be responsible for lineage commitment on differentiation of murine ESCs. Thus, the present study looked for understanding the regulatory role of miR-29a and its epigenetic targets in the pluripotency contexton early differentiation in human cells. For that, two human pluripotent cell lines (H1 and NTera-2) were submitted to atRA-induced differentiationper four days *in vitro* for subsequent gene expression analysis by qPCR. Furthermore, cells were reversely transfected with hsa-miR-29a-3p mimics for 48 and 96 hours in culture before gene expression evaluation. Primers forpluripotency and differentiation markers were used, as well as for miR-29a-3p gene targets. It was observed that under atRA-induced differentiation, miR-29a and miR-29b expression levels increased as well as a few of its targets (excepting *DNMT3b*) and some endodermal and ectodermal markers, followed by a decreaseament in transcript level of the analyzed pluripotency markers in both cell lines. The miR-29a gain of function decreased the transcript levels of its targets and an increasement in the expression levels of endodermal, mesodermal and ectodermal markers in H1 cells, although a significantly statistical decreaseament in pluripotency markers was not noticed. These results results added new information about the complex role of miR-29 family members on the cell differentiation process in human pluripotent cells.

Keywords: pluripotency, hsa-miR-29-3p, epigenetics, Embryonic Stem Cells, Embryonal Carcinoma Cells

Introduction

The cells derived from the inner cell mass of blastocyst, also known as embryonic stem cells (ESC), are known for their prolonged undifferentiated proliferation and potential to differentiate and generates cells from all three germ layers (MARTIN, 1981; THOMSON et al., 1998). To maintain their intrinsic properties, the ESC present a unique chromatin architecture in which their transcriptional profile is in a dynamic equilibrium state between pluripotency and impairment with cell line commitment due to the presence of bivalent domains (BERNSTEIN et al., 2006).

In response to environmental stimuli, bivalent genes can be silenced or activated by transcriptional factors and epigenetic mechanisms which can modify the transcriptional program of ESC resulting in cell differentiation (BOLAND; NAZOR; LORING, 2014). Development by definition is epigenetic, as cells progressively lose their differentiation potential due to changes in nuclear architecture creating an increasingly restrictive transcriptional environment (REIK, 2007).

An example of an epigenetic modification with essential roles during embryonic development is DNA methylation (JAENISCH; BIRD, 2003). In mammals, 5-methylcytosine (5mC) occurs predominantly at CpG dinucleotides and is distributed along the genome alone or in sequence with CpG high-density regions, known as CpG islands, which overlap approximately 70% of human gene promoters (JONES, 2012). Interestingly, almost 25% of 5mC in ESC is found in a non-CpG context, like CpA, CpT or CpC, located mainly in the gene body of transcriptionally active genes (RAMSAHOYE et al., 2000).

There are three enzymatically active mammalian DNA methyltransferases (DNMT's) – DNMT1 is predominant in all proliferating cells and responsible for the restoration of hemi-methylated sites resulting from DNA replication by copying the methylation pattern from the original ribbon, a process known as methylation maintenance (BESTOR et al., 1988); DNMT3a and DNMT3b are responsible for *de novo* methylation, which is the establishment of DNA methylation patterns by targeting unmethylated CpG sites (OKANO et al., 1999).

ESC mice can tolerate hypomethylation caused by the inactivation of Dnmt1 or Dnmt3a / 3b to maintain their proliferative ability and pluripotency (LI; BESTOR; JAENISCH, 1992; OKANO et al., 1999). However, both inactivation of Dnmt1 or

Dnmt3a/3b or even the triple inactivation of the enzymes, impairs the process of cell differentiation, demonstrating that the establishment of methylation patterns is primordial for the specification of the lineages during embryogenesis (PAWLAK; JAENISCH, 2011; TSUMURA et al., 2006).

The 5-hydroxymethylcytosine (5hmC) is another nucleotide modification that has shown important roles in the epigenetic panorama of ESC. The DNA hydroxymethylation is actively generated by the TET family proteins (Ten-eleven-translocation) that contains a C-terminal domain of Fe (II) and 2-oxoglutarate dependent dioxygenase responsible for catalyzing the conversion of 5mC to 5hmC *in vitro* and *in vivo* (ITO et al., 2010; KRIAUCIONIS; HEINTZ, 2009; TAHILIANI et al., 2009).

The TET Family members – TET1, TET2 and TET3 – have different roles during development and show tissue-specific differential expression, with TET1 being mainly expressed in ESCs, whereas TET2 and TET3 are more ubiquitously expressed (ITO et al., 2010; TAHILIANI et al., 2009). In the literature the role of Tet1 in pluripotent cells are still confused and unknown, as some works found that Tet1-depleted mouse ESCs demonstrated impaired self-renewal (ITO et al., 2010), however others did not find any cell morphology or pluripotency markers expression changes after Tet1 knockdown (KOH et al., 2011; WILLIAMS et al., 2011). Indeed, it was only well demonstrated that the absence of these enzymes affected the lineage commitment during embryonic development (DAWLATY et al., 2011, 2013).

Concomitant with epigenetic modifications, microRNAs (miRNAs) play important roles in the orchestration of the genetic network of ESCs in pluripotency maintenance as well as in cell differentiation (LÜNINGSSCHRÖR et al., 2013). These molecules are a class of small, noncoding RNAs of ~22 nucleotides that regulate gene expression at the post-transcriptional level, mostly causing destabilization of target mRNAs or suppressing translation by binding to their targets by base pairing with complementary regions (BARTEL, 2004).

Recent studies have suggested that miR-29 family could implicate in the regulation of epigenetic mechanisms by targeting DNMT3a and 3b enzymes (FABBRI et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2015; ROBAINA et al., 2015) and TET family proteins as well as TDG (MORITA et al., 2013; ZHANG et al., 2013) that are involved in the DNA demethylation process. During reprogramming, miR-29 modulation affects the overall methylation and hydroxymethylation distribution, and iPS

generated from miR-29a-depleted cells had an epigenetic profile more similar to ESC (HYSOLLI et al., 2016; YANG; LI; RANA, 2011).

In mouse ESC, Tu et al. (2015) demonstrated that miR-29b increases sharply after embryoid body formation, which causes Tet1 repression and reduction of 5hmC level during ESCs differentiation. Besides that, overexpression of miR-29 selectively affects the markers of cell lines and guide the differentiation of mouse ESC in a similar way as occurs with ESC Tet1-depleted (CUI et al., 2016). Therefore, the miR-29 family could potentially be involved in production of mesodermal and endodermal derivatives.

However, these works were not able to identify if the changes observed in the epigenetic profile regarding global genomic methylation and hydroxymethylation are a reflection of the effects of miR-29 over DNMT or TET, or ever over any other molecular mechanism not yet revealed. Thus, here the regulatory activity of miR-29a on its epigenetic targets and the impacts of this modulation over the pluripotency maintenance and cell differentiation were investigated aiming to understand the miR-29-DNMT or miR-29-TET axis.

Material and Methods

Cell Culture

The human embryonal carcinoma cell line NTera-2 cl. D1 was used as a model of pluripotent stem cell. These cells were maintained in Dulbecco's Modified Eagle Medium High Glucose (Thermo Fisher Scientific) with 10% of Fetal Bovine Serum (Hyclone), 1% of penicillin/streptomycin (Thermo Fisher Scientific) at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂. The culture medium was changed every 2 to 3 days and for subculturing, the cells were mechanically harvested with a cell scraper.

For differentiation, NTera-2 cells were cultivated for four days in culture medium containing or not the cell differentiation inductor all-trans-retinoic acid (atRA, 10µM; Sigma-Aldrich). To do so, cells were initially plated and maintained in complete culture medium. After 24 hours, the medium was replaced and the groups submitted to cell differentiation induction received the culture medium supplemented with atRA. For the samples prepared for evaluations by RT-qPCR, the total RNA of the cells submitted to differentiation and the control groups (cultures w/out atRA) was extracted at two different time points (2 and 4 days in culture). For the samples

prepared for immunofluorescence/High Content Analysis (HCA), the staining was done after four days in culture.

RNAi transfection

Lipofectamine 2000 was used to transfect 50 nM of synthetic mimic-miR Pre-miR™ miRNA Precursor hsa-miR-29a (ID PM12499, Thermo Fisher Scientific), inhibitor-miR miRCURY LNA™ microRNA inhibitor hsa-miR-29a-3p (4100170-001, Exiqon) and target site blockers miRCURY LNA™ microRNA Target Site Blocker DNMT3b and miRCURY LNA™ microRNA Target Site Blocker TET1, as well as the negative and positive controls in cell line NTERA-2 cl. D1, according to the manufacturer's instructions. Likewise, for pre-validated siRNA against DNMT3b (ID s4221, Silencer® Selected Validated siRNA) and TET1 (ID 147892, Silencer® Pre-designed siRNA) as well as scramble siRNA (all from Thermo Fisher Scientific) transfection was used a final concentration of 30 nM, according to the manufacturer's instructions. Once the incubations were over, the samples were prepared for evaluations by RT-qPCR and immunofluorescence/High Content Analysis (HCA).

Immunofluorescence and High Content Analysis

Cells were fixed using a 2% solution of formaldehyde in ice-cold methanol (20 minutes; -20° C), followed by quenching step with glycine (0.1 M for 15 minutes) and blocking (30 minutes in PBS/1% FBS). The primary antibodies used for the staining were anti-OCT4 (#sc-5279, Santa Cruz Biotechnology, diluição); anti-OCT4 (#sc-9081, Santa Cruz Biotechnology, 1:200); anti-DNMT3b (#sc-20704, Santa Cruz Biotechnology, 1:200); anti-5-Methylcytidine (#sc-56615, Santa Cruz Biotechnology, 1:400); and anti-5-Hydroxymethylcytosine (39791, Active Motif, 1:400). A solution with the proper combining sets of primary antibodies were prepared and incubated overnight (4~8°C) with the cells. Secondary antibody staining was performed with Goat-Anti-Mouse DyLight 488 - FITC (#35503, Thermo Fisher Scientific, 1:300) and Goat-Anti-Rabbit DyLight 594 - Texas Red (#35561, Thermo Fisher Scientific, 1:300). Plates were incubated with the solutions containing the secondary antibodies and the Nuclei Marker (Hoechst 33342, #H1399, Thermo Fisher, 1:1000) for 45 minutes, and then washed and kept in PBS. The acquisition of images was performed on automated microscope system ImageXpress XLS (Molecular Devices) using the

software MetaXpress, 10X objective, and fluorescence detection cubes for DAPI (Hoechst 33342), FITC (DyLight 488) and Texas Red (DyLight 594).

RNA isolation and qRT-PCR

Total RNA from all samples was prepared using TRIzol LS, as described by the manufacturer and quantified on a Nanodrop 1000 Spectrophotometer. For reverse transcription of mRNA, we used 1 μ g of total RNA with the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit. qPCR was performed using either TaqMan Universal PCR Master Mix or Power SYBR Green PCR Master Mix (all from Thermo Fisher Scientific). Gene expression data was normalized to *GAPDH* expression, and miR data was normalized to RNU24 and RNU48. Used TaqMan probes and SYBR Green PCR primers are listed in Supplemental Table 1 and 2 respectively.

Statistical analysis

All experiments were performed in triplicates, where * = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,01$; *** = $p \leq 0,001$. The significances were calculated by Mann-Whitney test. GraphPad Prism 6.0 software was used for the statistical analysis.

Results

To investigate the expression levels of miR-29 family members in the pluripotency and differentiation contexts, the NT2 and H1 strains were submitted to the atRA differentiation induction protocol. Thus, collections were made to extract the total RNA at two moments of differentiation, on the second and fourth day after cell plating.

For the characterization of the cells, the expressions of some pluripotency markers and the three embryonic leaflets (endoderm, mesoderm and ectoderm) were evaluated. There was a statistically significant decrease ($p < 0.01$) in the expression of the OCT4 and NANOG genes in relation to the control on the second and fourth day of differentiation in the NT2 lineage. However, for the H1 lineage, only the statistically significant decrease in OCT4 gene expression ($p < 0.05$) was observed for both the second and the fourth day of differentiation (Figure 1).

Regarding the formation of the endoderm, the expression of genes, GATA4 and GATA6 related to the primitive endoderm, and FOXA2 representative of the final endoderm were evaluated. In the NT2 line, the statistically significant increase of the

GATA6 marker (on the second and fourth day) and the decrease of FOXA2 expression were observed only for the second day of atRA induced. For H1 lineage, although there were no statistically significant changes in the markers, an expressive increase in the expression of GATA4 ($p = 0.1667$) and GATA6 ($p = 0.1667$) was observed on the second and fourth day, as well as an increase Of FOXA2 ($p = 0.1667$) on the second day (Figure 2).

For the markers related to the formation of the mesoderm having as representative the Goosecoid gene (GSC) and the MIXL1 gene. In NT2, a statistically significant decrease in GSC gene expression was observed on the second and fourth day of differentiation, while in H1 no significant change was observed, despite the apparent decrease in MIXL1 ($p = 0.1667$) and increase in GSC ($p = 0.1667$) on the second day (Figure 2). As for the ectoderm markers, the expressions of the TUBB3, NES and NOTCH1 genes were analyzed. For the NT2 lineage the statistically significant increase in TUBB3 and NES gene expression was observed on the second and fourth day of differentiation. However, for H1, there were no significant changes in the expression of any of the markers (Figure 2).

The expression levels of the miR-29a-3p, miR-29b-3p and miR-29c-3p genes in the NT2 and H1 lines in the CTRL condition (without addition of atRA) and treated with the atRA inducer were also evaluated. According to the results obtained, it was possible to observe that the miR-29a-3p and miR-29b-3p genes showed increased expression levels on the second day of atRA differentiation in both strains. In particular, in the H1 strain the increased expression of the miR-29a-3p gene was also observed on the fourth day of differentiation. However, for the miR-29c-3p gene no significant changes were observed throughout the differentiation (Figure 3).

The next step consisted in the analysis of the gene expression of the epigenetic targets of miR-29a in the proposed differentiation model. Despite the increase in miR-29a, DNMT3b was shown to have decreased expression in the NT2 line, and only on the fourth day for the H1 lineage. As for the DNMT3a enzyme, significant alteration was observed only for the H1 lineage, but unlike the expected reduction, an increase in expression was observed on the second day of differentiation (Figure 5). Regarding the TET family, changes were only observed in the TET2 gene, with a statistically significant increase in expression in both lines, and in the TET3 gene on the fourth day. For the TET1 gene, as well as for TDG, no significant changes in expression were observed for both NT2 and H1 (Figure 4).

To investigate the influence of gain of miR-29a function in the pluripotent context, a functional assay was performed for transfection of mimic molecules into endogenous miR-29a. Regarding pluripotency markers, it was seen that increased miR-29a expression did not interfere in the NANOG gene expression of the lines, whereas for OCT4, a decrease in expression was observed only on the fourth day in NT2 (Figure 5).

For endoderm markers, the addition of mmiR-29a promoted a significant increase in GATA4 gene expression levels in the two strains. However, for the GATA6 gene, there was a contradiction, since while it was noted the decrease, from the marker to NT2, the opposite was seen in H1. Likewise, the inverse effect was also observed with the FOXA2 gene, which had a reduction in NT2 expression levels and an increase in H1 on the fourth day (Figure 6). As for mesoderm markers, in NT2 a significant reduction in the expression level of MIXL1 was observed, whereas for H1 an increase in the levels of this marker was observed. For the GSC marker, increased expression was observed in both strains (Figure 6). In the ectoderm markers, TUBB3 showed a statistically significant increase in expression levels in both H1 and NT2, and NES also exhibited alterations, however, only in H1 (Figure 6).

As expected, the presence of mmiR-29a led to decreased expression of its epigenetic targets, but with some caveats. The decrease in the expression of the DNMT3a and DNMT3b enzymes on the second day after transfection for both NT2 and H1 was observed. Regarding the TET family, it was found that the expression of TET1 was reduced in NT2 and in H1, as well as the levels of TET3 that were lower in both lines. However, it was observed that the transcriptional changes related to TET2 were not compatible with the other targets, since in NT2, no significant changes were observed but in H1, there was an increase in the expression of the gene on the second day, which contrasted With its decrease in the fourth day post transfection. Finally, expression of the TDG protein was reduced in NT2, while in H1, the reduction was observed only on the fourth day (Figure 7).

Discussion

During embryogenesis, atRA enters the cell to bind to the nuclear retinoic acid receptor family in DNA by activating primary response genes, such as the HOX cluster genes. In addition, atRA-activated transcription factors bind to several target genes, generating the secondary response that will result in the modification of the

transcriptional circuits involved in the fixation of differentiated cell lines (GUDAS; WAGNER, 2011). Thus, the use of atRA in in vitro differentiation models becomes interesting for the understanding of the molecular mechanisms related to the cellular compromise in the specification of the lineages.

After addition of the atRA differentiation inducer, we observed that the H1 and NT2 lines showed a reduction in the expression levels of pluripotency factors (OCT4 and NANOG). However, the decrease in NANOG was not statistically significant in H1. It is important to emphasize that in similar evaluations, other research groups also observed a reduction in OCT4 expression levels in NT2 after three and seven days (BOCKER et al., 2012) and in H1 after six and twelve days of differentiation under the Treatment of 1 μ M of atRA (ANNAB et al., 2012). Thus, the reduction of NANOG to non-significant levels in H1 can be explained by the time chosen for the evaluations of the present study, since our interest was to investigate the mechanisms responsible for the beginning of the differentiation process.

In relation to the differentiation in the NT2 lineage, after the 10 μ M treatment of aTRA, statistically significant alterations were observed in the expression of GATA6 (endoderm), TUBB3 and NES (ectoderm) markers and the reduction of FOXA2 (endoderm) and GSC (mesoderm). However, for the H1 lineage, treatment with 5 μ M atRA was not sufficient to generate statistically significant changes in the markers of differentiation, although variations in the expression levels of some genes, such as the increase of GATA4, GATA6 and FOXA2 (endoderm); GSC (mesoderm); NES and NOTCH1 (ectoderm).

Therefore, although administration of atRA is generally associated with the promotion of neural differentiation in pluripotent cells, this impairment does not occur through an autonomous cell program, but depends on the concentrations used, the time of exposure, and the time at which the atRA is added (TONGE; ANDREWS, 2010). Thus, as demonstrated in this study and in previous studies, the induction of differentiation by atRA in the NT2 lineage is not only related to the formation of neural tissues but also presents the expression of endodermal and mesodermal markers (ANDREWS, 2002; BOCKER et al., 2012).

After the characterization of the strains in the pluripotent and differentiated state, the expression of miR-29 family members was evaluated and we verified a statistically significant increase in the expression of both miR-29a and miR-29b after the onset of differentiation with atRA both for H1 and NT2.

We investigated the expression levels of miR-29 target enzymes during the onset of atRA differentiation. The evaluation of the DNMT3a and DNMT3b genes during four days of atRA differentiation showed that both the NT2 and H1 lines showed a statistically significant reduction of DNMT3b levels on the second and fourth day. However, for DNMT3a, although no changes were observed in its expression in NT2, in H1 it was possible to notice a statistically significant increase in the fourth day.

Zhang *et al.* (2015) also demonstrated that under induction of atRA, DNMT3b expression levels and overall methylation of the NT2 lineage decrease. In another study, it was observed that these methylation changes observed in the NT2 genome after the atR treatment were dynamic and occurred site-specific, involving increased methylation in CpG islands and their flanking sequences, enhancement hypomethylation and Decrease in non-CpG methylation (BOCKER *et al.*, 2012).

In the present study, only TET2 and TET3 showed significant changes in expression after atRA induction in pluripotent lines. For NT2, elevation in TET2 levels was observed on the second and fourth day, whereas for TET3 only on day 4, for H1 the increase was observed only in TET3. In line with our results Bocker *et al.* (2012) also found that after differentiation with 10 μ M atRA in NT2, expression levels of TET2 and TET3 increased in relation to TET1 over 10 days of treatment. A similar investigation of the role of atRA induction in TET family genes was performed in mouse CTEs, in which after 24 hours of treatment with 1 μ M of atRA, the cells showed a reduction in Tet1 and Tet2 levels in contrast to the increase in Levels of Tet3 (ZHANG *et al.*, 2015). The difference observed in the effect of atRA on the members of the TET family in these studies may be due to the differential role of these enzymes in human and mouse CTEs.

The role of the miR-29 family and its epigenetic targets has also been related to the beginning of the differentiation process in CTEs, so, in our investigation, we observed that the miR-29a function gain presented different results for the differentiation markers in H1 and NT2.

In our analyzes, the gain of miR-29a function, at least in the H1 line also demonstrated increased expression for all markers related to endodermal and mesoderm formation, as well as to two of the markers related to ectoderm formation. However, in order to conclude whether the direction of the formation of one germ leaf over another is due to miR-29's performance on its epigenetic targets, more detailed

evaluations will be necessary to investigate the presence or absence of the miR-29-TET or miR-29-DNMT.

Acknowledgments

This work was supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brazil.

Author disclosure statement

No competing financial interests exist.

References

- Andrews, P. W. (2002) 'From teratocarcinomas to embryonic stem cells.', *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 357(1420), pp. 405–417.
- Annab, L. A. *et al.* (2012) 'Differential responses to retinoic acid and endocrine disruptor compounds of subpopulations within human embryonic stem cell lines', *Differentiation*. Elsevier, 84(4), pp. 330–343.
- Bartel, D. P. (2004) 'MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function.', *Cell*, 116(2), pp. 281–97.
- Bernstein, B. E. *et al.* (2006) 'A Bivalent Chromatin Structure Marks Key Developmental Genes in Embryonic Stem Cells', *Cell*, 125(2), pp. 315–326.
- Bestor, T. *et al.* (1988) 'Cloning and sequencing of a cDNA encoding DNA methyltransferase of mouse cells. The carboxyl-terminal domain of the mammalian enzymes is related to bacterial restriction methyltransferases', *Journal of Molecular Biology*, 203(4), pp. 971–983.
- Bocker, M. T. *et al.* (2012) 'Hydroxylation of 5-methylcytosine by TET2 maintains the active state of the mammalian HOXA cluster', *Nature Communications*, 3(May), p. 818.
- Boland, M. J., Nazor, K. L. and Loring, J. F. (2014) 'Epigenetic regulation of pluripotency and differentiation', *Circulation Research*, 115(2), pp. 311–324.
- Cui, Y. *et al.* (2016) 'miR-29 regulates Tet1 expression and contributes to early differentiation of mouse ESCs', *Oncotarget*, 7(40).
- Dawlaty, M. M. *et al.* (2011) 'Tet1 is dispensable for maintaining pluripotency and its loss is compatible with embryonic and postnatal development.', *Cell stem cell*. Elsevier Inc., 9(2), pp. 166–75.

Dawlaty, M. M. *et al.* (2013) 'Combined Deficiency of Tet1 and Tet2 Causes Epigenetic Abnormalities but Is Compatible with Postnatal Development', *Developmental Cell*, 24(3), pp. 310–323.

Fabbri, M. *et al.* (2007) 'MicroRNA-29 family reverts aberrant methylation in lung cancer by targeting DNA methyltransferases 3A and 3B.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(40), pp. 15805–10.

Gudas, L. J. and Wagner, J. A. (2011) 'Retinoids regulate stem cell differentiation', *Journal of Cellular Physiology*, 226(2), pp. 322–330.

Hysolli, E. *et al.* (2016) 'Regulation of the DNA Methylation Landscape in Human Somatic Cell Reprogramming by the miR-29 Family', *Stem Cell Reports*. The Authors, 7(1), pp. 43–54.

Ito, S. *et al.* (2010) 'Role of Tet proteins in 5mC to 5hmC conversion, ES-cell self-renewal and inner cell mass specification.', *Nature*. Nature Publishing Group, 466(7310), pp. 1129–33.

Jacobsen, A. *et al.* (2013) 'Analysis of microRNA-target interactions across diverse cancer types', *Nature Structural & Molecular Biology*. Nature Publishing Group, 20(11), pp. 1325–1332.

Jaenisch, R. and Bird, A. (2003) 'Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals.', *Nature genetics*, 33 Suppl(march), pp. 245–54.

Jones, P. A. (2012) 'Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond.', *Nature reviews. Genetics*. Nature Publishing Group, 13(7), pp. 484–92.

Koh, K. P. *et al.* (2011) 'Tet1 and Tet2 regulate 5-hydroxymethylcytosine production and cell lineage specification in mouse embryonic stem cells.', *Cell stem cell*. Elsevier Inc., 8(2), pp. 200–13.

Kriaucionis, S. and Heintz, N. (2009) 'The Nuclear DNA Base 5-Hydroxymethylcytosine Is Present in Purkinje Neurons and the Brain', *Science*, 324(5929), pp. 929–930.

Li, E., Bestor, T. H. and Jaenisch, R. (1992) 'Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality.', *Cell*, 69(6), pp. 915–926.

Lin, S.-L. *et al.* (2008) 'Mir-302 reprograms human skin cancer cells into a pluripotent ES-cell-like state.', *RNA (New York, N.Y.)*, 14(10), pp. 2115–24.

Mallanna, S. K. and Rizzino, A. (2010) 'Emerging roles of microRNAs in the control of embryonic stem cells and the generation of induced pluripotent stem cells.', *Developmental biology*. Elsevier Inc., 344(1), pp. 16–25.

Martin, G. R. (1981) 'Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells *Developmental Biology* ', 78(12), pp. 7634–7638.

Metzeler, K. H. *et al.* (2011) 'TET2 mutations improve the new European LeukemiaNet risk classification of acute myeloid leukemia: a Cancer and Leukemia Group B study.', *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 29(10), pp. 1373–81.

Morita, S. *et al.* (2013) 'miR-29 represses the activities of DNA methyltransferases and DNA demethylases.', *International Journal of Molecular Sciences*, 14(7), pp. 14647–14658.

Okano, M. *et al.* (1999) 'DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development.', *Cell*, 99(3), pp. 247–57.

Oliveira, L. H. *et al.* (2015) 'Potential roles of microRNA-29a in the molecular pathophysiology of T-cell acute lymphoblastic leukemia', *Cancer Science*, 106(10), pp. 1264–1277.

Pawlak, M. *et al.* (2011) 'De novo DNA methylation by Dnmt3a and Dnmt3b is dispensable for nuclear reprogramming of somatic cells to a pluripotent state service De novo DNA methylation by Dnmt3a and Dnmt3b is dispensable for nuclear reprogramming of somatic cells to a pluripotent s', pp. 1035–1040.

Ramsahoye, B. H. *et al.* (2000) 'Non-CpG methylation is prevalent in embryonic stem cells and may be mediated by DNA methyltransferase 3a', 97(10).

Reik, W. (2007) 'Stability and flexibility of epigenetic gene regulation in mammalian development.', *Nature*, 447(7143), pp. 425–32.

Robaina, M. C. *et al.* (2015) 'Deregulation of DNMT1, DNMT3B and miR-29s in Burkitt lymphoma suggests novel contribution for disease pathogenesis', *Experimental and Molecular Pathology*. Elsevier Inc., 98(2), pp. 200–207.

Tahiliani, M. *et al.* (2009) 'Conversion of 5-Methylcytosine to 5-Hydroxymethylcytosine in Mammalian DNA by MLL Partner TET1', *Science*, 324(5929), pp. 930–935.

Thomson, J. a. (1998) 'Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts', *Science*, 282(5391), pp. 1145–1147.

Tonge, P. D. and Andrews, P. W. (2010) 'Retinoic acid directs neuronal differentiation of human pluripotent stem cell lines in a non-cell-autonomous manner', *Differentiation*. Elsevier, 80(1), pp. 20–30.

Tsumura, A. *et al.* (2006) 'Maintenance of self-renewal ability of mouse embryonic stem cells in the absence of DNA methyltransferases Dnmt1, Dnmt3a and Dnmt3b', *Genes to Cells*, 11(7), pp. 805–814.

Tu, J. *et al.* (2015) 'MicroRNA-29b/Tet1 regulatory axis epigenetically modulates mesendoderm differentiation in mouse embryonic stem cells', *Nucleic Acids Research*, 43(16), pp. 7805–7822.

Williams, K. *et al.* (2011) 'TET1 and hydroxymethylcytosine in transcription and DNA methylation fidelity.', *Nature*. Nature Publishing Group, 473(7347), pp. 343–8.

Yang, C.-S. C.-S., Li, Z. and Rana, T. M. (2011) 'microRNAs modulate iPS cell generation.', *RNA (New York, N.Y.)*, 17(8), pp. 1451–60.

Zhang, J. *et al.* (2015) 'Retinoic Acid Induces Embryonic Stem Cell Differentiation by Altering Both Encoding RNA and microRNA Expression', *PLOS ONE*. Edited by C. Gaetano, 10(7), p. e0132566.

Zhang, P. *et al.* (2013) 'Ten-eleven translocation (Tet) and thymine DNA glycosylase (TDG), components of the demethylation pathway, are direct targets of miRNA-29a', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 437(3), pp. 368–373.

Figure 1. Gene expression of pluripotency markers in NT2 and H1 treated with atRA. Expression of the OCT4 and NANOG genes in NT2 (A) and in H1 (B). CTRL D2 and D4, cells maintained in basal culture medium; AtRA D2 and D4, cells maintained in basal culture medium plus 10 μ M atRA in NT2 and 5 μ M atRA in H1. The analysis used was the non-parametric Mann-Whitney non-paired statistical test, being * = <0.05; ** = <0.01 and *** = <0.001.

Figure 2. Gene expression of endoderm markers in NT2 and H1 treated with atRA after two and four days of culture. Expression of genes GATA4, GATA6 and FOXA2 in NT2 (A) and in H1 (B). CTRL D2 and D4, cells maintained in basal culture medium; AtRA D2 and D4, cells maintained in basal culture medium plus 10 μ M atRA in NT2 and 5 μ M atRA in H1. The analysis used was the non-parametric Mann-Whitney non-paired statistical test, being * = <0.05; ** = <0.01 and *** = <0.001.

Figure 3. Gene expression of the miR-29 family members in NT2 and H1 treated with atRA after two and four days of culture. Gene expression of the miR-29a-3p, miR-29b-3p and miR29c-3p genes in NT2 (A) and H1 (B). CTRL D2 and D4, cells maintained in basal culture medium; AtRA D2 and D4, cells maintained in basal culture medium plus 10 μ M atRA in NT2 and 5 μ M atRA in H1. The analysis used was the non-parametric Mann-Whitney non-paired statistical test, being * = <0.05; ** = <0.01 and *** = <0.001.

Figure 4. Gene expression of the epigenetic targets of miR-29a in NT2 and H1 treated with atRA after two and four days of culture. Gene expression of the DNMT3a, DNMT3b, TET1, TET2, TET3 and TDG genes in NT2 (A and C) and H1 (B and D). CTRL D2 and D4, cells maintained in basal culture medium; AtRA D2 and D4, cells maintained in basal culture medium plus 10 μ M atRA in NT2 and 5 μ M atRA in H1. The analysis used was the non-parametric Mann-Whitney non-paired statistical test, being * = <0.05; ** = <0.01 and *** = <0.001.

Figure 5. Expressão gênica de marcadores de pluripotência em NT2 e H1 transfectadas com moléculas mímicas do miR-29a após dois e quatro dias de cultivo. Expressão dos genes *OCT4* e *NANOG* em NT2 (A) e em H1 (B). *mmiR-29a* D2 e D4, células mantidas em meio de cultivo basal transfectadas com mimic-miR-29a (50nM); *mmiR-Ctrl* D2 e D4, células mantidas em meio de cultivo basal transfectadas com mimic-miR-29a. A análise empregada foi o teste estatístico não paramétrico Mann-Whitney não pareado, sendo * = < 0,05; ** = < 0,01 e *** = < 0,001.

Figure 6. Gene expression of pluripotency markers in NT2 and H1 transfected with mimic molecules of miR-29a after two and four days of culture. Expression of the OCT4 and NANOG genes in NT2 (A) and in H1 (B). MmiR-29a D2 and D4, cells maintained in basal culture medium transfected with mimic-miR-29a (50nM); MmiR-Ctrl D2 and D4, cells maintained in basal culture medium transfected with

mimic-miR-29a. The analysis used was the non-parametric Mann-Whitney non-paired statistical test, being * = <0.05; ** = <0.01 and *** = <0.001.

Figure 7. Gene expression of epigenetic targets of miR-29a in NT2 and H1 transfected with mimic molecules of miR-29a after two and four days of culture. Gene expression of the DNMT3a, DNMT3b, TET1, TET2, TET3 and TDG genes in NT2 (A and C) and H1 (B and D). MmiR-29a D2 and D4, cells maintained in basal culture medium transfected with mimic-miR-29a (50nM); MmiR-Ctrl D2 and D4, cells maintained in basal culture medium transfected with mimic-miR-29a. The analysis used was the non-parametric Mann-Whitney non-paired statistical test, being * = <0.05; ** = <0.01 and *** = <0.001.

Figure 1

Figure 2

Figure 3.

Figure 4.

Figure 5.

Figure 6.

Figure 7.

Supplemental Table 1 – TaqMan Probes list.

Gene	TaqMan
miR-29a-3p	ID 002112
miR-29b-3p	ID 002166
miR-29c-3p	ID 000587
RNU24	ID 001001
RNU48	ID 001006

Supplemental Table 2 – SYBR Green PCR primers list.

Gene	Primers Sequence
<i>GAPDH</i>	F: GAAGGTGAAGGTCGGAGTC R: GAAGATGGTGATGGGATTTC
<i>OCT4</i>	F: GAGAATTTGTTCTCCTGCAGTGC R: TCGTTGTGCATAGTCGCTG
<i>NANOG</i>	F: GAAATACCTCAGCCTCCAGC R: GCGTCACACCATTGCTATTTC
<i>GATA4</i>	F: CTTGCAATGCGGAAAGAGG R: TGCTGGAGTTGCTGGAAG
<i>GATA6</i>	F: AACACAACCTACAGCCTCAG R: TCTTGACCCGAATACTTGAGC
<i>GSC</i>	F: GAGGGAAGAGGAAGGTAAAAGC R: AAGTAATACGGGCAAGTGTCC
<i>T (BRACHYURY)</i>	F: TCTACATCCACCCCGACTC R: TCGAGGCTCATACTTATGCAAG
<i>MIXL1</i>	F: GTACCCCGACATCCACTTG R: GATTTCCCACTCTGACGCC
<i>FOXA2</i>	F: GACTCCCGGCCCATATG R: CTTCTCCCTTGCGTCTCTG
<i>NES</i>	F: GGTCTCTTTTCTCTTCCGTCC R: CTCCCACATCTGAAACGACTC
<i>OTX2</i>	F: CCAGACATCTTCATGCGAGAG R: GGCAGGTCTCACTTTGTTTTG
<i>TUBB3</i>	F: TTTGGACATCTCTTCAGGCC R: TTTCACACTCCTTCCGCAC
<i>NOTCH1</i>	F: TGCCTGGACAAGATCAATGAG R: CAGGTGTAAGTGTTGGGTCC
<i>TET1</i>	F: ACCTATTCCCCGAATCAAGC R: TTGCACGGTCTCAGTGTTACTC
<i>TET2</i>	F: ACTTGCCTTTGCTCCTGTTG R: AGCCCCATCACGTACAAAAC
<i>TET3</i>	F: CACAAGGACCAGGATAACT R: AGCGATTGTCTTCCTTGGTC
<i>TDG</i>	F: GACTCTCCCCGATATTTTGACC R: CACTGAGCCCTGACATAAACA
<i>DNMT1</i>	F: GAATCAGTTATGTGACTTGGAAACC R: CTAGACGTCCATTCACTTCCC
<i>DNMT3a</i>	F: GGAGAAGCCCAAGGTCAAG R: TTCCAGGGTAACATTGAGGC
<i>DNMT3b</i>	F: CCCATTTCGAGTCCTGTCATTG R: TTGATATTCCCCTCGTGCTTC