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

**AVALIAÇÃO DOS PAPÉIS DAS VIAS CANÔNICA E NÃO-CANÔNICA DE NF- κ B
NA PLURIPOTÊNCIA DE CÉLULAS-TRONCO EMBRIONÁRIAS HUMANAS**

HUDSON LENORMANDO DE OLIVEIRA BEZERRA

RIBEIRÃO PRETO

2018

HUDSON LENORMANDO DE OLIVEIRA BEZERRA

**AVALIAÇÃO DOS PAPÉIS DAS VIAS CANÔNICA E NÃO-CANÔNICA DE NF- κ B
NA PLURIPOTÊNCIA DE CÉLULAS-TRONCO EMBRIONÁRIAS HUMANAS**

Tese de doutorado 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 Ciências.

Área de concentração: Genética

Orientador: Dr. Rodrigo Alexandre Panepucci

RIBEIRÃO PRETO

2018

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

Versão corrigida. A versão original encontra-se disponível tanto na Biblioteca da Unidade que aloja o Programa, quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD)

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca Central do Campus Administrativo de Ribeirão Preto/USP.

Bezerra, Hudson Lenormando de Oliveira.

Avaliação dos papéis das vias canônica e não-canônica de NF- κ B na pluripotência de células-tronco embrionárias humanas. Ribeirão Preto, 2018.

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP.

Área de concentração: Genética.

Orientador: Panepucci, Rodrigo Alexandre.

1. Células-Tronco. 2. Pluripotência. 3. Diferenciação Celular.

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Hudson Lenormando de Oliveira Bezerra

Avaliação dos papéis das vias canônica e não-canônica de NF- κ B na pluripotência de células-tronco embrionárias humanas.

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

Área de Concentração: Genética

Aprovado em ____/____/____

Banca examinadora

Prof. Dr. Rodrigo Alexandre Panepucci

Instituição _____

Assinatura _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição _____

Assinatura _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição _____

Assinatura _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição _____

Assinatura _____

Dedico este trabalho ao Hudson de 8 anos atrás, que só sonhava em ser doutor na disciplina que ele sempre amou e que jamais imaginou que a genética seria um dia as azas que o faria voar. Que ele voe, pois és dono do seu próprio caminho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço principalmente à minha mãe, Nativa Bezerra, mulher da minha vida, por sempre ser o meu exemplo de força e meu alicerce sem nunca questionar as minhas escolhas.

Aos meus irmãos Hugo e Hildene, aos meus sobrinhos Nícollas, Brunno e Benício, e aos meus cunhados Vaninha e Orlando. Aos familiares, tias e primos queridos, parentes e aderentes.

Aos amigos da minha cidade e estado natal: Hugo Gurgel, Euri Gurgel, Ítalo Maia, Arlindo Bezerra, Pedro Barros, Amanda Bezerra, Carlos Junior, Porciano Barros, Verlândia Moraes, Luana, Izabel Leite, Paulinha Leite, Thyago Dantas e muitos outros.

Aos amigos que a graduação me deu: Willianne Alves, Bruno Tardeli, Jannyce Guedes, Juliana Alvez, Gabriela Diniz, Hermany Munguba, Hylarina Diniz e Janeusa de Souto.

À Luiza Araújo e à Aline Tolardo, minhas BFsF, à Ernesto Lopes e Igor Coqueiro, meus BBsFsF, à Rodrigo Soares, Evandro Amorim, Felipe Basso, Fernando Silva, Paulinho Dias, Maritza Salas, Gabriela Vieira, Dilo Correa, Isabela Ichihara, Danielle Brotto, Diana Ribeiro, Simone Carvalho, Lílian Figueiredo, Djalma Souza, Greice Molfetta e Larissa Ziotti. Obrigado por pôr risos no meu rosto e alegria na minha vida ribeirão-pretana. Obrigado por este suporte emocional, talvez o mais importante. Obrigado pelos laços de amizade. Espero poder sempre apertá-los.

Ao Laboratório de Terapia Celular, e às pessoas que sempre se dispuseram a me ajudar: Maristela Orellana, Sâmia Rigotto e Taisa Risque. Obrigado à Aline Garcia e Patrícia Tozetti. Obrigado pelo aprendizado, amizade, pelos sorrisos compartilhados e pelas histórias contadas. Saudades daquela convivência diária.

Ao Laboratório de Citometria Celular, principalmente à Camila Menezes e Patrícia Palma.

Ao Laboratório de Genética Molecular e Bioinformática, principalmente à Kamila Chagas Peronni Zueli, e ao CISBi (*Center for Integrative Systems Biology*), principalmente à Jessica Rodrigues Praça.

Ao Laboratório de Proteases e Biologia do Câncer, principalmente à sua chefe Katiuchia Uzzun Sales e seu orientando Gabriel Vieira pela orientação e acessoria experimentais.

À l'Université d'Aix-Marseille pour la réception; à toute l'équipe de Marseille Médical Genetics de la Faculté de Médecine La Timone; à tous ceux qui composent le Laboratoire de Physiopathologie du Développement Cardiaque, en particulier à Michel PUCEAT, pour avoir dirigé une partie de mon travail et la possibilité de le développer en France; à Thomas MOORE-MORRIS, pour son soutien et sa confiance dans mon travail; à Denis ARNAUD; à Batoul FARHAT, pour avoir partagé notre angoisse, pour être souvent la dose quotidienne de joie et pour les innombrables tasses de café prises entre les rires et les sourires.

Merci encore à tous mes amis qu'habitent en France: Mathieu LHERM, Patrick LE FLOCH, Carolina MORAES, Suzana CURTI, Alex MAGNO, Amanda MEDEIROS e Henrique DA SILVA.

Aos meus colegas de laboratório Helder Freitas, Felipe Canto, Sarah Blima e Amanda Corveloni. Em especial à Josiane Schiavinato, Vitor Leão e Ildercílio Lima, essenciais para a realização deste trabalho. Obrigado por tornar os dias de trabalho em bancada mais suaves. À Amélia Goes, mãezona de todos do laboratório.

Ao meu orientador Rodrigo Alexandre Panepucci. Obrigado por não se opor aos meus voos planados e rasantes. Obrigado pela oportunidade de aprendizado e crescimento dentro do laboratório e por ter me permitido uma real pós-graduação em genética. Obrigado pela confiança.

À Universidade de São Paulo e ao Programa de Pós-graduação em Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, em especial à Susie Nalon, sempre prestativa, sempre nos socorrendo.

À Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto e à CAPES, pelo auxílio financeiro.

Por fim, agradeço a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a minha formação como Doutor em Ciências Biológicas e Geneticista.

RESUMO

BEZERRA, H.L.O. **Avaliação dos papéis das vias canônica e não-canônica de NF-κB na pluripotência de células-tronco embrionárias humanas.** Tese (Doutorado). Ribeirão Preto, dezembro de 2018.

As células-tronco embrionárias humanas são caracterizadas pela sua autorrenovação e capacidade de originar *in vitro* a grande maioria de células que compõem um organismo adulto. No núcleo destas células há vários fatores atuantes responsáveis pela manutenção da identidade pluripotente, dentre eles destacam-se OCT4, NANOG, SOX2, KLF4, LIN28 e MYC. Muito já se sabe sobre os mecanismos que estes fatores atuam para promover a manutenção da pluripotência celular e baseados neste conhecimento foi possível gerar células-tronco de pluripotência induzida, porém, os mecanismos moleculares que direcionam a indução e perda da pluripotência ainda não estão muito bem esclarecidos. Sendo assim, propomos estudar o papel dos fatores de transcrição das vias de NF-κB na genética das células-tronco embrionárias humanas. A família gênica de NF-κB é estudada há mais de 3 décadas e possui sua atuação nos processos que regulam as respostas imunológicas nos organismos já bem descritas, todavia, seu papel em outros processos importantes como manutenção da pluripotência e que agem na diferenciação celular ainda não foram bem esclarecidos. Apesar de muitos resultados evidenciarem uma função distinta para as vias canônica e não-canônica de NF-κB, não existe ainda uma ideia ampla dos mecanismos pelos quais isso ocorre. Com a finalidade de entender melhor o papel destas duas vias propomos avaliar a modulação da expressão gênica dos membros da família de NF-κB e dos fatores de pluripotência bem como a relação existente entre estes dois grupos de fatores de transcrição na transição do estado indiferenciado celular para um estado de indução à diferenciação de células-tronco embrionárias humanas. Os resultados demonstram que as vias canônicas e não-canônicas de NF-κB possuem ações antagonistas nos processos de manutenção da pluripotência e diferenciação. A via canônica de NF-κB está comprometida com o processo de diferenciação de células-tronco embrionárias humanas e a via não-canônica de NF-κB está relacionada com a manutenção da pluripotência e viabilidade celular.

Palavras-chaves: células-tronco embrionárias humanas; pluripotência; diferenciação; NF-κB.

ABSTRACT

BEZERRA, H.L.O. **Evaluation of canonical and non-canonical NF- κ B signaling pathways on pluripotency of human embryonic stem cells.** Thesis (Ph.D. Degree). Ribeirão Preto, December 2018.

Human embryonic stem cells are characterized by their self-renewal and ability to originate in vitro the vast majority of cells that make up an adult organism. In the nucleus of these cells, there are several factors responsible for the maintenance of pluripotent identity, among which stand out OCT4, NANOG, SOX2, KLF4, LIN28, and MYC. Much is known about the mechanisms that these factors act to promote the maintenance of cellular pluripotency and based on this knowledge it was possible to generate induced pluripotent stem cells, however, the molecular mechanisms that direct the induction and loss of pluripotency are still not very well clarified. So, we propose to study the role of transcription factors of the NF- κ B pathways in the genetics of human embryonic stem cells. The gene family of NF- κ B has been studied for more than 3 decades and has its role in the processes that regulate immune responses in organisms well-described, however, its role in other important processes such as maintenance of pluripotency and that act on cell differentiation was not fully understood. Although many results demonstrate a distinct function for the canonical and non-canonical pathways of NF- κ B, there is still no widespread idea of the mechanisms by which this occurs. In order to better understand the role of these two pathways, we propose to evaluate the gene expression modulation of NF- κ B family members and the pluripotency factors as well the relationship between these two groups of transcription factors in the transition from the undifferentiated cellular state for a state of induction of differentiation in human embryonic stem cells. The results demonstrate that canonical and non-canonical pathways of NF- κ B have antagonistic actions in the maintenance of pluripotency and differentiation. The canonical pathway of NF- κ B is involved in the differentiation process of human embryonic stem cells and the non-canonical pathway of NF- κ B is related to the maintenance of pluripotency and cell viability.

Keywords: human embryonic stem cells; pluripotency; differentiation; NF- κ B.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 Células-tronco I As células-tronco de modo geral são caracterizadas pela habilidade de autorrenovação e sua capacidade de diferenciação em diferentes tipos celulares (Retirada de ARADI et al., 2011).	25
Figura 2 Células-tronco II Classificação da potencialidade das células-tronco em totipotentes, pluripotentes, multipotentes e onipotentes ou progenitoras (Retirada de ARADI et al., 2011).	26
Figura 3 Origem das células-tronco pluripotentes humanas As células-tronco embrionárias são derivadas da massa celular interna do blastocisto embrionário; as células embrionárias germinais são derivadas de células germinativas primordiais isoladas da gônada embrionária; células de carcinoma embrionário são também derivadas de células germinativas primordiais da gônada embrionária, mas geralmente são detectadas como componentes de tumores testiculares adultos (Retirada de DONOVAN; GEARHART, 2001).	27
Figura 4 Estabelecimento de linhagens de células-tronco embrionárias Células-tronco embrionárias humanas são isoladas a partir de embriões pré-implantação, normalmente no estágio de blastocisto. A massa celular interna do blastocisto é isolada e propagada em co-cultivo com células alimentadoras murinas (Retirada de ARADI et al., 2011).	28
Figura 5 Métodos para derivação de células-tronco embrionárias humanas (A) Derivação de hESCs pelo método convencional, onde as linhagens são derivadas de blastocistos humanos pré-implantados produzidos por fertilização in vitro havendo a necessidade do uso do embrião completo. (B) As linhagens também podem ser derivadas de blastômeros individuais biopsiados a partir de embriões em estágio de 8 células. (C) Geração de linhagens através da transferência nuclear de células somáticas (SCNT), que são fundidas ou diretamente injetadas em oócitos enucleados para formar blastocistos subsequentemente usados para derivação de ESC pelo método convencional (Retirada e adaptada de KAO et al., 2008).	30
Figura 6 Resumo esquemático das vias de sinalização que controlam a autorrenovação e a diferenciação de mESCs As vias de sinalização Lif/Stat3, Bmp e Wnt/b-catenina mantêm a autorrenovação, enquanto as vias de sinalização Fgf/Erk e calcineurina/NFAT promovem diferenciação. A via de sinalização PI3K/Akt ativada por pStat3 protege a auto-renovação via inibição das atividades de Erk e aprimora o sinal Wnt. Linhas tracejadas indicam as interações indiretas entre dois componentes. Linhas verdes e linhas vermelhas indicam ativação e inibição, respectivamente. Círculos amarelos indicam sinais extracelulares. Círculos vermelhos indicam os fatores relacionados à transcrição que regulam a atividade de cada via de sinalização. Círculos azuis indicam os componentes das vias de sinalização (Retirada de ZHAO; JIN, 2017).	32
Figura 7 Resumo esquemático das vias de sinalização que controlam a autorrenovação e a diferenciação de hESCs A via de sinalização FGF/ERK e a via de sinalização Activin A/SMAD2,3 são críticas para a autorrenovação, enquanto o sinal BMP impulsiona a diferenciação em sentido às linhagens primitivas e trofoblasto. O papel da sinalização WNT na decisão do destino celular das hESCs é complicado. É possível que b-catenina possa promover a diferenciação atuando em conjunto com alguns co-factores (por exemplo, TCF/LEF) e mantenha a autorrenovação aumentando o sinal de PI3K/AKT. Linhas tracejadas indicam interações indiretas entre dois componentes. A linha grossa indica o maior efeito a jusante. Linhas verdes e linhas vermelhas indicam ativação e inibição, respectivamente. Círculos amarelos indicam sinais extracelulares. Círculos vermelhos indicam os fatores relacionados à transcrição que regulam a atividade de cada via de sinalização. Círculos azuis indicam os componentes das vias de sinalização (Retirada de ZHAO; JIN, 2017).	32

Figura 8 Motivos Regulatórios Transcrpcionais em Células-tronco Embrionárias Humanas (A) Exemplo de circuito regulador de transcrição *feedforward* em hESCs. Os reguladores são representados por círculos azuis; promotores de genes são representados por retângulos vermelhos. A ligação de um regulador a um promotor é indicada por uma seta sólida. Os genes que codificam os reguladores estão ligados aos seus respectivos reguladores por setas tracejadas. (B) A malha de auto-regulação interconectada formada por OCT4, SOX2 e NANOG (Retirada de BOYER et al., 2005).34

Figura 9 Rede regulatória transcricional principal em hESCs Modelo da rede central de regulação transcricional construído pela identificação de genes alvo de OCT4, SOX2 e NANOG que codificam fatores de transcrição e reguladores de cromatina, além do conhecimento de integração das funções desses reguladores *downstream* na comparação com conjuntos de dados de expressão múltipla e na literatura. Um subconjunto de genes ativos e inativos co-ocupados pelos três fatores em hESCs é mostrado aqui. Reguladores são representados por círculos azuis; promotores de genes são representados por retângulos vermelhos; caixas cinzentas representam genes alvos putativos *downstream*. A regulação positiva foi assumida se o gene alvo foi expresso, enquanto a regulação negativa foi assumida quando o gene alvo não foi transcrito (Retirada de BOYER et al., 2005).35

Figura 10 Reprogramação nuclear à pluripotência I (A) Na transferência nuclear o núcleo de uma célula somática (2n) é transplantado para um oócito anucleado. No ambiente do ovócito, o núcleo da célula somática é reprogramado para que as células derivadas dele sejam pluripotentes. A partir deste oócito, um blastocisto é gerado, a partir do qual as linhas de células-tronco embrionárias são derivadas na cultura de tecidos. (B) Na fusão celular dois tipos distintos de células são combinados para formar uma única entidade. As células fundidas resultantes podem ser heterocariontes (de curta longevidade e não se dividem) ou híbridas (que proliferam mas, na divisão, os núcleos se fundirão para se tornarem 4n ou maior; se as células forem derivadas da mesma espécie, seu cariótipo permanecerá euploide; se forem de espécies diferentes, serão aneuploides, pois os cromossomos serão perdidos e rearranjados) (Retirada e adaptada de YAMANAKA; BLAU, 2010).37

Figura 11 Reprogramação nuclear à pluripotência II Para gerar hiPSCs as células somáticas adultas são transduzidas (ou transfectadas) com vetores que codificam quatro fatores de pluripotência (SOX2, KLF4, c-MYC e OCT4). As iPSCs totalmente reprogramadas possuem propriedades semelhantes às células-tronco embrionárias: são competentes para formar teratomas com a injeção em camundongos, são capazes de gerar progênie quando injetadas em embriões viáveis e podem então ser induzidas a sofrer diferenciação em vários tipos de células somáticas, todas com a mesma informação genética do doador de origem (Retirada e adaptada de YAMANAKA; BLAU, 2010).38

Figura 12 Proteínas da família de NF-κB e combinações diméricas Todas as subunidades contêm um domínio de homologia Rel (RHD). NFκB1 e NFκB2 possuem uma região rica em glicina (GRR), seguida por um domínio de repetição de anquirinas (ANK) nos precursores p105 e p100. RELA, RELB e c-REL contêm um domínio de transativação (TAD). RELB contém adicionalmente um motivo zíper de leucina (LZ). Enquanto a maioria dos dímeros ativa a transcrição, os dímeros p50:p50, p50:p52 e p52:p52 não possuem um TAD e, portanto, reprimem a transcrição na ausência de fatores co-ativadores. Acredita-se que os dímeros p65:RelB, c-Rel:RelB e RelB:RelB tenham ligação de DNA limitada (Retirada de CONCETTI et al., 2018).40

Figura 13 Vias de NF-κB A família de NF-κB pode ser ativada por diferentes mecanismos e, de acordo com os membros da família que estão envolvidos na ativação, dá-se a denominação da via de ativação: via canônica,

quando há ativação de RELA e NFkB1 (p50), e não-canônica, quando há ativação de RELB e NFkB2 (p52) (Retirada de VIENNOIS; CHEN; MERLIN, 2013).	42
Figura 14 Obtenção e Cultura de MEFs (A) Camundongo da linhagem C57BL/6 adulto e (B) fotomicrografia de fibroblastos embrionários murinos na terceira passagem (P3), 40X.....	49
Figura 15 hESCs em MEFs Fotomicrografias de campo claro de (A) células da linhagem H1 e (B) células da linhagem HuES-3.....	50
Figura 16 hESCs livres de MEFs Fotomicrografias de campo claro de (A) células da linhagem H1 e (B) células da linhagem HuES-3.	50
Figura 17 hESCs livres de MEFs Fotomicrografias de campo claro de (A e B) células da linhagem H9.	51
Figura 18 hESCs da linhagem H1 cultivadas sem formação de colônias Fotomicrografias de campo claro de hESCs cultivadas em monocamadas (A) pós inoculação de cultivo, (B) 24 horas, (C) 48 horas e (D) 72 horas de cultivo celular.....	52
Figura 19 Formação de corpos embrioides pela técnica de <i>Hanging Drops</i> (A) Fotografia das gotas formadas pela suspensão de células na tampa de uma placa de petri de 100 mm; (B) Fotografia das gotas invertidas no interior de uma placa de petri de 100 mm contendo PBS para evitar desidratação excessiva das gotas; (C) e (D) Fotomicrografia de campo claro dos corpos embrioides.	55
Figura 20 Padronização da Transfecção Reversa Representação esquemática da placa de 96 poços mostrando a distribuição dos reagentes de transfecção testados (Lipofectamine LTX, DharmaFECT-1 e DharmaFECT-4) e os respectivos volumes utilizados para os testes, utilizando moléculas com um controle negativo “Silencer Select Negative Control No. 1 siRNA” e como controle positivo o “siGENOME Human UBC siRNA” para se avaliar a eficiência de transfecção.	61
Figura 21 Ação da enzima Cas9 wild type A Cas9 (em amarelo) é direcionada para o DNA genômico por um gRNA consistindo uma sequência guia de 20 nt (em azul) e um scaffold (em vermelho). A sequência-guia emparelha-se com o alvo de DNA (em cinza) upstream ao motivo adjacente 5'-NGG (PAM, do inglês protospacer adjacent motif). A Cas9 causa um DSB em ~3 pb a montante da PAM (Retirada de RAN et al., 2013a).	66
Figura 22 Representação esquemática da análise dos dados obtidos por citometria de fluxo (A) Histograma individual do controle isotópico para EGFP em células não transfectadas viáveis; (B) Histograma individual representando o percentual de células transfectadas com 5 µg que expressaram EGFP; (C) Histograma individual representando o percentual de células transfectadas com 10 µg que expressaram EGFP; (D) Histograma individual representando o percentual de células transfectadas com 20 µg que expressaram EGFP. Cada amostra foi analisada com 10000 eventos.....	67
Figura 23 Ação da enzima Cas9^{D10A} nickase (Cas9n) A mutação D10A torna a Cas9n capaz de clivar apenas a cadeia complementar ao gRNA; um par de complexos gRNA-Cas9n pode cortar ambos os filamentos simultaneamente.....	69
Figura 24 Análise do bioimagem automatizado Através de imunofluorescência anti-OCT4, anti-SOX2, anti-NANOG, anti-RELA e anti-RELB e análise de bioimagem automatizado (N = 4) tivemos acesso às porcentagens de células positivas para estes marcadores bem como a localização celular dos fatores de transcrição RELA e RELB dentro das células-tronco embrionárias humanas indiferenciadas: A população celular possui uma média de positividade de 97% para OCT4, 99% para SOX2 e 96% para NANOG. RELA se encontra presente principalmente distribuído no citoplasma (5% das células apresentam no núcleo e 83% no citoplasma) celular	

enquanto RELB encontra-se bem distribuído por todo o compartimento celular e, diferentemente de RELA, encontra-se intensamente no interior do núcleo (91% das células).	75
Figura 25 Imunomarcacão para os fatores de pluripotência OCT4, SOX2 e NANOG e dos fatores de transcriçāo RELA e RELB Fotomicrografia de fluorescência da cultura de hESCs da linhagem H1 cultivadas sem formaçāo de colônias marcadas com o marcador nuclear Hoechst 33342 e anticorpos anti-OCT4, SOX2, NANOG, RELA e RELB (Escala: 100 µm).	76
Figura 26 Diferenciaçāo de hESCs Fotomicrografias de campo claro de hESCs da linhagem H1 antes da induçāo da diferenciaçāo. (A) 40X e (B) 100X.	78
Figura 27 Diferenciaçāo de hESCs Fotomicrografias de campo claro de hESCs da linhagem H1 apōs 48h e 96h de cultivo em mTeSR-1, mTeSR-1 com 5 uM atRA, DMEM/F12 e DMEM HG.	79
Figura 28 Repressāo da transcriçāo dos fatores de pluripotência durante diferenciaçāo induzida A expressāo relativa dos fatores de pluripotência foi analisada por RT-qPCR em células da linhagem H1. A análise foi realizada com a condiçāo sem tratamento (mTeSR-1) como referēncia e a normalizaçāo foi realizada utilizando o gene GAPDH. Os grāficos mostram os nıveis de expressāo mēdia dos transcritos (N = 3) de OCT4, NANOG, SOX2 e MYC nos grupos tratados e nāo tratados apōs 48 e 96 horas de cultura (** = $p < 0,005$; *** = $p < 0,0005$; **** $p < 0,00005$).	81
Figura 29 Modulaçāo da transcriçāo dos fatores de pluripotência durante diferenciaçāo espontānea A expressāo relativa dos fatores de pluripotência foi analisada por RT-qPCR em células da linhagem H1. A análise foi realizada tendo como controle corpos embriōides apōs a agregaçāo (antes de induzidos a diferenciaçāo). Os grāficos mostram os nıveis de expressāo mēdia dos transcritos (N = 3) de OCT4, NANOG, SOX2 e MYC nos grupos apōs 48 e 96 horas de cultura (** = $p < 0,005$; *** = $p < 0,0005$).	82
Figura 30 Modulaçāo da transcriçāo das subunidades da famılia de NF-κB durante a diferenciaçāo A expressāo relativa dos fatores de pluripotência foi analisada por RT-qPCR em células da linhagem H1. A análise foi realizada com a condiçāo sem tratamento (mTeSR-1) como referēncia e a normalizaçāo foi realizada utilizando o gene GAPDH. Os grāficos mostram os nıveis de expressāo mēdia dos transcritos (trēs repetiçōes) de RELA, NFKB1, RELB e NFKB2 nos grupos tratados e nāo tratados apōs 48 e 96 horas de cultura. Células indiferenciadas apresentaram nıveis baixos de expressāo de RELA e NFKB1, enquanto que as células induzidas à diferenciaçāo exibiram de maneira geral expressāo regulada positivamente destes fatores. Em contraste, RELB foi expresso em nıveis elevados em células indiferenciadas e foi regulado negativamente na diferenciaçāo. NFKB2 apresentou expressāo diferencial nāo significativa durante 48h de diferenciaçāo e elevaçāo significativa apōs 96 horas de diferenciaçāo nos meios mTeSR-1 suplementado com 5 µM atRA e DMEM <i>High Glucose</i> (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,005$; *** = $p < 0,0005$; **** $p < 0,00005$).	83
Figura 31 Modulaçāo da transcriçāo das subunidades da famılia de NF-κB durante a diferenciaçāo espontānea A expressāo relativa das subunidades da famılia de NF-κB foi analisada por RT-qPCR em células da linhagem H1. A análise foi realizada tendo como controle corpos embriōides apōs a agregaçāo (antes de induzidos a diferenciaçāo). Os grāficos mostram os nıveis de expressāo mēdia dos transcritos (N = 3) de RELA, NFKB1, RELB e NFKB2 apōs 48 e 96 horas de cultura (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,005$).	84
Figura 32 Modulaçāo da transcriçāo dos marcadores de diferenciaçāo durante diferenciaçāo espontānea A expressāo relativa dos fatores de pluripotência foi analisada por RT-qPCR em células da linhagem H1. A análise foi realizada tendo como controle corpos embriōides apōs a agregaçāo (antes de induzidos a diferenciaçāo). Os	

gráficos mostram os níveis de expressão média dos transcritos (N = 3)) de marcadores de diferenciação celular específicos dos 3 folhetos germinativos embrionários (BMP4 e VIM, ectoderme; RUNX1, mesoderme; e GATA4, endoderme) após 48 e 96 horas de cultura (** = $p < 0,005$; **** $p < 0,00005$).	85
Figura 33 Diferenciação de hESCs para a ChIP Fotomicrografias de campo claro de hESCs da linhagem H1 antes da indução da diferenciação. (A) 40X e (B) 100X.	86
Figura 34 Diferenciação de hESCs para o ChIP Fotomicrografias de campo claro de hESCs da linhagem H1 após 48h e 96h de cultivo em mTeSR-1 suplementado com penicilina/estreptomicina (1 %) e DMSO (0,05 %), representado por mTeSR-1 na imagem, e induzidas à diferenciação mTeSR-1 suplementado com penicilina/estreptomicina (1 %) e atRA (5 μ M).....	87
Figura 35 ChIP-qPCR Representação gráfica do enriquecimento relativo das regiões promotoras de OCT4, SOX2, KLF4 e MYC resultantes das imunoprecipitações anti-RELA, anti-RELB e anti-RNA Polimerase II entre as células pluripotentes e as células induzidas à diferenciação por atRA durante 96 horas analisados por qPCR.	89
Figura 36 Modulação da transcrição de RELA e RELB após o <i>knockdown</i> de RELA e RELB A expressão relativa dos transcritos para os genes RELA e RELB foi analisada por RT-qPCR após a transfecção de siRNAs anti-RELA e anti-RELB em células da linhagem H1 em 3 concentrações diferentes: 2,5 nM; 5 nM e 10 nM. Os gráficos mostram os níveis de expressão média dos transcritos (quatro repetições) de RELA e RELB após 48 horas pós-transfecção (** = $p < 0,005$; *** = $p < 0,0005$; **** $p < 0,00005$).	90
Figura 37 Modulação da transcrição de OCT4, SOX2 e NANOG o <i>knockdown</i> de RELA e RELB A expressão relativa dos transcritos para os genes OCT4, SOX2 e NANOG foi analisada por RT-qPCR após a transfecção de siRNAs anti-RELA e anti-RELB em células da linhagem H1 em 3 concentrações diferentes: 2,5 nM; 5 nM e 10 nM. Os gráficos mostram os níveis de expressão média dos transcritos (quatro repetições) de OCT4, SOX2 e NANOG após 48 horas pós-transfecção.	91
Figura 38 Efeitos do silenciamento de RELA e RELB no estado pluripotente de células-tronco embrionárias humanas da linhagem H1 I (A) Contagem e (B) área celulares relativas às células controle, que foram transfectadas com um controle negativo de siRNA, após 72h pós-transfecção (** = $p < 0,005$).	92
Figura 39 Efeitos do silenciamento de RELA e RELB no estado pluripotente de células-tronco embrionárias humanas da linhagem H1 II (A) Células OCT4 ⁺ , (B) Intensidade Média Nuclear de OCT e (C) Intensidade Média Nuclear de OCT4 ^{High} relativas às células controle, que foram transfectadas com um controle negativo de siRNA, após 72h pós-transfecção (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,005$).	92
Figura 40 RT-qPCR amostral prévio ao RNA-seq Expressão transcricional dos genes RELA e RELB resultantes dos tratamentos com siRNA após 3 dias do seu início (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,005$).	93
Figura 41 Diagrama de Venn gerado a partir das listas de genes diferencialmente expressos nos tratamentos com siRNA anti-RELA e com siRNA anti-RELB.....	95
Figura 42 Representação das vias que regulam a pluripotência gerada a partir da ferramenta DAVID com a análise dos genes regulados positivamente após <i>knockdown</i> de RELA em hESCs da linhagem H1, onde os grupos de genes (associados por suas funções biológicas na via) marcados com as estrelas vermelhas são aqueles em que um ou mais alvos tiveram expressão alterada.	97
Figura 43 Representação da via de regulação TGF-β gerada a partir da ferramenta DAVID com a análise dos genes regulados positivamente após <i>knockdown</i> de RELA em hESCs da linhagem H1, onde os grupos de genes	

(associados por suas funções biológicas na via) marcados com as estrelas vermelhas são aqueles em que um ou mais alvos tiveram expressão alterada.	98
Figura 44 Representação da via de regulação WNT gerada a partir da ferramenta DAVID com a análise dos genes regulados positivamente após <i>knockdown</i> de RELA em hESCs da linhagem H1, onde os grupos de genes (associados por suas funções biológicas na via) marcados com as estrelas vermelhas são aqueles em que um ou mais alvos tiveram expressão alterada.	99
Figura 45 Representação da via de regulação FoxO gerada a partir da ferramenta DAVID com a análise dos genes regulados positivamente após <i>knockdown</i> de RELA em hESCs da linhagem H1, onde os grupos de genes (associados por suas funções biológicas na via) marcados com as estrelas vermelhas são aqueles em que um ou mais alvos tiveram expressão alterada.	100
Figura 46 Representação das vias de vigilância do RNAm gerada a partir da ferramenta DAVID com a análise dos genes regulados positivamente após <i>knockdown</i> de RELA em hESCs da linhagem H1, onde os grupos de genes (associados por suas funções biológicas na via) marcados com as estrelas vermelhas são aqueles em que um ou mais alvos tiveram expressão alterada.	101
Figura 47 Representação das vias que regulam a formação de spliceossomos gerada a partir da ferramenta DAVID com a análise dos genes regulados positivamente após <i>knockdown</i> de RELA em hESCs da linhagem H1, onde os grupos de genes (associados por suas funções biológicas na via) marcados com as estrelas vermelhas são aqueles em que um ou mais alvos tiveram expressão alterada.	102
Figura 48 Representação das vias que regulam o ciclo celular gerada a partir da ferramenta DAVID com a análise dos genes regulados positivamente após <i>knockdown</i> de RELA em hESCs da linhagem H1, onde os grupos de genes (associados por suas funções biológicas na via) marcados com as estrelas vermelhas são aqueles em que um ou mais alvos tiveram expressão alterada.	103
Figura 49 Representação das vias que regulam o ciclo celular gerada a partir da ferramenta DAVID com a análise dos genes regulados positivamente após <i>knockdown</i> de RELA em hESCs da linhagem H1, onde os grupos de genes (associados por suas funções biológicas na via) marcados com as estrelas vermelhas são aqueles em que um ou mais alvos tiveram expressão alterada.	104
Figura 50 Representação da via de metabolismo do carbono gerada a partir da ferramenta DAVID com a análise dos genes regulados negativamente após <i>knockdown</i> de RELB em hESCs da linhagem H1, onde os grupos de genes (associados por suas funções biológicas na via) marcados com as estrelas vermelhas são aqueles em que um ou mais alvos tiveram expressão alterada.	106
Figura 51 Representação da via de metabolismo do carbono gerada a partir da ferramenta DAVID com a análise dos genes regulados negativamente após <i>knockdown</i> de RELB em hESCs da linhagem H1, onde os grupos de genes (associados por suas funções biológicas na via) marcados com as estrelas vermelhas são aqueles em que um ou mais alvos tiveram expressão alterada.	107
Figura 52 Representação da via sinalização AMPK gerada a partir da ferramenta DAVID com a análise dos genes regulados negativamente após <i>knockdown</i> de RELB em hESCs da linhagem H1, onde os grupos de genes (associados por suas funções biológicas na via) marcados com as estrelas vermelhas são aqueles em que um ou mais alvos tiveram expressão alterada.	108
Figura 53 Representação da via sinalização PI3K-AKT gerada a partir da ferramenta DAVID com a análise dos genes regulados negativamente após <i>knockdown</i> de RELB em hESCs da linhagem H1, onde os grupos de genes	

(associados por suas funções biológicas na via) marcados com as estrelas vermelhas são aqueles em que um ou mais alvos tiveram expressão alterada.	109
Figura 54 Representação da via sinalização HIF-1 gerada a partir da ferramenta DAVID com a análise dos genes regulados negativamente após <i>knockdown</i> de RELB em hESCs da linhagem H1, onde os grupos de genes (associados por suas funções biológicas na via) marcados com as estrelas vermelhas são aqueles em que um ou mais alvos tiveram expressão alterada.	110
Figura 55 Representação das vias de sinalização que controlam a endocitose celular gerada a partir da ferramenta DAVID com a análise dos genes regulados negativamente após <i>knockdown</i> de RELB em hESCs da linhagem H1, onde os grupos de genes (associados por suas funções biológicas na via) marcados com as estrelas vermelhas são aqueles em que um ou mais alvos tiveram expressão alterada.	111
Figura 56 Representação das vias de sinalização que controlam o citoesqueleto de actina gerada a partir da ferramenta DAVID com a análise dos genes regulados negativamente após <i>knockdown</i> de RELB em hESCs da linhagem H1, onde os grupos de genes (associados por suas funções biológicas na via) marcados com as estrelas vermelhas são aqueles em que um ou mais alvos tiveram expressão alterada.....	112
Figura 57 Representação das vias de sinalização que controlam o ciclo celular gerada a partir da ferramenta DAVID com a análise dos genes regulados negativamente após <i>knockdown</i> de RELB em hESCs da linhagem H1, onde os grupos de genes (associados por suas funções biológicas na via) marcados com as estrelas vermelhas são aqueles em que um ou mais alvos tiveram expressão alterada.	113
Figura 58 Representação das vias de sinalização que controlam o ciclo celular gerada a partir da ferramenta DAVID com a análise dos genes regulados negativamente após <i>knockdown</i> de RELB em hESCs da linhagem H1, onde os grupos de genes (associados por suas funções biológicas na via) marcados com as estrelas vermelhas são aqueles em que um ou mais alvos tiveram expressão alterada.	114
Figura 59 Representação das vias de sinalização que regulam a replicação do DNA gerada a partir da ferramenta DAVID com a análise dos genes regulados negativamente após <i>knockdown</i> de RELB em hESCs da linhagem H1, onde os grupos de genes (associados por suas funções biológicas na via) marcados com as estrelas vermelhas são aqueles em que um ou mais alvos tiveram expressão alterada.	115
Figura 60 Análise em gel de agarose dos produtos do ensaio T7E1 Em vermelho estão representados as populações celulares testadas com as combinações plasmidiais destinadas a edição do gene RELA e em azul estão representados as populações celulares testadas com as combinações plasmidiais destinadas a edição do gene RELB. 2P1 (A+B1), 2P2 (A+B2), 3P1 (A+B1+B2).	116
Figura 61 Sequenciamento por Sanger I Imagem obtida do alinhamento dos amplicons originários dos clones isolados de RELA (RELA +/+, como clone controle, e RELA +/-, como clone mutado) com a sequência de referência NC_000011 do gene RELA.	117
Figura 62 Sequenciamento por Sanger II Imagem obtida do alinhamento dos amplicons originários dos clones isolados de RELB (RELA +/+, como clone controle, e RELA +/-, como clone mutado) com a sequência de referência NC_000019 do gene RELB.	117
Figura 63 Modulação da transcrição de OCT4 nos clones mutados em heterozigose para os genes RELA e RELB A expressão relativa dos transcritos para os genes OCT4 foi analisada por RT-qPCR após a indução de diferenciação mediada por atRA (10 uM) por 96 horas em clones de células da linhagem H9 (** = $p < 0,005$; *** = $p < 0,0005$).	118

Figura 64 Padronização da Transfecção Reversa Representação esquemática da placa de 96 poços mostrando a distribuição dos reagentes de transfecção testados (Lipofectamine LTX, DharmaFECT 1 e DharmaFECT 4) e os respectivos volumes utilizados para os testes, utilizando moléculas com um controle negativo “Silencer Select Negative Control No. 1 siRNA” e como controle positivo o “siGENOME Human UBC siRNA” para se avaliar a eficiência de transfecção.	143
Figura 65 Toxicidade dos reagentes de transfecção Representação gráfica dos resultados obtidos da análise da contagem de células em relação ao controle (células virgens) na transfecção em H1, utilizando os reagentes de transfecção Lipofectamine LTX, DharmaFECT-1 e DharmaFECT-4 nas concentrações de 0,05; 0,075 e 0,1 µL/100 uL s.f.	144
Figura 66 Eficiência de transfecção dos reagentes Representação gráfica dos resultados obtidos da análise da viabilidade relativa obtida a partir da contagem de células transfectadas com o siRNA anti-UBC em relação ao controle (células transfectadas com o siRNA controle) na transfecção em H1, utilizando os reagentes de transfecção Lipofectamine LTX, DharmaFECT-1 e DharmaFECT-4 nas concentrações de 0,05; 0,075 e 0,1 µL/100 uL s.f.	144

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 <i>Primers para RNAm</i> Lista contendo os pares de <i>primers</i> utilizados para as reações de RT-qPCR.	57
Tabela 2 <i>Sondas TaqMan para RNAm</i> Lista contendo os códigos das sondas utilizados para as reações de RT-qPCR.	57
Tabela 3 <i>Primers para DNA</i> Lista contendo os pares de <i>primers</i> utilizados para as reações de ChIP-qPCR.....	59
Tabela 4 <i>Sequências guias</i> Lista contendo as sequências guias desenhadas <i>in silico</i> de acordo com seus alvos às quais editamos por CRISPR/Cas9.....	67
Tabela 5 <i>Sequências guias</i> Lista contendo as sequências guias desenhadas <i>in silico</i> de acordo com seus alvos às quais editamos por CRISPR.....	69
Tabela 6 Primers de DNA usados para isolar os fragmentos de DNA (<i>amplicons</i>) alvos das edições gênicas.....	70
Tabela 7 Dados gerados no RNA-seq Total de reads geradas pelo RNA-seq das amostras dos tratamentos com siRNA controle, siRNA anti-RELA e siRNA anti-RELB e quantidade de reads mapeadas contra o genoma de referência GRCh37.p13.....	94
Tabela 8 Vias biológicas detectadas pela ferramenta DAVID Na presente tabela, encontram-se descritas as vias e os genes regulados positivamente após o <i>knockdown</i> de RELA.....	96
Tabela 9 Vias biológicas detectadas pela ferramenta DAVID Na presente tabela, encontram-se descritas as vias e os genes exclusivamente regulados negativamente após o <i>knockdown</i> de RELB.	105

SUMÁRIO

1. Prólogo	22
2. Introdução.....	24
2.1. Células-tronco Humanas	25
2.1.1. Células-tronco Pluripotentes Humanas	26
2.1.1.1. Células-tronco Embrionárias Humanas	28
2.1.1.1.1. Fatores de Pluripotência	31
2.2. NF-κB	39
3. Hipótese.....	43
4. Objetivos.....	45
4.1. Objetivo geral	46
4.2. Objetivos específicos	46
5. Métodos	47
5. Cultura de células-tronco embrionárias humanas	48
5.1. Cultura com MEFs como células alimentadoras	48
5.1.1. Obtenção das MEFs.....	48
5.1.1.1. Inativação das MEFs	49
5.2. Descongelamento, cultura e congelamento de hESCs.....	49
5.2.1. Cultura de células embrionárias sem formação de colônia	51
5.3. Diferenciação de hESCs.....	54
5.3.1. Diferenciação de colônias de hESCs	54
5.3.2. Diferenciação de corpos embrióides de hESCs	54
5.4. RT-qPCR	56
5.5. ChIP-qPCR.....	58
5.6. Avaliação funcional por <i>knockdown</i> (siRNA).....	60
5.6.1. Avaliação por microscopia quantitativa multiparamétrica.....	62
5.7. Efeito do <i>knockdown</i> de RELA e RELB sobre o transcriptoma de hESCs	62

5.7.1.	<i>Knockdown</i> por siRNA	62
5.7.2.	Extração de RNA	63
5.7.3.	Preparo das bibliotecas, Clusterização e Sequenciamento	63
5.7.4.	Análise do RNA-seq	63
5.7.5.	Predição <i>in silico</i> das vias reguladas por RELA e RELB	65
5.8.	Avaliação funcional por <i>Knockout</i> (CRISPR)	65
5.8.1.	Cas9 <i>wild type</i>	65
5.8.2.	Cas9 <i>Nickase</i>	68
5.8.2.1.	Validação das construções plasmidiais	70
5.8.2.1.1.	Ensaio para detecção de mutações	70
5.8.2.2.	Transfecção, seleção e avaliação dos clones de hESCs editados	71
5.8.2.3.	Ensaio funcional dos clones gerados	72
5.9.	Testes Estatísticos	72
6.	Resultados	73
6.1.	Cultura de células-tronco embrionárias humanas	74
6.1.1.	Cultura de células embrionárias sem formação de colônia	74
6.2.	Diferenciação de hESCs	77
6.3.	ChIP-qPCR	86
6.4.	Avaliação funcional por <i>knockdown</i> (siRNA)	90
6.4.1.	Avaliação por microscopia quantitativa multiparamétrica	91
6.5.	Efeito do <i>knockdown</i> de RELA e RELB sobre o transcriptoma de hESCs	93
6.5.1.	Sequenciamento do RNA	93
6.5.2.	Predição <i>in silico</i> das vias reguladas por RELA e RELB	96
6.6.	Avaliação funcional por <i>Knockout</i> (CRISPR)	116
6.6.1.	Validação dos plasmídios em HEK	116
6.6.2.	Seleção e análise dos clones gerados	116
6.6.3.	Ensaio funcional dos clones gerados	118
7.	Discussão	119

8.	<i>Conclusão.....</i>	<i>129</i>
9.	<i>Referências Bibliográficas</i>	<i>131</i>
10.	<i>Anexos.....</i>	<i>141</i>
10.1.	<i>Padronização da transfecção de siRNA em hESCs.....</i>	<i>142</i>
11.	<i>Manuscrito</i>	<i>146</i>

1. PRÓLOGO

A família gênica NF- κ B consiste em um grupo de fatores de transcrição (FTs) que orquestram processos biológicos importantes e complexos. Se ligam à muitos promotores de genes críticos em um sistema elaborado que permite que as células se adaptem e respondam a mudanças ambientais. Além de um importante papel nas respostas imunes, essa família de FTs participa de outros processos importantes como apoptose, proliferação, diferenciação e desenvolvimento celular. Os FTs desta família podem ser ativados por diferentes mecanismos e, de acordo com os membros componentes envolvidos, é dada a denominação da via. As duas vias mais estudadas são a canônica (ou clássica) e não-canônica (ou alternativa). A via clássica resulta na translocação nuclear de vários complexos de NF- κ B, predominantemente RELA-NFKB1, onde ativará ou reprimirá a transcrição de genes alvos (SMALE, 2011). A via não-canônica, por sua vez, é representada pela ativação de RELB-NFKB2. Poucos estudos apresentaram evidências de comprometimento dos componentes das vias canônica e não-canônica de NF- κ B com a manutenção da pluripotência em células-tronco.

As células-tronco embrionárias humanas (hESCs, do inglês *human embryonic stem cells*), modelo biológico deste estudo, são células pluripotentes com elevado potencial para estudos no campo da medicina regenerativa e há um grande esforço dedicado à compreensão dos mecanismos moleculares que regulam as propriedades básicas da pluripotência. Embora muitos estudos tenham mostrado a participação de componentes canônicos e não-canônicos de NF- κ B na pluripotência e no destino celular, o papel das vias de NF- κ B nesses processos não é muito bem compreendido. Neste sentido, aqui avaliamos a relação entre os componentes da família gênica NF- κ B com a regulação de genes relacionados à pluripotência em células pluripotentes humanas.

2. INTRODUÇÃO

2.1. Células-tronco Humanas

As células-tronco representam para a humanidade desde muito tempo a mais otimista esperança de elixir da vida como uma promessa de imortalidade. Elas são capazes de dar origem aos mais variados tipos celulares de um organismo vivo. Tendo isso em mente, a comunidade científica que atua na medicina regenerativa vem depositando grande esforço para entender a biologia destas células e futuramente dominar esta poderosa ferramenta. Estas células tornam-se importantes por apresentarem, principalmente, duas características: um elevado potencial de autorrenovação e a capacidade de diferenciação para muitas células de funções de extrema importância para o perfeito funcionamento do corpo (**Figura 1**) (DE LOS ANGELES et al., 2015).

Figura 1 Células-tronco I As células-tronco de modo geral são caracterizadas pela habilidade de autorrenovação e sua capacidade de diferenciação em diferentes tipos celulares (Retirada de ARADI et al., 2011).

As células-tronco são classificadas de acordo com sua origem, em adultas e embrionárias, e de acordo com sua potencialidade, ou seja, a capacidade de gerar uma maior diversidade de células maduras diferenciadas, em totipotentes, pluripotentes, multipotentes e unipotentes (KELLY, 1977). As células totipotentes são capazes de formar o embrião, trofoblastos e anexos placentários; o exemplo mais adequado é o zigoto, que se desenvolve formando uma mórula e após cerca de 4 dias começam a se especializar e a perder parte do seu potencial de diferenciação. A mórula se desenvolve em blastocisto, que no seu interior tem um

aglomerado de células chamado de massa celular interna (ICM, do inglês *inner cell mass*) a partir do qual o embrião se desenvolve. As células da massa celular interna do blastocisto são consideradas pluripotentes e possuem a capacidade de se diferenciar em quase todas as células que surgem das três camadas germinativas. Por serem comprometidas com a formação do embrião são incapazes de dar origem à placenta e aos tecidos de suporte. Consequentemente, as células que compõem um dos três folhetos embrionários são consideradas células multipotentes, presentes na maioria dos tecidos e órgãos. Estas células são capazes de produzir uma gama limitada de linhagens celulares diferenciadas, adequadas à sua localização (por exemplo, as células-tronco hematopoiéticas que dão origem a todas as células e componentes presentes no sangue). No final da hierarquia estão as células unipotentes capazes de gerar um tipo específico de célula (por exemplo, os eritroblastos que originam apenas os eritrócitos). As células-tronco unipotentes podem ser ainda conhecidas como células progenitoras (**Figura 2**) (FOSTER et al., 2002).

Figura 2 Células-tronco II Classificação da potencialidade das células-tronco em totipotentes, pluripotentes, multipotentes e unipotentes ou progenitoras (Retirada de ARADI et al., 2011).

Neste trabalho voltamos as atenções para as células-tronco pluripotentes e suas características.

2.1.1. Células-tronco Pluripotentes Humanas

As células-tronco pluripotentes oferecem oportunidades sem precedentes para a pesquisa em biologia do desenvolvimento, descoberta de drogas e, possivelmente, para o desenvolvimento de uma nova geração de terapias celulares (WARE; NELSON; BLAU, 2006). Dentre as células-tronco pluripotentes, podemos destacar as células-tronco embrionárias,

células germinais embrionárias e células de carcinoma embrionário (**Figura 3**) (DONOVAN; GEARHART, 2001).

Figura 3 Origem das células-tronco pluripotentes humanas As células-tronco embrionárias são derivadas da massa celular interna do blastocisto embrionário; as células embrionárias germinais são derivadas de células germinativas primordiais isoladas da gônada embrionária; células de carcinoma embrionário são também derivadas de células germinativas primordiais da gônada embrionária, mas geralmente são detectadas como componentes de tumores testiculares adultos (Retirada de DONOVAN; GEARHART, 2001).

As primeiras células pluripotentes cultivadas *in vitro* foram derivadas de teratocarcinomas, um tumor com origem em células germinativas (STEVENS, 1958). Somente mais tarde foi possível isolar células pluripotentes originadas da massa celular interna de blastocistos de camundongos. As linhagens de células pluripotentes geradas foram capazes de se diferenciar *in vitro* ou dar origem a tumores contendo células representantes dos três folhetos embrionários após a inoculação em um camundongo, mantendo um cariótipo normal (EVANS; KAUFMAN, 1981). Outro grupo, no mesmo ano, conseguiu isolar e cultivar células embrionárias também murinas em meio condicionado por uma linhagem de células pluripotentes de teratocarcinoma, sugerindo que o meio condicionado poderia conter fatores de crescimento que estimula a proliferação ou inibe a diferenciação destas células (MARTIN, 1981). Este conhecimento contribuiu para o isolamento de células embrionárias derivadas também de blastocistos de primatas não-humanos (THOMSON et al., 1995) e posteriormente

de humanos com embriões doados para a pesquisa que, caso contrário, seriam descartados (THOMSON et al., 1998).

2.1.1.1. Células-tronco Embrionárias Humanas

Em laboratório, como dito anteriormente, as células-tronco embrionárias foram isoladas pela primeira vez de camundongos e, posteriormente, de primatas não-humanos e seres humanos a partir da massa celular interna (ICM) do blastocisto. Uma vez isoladas, foram capazes de se proliferar *in vitro* indefinidamente em seu estado indiferenciado (**Figura 4**) (BHARTIYA et al., 2013).

Figura 4 Estabelecimento de linhagens de células-tronco embrionárias Células-tronco embrionárias humanas são isoladas a partir de embriões pré-implantação, normalmente no estágio de blastocisto. A massa celular interna do blastocisto é isolada e propagada em co-cultivo com células alimentadoras murinas (Retirada de ARADI et al., 2011).

O termo “células-tronco embrionárias” foi introduzido para distinguir estas células pluripotentes, derivadas de embriões, das células pluripotentes de carcinoma embrionário, derivadas de teratocarcinomas. Após o isolamento das primeiras linhagens de ESCs de primatas não-humanos e humanos, com a aplicação da técnica de imunocirurgia consistente no uso de pronase com a finalidade de remover a zona pelúcida e isolar a ICM dos embriões, Thomson e seus colaboradores propuseram que as características essenciais destas células deveriam incluir (i) a derivação a partir de embriões pré-implantação ou peri-implante, (ii) proliferação indiferenciada prolongada e (iii) potencial de desenvolvimento estável para dar origem à células representantes de todas as três camadas germinativas embrionárias, mesmo após a cultura prolongada. Diferentemente das postulações feitas para células-tronco embrionárias murinas excluiu-se por motivos éticos a formação de quimeras como teste qualitativo das linhagens geradas. Naquele primeiro momento, a equipe de Thomson gerou várias linhagens de células-

tronco embrionárias humanas, entre elas três linhagens com cariótipo XY normal (a H1, por exemplo, utilizada na maioria dos experimentos que serão apresentados nesta tese) e duas linhagens com cariótipo XX normal (a H9, também utilizada como modelo biológico nesta tese, é uma delas). A partir de então postulou-se os marcadores de superfície que caracterizariam fenotipicamente as linhagens primatas não-humanas e humanas: alta atividade da telomerase, sabidamente ativa na maioria dos tecidos de origens embrionárias; presença dos antígenos de superfície celular SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60, TRA-1-81 e fosfatase alcalina, facilmente detectáveis por imunofluorescência; e ausência de um antígeno de superfície indicador de diferenciação, o SSEA-1 (THOMSON et al., 1998). Após os primeiros isolamentos de células-tronco embrionárias derivadas da ICM de embriões outras linhagens foram estabelecidas de embriões em estágios morulares bem como obtidas também a partir de blastômeros isolados, mesmo que esses blastômeros tivessem que ser cultivados em grupos para sobreviver (STRELCHENKO et al., 2004; CHUNG et al., 2006; SKOTTMAN; HOVATTA, 2006). Além dos procedimentos de isolamentos padrão várias estratégias alternativas para derivar células-tronco embrionárias humanas foram propostas e realizadas (**Figura 5**). Esses métodos alternativos de geração oferecem diversas vantagens que superam problemas fundamentais relacionados a derivação destas linhagens (KAO et al., 2008).

A. Normal ESC derivation

B. Single blastomere ESC derivation

C. SCNT ESC derivation

Figura 5 Métodos para derivação de células-tronco embrionárias humanas (A) Derivação de hESCs pelo método convencional, onde as linhagens são derivadas de blastocistos humanos pré-implantados produzidos por fertilização in vitro havendo a necessidade do uso do embrião completo. (B) As linhagens também podem ser derivadas de blastômeros individuais biopsiados a partir de embriões em estágio de 8 células. (C) Geração de linhagens através da transferência nuclear de células somáticas (SCNT), que são fundidas ou diretamente injetadas em oócitos enucleados para formar blastocistos subsequentemente usados para derivação de ESC pelo método convencional (Retirada e adaptada de KAO et al., 2008).

2.1.1.1.1. Fatores de Pluripotência

A elucidação dos mecanismos celulares e moleculares que controlam a pluripotência e a autorrenovação das hESCs pode levar ao tratamento de uma ampla gama de condições humanas decorrentes da perda ou mau funcionamento de tipos celulares específicos. Além disso, esse conhecimento também contribui para a compreensão dos mecanismos subjacentes à diferenciação celular e ao desenvolvimento inicial de órgãos e tecidos (KAO et al., 2008). Sabe-se que as células-tronco embrionárias necessitam de fatores de crescimento extrínsecos para manter sua pluripotência em cultura, e que esses fatores atuam em diferentes vias de sinalização para regular redes de FTs intrínsecos mantendo estas células no estado indiferenciado (NAT; EIGENTLER; DECHANT, 2013).

As vias de sinalização extrínsecas necessárias para manter a pluripotência em células-tronco embrionárias de camundongos (mESCs, do inglês *mouse embryonic stem cells*) são diferentes daquelas em hESCs. Ao contrário das mESCs, que por muito tempo foram mantidas com meios de cultura contendo soro suplementado com LIF até que se descobriu que o Bmp4 poderia substituir o soro para manter a sua autorrenovação (**Figura 6**), as hESCs são convencionalmente mantidas em meios de cultura suplementados com bFGF e Activina A (**Figura 7**) (CHEN; LAI, 2014; ZHAO; JIN, 2017).

Figura 6 Resumo esquemático das vias de sinalização que controlam a autorrenovação e a diferenciação de mESCs As vias de sinalização Lif/Stat3, Bmp e Wnt/b-catenina mantêm a autorrenovação, enquanto as vias de sinalização Fgf/Erk e calcineurina/NFAT promovem diferenciação. A via de sinalização PI3K/Akt ativada por pStat3 protege a auto-renovação via inibição das atividades de Erk e aprimora o sinal Wnt. Linhas tracejadas indicam as interações indiretas entre dois componentes. Linhas verdes e linhas vermelhas indicam ativação e inibição, respectivamente. Círculos amarelos indicam sinais extracelulares. Círculos vermelhos indicam os fatores relacionados à transcrição que regulam a atividade de cada via de sinalização. Círculos azuis indicam os componentes das vias de sinalização (Retirada de ZHAO; JIN, 2017).

Figura 7 Resumo esquemático das vias de sinalização que controlam a autorrenovação e a diferenciação de hESCs A via de sinalização FGF/ERK e a via de sinalização Activin A/SMAD2,3 são críticas para a autorrenovação, enquanto o sinal BMP impulsiona a diferenciação em sentido às linhagens primitivas e trofoblasto. O papel da sinalização WNT na decisão do destino celular das hESCs é complicado. É possível que b-catenina possa promover a diferenciação atuando em conjunto com alguns co-fatores (por exemplo, TCF/LEF) e mantenha a autorrenovação aumentando o sinal de PI3K/AKT. Linhas tracejadas indicam interações indiretas entre dois componentes. A linha grossa indica o maior efeito a jusante. Linhas verdes e linhas vermelhas indicam ativação e inibição, respectivamente. Círculos amarelos indicam sinais extracelulares. Círculos vermelhos indicam os fatores relacionados à transcrição que regulam a atividade de cada via de sinalização. Círculos azuis indicam os componentes das vias de sinalização (Retirada de ZHAO; JIN, 2017).

As hESCs são ainda caracterizadas por mecanismos moleculares intrínsecos que sustentam a autorrenovação e suprimem a diferenciação, ao mesmo tempo em que mantêm genes-chave de diferenciação em um estado silenciado, ainda "equilibrado", que reflete seu incipiente potencial de desenvolvimento. Um conjunto selecionado de fatores essenciais de transcrição em combinação controla e define assim a pluripotência: OCT4 (também conhecido como POU5F1), SOX2 e NANOG, principalmente. OCT4 e NANOG são designados como fatores centrais de transcrição baseados em seu padrão específico de expressão em células pluripotentes e embriões e no rastreo genético que identifica seu papel essencial no estabelecimento da pluripotência em camundongos e humanos (DE LOS ANGELES et al., 2015). OCT4 funciona como um heterodímero com SOX2, colocando SOX2 entre os principais reguladores. NANOG co-localiza-se extensivamente com o OCT4 e SOX2 em todo o genoma das células pluripotentes humanas. Enquanto estes três principais fatores de transcrição definem e controlam a pluripotência, em circunstâncias especiais, as células pluripotentes podem tolerar a perda de SOX2 ou NANOG ou a substituição com outros fatores, sugerindo uma certa flexibilidade no controle de pluripotência. Entre os principais fatores de transcrição, OCT4 provou ser mais indispensável e continua sendo o fator de pluripotência mais relevante. OCT4, SOX2 e NANOG se ligam aos seus próprios promotores, se autorregulando (**Figura 8**) (BOYER et al., 2005). Eles ativam uma fração substancial de genes que codificam proteínas, miRNA e RNA não codificadores em células-tronco embrionárias além de ocupar genes que codificam reguladores linhagens-específicos. Os promotores de muitos reguladores apresentam tanto marcas de histonas ativas (H3K4me3) quanto repressivas (H3K27me3), um estado bivalente pensado para facilitar a ativação de genes de desenvolvimento ao sair da pluripotência. Esta capacidade de ativar os genes necessários para manter a pluripotência enquanto reprimem os reguladores que especificam o destino celular é responsável principalmente pela característica dupla de autorrenovação e diferenciação (**Figura 9**) (BERNSTEIN et al., 2006).

A

B

Figura 8 Motivos Regulatórios Transcricionais em Células-tronco Embrionárias Humanas (A) Exemplo de circuito regulador de transcrição *feedforward* em hESCs. Os reguladores são representados por círculos azuis; promotores de genes são representados por retângulos vermelhos. A ligação de um regulador a um promotor é indicada por uma seta sólida. Os genes que codificam os reguladores estão ligados aos seus respectivos reguladores por setas tracejadas. (B) A malha de auto-regulação interconectada formada por OCT4, SOX2 e NANOG (Retirada de BOYER et al., 2005).

Figura 9 Rede regulatória transcritorial principal em hESCs Modelo da rede central de regulação transcritorial construído pela identificação de genes alvo de OCT4, SOX2 e NANOG que codificam fatores de transcrição e reguladores de cromatina, além do conhecimento de integração das funções desses reguladores *downstream* na comparação com conjuntos de dados de expressão múltipla e na literatura. Um subconjunto de genes ativos e inativos co-ocupados pelos três fatores em hESCs é mostrado aqui. Reguladores são representados por círculos azuis; promotores de genes são representados por retângulos vermelhos; caixas cinzas representam genes alvos putativos *downstream*. A regulação positiva foi assumida se o gene alvo foi expresso, enquanto a regulação negativa foi assumida quando o gene alvo não foi transcrito (Retirada de BOYER et al., 2005).

Com o conhecimento de que células somáticas podem ser reprogramadas a estágios de pluripotência através de fusão celular com oócitos (**Figura 10A**) (WILMUT et al., 1997) ou com células-tronco embrionárias (**Figura 10B**) (COWAN et al., 2005), bem como o conhecimento de como as redes de regulação intrínsecas regulam a pluripotência, Yamanaka e Takahashi levantaram a hipótese de que um pequeno conjunto de genes nestas células indiferenciadas seria capaz de reverter o estado diferenciado de uma célula madura reprogramando-a de forma a atingirem um estado de pluripotência induzida. Testando 24 possíveis fatores de pluripotência, eles provaram que células-tronco pluripotentes induzidas (iPSCs, do inglês *induced pluripotent stem cells*) podem ser geradas a partir de células somáticas de camundongos e humanos pela transfecção retroviral de um pequeno número de genes: OCT4, SOX2, MYC e KLF4 (**Figura 11**) (TAKAHASHI; YAMANAKA, 2006; TAKAHASHI et al., 2007).

Apesar da grande proximidade funcional e morfológica entre hESCs e hiPSCs, os mecanismos moleculares que direcionam a indução da pluripotência celular ainda não estão muito bem esclarecidos. Alguns estudos, muitos deles contraditórios, têm mostrado a participação de fatores de transcrição componentes da via canônica (RELA e NFKB1) e não-canônica (RELB e NFKB2) de NF- κ B na manutenção da pluripotência. O primeiro trabalho que propôs mostrar uma relação entre os genes da família de NF- κ B com a pluripotência relacionou a via canônica de NF- κ B como importante da manutenção do estado indiferenciado das células pluripotentes (ARMSTRONG et al., 2006a) e nos anos posteriores surgiram trabalhos mostrando que a via canônica agia de maneira pró-diferenciação atribuindo à via não-canônica de NF- κ B um papel importante na manutenção da pluripotência (YANG et al., 2010; LÜNINGSCHRÖR; KALTSCHMIDT; KALTSCHMIDT, 2012).

Figura 10 Reprogramação nuclear à pluripotência I (A) Na transferência nuclear o núcleo de uma célula somática (2n) é transplantado para um oócito anucleado. No ambiente do ovócito, o núcleo da célula somática é reprogramado para que as células derivadas dele sejam pluripotentes. A partir deste oócito, um blastocisto é gerado, a partir do qual as linhas de células-tronco embrionárias são derivadas na cultura de tecidos. (B) Na fusão celular dois tipos distintos de células são combinados para formar uma única entidade. As células fundidas resultantes podem ser heterocariontes (de curta longevidade e não se dividem) ou híbridas (que proliferam mas, na divisão, os núcleos se fundirão para se tornarem 4n ou maior; se as células forem derivadas da mesma espécie, seu cariótipo permanecerá euploide; se forem de espécies diferentes, serão aneuploides, pois os cromossomos serão perdidos e rearranjados) (Reritada e adaptada de YAMANAKA; BLAU, 2010).

Figura 11 Reprogramação nuclear à pluripotência II Para gerar hiPSCs as células somáticas adultas são transduzidas (ou transfectadas) com vetores que codificam quatro fatores de pluripotência (SOX2, KLF4, c-MYC e OCT4). As iPSCs totalmente reprogramadas possuem propriedades semelhantes às células-tronco embrionárias: são competentes para formar teratomas com a injeção em camundongos, são capazes de gerar progênie quando injetadas em embriões viáveis e podem então ser induzidas a sofrer diferenciação em vários tipos de células somáticas, todas com a mesma informação genética do doador de origem (Retirada e adaptada de YAMANAKA; BLAU, 2010).

2.2. NF- κ B

O fator de transcrição NF- κ B (especificamente RELA) foi descoberto em 1986 como um fator nuclear que se ligava ao *enhancer* da cadeia leve da imunoglobulina kappa de células B ativadas (portanto denominado NF- κ B) (SEN; BALTIMORE, 1986). Hoje em dia sabe-se que NF- κ B é uma família gênica formada por um grupo de genes que orquestram processos biológicos complexos, principalmente a resposta inflamatória. Desde sua descoberta a família de NF- κ B tem sido relacionada a uma ampla variedade de processos normais e patológicos. Estes anos de pesquisa demonstraram que seus componentes são expressos em quase todos os tipos de células e tecidos, e que locais específicos de ligação de NF- κ B estão presentes nos promotores de muitos genes. Os fatores de transcrição de NF- κ B são cruciais em um elaborado sistema que permite que as células se adaptem e respondam às mudanças ambientais, um processo essencial à sobrevivência. Um grande número de estímulos externos leva à ativação desta via e dos genes cuja expressão é regulada por ela desempenhando papéis importantes e conservados em respostas imunes e em outros processos importantes como apoptose, proliferação, diferenciação e desenvolvimento celular (OECKINGHAUS; GHOSH, 2009).

A família de NF- κ B, em mamíferos, consiste em cinco proteínas: RELA (p65/NF κ B), RELB, c-REL, NFKB1 (p105/p50) e NFKB2 (p100/p52) (MITCHELL; VARGAS; HOFFMANN, 2016). Em contraste com os outros membros da família, NFKB1 e NFKB2 são sintetizados como pró-formas (p105 e p100, respectivamente) e depois processados proteoliticamente para p50 e p52, respectivamente (HOESEL; SCHMID, 2013). As proteínas pertencentes à família de NF- κ B são caracterizadas pela presença de um domínio homólogo de Rel (RHD, do inglês *Rel homology domain*) de 300 aminoácidos conservados evolutivamente que está localizado próximo a porção N-terminal da proteína que é responsável pela dimerização, interação com os I κ Bs (Inibidores de κ Bs) e ligação ao DNA nas regiões conhecidas como sítios κ B (HAYDEN; GHOSH, 2004). Todos os cinco membros dessa família de proteínas podem formar uma variedade de homo ou heterodímeros submetidos a fosforilação e outras modificações pós-traducionais, que são essenciais para sua ativação, *crosstalk* e translocação para o núcleo onde eles se ligam a regiões alvo regulando uma variedade de genes (WONG et al., 2011). Através de associações combinatórias, os membros desta família de proteínas podem formar até 15 dímeros diferentes (**Figura 12**) (SHIH et al., 2011). Ainda que não tenha sido demonstrada a existência fisiológica e relevante para todos os possíveis complexos diméricos alguns heterodímeros são bastante conhecidos, por exemplo,

RELA:NFKB1, que representa o mais abundante dos dímeros da família, sendo encontrado em quase todos os tipos de células. Na maioria das células quiescentes, estes dímeros estão ligados a moléculas inibitórias da família de proteínas IκB (inibidores do NF-κB). Estas proteínas são caracterizadas por repetições de anquirina, que se associam aos domínios de ligação ao DNA dos fatores de transcrição tornando-os transcricionalmente inativos. p105 e p100 (precursores de p50 e p52, contêm repetições de anquirina semelhantes funcionando como seus próprios inibidores internos e que são clivadas durante a maturação (**Figura 12**) (HOESEL; SCHMID, 2013). Os dímeros de p50 e p52 não contêm um domínio de transativação que pode se ligar aos promotores dos genes alvo da família de NF-κB e atuam como repressores transcricionais (HAYDEN; GHOSH, 2012) porém quando p50 ou p52 estão ligados a um membro da família com domínio de transativação, como RELA ou RELB, eles atuam como ativadores transcricionais. As variações dos contextos em que os dímeros são formados são enormes (OECKINGHAUS; GHOSH, 2009).

Figura 12 Proteínas da família de NF-κB e combinações diméricas Todas as subunidades contêm um domínio de homologia Rel (RHD). NFKB1 e NFKB2 possuem uma região rica em glicina (GRR), seguida por um domínio de repetição de anquirinas (ANK) nos precursores p105 e p100. RELA, RELB e c-REL contêm um domínio de transativação (TAD). RELB contém adicionalmente um motivo zíper de leucina (LZ). Enquanto a maioria dos dímeros ativa a transcrição, os dímeros p50:p50, p50:p52 e p52:p52 não possuem um TAD e, portanto, reprimem a transcrição na ausência de fatores co-ativadores. Acredita-se que os dímeros p65:RelB, c-Rel:RelB e RelB:RelB tenham ligação de DNA limitada (Retirada de CONCETTI et al., 2018).

A família de NF- κ B pode ser ativada por diferentes mecanismos e de acordo com os membros da família que estão envolvidos na ativação da via, dá-se a denominação da via de ativação (**Figura 13**). As duas mais estudadas são a via canônica (ou clássica) e a via não-canônica (ou alternativa). A via canônica de NF- κ B é induzida por citocinas como TNF α (do inglês *tumor necrosis factor alpha*), IL-1 (do inglês *interleukin 1*) e LPS (do inglês *lipopolysaccharide*) e é ativada através da degradação de I κ Bs (Inibidores de κ Bs), principalmente I κ B α , que resulta na translocação nuclear de vários complexos de NF- κ B, predominantemente do dímero RELA-NFKB1. A degradação de I κ B α é mediada através da sua fosforilação pela quinase I κ B (IKK), um complexo trimérico composto por duas subunidades catalíticas, IKK α e IKK β , e uma subunidade reguladora, IKK γ (ou NEMO, modulador essencial de NF κ B), que leva a ubiquitinação de I κ B α e subsequente degradação pelo proteossoma 26S. O complexo RELA-NFKB1 se torna livre para se translocar até o núcleo e ativar ou reprimir a transcrição dos genes alvos (SMALE, 2011). A via não-canônica de NF- κ B, por sua vez, é representada pela ativação do heterodímero RELB:NFKB2 através de um mecanismo complexo que depende do processamento de p100 em vez de degradação de I κ B α . Dentro deste contexto, p100 funciona como uma molécula semelhante a I κ B, preferencialmente inibindo a translocação nuclear de RELB (SOLAN et al., 2002). A ativação de IKK α através de NIK (quinase indutora de NF κ B) após o estímulo de citocinas leva a formação do complexo NIK:IKK α :p100 que resulta na fosforilação da subunidade p100, que é processada à p52 (NFKB2) pelo proteossoma 26S, ativando o complexo RELB:NFKB2 (SMALE, 2011; VIENNOIS; CHEN; MERLIN, 2013).

Possivelmente, as contradições encontradas na literatura a respeito dos papéis das vias canônica e não-canônica de NF- κ B sobre a pluripotência celular se devem ao fato de que muitos dos estudos realizados não levavam em consideração que estas vias, apesar de pertencerem a mesma família gênica, são ativadas e inibidas de maneiras e em momentos celulares distintos podendo atuar na regulação gênica opostamente. Muitos dos ensaios realizados nestes estudos, principalmente os primeiros que surgiram dentro desta temática, ignoravam o papel da via não-canônica de NF- κ B e muitas vezes até a sua existência dentro do contexto genético das células-tronco pluripotentes. No presente trabalho, foram utilizadas abordagens modernas e sempre levando em consideração o papel de cada via de forma específica nos processos que regulam a pluripotência das células-tronco embrionárias humanas levando à conclusão de que, no modelo aqui apresentado, há um papel importante da via canônica de NF- κ B no processo de transição de um estado indiferenciado celular para o início da diferenciação enquanto a via não-canônica de NF- κ B encontra-se comprometida com processos fundamentais para a manutenção da

pluripotência, bem como processos relacionados com o controle do ciclo celular e sobrevivência das células embrionárias humanas.

Figura 13 Vias de NF-κB A família de NF-κB pode ser ativada por diferentes mecanismos e, de acordo com os membros da família que estão envolvidos na ativação, dá-se a denominação da via de ativação: via canônica, quando há ativação de RELA e NFκB1 (p50), e não-canônica, quando há ativação de RELB e NFκB2 (p52) (Retirada de VIENNOIS; CHEN; MERLIN, 2013).

3. HIPÓTESE

As vias canônica e não-canônica de NF- κ B possuem papéis opostos na manutenção da pluripotência de células-tronco embrionárias humanas.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo geral

Investigar os papéis das vias canônica e não-canônica de NF- κ B na pluripotência de hESCs.

4.2. Objetivos específicos

- Avaliar a modulação transcricional dos fatores de transcrição das vias canônica e não-canônica de NF- κ B no processo de indução de diferenciação em hESCs indiferenciadas;
- Avaliar a ocupação dos fatores de transcrição das vias canônica e não-canônica de NF- κ B em regiões de regulação da transcrição de fatores de pluripotência em hESCs indiferenciadas e após indução de diferenciação;
- Avaliar as alterações fenotípicas resultantes da supressão das vias canônica e não-canônica de NF- κ B em hESCs indiferenciadas;
- Avaliar a modulação transcricional global decorrente da supressão das vias canônica e não-canônica de NF- κ B em hESCs indiferenciadas.

5. MÉTODOS

5. Cultura de células-tronco embrionárias humanas

Para a execução deste trabalho, foi proposto o uso da linhagem HuES-3 (Harvard Stem Cell Institute), porém durante o desenvolvimento do projeto surgiu a possibilidade de também trabalharmos com mais duas linhagens de hESCs: a linhagem H1 (WiCell Research Institute), a primeira linhagem a ser isolada, cultivada e expandida em laboratório por Thomson em 1998, e a H9 (WiCell Research Institute). Estas 3 linhagens estavam armazenadas no banco de célula da Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto e foram criopreservadas quando cultivadas em co-cultivo com MEFs (do inglês *murine embryonic fibroblasts*), no caso da H1 e da HuES-3, e em culturas livres de MEFs, no caso da H9. Sendo assim, no banco de células criado para uso durante o desenvolvimento do projeto foram utilizadas estas duas maneiras distintas de fazer o cultivo das hESCs: utilizando MEFs e uma posterior adaptação para cultura livre de células alimentadoras a qual faz uso de matrizes extracelulares comerciais para cultivo das células pluripotentes. O método livre de células alimentadoras ainda foi realizado de duas formas: convencional, por meio do cultivo e passagem celular em forma de colônias, e em forma de cultura em monocamadas com passagem enzimática das células, não havendo aqui a formação de colônias e implicando em uma maior expansão destas células que garantia uma maior estabilidade da identidade pluripotente e um maior escalonamento das células necessário para muitos dos ensaios moleculares e funcionais aqui aplicados.

5.1. Cultura com MEFs como células alimentadoras

5.1.1. Obtenção das MEFs

Para a criação do banco celular de MEFs deste projeto foram utilizados a linhagem de camundongo C57BL/6 (**Figura 14A**). Entre os dias 13.5 e 14.5 de gestação a fêmea foi eutanasiada e foram obtidos 7 embriões que foram limpos para a retirada dos anexos embrionários, órgão vermelhos (como coração e fígado) e cabeça. A porção que restou dos embriões foi então lavada com da PBS e dissociada com 15 mL de TrypLE Express (Thermo Fisher Scientific) durante 15 minutos a 37°C. Após a inativação da reação de dissociação com 3 vezes o volume da TrypLE Express de meio basal de cultura, a suspensão celular foi centrifugada à 200 G durante 10 minutos, lavada mais uma vez com PBS, re-centrifugada e colocada em garrafas previamente tratadas com gelatina a 1% (Sigma-Aldrich) e cultivadas com meio DMEM *High Glucose* (Thermo Fisher Scientific) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (HyClone, GE Healthcare), 1% de GlutaMAX (Thermo Fisher Scientific) e 1% de

penicilina-estreptomicina (Thermo Fisher Scientific). Esta etapa foi realizada independentemente para cada embrião com a intenção de manter uma isogenia das linhagens primárias de MEFs utilizadas para expansão das células pluripotentes. As células foram cultivadas até a 3ª passagem (**Figura 14B**), congeladas em uma solução de Soro Fetal Bovino (HyClone, GE Healthcare) com 10% de DMSO (Sigma-Aldrich) e armazenadas para uso de acordo com a necessidade.

Figura 14 Obtenção e Cultura de MEFs (A) Camundongo da linhagem C57BL/6 adulto e (B) fotomicrografia de fibroblastos embrionários murinos na terceira passagem (P3), 40X.

5.1.1.1. Inativação das MEFs

Para uso das MEFs como células alimentadoras, o cultivo foi realizado até as células atingirem 80% de confluência, posteriormente foram inativadas para que o crescimento celular cessasse e todo o metabolismo basal da célula fosse preservado. A inativação foi realizada com meio de cultura suplementado com 10 µg/mL de Mitomicina C (Sigma-Aldrich) durante no mínimo 3 horas. Após a inativação, as células foram lavadas duas vezes com meio sem Mitomicina C e desta forma estavam aptas para receber as hESCs.

5.2. Descongelamento, cultura e congelamento de hESCs

Vials das linhagens de hESCs H1 e HuES-3 foram descongelados e co-cultivadas com MEFs previamente inativadas em meio composto por *KnockOut* DMEM (Thermo Fisher Scientific) suplementado com 1% de penicilina-estreptomicina (Thermo Fisher Scientific), 1% de GlutaMAX (Thermo Fisher Scientific), 1% de Aminoácidos Não-essenciais/NEAA (Thermo Fisher Scientific), 0,1 % de 2-mercaptoetanol (Thermo Fisher Scientific), 10 % de substituinte de soro/KOSR (Thermo Fisher Scientific) e 10 ng/mL de 2-FGF (Thermo Fisher Scientific). O

meio foi trocado diariamente e as passagens foram feitas manualmente em um microscópio invertido mantido sob condições estéreis dentro de um fluxo horizontal.

Figura 15 hESCs em MEFs Fotomicrografias de campo claro de (A) células da linhagem H1 e (B) células da linhagem HuES-3.

As colônias das linhagens H1 e HuES-3 (**Figura 15**) foram fragmentadas manualmente e, foi feita a adaptação das células para culturas livres de MEFs: fragmentos de colônias foram cultivadas nos meios mTeSR-1 (Stem Cell Technologies) ou Essential 8 (Thermo Fisher Scientific) em placas de cultura previamente tratadas com Matrigel (Corning) ou Geltrex (Thermo Fisher Scientific). O meio foi trocado todos os dias. Ao atingir a confluência desejada, entre 60 e 80%, foi realizada a passagem celular utilizando uma solução de PBS e EDTA a 0,5 mM, a qual após 5 minutos de contato com as colônias de hESCs fragmentava-as em pequenos agregados de células e estes eram postos em cultura até a passagem seguinte (**Figura 16**).

Figura 16 hESCs livres de MEFs Fotomicrografias de campo claro de (A) células da linhagem H1 e (B) células da linhagem HuES-3.

Vials da linhagem de hESCs H9 (**Figura 17**) foram descongelados e as células foram cultivadas nos meios mTeSR-1 (Stem Cell Technologies) ou Essential 8 (Thermo Fisher Scientific) como descrito anteriormente para as linhagens H1 e HuES-3 adaptadas para uma condição livre de células alimentadoras.

Figura 17 hESCs livres de MEFs Fotomicrografias de campo claro de (A e B) células da linhagem H9.

As células cultivadas em MEFs foram congeladas utilizando uma solução de KSR (do inglês *Knock-out Serum Replacement*; Thermo Fisher Scientific) com 10% de DMSO (Sigma-Aldrich) enquanto as células cultivadas sem o auxílio de MEFs foram congeladas utilizando uma solução de mTeSR-1 ou Essential 8 suplementado com inibidor de Rock/Y-27632 a 10 µM (Tocris Bioscience) e 10% de DMSO (Sigma-Aldrich).

5.2.1. Cultura de células embrionárias sem formação de colônia

Para esta metodologia de cultivo foi necessário que as células fossem adaptadas à passagem enzimática, utilizando Accutase (Thermo Fisher Scientific) por 10 minutos a 37°C. A suspensão de células desagregadas foi diluída com o meio basal de cultivo, centrifugada a 200 G por 5 minutos, ressuspendidas em mTeSR-1 suplementado com inibidor de Rock/Y-27632 a 10 µM e 1% de penicilina-estreptomicina (Thermo Fisher Scientific), contadas e plaqueadas em um poço de uma placa de 6 poços previamente tratada com Matrigel (Corning) ou Geltrex (Thermo Fisher Scientific) na densidade de $1,5 \times 10^5$ a 2×10^5 células por cm². O meio era trocado diariamente com mTeSR-1 sem inibidor de Rock até atingir 100% de confluência (**Figura 18D**). Após esta etapa as células foram desagregadas com Accutase e plaqueadas sempre numa passagem de 1:3 em placas de 6 poços previamente tratada com

Matrigel ou Geltrex. Desta forma, foi estabelecido uma metodologia alternativa de cultura das células-tronco embrionárias humanas que foram utilizadas no decorrer do projeto.

Figura 18 hESCs da linhagem H1 cultivadas sem formação de colônias Fotomicrografias de campo claro de hESCs cultivadas em monocamadas (A) pós inoculação de cultivo, (B) 24 horas, (C) 48 horas e (D) 72 horas de cultivo celular.

Ainda foi realizada uma caracterização imunofenotípica das hESCs cultivadas em monocamadas. Para isso, foi utilizada como fixador uma solução de formol (2%) em metanol (MeOH) gelado. Previamente foi retirado o meio de cultura da placa e, em seguida, foram realizadas duas lavagens com PBS (100 uL). A solução fixadora gelada foi adicionada (100 uL) e a placa de cultura foi mantida à -20°C por 20 minutos. Após este período, foram adicionados sobre o fixador mais 100 uL de PBS. A mistura PBS/MeOH foi retirada logo em seguida e as células foram lavadas por mais duas vezes com 100 uL de PBS. As etapas seguintes foram de *quenching* com glicina (0,1 M por 15 minutos) e bloqueio (30 minutos em PBS/SBF 1%). Após, as células foram marcadas com anticorpos primários anti-OCT4 (sc-9081, Santa Cruz Biotechnology), anti-SOX2 (D6D9, Cell Signaling Technology), anti-NANOG (AB5731, Merck Millipore), anti-RELA (sc-8008, Santa Cruz Biotechnology) e anti-RELB (sc-226, Santa

Cruz Biotechnology) nas concentrações 1 µg/mL, 2 µg/mL, 500 µg/mL, 1 µg/mL e 2 µg/mL, respectivamente. A marcação com o anticorpo primário foi realizada utilizando-se 40 µL/poço de uma solução contendo os anticorpos diluídos em solução de bloqueio (PBS/SBF 1%), seguida de uma incubação *overnight*. Finalizada a marcação com o anticorpo primário, os poços foram lavados por três vezes com PBS e, em seguida, foram adicionados 40 µL/poço de uma solução de anticorpo secundário marcado com DyLight 594. Esta mesma solução já continha o marcador nuclear Hoechst 33342. As placas foram incubadas com esta solução no escuro, por 45 minutos e, acabado este período, foram realizadas três lavagens com PBS (100 µL). Por fim, foram mantidos 100 µL de PBS por poço e as placas foram levadas ao equipamento de *High Content Screening* para a aquisição das imagens.

5.3. Diferenciação de hESCs

Uma vez que o banco de hESCs estava formado, partimos para a padronização dos experimentos de diferenciação que deu base para os ensaios aqui apresentados. Durante a fase de padronização foram adotadas duas formas de indução de diferenciação. A primeira representada pela indução de diferenciação utilizando-se meios indutores de diferenciação ou que continham agentes indutores, em cultura celular de duas dimensões (colônias planas); e a segunda representada por uma diferenciação espontânea de estruturas celulares tridimensionais, os corpos embrióides, em um meio indutor de diferenciação.

5.3.1. Diferenciação de colônias de hESCs

Testamos 3 meios indutores de diferenciação comparando-os à condição basal de cultivo. Os meios utilizados foram: (1) mTeSR-1 acrescido de 1% de penicilina-estreptomicina (Thermo Fisher Scientific), como controle; (2) mTeSR-1 com 1% de penicilina-estreptomicina (Thermo Fisher Scientific) e 5 μ M de *all-trans retinoic acid* (atRA) (Sigma-Aldrich); (3) DMEM/F12 (Thermo Fisher Scientific) com 1% de penicilina-estreptomicina (Thermo Fisher Scientific) e 20% de Soro Fetal Bovino (HyClone, GE Healthcare) não inativado; e (4) DMEM *High Glucose* (Thermo Fisher Scientific) com 1% de penicilina-estreptomicina (Thermo Fisher Scientific) e 15% de Soro Fetal Bovino (HyClone, GE Healthcare) inativado. Como o atRA foi diluído em DMSO todos os outros meios foram suplementados com uma quantidade equivalente de DMSO presente no meio suplementado com atRA, que foi de 0,05%.

5.3.2. Diferenciação de corpos embrióides de hESCs

Para a realização da diferenciação em formato de corpos embrióides, as células foram inicialmente cultivadas em monocamadas. Os corpos embrióides foram formados pela metodologia de *Hanging Drops*, a qual permite que células previamente desagregadas por um método enzimático se unam pela força da gravidade no interior de gotas invertidas na superfície de uma tampa de uma placa de petri comum (**Figura 19A e 19B**). Os corpos embrióides foram formados por gotas de 25 μ L de meio basal mTeSR-1 suplementado com inibidor de Rock a 10 μ M contendo 10000 células (**Figuras 19C e 19D**). Após 48 horas sob inversão parte dos corpos embrióides foram transferidos para coleta de RNA totais e outra para placas de 6 poços previamente tratados com Agarose a 1% (Thermo Fisher Scientific) para manter uma baixa

aderência e evitar que os corpos embrióides aderissem à superfície das placas para assim ser iniciado o processo de diferenciação espontânea.

Figura 19 Formação de corpos embrióides pela técnica de *Hanging Drops* (A) Fotografia das gotas formadas pela suspensão de células na tampa de uma placa de petri de 100 mm; (B) Fotografia das gotas invertidas no interior de uma placa de petri de 100 mm contendo PBS para evitar desidratação excessiva das gotas; (C) e (D) Fomomicrografia de campo claro dos corpos embrióides.

5.4. RT-qPCR

Após 48 e 96 horas de diferenciação extraímos o RNA total pelo método de TRIzol LS (Thermo Fisher Scientific), como descrito pelo fabricante e quantificado em um espectrofotômetro Nanodrop 1000 (Thermo Fisher Scientific). Prosseguimos com a transcrição reversa de RNAm utilizando 1 µg de RNA total com o kit High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific). A fim de analisarmos a expressão relativa dos genes relacionados com a pluripotência celular (OCT4, NANOG, SOX2 e MYC) e dos componentes da família gênica NF-κB, alvos dos nossos estudos (RELA, NFKB1, RELB e NFKB2). As reações de amplificação foram realizadas num sistema *7500 Real Time PCR ABI Prism Sequence Detection System* (Applied Biosystems). Como normalizador foi utilizado o gene GAPDH referente a cada condição celular. As reações foram realizadas em duplicatas em placas de 96 poços sob as condições previamente padronizadas utilizando amostras de cDNA (20 ng por reação). Os dados obtidos foram então exportados para planilhas do software Excel (Microsoft), onde foram realizados os cálculos matemáticos para as análises dos dados. Após a obtenção destes valores, foram realizados os cálculos para determinação da expressão relativa baseadas na fórmula $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (PFAFFL, 2001). Os *primers* utilizados foram desenhados pelo software PrimerQuest Tool (Integrated DNA Technologies) e estão representados na **Tabela 1**. Na indução de diferenciação de corpos embrióides analisamos a expressão de genes marcadores de diferenciação celular específico de dos 3 folhetos germinativos embrionários (BMP4 e VIM, para ectoderme; RUNX1, para mesoderme; e GATA4, para endoderme) utilizando sondas TaqMan (Thermo Fisher Scientific) representadas na **Tabela 2**.

Tabela 1 Primers para RNAm Lista contendo os pares de *primers* utilizados para as reações de RT-qPCR.

GENE	PAR DE PRIMERS	[]
GAPDH	5'- GAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3'	0,4 µM
	5'- GAAGATGGTGATGGGATTTC-3'	
OCT4	5'-GTACTCCTCGGTCCTTTCC-3'	0,4 µM
	5'-CAAAAACCCTGGCACAAACT-3'	
NANOG	5'- CAAAGGCAAACAACCCACTT-3'	0,4 µM
	5'- ATTGTTCCAGGTCTGGTTGC-3'	
SOX2	5'-ACCAAGACGCTCATGAAGAAGG-3'	0,4 µM
	5'-TTCATGTGCGCGTAACTGTC-3'	
MYC	5'-CAGATCAGCAACAACCGAAA-3'	0,4 µM
	5'-GGCCTTTTCATTGTTTCCA-3'	
RELA	5'-TGACAAGGTGCAGAAAGAGG-3'	0,3 µM
	5'-CACATCAGCTTGCGAAAAGG-3'	
NFKB1	5'- GAACCACACCCCTGCATATAG-3'	0,3 µM
	5'- GCATTTTCCCAAGAGTCATCC-3'	
RELB	5'-ATTGACCCCTACAACGCTG-3'	0,3 µM
	5'-TTTCTTGTCATAGACGGGCTC-3'	
NFKB2	5'-GAAGCCAGTCATCTCCCAG-3'	0,3 µM
	5'-CATCTTTCTGCACCTTGTCAC-3'	

Tabela 2 Sondas TaqMan para RNAm Lista contendo os códigos das sondas utilizados para as reações de RT-qPCR.

GENE	REFERÊNCIA DA SONDA
BMP4	Hs03676628_s1
VIM	Hs00958111_m1
RUNX1	Hs02558380_s1
GATA4	Hs00171403_m1

5.5. ChIP-qPCR

Para verificar a ocupação das regiões promotoras em genes que regulam a pluripotência celular pelos fatores de transcrição RELA e RELB aplicamos a técnica de imunoprecipitação de cromatina (ChIP, do inglês *chromatin immunoprecipitation*) com análise realizadas em PCR em tempo real. Optamos comparar as ocupações em duas situações: quando as hESCs estavam em seu estado pluripotente (cultivadas apenas com mTeSR-1, que mantém a pluripotência) e quando as mesmas eram induzidas à uma diferenciação mediada pela suplementação de atRA na concentração de 5 μ M no meio basal durante 96 horas.

Para atender à quantidade de células exigida para o desenvolvimento da técnica de ChIP, realizamos as culturas em placas de petri de 100 mm (Greiner) tratadas previamente com Geltrex com repique celular inicial de 2×10^6 células por placa, o que equivale à aproximadamente $3,33 \times 10^4$ células por cm^2 , realizado com mTeSR-1 suplementado com inibidor de Rock (10 μ M) e mantido por 48 horas para permitir adesão e adaptação das células na placa de cultura. As células destinadas ao controle foram alimentadas com mTeSR-1 suplementado com penicilina/estreptomicina (1 %) e DMSO (0,05 %) enquanto as células que foram induzidas à diferenciação foram alimentadas com mTeSR-1 suplementado com penicilina/estreptomicina (1 %) e atRA (5 μ M). Como DMSO foi utilizado para diluir o atRA em uma concentração final de 0,05 % do meio de cultura resolvemos manter esta concentração no meio controle para descartar alguma eventual mudança em relação à presença ou não deste solvente nas células. Em cada placa foi adicionado 10 mL de meio. O meio de todas as condições foi trocado a cada 48 horas. Após 96 horas de indução de diferenciação o ensaio de ChIP foi iniciado seguindo com as etapas de *crosslinking*, lise celular, fragmentação da cromatina, imunoprecipitação, purificação do DNA e qPCR como recomendados pelo fabricante do kit Magna ChIP G (17-611, Merck Millipore), sem nenhuma alteração de procedimento.

O enriquecimento por ChIP dos fragmentos de DNA obtidos por meio da imunoprecipitação realizada com anticorpos anti-RELA (sc-372, Santa Cruz Technology), anti-RELB (sc-226, Santa Cruz Technology) e anti-RNA Polimerase II (CTD4H8, Merck Millipore) nas regiões promotoras dos genes OCT4, SOX2, KLF4 e MYC nas células pluripotentes e induzidas à diferenciação foram analisados por qPCR. Para isto foram utilizados *primers* (Integrated DNA Technologies) para regiões de regulação apresentados na Tabela 3. As reações de amplificação PCR foram realizadas num sistema 7500 Real Time PCR ABI Prism Sequence

Detection System (Applied Biosystems). Como normalizador foi utilizado o *input* referente a cada condição celular. As reações foram realizadas em duplicatas em placas de 96 poços sob as condições previamente padronizadas utilizando amostras de DNA obtidas no ChIP (2 µL por reação). Os dados obtidos foram então exportados para planilhas do Microsoft Excel, onde foram realizados os cálculos matemáticos para as análises dos dados, da seguinte forma: os valores de Ct de cada imunoprecipitação foram normalizados para cada amostra, subtraindo-se o valor do Ct obtido pelo *input*, obtendo-se assim os valores de ΔCt . Após a obtenção destes valores, foram realizados os cálculos para determinação do enriquecimento relativo baseados na fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (PFAFFL, 2001), comparando o nível de amplificação dos transcritos entre os grupos controle e tratados com atRA durante 96 horas.

Tabela 3 Primers para DNA Lista contendo os pares de *primers* utilizados para as reações de ChIP-qPCR.

GENE	PAR DE PRIMERS	[]
OCT4	5'-CCCCACAGAACTCATACGG-3'	0,4 µM
	5'-ATCCTCGGACCTGGCTAAG-3'	
SOX2	5'-CTGGCAGGCTGGCTCTGGGA-3'	0,4 µM
	5'-GGCTCCTCCACTCGAGCCCA-3'	
MYC	5'-GCAGCTATCATTTGCAACACC-3'	0,4 µM
	5'-AATGAGGCTTTGGACACACC-3'	
KLF4	5'-TGGCCAGTAAAGGTCAAAGG-3'	0,4 µM
	5'-CGGTGTGCACTTTTTGAGAG-3'	

5.6. Avaliação funcional por *knockdown* (siRNA)

Com o intuito de avaliarmos funcionalmente os fatores de transcrição RELA e RELB na regulação da pluripotência nas hESCs realizamos o *knockdown* destas duas proteínas pela técnica de silenciamento por siRNA. Optamos por realizar a transfecção de forma reversa modificada, a qual as células são postas em cultura em cima da solução contendo as micelas formadas pelo reagente de transfecção e as moléculas de siRNA em uma placa previamente tratada com Geltrex (Thermo Fisher Scientific).

Na padronização da transfecção reversa dos siRNA contra as subunidades RELA e RELB de NF- κ B nas hESCs avaliamos a toxicidade e eficiência de transfecção de três reagentes em 3 concentrações: Lipofectamine LTX (0,05; 0,075 e 0,1 μ L/100 μ L v.f.; Thermo Fisher Scientific), DharmaFECT-1 (0,05; 0,075 e 0,1 μ L/100 μ L v.f.; GE Healthcare Dharmacon) e DharmaFECT-4 (0,05; 0,075 e 0,1 μ L/100 μ L v.f.; GE Healthcare Dharmacon) com os quais foram utilizados com um controle negativo “Silencer Select Negative Control No. 1 siRNA” na concentração de 30 nM (4390844, Thermo Fisher Scientific) que possui efeito neutro e como controle positivo o “siGENOME Human UBC siRNA” na concentração de 30 nM (M-019408-01, GE Healthcare Dharmacon) com morte celular esperada. O ensaio foi realizado em placa de cultura de 96 poços, pretas, de fundo translúcido, específicas para ensaios baseados em análises de imagem (Cat 306; Corning Costar) e seguindo os protocolos fornecidos pelas fabricantes dos reagentes de transfecção. Executamos o ensaio com uma concentração celular de $2,17 \times 10^4$ por cm^2 , o que equivale a $6,5 \times 10^3$ células por poço em placas de 96 poços ($0,3 \text{ cm}^2$), tratadas previamente com inibidor de Rock (Y-27632) a 10 μ M por pelo menos 1 hora antes da dissociação enzimática. Para a transfecção o meio foi suplementado com inibidor de Rock (Y-27632) a 10 μ M. Após 24 horas da transfecção foi adicionado a mesma quantidade do volume final de meio, após 48 horas o meio foi trocado totalmente com um meio sem inibidor de Rock e após 48 horas as células foram lavadas 2 vezes com PBS, fixadas na placa com uma solução fixadora composta por 2% de formaldeído em metanol gelado e marcadas para o núcleo e citoplasma com Hoechst 33342 1 μ M em PBS (Thermo Fisher Scientific). A aquisição das imagens foi realizada por bioimageamento automatizado em um sistema de HCA (do inglês *high content analysis*) e análise no software ImageXpress XL (ambos da Molecular Devices). O desenho deste ensaio está representado na **Figura 20** e a representação das imagens adquiridas respeitando a distribuição na placa na **Figura 22**.

	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	siRNA Controle
B	PBS	0,05	0,075	0,1	0,05	0,075	0,1	0,05	0,075	0,1		PBS	
C	PBS	0,05	0,075	0,1	0,05	0,075	0,1	0,05	0,075	0,1		PBS	
D	PBS	0,05	0,075	0,1	0,05	0,075	0,1	0,05	0,075	0,1		PBS	
E	PBS	0,05	0,075	0,1	0,05	0,075	0,1	0,05	0,075	0,1		PBS	
F	PBS	0,05	0,075	0,1	0,05	0,075	0,1	0,05	0,075	0,1		PBS	
G	PBS	0,05	0,075	0,1	0,05	0,075	0,1	0,05	0,075	0,1		PBS	siRNA anti-UBC
H	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	
Lipofectamine LTX				DharmaFECT 1			DharmaFECT 4			Virgem			

Figura 20 Padronização da Transfecção Reversa Representação esquemática da placa de 96 poços mostrando a distribuição dos reagentes de transfecção testados (Lipofectamine LTX, DharmaFECT-1 e DharmaFECT-4) e os respectivos volumes utilizados para os testes, utilizando moléculas com um controle negativo “Silencer Select Negative Control No. 1 siRNA” e como controle positivo o “siGENOME Human UBC siRNA” para se avaliar a eficiência de transfecção.

A eficiência de transfecção foi aferida através da relação existente entre a quantidade de células vivas após 48 horas da transfecção com o siRNA anti-UBC e as células transfectadas com o siRNA controle. Os resultados estão representados no texto anexo (**Sessão 8**) desta tese, que permite a conclusão de que para os 3 reagentes de transfecção a maior concentração possui uma maior eficiência, sendo entre os 3 reagentes o DharmaFECT-4 possui a maior eficiência.

Uma vez selecionado o reagente de transfecção e concentração adequada partimos para os ensaios que viessem a avaliar a concentração de siRNA mínima necessária para atingir o *knockdown* desejado. Com este objetivo, foi feita a transfecção com siRNA anti-RELA (s11914, Thermo Fisher Scientific) e siRNA anti-RELB (s11918, Thermo Fisher Scientific) em 3 concentrações: 2,5 nM; 5 nM e 10 nM. A análise foi realizada por RT-qPCR após 48h de transfecção sendo realizada em relação às transfecções com o siRNA controle com concentrações pareadas. Nas análises feitas com RT-qPCR, a normalização foi feita utilizando o gene GAPDH. Os gráficos gerados mostram os níveis de expressão média dos transcritos (quatro repetições) de RELA e RELB após 48 horas pós-transfecção. Foi avaliado ainda a modulação transcrricional dos três fatores de pluripotência chaves OCT4, SOX2 e NANOG.

Em todos os ensaios os quais foram utilizadas a técnica de silenciamento gênico por siRNA foi adotada a concentração de 5 nM para a molécula de siRNA controle, anti-RELA e anti-RELB. Para o controle positivo, siRNA anti-UBC, foi adotada a concentração de 30 nM.

5.6.1. Avaliação por microscopia quantitativa multiparamétrica

Em sequência, foram realizados ensaios de *knockdown* de RELA e RELB para análise multiparamétrica em um sistema de HCA (do inglês, *High-Content Analysis*) para estudo da morfologia e viabilidade celular bem como foi medida a intensidade de fluorescência relativa para o marcador de pluripotência OCT4. A aquisição das imagens foram realizadas no sistema de microscópio automatizado ImageXpress XLS (Molecular Devices) usando o software MetaXpress (Molecular Devices), objetiva de 10X e cubos de detecção de fluorescência para DAPI (Hoechst 33342 e HCS CellMask® Blue) e FITC (DyLight 488). As imagens foram analisadas com o software CellProfiler (CARPENTER et al., 2006) para quantificar a intensidade de fluorescência dos marcadores nos diferentes compartimentos celulares (núcleo e citoplasma). Posteriormente, os seguintes resultados foram utilizados para a análise: intensidade mediana de OCT4 nuclear, núcleos medianos RELA intensidade integrada e núcleos medianos RELB intensidade integrada. Além disso, com base na intensidade OCT4, traçamos um limiar para identificar células expressando altos níveis de OCT4 (descrito como células OCT4^{high}).

5.7. Efeito do *knockdown* de RELA e RELB sobre o transcriptoma de hESCs

O transcriptoma (conjunto de RNAs mensageiros expressos pelas células) de células transfectadas com siRNAs controle ou contra RELA e RELB foram determinados pela técnica de RNA-seq ou sequenciamento de próxima geração (NGS, do inglês *Next Generation Sequencing*).

As etapas de cultura celular, *knockdown* por siRNA e extração de RNA total das amostras foram realizadas no Laboratório de Biologia Funcional. As etapas de sequenciamento de RNA e análise da expressão diferencial com os dados gerados foram feitos em colaboração com o Laboratório de Genética Molecular e Bioinformática (LGMB) e o CISBi (*Center for Integrative Systems Biology*), ambos chefiados pelo Prof. Dr. Wilson Araújo da Silva Junior, tendo a Dra. Kamila Chagas Peronni Zueli responsável pelo sequenciamento e a bioinformata Jessica Rodrigues Praça responsável pelas análises dos dados gerados.

5.7.1. *Knockdown* por siRNA

Foi realizado o *knockdown* das proteínas RELA e RELB, independentemente, nas células-tronco embrionárias humanas da linhagem H1 como descrito na sessão anterior, no qual

utilizamos a técnica de silenciamento gênico através da transfecção de moléculas de siRNA contra os genes alvos. Ainda foi realizado um tratamento controle com um siRNA sem alvo. Após 72 horas da transfecção de siRNA na concentração de 5nM, em todos os alvos, foi extraído o RNA total das amostras (3 grupos em triplicata).

5.7.2. Extração de RNA

A extração do RNA total foi realizada usando o All Prep DNA/RNA/miRNA Universal Kit (Qiagen) de acordo com as instruções descritas no protocolo fornecido pelo fabricante. As amostras de RNA total extraídas foram quantificadas pelo sistema RNA QuantiFluor (Promega Corporation) e tiveram sua integridade verificada no equipamento 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies).

5.7.3. Preparo das bibliotecas, Clusterização e Sequenciamento

Foram utilizados 300 ng de RNA para o preparo das amostras, que foi realizado com o TruSeq Stranded Total RNA LT Sample Prep Kit (Illumina Inc.), de acordo com o protocolo do fabricante. A geração de clusters foi realizada utilizando o TruSeq Cluster Generation Kit v5 (Illumina Inc.), de acordo com instruções do fabricante. O sequenciamento por síntese dos grupos clonais foi realizado em aparelho NextSeq 550 (Illumina, Inc.), utilizando o NextSeq 500/550 Mid Output Kit v2 (Illumina Inc.). Os moldes de DNA foram copiados base a base utilizando nucleotídeos associados a um terminador reversível marcado fluorescentemente. Após cada passo de síntese, os agrupamentos foram excitados por um laser, levando à emissão de fluorescência da última base adicionada, e então o terminador foi removido, permitindo a incorporação do próximo nucleotídeo. Os sinais fluorescentes de cada ciclo de síntese foram, então, capturados por uma câmera do próprio aparelho.

5.7.4. Análise do RNA-seq

Após o sequenciamento, os arquivos brutos (".bcl") foram convertidos em ".fastq" e tiveram sua qualidade verificada com o software FastQC. As *reads* foram então mapeadas contra o genoma de referência GRCh38 (Gencode), contadas e anotadas com o software STAR (DOBIN et al., 2013). A normalização dos dados e as análises de expressão diferencial foram feitas no R com o package edgeR (ROBINSON; MCCARTHY; SMYTH, 2010). Os volcanos plot e Heatmaps foram feitos com packages limma (RITCHIE et al., 2015) e ComplexHeatmap,

respectivamente (GU; EILS; SCHLESNER, 2016). Os packages edgeR, limma e ComplexHeatmap estão disponíveis no Bioconductor.

5.7.5. Predição *in silico* das vias reguladas por RELA e RELB

As listas de genes diferencialmente expressos geradas a partir do sequenciamento de RNA para cada um dos tratamentos em relação a um controle foram salvas em uma tabela “.CSV”. Para identificarmos as possíveis vias biológicas reguladas e que possivelmente levaram às alterações nas células transfectadas, foi utilizada a ferramenta *online* DAVID 6.8 (*Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery*) (HUANG; SHERMAN; LEMPICKI, 2009). Para isso, as listas de genes foram submetidas a análises de enriquecimento na ferramenta DAVID, utilizando a espécie *Homo sapiens* como genoma de referência, e a ferramenta de “gráfico de anotação funcional” foi aplicada, escolhendo-se a detecção de vias nos bancos de dados “BBID”, “BIOCARTA” e “KEGG_PATHWAY”. Em seguida, das vias identificadas foram escolhidas aquelas com maior relevância para o contexto celular e biológico.

5.8. Avaliação funcional por *Knockout* (CRISPR)

Com o objetivo de fazer o silenciamento total (*knockout*) dos fatores de transcrição RELA e RELB iniciamos a edição gênica em células da linhagem de hESCs H1 em colaboração com o Laboratório de Proteases e Biologia do Câncer chefiado pela Profa. Dra. Katiuchia Uzzun Sales. O *knockout* dos genes foi iniciado pela técnica de edição genômica CRISPR/Cas9 e toda a metodologia foi baseada nos protocolos publicados pelo grupo de pesquisa do Feng Zhang (RAN et al., 2013a). Posteriormente, a edição gênica em células da linhagem de hESCs H9 para *knockout* de RELA e RELB foram executadas em colaboração com o Laboratório de Fisiopatologia do Desenvolvimento Cardíaco chefiado pelo Dr. Michel Puceat, em Marselha, França, como proposta de trabalho do estágio sanduíche. Desta vez, teve-se como base outro trabalho grupo de pesquisa do Feng Zhang que aborda o uso de uma Cas9 mutante (RAN et al., 2013b).

5.8.1. Cas9 *wild type*

A enzima Cas9 funcional causa uma ruptura de fita dupla (DSB, do inglês *double strand break*) em um local específico com base em uma sequência alvo (gRNA, do inglês *guide RNA*) (**Figura 21**). Os DSBs são preferencialmente reparados pelo mecanismo de reparação por união de extremidade não-homóloga (NHEJ, do inglês *non-homologous end joining*) que

frequentemente insere ou deleta bases no DNA que levam a *frameshifts*, criando perda de alelos de função.

Figura 21 Ação da enzima Cas9 wild type A Cas9 (em amarelo) é direcionada para o DNA genômico por um gRNA consistindo uma sequência guia de 20 nt (em azul) e um scaffold (em vermelho). A sequência-guia emparelha-se com o alvo de DNA (em cinza) upstream ao motivo adjacente 5'-NGG (PAM, do inglês protospacer adjacent motif). A Cas9 causa um DSB em ~3 pb a montante da PAM (Retirada de RAN et al., 2013a).

Para cada gene alvo foram desenhados 2 guias através de uma ferramenta *on line* desenvolvida e fornecida pelo grupo do Zhang (HSU et al., 2013a). Os guias para ambas as proteínas foram desenhados contra alvos presentes dentro das regiões conhecidas como domínios de homologias de Rel (RHD, do inglês *Rel homology domain*) que são regiões codantes dos genes da família Rel altamente conservadas evolutivamente que codificam as regiões destas proteínas que se ligam ao DNA. Os guias estão representados na **Tabela 4**. Todas as construções foram feitas no vetor de expressão plasmidial pSpCas9(BB)-2A-GFP (PX458) (#48138, Addgene), que expressa um gRNA e as proteínas EGFP (do inglês, *enhanced green fluorescent protein*) humana e uma Cas9 com códon otimizados.

Tabela 4 – Sequências guias Lista contendo as sequências guias desenhadas *in silico* de acordo com seus alvos às quais editamos por CRISPR/Cas9.

ALVO	GUIA	SEQUÊNCIA
RELA	01	TCCTTTCCTACAAGCTCGTGGG
	02	CCCCACGAGCTTGTAGGAAAGG
RELB	01	CTGGGGACACTAGTCGGCCCAGG
	02	CGACTAGTGTCCCCAGCGCCGGG

Uma vez os vetores de expressão prontos para a transfecção realizamos a padronização através de eletroporação pela sua simplicidade de aplicação quando comparada às transfecções realizadas com lipossomos catiônicos. Utilizamos o sistema de eletroporação Neon™ Transfection System (Thermo Fisher Scientific) com o qual testamos a eficiência da eletroporação de 10^6 células, tratadas previamente com inibidor de Rock (10 μ M) por pelo menos 1 hora, com três concentrações diferentes do plasmídeo (*backbone*): 5 μ g, 10 μ g e 20 μ g. A eletroporação foi executada seguindo as recomendações do fabricante do sistema com pulsos únicos de voltagem igual a 1100 volts e comprimentos de onda de 30 ms. Após a eletroporação as células eram postas em cultura em placas de 6 poços previamente tratadas com Geltrex por 1 hora e então cultivadas com mTeSR-1 sem antibióticos suplementado com inibidor de Rock (10 μ M). Por citometria de fluxo analisamos a eficiência de eletroporação após 24 horas do procedimento. Os resultados estão expressos na **Figura 22**.

Figura 22 – Representação esquemática da análise dos dados obtidos por citometria de fluxo (A) Histograma individual do controle isotípico para EGFP em células não transfectadas viáveis; (B) Histograma individual representando o percentual de células transfectadas com 5 μ g que expressaram EGFP; (C) Histograma individual representando o percentual de células transfectadas com 10 μ g que expressaram EGFP; (D) Histograma individual representando o percentual de células transfectadas com 20 μ g que expressaram EGFP. Cada amostra foi analisada com 10000 eventos.

Foi definido então que faríamos a eletroporação usando 20 µg dos plasmídeos construídos para cada um dos 4 RNAs guias com a quantidade de células aqui utilizadas. Após 48 horas da eletroporação, as células foram então selecionadas por FACS (do inglês *fluorescence-activated cell sorting*) utilizando o marcador EGFP.

Após o *sorting*, $1,5 \times 10^4$ células de cada população foram postas em placas de petri de 100 mm (Greiner) previamente tratadas com Geltrex em um meio de recuperação pós-FACS composto por meio mTeSR-1 condicionado (já utilizado em cultura de hESCs durante 24 horas) e mTeSR-1 fresco na proporção de 1:1 suplementado com 1 % penicilina/estreptomicina, 10 ng/mL de 2-FGF e inibidor de Rock (Y-27632) a 10 µM. As células foram mantidas nestes sistemas de cultura por 7 dias até que as colônias geradas por células únicas atingissem o tamanho necessário para uma passagem manual. Para cada guia foram isoladas 48 colônias postas em cultura em placas de 48 poços (Greiner) previamente tratadas com Geltrex contendo mTeSR-1 suplementado com 1% de penicilina/estreptomicina até atingirem a confluência de 80 % necessária para a realização de uma passagem. A passagem foi realizada utilizando uma solução de EDTA (0,5 mM) em PBS. De cada placa foram derivadas mais duas placas de 48 poços, que foram destinadas à criopreservação dos clones, e uma placa de 96 poços, destinada à análise por marcadores de fluorescência para a análise de expressão proteica dos genes a serem silenciados.

Não foi gerado nenhum clone mutado através desta metodologia.

5.8.2. Cas9 Nickase

A enzima mutante Cas9^{D10A} nickase causa quebra de cadeia simples direcionadas pelo gRNA no DNA em vez das quebras de fita dupla criadas pela enzima Cas9 do tipo selvagem. Deste modo, para usar este mutante é necessário dois gRNAs que atinjam as cadeias opostas de DNA nas proximidades da região a ser editada (**Figura 23**). Esses entalhes duplos em regiões distintas e opostas criam uma quebra de fita dupla que é reparada pelo sistema NHEJ que é propensa a erros. Esta estratégia reduz os efeitos inespecíficos.

Figura 23 Ação da enzima Cas9^{D10A} nickase (Cas9n) A mutação D10A torna a Cas9n capaz de clivar apenas a cadeia complementar ao gRNA; um par de complexos gRNA-Cas9n pode cortar ambos os filamentos simultaneamente.

Para cada gene alvo foram desenhados 3 guias através de uma ferramenta *on line* desenvolvida e fornecida pelo grupo do Zhang (HSU et al., 2013b), com isso para cada alvo tivemos a possibilidade de formar 2 pares de plasmídios distintos para a edição e uma terceira combinação contendo os 3 plasmídios na proporção de 2:1:1. Os guias para ambas as proteínas foram desenhados contra alvos presentes dentro das regiões genômicas do exon 01, dentro da porção codante. Os guias estão representados na **Tabela 5**. Todas as construções foram feitas no vetor de expressão plasmidial pSpCas9n(BB)-2A-Puro (PX462) (#48141, Addgene), que expressa um RNA guia quimérico (gRNA), uma proteína de resistência à puromicina (PAC, puromicina N-acetil-transferase) e uma Cas9 mutante (Cas9^{D10A} nickase) com capacidade apenas para cortar uma das fitas do DNA.

Tabela 5 – Sequências guias Lista contendo as sequências guias desenhadas *in silico* de acordo com seus alvos às quais editamos por CRISPR.

ALVO	GUIA	SEQUÊNCIA
RELA	A	AGAGGCGGAAATGCGCCGCG CGG
	B1	CTCGTCTGTAGTGCACGCCG CGG
	B2	TCGTCTGTAGTGCACGCCG GGG
RELB	A	CGCGGCGACTCGGCATGGCC CGG
	B1	CGCCAGACCGCCGGCTGCGC CGG
	B2	ACCGCCGGCTGCGCCGGAGC TGG

5.8.2.1. Validação das construções plasmidiais

Antes de tentarmos fazer a edição gênica nas hESCs, testamos a eficiência dos pares de guias construídos em células da linhagem HEK, que é uma linhagem renal de origem embrionária, facilmente cultivada com DMEM (Thermo Fisher Scientific) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (Thermo Fisher Scientific) e propagada sob dissociação enzimática com tripsina (Thermo Fisher Scientific). Previamente à transfecção, as células foram plaqueadas (10^5 células por poço) em uma placa de 48 poços (Greiner), ou seja, 10^5 células por cm^2 . Em continuidade, transfectamos 250 ng de DNA plasmidial usando Lipofectamine 3000 (Thermo Fisher Scientific) seguindo as recomendações do fabricante. Para cada gene foram testados 3 combinações plasmidiais: A+B1, A+B2 e A+B1+B2. Após 48h de transfecção as células/DNA das populações celulares aqui testadas foram extraídos.

5.8.2.1.1. Ensaio para detecção de mutações

Na sequência foram amplificadas as regiões alvos das edições gênicas pretendidas (*primers* descritos da **Tabela 6**). Foi então realizado um ensaio para detecção de mutações T7 endonuclease I (New England Biolabs). A enzima T7 Endonuclease I reconhece e cliva DNA não perfeitamente hibridizado. No primeiro passo, os produtos de PCR são produzidos a partir do DNA genômico de células cujos genomas foram direcionados usando Cas9. Estes produtos de PCR são anelados e digeridos com T7 Endonuclease I. Os fragmentos gerados são analisados para determinar a eficiência da segmentação do genoma. A análise foi feita em gel de agarose a 2%.

Tabela 6 Primers de DNA usados para isolar os fragmentos de DNA (*amplicons*) alvos das edições gênicas.

ALVO	PRIMERS	SEQUÊNCIA
RELA	Foward	CACCCAGAGGGGAAACTGAG
	Reverse	GGGCCCTGAAATCCCCTAAA
RELB	Foward	TTGCTCAATGGGTAAGGCGT
	Reverse	CTCCCATAGGAACCCCCAGA

5.8.2.2. Transfecção, seleção e avaliação dos clones de hESCs editados.

Para a transfecção plasmidial em hESCs, foi utilizada a linhagem H9 cultivada nas mesmas condições livre de células alimentadoras como descrito anteriormente na sessão de cultura de células embrionárias humanas, diferindo apenas o meio base de cultura, que no lugar de mTeSR-1 foi utilizado o meio E8 (Stem Cells Technologies). Nesta abordagem experimental utilizamos o sistema de eletroporação Amaxa™ Nucleofector™ Technology (Lonza Bioscience), programa B16. Foi realizada a eletroporação de 2×10^6 células, tratadas previamente com inibidor de Rock ($10 \mu\text{M}$) por pelo menos 1 hora, com $10 \mu\text{g}$ de plasmídeo ($5 \mu\text{g}$ do plasmídeo A mais $5 \mu\text{g}$ do plasmídeo B2, de forma independente para cada gene a ser editado). Após a eletroporação as células eram postas em cultura em placas de 6 poços previamente tratadas com Geltrex por 1 hora e então cultivadas com E8 sem antibióticos suplementado com inibidor de Rock ($10 \mu\text{M}$). Após 48h da transfecção foi iniciada seleção química das células com meio de propagação suplementado com puromicina (Thermo Fisher Scientific) ($1 \mu\text{g/mL}$) por 24h. Após a seleção, 10^4 células de cada população foram postas em placas de petri de 100 mm (Greiner) previamente tratadas com Geltrex em um meio de recuperação composto por meio E8 condicionado (já utilizado em cultura de hESCs durante 24 horas) e E8 fresco na proporção de 1:1 suplementado com 1 % penicilina/estreptomicina e inibidor de Rock (Y-27632) a $10 \mu\text{M}$. As células foram mantidas nestes sistemas de cultura por 14 dias até que as colônias geradas por células únicas atingissem o tamanho necessário para uma passagem manual. Para cada população celular foram isoladas 48 colônias postas em cultura em placas de 24 poços (Greiner) previamente tratadas com Geltrex contendo mTeSR-1 suplementado com 1% de penicilina/estreptomicina até atingirem a confluência de 80 %. As colônias formadas pelos clones foram fragmentadas utilizando uma solução de EDTA ($0,5 \text{ mM}$) em PBS por 3 minutos e conseguinte adição de meio de cultura pra ressuspensão celular. Um terço da suspensão celular de cada clone foi separado para extração de DNA e análise pelo ensaio T7E1 e o restante foi destinado à criopreservação em *freezer* -80°C dos clones após ser adicionado uma solução de congelamento composta por 20% de DMSO em meio de cultura (para atingir uma concentração final de 10% de DMSO). Os clones mutados detectados pelo ensaio T7E1 foram expandidos e o DNA das regiões de interesse foram sequenciados pela metodologia de Sanger e analisados pelo *software* Geneious (Biomatters) através de alinhamentos múltiplos por sequências de referência obtidas na plataforma NCBI.

5.8.2.3. Ensaio funcional dos clones gerados

Os clones controles e mutantes com edição gênica verificada para os genes RELA e RELB foram submetidos à um ensaio funcional de indução de diferenciação mediado por atRA (10 μ M) durante 96 horas. Após a indução, o RNA total foi extraído pelo método de Trizol, como descrito anteriormente, e foi avaliado a modulação transcricional no gene OCT4.

5.9. Testes Estatísticos

Os testes estatísticos utilizados nos resultados originados das RT-qPCRs e quantificações realizadas no HCS foram realizados no software GraphPad Prism 7 pelo método *Ordinary one-way ANOVA Sidak's multiple comparisons test* (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,005$; *** = $p < 0,0005$; **** = $p < 0,00005$).

6. RESULTADOS

6.1. Cultura de células-tronco embrionárias humanas

Após a construção do banco de hESCs, prosseguimos para a padronização da diferenciação. Apesar de termos proposto utilizar a linhagem de hESCs HuES-3 e, posteriormente, demonstrar interesse em incluir mais duas linhagens de hESCs (H1 e H9), prosseguimos com os estudos usando apenas hESCs da linhagem H1. Uma série de fatores foi responsável por esta mudança como a facilidade de cultivo, redução do número de experimentos e consequente diminuição dos gastos, entretanto o fator crucial desta escolha foi a qualidade das culturas empregadas. A linhagem HuES-3, como podemos perceber na **Figura 15B**, tinha a capacidade de manter a homogenia da população de células, mas possuía uma recuperação pós-descongelamento deficiente, exigindo uma maior manipulação a fim de selecionar as colônias morfolologicamente mais adequadas. A linhagem H9 (**Figura 17**), apesar de ter sido adquirida já sob uma condição livre de células alimentadoras, apresentava uma população heterogênea desde o seu descongelamento até as passagens realizadas por seguinte. Depois de muitas tentativas de limpeza de suas colônias e nenhum sucesso decidimos abandonar o seu cultivo e focar na outra alternativa. A linhagem H1 (**Figura 15A**), apesar de ser a primeira e, portanto, a mais antiga entre as hESCs isoladas, em nosso laboratório sempre se manteve estável, sem o surgimento de diferenciações espontâneas, fácil recuperação pós-descongelamento e adaptável às várias condições de cultura testadas. Atrelado às características aqui relatadas está o fato de que esta linhagem, em particular, é a mais citada na literatura científica e, portanto, mais utilizada e bem descrita como modelo de célula-tronco pluripotente. Além do mais, como o projeto foi sendo aprimorado com outras técnicas no decorrer do doutorado, foi ficando inviável trabalharmos com mais de uma linhagem de hESCs. Portanto a padronização e execução dos experimentos foram realizados utilizando principalmente a linhagem H1 como modelo biológico.

6.1.1. Cultura de células embrionárias sem formação de colônia

Após a padronização da forma de cultivo sem formação de colônias de hESCs da linhagem H1, sob análise do bioimagem automatizado (**Figura 25**) analisamos as porcentagens de células positivas para os marcadores de pluripotência dentro da população de hESCs indiferenciadas cultivadas sem formação de colônia, que apresentou uma média de positividade de 97% para OCT4, 99% para SOX2 e 96% para NANOG. Além do mais, digno de nota, a imunofluorescência utilizando anticorpos anti-RELA e anti-RELB mostrou que,

enquanto RELB está constitutivamente localizada no núcleo das hESCs indiferenciadas, RELA está presente predominantemente no citoplasma (**Figura 24**).

Figura 24 Análise do bioimagiamento automatizado Através de imunofluorescência anti-OCT4, anti-SOX2, anti-NANOG, anti-RELA e anti-RELB e análise de bioimagiamento automatizado (N = 4) tivemos acesso às porcentagens de células positivas para estes marcadores bem como a localização celular dos fatores de transcrição RELA e RELB dentro das células-tronco embrionárias humanas indiferenciadas: A população celular possui uma média de positividade de 97% para OCT4, 99% para SOX2 e 96% para NANOG. RELA se encontra presente principalmente distribuído no citoplasma (5% das células apresentam no núcleo e 83% no citoplasma) celular enquanto RELB encontra-se bem distribuído por todo o compartimento celular e, diferentemente de RELA, encontra-se intensamente no interior do núcleo (91% das células).

Figura 25 Imunomarcacão para os fatores de pluripotência OCT4, SOX2 e NANOG e dos fatores de transcrição RELA e RELB Fotomicrografia de fluorescência da cultura de hESCs da linhagem H1 cultivadas sem formação de colônias marcadas com o marcador nuclear Hoechst 33342 e anticorpos anti-OCT4, SOX2, NANOG, RELA e RELB (Escala: 100 μ m).

6.2. Diferenciação de hESCs

Com a finalidade de definir um modelo de indução de diferenciação no qual fosse observado a perda da pluripotência bem como a modulação de NF- κ B, foi analisado por RT-qPCR a expressão transcricional gênica de quatro fatores de pluripotência (**Figuras 28 e 29**) e dos quatro membros da família de NF- κ B objetos deste estudo (**Figuras 30 e 31**) em três modelos de indução de diferenciação de células-tronco embrionárias humanas da linhagem H1, três deles em cultura de monocamadas e um deles numa abordagem tridimensional com corpos embrióides durante dois tempos, 48 e 96 horas. Para a indução por formação de corpos embrióides ainda analisamos marcadores de expressão da endoderme, mesoderme e ectoderme primitivas (**Figura 29**).

A morfologia das hESCs antes da indução de diferenciação está registrada na **Figura 26** e após a indução está na **Figura 27**. Morfologicamente, percebemos que em todas as condições de indução de diferenciação em sistema de colônias (em monocamadas) houve alteração após 48 horas de estímulo. As alterações morfológicas se acentuaram até o tempo limite do ensaio, que foi de 96 horas. As células inicialmente compactas e uniformes com uma morfologia epitelial ganharam volume e nas condições induzidas com DMEM/F12 e DMEM HG adquiriram uma aparência mesenquimal. Em contramão, a indução de diferenciação de corpos embrióides não apresentou diferenças morfológicas associadas à diferenciação das células. No decorrer das 48 e 96 horas de indução a maioria dos corpos embrióides mantiveram o seu tamanho enquanto outros tiveram parte da massa celular desagregada, como indicativo de morte celular (fotos não registradas). O esperado nas diferenciações de corpos embrióides é que eles cresçam um pouco no início da indução de diferenciação. Mesmo diante deste quadro realizamos a extração do RNA total das amostras e prosseguimos com as análises, já que apresentaram aumento da expressão transcricional de alguns marcadores representantes dos três folhetos embrionários, apresentados na **Figura 32**.

Figura 26 Diferenciação de hESCs Fotomicrografias de campo claro de hESCs da linhagem H1 antes da indução da diferenciação. (A) 40X e (B) 100X.

Figura 27 Diferenciação de hESCs Fotomicrografias de campo claro de hESCs da linhagem H1 após 48h e 96h de cultivo em mTeSR-1, mTeSR-1 com 5 uM atRA, DMEM/F12 e DMEM HG.

No grupo induzido em monocamadas, o nível de expressão transcricional do gene OCT4 foi reduzida significativamente em todas as condições e tempos testados. Para o gene NANOG a redução ocorreu em todas as condições, mas apenas no tempo de 96 horas apresentou significância estatística. Para o gene SOX2 a modulação ocorreu de forma similar à de NANOG, com exceção da condição induzida à diferenciação com atRA, que apresentou níveis transcricionais significativamente reduzidos já com 48 horas. O gene MYC sofreu modulação negativa nos dois tempos para a condição de indução com atRA; nas demais condições oscilou, mas sem resultados significativos (**Figura 25**). A indução de diferenciação abordando corpos embrióides não ocorreu de forma homogênea para a maioria dos genes avaliados como nos métodos em monocamadas. Em média, a modulação de OCT4 foi reduzida, mas apresentou variação alta não mostrando significância estatística em nenhum dos tempos testados. NANOG e MYC apresentaram reduções significativas. O primeiro sofreu redução gradativa em relação ao tempo caindo a níveis que não foram apresentados em nenhuma metodologia aqui adotada enquanto MYC sofreu redução, mas manteve o nível de expressão de um tempo testado para o outro. A modulação de SOX2 variou com elevação em 48 horas e queda com 96 horas, não apresentando significância em relação ao controle (**Figura 29**).

Figura 28 Repressão da transcrição dos fatores de pluripotência durante diferenciação induzida A expressão relativa dos fatores de pluripotência foi analisada por RT-qPCR em células da linhagem H1. A análise foi realizada com a condição sem tratamento (mTeSR-1) como referência e a normalização foi realizada utilizando o gene GAPDH. Os gráficos mostram os níveis de expressão média dos transcritos (N = 3) de OCT4, NANOG, SOX2 e MYC nos grupos tratados e não tratados após 48 e 96 horas de cultura (** = $p < 0,005$; *** = $p < 0,0005$; **** = $p < 0,00005$).

Figura 29 Modulação da transcrição dos fatores de pluripotência durante diferenciação espontânea A expressão relativa dos fatores de pluripotência foi analisada por RT-qPCR em células da linhagem H1. A análise foi realizada tendo como controle corpos embrióides após a agregação (antes de induzidos a diferenciação). Os gráficos mostram os níveis de expressão média dos transcritos (N = 3) de OCT4, NANOG, SOX2 e MYC nos grupos após 48 e 96 horas de cultura (** = $p < 0,005$; *** = $p < 0,0005$).

Após confirmarmos a perda da pluripotência das hESCs e início da diferenciação. Com base nos fatores de pluripotência, analisamos a expressão transcricional dos genes que atuam nos processos de ativação das vias canônica (RELA e NF κ B1) e não-canônica (RELB e NF κ B1) de NF- κ B. Foi possível observar que a média da expressão transcricional de RELA aumentou em todas as condições testadas com significância estatística nas condições induzidas com atRA e DMEM/F12 após 48 horas e na indução realizada com DMEM HG após 96 horas, ambas em monocamadas, e um aumento de quase o dobro da expressão na diferenciação de corpos embrióides após 96 horas. Houve também um aumento da média da expressão transcricional de NF κ B1 em todas as condições, mas com significância estatística na condição induzida com atRA, nos dois tempos de cultivo, e nas demais condições com 96 horas. Nas induções em monocamadas, a expressão de RELB diminuiu em todas as condições testes, com exceção da indução mediada por atRA durante 48 horas que não resultou em diferença na sua

média enquanto NFKB2 sofreu elevação da transcrição após 96 horas de indução com atRA e DMEM HG (**Figura 30**). Nas demais condições e tempos não houve alterações com significância estatística. Em contrapartida, na indução de diferenciação de corpos embriões houve um aumento da média da expressão transcripcional de todos os componentes de NF- κ B aqui avaliados (**Figura 31**).

Figura 30 Modulação da transcrição das subunidades da família de NF- κ B durante a diferenciação A expressão relativa dos fatores de pluripotência foi analisada por RT-qPCR em células da linhagem H1. A análise foi realizada com a condição sem tratamento (mTeSR-1) como referência e a normalização foi realizada utilizando o gene GAPDH. Os gráficos mostram os níveis de expressão média dos transcritos (três repetições) de RELA, NFKB1, RELB e NFKB2 nos grupos tratados e não tratados após 48 e 96 horas de cultura. Células indiferenciadas apresentaram níveis baixos de expressão de RELA e NFKB1, enquanto que as células induzidas à diferenciação exibiram de maneira geral expressão regulada positivamente destes fatores. Em contraste, RELB foi expresso em níveis elevados em células indiferenciadas e foi regulado negativamente na diferenciação. NFKB2 apresentou expressão diferencial não significativa durante 48h de diferenciação e elevação significativa após 96 horas de diferenciação nos meios mTeSR-1 suplementado com 5 μ M atRA e DMEM *High Glucose* (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,005$; *** = $p < 0,0005$; **** = $p < 0,00005$).

Resumidamente, os três meios indutores de diferenciação mostraram redução significativa na expressão dos genes de pluripotência OCT4, NANOG, SOX2 e MYC além de evidenciarem aumento da expressão dos componentes da via canônica de NF- κ B (RELA e

NFKB1) e redução da ativação da via não-canônica, principalmente pela diminuição da expressão de RELB. Para NFKB2, outra proteína chave da via não-canônica de NF- κ B, os resultados não foram conclusivos mostrando a necessidade de novas abordagens para entender melhor o papel desta proteína no processo de diferenciação celular e consequente perda da pluripotência.

Figura 31 Modulação da transcrição das subunidades da família de NF- κ B durante a diferenciação espontânea A expressão relativa das subunidades da família de NF- κ B foi analisada por RT-qPCR em células da linhagem H1. A análise foi realizada tendo como controle corpos embriões após a agregação (antes de induzidos a diferenciação). Os gráficos mostram os níveis de expressão média dos transcritos (N = 3) de RELA, NFKB1, RELB e NFKB2 após 48 e 96 horas de cultura (* = p<0,05; ** = p<0,005).

Por ser um modelo de diferenciação espontânea e poder gerar células dos três folhetos embrionários, verificamos a expressão dos marcadores precoces de diferenciação BMP4 e VIM (ectoderme), RUNX1 (mesoderme) e GATA4 (endoderme). Com exceção do marcador GATA4 todos os outros apresentaram aumentos significativos na sua expressão após 96 horas de diferenciação (**Figura 32**).

Figura 32 Modulação da transcrição dos marcadores de diferenciação durante diferenciação espontânea A expressão relativa dos fatores de pluripotência foi analisada por RT-qPCR em células da linhagem H1. A análise foi realizada tendo como controle corpos embrioides após a agregação (antes de induzidos a diferenciação). Os gráficos mostram os níveis de expressão média dos transcritos (N = 3)) de marcadores de diferenciação celular específicos dos 3 folhetos germinativos embrionários (BMP4 e VIM, ectoderme; RUNX1, mesoderme; e GATA4, endoderme) após 48 e 96 horas de cultura (** = $p < 0,005$; **** = $p < 0,00005$).

Com base na modulação transcricional dos fatores de pluripotência, dos quatro métodos de indução de diferenciação aquele que mais atendeu as nossas necessidades de visualização do fenótipo pluripotente para um de células em diferenciação foi a indução mediada por atRA durante 96 horas. Tal modelo de indução de diferenciação mostrou-se adequado em células-tronco embrionárias humanas da linhagem H1 e pôde ser aplicado aos estudos seguintes visando melhor compreender os mecanismos de sinalização de NF- κ B envolvidos na manutenção da pluripotência. Resultados concordantes aos nossos foram relatados em outros trabalhos de indução de diferenciação mediada por atRA em células pluripotentes (KIM et al., 2008; LU et al., 2009; COYLE; LI; BACCEI, 2011).

6.3. ChIP-qPCR

Para o ensaio de imunoprecipitação de cromatina e análise por qPCR, utilizamos a indução de diferenciação de colônias em monocamadas mediada por atRA. A morfologia das hESCs antes da indução de diferenciação está registrada na **Figura 33** e após a indução de diferenciação está registrada na **Figura 34**.

Figura 33 Diferenciação de hESCs para a ChIP Fotomicrografias de campo claro de hESCs da linhagem H1 antes da indução da diferenciação. (A) 40X e (B) 100X.

Figura 34 Diferenciação de hESCs para o ChIP Fotomicrografias de campo claro de hESCs da linhagem H1 após 48h e 96h de cultivo em mTeSR-1 suplementado com penicilina/estreptomicina (1 %) e DMSO (0,05 %), representado por mTeSR-1 na imagem, e induzidas à diferenciação mTeSR-1 suplementado com penicilina/estreptomicina (1 %) e atRA (5 μ M).

Após a análise da modulação transcricional dos fatores de pluripotência e da transcrição das vias canônica e não-canônica de NF- κ B durante a indução de diferenciação no decorrer de 96 horas verificamos a interação entre estes dois grupos gênicos ao nível de regulação transcricional. A **Figura 35** mostra o enriquecimento relativo das regiões promotoras de OCT4, SOX2, KLF4 e MYC resultantes das imunoprecipitações anti-RELA, anti-RELB e anti-RNA Polimerase II entre células indiferenciadas e as células induzidas à diferenciação por atRA, ou seja, a quantidade de vezes que as proteínas RELA, RELB e RNA Polimerase II se ligaram a mais nas regiões de regulação destes 4 fatores de pluripotência. O fator de transcrição RELA se ligou na região reguladora de OCT4 quase 2 vezes a mais nas células em diferenciação do que nas células indiferenciadas; ainda sobre OCT4, a ligação exercida pela RNA Polimerase II também aumentou também quase 2 vezes. A ligação promovida por RELB apesar de ter aumentado 1,39 vezes foi menor que a exercida por RELA sob as mesmas condições de diferenciação. Estes resultados também se mantiveram para os fatores de pluripotência SOX2, KLF4 e MYC com valores de enriquecimento relativo de RELA de 3,93; 2,55 e 5,86 vezes, respectivamente, enquanto a razão de enriquecimento de RELB foi de 1,18; 1,35 e 2,93 vezes, respectivamente, e a enriquecimento relativo da RNA Polimerase II foi de 3,04; 10,48 e 18,44 vezes, respectivamente. Os valores da enriquecimento relativo da imunoprecipitação anti-RNA Polimerase II para os genes OCT4, SOX2 e MYC apontam um fato curioso quando relacionados com a expressão transcricional relativa destes genes: mesmo havendo uma maior ligação da enzima RNA Polimerase II nas regiões de regulação gênica, a expressão dos transcritos apresentou uma diminuição para níveis abaixo de 25 % em relação à expressão transcricional destes genes em células indiferenciadas. Estes dados, de forma geral, sugerem um possível envolvimento da via canônica de NF- κ B através da ativação de RELA com o processo de diferenciação das células pluripotentes. Nas células induzidas à diferenciação, quando RELA está ligado na região reguladora dos fatores de pluripotência aqui abordados, mesmo sob aumento ligação da enzima RNA Polimerase II, há uma diminuição da expressão gênica. Estes dados, de forma geral, sugerem que a via canônica de NF- κ B está intensamente envolvida com o processo de diferenciação celular das células-tronco embrionárias humanas.

Figura 35 ChIP-qPCR Representação gráfica do enriquecimento relativo das regiões promotoras de OCT4, SOX2, KLF4 e MYC resultantes das imunoprecipitações anti-RELA, anti-RELB e anti-RNA Polimerase II entre as células pluripotentes e as células induzidas à diferenciação por atRA durante 96 horas analisados por qPCR.

6.4. Avaliação funcional por *knockdown* (siRNA)

Uma vez selecionado o reagente de transfecção e a concentração adequada do mesmo, como descrito nos anexos na sessão de Padronização da Transfecção de siRNA em hESCs, partimos para a avaliação da concentração de siRNA mínima necessária para atingir o *knockdown* desejado. Com este objetivo foi feita a transfecção com siRNA anti-RELA (s11914, Thermo Fisher Scientific) e siRNA anti-RELB (s11918, Thermo Fisher Scientific) em 3 concentrações: 2,5 nM; 5 nM e 10 nM. A análise foi realizada por RT-qPCR após 72h de transfecção sendo realizada em relação às transfecções com o siRNA controle com concentrações pareadas mostram os níveis de expressão média dos transcritos (quatro repetições) de RELA e RELB após 72 horas pós-transfecção (**Figura 36**). Observamos especificidade de silenciamento e eficiência de silenciamento com a transfecção de 5 nM, tanto para o siRNA anti-RELA como para o siRNA anti-RELB, causando uma diminuição de expressão média para 18,75 % e 22,5 %, respectivamente. Curiosamente, esta análise evidenciou que uma redução dos níveis transcricionais de RELB provocou um aumento na transcrição de RELA de 405,75 %, quando avaliamos a transfecção realizada com siRNA anti-RELB na concentração de 5 nM. Este achado fortalece nossa hipótese de que RELB esteja associado com um estado indiferenciado celular ao passo que sua diminuição causaria um aumento de RELA, relacionada com diferenciação e perda da pluripotência.

Figura 36 Modulação da transcrição de RELA e RELB após o *knockdown* de RELA e RELB A expressão relativa dos transcritos para os genes RELA e RELB foi analisada por RT-qPCR após a transfecção de siRNAs anti-RELA e anti-RELB em células da linhagem H1 em 3 concentrações diferentes: 2,5 nM; 5 nM e 10 nM. Os gráficos mostram os níveis de expressão média dos transcritos (quatro repetições) de RELA e RELB após 48 horas pós-transfecção (** = $p < 0,005$; *** = $p < 0,0005$; **** = $p < 0,00005$).

Avaliamos ainda a modulação transcrricional de três fatores de pluripotência chave (OCT4, SOX2 e NANOG) e, apesar dos resultados não apresentarem significância estatística, apresentaram uma diminuição de pelo menos mais de 10% na média da expressão transcrricional destes genes com o *knockdown* de RELB quando comparados aos seus respectivos controles, o que pode ser considerado um efeito biologicamente importante dentro do contexto da regulação da manutenção da pluripotência e diferenciação (**Figura 37**).

Figura 37 Modulação da transcrição de OCT4, SOX2 e NANOG o *knockdown* de RELA e RELB A expressão relativa dos transcritos para os genes OCT4, SOX2 e NANOG foi analisada por RT-qPCR após a transfecção de siRNAs anti-RELA e anti-RELB em células da linhagem H1 em 3 concentrações diferentes: 2,5 nM; 5 nM e 10 nM. Os gráficos mostram os níveis de expressão média dos transcritos (quatro repetições) de OCT4, SOX2 e NANOG após 48 horas pós-transfecção.

6.4.1. Avaliação por microscopia quantitativa multiparamétrica

Uma vez definida a concentração de siRNA, outros ensaios de *knockdown* de RELA e RELB foram realizados. Após transfectadas, as células foram cultivadas por 96 horas e finalmente fixadas e marcadas para avaliação das alterações fenotípicas resultantes do silenciamento usando a abordagem de HCA (do inglês *High-Content Analysis*). Analisamos cinco características: células totais e área celular, graficamente representadas na **Figura 38**, porcentagem de células OCT4 positivas (OCT4⁺), porcentagem de células OCT4^{high} e intensidade nuclear média de OCT4, representados graficamente na **Figura 39**. Os resultados são relativos às células controle, que foram transfectadas com um controle negativo de siRNA. Foi observado que o *knockdown* de RELA nas células indiferenciadas não teve efeito estatisticamente significativo em nenhum das cinco características observadas. Por outro lado, o *knockdown* de RELB resultou em um aumento da mortalidade das hESCs e alterações na morfologia destas células. Para verificar os efeitos do *knockdown* de RELB analisamos a expressão proteica de OCT4 por análise de imunofluorescência e vimos que, houve redução da porcentagem de células OCT4 positivas nas colônias de hESCs e uma redução de

aproximadamente 20% da intensidade média nuclear de OCT4/OCT4^{High}, mostrando uma relação direta entre RELB e a translocação nuclear de OCT4, de maneira significativa, corroborando com a hipótese de que, de fato, a via não-canônica de NF-κB esteja também comprometida com a manutenção da pluripotência de hESCs.

Figura 38 Efeitos do silenciamento de RELA e RELB no estado pluripotente de células-tronco embrionárias humanas da linhagem H1 I – (A) Contagem e (B) área celulares relativas às células controle, que foram transfectadas com um controle negativo de siRNA, após 72h pós-transfecção (** = p<0,005).

Figura 39 Efeitos do silenciamento de RELA e RELB no estado pluripotente de células-tronco embrionárias humanas da linhagem H1 II – (A) Células OCT4⁺, (B) Intensidade Média Nuclear de OCT4 e (C) Intensidade Média Nuclear de OCT4^{High} relativas às células controle, que foram transfectadas com um controle negativo de siRNA, após 72h pós-transfecção (* = p<0,05; ** = p<0,005).

6.5. Efeito do *knockdown* de RELA e RELB sobre o transcriptoma de hESCs

Antes da realização do sequenciamento do RNA foi feita uma avaliação dos níveis de expressão transcricional dos genes RELA e RELB com a finalidade de analisar os efeitos do *knockdown* destes genes resultantes dos tratamentos com siRNA. Nas amostras analisadas, os níveis dos transcritos foram reduzidos para 36 e 31% para os genes RELA e RELB, respectivamente, dos níveis observados na condição controle, ambos com significância estatística (**Figura 40**). Diante deste quadro foi realizado o sequenciamento do RNA total das amostras.

Figura 40 RT-qPCR amostral prévio ao RNA-seq Expressão transcricional dos genes RELA e RELB resultantes dos tratamentos com siRNA após 3 dias do seu início (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,005$).

6.5.1. Sequenciamento do RNA

O sequenciamento das amostras gerou entre 15,7 e 22,8 milhões (M) de reads por amostra, sendo mais de 95% delas mapeadas contra o genoma de referência (**Tabela 7**).

Tabela 7 Dados gerados no RNA-seq Total de reads geradas pelo RNA-seq das amostras dos tratamentos com siRNA controle, siRNA anti-RELA e siRNA anti-RELB e quantidade de reads mapeadas contra o genoma de referência GRCh37.p13.

Amostra	Total de Reads (M)	Reads Mapeadas (M)	Reads Mapeadas (%)
1033 – siCTRL 1	22.8	21.9	96.02
1034 – siCTRL 2	16.0	15.3	95.45
1035 – siCTRL 3	20.0	19.1	95.40
1037 – siRELA 1	20.3	19.3	95.37
1039 – siRELA 2	19.2	18.4	95.54
1040 – siRELA 3	15.7	15.0	95.54
1041 – siRELB 1	18.1	17.3	95.70
1042 – siRELB 2	19.1	18.2	95.46
1044 – siRELB 3	21.9	20.9	95.38

A partir da análise da expressão diferencial entre os tratamentos para *knockdown* por siRNA de RELA e RELB, independentemente, obtivemos duas listas de genes com os valores de P ajustados ($< 0,05$). A primeira contendo os genes diferencialmente expressos no tratamento com o siRNA anti-RELA em comparação com um controle totalizando 2338 genes, entre estes 1008 positivamente regulados e 1330 negativamente regulados. A segunda lista com genes diferencialmente expressos no tratamento com o siRNA anti-RELB em comparação com um controle com 2825 genes, sendo 1146 positivamente regulados e 1674 negativamente.

Com a observação de que as listas de genes obtidas da análise da expressão diferencial proveniente dos dois tratamentos testados descreviam os mesmos genes e tendo o conhecimento que as duas proteínas silenciadas, RELA e RELB, são da mesma família e compartilham um mesmo motivo de ligação ao DNA e, por tanto, podem regular os mesmos genes, foi construído um diagrama de Venn para verificar se esses genes eram regulados de modo semelhante nos diferentes tratamentos aqui estudados (**Figura 41**). Observa-se que, grande parte dos transcritos são regulados de maneira semelhante nos dois tratamentos: 730 genes foram regulados positivamente, tanto no tratamento com o siRNA anti-RELA como no tratamento com o siRNA anti-RELB, e 1066 genes foram regulados negativamente em ambas as situações, mostrando que estes dois genes regulam muitos genes de forma semelhante. Por outro lado, e de forma exclusiva, no tratamento com siRNA anti-RELA, 274 genes foram regulados positivamente enquanto 264 foram regulados negativamente; no tratamento com siRNA anti-RELB, 416 genes foram regulados positivamente e 613 genes foram regulados negativamente.

Figura 41 Diagrama de Venn gerado a partir das listas de genes diferencialmente expressos nos tratamentos com siRNA anti-RELA e com siRNA anti-RELB.

6.5.2. Predição *in silico* das vias reguladas por RELA e RELB

Com o propósito de analisar a ação do gene RELA no estado de pluripotência das hESCs, através da lista de genes positivamente regulados, realizamos uma análise *in silico* pela ferramenta DAVID e pôde-se destacar a regulação positiva de vias que regulam de maneira direta a pluripotência celular. As vias e os genes relacionados encontram-se descritos da **Tabela 8** e as representações das vias geradas a partir da ferramenta DAVID nas **Figuras 42 a 49**.

Tabela 8 Vias biológicas detectadas pela ferramenta DAVID Na presente tabela, encontram-se descritas as vias e os genes regulados positivamente após o *knockdown* de RELA.

Via	Genes	Fold Enrichment	pValue	Bonferroni
Regulação da Pluripotência	NANOG, JARID2, NODAL, SMAD5, SOX2, SMAD4, REST, FZD5, LIF, INHBA, NRAS, WNT3, ID2, RIF1, ID1, GSK3B, LHX5, ID4, FGF2, KLF4, KAT6A	3,1	0	0
TGF-beta	PPP2R1B, SMAD7, NODAL, CREBBP, FST, SMAD5, SMAD4, AMH, INHBA, EP300, ID2, ID1, PPP2CA, PPP2CB, LEFTY2, ID4, THBS1, PITX2	4,4	0	0
WNT	CSNK1A1, CER1, TBL1XR1, CTBP2, CREBBP, SMAD4, FZD5, CSNK2A2, CHD8, WNT3, EP300, GSK3B, JUN, LRP6, FRAT2, FOSL1	2,4	0	0,451
FoxO	NRAS, CDKN1A, IRS2, PLK3, EP300, ATG12, PLK2, CREBBP, SMAD4, FBXO25, MDM2, SIRT1, GADD45A	2	0,03	0,998
Vigilância do mRNA	PABPN1, PPP2R1B, UPF3A, PPP2CA, MAGOH, PPP2CB, SAP18, SMG1, ACIN1, CSTF2T, WDR82, PNN	2,7	0	0,615
Spliceossomo	RBM22, CCDC12, LSM6, MAGOH, CWC15, ZMAT2, SNRPD1, PRPF3, SART1, SMNDC1, HNRNPA3, HNRNPK, LSM3, PHF5A, ACIN1, SNRPE, RBM25, PRPF38A	2,8	0	0,048
p53	RPRM, PMAIP1, SESN2, SESN1, SESN3, PPM1D, TP53I3, CDKN1A, CASP3, BBC3, BAX, SERPINE1, DDB2, MDM2, THBS1, GADD45A	4,9	0	0,000
Ciclo Celular G2/M Checkpoint	CREBBP, SMAD4, WEE1, CDKN1A, EP300, GSK3B, MDM2, ORC6, GADD45A, CCNA2, BUB3, STAG2, STAG1	3,3	0,02	1,000

Figura 42 Representação das vias que regulam a pluripotência gerada a partir da ferramenta DAVID com a análise dos genes regulados positivamente após *knockdown* de RELA em hESCs da linhagem H1, onde os grupos de genes (associados por suas funções biológicas na via) marcados com as estrelas vermelhas são aqueles em que um ou mais alvos tiveram expressão alterada.

Figura 43 Representação da via de regulação TGF-beta gerada a partir da ferramenta DAVID com a análise dos genes regulados positivamente após *knockdown* de RELA em hESCs da linhagem H1, onde os grupos de genes (associados por suas funções biológicas na via) marcados com as estrelas vermelhas são aqueles em que um ou mais alvos tiveram expressão alterada.

Figura 45 Representação da via de regulação FoxO gerada a partir da ferramenta DAVID com a análise dos genes regulados positivamente após *knockdown* de RELA em hESCs da linhagem H1, onde os grupos de genes (associados por suas funções biológicas na via) marcados com as estrelas vermelhas são aqueles em que um ou mais alvos tiveram expressão alterada.

101

04110 11/15/18
(c) Kanehisa Laboratories

Figura 48 Representação das vias que regulam o ciclo celular gerada a partir da ferramenta DAVID com a análise dos genes regulados positivamente após *knockdown* de RELA em hESCs da linhagem H1, onde os grupos de genes (associados por suas funções biológicas na via) marcados com as estrelas vermelhas são aqueles em que um ou mais alvos tiveram expressão alterada.

Figura 49 Representação das vias que regulam o ciclo celular gerada a partir da ferramenta DAVID com a análise dos genes regulados positivamente após *knockdown* de RELA em hESCs da linhagem H1, onde os grupos de genes (associados por suas funções biológicas na via) marcados com as estrelas vermelhas são aqueles em que um ou mais alvos tiveram expressão alterada.

A partir da lista de genes que foram regulados exclusivamente de forma negativa pelo tratamento com o siRNA anti-RELB realizamos uma análise *in silico* pela ferramenta DAVID e pôde-se destacar a regulação negativa de vias celulares importantes para a sobrevivência celular. As vias e os genes relacionados encontram-se descritos da **Tabela 9** e as representações das vias geradas a partir da ferramenta DAVID nas **Figuras 53 a 62**.

Tabela 9 Vias biológicas detectadas pela ferramenta DAVID Na presente tabela, encontram-se descritas as vias e os genes exclusivamente regulados negativamente após o *knockdown* de RELB.

Via	Genes	Fold Enrichment	pValue	Bonferroni
Metabolismo do Carbono	GPI, SHMT1, SHMT2, G6PD, ACADM, OGDHL, HK1, PDHA1, HIBCH, OGDH, PSAT1, GPT2, PCCA	2,9	0,001	0,280
Metabolismo de Ácidos Graxos	ACAA2, CPT2, ACADM, HACD3, ACACA, TECR, CPT1A	3,7	0,010	0,915
AMPK	SREBF1, PIK3CB, PRKAG1, PIK3CD, TSC2, ACACA, ELAVL1, RPS6KB2, MTOR, PCK2, CPT1A	2,3	0,02	0,994
PI3K-AKT	PHLPP1, COL4A1, MAP2K1, PIK3CB, PIK3CD, RPS6KB2, PCK2, KDR, CCNE1, ITGA9, PTK2, LAMA3, GNB2, LAMA5, TSC2, EPOR, GNB4, MTOR, FN1, ITGA2B	1,4	0,075	1,000
HIF-1	HIF1A, MAP2K1, PIK3CB, PIK3CD, SLC2A1, RPS6KB2, HK1, PDHA1, MTOR	2,4	0,032	1,000
Endocitose	GIT1, RAB4A, ASAP2, PRKCI, CBL, AP2A2, RAB31, RAB11FIP3, SH3GLB2, ACAP1, ZFYVE9, WWP1, PDCD6IP, PARD6G, AGAP3, ARAP1, AP2M1	1,8	0,024	0,998
Replicação do DNA	DNA2, PRIM2, PCNA, MCM3, MCM5, MCM6	4,2	0,012	0,947
Regulação do Citoesqueleto de Actina	ACTB, GIT1, MAP2K1, PIK3CB, ARHGEF6, SSH3, GNA12, PIK3CD, ACTG1, ITGA9, PTK2, CYFIP2, RRAS, FN1, ITGA2B	1,8	0,032	1,000
Adesão Focal	ACTB, COL4A1, MAP2K1, PIK3CB, PIK3CD, KDR, ACTG1, ITGA9, PTK2, LAMA3, LAMA5, RAP1B, ITGA2B, FN1	1,7	0,05	1,000
Ciclo Celular	CCNE1, HDAC2, E2F5, CCNH, PCNA, ANAPC11, MCM3, MCM5, MCM6, ORC3	2	0,05	1,000

CARBON METABOLISM

Figura 50 Representação da via de metabolismo do carbono gerada a partir da ferramenta DAVID com a análise dos genes regulados negativamente após *knockdown* de RELB em hESCs da linhagem H1, onde os grupos de genes (associados por suas funções biológicas na via) marcados com as estrelas vermelhas são aqueles em que um ou mais alvos tiveram expressão alterada.

Figura 51 Representação da via de metabolismo do carbono gerada a partir da ferramenta DAVID com a análise dos genes regulados negativamente após *knockdown* de RELB em hESCs da linhagem H1, onde os grupos de genes (associados por suas funções biológicas na via) marcados com as estrelas vermelhas são aqueles em que um ou mais alvos tiveram expressão alterada.

Figura 52 Representação da via sinalização AMPK gerada a partir da ferramenta DAVID com a análise dos genes regulados negativamente após *knockdown* de RELB em hESCs da linhagem H1, onde os grupos de genes (associados por suas funções biológicas na via) marcados com as estrelas vermelhas são aqueles em que um ou mais alvos tiveram expressão alterada.

Figura 54 Representação da via sinalização HIF-1 gerada a partir da ferramenta DAVID com a análise dos genes regulados negativamente após *knockdown* de RELB em hESCs da linhagem H1, onde os grupos de genes (associados por suas funções biológicas na via) marcados com as estrelas vermelhas são aqueles em que um ou mais alvos tiveram expressão alterada.

Figura 55 Representação das vias de sinalização que controlam a endocitose celular gerada a partir da ferramenta DAVID com a análise dos genes regulados negativamente após *knockdown* de RELB em hESCs da linhagem H1, onde os grupos de genes (associados por suas funções biológicas na via) marcados com as estrelas vermelhas são aqueles em que um ou mais alvos tiveram expressão alterada.

Figura 57 Representação das vias de sinalização que controlam o ciclo celular gerada a partir da ferramenta DAVID com a análise dos genes regulados negativamente após *knockdown* de RELB em hESCs da linhagem H1, onde os grupos de genes (associados por suas funções biológicas na via) marcados com as estrelas vermelhas são aqueles em que um ou mais alvos tiveram expressão alterada.

Figura 59 Representação das vias de sinalização que regulam a replicação do DNA gerada a partir da ferramenta DAVID com a análise dos genes regulados negativamente após *knockdown* de RELB em hESCs da linhagem H1, onde os grupos de genes (associados por suas funções biológicas na via) marcados com as estrelas vermelhas são aqueles em que um ou mais alvos tiveram expressão alterada.

6.6. Avaliação funcional por *Knockout* (CRISPR)

6.6.1. Validação dos plasmídios em HEK

Abaixo encontra-se representada na **Figura 60** a análise das amostras provenientes das populações celulares submetidas à transfecção, edição gênica e ensaio de detecção de mutações em células HEK. Pela análise visual/qualitativa do gel de agarose e do padrão de bandas das amostras após o ensaio T7E1, as melhores combinações foram 2P2 (A+B2) e 3P1 (A+B1+B2). Apesar da combinação dos 3 plasmídeos ter gerado mais mutações que a de 2 plasmídios, optamos, por uma questão prática, pela combinação mais simples para seguir com os experimentos em hESCs.

Figura 60 Análise em gel de agarose dos produtos do ensaio T7E1 Em vermelho estão representados as populações celulares testadas com as combinações plasmidiais destinadas a edição do gene RELB e em azul estão representados as populações celulares testadas com as combinações plasmidiais destinadas a edição do gene RELB. 2P1 (A+B1), 2P2 (A+B2), 3P1 (A+B1+B2).

6.6.2. Seleção e análise dos clones gerados

Após a transfecção plasmidial, seleção por resistência à puomicina das células transfectadas e geração dos clones foi feita uma triagem a fim de selecionar clones que possivelmente sofreram edição dos genes de interesse. Na edição do gene RELB, dos 48 clones isolados apenas 1 clone foi positivo para mutação na região gênica amplificada. Além deste clone, e para fins comparativos, foi isolado mais um outro clone como controle para os experimentos planejados. Na edição do gene RELB, dos 48 clones isolados 12 clones foram positivos para mutação na região gênica amplificada. Além destes clones, e para fins comparativos, foi expandido outro clone como controle para os experimentos planejados. Este trabalho foi realizado na França e naquela época todos os clones foram expandidos e congelados à -150°C. No processo de importação e recuperação dos clones, ao final, só continuamos com

2 clones relacionados ao gene RELA e 3 clones relacionados ao gene RELB. Os clones tiveram as regiões de interesse sequenciadas e o alinhamento com seus genes de referência estão representados na **Figura 60**, para o gene RELA, e na **Figura 61**, para o gene RELB. Um novo sequenciamento foi planejado com a finalidade de confirmar, definir e distinguir as mutações geradas em cada braço cromossômico. Até o fechamento desta tese estes experimentos não foram finalizados.

Figura 61 Sequenciamento por Sanger I Imagem obtida do alinhamento dos amplicons originários dos clones isolados de RELA (RELA +/+, como clone controle, e RELA +/-, como clone mutado) com a sequência de referência NC_000011 do gene RELA.

Figura 62 Sequenciamento por Sanger II Imagem obtida do alinhamento dos amplicons originários dos clones isolados de RELB (RELA +/+, como clone controle, e RELA +/-, como clone mutado) com a sequência de referência NC_000019 do gene RELB.

6.6.3. Ensaio funcional dos clones gerados

Antes de realizarmos ensaios mais robustos para avaliar os efeitos das edições gênicas de RELA e RELB após como RNA-seq, qPCR com um maior número de genes/marcadores ou ensaios de HCS, por exemplo, realizou-se um ensaio piloto funcional de a indução de diferenciação mediada por atRA e pôde-se ver que a expressão transcricional do gene OCT4 no clone controle (RELA +/+, não mutado) referente ao gene RELA decaiu pela metade em relação a condição não tratada. A mesma modulação de OCT4 foi vista para os clones controle (RELB +/+, não mutado) e seus pares mutados [RELB +/- (3) e RELB +/- (5), heterozigotos para as mutações] referentes ao gene RELB. Enquanto que, sob indução de diferenciação, o clone mutado para o gene RELA (RELA +/-, em heterozigose para a mutação) não sofreu alteração significativa na modulação transcricional do gene OCT4 (**Figura 62**). O que pode indicar uma possível haploinsuficiência deste gene e um ineficiente papel da indução de diferenciação do clone mutado.

Figura 63 Modulação da transcrição de OCT4 nos clones mutados em heterozigose para os genes RELA e RELB A expressão relativa dos transcritos para os genes OCT4 foi analisada por RT-qPCR após a indução de diferenciação mediada por atRA (10 uM) por 96 horas em clones de células da linhagem H9 (** = $p < 0,005$; *** = $p < 0,0005$).

7. DISCUSSÃO

Estudos realizados anteriormente em nosso grupo de pesquisa mostraram por análise de expressão gênica que células-tronco hematopoiéticas primitivas de cordão umbilical, quando comparadas com células-tronco hematopoiéticas da medula óssea, apresentaram alta expressão de fatores transcricionais relacionados com hematopoiese primitiva e a autorrenovação, entre eles componentes chaves da via não-canônica de NF- κ B, RELB e NFKB2, sugerindo que esta via poderia estar envolvida na regulação de um fenótipo imaturo nas células-tronco hematopoiéticas (PANEPUCCI et al., 2007, 2010). Outros estudos, muitos deles contraditórios, têm mostrado a participação dos componentes da via canônica e não-canônica de NF- κ B nos processos de diferenciação celular ou na manutenção da pluripotência. Durante anos, desconsiderou-se a complexidade da sinalização de NF- κ B assumindo RELA (quase sempre nomeada como NF- κ B) como protagonista de todos os processos celulares relacionados à via. No artigo pioneiro neste tema, Armstrong et al. identificaram em hESCs a expressão dos genes ativadores da via canônica LCK, PELLINO1 e TNSF11, bem como os componentes da via RELA e NFKB1. Com a finalidade de compreender melhor a ação destes genes em hESCs, eles usaram um inibidor específico de NF- κ B, o pirrolidinadiocarbamato de sódio (PTDC), que impede a entrada de RELA no núcleo. Após 3 dias de tratamento, foi observado que vários núcleos das hESCs não apresentaram marcação para RELA; além disso houve morte celular significativa, redução na expressão de OCT4, NANOG, SOX2, fosfatase alcalina e do marcador de superfície SSEA-4 – fenótipos relacionados à pluripotência celular. De acordo com os autores, isto destacaria a importância de NF- κ B na manutenção da pluripotência bem como na viabilidade celular de hESCs pela primeira vez (ARMSTRONG et al., 2006a; DREESEN; BRIVANLOU, 2007). No entanto, os ensaios de imunofluorescência e de citometria não foram feitos em replicata e não foi realizada nenhuma análise quantitativa ou estatística. A escolha da dose teria sido feita de forma a utilizar a menor dose capaz de inibir a via NF- κ B, mas mencionaram apenas duas doses, uma de 100 μ M e uma de 50 μ M. Não fica claro se outras doses menores foram utilizadas. Desta forma, efeitos inespecíficos da droga podem ser responsabilizados pela citotoxicidade e consequentemente indução da diferenciação. Problemas similares já foram descritos em estudos do papel da via Notch na pluripotência. Inicialmente, esta via era considerada importante para a manutenção da pluripotência e sobrevivência de ESCs (ANDROUTSELLIS-THEOTOKIS et al., 2006; GOKHALE et al., 2007), mas estudos posteriores mostraram que as doses do inibidor utilizado eram citotóxicas e que doses menores inibiam totalmente a via e tinham um efeito oposto, promovendo a proliferação de células indiferenciadas (YU et al., 2008).

Seguindo a linha de raciocínio de Armstrong et al., Kang avaliou o papel de NF- κ B na pluripotência e na diferenciação de hESCs por meio da investigação de eventos de expressão e sinalização intracelular. Para tal, ele comparou a expressão de RELA e NFKB1, por RT-qPCR e *western blotting*, em hESCs e em outras linhagens celulares adultas: os níveis de expressão desses componentes nas hESCs foram significativamente inferiores aos das linhagens adultas. No mesmo estudo, Kang comparou a expressão de RELA entre hESCs indiferenciadas com células induzidas à diferenciação com ácido retinóico (RA, do inglês *retinoic acid*). O tratamento além de trazer diferenças morfológicas entre as condições elevou significativamente a expressão de RELA e NFKB1 e diminuiu a expressão de OCT4, assim como visto no presente trabalho. Mesmo com baixa expressão de RELA e NFKB1 em hESCs, Kang não excluiu a hipótese de que a via canônica de NF- κ B desempenhe um papel importante na autorrenovação de hESCs indiferenciadas. Em paralelo, seu colega de pesquisa Kim publicou seu trabalho em mESCs, no qual relatou que os níveis de expressão de RELA também foram significativamente menores do que em células adultas. Ao examinar a expressão transcricional de RELA e NFKB1 em mESCs diferenciadas (induzidas também por RA) viu que era comparável às mESCs indiferenciadas, entretanto, a expressão proteica de RELA aumentou significativamente com o tempo durante o processo de diferenciação enquanto a expressão de NFKB1 se manteve, sugerindo que o controle pós-transcricional seja crítico para a regulação de RELA durante a diferenciação. Além disso, Kim investigou a ativação de RELA em resposta ao TNF- α e relatou que não observou atividade de ligação de RELA nem antes nem após a estimulação com TNF- α em células indiferenciadas, porém um aumento da ligação de RELA após a estimulação com TNF- α em células induzidas à diferenciação foi claramente observado. Diante destes resultados, o grupo sugeriu que uma menor expressão de RELA pode estar associada a uma menor atividade de sinalização em células indiferenciadas em relação às células diferenciadas. O trabalho de Kim foi um dos primeiros a tentar visualizar a modulação de expressão de RELB durante o processo de diferenciação de mESCs que, assim como RELA e NFKB1, aumentou após a indução de diferenciação. No entanto, o aumento é pouco evidente (comparado com o marcado aumento nos níveis de RELA) e não foi feita uma quantificação das bandas para evidenciar este suposto aumento. Finalmente, a avaliação foi feita em monocata. Portanto, o real aumento de RELB não ficou bem estabelecido (KANG et al., 2007; KIM et al., 2008).

Em 2008, Torres e Watt foram além e estudaram, em mESCs, a relação existente entre NANOG, um fator de pluripotência importante, e a família de proteínas de NF- κ B. Por RT-qPCR, ele confirmou que os transcritos dos genes RELA, NFKB1, RELB, NFKB2 e c-REL

foram expressos em duas linhagens de mESCs testadas e descobriu que NANOG interagia fisicamente com 3 delas: RELA, RELB e c-REL. Outros experimentos demonstraram que o c-terminal de NANOG medeia a interação com estas proteínas e a inibição da transcrição dependente de NF- κ B, revelando uma ligação entre as interações físicas e funcionais de NANOG. Reportaram também que o aumento na fosforilação de RELA, que ocorreu ao longo do tempo após a retirada do LIF do meio de cultura, foi consistente com a regulação positiva da sinalização de NF- κ B durante a diferenciação de mESCs. Ademais, com o uso de mESCs geneticamente modificadas para se tornarem deficientes em NEMO, ativador da via canônica de NF- κ B, os níveis de OCT4, NANOG e SOX2 foram aproximadamente 2 vezes maiores do que em mESCs do tipo selvagem, tanto na presença de LIF como após a sua retirada. Estes resultados indicaram que a via canônica de NF- κ B é regulada positivamente na retirada de LIF e que uma sinalização deficiente de NF- κ B atrasa a perda de marcadores de pluripotência. No presente trabalho, resultado semelhante foi obtido ao realizarmos o *knockout* de um dos alelos do gene RELA em hESCs onde a indução de diferenciação destas células não provocou diminuição significativa da expressão transcricional do marcador de pluripotência OCT4. Em outro experimento, Torres e Watt superexpressou membros diferentes da família de NF- κ B (RELA, o dímero RELB:NFKB2 e c-REL) e uma forma superrepressora do inibidor de NF- κ B I κ B α (I κ B α -SR): a superexpressão de RELA levou à uma mistura de colônias indiferenciadas e diferenciadas que não expressaram OCT4 e NANOG; a superexpressão de c-REL levou a profundas alterações morfológicas em todas as células, perda de NANOG e OCT4 e uma redução acentuada na expressão de SSEA-1. Em contraste com os efeitos da superexpressão das proteínas de NF- κ B, o I κ B α -SR não induziu perda de nenhuma característica do fenótipo pluripotente. Sem traçar uma linha entre as duas principais vias de ativação de NF- κ B, Torres e Watt viram que a transfecção do dímero RELB:NFKB2, que é resultante da ativação da via não-canônica de NF- κ B, foi produzida uma quantidade pequena de colônias contendo células altamente espalhadas e de morfologia diferenciada que não expressavam OCT4 e NANOG. Estes resultados demonstraram mais uma vez a existência de uma relação entre as proteínas de NF- κ B e a diferenciação em mESCs em cultura. Usando conjuntos de dados disponíveis na nuvem, apontaram indícios que a expressão de genes regulados por NF- κ B é inibida em mESCs indiferenciadas e ativada durante a diferenciação. Os resultados também mostraram que 72% dos genes relacionados à família de NF- κ B foram regulados positivamente durante a diferenciação de mESCs. Funcionalmente, examinaram tal achado durante a diferenciação de mESCs e no *knockdown* de NANOG por siRNA. O silenciamento de NANOG causou alterações em 16% dos genes relacionados à NF- κ B. Com o mapeamento dos locais de ligação

de NANOG no genoma de mESCs, descobriram que 10% dos genes relacionados à NF- κ B são também relacionados à NANOG. Estes resultados suportam a ideia de que a expressão gênica dependente de NF- κ B é regulada positivamente durante a diferenciação e que a atividade de NF- κ B é inibida em mESCs indiferenciadas, tendo a atividade de NF- κ B reprimida por NANOG. É importante destacar ainda que, apesar dos resultados de Torres demonstrarem convincentemente o papel da via não-canônica na diferenciação, com a demonstração de que a inibição desta via leva à manutenção da pluripotência e retardo da diferenciação, os experimentos de superexpressão podem trazer resultados menos significantes do ponto de vista fisiológico, uma vez que níveis extremamente altos dos fatores são expressos nas células. Em particular, RELB foi superexpresso juntamente com p52 (a forma processada de NFKB2/p100), enquanto que RELA e REL foram superexpressos sozinhos. Ainda, o trabalho omite a avaliação da marcação de SSEA-3 nas células superexpressando RELB-p52. Portanto, o efeito observado da superexpressão de RelB-p52 pode não refletir seu papel em condições fisiológicas. De fato, o trabalho não discute diretamente questões relacionadas à RELB ou à via não-canônica. (TORRES; WATT, 2008). Anos mais tarde, outro trabalho explorou a atividade supressora de NANOG, como um mecanismo subjacente à redução de fatores pró-inflamatórios sobre a via de NF- κ B como estratégia de tratamento de doenças resultantes da sua superexpressão patológica (DUAN et al., 2013). Opostamente a outros estudos os quais sugerem um papel positivo de NF- κ B na manutenção da pluripotência em hESCs. Tais contradições podem refletir diferenças nos mecanismos de autorrenovação de mESCs e hESCs ou um efeito indireto de NF- κ B atuando em hESCs.

Com uma abordagem mais detalhada que propôs estudar a diferença dos papéis das vias canônica e não-canônica de NF- κ B na pluripotência e diferenciação de hESCs, Yang et al., em 2010, reproduziram muitos dos resultados mostrados por Kang (KANG et al., 2007). O grupo confirmou que a atividade da via canônica de NF- κ B é estimulada durante a diferenciação de hESCs, assim como também visto no presente trabalho. Mostraram ainda uma diminuição significativa na expressão dos ativadores desta via (IKK β , NEMO e BCL3) e um aumento da expressão de I κ B ζ , que é associada com NFKB1 e suprime a atividade de NF- κ B indicando um possível *feedback* negativo da sinalização de NF- κ B. A expressão de RELB e NFKB2 foi significativamente reduzida durante a diferenciação, tanto em nível transcricional como proteico, assim como apresentado aqui nesta tese. Além disso, houve diminuição na expressão proteica de IKK α . Estes resultados levantam a possibilidade de que esta via possa ser uma chave determinante para a transição entre proliferação e diferenciação de hESCs. Também

promoveram a inibição farmacológica de IKK que levou a perda da morfologia compacta das colônias de hESCs, diminuição da proliferação celular, redução do número de células na fase S e aumento do número de células na fase G2/M do ciclo celular. Estes resultados sugeriram que inibição da via canônica de NF- κ B reduz a viabilidade celular em hESCs. Por outro lado, a inibição de IKK causou aumento da expressão de NANOG e OCT4. O mesmo resultado foi encontrado por Torres e Watt ao inibirem a via canônica de NF- κ B, como discutido anteriormente. O *knockdown* de RELA por siRNA promoveu aumento de morte celular, mostrando uma possível importância da via canônica de NF- κ B na viabilidade celular de hESCs. Apesar disto, nossos resultados não evidenciaram efeitos significativos na viabilidade celular mas, após análise por RNA-seq de hESCs após o *knockdown* de RELA, houve um aumento da expressão de genes envolvidos com o ciclo celular, entre eles genes que regulam a p53 e, especificamente, genes que atuam no *checkpoint* entre as fases G2 para a fase M. É importante destacar que o *knockdown* de RELA causou um aumento da expressão de genes diretamente envolvidos com o controle da pluripotência e de vias importantes na manutenção de estado indiferenciado das hESCs, tais como as vias TGF-beta (JAMES et al., 2005; PARK, 2011; MULLEN; WRANA, 2017), WNT (MARSON et al., 2008; SOKOL, 2011; MERRILL, 2012) e FoxO (ZHANG et al., 2011; ORMSBEE GOLDEN; WUEBBEN; RIZZINO, 2013), além de aumentar a expressão de genes relacionados com a formação de spliceossomos em células pluripotentes, tais como SNRPD1 e PNN (KIM et al., 2017), e de vigilância de RNAm responsáveis pelo controle de qualidade da tradução de proteínas. Em relação ao *knockdown* de RELB, Torres e Watt não demonstraram alterações na expressão de NANOG e OCT4, nem alterações como aumento de apoptose celular, diminuição do marcador de superfície SSEA-4 e atividade da fosfatase alcalina, porém observou redução da expressão de SOX2 e aumento da expressão de marcadores de diferenciação, sustentando a ideia de que a via canônica de NF- κ B possa atuar como supressor da diferenciação de hESC. Diferentemente do trabalho de Yang et al., nossos resultados revelaram aumento da morte celular, alterações na morfologia das hESCs, diminuição da porcentagem de células positivas para OCT4, diminuição da intensidade média de OCT4 no núcleo das células transfectadas além da regulação negativa de genes relacionados com vias de metabolismo importantes para a manutenção do estado indiferenciado das células pluripotentes já relatados na literatura científica, tais como vias de metabolismo do carbono (SHYH-CHANG; NG, 2017), ácidos graxos (SHYH-CHANG; NG, 2017), AMPK (LIU; YAMASHITA, 2019), PI3K-AKT (ARMSTRONG et al., 2006b; RAN et al., 2013b; HOSSINI et al., 2016; ROMORINI et al., 2016; YU; CUI, 2016; WANG et al., 2017) e HIF-1 (FORRISTAL et al., 2010; LÓPEZ-IGLESIAS et al., 2015; SUGIMOTO et al., 2018), bem

como genes envolvidos no processos de endocitose, regulação do citoesqueleto de actina, ciclo celular e replicação do DNA. A redução da expressão transcricional de RELB com o seu *knockdown* promoveu um aumento da expressão transcricional de RELA, indicando que RELB possa atuar regulando negativamente a expressão de RELA no estado de pluripotência em hESCs. Nossos dados mais uma vez sugerem que a via não-canônica de NF- κ B possui um papel importante na viabilidade celular e pluripotência.

Assim como no presente trabalho, Yang et al. realizaram ensaio de ChIP com anticorpos anti-RELA e anti-RELB e viram que o anticorpo anti-RELA ocasionou ligação significativa na região promotora de SOX2 e outros genes, tais como CCND1 (relacionado com proliferação celular) e genes relacionados com diferenciação, entretanto não relatou ligação direta com as regiões reguladoras de OCT4 e NANOG. Na imunoprecipitação com o anticorpo anti-RELB detectaram forte ligação de RELB à região regulatória de SOX2, atribuindo a RELB um papel da manutenção da pluripotência (YANG et al., 2010). Concordantemente, nossos resultados mostram a co-ocupação de RELA e RELB em regiões regulatórias de quatro fatores de pluripotência (OCT4, SOX2, KLF4 e MYC) mostrando que os fatores de transcrição de NF- κ B atuam nestes mesmos genes e que, durante a diferenciação, prevalece uma ação de repressão da transcrição gênica dos fatores de pluripotência exercida por RELA uma vez que o aumento de ligação é acompanhado pelo aumento transcricional de RELA e NFKB1, diminuição da transcrição gênica de RELB e dos fatores de pluripotência, mesmo com o aumento da ligação da RNA Polimerase II nas mesmas regiões. Estes resultados fortalecem nossa hipótese de as vias canônica e não-canônica de NF- κ B são multifuncionais em hESCs. A diferenciação foi acompanhada por mudança da sinalização não-canônica para a canônica de NF- κ B que pode ser crítica para a sobrevivência e diferenciação no estado pós-pluripotente de hESCs (YANG et al., 2010). Em contradição ao trabalho de Yang et al., Deng ao inibir a via canônica de NF- κ B em hESCs com o mesmo inibidor de IKK causou a aceleração da diferenciação em MSCs (do inglês, *mesenchymal stem cells*) aumentando também a diferenciação terminal específica da linhagem em osteoblastos e condrócitos. Deng relacionou a diferença entre esses resultados à concentração super-fisiológica de IKK usada por Yang, possivelmente responsável pela morte celular significativa e mudanças morfológicas apresentadas nas hESCs (DENG et al., 2016).

Outras abordagens já foram mostradas como explicação para o controle das vias de NF- κ B na manutenção da pluripotência e diferenciação. Em 2012, Luningschror et al. publicaram que, no estado pluripotente, a tradução de RELA é inibida pelos membros do cluster

miR-290 e que, após a diferenciação de mESCs induzida por RA, a expressão de miR-291b e miR-293 é regulada negativamente, causando um aumento dos níveis proteicos de RELA. Também atribuíram um efeito indutor da via canônica de NF- κ B na transição epitélio-mesenquimal (EMT, do inglês *epithelial–mesenchymal transition*) resultando na perda do fenótipo epitelial e pluripotente. Entretanto, em contraste à regulação positiva da via canônica de NF- κ B, observaram uma forte redução da expressão das subunidades da via não-canônicas (RELB e NFKB1) o que sugeriu um papel desta via no estado pluripotente de mESCs (LÜNINGSCHRÖR et al., 2012; GRUBER et al., 2014). Em outro trabalho publicado naquele mesmo ano, o grupo mostrou que o duplo *knockdown* de IKK α e IKK β , importantes para a ativação da via canônica, não causou perda do fenótipo pluripotente e nem comprometimento da autorrenovação de mESCs mostrando que a via clássica de NF- κ B não tem um papel fundamental na pluripotência (LÜNINGSCHRÖR; KALTSCHMIDT; KALTSCHMIDT, 2012).

Takase et al. estudaram o papel das vias de NF- κ B usando como modelo biológico hiPSCs e demonstraram aumento da atividade de RELA nestas células indiferenciadas. Através da indução de diferenciação das hiPSCs em monocamadas com meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino o grupo viu que a via clássica de NF- κ B foi reprimida. No mesmo trabalho, promoveram o *knockdown* de RELA por siRNA que não mostrou nenhuma alteração no crescimento celular e nem na formação de colônias após 4 dias de tratamento, mas tornaram-se negativas para a coloração da fosfatase alcalina e tiveram a redução da expressão dos marcadores de pluripotência OCT4 e NANOG. Com este conjunto de resultados concluíram que a via canônica de NF- κ B desempenha um papel fundamental na manutenção do estado indiferenciado de hiPSCs (TAKASE et al., 2013). Estes dados contradizem muitos dos trabalhos realizados com mESCs como modelo, e a justificativa utilizada pelo grupo foi que as mESCs e hESCs residem em um estado pluripotente diferente. Soria-Valles et al. através de um estudo dos mecanismos regulatórios que constituem barreiras associadas à idade para a reprogramação de células somáticas, em particular a difícil geração de iPSCs de fibroblastos de pacientes com síndrome de Néstor-Guillermo Progeria (NGPS), levou à análise de genes superexpressos em células destes pacientes. Entre estes, foram descritos os genes da via canônica de NF- κ B. Eles encontraram uma repressão significativa da assinatura de genes relacionados com a diferenciação como consequência da inibição de RELA, bem como a elicitação de genes associados à pluripotência, tais como NANOG e LIN28A, que suportam uma ligação entre a ativação da via e controle da diferenciação celular. Adicionalmente,

observaram redução da expressão de genes repressores da reprogramação (DOT1L e YY1) como consequência da repressão da via canônica. Além do mais, relataram que a eficiência da reprogramação diminui bastante com a idade do doador das células somáticas, levando à uma ausência de clones positivos para TRA-1-60 nas linhagens originadas de células mais velhas após a infecção com OCT4, SOX2, KLF4 e c-MYC. Com o bloqueio de RELA, aumentaram significativamente a eficiência de reprogramação de fibroblastos de doadores em idade avançada, especialmente no caso da linhagem de fibroblastos de um doador de 97 anos de idade, onde a inibição de RELA permitiu a geração de um número significativo de clones de iPSCs (SORIA-VALLES et al., 2015; MARTÍN-SUBERO et al., 2018).

Levando em consideração o trabalho de Yang, que mostrou que a ativação da via canônica de NF- κ B aumenta a sobrevivência celular em hESCs e que a ativação da via não-canônica de NF- κ B desempenha um papel na manutenção da pluripotência de hESCs ligando-se à região reguladora de SOX2, Thakar et al. proporem estudar a relação de RELB dentro destes processos celulares. Para isso, superexpressou RELB em hiPSCs observando níveis aumentados das proteínas IGF2, CCND1, c-MYC, CCNE1, CCNE2 e dos transcritos de CCND1. Esta modulação de expressão gênica causou aumento no número de células na fase S, acompanhado por um declínio na população em G2/M em comparação às células controle. A superexpressão de RELB não afetou a expressão das proteínas da via canônica de NF- κ B, RELA e NF κ B1. Por outro lado, o *knockdown* de RELB em hiPSCs levou à diminuição das células na fase S e aumentou a população na fase G2/M em comparação com hiPSCs transfectadas com um siRNA sem alvo. O *knockdown* de RELB foi acompanhado por uma diminuição de IGF2, da expressão das proteínas CCNE2, c-MYC e CCND1 e diminuição da CCNE1, c-MYC, c-FOS, e dos níveis transcricionais de CCND1. Houve também a redução da expressão de proteínas relacionadas com a via não-canônica de NF- κ B, NF κ B2 e NIK, talvez como efeito de um mecanismo de *feedback* negativo. Ademais, o *knockdown* prolongado (com shRNA) ou a superexpressão de RELB em hESCs ou em hiPSCs não afetou a pluripotencialidade nem a expressão de OCT4 e NANOG. Com estes resultados, Thakar et al. concluíram que a proteína RELB atua modulando a expressão de genes relacionados ao ciclo celular, como IGF2, e a proliferação de hPSCs sem afetar a pluripotência (THAKAR et al., 2015). Estes resultados também conflitam com os achados de Torres no que diz respeito ao papel de RELB. De fato, a superexpressão de RELB sozinho e RELB juntamente com p52 apresentaram resultados contrastantes.

Em resumo, nossos achados fortalecem a hipótese de que as vias canônica e não-canônica de NF- κ B possuem ações antagonistas nos processos de manutenção da pluripotência e diferenciação de hESCs, atuando no mesmo conjunto de genes aqui estudados. Sob indução de diferenciação, as hESCs apresentaram modulação positiva dos componentes-chaves da via canônica de NF- κ B, RELA e NF κ B1, indicando a ativação desta via e seu possível papel no processo de diferenciação celular. Entretanto, o *knockdown* de RELA não causou nenhuma alteração na viabilidade e nas características pluripotentes das hESCs, descartando assim um papel importante na manutenção do estado pluripotente. Sob a mesma condição de indução da diferenciação, houve uma modulação negativa de fatores de transcrição fundamentais para a manutenção da pluripotência acompanhado também por uma modulação negativa de componentes da via não-canônica de NF- κ B, RELB e NF κ B2, indicando a supressão da transcrição destes genes e descartando um papel importante no processo de diferenciação celular. O *knockdown* de RELB resultou em diminuição da viabilidade celular, alteração da morfologia, diminuição da expressão proteica e ativação do fator de pluripotência OCT4 nas células transfectadas mostrando assim um papel importante de RELB na viabilidade celular e manutenção da pluripotência de hESCs.

8. CONCLUSÃO

As vias canônicas e não-canônicas de NF- κ B possuem ações antagônicas nos processos de manutenção da pluripotência de hESCs. A via canônica é ativada, acompanhada com a supressão da expressão dos transcritos dos fatores de pluripotência; enquanto a via não-canônica é suprimida durante a indução de diferenciação. Os fatores de transcrição das duas vias co-ocupam as regiões de regulação gênica dos fatores de pluripotência mas, após indução de diferenciação, é vista uma maior ligação ao DNA exercida por RELA-NFKB1 em comparação àquela de RELB-NFKB2. Entretanto, com a inativação da via não-canônica pelo silenciamento parcial da tradução de RELB, as hESCs perdem alguns fenótipos do estado de pluripotência celular e a viabilidade celular é prejudicada. Por outro lado, o *knockdown* de RELA resultou em um aumento da expressão dos transcritos de vias relacionadas à pluripotência. Além disso, o *knockout* de um dos alelos deste gene resultou em uma deficiência na diminuição de expressão do transcrito de OCT4, um gene crucial para a regulação da pluripotência, durante a diferenciação. Estes dados, juntos, apontam que a via canônica de NF- κ B esteja comprometida com a diferenciação de hESCs e a via não-canônica esteja relacionada com a manutenção da pluripotência e viabilidade de hESCs.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDROUTSELLIS-THEOTOKIS, A. et al. Notch signalling regulates stem cell numbers in vitro and in vivo. **Nature**, 2006.

ARADI, J. et al. **Embryonic and adult stem cells in regenerative medicine I**. [s.l.] University of Debrecen, 2011.

ARMSTRONG, L. et al. The role of PI3K/AKT, MAPK/ERK and NF κ B signalling in the maintenance of human embryonic stem cell pluripotency and viability highlighted by transcriptional profiling and functional analysis. **Human Molecular Genetics**, v. 15, n. 11, p. 1894–1913, 2006a.

ARMSTRONG, L. et al. The role of PI3K/AKT, MAPK/ERK and NF κ B signalling in the maintenance of human embryonic stem cell pluripotency and viability highlighted by transcriptional profiling and functional analysis. **Human Molecular Genetics**, v. 15, n. 11, p. 1894–1913, 1 jun. 2006b. Disponível em: <[http://academic.oup.com/hmg/article/15/11/1894/592247/The-role-of-PI3KAKT-MAPKERK-and-NF \$\kappa\$ B-signalling-in](http://academic.oup.com/hmg/article/15/11/1894/592247/The-role-of-PI3KAKT-MAPKERK-and-NFκβ-signalling-in)>. Acesso em: 14 fev. 2019.

BERNSTEIN, B. E. et al. A Bivalent Chromatin Structure Marks Key Developmental Genes in Embryonic Stem Cells. **Cell**, 2006.

BHARTIYA, D. et al. An Overview of Pluripotent Stem Cells. **Pluripotent Stem Cells of**, p. 3–24, 2013.

BOYER, L. A. et al. Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. **Cell**, v. 122, n. 6, p. 947–956, 2005.

CARPENTER, A. E. et al. CellProfiler: Image analysis software for identifying and quantifying cell phenotypes. **Genome Biology**, v. 7, n. 10, 2006.

CHEN, Y.; LAI, D. Pluripotent States of Human Embryonic Stem Cells. **Cellular reprogramming**, v. 17, n. 1, p. 1–6, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25393391>>.

CHUNG, Y. et al. Embryonic and extraembryonic stem cell lines derived from single mouse blastomeres. **Nature**, 2006.

CONCETTI, J. et al. NFKB1 and Cancer: Friend or Foe? **Cells**, v. 7, n. 9, p. 133, 7 set. 2018. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/2073-4409/7/9/133>>. Acesso em: 12 nov. 2018.

COWAN, C. A. et al. Developmental Biology: Nuclear reprogramming of somatic cells after

fusion with human embryonic stem cells. **Science**, v. 309, n. 5739, p. 1369–1373, 26 ago. 2005. Disponível em: <<http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1116447>>.

COYLE, D. E.; LI, J.; BACCEI, M. Regional differentiation of retinoic acid-induced human pluripotent embryonic carcinoma stem cell neurons. **PLoS ONE**, v. 6, n. 1, 2011.

DE LOS ANGELES, A. et al. Hallmarks of pluripotency. **Nature**, v. 525, n. 7570, p. 469–78, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26399828>>.

DENG, P. et al. Inhibition of IKK/NF- κ B Signaling Enhances Differentiation of Mesenchymal Stromal Cells from Human Embryonic Stem Cells. **Stem Cell Reports**, v. 6, n. 4, p. 456–465, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.stemcr.2016.02.006>>.

DOBIN, A. et al. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. **Bioinformatics**, v. 29, n. 1, p. 15–21, 1 jan. 2013. Disponível em: <<https://academic.oup.com/bioinformatics/article-lookup/doi/10.1093/bioinformatics/bts635>>. Acesso em: 31 jan. 2019.

DONOVAN, P. J.; GEARHART, J. **The end of the beginning for pluripotent stem cells** **Nature**, nov. 2001. . Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/35102154>>.

DREESEN, O.; BRIVANLOU, A. H. Signaling pathways in cancer and embryonic stem cells. **Stem Cell Reviews**, v. 3, n. 1, p. 7–17, 27 jul. 2007. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s12015-007-0004-8>>. Acesso em: 22 nov. 2018.

DUAN, Z. et al. Nanog attenuates lipopolysaccharide-induced inflammatory responses by blocking nuclear factor- κ B transcriptional activity in BV-2 cells. **NeuroReport**, v. 24, n. 13, p. 718–723, 2013.

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

FORRISTAL, C. E. et al. Hypoxia inducible factors regulate pluripotency and proliferation in human embryonic stem cells cultured at reduced oxygen tensions. **Reproduction (Cambridge, England)**, v. 139, n. 1, p. 85–97, jan. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19755485>>. Acesso em: 15 fev. 2019.

FOSTER, C. S. et al. **An introduction to stem cells** **Journal of Pathology**, jul. 2002. . Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/path.1187>>.

GOKHALE, P. J. et al. Cell-Cell Signaling Through NOTCH Regulates Human Embryonic Stem Cell Proliferation. **Stem Cells**, 2007.

GRUBER, A. J. et al. Embryonic stem cell-specific microRNAs contribute to pluripotency by

inhibiting regulators of multiple differentiation pathways. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. 14, p. 9313–9326, 2014.

GU, Z.; EILS, R.; SCHLESNER, M. Complex heatmaps reveal patterns and correlations in multidimensional genomic data. **Bioinformatics**, v. 32, n. 18, p. 2847–2849, 15 set. 2016. Disponível em: <<https://academic.oup.com/bioinformatics/article-lookup/doi/10.1093/bioinformatics/btw313>>. Acesso em: 31 jan. 2019.

HAYDEN, M. S.; GHOSH, S. Signaling to NF- κ B. **Genes & Development**, v. 18, p. 2195–2224, 2004.

HAYDEN, M. S.; GHOSH, S. NF- κ B, the first quarter-century: remarkable progress and outstanding questions. **Genes & development**, v. 26, n. 3, p. 203–34, 1 fev. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22302935>>. Acesso em: 10 nov. 2018.

HOESEL, B.; SCHMID, J. A. The complexity of NF- κ B signaling in inflammation and cancer. **Molecular Cancer**, v. 12, n. 1, p. 86, 2 ago. 2013. Disponível em: <<http://molecular-cancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/1476-4598-12-86>>. Acesso em: 10 nov. 2018.

HOSSINI, A. M. et al. PI3K/AKT Signaling Pathway Is Essential for Survival of Induced Pluripotent Stem Cells. **PLOS ONE**, v. 11, n. 5, p. e0154770, 3 maio 2016. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0154770>>. Acesso em: 14 fev. 2019.

HSU, P. D. et al. DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. **Nature biotechnology**, v. 31, n. 9, p. 827–32, 2013a. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23873081>>5Cn<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC3969858>>.

HSU, P. D. et al. DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. **Nature Biotechnology**, 2013b.

HUANG, D. W.; SHERMAN, B. T.; LEMPICKI, R. A. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. **Nature Protocols**, v. 4, n. 1, p. 44–57, 1 jan. 2009. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nprot.2008.211>>. Acesso em: 31 jan. 2019.

JAMES, D. et al. TGF β /activin/nodal signaling is necessary for the maintenance of pluripotency in human embryonic stem cells. **Development (Cambridge, England)**, v. 132, n. 6, p. 1273–82, 15 mar. 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12163406>>. Acesso em: 15 fev. 2019.

KANG, H.-B. et al. Enhancement of NF-kappaB expression and activity upon differentiation of human embryonic stem cell line SNUhES3. **Stem cells and development**, v. 16, n. 4, p. 615–23, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17784835>>.

KAO, C. F. et al. Human pluripotent stem cells: Current status and future perspectives. **Chinese Journal of Physiology**, v. 51, n. 4, p. 214–225, 2008.

KELLY, S. J. Studies of the developmental potential of 4- and 8-cell stage mouse blastomeres. **Journal of Experimental Zoology**, 1977.

KIM, Y.-D. et al. The unique spliceosome signature of human pluripotent stem cells is mediated by SNRPA1, SNRPD1, and PNN. **Stem Cell Research**, v. 22, p. 43–53, jul. 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28595116>>. Acesso em: 15 fev. 2019.

KIM, Y.-E. et al. Upregulation of NF-kappaB upon differentiation of mouse embryonic stem cells. **BMB reports**, v. 41, n. 10, p. 705–9, 2008. Disponível em: <<http://koreascience.or.kr/journal/view.jsp?kj=E1MBB7&py=2008&vnc=v41n10&sp=705%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18959816>>.

LIU, Y.; YAMASHITA, J. K. AMPK activators contribute to maintain naïve pluripotency in mouse embryonic stem cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 509, n. 1, p. 24–31, 29 jan. 2019. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006291X18325993>>. Acesso em: 14 fev. 2019.

LÓPEZ-IGLESIAS, P. et al. Hypoxia Induces Pluripotency in Primordial Germ Cells by HIF1 α Stabilization and Oct4 Deregulation. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 22, n. 3, p. 205–223, 20 jan. 2015. Disponível em: <<http://www.liebertpub.com/doi/10.1089/ars.2014.5871>>. Acesso em: 15 fev. 2019.

LU, J. et al. All-trans retinoic acid promotes neural lineage entry by pluripotent embryonic stem cells via multiple pathways. **BMC cell biology**, v. 10, p. 57, jan. 2009.

LÜNINGSSCHRÖR, P. et al. miR-290 cluster modulates pluripotency by repressing canonical NF- κ B signaling. **Stem Cells**, v. 30, n. 4, p. 655–664, 2012.

LÜNINGSSCHRÖR, P.; KALTSCHMIDT, B.; KALTSCHMIDT, C. Knockdown of IKK1/2 Promotes Differentiation of Mouse Embryonic Stem Cells into Neuroectoderm at the Expense of Mesoderm. **Stem Cell Reviews and Reports**, v. 8, n. 4, p. 1098–1108, 2012.

MARSON, A. et al. Wnt signaling promotes reprogramming of somatic cells to pluripotency.

Cell stem cell, v. 3, n. 2, p. 132–5, 7 ago. 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18682236>>. Acesso em: 15 fev. 2019.

MARTÍN-SUBERO, J. I. et al. Retraction Note: NF-κB activation impairs somatic cell reprogramming in ageing. **Nature Cell Biology**, 2018.

MARTIN, G. R. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 78, n. 12, p. 7634–7638, 1981. Disponível em: <<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.78.12.7634>>.

MERRILL, B. J. Wnt pathway regulation of embryonic stem cell self-renewal. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 4, n. 9, p. a007971, 1 set. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22952393>>. Acesso em: 15 fev. 2019.

MITCHELL, S.; VARGAS, J.; HOFFMANN, A. Signaling via the NFκB system. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine**, v. 8, n. 3, p. 227–241, 2016.

MULLEN, A. C.; WRANA, J. L. TGF-β Family Signaling in Embryonic and Somatic Stem-Cell Renewal and Differentiation. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 9, n. 7, 5 jul. 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28108485>>. Acesso em: 15 fev. 2019.

NAT, R.; EIGENTLER, a; DECHANT, G. Molecular Mechanisms of Embryonic Stem Cell Pluripotency. **Pluripotent Stem Cells**, n. Figure 1, p. 283–299, 2013. Disponível em: <<http://www.intechopen.com/books/pluripotent-stem-cells/molecular-mechanisms-of-embryonic-stem-cell-pluripotency>>.

OECKINGHAUS, A.; GHOSH, S. The NF- B Family of Transcription Factors and Its Regulation. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 1, n. 4, p. a000034–a000034, out. 2009. Disponível em: <<http://cshperspectives.cshlp.org/lookup/doi/10.1101/cshperspect.a000034>>.

ORMSBEE GOLDEN, B. D.; WUEBBEN, E. L.; RIZZINO, A. Sox2 expression is regulated by a negative feedback loop in embryonic stem cells that involves AKT signaling and FoxO1. **PloS one**, v. 8, n. 10, p. e76345, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24116102>>. Acesso em: 15 fev. 2019.

PANEPUCCI, R. A. et al. Higher expression of transcription targets and components of the nuclear factor-kappaB pathway is a distinctive feature of umbilical cord blood CD34+

precursors. **Stem cells (Dayton, Ohio)**, v. 25, n. 1, p. 189–96, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16973832>>.

PANEPUCCI, R. A. et al. Increased levels of NOTCH1, NF-kappaB, and other interconnected transcription factors characterize primitive sets of hematopoietic stem cells. **Stem cells and development**, v. 19, n. 3, p. 321–332, 2010.

PARK, K.-S. Tgf-Beta family signaling in embryonic stem cells. **International journal of stem cells**, v. 4, n. 1, p. 18–23, jun. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24298330>>. Acesso em: 15 fev. 2019.

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic acids research**, v. 29, n. 9, p. e45, maio 2001.

RAN, F. A. et al. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. **Nat. Protocols**, v. 8, n. 11, p. 2281–2308, 2013a. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2013.143>%5Cn10.1038/nprot.2013.143%5Cn<http://www.nature.com/nprot/journal/v8/n11/abs/nprot.2013.143.html#supplementary-information>>.

RAN, F. A. et al. Double Nicking by RNA-Guided CRISPR Cas9 for Enhanced Genome Editing Specificity. **Cell**, v. 154, n. 6, p. 1380–1389, 12 set. 2013b. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867413010155>>. Acesso em: 12 fev. 2019.

RITCHIE, M. E. et al. limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. 7, p. e47–e47, 20 abr. 2015. Disponível em: <<http://academic.oup.com/nar/article/43/7/e47/2414268/limma-powers-differential-expression-analyses-for>>. Acesso em: 31 jan. 2019.

ROBINSON, M. D.; MCCARTHY, D. J.; SMYTH, G. K. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. **Bioinformatics**, v. 26, n. 1, p. 139–140, 1 jan. 2010. Disponível em: <<https://academic.oup.com/bioinformatics/article-lookup/doi/10.1093/bioinformatics/btp616>>. Acesso em: 31 jan. 2019.

ROMORINI, L. et al. AKT/GSK3 β signaling pathway is critically involved in human pluripotent stem cell survival. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 35660, 20 dez. 2016. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/srep35660>>. Acesso em: 14 fev. 2019.

SEN, R.; BALTIMORE, D. Inducibility of κ immunoglobulin enhancer-binding protein NF- κ B by a posttranslational mechanism. **Cell**, v. 47, n. 6, p. 921–928, 26 dez. 1986. Disponível em:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S009286748690807X>>. Acesso em: 10 nov. 2018.

SHIH, V. F.-S. et al. A single NF κ B system for both canonical and non-canonical signaling. **Cell Research**, v. 21, n. 1, p. 86–102, 23 jan. 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/cr.2010.161>>.

SHYH-CHANG, N.; NG, H.-H. The metabolic programming of stem cells. **Genes & development**, v. 31, n. 4, p. 336–346, 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28314766>>. Acesso em: 14 fev. 2019.

SKOTTMAN, H.; HOVATTA, O. Culture conditions for human embryonic stem cells. **Reproduction**, v. 132, n. 5, p. 691–698, 2006.

SMALE, S. T. Hierarchies of NF- κ B target-gene regulation. **Nature immunology**, v. 12, n. 8, p. 689–94, ago. 2011.

SOKOL, S. Y. Maintaining embryonic stem cell pluripotency with Wnt signaling. **Development (Cambridge, England)**, v. 138, n. 20, p. 4341–50, out. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21903672>>. Acesso em: 15 fev. 2019.

SOLAN, N. J. et al. RelB cellular regulation and transcriptional activity are regulated by p100. **Journal of Biological Chemistry**, 2002.

SORIA-VALLES, C. et al. NF- κ B activation impairs somatic cell reprogramming in ageing. **Nature Cell Biology**, v. 17, n. 8, p. 1004–1013, 27 ago. 2015. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/10.1038/ncb3207>>.

STEVENS, L. C. Studies on Transplantable Testicular Teratomas of Strain 129 Mice2. **JNCI: Journal of the National Cancer Institute**, v. 20, n. 6, p. 1257–1275, 1 jun. 1958. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jnci/article-lookup/doi/10.1093/jnci/20.6.1257>>.

STRELCHENKO, N. et al. Morula-derived human embryonic stem cells. **Reproductive BioMedicine Online**, 2004.

SUGIMOTO, K. et al. Effects of hypoxia inducible factors on pluripotency in human iPS cells. **Microscopy Research and Technique**, v. 81, n. 7, p. 749–754, jul. 2018. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29633433>>. Acesso em: 15 fev. 2019.

TAKAHASHI, K. et al. Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. **Cell**, v. 131, n. 5, p. 861–872, nov. 2007. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867407014717>>.

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. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16904174>>.

TAKASE, O. et al. The Role of NF- κ B Signaling in the Maintenance of Pluripotency of Human Induced Pluripotent Stem Cells. **PLoS ONE**, v. 8, n. 2, p. e56399, 20 fev. 2013. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0056399>>.

THAKAR, N. Y. et al. RELB Alters Proliferation of Human Pluripotent Stem Cells via IMP3- and LIN28-Mediated Modulation of the Expression of IGF2 and Other Cell-Cycle Regulators. **Stem cells and development**, v. 00, n. 00, p. 150505114712009, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25794352>>%5Cn<http://online.liebertpub.com/doi/10.1089/scd.2014.0587>>.

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, 6 nov. 1998. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9804556>>.

THOMSON, J. A. et al. Isolation of a primate embryonic stem cell line. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 1995.

TORRES, J.; WATT, F. M. Nanog maintains pluripotency of mouse embryonic stem cells by inhibiting NF κ B and cooperating with Stat3. **Nature cell biology**, v. 10, n. 2, p. 194–201, 2008.

VIENNOIS, E.; CHEN, F.; MERLIN, D. NF- κ B pathway in colitis-associated cancers. **Translational gastrointestinal cancer**, v. 2, n. 1, p. 21–29, jan. 2013.

WANG, X. Q. et al. CDK1-PDK1-PI3K/Akt signaling pathway regulates embryonic and induced pluripotency. **Cell Death & Differentiation**, v. 24, n. 1, p. 38–48, 16 jan. 2017. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/cdd201684>>. Acesso em: 14 fev. 2019.

WARE, C. B.; NELSON, A. M.; BLAU, C. A. A comparison of NIH-approved human ESC lines. **Stem cells**, v. 24, n. 12, p. 2677–2684, 2006.

WILMUT, I. et al. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. **Nature**, v. 385, p. 810–813, 1997.

WONG, D. et al. Extensive characterization of NF- κ B binding uncovers non-canonical motifs and advances the interpretation of genetic functional traits. **Genome Biology**, v. 12, n. 7, p. R70, 29 jul. 2011. Disponível em:

<<http://genomebiology.biomedcentral.com/articles/10.1186/gb-2011-12-7-r70>>. Acesso em: 10 nov. 2018.

YAMANAKA, S.; BLAU, H. M. Nuclear reprogramming to a pluripotent state by three approaches. **Nature**, v. 465, n. 7299, p. 704–712, 10 jun. 2010. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nature09229>>. Acesso em: 9 nov. 2018.

YANG, C. et al. Opposing putative roles for canonical and noncanonical NF- κ B signaling on the survival, proliferation, and differentiation potential of human embryonic stem cells. **Stem Cells**, v. 28, n. 11, p. 1970–1980, 2010.

YU, J. S. L.; CUI, W. Proliferation, survival and metabolism: the role of PI3K/AKT/mTOR signalling in pluripotency and cell fate determination. **Development (Cambridge, England)**, v. 143, n. 17, p. 3050–60, 1 set. 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27578176>>. Acesso em: 14 fev. 2019.

YU, X. et al. Notch Signaling Activation in Human Embryonic Stem Cells Is Required for Embryonic, but Not Trophoblastic, Lineage Commitment. **Cell Stem Cell**, 2008.

ZHANG, X. et al. FOXO1 is an essential regulator of pluripotency in human embryonic stem cells. **Nature cell biology**, v. 13, n. 9, p. 1092–9, 31 jul. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21804543>>. Acesso em: 15 fev. 2019.

ZHAO, H.; JIN, Y. Signaling networks in the control of pluripotency. **Current Opinion in Genetics and Development**, v. 46, p. 141–148, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.gde.2017.07.013>>.

10. ANEXOS

10.1. Padronização da transfecção de siRNA em hESCs

Após 72 horas de transfecção com um siRNA de efeito apoptótico para as células e um siRNA sem efeito específico, como controle, realizamos a aquisição das imagens por bioimageamento automatizado em um sistema de HCS (do inglês *high content system*), que combina a aquisição automatizada de imagens de microscopia de fluorescência (carregadas em placas de múltiplos poços) com processamento quantitativo de imagens digitais, permitindo a avaliação de múltiplas características morfológicas e fenotípicas das células. A análise foi realizada no software ImageXpress XL (Molecular Devices). A representação das imagens adquiridas respeitando a distribuição na placa está representada na **Figura 33**.

	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	siRNA Controle
B	PBS	0,05	0,075	0,1	0,05	0,075	0,1	0,05	0,075	0,1		PBS	
C	PBS	0,05	0,075	0,1	0,05	0,075	0,1	0,05	0,075	0,1		PBS	
D	PBS	0,05	0,075	0,1	0,05	0,075	0,1	0,05	0,075	0,1		PBS	
E	PBS	0,05	0,075	0,1	0,05	0,075	0,1	0,05	0,075	0,1		PBS	
F	PBS	0,05	0,075	0,1	0,05	0,075	0,1	0,05	0,075	0,1		PBS	
G	PBS	0,05	0,075	0,1	0,05	0,075	0,1	0,05	0,075	0,1		PBS	
H	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	siRNA anti-UBC
Lipofectamine LTX					DharmaFECT 1			DharmaFECT 4			Virgem		

Figura 64 Padronização da Transfecção Reversa Representação esquemática da placa de 96 poços mostrando a distribuição dos reagentes de transfecção testados (Lipofectamine LTX, DharmaFECT 1 e DharmaFECT 4) e os respectivos volumes utilizados para os testes, utilizando moléculas com um controle negativo “Silencer Select Negative Control No. 1 siRNA” e como controle positivo o “siGENOME Human UBC siRNA” para se avaliar a eficiência de transfecção.

Com a análise do ensaio de padronização da transfecção reversa obtivemos acesso à toxicidade das três concentrações dos três reagentes de transfecção aqui utilizados por meio da análise da relação existente entre a quantidade de células vivas após 72 horas da transfecção e das células não-transfectadas (virgens). Os dados da análise estão representados na **Figura 34** que nos permitiu concluir que a toxicidade de todas as condições testadas foi baixa, não causando maiores danos à cultura celular.

Figura 65 Toxicidade dos reagentes de transfecção Representação gráfica dos resultados obtidos da análise da contagem de células em relação ao controle (células virgens) na transfecção em H1, utilizando os reagentes de transfecção Lipofectamine LTX, DharmaFECT-1 e DharmaFECT-4 nas concentrações de 0,05; 0,075 e 0,1 µL/100 µL s.f..

A eficiência de transfecção foi aferida através da relação existente entre a quantidade de células vivas após 72 horas da transfecção com o siRNA anti-UBC e as células transfectadas com o siRNA controle. Os resultados estão representados na **Figura 35**, que permite a conclusão de que para os três reagentes de transfecção testados a maior concentração possui uma maior eficiência, sendo entre os três reagentes o DharmaFECT-4 que possui a maior eficiência.

Figura 66 Eficiência de transfecção dos reagentes Representação gráfica dos resultados obtidos da análise da viabilidade relativa obtida a partir da contagem de células transfectadas com o siRNA anti-UBC em relação ao controle (células transfectadas com o siRNA controle) na transfecção em H1, utilizando os reagentes de

transfecção Lipofectamine LTX, DharmaFECT-1 e DharmaFECT-4 nas concentrações de 0,05; 0,075 e 0,1 $\mu\text{L}/100$ uL s.f..

11. MANUSCRITO

Opposite Effects of NF- κ B Canonical and Non-Canonical Pathways in Pluripotency and Cell Differentiation of Human Stem Cells.

***Hudson Lenormando de Oliveira Bezerra^{1,2,3}, *Ildercílio Mota de Souza Lima^{1,2,3},
Josiane Lilian dos Santos Schiavinato^{1,3}, Sarah Blima Paulino Leite^{1,2,3}, Vitor
Leão^{1,2,3}, Dimas Tadeu Covas^{2,3}, Marco Antônio Zago^{2,3}, Rodrigo Alexandre
Panepucci^{1,2,3}.**

¹Laboratory of Functional Biology (LFBio), Center for Cell Therapy (CTC) and Regional Blood Center, Ribeirão Preto, SP, Brazil. ²Department of Genetics, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil. ³Medical School of Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, SP, Brazil.

* contributed equally to the study

Corresponding Author:

Rodrigo Alexandre Panepucci, PhD.
Laboratory of Functional Biology
Regional Blood Center
R. Tenente Catão Roxo, 2501
14051-140 Ribeirão Preto, Brazil
Telephone +55 (16) 2101-9300 (R: 9722)
Fax +55 (16) 2101-9309
e-mail: rapane@gmail.com

Running Head: NF- κ B pathway in pluripotency and cell differentiation

Authorship & Contributions

HLOB: Conception and design, Collection and/or assembly of data, Data analysis and interpretation, Manuscript writing, Final approval of the manuscript.

IMSL: Collection and/or assembly of data, Data analysis and interpretation, Manuscript revision, Final approval of the manuscript.

JLSS: Design, Manuscript revision, Final approval of the manuscript.

SBPL: Collection and/or assembly of data, Data analysis and interpretation, Manuscript revision, Final approval of the manuscript.

DTC: Conception, Manuscript revision, Final approval of the manuscript.

MAZ: Conception, Manuscript revision and Final approval of the manuscript.

RAP: Conception and design, Collection and/or assembly of data, Data analysis and interpretation, Manuscript writing, Final approval of the manuscript.

ABSTRACT

Genetic mechanisms responsible for the maintenance of human pluripotent stem cells (hPSCs) identity are not fully understood. *OCT4*, *NANOG*, *SOX2*, *KLF4*, and *MYC* are considered major pluripotency transcription factors (TF) in hPSCs, nevertheless, distinct pathways and downstream TFs are also involved. There are conflicting results to whether NF- κ B, through the classical or the alternative non-canonical pathway, mediated, respectively, by TF complexes composed of RELA/NF κ B1 or RELB/NF κ B2, would be involved in the regulation of pluripotency/differentiation. Upon atRA-induced differentiation of the pluripotent embryonal carcinoma cell line NTera-2, transcript levels of *RELA* and *NF κ B1* are induced, while, *RELB*, *NF κ B2*, and the pluripotency factors *OCT4*, *NANOG*, *SOX2*, and *KLF4* were all downregulated. Moreover, chromatin immunoprecipitation (ChIP) assays revealed that RELA binds strongly to the regulatory regions of *OCT4*, *SOX2* and *KLF4* when cells are induced to differentiate, while, RELB binds these regions, both, in pluripotent or differentiating cells. This data suggests that the canonical NF- κ B pathway may be associated with differentiation and cell fate processes by downregulation of genes responsible for the pluripotent identity and that the non-canonical NF- κ B pathway may act in the maintenance of pluripotency through the upregulation of the same factors. We further explored the roles of canonical and non-canonical NF- κ B in this context, by functionally evaluating the effects of siRNA-mediated knockdown of RELA and RELB. We transfected two different models of human pluripotent cells and using quantitative high-content immunofluorescence microscopy analysis (HCA), we observed the effects of silencing canonical or non-canonical NF- κ B pathway on the pluripotent phenotype. Our results show that RELB silencing led to differentiation-related features, including decrease in total cells number, OCT4 expression and OCT4 positive population.. Moreover, *RELB* knockdown led to increased *RELA* transcript levels. Our result further supports that non-canonical NF- κ B may act in the maintenance of pluripotency, while, canonical NF- κ B may be associated with differentiation, by downregulating key pluripotency genes.

INTRODUCTION

NF- κ B family consists in a group of transcription factors (TFs) that orchestrate complex biological processes, mainly the inflammatory response. Since its discovery, more than 30 years ago, this family of TFs has been related to a wide variety of normal and pathological processes and it is known for being expressed in nearly all types of cells and tissues. These bind on a large number of critical genes promoters in an elaborate system that allows cells to adapt and respond to environmental changes. In addition to its important role in immune responses, this family of TFs participates in other important processes like apoptosis, proliferation, differentiation and cellular development. In mammals, the NF- κ B TFs consist of five proteins: *RELA*, *RELB*, *c-REL*, *NFKB1*, and *NFKB2*, which are associated with others to form homo and heterodimers transcriptionally active complexes. Through combinatorial associations, members of the "Rel family" of proteins can form up to 15 different dimers. Some of them are well known, as *RELA/NFKB1*, which is the most abundant dimer found in almost all cell types (Oeckinghaus and Ghosh, 2009).

Different mechanisms can activate NF- κ B pathway and depending on the component members involved with the process, this activation can be given in acanonical (or classical) or noncanonical (or constitutive) way. The NF- κ B canonical pathway is usually induced by cytokines (such as TNF α , IL-1) and LPS and it is activated by I κ Bs degradation (κ Bs inhibitors), especially I κ B α that results in nuclear translocation of several NF- κ B complexes, predominantly *RELA/NFKB1*, where it will activate or repress the transcription of target genes (Smale, 2011). On the other hand, noncanonical NF- κ B pathway is represented by the activation of *RELB/NFKB2* through a complex mechanism that depends on the processing of inducible p100 instead of I κ B α degradation. The IKK α activation by NIK (kinase inducer of NF- κ B) after stimulation of cytokines leads to formation of NIK/IKK α /p100 complex, resulting in p100 phosphorylation, which is processed to p52 (*NFKB2*) by 26S proteasome, enabling complex *RELB/NFKB2* assemble (Viennois et al., 2013).

Some studies have presented evidence of canonical and noncanonical NF- κ B pathway components involvement with differentiation and maintenance of pluripotency in stem cells. Embryonic stem cells (ESC) are the most well-known pluripotent cells and due to their high potential for regenerative medicine studies, a great effort has been

devoted to the understanding of the molecular mechanisms regulating the basic properties of pluripotency (Thomson et al., 1998). A set of core TFs, including OCT4, SOX2, KLF4, and c-MYC (OSKM), is known for sustaining pluripotency in ESCs (Boyer et al., 2005; Loh et al., 2006), and the understanding of how these TF work, as well as the exploration of the knowledge obtained during the process of understanding the molecular bases of pluripotency, led to the advent of induced pluripotent stem cells (iPSCs), which are pluripotent cells derived from the nuclear reprogramming of somatic cells by ectopic expression of pluripotency related TF like OSKM (Takahashi and Yamanaka, 2006; Yu et al., 2007).

The embryonal carcinoma cells (ECC) compound another source of pluripotent stem cells (PSC) for studying pluripotency and cell differentiation. These cells are obtained from teratocarcinomas, highly malignant tumors containing a disorganized set of somatic and extra-embryonic cells together with populations of highly undifferentiated cells (Andrews et al., 2005). Usually, they possess some advantages to work with as compared to ESC, as they can grow in undifferentiated state absence of LIF, bFGF or a layer of feeder cells. Extensive studies during the 1970s also showed a close relationship between mouse embryonic carcinoma cells and pluripotent cells of the internal cell mass of mouse blastocysts. This knowledge, together with the understanding of how to culture and characterize embryonic carcinoma cells *in vitro*, made it possible to isolate embryonic stem cells from the internal cell mass of mouse embryos in 1981 (Martin, 1981).

Previously, our group found that primitive cord blood hematopoietic stem cell have higher expression of noncanonical NF- κ B pathway (RELB and NFKB2) TFs. These cells are related to early hematopoiesis and self-renewal, when compared to bone marrow cells, which bring us the hypothesis that noncanonical NF- κ B pathway may be involved with the regulation of a more undifferentiated stem cell state (Panepucci et al., 2007). Although many studies have shown the participation of canonical and noncanonical NF- κ B components in pluripotency and cell fate, the role of NF- κ B pathways in this sense is not very well understood. With that in mind, here we evaluated the relationship between NF- κ B components, looking to the canonic and noncanonic-related components individually, aiming to understand their roles in pluripotency and differentiation of human pluripotent stem cells (hPSC).

RESULTS

Expression of canonical and non-canonical NF- κ B components behave in opposite way during atRA-induced differentiation

Relative expression analysis of the genes that act on canonical and non-canonical activation of NF- κ B was done having reference to the data from condition atRA mediated differentiation under untreated cells. The experimental design is shown in Figure 1A. Figure 1B shows the relative expression of RELA, NFKB1, RELB, and NFKB2. It can be noted that the mean expression of RELA and NFKB1 was elevated with 4 days atRA treatment, the difference in the expression of RELA being statistically significant ($p = 0.004$), and the relative expression means of RELB and NFKB2 during the induction time. We analyzed in sequence the relative gene expression of pluripotency factors OCT4, NANOG, SOX2, and KLF4. The means of expression levels of the transcripts in the groups treated and not treated with atRA after 4 days of cell culture represented are plotted in Figure 1C. The expression levels of the OCT4, NANOG, and SOX2 genes were reduced when compared to the untreated condition and were statistically significant ($p = 0.0002$, $p = 0.007$ and $p = 0.02$, respectively). The expression of the KLF4 gene, on average, was also reduced after 4 days of culture in the presence of atRA, although it was not statistically significant.

RELA binding on promoter regions of pluripotency-regulating genes increases after induction of differentiation

Figure 1D shows enrichment of the RELA and RELB transcription factors in immunoprecipitation performed with pluripotent cells and also atRA-mediated differentiation in the promoter regions of OCT4, SOX2, KLF4, and MYC genes. Amplifications concerning the possible binding regions of the RELA and RELB transcription factors and of the RNA polymerase II enzyme in regions close to the OCT4, SOX2, KLF4 and MYC genes were normalized through the input concerning the treated and untreated conditions. The enrichment of RELA in the OCT4 promoter region was approximately 133 folds greater in the differentiating cells than in the pluripotent cells while the enrichment of RELB remained almost equivalent in the two situations. These results were maintained for the pluripotency factors SOX2, KLF4 and MYC with values for enrichment of RELA of 58, 75 and 49 folds, respectively.

RELB silencing leads to cell differentiation-related features in human pluripotent cells

Aiming to functionally evaluate the roles of NF- κ B canonical and noncanonical pathways in pluripotent stem cells, we transfected NTERA-2 (ECC) and H1 (hESC) with siRNA for RELA (siRNA-RELA) or for RELB (siRNA-RELB) individually. Once transfected, these cells were cultured for 4 or 3 days (for NTERA-2 and H1, respectively) and, finally fixed and stained for assessment of the resulting phenotypical changes of NF κ B components silencing by using the High Content Screening (HCS) approach. The assays based on HCS combine the automated acquisition of fluorescence microscopy images (carried in multiwell plates) with quantitative digital image processing, allowing the evaluation of multiple morphological and phenotypic features of cells (Sherman et al., 2011). After transfection with siRNA-RELA and siRNA-RELB, we looked up to five different features: total cells, cell area, percentage of OCT4 positive (+) cells, percentage of OCT4 high cells and average OCT4 nuclear intensity. All these results presented here are relative to control cells, which were transfected with a siRNA negative control, and figures XX and XX show the results obtained from NTERA-2 and H1 cells, respectively.

About the ECC cell line, we observed that the transfection of both siRNA caused a reduction in the number of cells, but only siRNA-RELA caused a difference with statistical relevance (Fig. XX A). No differences were observed in the cell area (Fig. XX B) and percentage of OCT4+ cells (Fig. XX C), but percentage of cells with high expression of OCT4 (Fig. XX D), as well as the OCT4 nuclear average intensity (Fig. XX E) were significantly lower in those cells transfected with siRNA-RELB in comparison with the negative control group. When it comes to the hESC H1, we observed that siRNA-RELB reduced the total number of cells (Fig. XX A), increased the cell area (Fig. XX B), and also reduced the percentage of OCT4+ (Fig. XX C) cells and the OCT4 nuclear average intensity (Fig. XX E) in a significant way, but it did not affect the percentage of OCT4 high cells.

DISCUSSION

We analyzed by RT-qPCR the relative gene expression of 4 pluripotency factors: *OCT4*, *NANOG*, *SOX2*, and *KLF4*. The expression levels of the transcripts of the *OCT4*, *NANOG*, and *SOX2* genes were reduced when compared to the untreated condition. This result was seen in other works with atRA-mediated differentiation in pluripotent cells (Coyle et al., 2011). Expression of *KLF4* gene on average was also reduced after 4 days of culture in the presence of atRA but was not significant. It is possible to observe a high

standard deviation which may be warranted by the expression profile of the embryonal carcinoma cells used as the biological model of this study, since high levels of *KLF4* expression are also reported in some carcinomas (Foster et al., 2005; Pandya et al., 2004). The study proceeded with the analysis of transcripts expression of genes that act in the processes of activation of canonical and non-canonical NF- κ B Signaling. The average *RELA* and *NFKB1* expressions were increased with atRA treatment, and the difference was statistically significant for *RELA* expression ($p = 0.004$) and the average relative expression of *RELB* and *NFKB2* went down during treatment. Previous studies indicated a positive regulation of canonical NF- κ B pathway mediated atRA during differentiation in embryonic stem cells, suggesting a potential role of canonical NF- κ B pathway during the differentiation of these cells. Kang et al. demonstrated through studies of two human embryonic stem cell lines that these cells expressed almost null quantities of *RELA* and *NFKB1* in their undifferentiated state while other adult cell lines showed a high expression of these two subunits. When embryonic stem cell lines were induced to differentiate with atRA for 6 days they started to express *RELA* and *NFKB1* and there was still a decrease in the expression of *OCT4* and *NANOG*, as seen in our results with NTERA-2 in 4 days of atRA treatment. The group also reported that the extrinsic activation of *RELA* by TNF- α in undifferentiated cells and atRA-differentiated cells resulted in migration of this subunit into the nucleus, detectable only in differentiated cells, evidencing by immunofluorescence that *RELA* activity was very low in embryonic stem cells and that its expression, as well as activation, was a process that would arise in the process of cellular differentiation (Kang et al., 2007). In another post-work, the group showed that these same results were also seen in embryonic stem cells of murine origin (Kim et al., 2008). In 2008, Torres and Watt through functional assays examined the effects of direct activation of constitutive transcription or NF- κ B repression in differentiating murine embryonic stem cells. For this, they overexpressed by different transfection members of the NF- κ B family and a super-repressor form of the NF- κ B I κ B α inhibitor (I κ B α -SR), which inhibits *RELA*, *RELB/NFKB2* heterodimer, and REL. The overexpression of *RELA* revealed a mixture of undifferentiated and differentiated colonies that didn't express *OCT4* and *NANOG*, whereas the overexpression of *RELB/NFKB2* resulted in a few differentiated colonies that also did not express *OCT4* or *NANOG*, while *c-REL* overexpression led to profound morphological changes in all cells, loss of *NANOG* and *OCT4* expression and a reduction in *SSEA1* marker expression. In contrast to the effects of overexpression of the *RELA*, *RELB/NFKB2* and *REL* proteins,

overexpression of I κ B α -SR did not induce loss of *NANOG*, *OCT4*, and *SSEA1* expression. These results demonstrated that NF- κ B is involved in the differentiation process of murine embryonic stem cells into culture functioning as a positive differentiation stimulus (Torres and Watt, 2008). In some aspects, Torres and Watt study contrast with ours, which the levels of gene expression of *RELB* and *NFKB2* proteins declined during induction of differentiation in human embryonic carcinoma cells (Armstrong et al., 2006). Possibly non-canonical signaling acts differently inside different species, as in other pathways that in murine are important for the maintenance of pluripotency and are irrelevant in human cells culture systems, as is the case of pathways that are activated by *LIF* (Williams et al., 1988).

Through another approach, Yang et al. studied in greater detail the performance of the two NF- κ B activation pathways and their relationships with pluripotency maintenance and cell differentiation processes and concluded that the canonical pathway is involved in embryonic cell differentiation and their viability, whereas the non-canonical pathway is mainly associated with maintaining the pluripotency state of these cells. In a cell differentiation model based on spontaneous differentiation with generation of embryoid bodies, the authors demonstrated that with cell differentiation there was a decrease in the expression levels of the pluripotency key markers (*OCT4*, *NANOG*, *SOX2*, and *TERT*) and elevation of markers such as *AFP*, *PAX6*, and *KDR* as seen in previous experiments of the group (Armstrong et al., 2006; Yang et al., 2010). In the same study, their analyzes indicated a continuous and significant elevation in the expression of *RELA* and *NFKB1* that is consistent with the involvement of canonical pathway of NF- κ B during the differentiation process. RT-qPCR analyzes also showed a significant decrease in the expression of the I κ B β and I κ B ϵ transcripts as well as the increase of the activators of this same pathway, *IKK2*, and *NEMO*. In contrast to the previous findings, there was a decrease in the expression of transcripts of the NF- κ B family subunits representing the non-canonical pathway *RELB* and *NFKB2* as well as in our study, and it may be presumed that noncanonical pathway is suppressed during the differentiation of human pluripotent cells. Yang and colleagues further performed functional assays that inhibited the canonical pathway by treating cells with an *IKK* inhibitor which resulted in loss of the epithelial and compact appearance of the embryonic stem cells and decreased cell proliferation, but elevated levels of *OCT4* and *NANOG* due to inhibition of the canonical pathway (Yang et al., 2010), corroborating with the work of TORRES and WATT (Torres

and Watt, 2008). In addition, the authors provoked the *knockdown* of *RELA* that was associated with increased cell mortality, indicating that the pathway beside related to cell differentiation would be important for viability. After studying the involvement of the canonical pathway with the differentiation process in embryonic stem cells, they performed some experiments addressing the role of the noncanonical pathway of NF- κ B, which showed a decrease of its components during cell differentiation, as well as in the present work. To investigate this observation, the interfering RNA technique against *RELB* was used. After the knockdown *RELB*, there was a significant decrease in pluripotency markers *OCT4* and *NANOG* but caused a significant reduction of *SOX2* expression. They also reported binding of the *RELB* protein to the promoter region of the *SOX2* transcription factor and the *CDX2*, *BRACHYURY* and *PAX6* genes in undifferentiated human embryonic stem cells. In association with the data obtained from the qPCR for a number of cell differentiation markers after knockdown *RELB*, the group suggested that these findings were consistent with the involvement of *RELB* in the maintenance of pluripotency and differentiation by suppressing the transcription of *Brachyury* and *CDX2* and direct activation of *SOX2* and *PAX6* transcription (Yang et al., 2010). Takase in his work using induced pluripotency cells showed that these undifferentiated cells have a high NF- κ B activity and when spontaneously differentiated by embryoid bodies method presented the opposite. The *RELA* siRNA knockdown resulted in a decrease of expression of *OCT4* and *NANOG*, indicating that the canonical pathway is related to the maintenance of pluripotency. These results contrast with the results of other research groups. The author suggested that such a difference could be related to the differences between the models of cellular differentiation adopted in the experiments (Takase et al., 2013).

With Chromatin Immunoprecipitation (ChIP), we could notice an increase in the binding of *RELA* and *RELB* in the region of gene regulation of 4 factors of pluripotency in the cells under induction of differentiation. Both *RELA* and *RELB* are bound in the regulatory region of *OCT4*, *SOX2*, and *KLF4*, which gene expression was decreased after 4 days of atRA-mediated induction. In this analysis, *RELA* bound in the regulatory region of *OCT4* approximately 133-fold more in differentiating cells than undifferentiated cells while *RELB* binding remained nearly equivalent in both situations. These results were maintained for pluripotency factors *SOX2*, *KLF4*, and *MYC* with values for the ratio of enrichment of *RELA* of 58, 75 and 49 times, respectively. This may indicate that the

transcription factor *RELA* may be negatively regulating the expression of these genes. An observed adverse event was the fact that the same ChIP results found for the *OCT4*, *SOX2*, and *KLF4* genes were seen in the *MYC* gene, but this gene, differently from those, had its expression increased during the differentiation process. Its expression, in NTERA-2 embryonic carcinoma cells, is probably regulated differently than the other pluripotency factors studied here. These data, in general, suggest that the canonical pathway of NF- κ B, through the activation of *RELA*, is intensely involved with the process of cell differentiation of pluripotent cells. In treated cells, when *RELA* is bound in the regulatory region of the pluripotency factors discussed herein there is a decrease in the expression of these genes. This does not occur with the binding of *RELB* in these regions to undifferentiated cells. There was a greater enrichment of *RELB* in the regulatory region of these genes when the cells were in their undifferentiated state and therefore expressing these factors, indicating that the non-canonical pathway of NF- κ B, represented by activation and binding of *RELB* in the target genes, is regulating the expression positively.

This was the first work to evaluate the binding of the *RELA* and *RELB* transcription factors in this set of genes responsible for the pluripotent character of undifferentiated cells during the process of differentiation mediated by atRA in embryonic carcinoma cells NTERA-2. In their undifferentiated state, only *RELB* was bound in the regulatory regions of the *OCT4*, *SOX2*, *KLF4* and *MYC* genes, whereas during the differentiation process these same regions were co-occupied by the *RELA* and *RELB* transcription factors. It can be said that *RELB* remains bound to the binding site of the regulatory regions of these genes but with the beginning of the differentiation and consequent activation of this protein binds forming a complex that would inactivate the activity of RNA Polymerase II blocking the expression of these genes.

MATERIALS AND METHODS

Cell culture and differentiation induction

The human ECC line NTera-2 cl.D1 was purchased from the Cell Bank of Rio de Janeiro (BCRJ) and cultured in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium high glucose, Gibco, #12800-017), supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, GE Life Sciences, #SH30071.03) and subcultured manually using cell scrapers. The hESC line H1 was purchased from WiCell and maintained in a feeder-free condition using the GelTrex matrix (Gibco, # A1413302) and the culture medium mTeSR™-1 (STEMCELL Technologies, # 5850). The cells were subcultured with StemPro® Accutase® Dissociation Reagent (ThermoFisher Scientific, #A1110501) and to inhibit spontaneous differentiation as a result from the enzymatic harvesting, a Rock inhibitor reagent (iROCK, 10μM, Hydrochloride Y-27632, Abcam, #ab120129) was used. Both cell lines were maintained in a humidified incubator, with controlled air humidity (85%), temperature (37°C) and CO₂ concentration (5%).

For evaluating the behavior of NF-κB components transcripts during cell differentiation, NTera-2 cells were cultivated for several 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 the 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. The total RNA of the cells submitted to differentiation and the control groups (cultures w/out atRA) was extracted at three different time points (3, 5 and 9 days in culture).

siRNA transfection

Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific) was used to transfect 10nM of siRNA molecules targeting RELA (ID s11914; #4390825; Thermo Fisher Scientific) or RELB (ID s11918; #4392421; Thermo Fisher Scientific) as well as the negative and positive controls in human embryonal carcinoma cell line NTera-2 cl. D1, according to the manufacturer's instructions. These cells were incubated for 3 and 5 days and they were divided into two different groups: the control group and the one submitted to differentiation with atRA (2 and 4 days of treatment, respectively). Once the incubations were over, the samples were prepared for evaluations by RT-qPCR and immunofluorescence/High Content Analysis (HCA).

RNA isolation and qRT-PCR

Total RNA from all samples was extracted using TRIzol reagent (Thermo Fisher Scientific) according to the manufacturer's instructions and quantified via NanovuePlus (GE Healthcare Life Sciences). The reverse transcription reaction of 1 µg of RNA was carried on with the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific), following manufacturer's instructions. The cDNAs samples were diluted to a final concentration of 10 ng/µL in nuclease-free water (Promega Corporation) for posterior qPCR analysis. The qPCR reactions were performed using the SYBR Green PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific) and signals were detected with Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR System. The expression of the transcripts for OCT4 (forward 5'-GTACTCCTCGGTCCCTTTCC-3' and reverse 5'-CAAAAACCCTGGCACAACACT-3'), SOX2 (forward 5'-ACCAAGACGCTCATGAAGAAGG-3' and reverse 5'-TTCATGTGCGCGTAACTGTC-3'), KLF4 (forward 5'-ACCCACACAGGTGAGAAACC-3' and reverse 5'-ATGTGTAAGGCGAGGTGGTC-3'), and MYC (forward 5'-CAGATCAGCAACAACCGAAA-3' and reverse 5'-GGCCTTTTCATTGTTTTC-3'), were evaluated using primers (Integrated DNA Technologies) while the expression of RELA (HS00153294_M1; Thermo Fisher Scientific), NFkB1 (HS00765730_M1; Thermo Fisher Scientific), RELB (HS00232399_M1; Thermo Fisher Scientific), and NFkB2 (HS00174517_M1; Thermo Fisher Scientific) transcripts using real-time PCR probes. Gene expression data was normalized to GAPDH expression with primers (forward 5'-GAAGGTGAAGGTCTGGAGTC-3' and reverse 5'-GAAGATGGTGATGGGATTTC-3') and probe (4310884E; Thermo Fisher Scientific).

The amplification reactions for these regions were carried out in a CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories) and evaluated using the software Bio-Rad CFX Manager (Bio-Rad Laboratories). Once the data was acquired, the relative enrichment of the specific regulatory regions was obtained by the method described by Pfaffl 2001 (Pfaffl, 2001).

ChIP-qPCR assay

Chromatin immunoprecipitation was performed using the Magna ChIP™ G kit (Merck Millipore) according to the manufacturer's protocol. The chosen antibodies for the qPCR analysis were anti-RelA (sc-372; Santa Cruz Biotechnology) and anti-RelB (sc-226; Santa Cruz Biotechnology).

The ChIP enrichment was accessed by qPCR using primers (Integrated DNA Technologies) targeting the regulatory regions of OCT4 (forward 5'-CCCCACAGAACTCATACGG-3' and reverse 5'-ATCCTCGGACCTGGCTAAG-3'), SOX2 (forward 5'-CTGGCAGGCTGGCTCTGGGA-3' and reverse 5'-GGCTCCTCCACTCGAGCCCA-3'), KLF4 (forward 5'-TGGCCAGTAAAGGTCAAAGG-3' and reverse 5'-CGGTGTGCACTTTTTGAGAG-3') e MYC (forward 5'-GCAGCTATCATTTGCAACACC-3' and reverse 5'-AATGAGGCTTTGGACACACC-3') genes. The amplification reactions for these regions were carried out in a CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories) and evaluated using the software Bio-Rad CFX Manager (Bio-Rad Laboratories). Once the data was acquired, the relative enrichment of the specific regulatory regions was obtained by the method described by Pfaffl 2001 (Pfaffl, 2001).

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). After, they were incubated overnight with a solution containing the following primary antibodies: anti-OCT4 (sc-5279; Santa Cruz Biotechnology) and anti-RELA (sc-372; Santa Cruz Biotechnology) or anti-OCT4 and anti-RELB (sc-226; Santa Cruz Biotechnology). Staining was performed with a goat anti-mouse IgG secondary antibody, DyLight 488 conjugated (#35503; Thermo Fisher Scientific), goat anti-rabbit IgG secondary antibody, DyLight 594 conjugated (#35561; Thermo Fischer Scientific), Hoechst 33342 (#H1399; Thermo Fisher Scientific) and HCS CellMask®Blue (#H32720; Thermo Fisher Scientific) solution. Plates were incubated with this solution for 45 minutes and then washed and kept in PBS (100µL/well). The image acquisition was performed on automated microscope system ImageXpress XLS (Molecular Devices) using the software MetaXpress (Molecular Devices), 10X objective, and fluorescence detection cubes for DAPI (Hoechst 33342 and HCS CellMask® Blue) and FITC (DyLight 488).

Images were analyzed with CellProfiler software (Carpenter et al., 2006) for quantifying fluorescence intensity of the markers in the different cell compartments (nucleus and cytoplasm). Thereafter, the following outputs were used for the analysis: median nuclei OCT4 integrated intensity, median nuclei RELA integrated intensity, and median nuclei RELB integrated intensity. Also, based on the OCT4 intensity, we traced a threshold to identify cells expressing high levels of OCT4 (described as OCT4^{high} cells).

Figure 1 – NF- κ B genes behavior in atRA-induced differentiation in NTERA-2 cells.

(A) Differentiation assay design for RT-qPCR and ChIP-qPCR evaluation; (B) Transcriptional modulation of NF- κ B components upon differentiation; (C) Expression level of pluripotency related genes upon differentiation; (D) results from chromatin immunoprecipitation of RELA e RELB.

Figure 2 – Effects of RELA and RELB silencing in the pluripotent state of NTera-2 cells

Figure 3 – Effects of RELA and RELB silencing in the pluripotent state of H1 cells.

REFERENCES

- Andrews, P. W., Matin, M. M., Bahrami, A. R., Damjanov, I., Gokhale, P. and Draper, J. S.** (2005). Embryonic stem (ES) cells and embryonal carcinoma (EC) cells: opposite sides of the same coin. *Biochem. Soc. Trans.* **33**, 1526.
- Armstrong, L., Hughes, O., Yung, S., Hyslop, L., Stewart, R., Wappler, I., Peters, H., Walter, T., Stojkovic, P., Evans, J., et al.** (2006). The role of PI3K/AKT, MAPK/ERK and NF κ B signalling in the maintenance of human embryonic stem cell pluripotency and viability highlighted by transcriptional profiling and functional analysis. *Hum. Mol. Genet.* **15**, 1894–1913.
- Carpenter, A. E., Jones, T. R., Lamprecht, M. R., Clarke, C., Kang, I. H., Friman, O., Guertin, D. A., Chang, J. H., Lindquist, R. A., Moffat, J., et al.** (2006). CellProfiler: Image analysis software for identifying and quantifying cell phenotypes. *Genome Biol.* **7**,.
- Coyle, D. E., Li, J. and Bacceti, M.** (2011). Regional differentiation of retinoic acid-induced human pluripotent embryonic carcinoma stem cell neurons. *PLoS One* **6**,.
- Kang, H.-B., Kim, Y.-E., Kwon, H.-J., Sok, D.-E. and Lee, Y.** (2007). Enhancement of NF-kappaB expression and activity upon differentiation of human embryonic stem cell line SNUhES3. *Stem Cells Dev.* **16**, 615–23.
- Kim, Y.-E., Kang, H.-B., Park, J.-A., Nam, K.-H., Kwon, H.-J. and Lee, Y.** (2008). Upregulation of NF-kappaB upon differentiation of mouse embryonic stem cells. *BMB Rep.* **41**, 705–9.
- 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**, 7634–7638.
- Oeckinghaus, A. and Ghosh, S.** (2009). The NF- B Family of Transcription Factors and Its Regulation. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **1**, a000034–a000034.
- Panepucci, R. A., Calado, R. T., Rocha, V., Proto-Siqueira, R., Silva, W. A. and Zago, M. A.** (2007). Higher expression of transcription targets and components of the nuclear factor-kappaB pathway is a distinctive feature of umbilical cord blood CD34+ precursors. *Stem Cells* **25**, 189–96.
- Pfaffl, M. W.** (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* **29**, e45.
- Smale, S. T.** (2011). Hierarchies of NF- κ B target-gene regulation. *Nat. Immunol.* **12**, 689–94.

- Takase, O., Yoshikawa, M., Idei, M., Hirahashi, J., Fujita, T., Takato, T., Isagawa, T., Nagae, G., Suemori, H., Aburatani, H., et al.** (2013). The Role of NF- κ B Signaling in the Maintenance of Pluripotency of Human Induced Pluripotent Stem Cells. *PLoS One* **8**, e56399.
- Thomson, J. a., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S. S., Waknitz, M. A., Swiergiel, J. J., Marshall, V. S. and Jones, J. M.** (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* **282**, 1145–7.
- Torres, J. and Watt, F. M.** (2008). Nanog maintains pluripotency of mouse embryonic stem cells by inhibiting NF κ B and cooperating with Stat3. *Nat. Cell Biol.* **10**, 194–201.
- Viennois, E., Chen, F. and Merlin, D.** (2013). NF- κ B pathway in colitis-associated cancers. *Transl. Gastrointest. Cancer* **2**, 21–29.
- Williams, R. L., Hilton, D. J., Pease, S., Willson, T. a, Stewart, C. L., Gearing, D. P., Wagner, E. F., Metcalf, D., Nicola, N. a and Gough, N. M.** (1988). Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. *Nature* **336**, 684–687.
- Yang, C., Atkinson, S. P., Vilella, F., Lloret, M., Armstrong, L., Mann, D. A. and Lako, M.** (2010). Opposing putative roles for canonical and noncanonical NF- κ B signaling on the survival, proliferation, and differentiation potential of human embryonic stem cells. *Stem Cells* **28**, 1970–1980.