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

HUDSON LENORMANDO DE OLIVEIRA BEZERRA

Avaliação do papel da via canônica e não canônica de NFκB na manutenção da pluripotência e na diferenciação, por meio da técnica de imunoprecipitação de cromatina.

Ribeirão Preto

2014

HUDSON LENORMANDO DE OLIVEIRA BEZERRA

Avaliação do papel da via canônica e não canônica de NFκB na manutenção da pluripotência e na diferenciação, por meio da técnica de imunoprecipitação de cromatina.

Dissertação de Mestrado apresentada a
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto,
Universidade de São Paulo, para obtenção
do título de mestre em Ciências

Área de Concentração: Genética

Ribeirão Preto

2014

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

Bezerra, Hudson Lenormando de Oliveira.

Avaliação do papel da via canônica e não canônica de NFκB na manutenção da pluripotência e na diferenciação, por meio da técnica de imunoprecipitação de cromatina.

Ribeirão Preto, 2014.

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

Orientador: Panepucci, Rodrigo Alexandre.

1. Células-tronco Pluripotentes. 2. Carcinoma Embrionário. 3. Pluripotência. 4. Diferenciação. 5. NFκB.

HUDSON LENORMANDO DE OLIVEIRA BEZERRA

Avaliação do papel da via canônica e não canônica de NFκB na manutenção da pluripotência e na diferenciação, por meio da técnica de imunoprecipitação de cromatina.

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Genética.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Alexandre Panepucci.

Aprovado em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

*À minha Amada Mãe, Mulher da minha vida, por sempre ser o meu
exemplo e alicerce sem questionar as minhas escolhas.*

AGRADECIMENTOS

Nunca fui uma pessoa religiosa, mas sempre acreditei em uma energia superior responsável por todas as coisas do Universo, não sei se ele(a) está dentro de mim ou por aí, o que sei é que ele(a) é presente. Começo os meus agradecimentos à Deus, inteligência suprema e causa primária de todas as coisas, que me proporcionou tantas oportunidades vivenciadas durante o mestrado. Oportunidade de crescer como homem, de amadurecer para a vida e pelo aprendizado que sempre estará comigo. Agradeço ainda pelas pessoas que Ele pôs no meu caminho, sem elas eu não seria quem eu sou: uma pessoa que erra, mas que reconhece seu dever e capacidade de ser uma pessoa melhor a cada dia.

Agradeço à minha família: à minha amada Mãe, por me apoiar sem questionar os meus caminhos e abrir mão da minha companhia; ao meu Pai, que já não está entre nós mas tenho certeza que onde ele estiver está orgulhoso pelos meus feitos; aos meus Irmãos, Hugo e Hildene, e aos meus Sobrinhos, Nícollas, Bruno e Benício – nossos laços são eternos selados por nossos genes; à Vaninha e Orlando, meus cunhados.

Aos amigos da minha cidade e estado natal: Hugo, Gurgel, Ítalo, Arlindo, Amanda, Carlos Junior, Porciano, Carol, Helena, Nacor, Tiago, Aila, Verlândia, Luana, Cleuton, Bebel, Flávio, Paulinha, Biana (*In Memoriam*) e muitos outros.

Aos amigos que a graduação me deu: Willi, Bruno, Jannyce, Juliana, Fernanda, Gabi, Carol, Hermany e Hylarina, que seja em Natal, Lisboa, Belém ou Estocolmo eu sei que sempre poderei contar.

Aos amigos que também fazem pós-graduação em Ribeirão Preto, que além de compartilhar esta vida acadêmica que optamos seguir sanam a ausência física das nossas famílias: Leonardo, Djalma, Lilian, Neto, Larissa, Ana, Natália, Fabi, Alexandra, Ana Paula, Mariana, Milena e Patrícia.

À Luiza e Aline, parceiras incondicionais. Obrigado por sempre estarem comigo.

Aos amigos que eu conheci através do Seven-USP: Robson, Rodrigo, André, Ernesto, Michel, Fabrício, César, Evandro, Otávio, Rafael, Thiago, Kiko, Fernando, Larissa, entre outros que deram cores à minha vida ribeirãopretana.

À Dra. Maristela Delgado Orellana, talvez o principal motivo para eu estar aqui. A paixão que eu tenho pelas células foi projetada na admiração que eu sinto por esta mulher, chefe excepcional, figura maternal. Obrigado por confiar em mim e ter aberto as portas do seu laboratório, foram dois anos de aprendizado sempre baseado no respeito. Obrigado pelos devidos puxões de orelha, obrigado por sempre me julgar de forma correta. Obrigado pelas possibilidades. Serei eternamente grato.

À minha antiga casa, o Laboratório de Terapia Celular, e as pessoas que enchem aquele ambiente de vida: Sâmia, Taísa e Karina, obrigado pelo aprendizado e companheirismo; Everton, Priscilla, Patrícia e Aline, obrigado pelos sorrisos partilhados, pelas histórias contadas e pelas refeições recheadas de alegria.

À Profa. Dra. Aparecida Maria Fontes, minha orientadora no primeiro ano de mestrado, por ter aberto as portas da Universidade de São Paulo para mim ao me aceitar como aluno, sem nem me conhecer direito, e por me incentivar muitas vezes a sempre acreditar em mim e manter a fé de que dias melhores virão.

À “Família Hemocentro”, representados por Luiza, Aline, Juliana (japonesa), Ricardo, Lucas, Virgínia (japonesa), Bruninha, Rose, Natália, Daiane, Camila, Karina, Carol e muitos outros.

Aos meus colegas de laboratório Sarah, Danuta, Mariane, Bruno, Lara, Felipe e Helder. Em especial à Josi, Vitor e Ildercílio, essenciais para a realização deste trabalho. Obrigado por tornar os dias de pós-graduação menos sérios.

Às técnicas de laboratório Amélia, Julia, Marli, Bete e Claudinha, pela ajuda técnica e emocional.

Ao meu orientador Prof. Dr. Rodrigo Alexandre Panepucci, por ter aceitado me orientar na metade do meu mestrado. Sou muito grato por ter me dado a mão quando eu precisei e não ter podado minhas asas quando eu quis voar. Obrigado pela oportunidade de aprendizado e crescimento dentro do laboratório e por ter me permitido uma real pós-graduação em genética. Hoje me sinto um pouco geneticista.

À Universidade de São Paulo e ao Programa de Pós-graduação em Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, em especial ao Prof. Dr. Ademilson Espencer e à Susie Nalon, sempre prestativos, 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 Mestre em Ciências e Geneticista.

“Il faut bien que je supporte deux ou trois chenilles si je veux connaître les papillons.”

Antoine DE SAINT-EXUPÉRY.

Le Petit Prince.

RESUMO

BEZERRA, HLO. **Avaliação do papel da via canônica e não canônica de NFκB na manutenção da pluripotência e na diferenciação, por meio da técnica de imunoprecipitação de cromatina.** Dissertação. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, 2014.

As células pluripotentes (CPs), em teoria, são capazes de dar origem a todos os mais de 200 tipos de células do organismo. Na natureza, há três tipos de células pluripotentes: células-tronco embrionárias, células germinais embrionárias e células de carcinoma embrionário. As características das CPs têm permitido um importante avanço para a pesquisa básica e apontam uma grande aplicabilidade na medicina regenerativa. No núcleo das CPs existem fatores atuantes responsáveis pela manutenção da identidade pluripotente; dentre eles destacam-se OCT4, NANOG, SOX2, KLF4 e MYC. Muito já se sabe sobre os mecanismos que estes fatores atuam para promover a manutenção da pluripotência celular. Baseados nestes estudos foi possível gerar células de pluripotência induzida (iPSCs). Porém, os mecanismos moleculares que direcionam a indução da pluripotência ainda não estão muito bem esclarecidos. Alguns estudos revelaram que componentes chaves da via NFκB estão envolvidos na regulação da pluripotência, bem como na diferenciação e destino celular das células-tronco. Neste estudo, analisamos a participação de componentes da via canônica (RelA e NFκB1) e não-canônica (RelB e NFκB2) de NFκB nos processos de diferenciação e destino celular ou manutenção da pluripotência. Para isto usamos técnicas de PCR quantitativa em Tempo Real (qPCR) e Imunoprecipitação de Cromatina (ChIP) investigando os papéis das vias canônica e não-canônica de NFκB na manutenção da pluripotência e diferenciação de CPs, em um modelo de indução de diferenciação celular mediado por ácido trans-retinóico (atRA) em células de carcinoma embrionário NTera-2. Foram avaliadas as ligações dos fatores de transcrição RelA e RelB nas regiões promotoras dos genes OCT4, SOX2, MYC, KLF4 e GFAP e a regulação transcricional associada. Nossos resultados identificaram que as células não tratadas com atRA apresentaram níveis baixos na expressão dos componentes da via canônica de NFκB, RelA e NFκB1, e GFAP e quando induzidas à diferenciação por atRA durante 4 dias esses níveis se elevaram. Uma situação oposta foi vista nos componentes da via não-canônica de NFκB, RelB e NFκB2, e na expressão dos fatores de pluripotência OCT4, NANOG, SOX2 e KLF4, que apresentaram níveis de expressão elevados nas células não tratadas com atRA e sofreram redução com a indução da diferenciação celular. O ensaio de ChIP revelou que RelA liga-se nas regiões de regulação dos genes OCT4, SOX2, KLF4, MYC e GFAP apenas quando a célula está em processo de diferenciação, enquanto RelB se apresentou ligado às mesmas regiões tanto nas células indiferenciadas quanto naquelas induzidas à diferenciação por 4 dias. Com estes dados sugerimos que a via canônica de NFκB pode estar relacionada com o processo de diferenciação e destino celular através da regulação negativa executada por RelA e NFκB1 nos genes responsáveis pela identidade pluripotente das células aqui estudadas enquanto a via não-canônica de NFκB, representada pela ativação de RelB e NFκB2, pode participar na manutenção da pluripotência através da regulação positiva destes mesmos fatores.

Palavras-chave: Células Pluripotentes; Carcinoma Embrionário; Pluripotência; Diferenciação; NFκB.

ABSTRACT

BEZERRA, HLO. **Evaluation of canonical and non-canonical NF κ B pathways in the maintenance of pluripotency and differentiation by chromatin immunoprecipitation technique.** 2014. Master's Thesis. Ribeirão Preto Medical School, 2014.

Human pluripotent stem cells (hPSCs) are able to give rise to all the 200 cell types of the adult organism. In nature, there are three types of hPSCs: embryonic stem cells, germ line stem cells and embryonal carcinoma cells. hPSCs' characteristics have allowed a major advance in basic research, and are thought to have great applicability in regenerative medicine. In the nucleus of hPSCs there are transcription factors responsible for the maintenance of their pluripotent identity. OCT4, NANOG, SOX2, KLF4 and MYC are considered the core pluripotency factors in hPSCs. A great deal of knowledge about the mechanisms that promote and maintain pluripotency has been generated. Based on these studies it was possible to generate induced pluripotent stem cells (iPSCs). However, the molecular mechanisms that drive the induction of pluripotency are not fully understood. Some studies have recently indicated that key components of the NF κ B may be involved in regulating pluripotency as well as cell differentiation and cell fate. In this study we analyzed the involvement of components of the canonical (RelA and NF κ B1) and the non-canonical NF κ B pathways (RelB and NF κ B2) in the maintenance of pluripotency, differentiation and cell fate processes. The techniques of quantitative real-time PCR (qPCR) and chromatin immunoprecipitation (ChIP) were used to interrogate the roles of the canonical and non-canonical NF κ B pathways in maintenance of pluripotency and differentiation in a model of cell differentiation induced by all trans-retinoic acid (atRA) on embryonal carcinoma cells NTera-2. The transcription factors RelA and RelB occupancy in the promoter regions of OCT4, SOX2, KLF4, MYC and GFAP, and the transcriptional regulation associated were evaluated. Our results showed that undifferentiated cells exhibited low expression levels of canonical NF κ B pathway components, RelA and NF κ B1, while cells induced to differentiate for 4 days exhibited downregulated expression of these factors. In the other hand, the non-canonical NF κ B pathway components, RelB and NF κ B2, and the pluripotency factors OCT4, NANOG, SOX2 and KLF4 were expressed in higher levels in undifferentiated cells, and were downregulated upon the differentiation process. ChIP assay revealed that RelA binds to the regulatory regions of OCT4, SOX2, KLF4, MYC, and GFAP only when cells are induced to differentiate, while RelB was found bound to the same regions in both undifferentiated and differentiated cells. This data suggests that the canonical NF κ B pathway may be associated to 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.

Key words: Pluripotent Stem Cells; Embryonal Carcinoma; Pluripotency; Differentiation; NF κ B.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
1.1. Células-tronco Humanas.....	16
1.1.1. Células-tronco Pluripotentes.....	17
1.1.1.1. Células-tronco Embrionárias.....	18
1.1.1.1.1. Fatores de Pluripotência	20
1.1.1.2. Células de Carcinoma Embrionário	23
1.1.1.2.1. Diferenciação de Células de Carcinoma Embrionário	26
1.2. Vias de Sinalização NFκB.....	26
1.3. Imunoprecipitação de Cromatina.....	30
2. OBJETIVOS.....	34
2.1. Objetivo geral	35
2.2. Objetivos específicos	35
3. METODOLOGIA	36
3.1. Cultura celular e condições de cultivo.....	37
3.1.1. Indução de diferenciação celular	38
3.2. Extração de RNA.....	38
3.3. Transcrição Reversa	39
3.4. RT-qPCR	39
3.5. Imunoprecipitação de Cromatina.....	43
3.5.1. Crosslinking	43
3.5.2. Lise celular.....	43
3.5.3. Sonicação para fragmentação do DNA.....	44
3.5.4. Imunoprecipitação das Proteínas “crosslinkadas” com o DNA	45
3.5.5. Reversão do complexo proteína-DNA e eluição do DNA.....	46
3.5.5.1. Purificação do DNA	46
3.6. ChIP-qPCR	47
3.6.1. Desenhos dos Primers para regiões do DNA com afinidade aos Fatores de Transcrição	48
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
4.1. Cultura de NTERA-2 para o ensaio de ChIP.....	50
4.2. RT-qPCR dos marcadores de pluripotência.	54
4.3. RT-qPCR dos genes das vias canônica e não canônica de NFκB	56
4.4. RT-qPCR dos genes MYC e GFAP	60

4.5. ChIP-qPCR	61
5. CONCLUSÃO	71
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73

1.INTRODUÇÃO

As mudanças nos hábitos de higiene, acompanhados por novos conhecimentos científicos que nos permitiram compreender como o nosso corpo funciona e como os agentes patogênicos nos prejudicam, juntamente com a descoberta de princípios ativos que vieram a diminuir nossas mazelas e até promovendo a cura de muitas doenças, fizeram com que nossa expectativa de vida aumentasse consideravelmente nos últimos 100 anos. Ainda nos encontramos longe do ideal de vida longa, instigando ao homem evoluir neste sentido. Hoje, a pesquisa com células-tronco é considerada uma forte candidata a gerar revolucionárias técnicas de regeneração e reposição de células, tecidos e órgãos que seriam empregados no tratamento das mais diversas patologias. Apesar deste ser um assunto relativamente novo no campo das ciências biomédicas, a ideia básica da medicina regenerativa é algo existente há muito tempo em nossa sociedade. Desde a Grécia Antiga o homem tinha a vaga ideia de que alguns órgãos, como o fígado, tinham a capacidade de se regenerar. O que pode ser constatado através da obra Teogonia, ou A Origem dos Deuses, do poeta grego Hesíodo, que narra que Zeus furioso com Prometeu, devido ao roubo da centelha divina que deu origem ao homem e a civilização, o puniu acorrentando-o em uma montanha e permitindo que todos os dias uma águia viesse devorar parte de seu fígado, que sempre regenerava no decorrer das noites que se sucediam e na manhã seguinte era novamente devorado pelo mesmo animal. Através dos tempos, ele suportou tal agonia até que o herói Hercules o libertasse (CHEN; CHEN, 1994).

Ao longo dos séculos, a ciência tem progredido e já possui muitas das respostas ligadas àquela primitiva ideia de regeneração tecidual, principalmente no que diz respeito ao grupo de células-tronco. Muitos dos mecanismos responsáveis pelo papel fundamental destas células já foram evidenciados, outros, porém, não, como é o caso dos mecanismos envolvidos no potencial terapêutico das mesmas, que de maneira geral é traduzido de acordo com sua potencialidade e pluripotência, bem como as redes de sinalização genéticas que interagem para a manutenção da pluripotencialidade e aquelas envolvidas durante o processo de perda da

pluripotência e consequente diferenciação celular. Sabemos que as características e funções de uma célula são determinadas através do perfil de expressão de genes que são específicos de acordo com o tecido e sua função no organismo. Todas as células de um organismo possuem a mesma informação genética. Diante disto, há a necessidade de uma regulação gênica complexa que irá definir quais genes e em que momentos serão expressos ou terão sua expressão inibida para que a célula assuma o perfil desejado para atender suas funções do tecido ao qual ela fará ou faz parte. A regulação da expressão gênica em células-tronco é bem estudada, mas não completamente conhecida. Muitos dos genes responsáveis pelas características indiferenciadas destas células já foram descritos, no entanto, a maneira pela qual estes genes interagem com outras famílias gênicas permanece em intenso estudo. Neste trabalho propomos entender melhor a relação de genes relacionados com o caráter celular indiferenciado com os genes da família de NF κ B, os quais estão inseridos normalmente em um contexto diferente possuindo papéis variados nos organismos. Atendemos esta proposta através do uso de técnicas de estudos da expressão gênica a nível transcricional, além de avaliar o envolvimento de seus fatores de transcrição atuantes na inibição ou indução da expressão gênica.

1.1. Células-tronco Humanas

As células-tronco são capazes de originar os mais variados tipos celulares do corpo humano e podem ser encontradas na maioria dos órgãos do corpo. O que as definem é a sua capacidade de se dividir indefinidamente e o seu potencial para dar origem a outros tipos de células maduras especializadas. Algumas propriedades as tornam especiais em relação às demais células somáticas. ALISON e colaboradores (2002), fazem algumas descrições gerais: estão no início do fluxo celular, especialmente quando o fluxo de células é unidirecional, como no intestino delgado, onde há células em constante divisão e amadurecimento em uma extremidade e em descamação ou apoptose no outro lado – isso tem sentido devido a

necessidade de manutenção da população de células-tronco deste nicho; são uma população de células autossustentáveis – quando uma célula-tronco se divide, as células-filhas podem seguir dois caminhos diferentes: um deles leva à formação de uma célula diferenciada especializada, o outro leva à autorrenovação a fim de se manter indiferenciada garantindo assim que um grupo de células-tronco permaneça presente no órgão adulto (GARDNER, 2002).

A divisão celular assimétrica das células-tronco é um importante mecanismo fisiológico para a manutenção da composição celular de tecidos e órgãos do corpo; estas células são relativamente indiferenciadas, o que significa que na maioria dos tecidos as células-tronco não têm a funcionalidade das descendentes que originam; são cíclicas, mas muito lentamente clonogênicas. Dessa forma, é prudente restringir a divisão celular, pois a síntese de DNA pode ser propensa a erros, assim, em muitos tecidos, as células-tronco dividem-se com menos frequência. Além disso, Gardner (2002) enfatiza que outro atributo interessante das células-tronco é a plasticidade celular, ou seja, sua capacidade de se diferenciar em tipos celulares diferentes dos tecidos em que normalmente residem.

As células-tronco de mamíferos são geralmente classificadas em totipotentes, pluripotentes, multipotentes, oligopotentes e unipotentes de acordo com o tecido de origem e com a sua potencialidade. Células-tronco totipotentes têm a capacidade de formar todos os tipos de células do conceito, incluindo o feto e a placenta. Estas células têm capacidade ilimitada, pois podem formar basicamente todo o organismo, porém, por questões éticas, não podemos fazer uso delas e como alternativa focamos o estudo no grupo das células-tronco pluripotentes.

1.1.1. Células-tronco Pluripotentes

Em teoria, as células-tronco pluripotentes têm a capacidade de formar todos os mais de 200 tipos de células do corpo, originados a partir das três camadas germinativas: ectoderme, mesoderme e endoderme. Naturalmente, há três classes de células-tronco pluripotentes: células-

tronco embrionárias, células germinais embrionárias e células de carcinoma embrionário (Figura 1) (DONOVAN; GEARHART, 2001).

Figura 1 - Origem e tipos de células pluripotentes humanas (Retirado de DONOVAN; GEARHART, 2001).

1.1.1.1. Células-tronco Embrionárias

Na natureza as células-tronco embrionárias são efêmeras, elas foram isoladas pela primeira vez a partir de camundongos e posteriormente de seres humanos a partir de embriões, mais especificamente a partir da massa celular interna (ICM) do blastocisto (BHARTIYA et al., 2013; MARTIN, 1981; THOMSON, 1998). Uma vez isoladas, são capazes de se proliferar *in vitro* ilimitadamente em seu estado indiferenciado (EVANS; KAUFMAN, 1981). As características essenciais das células-tronco embrionárias de primatas incluem (i) origem a partir de um embrião pre-implantado, (ii) prolongada proliferação em estado indiferenciado e (iii) potencial para formar derivados de todas as três camadas germinativas (Figura 2) (THOMSON, 1998). Elas ainda são capazes de produzir quimeras, quando injetadas em

blastocistos, mas por motivos éticos e práticos, em muitas espécies de primatas, o que inclui os seres humanos, a capacidade das células-tronco embrionárias para formação de quimeras não é uma propriedade testável.

O contínuo subcultivo *in vitro* e desenvolvimento destas células depende de uma camada de fibroblastos embrionários (murinos) de alimentação que levam ao desenvolvimento da linhagem que podem ser expandidas e sob condições ótimas de cultura se dividem simetricamente dando origem à outras células-filhas. Quando cultivadas em superfícies não aderentes tendem a agrupar-se para formar agregados 3D conhecidos como corpos embrióides (Figura 2) (BHARTIYA et al., 2013). As linhagens de células-tronco embrionárias expressam a proteína telomerase, garantindo que a extremidade do telômero dos cromossomos seja mantida intacta em cada divisão celular, evitando que as células sejam submetidas à senescência, e também mantêm um cariótipo normal após passagens contínuas *in vitro*, tornando-as verdadeiramente imortais (BOYER et al., 2005b). Bongso e Richards (2004) ainda enfatizam que, para se qualificar uma boa linhagem de célula-tronco embrionária as células têm que expressar em alta quantidade o gene OCT4 e outros fatores de pluripotência, os quais geram proteínas criticamente envolvidas na auto-renovação das células-tronco embrionárias indiferenciadas. Todas estas características, juntas, têm servido como um importante avanço para a pesquisa básica e possuem um grande potencial para a medicina regenerativa. Desta forma, as células-tronco embrionárias podem atuar como ferramentas de pesquisa para a compreensão de eventos complexos que ocorrem durante o desenvolvimento embrionário e no desenvolvimento de doenças. Ademais, são candidatas ideais para estudar a apoptose em fase precoce do embrião, mecanismos de diferenciação celular, mutagênese, rejeição imunológica e envelhecimento, ainda são aplicadas na testagem de drogas terapêuticas, na sua eficiência e toxicidade; e também, têm larga aplicação na engenharia de tecidos (BHARTIYA et al., 2013).

Figura 2 – As células-tronco embrionárias são derivadas a partir da massa celular interna do blastocisto. A massa celular interna é isolada usando dissecação mecânica para remover a trofotoderme e submetendo-a à cultura na presença de células alimentadoras. As células resultantes podem então ser diferenciadas em vários tipos celulares dos três folhetos embrionários através de métodos como a formação de corpos embrióides, co-cultivo com células somáticas e cultura em suportes tridimensionais (Retirado de HYSLOP et al., 2005).

1.1.1.1.1. Fatores de Pluripotência

É de conhecimento de todos a importância biológica e clínica/terapêutica das células-tronco embrionárias, mas todas as suas vantagens vêm acompanhadas por dificuldades éticas que dificultam a sua obtenção. Existe também o fato de que estas células podem gerar rejeição nos possíveis pacientes, o que torna sua aplicação limitada. Partindo do conhecimento de que células somáticas podem ser reprogramadas à estágios de pluripotência através de fusão celular com oócitos (WILMUT et al., 1997) ou células-tronco embrionárias (COWAN et al., 2005), indagou-se sobre os genes responsáveis pela identidade pluripotentes das células.

A descoberta da reprogramação de células somáticas em iPS forneceu informações essenciais sobre o papel dos fatores de transcrição na manutenção da pluripotência. A

identificação de fatores-chave de pluripotência tem sido um avanço na compreensão deste processo. Porém o entendimento das redes de sinalização que envolvem outros fatores de transcrição não é completo. Infelizmente, antes que o potencial das células pluripotentes possa ser aproveitado para a aplicação clínica, é essencial compreender os mecanismos envolvidos na manutenção da pluripotência e indução da diferenciação. Sem uma compreensão mais clara das redes de sinalização envolvidas na manutenção da pluripotência e diferenciação, o uso de células iPS e de células embrionárias em terapia celular será limitado, assim como a nossa capacidade de modular *in situ* estas células (GREENOW; CLARKE, 2012).

Para manterem a capacidade de autorrenovação e permanecerem indiferenciadas, as células pluripotentes exigem a cooperação de vários fatores regulatórios, incluindo um conjunto de fatores de transcrição (BOYER et al., 2005a; KIM et al., 2008a), complexos policombe (BOYER et al., 2006; CHAMBERLAIN; YEE; MAGNUSON, 2008), microRNAs (MARSON et al., 2008) e modificações histônicas (BERNSTEIN et al., 2006). Embora o papel exato desses mecanismos ainda não esteja claro, vários estudos têm identificado os principais fatores de transcrição que são necessárias para a pluripotência celular. Dentre eles, OCT4 e NANOG foram os primeiros fatores a serem identificados como essenciais para o desenvolvimento embrionário e manutenção da pluripotência das células-tronco embrionárias (CHAMBERS et al., 2003; MITSUI et al., 2003; NIWA et al., 1998a). Além disso, SOX2, outro fator de transcrição, que heterodimeriza com OCT4, também tem sido relatado como fundamental para a regulação transcricional da rede de pluripotência em células murinas e humanas. Estes três fatores atuam tanto como ativadores como repressores da transcrição e compartilham uma fração substancial de genes-alvo (BOYER et al., 2005a). Muitos outros fatores de transcrição são descritos na cooperação íntima com estes três fatores de pluripotência essenciais. Interessantemente, a expressão ectópica de OCT4, SOX2, MYC e KLF4 foi descrita como suficiente para reprogramar tanto fibroblastos adultos de murinos como de humanos para um

estado celular pluripotente (Figura 3) (MAHERALI et al., 2007; OKITA; ICHISAKA; YAMANAKA, 2007; TAKAHASHI; YAMANAKA, 2006; WERNIG et al., 2007). Estes estudos ainda revelaram a reativação dos genes OCT4, SOX2 e NANOG endógenos após a reprogramação.

As células-tronco embrionárias humanas diferem das de camundongos em vários aspectos (RAO, 2004). As colônias de células-tronco embrionárias humanas são planas e não se sobrepõem como ocorrem nos murinos, além disso, as células humanas dependem de bFGF (do inglês, *basic fibroblast growth factors*) para auto-renovação (AMIT et al., 2000) enquanto que as células embrionárias de camundongos dependem de LIF (do inglês, *leukemia inhibitory factor*) (MATSUDA et al., 1999; NIWA et al., 1998b). BMP (do inglês, *bone morphogenetic proteins*) induz diferenciação em células embrionárias humanas (XU et al., 2005), mas está envolvida na auto-renovação de células embrionárias de camundongos (YING et al., 2003). Apesar destas diferenças, Yamanaka e Kakahashi (2007) mostraram que os mesmos quatro fatores de transcrição são capazes de gerar células-tronco pluripotentes induzidas em ambas as espécies. Outro grupo mostrou que OCT4, SOX2, NANOG e LIN28 foram suficientes para estabelecer células pluripotentes a partir de células somáticas humanas (YU et al., 2007).

Figura 3 – Geração de células-tronco de pluripotência indizada a partir de fibroblastos através da transdução retroviral dos fatores de pluripotência OCT4, SOX2, MYC e KLF4 (Retirado de LEWITZKY; YAMANAKA, 2007).

1.1.1.2. Células de Carcinoma Embrionário

Perante as dificuldades impostas pelo cultivo e manutenção das células-tronco embrionárias e das células-tronco pluripotentes induzidas, bem como as barreiras éticas em sua obtenção, uma alternativa para estudos biológicos que envolvam células pluripotentes são as células de carcinoma embrionário, as quais podem se auto-renovar na ausência de LIF, bFGF ou de uma camada alimentadora.

As células de carcinoma embrionário são originadas a partir de células pluripotentes presentes nos teratocarcinomas, tumores altamente malignos que contêm um conjunto desorganizado de células somáticas e extra-embrionárias, juntamente com populações de células altamente indiferenciadas (ANDREWS et al., 2005). As células de carcinoma embrionário são capazes de se auto-renovarem além de se diferenciarem em uma gama muito ampla de células. Apesar de formarem teratocarcinomas malignos quando transplantadas para locais ectópicos em um organismo, quando reintroduzidas num blastocisto, elas podem se incorporar ao embrião e contribuir para a formação dos tecidos do feto em desenvolvimento (BRINSTER, 1974). A malignidade destas células foi demonstrada pela capacidade de regenerar todo o teratocarcinoma, incluindo os seus elementos diferenciados, demonstrado pelos ensaios clássicos de Kleinsmith e Pierce (1964), através da transplantação de uma única célula de carcinoma embrionário que foi suficiente para gerar um novo tumor em camundongo.

Outros estudos extensivos durante a década de 1970 também mostraram uma estreita relação entre as células de carcinoma embrionário de camundongo e células pluripotentes da massa celular interna de blastocistos de camundongos (JAKOB H, BOON T, GAILLARD J, NICOLAS J, 1973). Estes conhecimentos, juntos com o entendimento de como cultivar e caracterizar células de carcinoma embrionário *in vitro*, tornou possível o isolamento das células-tronco embrionárias a partir da massa celular interna de embriões de camundongos em 1981 (EVANS; KAUFMAN, 1981; MARTIN, 1981). Curiosamente no início de 1980, Evans

e Kaufman (1981) isolaram estas células e curiosamente caracterizaram-nas como linhagens de células-tronco de teratocarcinoma (CHAMBERS; SMITH, 2004).

Uma das linhagens mais antigas estabelecidas a partir de um teratocarcinoma humano é a Tera-2, que foi derivada de uma metástase pulmonar de um tumor de células germinativas testiculares isoladas por Fogh e Tremp em 1975 (HUET et al., 1987). Entretanto, as propriedades pluripotentes do carcinoma embrionário não eram bem conhecidas, devido em parte a manutenção de seu fenótipo indiferenciado que exige que culturas destas células sejam passadas através de raspagem, a fim de obter pequenos aglomerados de células, em vez da tripsinização, resultando em suspensões de células individuais. Em um estudo inicial com essas linhagens, Andrews e colaboradores (1980) já acreditavam no potencial da linhagem de carcinoma embrionário Tera-2. Após uma série de tentativas, o grupo teve sucesso na obtenção destas células a partir de um único tumor de xenoenxerto originado por injeção de Tera-2 em um camundongo imunocomprometido. Parte deste tumor foi reinjetado em outro camundongo imunocomprometido, dando origem a um teratocarcinoma, e outra parte foi posta em cultura celular, dando origem assim à agora chamada NTera-2, nomenclatura dada para designar a sua passagem através de um camundongo *nude*. No entanto, a nova linhagem não se assemelhava morfológicamente às Tera-2 (ANDREWS et al., 1980), mas sim à outras células que se acreditavam representar células de carcinoma embrionário humano (ANDREWS, 1982; ANDREWS et al., 1984).

Atualmente, já se conhece diferentes clones de NTera-2, como o clone B9, clone D3 e o clone D1, que exibem pequenas diferenças em seus cariótipos e uma pequena deriva genética devido aos prolongados períodos de cultivo. No entanto, os números cromossômicos dos clones de NTera-2, e da própria Tera-2, são muito semelhantes - cerca de 61 cromossomos, incluindo uma variedade de rearranjos. Muitos destes rearranjos são comuns a todos os clones e novos rearranjos continuam a aparecer e a caracterizar os clones individualmente (ANDREWS et al.,

1984, 1985). As células de carcinoma embrionário exibem uma variedade de anomalias cromossômicas, como trissomia do cromossoma 6, onde se encontra o gene NANOG (CHAMBERS; SMITH, 2004).

Em seres humanos, os tumores de células germinativas testiculares são responsáveis pela maioria dos cânceres em jovens homens pós-púberes, que apresentam invariavelmente trissomia do cromossomo 12, muitas vezes presente como um pequeno isocromossomo, onde contém uma região similar ao cromossomo 6 de camundongo na qual está localizado o gene NANOG (SKOTHEIM; LOTHE, 2003). Assim como as células de carcinoma embrionário e as células-tronco embrionárias de camundongos, as células humanas expressam caracteristicamente o fator de pluripotência OCT4, que é regulado negativamente no processo de diferenciação, e o *knockdown* deste gene em células de carcinoma embrionário humano usando técnicas baseadas em RNAi (RNA de interferência) resultam na diferenciação destas células no sentido trofotodermico (MATIN et al., 2004; NIWA; MIYAZAKI; SMITH, 2000).

Outras mudanças que têm sido observadas em humanos incluem translocações envolvendo o oncogene MYC (JANSSEN et al., 1986), sendo que baixa atividade de MYC tem sido observada em áreas indiferenciadas nos tumores de células germinativas, enquanto alta atividade é observada em áreas de diferenciação (SIKORA et al., 1985, 1987). As células de carcinoma embrionário NTera-2 também compartilham com células-tronco embrionárias a expressão de genes marcadores característicos, por exemplo, OCT4. Expressam, ainda, antígenos de superfície característicos de células de carcinoma embrionário indiferenciadas: como os antígenos glicolipídicos de estágios embrionários SSEA3 e SSEA4, mas não SSEA1, antígenos de proteoglicanos TRA-1-60, TRA-1-81 e GCTM-2, e L-ALP, uma fosfatase alcalina encontrada no fígado, ossos e rins. Estes mesmos antígenos de superfície são também expressos em células-tronco embrionárias humanas e ainda diferem das células-tronco embrionárias murinas, que não expressam SSEA3 ou SSEA4 (ANDREWS, 2006).

1.1.1.2.1. Diferenciação de Células de Carcinoma Embrionário

Em cultura, as células de carcinoma embrionário podem ser induzidas a diferenciação através da exposição com ácido trans-retinóico (atRA, do inglês *all-trans retinoic acid*). O ácido transretinóico é um dos indutores de diferenciação mais fortes e mais amplamente estudados (NIU et al., 2010). Esta indução promove a geração de células nervosas que permitem a replicação de citomegalovírus (um vírus que pode causar defeitos congênitos em humanos), podendo fornecer um importante modelo que contribui no estudo de mecanismos de diferenciação celular que ocorrem na fase embrionária tornando estas células ferramentas importantes na pesquisa (ANDREWS, 1988).

1.2. Vias de Sinalização NFκB

NFκB é uma família formada por um grupo de fatores de transcrição que orquestram processos biológicos complexos, principalmente a resposta inflamatória. A denominação NFκB é devido ao fato de ser um fator nuclear que se ligava seletivamente no intensificador do gene da cadeia leve kappa e por ter sido inicialmente encontrado em extratos de tumores de células B (BALTIMORE, 2009). Desde sua descoberta, nestes quase 30 anos, a família de NFκB tem sido relacionada a uma ampla variedade de processos normais e patológicos. Estes anos de pesquisa demonstraram que o NFκB é expresso em quase todos os tipos de células e tecidos, e que locais específicos de ligação de NFκB está presente nos promotores de um grande número de genes. Os fatores de transcrição de NFκB 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 de NFκB e dos genes cuja expressão é regulada por esta via de regulação desempenhando papéis importantes e conservados em respostas imunes e em outros processos importantes como apoptose,

proliferação, diferenciação e desenvolvimento celular (Figura 4) (OECKINGHAUS; GHOSH, 2009).

Figura 4 Estímulos de ativação de NFκB e genes alvo. NFκB atua como um mediador central de respostas imunes e inflamatórias e está envolvida na resposta ao estresse e regulação da proliferação celular e apoptose. Os genes alvos de NFκB permitem que o organismo responda eficazmente a mudanças ambientais (Retirada de OECKINGHAUS; GHOSH, 2009).

A família dos fatores de transcrição de NFκB em mamíferos consiste em cinco proteínas: RelA (p65/NFκB), RelB, c-Rel, NFκB1 (p105/p50) e NFκB2 (p100/52) que se associam umas com as outras formando complexos de homo e heterodímeros distintos e transcricionalmente ativos. Através de associações combinatórias, os membros da “família Rel” de proteínas podem formar até 15 dímeros diferentes. 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/NFκB1, que representa o mais abundante dos dímeros da família Rel, sendo encontrado em quase todos os tipos de células.

A família de NFκB pode ser ativada por diferentes mecanismos. Deste modo, de acordo com os membros da família que estão envolvidos na ativação da via, dá-se a

denominação da via de ativação. As duas mais estudadas são a via canônica (ou clássica) e a via não-canônica (ou constitutiva).

A via canônica de NFκB é induzida por citocinas como TNFα (do inglês, *tumor necrosis factor alpha*), IL-1 (do inglês, *interleukin 1*) e LPS (do inglês, *lipopolysaccharide*) e é ativada através da degradação de IκBs (Inibidores de κBs), principalmente IκBα, que resulta na translocação nuclear de vários complexos de NFκB, predominantemente do dímero RelA/NFκB1. A degradação de IκBα é mediada através da sua fosforilação pela cinase IκB (IKK), um complexo trimérico composto por duas subunidades catalíticas, IKKα e IKKβ, e uma subunidade reguladora, IKKγ (ou NEMO, modulador essencial de NFκB), que leva a ubiquitinação de IκBα e subsequente degradação pelo proteossoma 26S. O complexo RelA/NFκB1 se torna livre para se translocar até o núcleo e ativar ou reprimir a transcrição dos genes alvos (SMALE, 2011). A via não canônica (ou constitutiva) de NFκB, por sua vez, é representada pela ativação do heterodímero RelB/NFκB2 através de um mecanismo complexo que depende da transformação induzível de p100 em vez de degradação de IκBα. A ativação de IKKα através de NIK (cinase indutora de NFκB) após o estímulo de citofinas leva a formação do complexo NIK/IKKα/p100 que resulta na fosforilação da subunidade p100, que é processada à p52 (NFκB2) pelo proteossoma 26S, ativando o complexo RelB/NFκB2 (Figura 5) (SMALE, 2011; VIENNOIS; CHEN; MERLIN, 2013).

Figura 5 - Vias de Ativação de NFκB canônica e não-canônica (Retirado de VIENNOIS; CHEN; MERLIN, 2013).

Interessantemente, estudos realizados anteriormente em nosso grupo mostraram por análise de expressão gênica que células-tronco hematopoéticas primitivas de cordão umbilical quando comparadas com células da medula óssea apresentaram alta expressão de fatores de transcrição relacionados com a hematopoiese primitiva e a auto-renovação, entre eles componentes chaves da via NFκB não canônica, RelB e NFKB2, sugerindo que a via NFκB pode estar envolvida na regulação da pluripotência em células-tronco (PANEPUCCI et al., 2007). Outros estudos, muitos deles contraditórios, têm mostrado a participação dos componentes da via canônica e não-canônica de NFκB nos processos de diferenciação e destino celular ou manutenção da pluripotência (ARMSTRONG et al., 2006; KANG et al., 2007; LÜNINGSSCHRÖR; KALTSCHMIDT; KALTSCHMIDT, 2012; YANG et al., 2010).

Entretanto, o papel dos fatores de transcrição das vias de NF κ B nos processos de diferenciação e manutenção da pluripotência ainda não estão bem esclarecidos.

1.3. Imunoprecipitação de Cromatina

Todos os processos biológicos são dependentes da expressão de diferentes genes em combinação, seus produtos agem para mediar as funções celulares. Entender como estes processos controlam a expressão gênica é essencial para compreendermos o desenvolvimento celular e o surgimento das doenças. Entretanto, a regulação da transcrição em eucariotos superiores é complexa. Este fato é reforçado pela existência de um grande número de proteínas que controlam a expressão gênica, os fatores de transcrição, que representam aproximadamente 10% de todos os genes humanos (BABU et al., 2004), além das vastas áreas do genoma que participam na transcrição atuando como suporte para a montagem dos complexos reguladores (CARROLL et al., 2006). Assim, tem-se dedicado muitos estudos para identificar as redes de transcrição e para mapear as regiões do genoma que participam no controle da expressão gênica (COLLAS; DAHL, 2008; KIM; REN, 2006; WU et al., 2006).

Tradicionalmente, as regiões onde estão localizados os promotores dos genes, os quais são considerados como estando próximo aos sítios de início de transcrição (TSSs, do inglês *transcription starting sites*), são tidos como os elementos reguladores mais importantes do genoma. Experimentos usando técnicas como ChIP-seq, ChIP-cloning e ChIP-chip utilizando *arrays* que não se limitavam apenas às regiões promotoras, permitiram a identificação de regiões do genoma onde os fatores de transcrição também se ligavam e poderiam ter um papel importante na regulação da transcrição (CAWLEY et al., 2004). Estas ferramentas permitem a identificação de elementos reguladores próximos aos genes que possuem fatores de transcrição já descritos, embora estas abordagens estejam limitadas à necessidade da determinação de genes alvos e à área do genoma analisada ser relativamente pequena. De modo igual, nem todos os

alvos diretos de um determinado fator de transcrição serão regulados da mesma forma: o fator de transcrição pode ativar alguns genes alvos diretamente enquanto reprime outros nas mesmas condições celulares (MASSIE; MILLS, 2008).

A técnica de Imunoprecipitação de Cromatina (ChIP, do inglês *Chromatin Immunoprecipitation*) se tornou um ensaio muito popular para o estudos de fatores de transcrição, histonas modificadas e outras proteínas cromossômicas não-histônicas, e é uma técnica *in situ* que oferece uma representação mais fisiológica dos eventos nucleares envolvidos no processamento do DNA (SPENCER, 2003). Os primeiros ensaios de ChIP foram desenvolvidos por Gilmour e Lis (1984, 1985, 1986, 1987) como uma técnica para monitorar a associação da enzima RNA polimerase II com a transcrição de genes em *Escherichia coli* e *Drosophila* (CAREY; PETERSON; SMALE, 2009). Hoje duas abordagens são usadas. Elas diferem na forma como a cromatina é preparada para o ensaio. A primeira utiliza a cromatina nativa fragmentada através de nuclease microcócica (que hidrolisa DNA de fita dupla) e é referida como nChIP (YAN; CHEN; COSTA, 2004). Este método é utilizado para o estudo de proteínas que se ligam ao DNA com elevada afinidade, tais como as histonas e as suas isoformas modificadas. O segundo método utiliza a cromatina “crosslinkada” preparada por adição de formaldeído às células ou através da exposição das células à radiação ultravioleta (UV). Entre os vários agentes de *crosslinking*, o formaldeído (HCHO) é o mais comumente utilizado e teve o seu uso iniciado por Solomon e Varshavsky (1988). Hoje, sabemos que o formaldeído induz a formação de ligações químicas eficientemente entre proteína-DNA, proteína-RNA e proteína-proteína *in vitro* através da interação entre os grupos amino e imino da lisina, arginina e histidina e as bases nitrogenadas do DNA. Além disso, a estrutura da cromatina se mantém fielmente conservada e as ligações cruzadas podem ser desfeitas sob condições que não alteram a natureza do DNA. Após o *crosslinking* as células são sonicadas para fragmentar o DNA e a suspensão celular é centrifugada para remover os detritos celulares insolúveis. Esta suspensão

clarificada é incubada com um anticorpo primário contra a proteína nuclear desejada. Os complexos anticorpo-antígeno são então capturados por esferas magnéticas conjugadas com uma superfície envolta com proteínas aderentes de acordo com a natureza do anticorpo. As esferas devem ser lavadas várias vezes com tampões contendo diferentes concentrações de sais e detergentes. Os complexos anticorpo-antígeno são eluídos das esferas com um tampão de eluição de elevada concentração de detergente. As ligações cruzadas de DNA-proteína são revertidas e os fragmentos de DNA enriquecidos são, então, purificados para análise. Em teoria, o ChIP pode ser utilizado para investigar qualquer alvo na cromatina contra o qual um anticorpo pode ser ligado e, conseqüentemente, tem sido utilizado com sucesso para identificar regiões do genoma associadas com sítios de ligação aos fatores de transcrição, cofatores, histonas modificações específicas e metilação de DNA. Este procedimento é conhecido como xChIP. Este método é a única opção quando se está interessado em estudar as proteínas que se ligam ao DNA com uma menor afinidade, o que inclui a maioria das proteínas não-histônicas (YAN; CHEN; COSTA, 2004).

Um dos principais objetivos dos estudos baseados em ChIP é identificar a função de fatores de transcrição que estão ligados diretamente a genes alvos para obter *insights* sobre sua biologia e os mecanismos que levam à sua ativação. Essas abordagens têm sido aplicadas com sucesso em várias áreas importantes da biologia, incluindo a contribuição dos fatores de transcrição relacionados à identidade pluripotente das células-tronco embrionárias, como OCT4, SOX2 e NANOG (MASSIE; MILLS, 2008).

Figura 6 - Visão geral da Imunoprecipitação de Cromatina. (A) Resumo da metodologia de Imunoprecipitação de Cromatina (ChIP). (B) Crosslinking químico por formaldeído. (C) Exemplo de análise da cromatina por electroforese em gel, antes e após a sonicação. (D) Resumo de enriquecimento do DNA fragmento pelo ChIP, mostrando o grande número de fragmentos de DNA não-específicos de baixa abundância e fragmentos de DNA enriquecidos com chip específico de alta abundância. (E) Representação gráfica do enriquecimento por ChIP de dois fatores de transcrição, KLK2 e KLK3, na região promotora do gene do receptor de andrógeno (AR) analisados por PCR em Tempo Real e normalizados pelo *input*. (Adaptado de MASSIE; MILLS, 2008).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

O presente estudo teve como objetivo investigar os papéis das vias canônica e não-canônica de NFκB na manutenção da pluripotência e na diferenciação de células pluripotentes de carcinoma embrionário, utilizando para tal, a técnica de imunoprecipitação de cromatina (ChIP) atrelada ao uso de RT-qPCR para identificação de promotores ligados a RelA e RelB, bem como a regulação transcricional associada.

2.2. Objetivos específicos

- Padronizar o modelo de indução de diferenciação mediado por atRA sob condições de cultivo aplicados ao ChIP;
- Avaliar as alterações transcricionais decorrentes do processo de diferenciação celular, utilizando RT-qPCR;
- Avaliar a ocupação de regiões promotoras, pelas subunidades RelA e RelB de NFκB, em regiões de interesse, utilizando ChIP-qPCR;
- Identificar potenciais alvos de regulação, tanto positiva como negativa, das subunidades RelA e RelB de NFκB, por meios da análise integrada dos dados de expressão da qPCR e dos dados do ChIP-qPCR.

3. METODOLOGIA

3.1. Cultura celular e condições de cultivo

No presente trabalho foi utilizada uma linhagem celular de carcinoma embrionário humano (NTera-2). A linhagem foi cedida pela Dra. Luciana Morganti Ferreira Maselli, do Laboratório de Genética e Hematologia Molecular da USP de São Paulo – SP.

Antes dos experimentos, as células foram mantidas congeladas a -195°C (Nitrogênio Líquido) em tubos de criogenia contendo alíquotas de aproximadamente 2 milhões de células por mL de solução de congelamento, composta por 70% de meio de cultura (DMEM – Gibco, na proporção de 1:1), 20% de Soro Bovino Fetal (HyClone – Thermo Scientific) e 10% de DMSO (Dimetil Sulfóxido – Inlab). No descongelamento, as células foram retiradas do nitrogênio líquido e aquecidas sob agitação manual no banho-maria a uma temperatura de 37°C . Em seguida o conteúdo das ampolas foi transferido para um tubo de 15 mL contendo 10 mL de meio de cultura, ressuspendido e centrifugado (1200 RPM, 10 minutos a 25°C). Após a centrifugação o sobrenadante foi desprezado e o *pellet* de células foi ressuspendido mais uma vez em 5mL de meio de cultura completo – DMEM, suplementado com 10% de Soro Bovino Fetal (HyClone – Thermo Scientific), 10000 U/mL de penicilina e 10000 $\mu\text{g/mL}$ de estreptomicina (Gibco) – e incubados (37°C , 5% CO_2 e 85% de umidade do ar) em uma garrafa de cultivo celular de 25 cm^2 (Greiner Bio-one Cell Star® Tissue Culture Flasks) até a próxima troca de meio. O meio de cultura era trocado a cada 2 dias ou de acordo com as necessidades da cultura celular, que poderiam variar de acordo com o seu crescimento. Quando as células atingiam o estado de semiconfluência (90%) eram repicadas. O repique foi realizado através de um método físico, utilizando-se *cell scrapers*, já que o uso de tripsina induz a perda da pluripotência desta linhagem inviabilizando o uso da mesma para nossos estudos. Em resumo, o meio de cultura antigo foi então retirado, em seguida as células foram lavadas com 5 mL de PBS 1X. Após a lavagem das células, foram adicionados mais 5 mL de PBS ou meio completo e as células foram mecanicamente removidas da garrafa com o uso de um *cell scraper*. A

suspensão celular foi transferida para um tubo de centrífuga e submetida à centrifugação, nas condições citadas anteriormente. O sobrenadante foi descartado e as células foram redistribuídas em novas garrafas de cultivo. Como a quantidade de células exigida para a realização dos nossos experimentos eram muito grandes, fizemos a transição gradativa das células em expansão celular das garrafas de 25 cm² para outras de 75 cm² e 175 cm², respectivamente, até atingir a quantidade de células desejada.

3.1.1. Indução de diferenciação celular

As células foram cultivadas sob as mesmas condições descritas anteriormente com exceção do meio de cultura que foi acrescido de ácido trans-retinóico (*all trans-retinoic acid*, atRA; Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha) para uma concentração final de 10 µM. Neste estudo tratamos nossas células durante 4 dias com a finalidade de estimularmos o processo de diferenciação celular e consequente perda da pluripotência.

3.2. Extração de RNA

Após os períodos de cultura e tratamento da linhagem, uma porção das células foi removida das garrafas de culturas em PBS 1X, centrifugadas e lavadas uma vez em 1 mL de PBS 1X DEPC (Dietilpirocarbonato; Sigma-Aldrich). Posteriormente, as células foram ressuspensas em 250 µL de PBS 1X com DEPC e solubilizadas com 750 µL de TRIZOL (Invitrogen, Carlsbad, Estados Unidos da América). Em seguida, as amostras foram transferidas e mantidas em freezer a -80°C. Para a extração do RNA total, as amostras foram descongeladas e a cada uma foi adicionado os volumes de 10 µL de glicogênio e 200 µL de clorofórmio. As amostras foram então homogeneizadas em vortex e, em seguida, centrifugadas (14.000 RPM, 15 minutos e 4°C). Após a centrifugação, foram retirados cuidadosamente os anéis formados em cada amostra, transferindo-os a outros tubos e, nestes, foram adicionados 500 µL de

isopropanol gelado. As amostras foram deixadas em descanso por 15 minutos em temperatura ambiente para que o material precipitasse. Seguido deste período, o material foi centrifugado novamente, nas mesmas condições citadas anteriormente, e então o sobrenadante foi descartado. O *pellet* formado foi ressuspendido em etanol 70% e, em seguida, o material foi submetido a mais uma centrifugação. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuspendido em 15 µL de água livre de RNase. As amostras de RNA obtidas foram congeladas em freezer -80°C.

O RNA total obtido das amostras foi quantificado por espectrofotometria em um aparelho *NanovuePlus* (General Eletronics, Little Chalfont, BKM, Reino Unido) no comprimento de onda de 260 nm, utilizando equivalência de 40 µg/mL para 1 unidade de absorbância. O grau de pureza das amostras foi avaliado através da razão 260/280 nm. A análise por espectrofotômetro das amostras de RNA mostrou que os valores para a razão de pureza estavam dentro do intervalo recomendado de 1,6 e 1,8.

3.3. Transcrição Reversa

Para a síntese do cDNA, foi utilizado o kit *High Capacity Cdna Archive Kit* (Applied Biosystems, CA, Estados Unidos da América), seguindo as instruções do fabricante. As amostras de cDNA resultantes desta reação foram diluídas para uma concentração final de 10 ng/µL em água livre de nucleases (Promega, Madison, Estados Unidos da América), para posterior utilização nas análises de expressão gênica por RT-qPCR.

3.4. RT-qPCR

Os níveis de expressão dos genes RELA, NFkB1, RELB e NFkB2 nas células NTera-2 foram validados por PCR quantitativa em tempo real (qPCR) utilizando sondas TaqMan® (Applied Biosystems, Boston, Estados Unidos da América) apresentadas na Tabela 1. As

reações de amplificação foram realizadas no 7500 Real Time PCR ABI Prism Sequence Detection System (Applied Biosystems, CA, Estados Unidos da América). Como normalizador foi utilizado o gene endógeno GAPDH (TaqMan®) apresentado na Tabela 1. A normalização da reação foi realizada pela média geométrica deste gene. Os níveis de expressão dos genes OCT4, NANOG, SOX2, KLF4, MYC e GFAP nas células NTERA-2 foram validados por qPCR utilizando *primers* (Integrated DNA Technologies, Brasil) apresentados na Tabela 2. As reações de amplificação destes genes foram realizadas no CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories, CA, Estados Unidos da América). Como normalizador foi utilizado o gene endógeno GAPDH, *primers* apresentados na Tabela 2. A normalização da reação foi realizada pela média geométrica deste gene.

A quantificação relativa da expressão gênica foi realizada pelo método de $2^{-\Delta\Delta C_t}$. As reações foram realizadas em duplicatas em placas de 96 poços (Applied Biosystems, Boston, Estados Unidos da América; Bio-Rad Laboratories, CA, Estados Unidos da América) sob as condições previamente padronizadas utilizando amostras de cDNA (20 ng/reação). Em todos os experimentos foram utilizados controles sem material genético (branco), os quais foram submetidos aos mesmos procedimentos para excluir ou detectar qualquer tipo de contaminação.

As condições de termociclagem compreenderam uma incubação de 50°C por 2 minutos, em seguida 95°C por 10 minutos (para ativação da DNA polimerase), e por fim 40 ciclos de 95°C por 15 segundos (desnaturação) e na temperatura de anelamento referente ao gene estudado por 1 minuto (anelamento e extensão simultâneos). Foi adicionada uma curva de dissociação ao final para a identificação de possíveis dímeros de *primers* ou produtos inespecíficos formados durante a reação de qPCR utilizando GoTaq® Green Master Mix (Promega, WI, Estados Unidos da América).

Os resultados foram avaliados através do software *Sequence Detection System* V1.3 e Bio-Rad CFX Manager para obtenção dos valores de Ct. 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 transcrito foram normalizados para cada amostra, subtraindo-se o valor do Ct obtido para o controle endógeno (GAPDH), obtendo-se assim os valores de ΔCt . Após a obtenção destes valores, foram realizados os cálculos para determinação da expressão relativa baseados na fórmula $2^{-\Delta Ct}$ (PFAFFL, 2001), comparando o nível de expressão dos transcritos (*foldchange*) entre os grupos controle e tratados com atRA, durante 4 ou 8 dias.

Tabela 1 – Lista contendo o código das sondas utilizadas para as reações de RT-qPCR.

EXPERIMENTO	GENE	Sonda	Temp.
RT-qPCR	GAPDH	4310884E	60°
	RelA	HS00153294_M1	60°
	NFKB1	HS00765730_M1	60°
	RelB	HS00232399_M1	60°
	NFKB2	HS00174517_M1	60°

Tabela 2 – Lista contendo os pares de *primers* utilizados para as reações de RT-qPCR.

EXPERIMENTO	GENE	PAR DE PRIMERS	Temp.
RT-qPCR	GAPDH	5'- GAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3' 5'- GAAGATGGTGATGGGATTTC-3'	60°
	OCT4	5'-GTACTCCTCGGTCCCTTTCC-3' 5'-CAAAAACCCTGGCACAAACT-3'	60°
	NANOG	5'- CAAAGGCAAACAACCCACTT 5'- ATTGTTCCAGGTCTGGTTGC	60°
	SOX2	5'-ACCAAGACGCTCATGAAGAAGG-3' 5'-TTCATGTGCGCGTAACTGTC-3'	60°
	KLF4	5'-ACCCACACAGGTGAGAAACC-3' 5'-ATGTGTAAGGCGAGGTGGTC-3'	60°
	MYC	5'-CAGATCAGCAACAACCGAAA-3' 5'-GGCCTTTTCATTGTTTTCCA-3'	60°
	GFAP	5'-GGGAGCTTGATTCTCAGCAC-3' 5'-AATTGCCTCCTCCTCCATCT-3'	60°

3.5. Imunoprecipitação de Cromatina

3.5.1. Crosslinking

Após o período de cultura e tratamento das células, as mesmas foram lavadas com PBS 1X que foi descartado. Em seguida foi adicionado mais 10 mL de PBS e uma pequena porção de células foi retirada para extração de RNA com a ajuda de um *cell scraper*. À garrafa de cultura celular foram adicionados 20 mL de PBS acrescido de 550 mL de formaldeído (Sigma-Aldrich, Steinhein, Alemanha) a 37% para uma concentração final de 1%. Incubamos as células à temperatura ambiente durante 10 minutos. Ao término desta incubação foram adicionados 2 mL de glicina 10X (GE Healthcare, Uppsala, Suécia) para inativar o formaldeído não reagente. Incubamos as células em temperatura baixa (no gelo) durante 5 minutos. Após a segunda incubação, aspiramos o PBS, removendo o máximo possível, tomando cuidado para não perturbar as células. Adicionamos 20 ml de PBS 1X gelado para lavar as células. Removemos o PBS e repetimos a lavagem mais uma vez. Após a lavagem das células adicionamos 2 ml de PBS gelado contendo 5 µL de Inibidor de Protease (Sigma-Aldrich, Steinhein, Alemanha) para cada 1 mL de PBS. As células foram removidas das garrafas de cultura com o auxílio de um *cell scraper* e separadas em tubos e submetidos a centrifugação a 800 G e 4°C por 5 minutos. Após a centrifugação o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi armazenado em tubos de microcentrífuga à -80°C até a etapa seguinte.

3.5.2. Lise celular

Após a etapa de *crosslinking*, o *pellet* de células foi descongelado, ressuspendido em 0,5 ml de tampão de lise (Merck Millipore, Estados Unidos da América) contendo 5 µL de Inibidor de Protease (Sigma-Aldrich, Steinhein, Alemanha) e incubado em gelo durante 15 minutos. A cada 5 minutos a suspensão de células era brevemente vortexizada. No final da incubação, homogeneizamos a suspensão de células 10 vezes em um homogeneizador a fim de

facilitar a libertação dos núcleos. Centrifugamos a suspensão de células a 13000 RPM a 4° C durante 5 minutos. Removemos o sobrenadante e ressuspendemos o sedimento de células em 0,5 ml de tampão de lise nuclear (Merck Millipore, Estados Unidos da América) contendo 2,5 µL de Coquetel Inibidor de Protease.

3.5.3. Sonicação para fragmentação do DNA

Antes de partimos para a sonicação das amostras que seriam analisadas, passamos por uma etapa de padronização da sonicação que compreendeu no acompanhamento nos ciclos de sonicação. Após cada ciclo uma alíquota de 50 µL da suspensão celular era retirada e armazenada. Procedemos desta maneira após cada um dos ciclos de 30 segundos de sonicação à uma amplitude de 30%. Após 10 ciclos, digerimos as proteínas ligantes no DNA das amostras e corremo-as em um gel de agarose a 1% para verificarmos o número de ciclos necessários para atingirmos fragmentos de DNA que variassem de 200 a 1000 pares de bases, ou seja, 6 ciclos de sonicação por 30 segundos a 30% de amplitude. O gel está respesentado abaixo.

Figura 7 – Imagem do gel de agarose a 1% para padronização da sonicação. Na figura estão representadas as posições dos marcadores moleculares de ácidos nucléicos e a quantidade de ciclos de sonicação em numerais.

Após os processos de *crosslinking* e lise celular, com o auxílio de um aparelho de sonicação celular (Sonics & Materials INC., Newtown, Estados Unidos da América), as amostras foram sonicadas em tubos de microcentrífuga envoltos por gelo para evitar possíveis

danos ao material, como desnaturação do DNA, causados pelo calor gerado pela utilização da técnica. A amostra foi sonicada até que atingíssemos o tamanho de DNA desejado de aproximadamente 200 a 1000 pares de bases de comprimento. A verificação deste comprimento foi realizada através da retirada de 5 µL da suspensão para análise em gel de agarose a 1 %. As amostras foram centrifugadas entre 10.000 G e 15.000 G, a 4° C durante 10 minutos para remover o material insolúvel. Os sobrenadantes de cada amostra foram aliquotados para tubos de microcentrífuga em alíquotas de 50 µL, cada alíquota de 50 µL continha o material equivalente a aproximadamente 10⁶ de células, que é suficiente para uma imunoprecipitação.

3.5.4. Imunoprecipitação das Proteínas “croslinkadas” com o DNA

Para cada alíquota de 50 µL da amostra foi adicionado 450 µL de tampão de diluição e 2,25 µL de Inibidor de Protease. A suspensão foi homogeneizada e foram retirados 5 µL (1%) de cada amostra como *input* que foram armazenados a 4°C. Foi adicionados 5 µg de cada anticorpo contra as proteínas a serem analisadas na imunoprecipitação, anti-RelA e anti-RelB (ambos da Santa Cruz Biotechnology, Estados Unidos da América) e 20 µL de microesferas magnéticas (Merck Millipore, Estados Unidos da América). A suspensão foi bem homogeneizada. Como controle positivo, foi adicionado 1 µg de anticorpo anti-RNA polimerase (Merck Millipore, Estados Unidos da América) por tubo. Como controle negativo, foi adicionado 1 µg de anticorpo IgG normal de coelho (Santa Cruz Biotechnology, Estados Unidos da América) por tubo. As amostras foram incubadas *overnight* a 4°C sob rotação. No dia seguinte, com o auxílio de separador magnético, as microesferas magnéticas contidas nas suspensões de cada amostra foram separadas do sobrenadante completamente. Após a separação, as microesferas complexadas com os anticorpos e a cromatina foram ressuspensas em 0,5 ml de tampão de lavagem e incubadas durante 3-5 minutos numa plataforma rotatória seguida de depuração magnética e remoção cuidadosa do líquido sobrenadante para retirada

dos mesmos na ordem a seguir: *Low Salt Immune Complex Wash Buffer* (1X), *High Salt Immune Complex Wash Buffer* (1X), *LiCl Immune Complex Wash Buffer* (1X), *TE Buffer* (1X) (tampões de lavagem da Merck Millipore, Estados Unidos da América).

3.5.5. Reversão do complexo proteína-DNA e eluição do DNA.

Para cada tubo, foi adicionado 100 µL do tampão de eluição para ChIP (Merck Millipore, Estados Unidos da América) e 1 µL de proteinase K (Merck Millipore, Estados Unidos da América). As amostras foram incubadas por 2 horas a 62°C sob agitação e em seguida por 10 minutos a 95°C. Em seguida as amostras foram esfriadas até a temperatura ambiente e as microesferas magnéticas foram separadas utilizando um separador magnético e sobrenadante foi transferido para um novo tubo.

3.5.5.1. Purificação do DNA

Foi adicionado 0,5 mL de *Bind Reagent "A"* a cada tubo de amostra de DNA e misturado bem. A suspensão foi então transferida para um tubo com um filtro e centrifugada durante 30 segundos a 13000 RPMs. O líquido foi descartado e foi adicionado 500 µL de *Wash Reagent "B"* ao tubo contendo o filtro e foi centrifugado mais uma vez sob as mesmas condições que a anterior. O líquido e o tubo foram descartados e o filtro foi posto em um novo tubo. Nesta etapa foi adicionado 50 µL do tampão de eluição “C” diretamente sob o filtro. Centrifugou-se mais uma vez por 30 segundos numa rotação de 13000 RPMs. O filtro então foi descartado e o eluato, o DNA purificado, foi congelado a -20°C (os reagentes A, B e C são produtos da Merck Millipore, Estados Unidos da América).

3.6. ChIP-qPCR

O enriquecimento por ChIP dos fatores de transcrição, RelA e Rel B, da enzima RNA Polimerase II e de uma IgG inespecífica de coelho nas regiões promotoras dos genes OCT4, SOX2, KLF4 e MYC nas células de carcinoma embrionário não tratadas e tratadas com atRA foram analisados por qPCR. Para isto foram utilizando *primers* (Integrated DNA Technologies, Brasil) para regiões de regulação apresentados na Tabela 3. As reações de amplificação destas regiões gênicas foram realizadas no CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories, CA, Estados Unidos da América). Como normalizador foi utilizado os Ct's gerados pelo *input* referente a cada situação celular.

As reações foram realizadas em duplicatas em placas de 96 poços (Bio-Rad Laboratories, CA, Estados Unidos da América) sob as condições previamente padronizadas utilizando amostras de DNA obtidas no ChIP. Em todos os experimentos foram utilizados controles sem material genético (branco), os quais foram submetidos aos mesmos procedimentos para excluir ou detectar qualquer tipo de contaminação.

As condições de termociclagem compreenderam uma incubação de 50°C por 2 minutos, em seguida 95°C por 10 minutos, e por fim 50 ciclos de 95°C por 15 segundos e na temperatura de anelamento referente ao gene estudado por 1 minuto. Foi adicionada uma curva de dissociação ao final para a identificação de possíveis dímeros de primers ou produtos inespecíficos formados durante a reação de qPCR utilizando GoTaq® Green Master Mix (Promega, Estados Unidos da América).

Os resultados foram avaliados através do software Bio-Rad CFX Manager para obtenção dos valores de Ct. 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 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (PFAFFL, 2001), comparando o nível de amplificação dos transcritos (*fold enrichment*) entre os grupos controle e tratados com atRA, durante 4 e/ou 8 dias.

3.6.1. Desenhos dos Primers para regiões do DNA com afinidade aos Fatores de Transcrição

Os *primers* foram desenhados tomando como base as possíveis posições e as sequencias onde os fatores de transcrição RelA e RelB se ligavam no genoma, e nos genes de interesse do nosso estudo, pelo software EpiTect ChIP qPCR Primers (SABiosciences/QIAGEN, Estados Unidos da América). Com estes dados foi possível achar as sequências de bases nitrogenadas completas no software Genome Browser (KENT et al., 2002) para serem usadas no software Primer3Plus (UNTERGASSER et al., 2007) na geração dos *primers* apresentados na Tabela 3.

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

EXPERIMENTO	GENE	PAR DE PRIMERS	Temp.
ChIP-qPCR	OCT4	5'-CCCCACAGAACTCATACGG-3' 5'-ATCCTCGGACCTGGCTAAG-3'	59°
	SOX2	5'-CTGGCAGGCTGGCTCTGGGA-3' 5'-GGCTCCTCCACTCGAGCCCA-3'	60°
	KLF4	5'-TGGCCAGTAAAGGTCAAAGG-3' 5'-CGGTGTGCACTTTTTGAGAG-3'	60°
	MYC	5'-GCAGCTATCATTTGCAACACC-3' 5'-AATGAGGCTTTGGACACACC-3'	60°
	GFAP	5'-GTGTGGGTCTCATTTGCATC-3' 5'-TCCTTAGAGAGACCCAGTTTG-3'	60°

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Cultura de NTERA-2 para o ensaio de ChIP

No presente trabalho foi utilizado um modelo para estudos de pluripotência celular por indução de diferenciação em culturas de carcinoma embrionário humano da linhagem NTERA-2 padronizado em nosso grupo em um trabalho anterior a este para a pesquisa de fatores de transcrição que possam atuar nos processos de manutenção da pluripotência e diferenciação celular, de maneira positiva ou negativa (LIMA; PANEPUCCI, 2013). A linhagem de carcinoma embrionário NTERA-2 foi escolhida por ter características semelhantes as células-tronco embrionárias humanas. Ela tem alta capacidade de diferenciação *in vitro* (PAL; RAVINDRAN, 2006), possui uma expressão gênica global similar às células-tronco embrionárias (SCHWARTZ et al., 2005) e são de fácil cultivo, crescem em meio D-MEM (do inglês, Dulbecco's modified Eagle's médium) suplementado com 10% de soro fetal bovino e sem a presença de outras células de suporte (fibroblastos alimentadores) bem como suplementos como LIF, bFGF e BMP (ANDREWS et al., 2005). Por meio deste trabalho prévio do nosso grupo vimos que as células de carcinoma embrionário NTERA-2 perdiam gradativamente o seu perfil pluripotente quando cultivadas em meio acrescido com 10 μ M de atRA. Esta indução da diferenciação celular se mostrou eficiente e condizentes com a literatura (ANDREWS, 1984, 1987; ANDREWS et al., 1984), ocorrendo durante os primeiros dias de tratamento e de forma tempo dependente. Tendo isto em mente, o primeiro obstáculo foi adaptar o modelo de indução da diferenciação para a demanda de material biológico exigida pelos ensaios de imunoprecipitação de cromatina.

A técnica de imunoprecipitação de cromatina recomenda a quantidade de células final para extração de DNA equivalente a 10^7 células por amostra analisada, uma quantidade útil para a realização de 10 imunoprecipitações (cromatina de 10^6 células por imunoprecipitação). Para conseguir esta quantidade de células precisamos transferir os experimentos padronizados em placas *multi-well* de 6 poços (aproximadamente 10 cm² de área útil para o crescimento

celular) para garrafas de cultura de 175 cm² (T175) tomando os devidos cuidados para preservar as características pluripotentes das células. Somado a este impasse inicial, a linhagem NTera-2 não pode ser isolada da placa ou garrafa com o auxílio de enzimas digestivas, como a tripsina. Para fazer o repique é necessário usar um *cell scraper* em um isolamento mecânico. Com isto, parte das células são perdidas, seja por destruição da célula ou pelo estresse nelas imposto, o que pode também alterar a biologia celular da cultura. Diante disso, levamos em consideração que nem todas as células repicadas sobreviveriam ou se aderiam à superfície das garrafas.

Revolvemos começar com um repique de 10⁷ células por garrafa, de forma que deixamos as células aderirem por 1 dia para depois continuarmos com o tratamento com atRA por 4 dias. As Figuras 8^a e 8B, retratam, respectivamente, células cultivadas em meio basal por 5 dias e células cultivadas em meio basal por 1 dia, em meio suplementado com 10 µM de atRA por 4 dias. Podemos perceber que na condição não tratada as células proliferaram mais que na condição tratada com atRA, o que já era esperado, uma vez que as células no processo de diferenciação reduzem a sua taxa de divisão celular. Deste modo, tínhamos uma grande quantidade de células na nossa situação não tratada em comparação as células tratadas, além do mais a cultura não tratada se apresentou com a formação de aglomerados celulares que tendem a se diferenciar espontaneamente. Com estes resultados resolvemos nas culturas seguintes fazer repiques com a metade de células utilizadas anteriormente, 5 x 10⁶ células por garrafa, nas mesmas condições de desenvolvimento das culturas tratada e não tratada com atRA. As Figuras 8C e 8D, representam, respectivamente, as culturas não tratada e tratada com atRA nas condições previamente descritas. Podemos ver a existência de espaços não ocupados por células na superfície das garrafas, indicando pouca proliferação celular em ambas as condições. Com esta condição não obtivemos a quantidade de células desejadas para a realização do CHIP.

Em uma terceira etapa, tentamos chegar a um equilíbrio em relação ao número de células repicadas, de forma que elas tivessem um tempo maior para se restabelecerem na cultura

e continuassem a se proliferar até a condição que adotamos como a ideal. Realizamos os repiques iniciais com a mesma quantidade de células do ensaio anterior, 5×10^6 células, mas deixamos as células em cultura por 2 dias antes de começarmos o tratamento para indução de diferenciação com atRA por 4 dias. As Figuras 8E e 8F, mostram a cultura de células não tratada e a cultura de células tratadas com atRA, respectivamente. Em ambas as condições podemos ver que a cultura se encontra mais homogênea e as células se apresentam mais de acordo com o que se espera das linhagens de carcinoma embrionário NTera-2, uma morfologia de células epiteliais, com contato célula-célula para o bom desenvolvimento da cultura e manutenção do caráter pluripotentes da linhagem (ANDREWS, 2006). Nestas condições de passagem celular foi possível obter a quantidade de células necessárias para a aplicação da técnica de ChIP nas duas condições estudadas. Após chegarmos a conclusão do número adequado de células repicadas, do tempo necessário para que a cultura se restabeleça realizamos as culturas para indução de diferenciação com atRA e *crosslinking* ao final do período de tratamento, 4 e 8 dias. A Figura 9 mostra uma fotomicrografia de campo claro das culturas realizadas nos ensaios antes da etapa de *crosslinking*, em 9A as células após 2 dias de cultivo, antes do início do tratamento, B as células não tratadas com atRA com mais 4 dias de cultura e 9C e 9D, células submetidas à indução de diferenciação por 4 e 8 dias, respectivamente, após o prazo de adesão e reestabelecimento da cultura.

Figura 8 – Padronização. Nesta imagem encontram-se representadas seis fotomicrografias de cultura de células da linhagem Ntera-2 submetidas ou não ao tratamento com atRA em garrafas de 175 cm²: A, repique inicial de 10^7 células em meio basal por 5 dias; B, repique inicial de 10^7 células em meio basal por 1 dia e em meio suplementado com 10 μ M de atRA por 4 dias; C, repique inicial de 5×10^6 células em meio basal por 5 dias; D, repique inicial de 5×10^6 células em meio basal por 1 dia e em meio suplementado com 10 μ M de atRA por 4 dias; E, repique inicial de 5×10^6 células em meio basal por 6 dias; F, repique inicial de 5×10^6 células em meio basal por 2 dias e em meio suplementado com 10 μ M de atRA por 4 dias (Aumento: 200X).

Figura 9 – Cultura de células usadas para o ensaio de ChIP. Nesta imagem encontram-se representadas quatro fotomicrografias de cultura de células da linhagem NTERA-2 submetidas ou não ao tratamento com atRA em garrafas T175: A, repique inicial de 5×10^6 células em meio basal por 2 dias; B, repique inicial de 5×10^6 células em meio basal por 6 dias; C, B, repique inicial de 5×10^6 células em meio basal por 2 dias e em meio suplementado com $10 \mu\text{M}$ de atRA por 4 dias; D, repique inicial de 5×10^6 células em meio basal por 2 dias e em meio suplementado com $10 \mu\text{M}$ de atRA por 8 dias (Aumento: 200X).

4.2. RT-qPCR dos marcadores de pluripotência.

Com a finalidade de estudar a eficiência do modelo de indução de diferenciação celular em células de carcinoma embrionário NTERA-2 adaptado ao nosso estudo, analisamos por RT-qPCR a expressão gênica relativa de 4 fatores de pluripotência. A análise foi feita tendo como referência os dados da condição tratada sob a não tratada, ambos normalizados pelo gene *housekeeping* GAPDH. Na Figura 10 estão representados graficamente as médias (de três replicatas) dos níveis de expressão dos transcritos OCT4 (A), NANOG (B), SOX2 (C) e KLF4 (D) nos grupos tratado e não tratado com atRA após 4 dias de cultura celular. Os níveis de expressão dos genes OCT4, NANOG e SOX2 sofreram redução quando comparados com a

condição não tratada e foram estatisticamente significantes: $p=0.0002$, $p=0.007$ e $p=0.02$, na respectiva ordem. Mostrando que o modelo de indução de diferenciação em células pluripotentes pôde ser aplicado aos estudos seguintes que pretendiam entender melhor os mecanismos de sinalização de NF κ B que estão envolvidos na manutenção da pluripotência bem como na diferenciação. Este resultado foi visto em outros trabalhos de indução de diferenciação mediada por atRA em células pluripotentes (COYLE; LI; BACCEI, 2011; KIM et al., 2008b; LU et al., 2009). A expressão do gene KLF4 (Figura 10C), em média, também se mostrou reduzida após os 4 dias de cultivo em presença de atRA, mas não foi significativa. É possível observar um desvio padrão alto. Das três replicatas experimentais analisadas, duas delas reduziram em 51% e 42% a expressão gênica de KLF4 enquanto em uma delas não houve mudança significativa. O gene KLF4 é ativado por LIF em células humanas e regula positivamente a expressão de E-caderina, proteína responsável pela adesão célula-célula e relacionada ao caráter epitelial das células pluripotentes, assim a diminuição da expressão de KLF4 é usada como marcador de um processo celular conhecido como transição epitélio-mesênquima (EMT, do inglês *epithelial-mesenchymal transition*)(YORI et al., 2010). Além disso, altos níveis de expressão de KLF4 também são relatados em alguns carcinomas (FOSTER et al., 2005; PANDYA et al., 2004). Desta forma, seria interessante acompanhar os níveis de expressão de KLF4 quando as células são submetidas a um maior tempo de tratamento, isso porque a linhagem NTera-2 é originada de um teratocarcinoma, o que poderia justificar a alta expressão de KLF4 e possível diminuição tardia no processo de diferenciação.

Figura 10 – Representação gráfica das médias dos níveis de expressão dos transcritos OCT4 (A), NANOG (B), SOX2 (C) e KLF4 (D) nos grupos tratado e não tratado com atRA após 4 dias de cultura celular. ***, ** e * diferente do grupo controle $p=0.0002$, $p=0.007$ e $p=0.02$, respectivamente.

4.3. RT-qPCR dos genes das vias canônica e não canônica de NFκB

O estudo prosseguiu com a análise da expressão dos genes que atuam nos processos de ativação das vias canônica (representada por RelA e NFκB1) e não canônica (representada por RelB e NFκB1) de NFκB. A análise foi feita seguindo o mesmo cálculo feito na análise dos genes de pluripotência, tendo como referência os dados da condição tratada sob a não tratada, ambos normalizados pelo gene *housekeeping* GAPDH. A Figura 11 apresenta os resultados da expressão relativa de RelA (A), NFκB1 (B), RelB (C) e NFκB2 (D). Pode-se notar que a média da expressão de RelA e NFκB1 se elevaram com o tratamento de 4 dias com atRA, sendo a diferença da expressão de RelA estatisticamente significativa ($p=0,004$), e que as médias de expressão relativa de RelB e NFκB2 caíram durante o tratamento.

Estudos anteriores indicaram uma regulação positiva da via canônica de NFκB durante diferenciação mediada por ácido retinóico em células-tronco embrionárias, sugerindo um

potencial papel de NF κ B durante a diferenciação destas células. Kang e Lee (2007) demonstraram através de estudos realizados com duas linhagens de células-tronco embrionárias humanas, através das técnicas de qPCR, *western blotting* e imunofluorescência, que estas células expressavam quantidades quase nulas de RelA e NF κ B1 em seu estado indiferenciado enquanto outras linhagens de células adultas apresentavam uma elevada expressão destas duas subunidades. Quando as linhagens de células-tronco embrionárias foram induzidas à diferenciação com atRA durante 6 dias passaram a expressar RelA e NF κ B1 e houve uma diminuição da expressão de OCT4 e NANOG, assim como visto em nossos resultados realizados com NTERA-2 em 4 dias de tratamento com atRA. O grupo relatou ainda que a ativação extrínseca de RelA por TNF- α em células indiferenciadas e em células diferenciadas por atRA, resultava em migração desta subunidade para o interior do núcleo, foi detectável apenas nas células diferenciadas, evidenciando por imunofluorescência que a atividade de RelA era muito baixa em células-tronco embrionárias e que a sua expressão, bem como ativação, era um processo que surgiria no processo de diferenciação celular (KANG et al., 2007).

Em outro trabalho posterior a este, o grupo mostrou que estes mesmos resultados eram vistos também em células-tronco embrionárias de origem murina (KIM et al., 2008b). Em 2008, Torres e Watt através de ensaios funcionais examinaram os efeitos da ativação direta da transcrição constitutiva ou repressão de NF κ B na diferenciação de células-tronco embrionárias murinas. Para isto eles superexpressaram por transfecção diferentes membros da família de NF κ B e uma forma super repressora do inibidor I κ B α de NF κ B (I κ B α -SR), que inibe RelA, o heterodímero RelB/NF κ B2 e c-Rel. A superexpressão de RelA revelou-se uma mistura de colônias indiferenciadas e diferenciadas, que não expressavam OCT4 e NANOG, já a transfecção de RelB/NF κ B2 resultou em poucas colônias diferenciadas que também não expressavam OCT4 ou NANOG, enquanto a superexpressão de c-Rel levou a profundas alterações morfológicas em todas as células, perda da expressão de NANOG e OCT4 e uma

redução na expressão do marcador SSEA1. Em contraste com os efeitos da superexpressão das proteínas RelA, RelB/NFkB2 e c-Rel, a superexpressão de Ikb α -SR não induziu perda da expressão de NANOG, OCT4 e SSEA-1. Estes resultados demonstraram que NFkB está envolvido no processo de diferenciação de células-tronco embrionárias murinas em cultura funcionando como um estímulo positivo de diferenciação. Em alguns pontos os estudos de Torres e Watt (2008) contrastam com os nossos, nos quais os níveis de expressão gênica das proteínas RelB/NFkB2 decaíram durante a indução de diferenciação em nosso modelo com células de carcinoma embrionário humanas. Talvez a via de sinalização não-canônica atue de formas diferentes nas duas espécies, como ocorrem em outras vias que em murinos são importantes para a manutenção da pluripotência e são irrelevantes em cultura de células humanas, como é o caso das vias que são ativadas por LIF (ARMSTRONG et al., 2006).

Através de uma nova abordagem YANG e colaboradores (2010), estudaram com maiores detalhes a atuação das duas vias de ativação de NFkB e as suas relações com os processos de manutenção da pluripotência e comprometimento da diferenciação celular e concluíram que a via canônica está envolvida com a diferenciação de células embrionárias humanas e sua viabilidade, enquanto que, a via não-canônica está principalmente associada a manutenção do estado de pluripotência destas células. Em um modelo de diferenciação celular baseado em diferenciação espontânea com a geração de corpos embrióides, os autores viram que com a diferenciação celular havia queda nos níveis de expressão dos marcadores chaves de pluripotência (OCT4, NANOG, SOX2 e TERT) e elevação de marcadores de diferenciação como AFP, PAX6 e KDR assim como visto em experimentos anteriores do grupo (ARMSTRONG et al., 2006). No mesmo experimento, suas análises indicaram uma contínua e significativa elevação na expressão de RelA e NFkB1 que é condizente com o envolvimento da via canônica de NFkB durante o processo de diferenciação. As análises de RT-qPCR também mostraram uma diminuição significativa na expressão dos inibidores da via canônica Ikb β e

I κ B ϵ bem como aumento dos ativadores desta mesma via, IKK2 e NEMO. Em contraste aos achados anteriores, houve uma diminuição da expressão de subunidades da família de NF κ B representantes da via não-canônica, RelB e NF κ B2, assim como no nosso estudo em células de carcinoma embrionário NTERA-2, podendo então presumir que a via não-canônica é suprimida durante a diferenciação de células pluripotentes humanas. Yang e colaboradores (2010) ainda realizaram ensaios funcionais que inibiram a via canônica através do tratamento das células com um inibidor de IKK que resultou em perda da aparência epitelial e compacta das células-tronco embrionárias e diminuição da proliferação celular, porém com elevação dos níveis de OCT4 e NANOG devido a inibição da via canônica, corroborando com o trabalho de TORRES e WATT (2008). Ademais, os autores provocaram o *knockdown* de RelA que foi associado ao aumento da mortalidade celular, indicando que a via além de relacionada a diferenciação celular, seria importante para a viabilidade celular. Após estudarem o envolvimento da via canônica com o processo de diferenciação em células-tronco embrionárias realizaram alguns experimentos abordando o papel da via não-canônica de NF κ B, que apresentou queda dos seus componentes durante a diferenciação celular, assim como no presente trabalho. Para apurar esta observação foi utilizada a técnica de RNA de interferência contra RelB, causando uma diminuição de cinco vezes da expressão desta proteína. Após o *knockdown* de RelB não houve uma diminuição significativa dos marcadores de pluripotência OCT4 e NANOG mas causou uma redução significativa da expressão de SOX2 (YANG et al., 2010). Takase (2013) em seu trabalho utilizando células de pluripotência induzida mostraram que estas células em estado indiferenciado possuem uma alta atividade de NF- κ B e quando diferenciadas espontaneamente pelo método de corpos embrióides apresentavam o oposto. O *knockdown* por siRNA de RelA resultou em uma queda de expressão dos fatores de pluripotência OCT4 e NANOG, indicando que a via canônica está relacionada com a manutenção da pluripotência. Estes resultados entram em contraste com os resultados de outros

grupos de pesquisa. O autor sugeriu que tal diferença pudesse estar relacionada às diferenças entre os modelos de diferenciação celular adotados nos experimentos (TAKASE et al., 2013).

Figura 11 – Representação gráfica das médias dos níveis de expressão dos transcritos RelA (A), NFkB1 (B), RelB (C) e NFkB2 (D) nos grupos tratado e não tratado com atRA após 4 dias de cultura celular. **, diferente do grupo controle $p=0.004$.

4.4. RT-qPCR dos genes MYC e GFAP

No presente estudo ainda foram realizadas análises da expressão relativa dos genes MYC (A) e GFAP (B), representados graficamente na Figura 12. O gene MYC é um oncogene tido como essencial para a reprogramação de células adultas em células pluripotentes e altamente expresso em células indiferenciadas (TAKAHASHI et al., 2007). Espera-se que este gene diminua sua expressão em um modelo de diferenciação celular. No nosso modelo foi observado uma situação oposta à esperada. A média de expressão relativa do gene MYC em células tratadas com atRA foi quase o dobro quando comparada com a média de expressão das células indiferenciadas. O mesmo resultado foi visto por outro trabalho, que tratou células Tera-

2, a linhagem que deu origem a NTera-2, com ácido retinóico e viram que os níveis de expressão de MYC se elevaram de acordo com o tempo de exposição ao agente indutor (SCHOFIELD et al., 1987).

A proteína estrutural GFAP é uma proteína do citoesqueleto expressa em células nervosas e bastante utilizada como marcador de diferenciação celular de células pluripotentes em células nervosas (LU et al., 2009). Nosso modelo de indução de diferenciação celular com atRA estimula as células a se diferenciarem no sentido neuro-ectodérmico, focando apenas na perda gradativa da expressão de genes responsáveis pela identidade pluripotente das células, não havendo a necessidade de um tempo mais prolongado de tratamento. O aumento da média da expressão de GFAP é dado de forma ainda discreta e bastante variante, mas ainda pode ser considerado um indicativo de que nosso modelo de indução da diferenciação através de atRA foi eficiente.

Figura 12 – Representação gráfica das médias dos níveis de expressão dos transcritos MYC (A) e GFAP (B) nos grupos tratado e não tratado com atRA após 4 dias de cultura celular.

4.5. ChIP-qPCR

Para a análise dos dados obtidos através do ChIP-qPCR, as amplificações referentes as possíveis regiões de ligação dos fatores de transcrição RelA e RelB, da enzima RNA Polimerase II em regiões próximas aos genes OCT4, SOX2, KLF4 e MYC foram normalizadas através do *input* referente as condições tratada e não tratada. No estudo ainda foi realizado uma

imunoprecipitação com uma IgG de coelho inespecífica como controle negativo. Estes dados estão mostrados na Figura 13, que ilustra os dados da normalização de cada imunoprecipitação (anti-RelA, anti-RelB, anti-RNA Polimerase II e anti-IgG) quando calculados pelo *input* na condição não tratada (azul) e tratada com atRA por 4 dias (vermelho) para as regiões gênicas de OCT4 (A), SOX2 (B), KLF4 (C) e MYC (D) no ensaio 1 de imunoprecipitação de cromatina. A Figura 14 representa o mesmo conjunto de dados da sua anterior, mas referentes ao ensaio 2 de imunoprecipitação.

Figura 13 – Ensaio 1 – Análise por PCR em Tempo Real do enriquecimento do ChIP de RelA, RelB, RNA Polimerase II e IgG inespecífico nos grupos tratado (vermelho) e não tratado (azul) com atRA após 4 dias de cultura celular nas regiões gênicas de OCT4 (A), SOX2 (B), KLF4 (C) e MYC (D). Os valores apresentados são em relação ao *input* grupo específico.

Figura 14 – Ensaio 2 – Análise por PCR em Tempo Real do enriquecimento do ChIP de RelA, RelB, RNA Polimerase II e IgG inespecífico nos grupos tratado (vermelho) e não tratado (azul) com atRA após 4 dias de cultura celular nas regiões gênicas de OCT4 (A), SOX2 (B), KLF4 (C) e MYC (D). Os valores apresentados são em relação ao *input* grupo específico.

Nas Figuras 13 e 14 podemos visualizar os dois ensaios e as ligações dos fatores de transcrição RelA e RelB e da enzima RNA Polimerase II nas regiões reguladoras dos genes OCT4 (A), SOX2 (B), KLF4 (C) e MYC (D) nas duas situações, células não induzidas a diferenciação em seu estado indiferenciado (barra azul) e células induzidas à diferenciação mediada por atRA (barra vermelha). Podemos notar que não houve ligação de RelA na região de regulação de nenhum dos quatro genes aqui apresentados. Isto fica evidente quando comparamos os valores com os apresentados na imunoprecipitação anti-IgG inespecífica, que se apresentaram quase nulas. Mesmo de forma discreta, o enriquecimento de RelB nestas mesmas regiões de regulação nas células não tratadas foi maior do que para RelA. Quando voltamos nossa atenção para as imunoprecipitações realizadas com as células tratadas com atRA, percebemos um aumento de ligação de RelA e RelB na região de regulação gênica dos 4 fatores de pluripotência.

Com os nossos dados podemos analisar ainda a ligação da enzima RNA Polimerase II nos genes em estudo. Vemos que em ambas as situações a enzima se apresenta ligada, e de maneira curiosa a ligação é maior quando as células se encontram em processo de diferenciação. Analisados juntamente com os dados apresentados nos estudos dos transcritos através do ensaio de qPCR, podemos conferir que quando as células estão em seu estado indiferenciado, há ligação tanto de RelB como da RNA Polimerase nas regiões de regulação dos genes OCT4, SOX2, KLF4 e MYC, bem como há a transcrição destes genes. O que nos sugere que RelB está envolvido na regulação da expressão desses genes de forma positiva. Enquanto que, quando as células se encontram sob indução de diferenciação, ou seja, perdendo sua identidade pluripotente, estão ligadas na região de regulação dos fatores de pluripotência OCT4, SOX2 e KLF4 tanto RelA como RelB, bem como a RNA Polimerase II, mas a expressão gênica encontrou-se diminuída, uma vez que foi possível ver a queda da expressão destes fatores após 4 dias de diferenciação. O que pode nos indicar que o fator de transcrição RelA age regulando

negativamente a expressão destes três genes. Um fato adverso observado foi o fato de que os mesmos resultados do ChIP encontrados para os genes OCT4, SOX2 e KLF4 foi visto no gene MYC, mas este, diferentemente daqueles, teve sua expressão aumentada durante o processo de diferenciação. Sua expressão, em células de carcinoma embrionário NTera-2, provavelmente é regulada de forma diferente dos outros fatores de pluripotência aqui estudados. Não podemos deixar de observar que os dados apresentados no ensaio 2 quando comparados com o ensaio 1 nos permitem fazer as mesmas observações, mas com valores diferentes. Isso se deve às possíveis variações na técnica como quantidade de células utilizadas em cada imunoprecipitação que varia de cultura para cultura devido à população inicial de repique. Em estudos anteriores vimos através de *High Content Screening* que a cultura de NTera-2 apresentava uma população heterogênea de células, algumas células expressavam OCT4 e NANOG mais do que outras (LIMA; PANEPUCCI, 2013). Outra etapa da imunoprecipitação passível de variações é a sonicação, que é difícil de ser controlada no equipamento que utilizamos para tal. Temperatura do ambiente incontrolada e outros fatores podem gerar pequenas variações que são refletidas nos resultados.

Nossos resultados se tornam mais elucidativos quando fazemos uma análise das células em diferenciação tendo como referência as células indiferenciadas. As Figuras 15 e 16 mostram a razão do enriquecimento dos fatores de transcrição, RelA e RelB, e da RNA Polimerase II na imunoprecipitação realizada com as células submetidas à diferenciação sobre as células não tratadas e, portanto, pluripotentes, nas regiões de regulação dos fatores de pluripotência, ou seja, a quantidade de vezes que as proteínas RelA, RelB e RNA Polimerase II se ligaram a mais nas regiões de regulação dos fatores de pluripotência. No ensaio 1, RelA se ligou na região reguladora de OCT4 (Figura 15A) aproximadamente 133 vezes a mais nas células em diferenciação do que nas células indiferenciadas enquanto a ligação de RelB se manteve quase que equivalente nas duas situações e a RNA Polimerase II aumentou em um

nível discreto. Estes resultados se mantiveram para os fatores de pluripotência SOX2, KLF4 e MYC com valores para a razão de enriquecimento de RelA de 58, 75 e 49 vezes, respectivamente. Os resultados apresentados se mantiveram, de forma geral, no ensaio 2 de ChIP com as variações comuns à técnica. No ensaio 1 ainda analisamos células tratadas pelo dobro de dias (8 dias) para verificar se os resultados se mantinham ou se apresentavam alterações significativas. Vimos que o enriquecimento de RelA nas células tratadas para o gene OCT4 sofreu uma leve redução para 114 vezes enquanto os enriquecimentos para SOX2, KLF4 e MYC praticamente dobraram para 119, 171 e 99 vezes, respectivamente, mostrando que a atividade supressora de RelA aumentou durante a diferenciação das células. Com excessão de OCT4, que diminuiu o enriquecimento de RelB após o tratamento de 8 dias com atRA, houve um aumento da ligação nas regiões reguladoras dos genes SOX2, KLF4 e MYC de 10, 13 e 9 vezes, respectivamente.

Nossos dados, de forma geral, sugerem que a via canônica de NFκB, através da ativação de RelA, está intensamente envolvida com o processo de diferenciação celular das células pluripotentes. Nas células tratadas, quando RelA está ligado na região reguladora dos fatores de pluripotência aqui abordados, mesmo sob forte ligação da enzima RNA Polimerase II, há uma diminuição da expressão gênica destes genes. O que não ocorre com a ligação de RelB nestas regiões em células indiferenciadas. Houve um maior enriquecimento de RelB na região reguladora destes genes quando a células se encontrava em seu estado indiferenciado e, portanto, expressando estes fatores, indicando que a via não-canônica de NFκB, representada pela ativação e ligação de RelB nos genes alvos, está regulando positivamente a expressão.

Este foi o primeiro trabalho a avaliar as ligações dos fatores de transcrição RelA e RelB neste conjunto de genes responsáveis pelo caráter pluripotente de células indiferenciadas durante o processo de diferenciação mediado por atRA em células de carcinoma embrionário NTera-2. Em seu estado indiferenciado, apenas RelB estava ligado nas regiões de regulação

dos genes OCT4, SOX2, KLF4 e MYC, enquanto que durante o processo de diferenciação essas mesmas regiões foram co-ocupadas pelos fatores de transcrição RelA e RelB. Pode-se dizer que RelB continua ligada ao sítio de ligação das regiões reguladoras destes genes mas com o início da diferenciação e consequente ativação de RelA esta proteína se liga formando um complexo que viria a inativar a atividade da RNA Polimerase II bloqueando a expressão destes genes.

YANG e colaboradores (2010) relataram a ligação da proteína RelB na região promotora do fator de transcrição SOX2 e dos genes CDX2, BRACHYURY e PAX6 em células-tronco embrionárias humanas indiferenciadas. Em associação aos dados obtidos através da qPCR para uma série de marcadores de diferenciação celular, após o *knockdown* de RelB, o grupo sugeriu que estes achados condiziam com o envolvimento de RelB na manutenção da pluripotência e diferenciação celular através da supressão transcricional para BRACHYURY e CDX2 e ativação direta da transcrição de SOX2 e PAX6.

Analisamos ainda as ligações dos fatores de transcrição RelA e RelB na região de regulação do gene GFAP. Na Figura 18, principalmente no ensaio 1 (A) podemos visualizar o enriquecimento de RelA apenas após a indução da diferenciação e que RelB se apresentou ligado tanto nas células indiferenciadas, como vistos nas imunoprecipitações dos outros genes, bem como após a indução da diferenciação celular. Ao fazermos a análise através do enriquecimento relativo nas células diferenciadas sobre as células após 4 dias de tratamento com atRA, representada na Figura 19A, vimos que a ligação de RelA na região reguladora de GFAP foi 105 vezes maior e após 8 dias sob indução, este valor aumentou para 270 vezes, mostrando que a ligação aumentava na medida que o processo de diferenciação se desenvolvia. Além disso, podemos ver que a ligação da enzima RNA Polimerase II, no ensaio 1, teve um enriquecimento relativo de 2,5 em 4 dias de indução de diferenciação e enriquecimento relativo de 5 vezes em 8 dias. Podemos sugerir que o fator de transcrição RelA está envolvido no

processo de diferenciação e destino celular através da ativação direta da transcrição de GFAP, confirmada de forma ainda discreta pelos achados do qPCR.

Figura 15 – Ensaio 1 – Representação gráfica do enriquecimento relativo de RelA e RelB nas regiões de regulação gênica de OCT4 (A), SOX2 (B), KLF4 (C) e MYC (D) entre as células tratadas e não tratadas com atRA durante 4 dias analisados por qPCR.

Figura 16 – Ensaio 2 – Representação gráfica do enriquecimento relativo de RelA e RelB nas regiões de regulação gênica de OCT4 (A), SOX2 (B), KLF4 (C) e MYC (D) entre as células tratadas e não tratadas com atRA durante 4 dias analisados por qPCR.

Figura 17 – Ensaio 1 – Representação gráfica do enriquecimento relativo de RelA e RelB nas regiões de regulação gênica de OCT4 (A), SOX2 (B), KLF4 (C) e MYC (D) entre as células tratadas e não tratadas com atRA durante 8 dias analisados por qPCR.

Figura 18 – Análise por PCR em Tempo Real do enriquecimento do ChIP de RelA, RelB, RNA Polimerase II e IgG inespecífico nos grupos tratado (vermelho) e não tratado (azul) com atRA após 4 dias de cultura celular na região de regulação gênica de GFAP, dos ensaios 1 (A) e 2 (B). Os valores apresentados são em relação ao *input* grupo específico.

Figura 19 – Representação gráfica do enriquecimento relativo de RelA e RelB na região de regulação gênica de GFAP entre as células tratadas sobre as não tratadas com atRA por 4 dias (A, ensaio 1; B, ensaio 2) e 8 dias (C, ensaio 1) analisados por qPCR.

5. CONCLUSÃO

Por meio dos resultados obtidos com o desenvolvimento deste trabalho e das comparações feitas com outros estudos de mesma temática, podemos citar as seguintes conclusões:

- Apesar da grande diferença existente nas condições de cultivo celular entre as células de carcinoma embrionário humano, NTera-2, e as células-tronco embrionárias humanas e células de pluripotência induzida humanas, a linhagem de carcinoma embrionário aqui utilizada pode ser considerada uma boa alternativa em estudos de pluripotência e mecanismos de diferenciação celular, uma vez que a indução de diferenciação mediada por atRA se mostrou eficiente no processo de perda de pluripotência evidenciado pela redução de expressão dos fatores de pluripotência OCT4, NANOG e SOX2, significativamente, e aumento da expressão de GFAP.
- As células de carcinoma embrionário humanas, NTera-2, em seu estado pluripotente possuem baixos níveis de expressão de RelA e NFkB1 e elevados níveis para RelB e NFkB2 quando comparados aos níveis de expressão das células em diferenciação mediado por atRA. Pela técnica de ChIP, sob as mesmas condições, foi visto que RelA não está ligado nas regiões de regulação dos genes OCT4, SOX2, KLF4 e MYC enquanto RelB se apresentou ligado a estas regiões. Estes dados nos permitem concluir que a via não-canônica de NFkB regula positivamente a pluripotência celular.
- A linhagem NTera-2, sob indução de diferenciação mediada por atRA, apresentou um decréscimo na expressão dos genes RelB e NFkB2 e um aumento de expressão de RelA e NFkB1. Através do ChIP, vimos que RelA se apresentou fortemente ligada às regiões de regulação dos genes OCT4, SOX2, KLF4, MYC e GFAP, sugerindo que a via canônica de NFkB está diretamente relacionada com a diferenciação e destino celular.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALISON, M. R. et al. An introduction to stem cells. **The Journal of pathology**, v. 197, p. 419–423, 2002.

AMIT, M. et al. Clonally derived human embryonic stem cell lines maintain pluripotency and proliferative potential for prolonged periods of culture. **Developmental biology**, v. 227, p. 271–278, 2000.

ANDREWS, P. W. et al. A comparative study of eight cell lines derived from human testicular teratocarcinoma. **International journal of cancer. Journal international du cancer**, v. 26, n. 3, p. 269–80, 15 set. 1980.

ANDREWS, P. W. Human embryonal carcinoma cells in culture do not synthesize fibronectin until they differentiate. **International journal of cancer. Journal international du cancer**, v. 30, n. 5, p. 567–71, 15 nov. 1982.

ANDREWS, P. W. Retinoic acid induces neuronal differentiation of a cloned human embryonal carcinoma cell line in vitro. **Developmental biology**, v. 103, p. 285–293, 1984.

ANDREWS, P. W. et al. Pluripotent embryonal carcinoma clones derived from the human teratocarcinoma cell line Tera-2. Differentiation in vivo and in vitro. **Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology**, v. 50, n. 2, p. 147–62, mar. 1984.

ANDREWS, P. W. et al. A pluripotent human stem-cell clone isolated from the TERA-2 teratocarcinoma line lacks antigens SSEA-3 and SSEA-4 in vitro, but expresses these antigens when grown as a xenograft tumor. **Differentiation; research in biological diversity**, v. 29, n. 2, p. 127–35, jan. 1985.

ANDREWS, P. W. Human teratocarcinoma stem cells: glycolipid antigen expression and modulation during differentiation. **Journal of cellular biochemistry**, v. 35, n. 4, p. 321–32, dez. 1987.

ANDREWS, P. W. Human teratocarcinomas. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer**, v. 948, n. 1, p. 17–36, ago. 1988.

ANDREWS, P. W. et al. Embryonic stem (ES) cells and embryonal carcinoma (EC) cells: opposite sides of the same coin. **Biochemical Society transactions**, v. 33, n. Pt 6, p. 1526–30, dez. 2005.

ANDREWS, P. W. TERA2 and Its NTERA2 Subline: Pluripotent Human Embryonal Carcinoma Cells. In: ANDREWS, P. W. (Ed.). **Cell Biology, Four-Volume Set: A Laboratory** [s.l.] Elsevier Science, 2006. p. 8.

ARMSTRONG, L. et al. The role of PI3K/AKT, MAPK/ERK and NFkappabeta 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. 1894–913, 1 jun. 2006.

BABU, M. M. et al. **Structure and evolution of transcriptional regulatory networks** *Current Opinion in Structural Biology*, 2004.

- BALTIMORE, D. Discovering NF-kappaB. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 1, n. 1, p. a000026, jul. 2009.
- BERNSTEIN, B. E. et al. A Bivalent Chromatin Structure Marks Key Developmental Genes in Embryonic Stem Cells. **Cell**, v. 125, p. 315–326, 2006.
- BHARTIYA, D. et al. An Overview of Pluripotent Stem Cells. p. 3–24, 2013.
- BONGSO, A.; RICHARDS, M. History and perspective of stem cell research. **Best practice & research. Clinical obstetrics & gynaecology**, v. 18, n. 6, p. 827–42, dez. 2004.
- BOYER, L. A et al. Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. **Cell**, v. 122, p. 947–56, 2005a.
- BOYER, L. A. et al. Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. **Cell**, v. 122, p. 947–956, 2005b.
- BOYER, L. A. et al. Polycomb complexes repress developmental regulators in murine embryonic stem cells. **Nature**, v. 441, p. 349–353, 2006.
- BRINSTER, R. The effect of cells transferred into the mouse blastocyst on subsequent development. **The Journal of experimental medicine**, v. 140, p. 1049–1056, 1974.
- CAREY, M. F.; PETERSON, C. L.; SMALE, S. T. Chromatin immunoprecipitation (ChIP). **Cold Spring Harbor protocols**, v. 2009, n. 9, p. pdb.prot5279, set. 2009.
- CARROLL, J. S. et al. Genome-wide analysis of estrogen receptor binding sites. **Nature genetics**, v. 38, p. 1289–1297, 2006.
- CAWLEY, S. et al. Unbiased Mapping of Transcription Factor Binding Sites along Human Chromosomes 21 and 22 Points to Widespread Regulation of Noncoding RNAs. **Cell**, v. 116, p. 499–509, 2004.
- CHAMBERLAIN, S. J.; YEE, D.; MAGNUSON, T. Polycomb repressive complex 2 is dispensable for maintenance of embryonic stem cell pluripotency. **Stem cells**, v. 26, p. 1496–1505, 2008.
- CHAMBERS, I. et al. Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. **Cell**, v. 113, p. 643–655, 2003.
- CHAMBERS, I.; SMITH, A. Self-renewal of teratocarcinoma and embryonic stem cells. **Oncogene**, v. 23, n. 43, p. 7150–60, 20 set. 2004.
- CHEN, T. S. N.; CHEN, P. S. Y. The myth of Prometheus. **Journal of the Royal Society of Medicine**, v. 87, n. December, p. 754–755, 1994.
- COLLAS, P.; DAHL, J. A. Chop it, ChIP it, check it: the current status of chromatin immunoprecipitation. **Frontiers in bioscience : a journal and virtual library**, v. 13, p. 929–943, 2008.

- COWAN, C. A. et al. Nuclear reprogramming of somatic cells after fusion with human embryonic stem cells. **Science (New York, N.Y.)**, v. 309, p. 1369–1373, 2005.
- 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, p. e16174, jan. 2011.
- DONOVAN, P. J.; GEARHART, J. The end of the beginning for pluripotent stem cells. **Nature**, v. 414, n. 6859, p. 92–7, 1 nov. 2001.
- EVANS, M. J.; KAUFMAN, M. H. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. **Nature**, v. 292, n. 5819, p. 154–156, 9 jul. 1981.
- FOSTER, K. W. et al. Induction of KLF4 in basal keratinocytes blocks the proliferation-differentiation switch and initiates squamous epithelial dysplasia. **Oncogene**, v. 24, p. 1491–1500, 2005.
- GARDNER, R. L. Stem cells: potency, plasticity and public perception. **Journal of anatomy**, v. 200, p. 277–282, 2002.
- GILMOUR, D. S.; LIS, J. T. Detecting protein-DNA interactions in vivo: distribution of RNA polymerase on specific bacterial genes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 81, p. 4275–4279, 1984.
- GILMOUR, D. S.; LIS, J. T. In vivo interactions of RNA polymerase II with genes of *Drosophila melanogaster*. **Molecular and cellular biology**, v. 5, p. 2009–2018, 1985.
- GILMOUR, D. S.; LIS, J. T. RNA polymerase II interacts with the promoter region of the noninduced hsp70 gene in *Drosophila melanogaster* cells. **Molecular and cellular biology**, v. 6, p. 3984–3989, 1986.
- GILMOUR, D. S.; LIS, J. T. Protein-DNA cross-linking reveals dramatic variation in RNA polymerase II density on different histone repeats of *Drosophila melanogaster*. **Molecular and cellular biology**, v. 7, p. 3341–3344, 1987.
- GREENOW, K.; CLARKE, A. R. Controlling the stem cell compartment and regeneration in vivo: the role of pluripotency pathways. **Physiological reviews**, v. 92, n. 1, p. 75–99, jan. 2012.
- HUET, C. et al. Absorptive and mucus-secreting subclones isolated from a multipotent intestinal cell line (HT-29) provide new models for cell polarity and terminal differentiation. **The Journal of cell biology**, v. 105, p. 345–357, 1987.
- HYSLOP, L. A et al. Human embryonic stem cells: biology and clinical implications. **Expert reviews in molecular medicine**, v. 7, n. 19, p. 1–21, 19 set. 2005.
- JAKOB H, BOON T, GAILLARD J, NICOLAS J, J. F. Tératocarcinome de la spuris: isolement, culture et propriétés de cellules a potentialités multiples. **Ann Microbiol (Paris)**, n. 124, p. 269–282, 1973.

JANSSEN, J. W. et al. Sublocalization of c-myb to 6q21---q23 by in situ hybridization and c-myb expression in a human teratocarcinoma with 6q rearrangements. **Cytogenetics and cell genetics**, v. 41, p. 129–135, 1986.

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, ago. 2007.

KENT, W. J. et al. **The Human Genome Browser at UCSCGenome Research**, 2002.

KIM, J. et al. An Extended Transcriptional Network for Pluripotency of Embryonic Stem Cells. **Cell**, v. 132, p. 1049–1061, 2008a.

KIM, T. H.; REN, B. Genome-wide analysis of protein-DNA interactions. **Annual review of genomics and human genetics**, v. 7, p. 81–102, 2006.

KIM, Y. et al. Upregulation of NF-kappaB upon differentiation of mouse embryonic stem cells. **BMB Rep**, p. 705–709, 2008b.

KLEINSMITH, L. J.; PIERCE, G. B. MULTIPOTENTIALITY OF SINGLE EMBRYONAL CARCINOMA CELLS. **Cancer research**, v. 24, p. 1544–51, out. 1964.

LEWITZKY, M.; YAMANAKA, S. Reprogramming somatic cells towards pluripotency by defined factors. **Current opinion in biotechnology**, v. 18, n. 5, p. 467–73, out. 2007.

LIMA, I.; PANEPUCCI, R. A. **Um modelo para estudos de modulação da pluripotência e da diferenciação celular em células-tronco pluripotentes**. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2013.

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.

LÜNINGSCHRÖR, 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**, v. 8, n. 4, p. 1098–108, dez. 2012.

MAHERALI, N. et al. Directly reprogrammed fibroblasts show global epigenetic remodeling and widespread tissue contribution. **Cell stem cell**, v. 1, p. 55–70, 2007.

MARSON, A. et al. Connecting microRNA Genes to the Core Transcriptional Regulatory Circuitry of Embryonic Stem Cells. **Cell**, v. 134, p. 521–533, 2008.

MARTIN, G. R. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells *Developmental Biology* : v. 78, n. 12, p. 7634–7638, 1981.

MASSIE, C. E.; MILLS, I. G. ChIPping away at gene regulation. **EMBO reports**, v. 9, n. 4, p. 337–43, maio 2008.

MATIN, M. M. et al. Specific knockdown of Oct4 and beta2-microglobulin expression by RNA interference in human embryonic stem cells and embryonic carcinoma cells. **Stem cells**, v. 22, p. 659–668, 2004.

MATSUDA, T. et al. STAT3 activation is sufficient to maintain an undifferentiated state of mouse embryonic stem cells. **The EMBO journal**, v. 18, p. 4261–4269, 1999.

MITSUI, K. et al. The homeoprotein nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. **Cell**, v. 113, p. 631–642, 2003.

NIU, C. S. et al. Effect of all-trans retinoic acid on the proliferation and differentiation of brain tumor stem cells. **Journal of experimental & clinical cancer research : CR**, v. 29, n. 1, p. 113, jan. 2010.

NIWA, H. et al. Self-renewal of pluripotent embryonic stem cells is mediated via activation of STAT3. **Genes & development**, v. 12, p. 2048–2060, 1998a.

NIWA, H. et al. Self-renewal of pluripotent embryonic stem cells is mediated via activation of STAT3. **Genes & development**, v. 12, p. 2048–2060, 1998b.

NIWA, H.; MIYAZAKI, J.; SMITH, A. G. Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. **Nature genetics**, v. 24, p. 372–376, 2000.

OECKINGHAUS, A.; GHOSH, S. The NF-kappaB family of transcription factors and its regulation. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 1, n. 4, p. a000034, out. 2009.

OKITA, K.; ICHISAKA, T.; YAMANAKA, S. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. **Nature**, v. 448, p. 313–317, 2007.

PAL, R.; RAVINDRAN, G. Assessment of pluripotency and multilineage differentiation potential of NTERA-2 cells as a model for studying human embryonic stem cells. **Cell proliferation**, v. 39, n. 6, p. 585–98, dez. 2006.

PANDYA, A. Y. et al. Nuclear localization of KLF4 is associated with an aggressive phenotype in early-stage breast cancer. **Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research**, v. 10, p. 2709–2719, 2004.

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, jan. 2007.

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.

RAO, M. **Conserved and divergent paths that regulate self-renewal in mouse and human embryonic stem cells** *Developmental Biology*, 2004.

SCHOFIELD, P. N. et al. Expression of c-myc during differentiation of the human teratocarcinoma cell line Tera-2. **Journal of cell science**, v. 88 (Pt 1), p. 57–64, ago. 1987.

- SCHWARTZ, C. M. et al. NTera2: a model system to study dopaminergic differentiation of human embryonic stem cells. **Stem cells and development**, v. 14, p. 517–534, 2005.
- SIKORA, K. et al. Detection of the c-myc oncogene product in testicular cancer. **British journal of cancer**, v. 52, p. 171–176, 1985.
- SIKORA, K. et al. c-myc oncogene expression in colorectal cancer. **Cancer**, v. 59, p. 1289–1295, 1987.
- SKOTHEIM, R. I.; LOTHE, R. A. The testicular germ cell tumour genome. **APMIS**, v. 111, p. 136–151, 2003.
- SMALE, S. T. Hierarchies of NF- κ B target-gene regulation. **Nature immunology**, v. 12, n. 8, p. 689–94, ago. 2011.
- SOLOMON, M. J.; LARSEN, P. L.; VARSHAVSKY, A. Mapping protein-DNA interactions in vivo with formaldehyde: evidence that histone H4 is retained on a highly transcribed gene. **Cell**, v. 53, p. 937–947, 1988.
- SPENCER, V. Chromatin immunoprecipitation: a tool for studying histone acetylation and transcription factor binding. **Methods**, v. 31, n. 1, p. 67–75, set. 2003.
- TAKAHASHI, K. et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. **Cell**, v. 131, n. 5, p. 861–72, 30 nov. 2007.
- TAKAHASHI, K.; YAMANAKA, S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. **Cell**, v. 126, p. 663–676, 2006.
- 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, jan. 2013.
- THOMSON, J. A. Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts. **Science**, v. 282, n. 5391, p. 1145–1147, 6 nov. 1998.
- 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, fev. 2008.
- UNTERGASSER, A. et al. Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. **Nucleic Acids Research**, v. 35, 2007.
- VIENNOIS, E.; CHEN, F.; MERLIN, D. NF- κ B pathway in colitis-associated cancers. **Translational gastrointestinal cancer**, v. 2, n. 1, p. 21–29, 1 jan. 2013.
- WERNIG, M. et al. In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. **Nature**, v. 448, p. 318–324, 2007.
- WILMUT, I. et al. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. **Nature**, v. 385, p. 810–813, 1997.

WU, J. et al. ChIP-chip comes of age for genome-wide functional analysis. **Cancer research**, v. 66, p. 6899–6902, 2006.

XU, R.-H. et al. Basic FGF and suppression of BMP signaling sustain undifferentiated proliferation of human ES cells. **Nature methods**, v. 2, p. 185–190, 2005.

YAN, Y.; CHEN, H.; COSTA, M. Chromatin immunoprecipitation assays. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 287, p. 9–19, jan. 2004.

YANG, C. et al. Opposing putative roles for canonical and noncanonical NFκB signaling on the survival, proliferation, and differentiation potential of human embryonic stem cells. **Stem cells (Dayton, Ohio)**, v. 28, n. 11, p. 1970–80, nov. 2010.

YING, Q. L. et al. BMP induction of Id proteins suppresses differentiation and sustains embryonic stem cell self-renewal in collaboration with STAT3. **Cell**, v. 115, p. 281–292, 2003.

YORI, J. L. et al. Kruppel-like factor 4 (KLF4) inhibits epithelial-to-mesenchymal transition through regulation of E-cadherin gene expression. **The Journal of biological chemistry**, 2010.

YU, J. et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. **Science (New York, N.Y.)**, v. 318, p. 1917–1920, 2007.