UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

AMANDA DE OLIVEIRA RIBEIRO

Papel dos microRNAs no controle da expressão da DNA metiltransferase
3B durante a diferenciação de células-tronco embrionárias

São Paulo
2018

AMANDA DE OLIVEIRA RIBEIRO

Papel dos microRNAs no controle da expressão da DNA metiltransferase
3B durante a diferenciação de células-tronco embrionárias

Tese apresentada ao Instituto de Biociências
da Universidade de São Paulo para obtenção
do título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Biologia - Genética

Orientadora: Dra. Luciana dos Reis Vasques

São Paulo

2018

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.

Ribeiro, Amanda de Oliveira

Papel dos microRNAs no controle da expressão da DNA metiltransferase 3B durante a diferenciação de células tronco embrionárias / Amanda de Oliveira Ribeiro; orientador Luciana dos Reis Vasques. -- São Paulo, 2018.

58 f.

Tese (Doutorado) - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, Departamento de Genética e Biologia Evolutiva.

1. DNMT3B. 2. hESC. 3. Epigenética. 4. Regulação da expressão gênica. I. Vasques, Luciana dos Reis, orient. II. Título.

Nome: RIBEIRO, Amanda de Oliveira

Título: Papel dos microRNAs no controle da expressão da DNA metiltransferase 3B durante a diferenciação de células-tronco embrionárias

Title: Role of microRNAs in the regulation of DNA methyltransferase 3B during the differentiation of embryonic stem-cells

Tese apresentada ao Instituto de Biociências
da Universidade de São Paulo para obtenção
do título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Biologia - Genética

Data da aprovação:

Banca examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Dedico este modesto trabalho à memória da minha mãe querida.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Luciana, pela oportunidade e por todas as lições.

A esta Universidade, pelo suporte à minha formação acadêmica e pela oportunidade de conhecer coisas novas por meio de seus programas de extensão. À FAPESP, pela concessão da bolsa de estudos e pelo apoio financeiro aos projetos do grupo.

Aos professores Lygia Pereira, Danillo Pinhal e Flávia Delella, por terem me recebido em seus laboratórios.

À professora Maria Vibranovski, pela supervisão gentil e dedicada do meu estágio de aperfeiçoamento didático.

Ao Dr. André Kashiwabara, pela parceria nas análises de bioinformática.

Aos companheiros e amigos de laboratório – especialmente ao Luís, à Simone, à Giselle, à Roberta e ao Lucas –, pela divisão da jornada durante todos os dias, noites e finais de semana.

Aos meus familiares e amigos – tia Liu, tio Vela, tia Nena, tia Nice, tio Paulinho, Xande, Neca – pelo apoio em todos os momentos. À minha mãe, Leila, que acompanhou grande parte desta empreitada, pelo amor incondicional.

Ao meus amores Fernanda e Leo, por tudo.

Aos demais, que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação, o meu muito obrigada.

RESUMO

RIBEIRO, Amanda de Oliveira. Papel dos microRNAs no controle da expressão da DNA metiltransferase 3B durante a diferenciação de células-tronco embrionárias. 2018. 58f. Tese (Doutorado em Ciências: Biologia - Genética). Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

A Dnmt3b é a principal DNA metiltransferase no processo de remetilação de regiões de DNA repetitivo do genoma durante a onda de reprogramação epigenética que ocorre no desenvolvimento embrionário. Sua expressão é regulada por uma série de mecanismos, entre os quais encontram-se os microRNAs (miRNAs). O objetivo deste trabalho foi investigar o papel dos mRNAs hsa-miR-203, hsa-miR-26a e hsa-miR-26b na regulação da expressão de DNMT3B durante a diferenciação de células-tronco embrionárias humanas e suas consequências para a metilação do DNA destas células. Para isto, geramos curvas de expressão dos miRNAs investigados, bem como da DNMT3B, a fim de verificar a existência de correlação entre elas. Também analisamos o efeito da superexpressão de miRNAs miméticos sobre a expressão de DNMT3B e o efeito da inibição da interação entre os miRNAs e a região 3'UTR de DNMT3B sobre a expressão da DNA metiltransferase e sobre os níveis de metilação do DNA das células. Constatamos que a expressão de DNMT3B está inversamente correlacionada com a expressão dos miRNAs hsa-miR-203, hsa-miR-26a e hsa-miR-26b, mas não do hsa-miR-29b, regulador já validado para o controle da expressão de DNMT3B em células tumorais. Verificamos também que o impedimento da ligação do hsa-miR-203 ao segundo sítio predito para a ligação deste miRNA ao mRNA de DNMT3B ocasionou um aumento significativo na expressão da DNA metiltransferase, embora tal aumento não tenha refletido alteração nos níveis de metilação do DNA das células. Desta forma, concluímos que os miRNAs investigados fazem parte da maquinaria de regulação da DNA metiltransferase 3B na diferenciação de células-tronco embrionárias, embora o exato papel funcional de cada um deles no controle da expressão de DNMT3B e na metilação do DNA destas células ainda necessite ser melhor esclarecido.

Palavras-chave: DNMT3B. hESC. Epigenética. Regulação da expressão gênica.

ABSTRACT

RIBEIRO, Amanda de Oliveira. Role of microRNAs in the regulation of DNA methyltransferase 3B during the differentiation of embryonic stem-cells. 2018. 58p. Doctoral Thesis in Science: Biology - Genetics. Institute of Biosciences, University of São Paulo, São Paulo, 2018.

Dnmt3b is the major DNA methyltransferase in the process of repetitive DNA remethylation during the epigenetic reprogramming wave that occurs in the embryonic development. Its expression is regulated through several mechanisms, including microRNA (miRNAs). The aim of this study was to investigate the role of the miRNAs hsa-miR-203, hsa-miR-26a, and hsa-miR-26b in the regulation of DNMT3B expression during the differentiation of human embryonic stem-cells, and its consequences to the DNA methylation of these cells. To accomplish this, we generated expression curves for the investigated miRNAs, as well as for DNMT3B, to verify the existence of correlation between them. We also analysed the effect of superexpressing mimetic miRNAs on DNMT3B expression, and the effect of inhibiting the interaction of these miRNAs with DNMT3B 3'UTR region on the DNA methyltransferase expression and the levels of DNA methylation. We found that DNMT3B expression is inversely correlated to hsa-miR-203, hsa-miR-26a, and hsa-miR-26b expression, but not to hsa-miR-29b, a previously validated DNMT3B regulator in tumor cells. We also verified that blocking the interaction of hsa-miR-203 to its predicted second interaction site at the DNMT3B mRNA significantly increased DNMT3B expression, but did not interfere with the levels of DNA methylation in these cells. Thus, we conclude that the investigated miRNAs are part of the DNMT3B regulatory machinery during the differentiation of embryonic stem-cells, although the exact functional role of each of them in the control of DNMT3B expression and in the DNA methylation of these cells still remains to be further explored.

Keywords: DNMT3B. hESC. Epigenetics. Gene expression regulation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Efeito da introdução dos miRNAs estudados sobre a expressão de DNMT3B medido por ensaio de luciferase	22
Figura 2- Esquema exemplificando a diferenciação de hESC em corpos embrioides para obtenção da curva de expressão de DNMT3B e dos miRNAs estudados em intervalos de dois dias por 12 dias	25
Figura 3- Esquemas representando as posições relativas das regiões interrogadas pelo Illumina Infinium HumanMethylation450 BeadChip	31
Figura 4- Expressão de DNMT3B ao longo da diferenciação de hESC em corpos embrioides por 28 dias	33
Figura 5- Expressão de DNMT3B ao longo da diferenciação de hESC em corpos embrioides por 12 dias	34
Figura 6- Expressão de hsa-miR-203 (A), hsa-miR-26a (B), hsa-miR-26b (C) e hsa-miR-29b (D) ao longo da diferenciação de hESC em corpos embrioides por 12 dias	35
Figura 7- Curvas de regressão entre a expressão de DNMT3B e dos miRNAs hsa-miR-203 (A), hsa-miR-26a (B), hsa-miR-26b (C) e hsa-miR-29b (D) ao longo da diferenciação de hESC em corpos embrioides por 12 dias	36
Figura 8- Expressão de hsa-miR-203 (A) e de DNMT3B (B) em hESC após a introdução de miRNA miméticos	37
Figura 9- Expressão de DNMT3B em corpos embrioides após o bloqueio dos sítios de interação dos miRNAs estudados com DNMT3B por <i>target site blockers</i> (TSBs)	38
Figura 10- Metilação global do DNA de corpos embrioides e de células A549 após o bloqueio dos sítios de ligação dos miRNAs estudados em DNMT3B através de TSBs	39
Figura 11- Níveis de metilação de nucleotídeos CpG associados a diversas posições intra e intergênicas em corpos embrioides (EB) após o bloqueio dos sítios de ligação dos miRNAs estudados em DNMT3B através de TSBs	40
Figura 12- Níveis de metilação de nucleotídeos CpG associados a regiões repetitivas em corpos embrioides (EB) após o bloqueio dos sítios de ligação dos miRNAs estudados em DNMT3B através de TSBs	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- MicroRNAs candidatos à regulação de DNMT3B/Dnmt3b obtidos a partir de cinco programas de predição disponíveis na internet.	20
Tabela 2- MicroRNAs miméticos utilizados para verificar o efeito da superexpressão dos miRNAs estudados sobre a expressão de DNMT3B.	26
Tabela 3- Target site blockers (TSBs) utilizados para bloquear os sítios de ligação dos miRNAs na região 3'UTR do RNA mensageiro de DNMT3B.	27
Tabela 4- TaqMan® MicroRNA Assays utilizados para a análise da expressão dos miRNAs estudados.....	29
Tabela 5- Primers utilizados para detecção da expressão gênica por PCR quantitativo em tempo real e quantidade de cDNA inserido na reação.....	29

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
1.1. Mecanismos epigenéticos de regulação da expressão gênica	10
1.1.1. Metilação do DNA	11
1.1.2. Modificações nas histonas	13
1.1.3. Ação de pequenos RNAs não codificantes.....	14
1.2. Reprogramação epigenética ao longo do desenvolvimento	16
1.3. Regulação epigenética nas células-tronco embrionárias.....	17
1.4. Regulação de DNMT3B por miRNAs	19
2. OBJETIVOS	23
2.1. Objetivo geral.....	23
2.2. Objetivos específicos.....	23
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	24
3.1. Cultivo e manutenção das células	24
3.2. Diferenciação de hESC em corpos embrioides.....	24
3.3. Obtenção e análise das curvas de expressão	25
3.4. Introdução de miRNAs miméticos	26
3.5. Introdução de “target site blockers” (TSBs).....	26
3.6. Análise da expressão gênica em nível transcricional	27
3.7. Análise do perfil de metilação global do DNA.....	30
3.8. Análise do perfil de metilação de nucleotídeos CpG.....	30
4. RESULTADOS	33
5. DISCUSSÃO	41
6. CONCLUSÃO	46
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47
APÊNDICE.....	56

1. INTRODUÇÃO

Ao longo de toda a vida de uma célula, somente uma porção dos genes que estão codificados na vastidão do seu material genético será expressa. Genes distintos estão ativos em diferentes tipos celulares e janelas temporais ou em contextos normais *versus* patológicos. A expressão de um gene pode ser controlada em múltiplos níveis e por diversos mecanismos: pela modulação da acessibilidade da cromatina à maquinaria de transcrição da célula, pela atuação de moléculas repressoras ou ativadoras da transcrição ou pela degradação de RNAs mensageiros recém-transcritos (GRIFFITHS et al., 2013). Outra forma de controle da expressão de um gene consiste no estabelecimento de marcas que alteram a expressão gênica sem interferir na sequência do DNA em si, resultando em fenótipos herdáveis influenciados pelo ambiente celular – alguns de forma mais transiente, outros de forma mais estável (BERGER et al., 2009). Este tipo de controle da expressão gênica é chamado de "regulação epigenética".

A compreensão dos mecanismos de início, manutenção e herança dos estados epigenéticos de uma célula consiste em um grande desafio para os pesquisadores interessados em Genética, Biologia Molecular e Biologia do Desenvolvimento, e lança um novo olhar sobre fenômenos como estabilidade genômica, comportamento, origem e progressão de doenças e terapia gênica (WOLFFE; MATZKE, 1999).

1.1. Mecanismos epigenéticos de regulação da expressão gênica

As marcas epigenéticas são fundamentais para a manutenção da estabilidade do genoma e para a regulação de uma série de processos biológicos. Os mecanismos através dos quais se estabelecem estas marcas podem ser divididos em três grandes grupos: a metilação do DNA, as modificações nas histonas e a ação de pequenos RNAs não codificantes (GOLDBERG; ALLIS; BERNSTEIN, 2007).

1.1.1. Metilação do DNA

Em eucariotos, a metilação do DNA consiste na adição de um grupo metil ($-\text{CH}_3$) ao quinto carbono de uma base nitrogenada do tipo citosina. Predominantemente, as citosinas metiladas fazem parte da sequência canônica 5'-CG-3', conhecida como "dinucleotídeo CpG", porém a metilação pode ocorrer em outros contextos genômicos, como 5'-CHG-3' ou 5'-CHH-3', sendo H uma adenina, uma citosina ou uma timina (LISTER et al., 2009). As citosinas metiladas representam cerca de 1% do total de bases nitrogenadas no DNA humano, e cerca de 70 a 80% das CpGs do genoma humano encontram-se metiladas (EHRlich et al., 1982). Regiões ricas em dinucleotídeos CpG, conhecidas como "ilhas CpG", estão frequentemente associadas a regiões promotoras de genes, bem como próximas ao primeiro éxon, e representam potenciais sítios de regulação da expressão gênica por metilação (ILLINGWORTH; BIRD, 2009). Os algoritmos propostos para que uma região com alta densidade de dinucleotídeos CpG seja considerada uma ilha CpG consideram o conteúdo de citosinas e guaninas, a razão de dinucleotídeos CpG observados *versus* esperados e o tamanho da região (ZHAO; HAN, 2009).

Após ácidos nucleicos metilados terem sido identificados na década de 1950 (WYATT, 1950), o papel biológico da metilação das citosinas foi sendo aos poucos elucidado, mostrando seu envolvimento no silenciamento de alelos sujeitos ao *imprinting* genômico, dos genes do cromossomo X inativado, dos elementos transponíveis e de retrovírus endógenos, de maneira fundamental à estabilidade do genoma (BESTOR, 2000).

A metilação do DNA interfere na expressão gênica através da inibição estérica da ligação dos complexos de transcrição à região regulatória do gene e do recrutamento de proteínas que reconhecem regiões metiladas e se associam a proteínas co-repressoras (ATTWOOD; YUNG; RICHARDSON, 2002). As enzimas que catalisam a transferência do grupamento metil proveniente da S-adenosil-L-metionina à estrutura da citosina são membros de uma classe de enzimas conhecidas como DNA metiltransferases (DNMTs), composta por cinco membros – Dnmt1, Dnmt2, Dnmt3a, Dnmt3b e Dnmt3l.

A Dnmt1 (BESTOR et al., 1988) é uma proteína altamente conservada entre os eucariotos, que possui três isoformas – Dnmt1o, expressa em oócitos e embriões na fase de pré-implantação; Dnmt1p, presente em espermátocitos; e Dnmt1s, atuante em células somáticas – produzidas pelo uso diferencial de múltiplos sítios de início da transcrição (KO et al., 2005). Esta enzima tem preferência por substratos hemimetilados e se localiza próxima à forquilha de replicação onde realiza a metilação da fita recém-sintetizada de DNA, o que caracteriza a Dnmt1 como uma metiltransferase de manutenção do DNA (HERMANN; GOWHER; JELTSCH, 2004).

Outro membro das DNMTs, a Dnmt2 (YODER; BESTOR, 1998), não possui atividade catalítica para a metilação de DNA, mas sim para a metilação de RNA (JURKOWSKI et al., 2008). Embora se supusesse que as DNA metiltransferases eucarióticas tivessem surgido a partir de uma RNA metiltransferase semelhante à Dnmt2, Jurkowski e Jeltsch (2011) mostraram que, durante a evolução dos eucariotos, a enzima ancestral à atual Dnmt2 era uma DNA metiltransferase que mudou seu substrato para tRNA.

As enzimas Dnmt3a e Dnmt3b (OKANO; XIE; LI, 1998) mostram preferência por substratos desmetilados sendo, portanto, conhecidas como metiltransferases *de novo* do DNA, e também parecem ser as únicas DNMTs que realizam a metilação de citosinas em contextos diferentes do CpG (ARAND et al., 2012). Diferenças em seus domínios catalíticos sugerem que a Dnmt3a seja uma proteína mais relacionada à metilação de *loci* de cópia única que sofrem *imprinting* (KANEDA et al., 2004), enquanto a Dnmt3b está voltada para a metilação de regiões ricas em dinucleotídeos CpG, como regiões repetitivas do DNA (KATO et al., 2007). Em humanos, DNMT3A é codificada por um gene no braço curto do cromossomo 2 (2p23), enquanto um *locus* no braço longo do cromossomo 20 (20q11.2) guarda a informação para a transcrição da DNMT3B – e cada uma possui variantes geradas pelo *splicing* alternativo de seus transcritos primários (LAN et al., 2010). Okano e colaboradores (1999) mostraram que a inativação dos genes Dnmt3a e Dnmt3b impede a metilação *de novo* em células-tronco embrionárias e em embriões de camundongos, demonstrando que estas enzimas são essenciais nesse processo.

A quinta representante das DNA metiltransferases, Dnmt3l, apresenta certo grau de homologia com Dnmt3a e Dnmt3b, porém vários motivos estruturais

presentes nos domínios catalíticos destas outras duas DNMTs estão ausentes na Dnmt3l, e mesmo os motivos conservados apresentam diversas mutações (AAPOLA et al., 2000). Desta forma, Dnmt3l não possui atividade catalítica, mas atua como um co-fator para as DNA metiltransferases 3a e 3b (CHEN et al., 2005b), estando envolvida com o estabelecimento das marcas de *imprinting* genômico materno (BOURC'HIS et al., 2001).

Embora exista esta divisão de tarefas entre as DNA metiltransferases, em alguns contextos biológicos há sobreposição de função entre elas na determinação dos padrões de metilação do DNA das células. Por exemplo, Arand e colaboradores (2012) verificaram ação *de novo* de Dnmt1 em alguns elementos repetitivos e sequências de cópia única, ao mesmo tempo em que observaram que Dnmt3a e Dnmt3b têm papel na manutenção da simetria da metilação em algumas regiões do genoma de células-tronco embrionárias murinas (mESC), *in vivo*.

1.1.2. Modificações nas histonas

Outro mecanismo de regulação epigenética compreende uma série de modificações nas histonas, as proteínas que auxiliam a compactação do DNA. Estas alterações envolvem a adição de grupos químicos às caudas N-terminais de resíduos específicos de aminoácidos das histonas ou, em ocasiões mais raras, ao núcleo globular da própria histona (BANNISTER; KOUZARIDES, 2011). De forma geral, a adição destes grupamentos influencia a estrutura da cromatina, uma vez que a alteração na carga elétrica total da proteína interfere na interação entre as histonas e o DNA ou na ligação de moléculas efetoras ao DNA nesta região (WOLFFE; HAYES, 1999).

Entre as modificações de histonas, a acetilação e a desacetilação de lisinas estão entre as mais comuns e mais bem estudadas. A adição de um grupo acetil à cadeia lateral da lisina, catalisada por uma histona acetiltransferase (HAT), neutraliza a carga positiva deste aminoácido, enfraquecendo a interação entre o nucleossomo e o DNA e facilitando o acesso dos fatores de transcrição àquele gene. Por outro lado, a remoção do grupo acetil por meio de uma histona-desacetilase (HDAC), inibe a transcrição gênica por potencializar a interação entre as cargas negativas do DNA

ácido e as cargas positivas da histona básica (WOLFFE, 1996). O rol de modificações de histonas conhecidas é vasto, e muitas modificações podem ocorrer concomitantemente em um mesmo nucleossomo, de forma que a resultante do conjunto de modificações é que dará o sentido de inibição ou de favorecimento da expressão gênica (SUGANUMA; WORKMAN, 2011).

Os mecanismos de metilação do DNA e de modificações nas histonas, embora sejam didaticamente separados, muitas vezes atuam em conjunto promovendo o remodelamento da cromatina (DOBOSY; SELKER, 2001). Assim, elementos da maquinaria epigenética, como proteínas que se ligam a DNA metilado (*methyl-CpG-binding proteins*, ou MBPs), recrutam complexos de modificação de histonas para promover o silenciamento gênico. Por exemplo, a Mecp2 (*Methyl-CpG Binding Protein 2*), uma proteína importante da família MBP, se liga simultaneamente ao DNA metilado através de seu domínio MBD (*Methyl-CpG Binding Domain*) e a um complexo correpessor que recruta desacetilases de histonas por meio de seu domínio TRD (*Transcriptional Repression Domain*) (NAN et al., 1998).

1.1.3. Ação de pequenos RNAs não codificantes

Os RNAs não codificantes compreendem uma ampla categoria de moléculas com funções estruturais, enzimáticas ou regulatórias. Entre eles há os microRNAs (miRNAs): uma classe de pequenos RNAs com cerca de 22 nucleotídeos de tamanho, com expressão ubíqua nos animais e nas plantas – tanto no que se refere à sua presença nos mais diversos tecidos e células, como também entre as mais diferentes espécies – que têm um papel fundamental na regulação da tradução de RNAs mensageiros (AMBROS, 2004). Os primeiros miRNAs identificados, *lin-4* e *let-7*, foram descobertos em mutantes do nematódeo *Caenorhabditis elegans* que apresentavam problemas no desenvolvimento larval (LEE; FEINBAUM; AMBROS, 1993; REINHART et al., 2000).

Atualmente, diversos estudos dedicam-se a esclarecer o envolvimento destes pequenos RNAs nos processos biológicos. Sabemos que eles estão envolvidos com a regulação da organização temporal do desenvolvimento (LI et al., 2005), a proliferação celular (JOHNNIDIS et al., 2008), o ciclo celular (WANG et al., 2008), a

manutenção da pluripotência e reprogramação celular (LÜNINGSSCHRÖR et al., 2012, JUDSON et al., 2009), a diferenciação celular (TAY et al., 2008a), o destino celular (CORDES et al., 2009), a regulação das redes de expressão gênica (HE et al., 2007), o controle fino da expressão gênica (NEO et al., 2014) e a manutenção da robustez fenotípica (GOLJANEK-WHYSALL et al., 2011), dentre outras funções.

Os miRNAs foram descobertos há apenas 25 anos, mas certamente não porque sejam raros: o miRBase, um repositório online para dados de sequências, nomenclatura, localização genômica, predição e validação de alvos de miRNAs (GRIFFITHS-JONES et al., 2008), conta atualmente com dados de 2694 miRNAs maduros em humanos e 2014 miRNAs murinos. Análises de bioinformática concluíram que cerca de 60% dos genes humanos possuem sítios conservados de pareamento com miRNAs, constituindo-se de prováveis alvos da regulação por estes pequenos RNAs não codificantes (FRIEDMAN et al., 2009). Além de se encontrarem organizados tanto de forma isolada quanto em grupos (*clusters*) pelo genoma, diversos genes de miRNAs se sobrepõem a éxons ou estão localizados em íntrons tanto em genes codificantes quanto não codificantes de proteínas. Nestes casos, o controle da expressão do miRNA em geral está sujeito à regulação da expressão do gene hospedeiro (RODRIGUEZ et al., 2004).

Em animais, os miRNAs são transcritos principalmente pela RNA polimerase II, formando um transcrito primário chamado pri-miRNA com estrutura secundária em forma de grampo (LEE et al., 2004). A endorribonuclease Drosha, associada à proteína Dgcr-8 (HAN et al., 2004), cliva os pri-miRNAs em miRNAs precursores, os pré-miRNAs, estruturas intermediárias ainda em forma de grampo. Os pré-miRNAs são então exportados do núcleo pela Exportina-5 associada ao co-fator Ran-GTP (YI et al., 2003) e, no citoplasma, eles são processados em miRNAs duplexes com cerca de 22 nucleotídeos pela enzima Dicer (CHENDRIMADA et al., 2005). Os miRNAs duplexes são incorporados ao complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC), onde uma das fitas permanece associada e a outra é degradada (SCHWARZ et al., 2003).

O complexo RISC interage com o RNA mensageiro alvo por meio dos nucleotídeos 2 a 8 da região 5' do miRNA, chamados de "região semente" (LEWIS et al., 2003). O pareamento do miRNA é predominantemente feito com elementos da

região 3' UTR (*untranslated region*) do alvo. Entretanto, o miRNA também pode exercer regulação interagindo com o corpo do gene (*e.g.* TAY et al., 2008a) ou com a região 5' UTR do alvo (LYTLE; YARIO; STEITZ, 2007).

Os miRNAs regulam a expressão gênica através de duas formas de silenciamento. A primeira delas, o decaimento dos níveis do mRNA alvo, é resultado da sua clivagem (em caso de complementaridade perfeita ou quase perfeita entre o miRNA e o alvo) ou de sua degradação (em caso de complementaridade parcial). Neste último mecanismo, predominante em animais, ocorre o recrutamento de proteínas que removem estruturas que dão estabilidade ao mRNA – a cauda poli-A e o *cap* de metil-guanosina. A segunda forma de silenciamento consiste na repressão da tradução do mRNA alvo, que pode ocorrer pelo recrutamento de inibidores transcricionais ou pelo impedimento da ligação do mRNA ao complexo ribossomal (IWAKAWA; TOMARI, 2015).

1.2. Reprogramação epigenética no desenvolvimento embrionário

As modificações epigenéticas no genoma são, em geral, estáveis. No entanto, em mamíferos, as células germinativas e embrionárias passam por uma reprogramação epigenética que culmina no estabelecimento de um novo padrão de metilação do DNA e em um remodelamento das modificações nas histonas (MONK; BOUBELIK; LEHNERT, 1987; CEDAR; BERGMAN, 2012).

O primeiro evento de reprogramação epigenética ocorre durante a gametogênese, nas células germinativas primordiais. As marcas epigenéticas pré-existent nestas células, inclusive a metilação do DNA, são apagadas e depois, durante o crescimento e a maturação de oócitos e espermatozoides, são refeitas de acordo com a origem parental do gameta (SMALLWOOD; KELSEY, 2012).

O segundo evento de reprogramação epigenética acontece na embriogênese (LI, 2002). Durante esta fase, alguns tipos de retrotransposons, a heterocromatina centromérica e *loci* sujeitos a *imprinting* ficam protegidos do processo de desmetilação do DNA, enquanto o restante do genoma do embrião é desmetilado – tanto de forma ativa, ou seja, pela ação de enzimas que removem as marcas de metilação, quanto de forma passiva, isto é, pela replicação do DNA desmetilado

(CANTONE; FISHER, 2013). Na fase de blastocisto o genoma atinge seus níveis mais baixos de metilação (SMITH et al., 2014; OKAMOTO et al., 2016) e, após a implantação, o DNA do embrião é metilado pela ação *de novo* das DNA metiltransferases 3a e 3b (OKANO et al., 1999). A Dnmt3b é a principal DNA metiltransferase atuante no processo de remetilação do genoma, sendo detectada na massa interna celular (E4.5), no epiblasto (E5.5) e no ectoderma do embrião (E7.0), e começando a decair a partir do dia E8.5. Por outro lado, Dnmt3a começa a ser detectada em uma fase posterior, entre os dias E9.5 e E10.5 (WATANABE et al., 2002). De fato, Liao e colaboradores (2015) mostram que a inativação das enzimas DNMT3A e DNMT3B, individualmente, resulta em efeitos distintos sobre a metilação do DNA de células-tronco embrionárias humanas. Os autores demonstram que existem regiões sujeitas à metilação apenas por DNMT3B ou apenas por DNMT3A, e outras regiões que são alvos da ação das duas enzimas de forma conjunta.

À medida que a reprogramação epigenética acontece no embrião, genes relacionados à manutenção da pluripotência, como *Oct4* e *Nanog*, são silenciados por meio de extensa metilação e permanecem inativos nos tecidos adultos, assegurando estabilidade aos fenótipos diferenciados (LI et al., 2007). Genes associados à especificação de destinos celulares são diferencialmente metilados ao longo da diferenciação celular que acontece na embriogênese, contribuindo para a restrição do potencial de pluripotência e para a expressão de características que conferem a identidade celular (MOHN et al., 2008).

1.3. Regulação epigenética nas células-tronco embrionárias

Em novembro de 1998 foram publicados os primeiros trabalhos descrevendo a obtenção de células-tronco embrionárias humanas a partir de blastocistos (THOMSON et al., 1998) e de células germinativas primordiais (SHAMBLOTT et al., 1998). Tais células, que podem ser propagadas indefinidamente em cultura no estado pluripotente e indiferenciado, são capazes de se diferenciar em células dos três folhetos embrionários (ITSKOVITZ-ELDOR et al., 2000). Devido a estas características, as células-tronco embrionárias (*embryonic stem cells*, ou ESCs) são modelos interessantes para estudos sobre o desenvolvimento embrionário (DVASH;

BENVENISTY, 2004) e sobre abordagens terapêuticas, como regeneração tecidual, transplante e triagem de drogas (HWANG et al., 2008; LIU et al., 2000; KULKARNI; KHANNA, 2006). Em 2011 foi divulgada a primeira linhagem brasileira de células-tronco humanas, a BR-1 (FRAGA et al., 2011), caracterizada por um cariótipo normal e estável e pela expressão dos marcadores de pluripotência.

Estudos acerca da expressão e da atividade das DNA metiltransferases em células pluripotentes mostram que DNMT1 e DNMT3A têm níveis de expressão equivalentes em células-tronco embrionárias humanas e em células dos três folhetos germinativos derivadas delas – cerca de 50 *fpkm* (*fragments per kilobase per million fragments mapped*). DNMT3B, por outro lado, apresenta mais de 200 *fpkm* em células indiferenciadas – sendo DNMT3B3 a isoforma predominante – e cerca de 50 *fpkm* em células de ecto, endo e mesoderme – sendo DNMT3B1 a variante mais expressa nestas células (LIAO et al., 2015). Estes achados corroboram os resultados de Watanabe e colaboradores (2002) que demonstraram, por imunofluorescência, que a quantidade de Dnmt3b detectada em ESC (5ng/10mg de proteínas) é mais de dez vezes superior à quantidade de Dnmt3a encontrada nestas mesmas células (0,3ng/10mg de proteínas). Estudos reportam também que a expressão de DNMT3B varia substancialmente em células pluripotentes – células-tronco embrionárias e células de pluripotência induzida –, mesmo entre réplicas biológicas (LIAO et al., 2015).

A regulação do processo de diferenciação das células-tronco embrionárias depende, entre outros fatores, da ação de miRNAs, os quais reprimem genes relacionados com a pluripotência e impedem o retorno da célula à condição indiferenciada (MARSON et al., 2008). Assim como podemos identificar um perfil de expressão gênica característico de células-tronco embrionárias diferente do encontrado em corpos embrioides e em células diferenciadas (SATO et al., 2003; BHATTACHARYA et al., 2005), também podemos distinguir perfis de expressão de miRNAs específicos de células-tronco embrionárias (HOUBAVIY et al., 2003; CHEN et al., 2007). Isto sugere que alguns miRNAs – como o *cluster* mmu-miR-290-295 em camundongos (WANG et al., 2008) e seu homólogo humano hsa-miR-371-373 (BARROSO-DELJESUS et al., 2008) – cujos níveis de expressão decaem após a diferenciação celular, estejam relacionadas com a manutenção do estado

pluripotente e com a auto-renovação das células-tronco, enquanto outros – como o hsa-miR-145 (XU et al., 2009) e o mmu-miR-134 (TAY et al., 2008b) – que aumentam na célula após a sua diferenciação, estão envolvidas com o comprometimento da célula com uma determinada via de diferenciação.

Em mamíferos, a deleção de diversos componentes da via de biossíntese dos miRNAs resulta em letalidade ao embrião ou em incapacidade de diferenciação celular. Células-tronco embrionárias murinas que são mutantes nulos para a expressão de *Dgcr8* falham na proliferação e se acumulam na fase G1 do ciclo celular, o que pode ser revertido pela indução da expressão dos membros do *cluster* mmu-miR-290-295 (WANG et al., 2008). Este *cluster* tem sido reconhecido como o conjunto de miRNAs funcionalmente dominante em células-tronco embrionárias murinas. Sua expressão ectópica em células-tronco mutantes nulos para a expressão de *Dicer* é capaz de reverter muitos dos defeitos causados pela perda da maquinaria de miRNAs no início do desenvolvimento (SINKKONEN et al., 2008). Sua expressão foi associada ao silenciamento de uma série de inibidores de ciclo celular, incluindo *Rbl2* (Retinoblastoma-like 2 protein), o qual está envolvido com a repressão da proliferação celular (WANG et al., 2008) e com o silenciamento de isoformas de *Dnmt3a* e *Dnmt3b* (BENETTI et al., 2008; SINKKONEN et al., 2008).

1.4. Regulação de DNMT3B por miRNAs

Pesquisas recentes indicam que os miRNAs regulam diferentes moléculas envolvidas com as modificações epigenéticas (SATO et al., 2011) e que eles interferem na regulação da maquinaria de metilação da célula (GRIFFITHS; GORE, 2009; DENIS; NDLOVU; FUKS, 2011). Por exemplo, a superexpressão de membros da família hsa-miR-29 diminuiu a expressão de DNMT3A e de DNMT3B na linhagem A549 de células de tumor de pulmão (FABBRI et al., 2007) e, dentre os miRNAs da família, o hsa-miR-29b mostrou-se importante no silenciamento da expressão das DNA metiltransferases 1, 3A e 3B em células de leucemia mielóide aguda, tanto nos níveis de RNA quanto de proteínas (GARZON et al., 2009). O hsa-miR-29b também está envolvido na modulação da expressão dos genes *Dnmt3a* e *Dnmt3b* em células germinativas primordiais de embriões de camundongos (TAKADA et al., 2009). O

hsa-miR-148 também regula a expressão de DNMT3B, e o faz não pela interação com a região 3'UTR do gene, mas sim por meio de sua ligação a uma região contida na sequência codificante do mRNA de uma das isoformas da DNA metiltransferase (DUURSMA et al., 2008).

Além dos miRNAs já validados descritos na literatura, outros são preditos para o alvejamento de *DNMT3B/Dnmt3b* por diversos programas de predição (Tabela 1). Considerando que um único gene pode ser regulado por diferentes miRNAs (WU et al., 2010), os miRNAs hsa-miR-203, hsa-miR-26a e miR-26b surgem como candidatos interessantes à regulação de *DNMT3B*.

Tabela 1- MicroRNAs candidatos à regulação de DNMT3B/Dnmt3b obtidos a partir de cinco programas de predição disponíveis na internet.

Microna.org		Mirnaviewer	Targetscan 4.2		PicTar		miRGen	
<i>Homo sapiens</i>	<i>Mus musculus</i>	<i>Homo sapiens</i>	<i>Homo sapiens</i>	<i>Mus musculus</i>	Vertebrados	<i>Mus musculus</i>	<i>Homo sapiens</i>	<i>Mus musculus</i>
	29b	29a 29b 29c	29a 29b 29c	29a 29b 29c	26a 26b 29a 29b 29c	26a 26b 29a 29b 29c	26a 26b 29a 29b 29c	
129-5p					188	188	188	129-5p
203			203	203	203	203	203	188
326		326						326
365								365
379							379	
450b								450b
451								451

O hsa/mmu-miR-203 foi apontado simultaneamente por quatro programas de predição consultados, apresentando dois sítios de ligação preditos na região 3'UTR de *DNMT3B/Dnmt3b* pelo Targetscan 4.2 (o primeiro entre as posições 1081 e 1024, e o segundo entre as posições 1155 e 1161 da região 3'UTR do mRNA alvo). Além disso, este microRNA está implicado no controle do gene *Bmi1*, cuja proteína pertence ao complexo repressor Polycomb1 (WELLNER et al., 2009), também envolvido em processos relacionados à diferenciação celular. Trabalhos investigando humanos e camundongos mostraram que, ao longo da diferenciação de

queratinócitos primários induzida por cálcio, ocorre aumento na expressão do hsa/mmu-miR-203 (LENA et al., 2008; YI et al., 2008). O mmu-miR-203 também é altamente expresso nos queratinócitos da camada suprabasal da pele, em contraste com a camada basal, onde se encontram as células pluripotentes que são continuamente diferenciadas e passam a fazer parte da membrana suprabasal, no processo de regeneração epitelial (YI et al., 2008). Desta forma, a repressão da pluripotência celular é uma característica do miR-203, que nos casos estudados deu-se pelo alvejamento do *deltaNp63*, um fator de transcrição que regula a proliferação e a diferenciação dos queratinócitos. Um estudo investigando o envolvimento de hsa-miR-203 na diferenciação de hESC em células de epitélio estratificado verificou que a expressão deste miRNA aumenta logo nos primeiros dias de diferenciação induzida e a superexpressão do hsa-miR-203 produz um aumento na expressão de marcadores de queratinócitos primários, o que levou os autores a sugerirem que este miRNA esteja envolvido com processos mais iniciais da diferenciação (NISSAN et al., 2011). Outro trabalho investigando o envolvimento do hsa-miR-203 na diferenciação de hESC em células epiteliais encontrou 424 genes inibidos após a superexpressão deste miRNA. Destes, 261 possuem pelo menos um sítio de complementaridade com a sequência semente do hsa-miR-203 e muitos deles estão associados à progressão do ciclo celular e à proliferação celular (JACKSON et al., 2013).

Os miRNAs da família miR-26, além de terem sido preditos para alvejar *DNMT3B/Dnmt3b*, também foram preditos como reguladores de *MECP2/Mecp2*. O hsa-miR-26a também foi validado para o alvejamento do mRNA de *Ezh2* (WONG; TELLAM, 2008), uma proteína que faz parte do complexo repressivo Polycomb, importante na regulação dos eventos do início do desenvolvimento embrionário (LU et al., 2011). Além disso, o EZH2, por si só, interage com as DNMT3 no estabelecimento das marcas de metilação do DNA (VIRÉ et al., 2006).

Ademais, resultados de um trabalho de validação de miRNAs como reguladores da DNMT3B em células tumorais, realizado por ensaio de luciferase em nosso laboratório, mostram que os miRNAs hsa-miR-203, hsa-miR-26a e hsa-miR-26b, assim como o hsa-miR-29b, interagem diretamente com a região 3'UTR do mRNA de DNMT3B (Figura 1).

Figura 1- Efeito da introdução dos miRNAs estudados sobre a expressão de DNMT3B medido por ensaio de luciferase

Luminescência (média + DP) medida no ensaio para detecção de luciferase em células de adenocarcinoma de pulmão (A549) portando a construção híbrida que contém a região 3'UTR do mRNA de *DNMT3B* fusionada ao gene da luciferase (A549-LUC): as amostras transfectadas com microRNAs miméticos apresentaram uma emissão de luminescência menor do que as células transfectadas com uma sequência aleatória (*scrambled*). Resultados não publicados.

Tomadas em conjunto, estas evidências apontam a existência de um conjunto de miRNAs agindo em cooperação, ou ainda atuando em tecidos e janelas temporais diferentes, para regular a expressão de DNMT3B.

6. CONCLUSÃO

Com base nas evidências apresentadas, concluímos que os miRNAs investigados fazem parte da maquinaria de regulação da DNA metiltransferase 3B na diferenciação de células-tronco embrionárias, embora o exato papel funcional de cada um deles no controle da expressão de DNMT3B e na metilação do DNA destas células ainda necessite ser melhor esclarecido.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AAPOLA, U. et al. Isolation and initial characterization of a novel zinc finger gene, DNMT3L, on 21q22.3, related to the cytosine-5-methyltransferase 3 gene family. **Genomics**, v. 65, n. 3, p. 293-298, 2000.

AMBROS, V. The functions of animal microRNAs. **Nature**, v. 431, n. 7006, p. 350-355, 2004.

ARAND, J. et al. *In vivo* control of CpG and non-CpG DNA methylation by DNA methyltransferases. **PLoS Genetics**, v. 8, n. 6, p. e1002750, 2012.

ASSENOV, Y. et al. Comprehensive analysis of DNA methylation data with RnBeads. **Nature Methods**, v. 11, n. 11, p. 1138-1140, 2014.

ATTWOOD, J. T.; YUNG, R. L.; RICHARDSON, B. C. DNA methylation and the regulation of gene transcription. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 59, n. 2, p. 241-257, 2002.

BANNISTER, A. J.; KOUZARIDES, T. Regulation of chromatin by histone modifications. **Cell Research**, v. 21, n. 3, p. 381-395, 2011.

BARROSO-DELJESUS, A. et al. Embryonic stem cell-specific miR-302-367 cluster: human gene structure and functional characterization of its core promoter. **Molecular and Cellular Biology**, v. 28, n. 21, p. 6609-6619, 2008.

BENETTI, R. et al. A mammalian microRNA cluster controls DNA methylation and telomere recombination via Rbl2-dependent regulation of DNA methyltransferases. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 15, n. 9, p. 268-279, 2008.

BERGER, S. L. et al. An operational definition of epigenetics. **Genes & Development**, v. 23, n. 7, p. 781-783, 2009.

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

BESTOR, T. H. The DNA methyltransferases of mammals. *Human Molecular Genetics*, v. 9, n. 16, p. 2395-2402, 2000.

BHATTACHARYA, B. et al. Comparison of the gene expression profile of undifferentiated human embryonic stem cell lines and differentiating embryoid bodies. **BMC Developmental Biology**, v. 5, n. 22, 2005.

BOURC'HIS, D. et al. Dnmt3L and the establishment of maternal genomic imprints. **Science**, v. 294, n. 5551, p. 2536-2569, 2001.

CANTONE, I.; FISHER, A. G. Epigenetic programming and reprogramming during development. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 20, n. 3, p. 282-289, 2013.

CEDAR, H.; BERGMAN, Y. Programming of DNA methylation patterns. **Annual Review of Biochemistry**, v. 81, p. 97-117, 2012.

CHEN, C. et al. Defining embryonic stem cell identity using differentiation-related microRNAs and their potential targets. **Mammalian Genome**, v. 18, n. 5, p. 316-327, 2007.

CHEN, C. et al. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 33, n. 20, p. e179, 2005a.

CHEN, Z. et al. Physical and functional interactions between the human DNMT3L protein and members of the *de novo* methyltransferase family. **The Journal of Cellular Biochemistry**, v. 95, p. 902-917, 2005b.

CHENDRIMADA, T. P. et al. TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. **Nature**, v. 436, n. 7051, p. 740-744, 2005.

CORDES, K. R. et al. miR-145 and miR-143 regulate smooth muscle cell fate and plasticity. **Nature**, v. 460, n. 7256, p. 705-710, 2009.

DEDEURWAERDER, S. et al. Evaluation of the Infinium Methylation 450K technology. **Epigenomics**, v. 3, n. 6, p. 771-784, 2011.

DENIS, H.; NDLOVU, M. N.; FUKS, F. Regulation of mammalian DNA methyltransferases: a route to new mechanisms. **EMBO Reports**, v. 12, n. 7, p. 647-656, 2011.

DOBOSY, J. R.; SELKER, E. U. Emerging connections between DNA methylation and histone acetylation. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 58, n. 5-6, p. 721-727, 2001.

DUURSMA, A. M. et al. miR-148 targets human DNMT3b protein coding region. **RNA**, v. 14, n. 5, p. 872-877, 2008.

DVASH, T.; BENVENISTY, N. Human embryonic stem cells as a model for early human development. **Best Practice & Research: Clinical Obstetrics & Gynaecology**, v. 18, n. 6, p. 929-940, 2004.

EBERT, M. S; SHARP, P. A. Roles for microRNAs in conferring robustness to biological processes. **Cell**, v. 149, n. 3, p. 515-524, 2012.

EHRLICH, M. et al. Amount and distribution of 5-methylcytosine in human DNA from different types of tissues of cells. **Nucleic Acids Research**, v. 10, n. 8, p. 2709-2721, 1982.

FABBRI, M. et al. MicroRNA-29 family reverts aberrant methylation in lung cancer by targeting DNA methyltransferases 3A and 3B. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 40, p. 15805-15810, 2007.

FRAGA, A. M. et al. Establishment of a Brazilian line of human embryonic stem cells in defined medium: implications for cell therapy in an ethnically diverse population. **Cell Transplantation**, v. 20, n. 3, p. 431-440, 2011.

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

GARZON, R. et al. MicroRNA-29b induces global DNA hypomethylation and tumor suppressor gene reexpression in acute myeloid leukemia by targeting directly DNMT3A and 3B and indirectly DNMT1. **Blood**, v. 113, n. 25, p. 6411-6418, 2009.

GOLDBERG, A. D.; ALLIS, C. D.; BERNSTEIN, E. Epigenetics: a landscape takes shape. **Cell**, v. 128, n. 4, p. 635-638, 2007.

GOLJANEK-WHYSALL, K. et al. MicroRNA regulation of the paired-box transcription factor Pax3 confers robustness to developmental timing of myogenesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 29, p. 11936-11941, 2011.

GRIFFITHS, A. J. F. et al. **Introdução à genética**. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013. 712 p. ISBN 978-85-277-2191-2.

GRIFFITHS, E. A.; GORE, S. D. MicroRNA: mIR-ly regulators of DNMT? **Blood**, v. 113, n. 25, p. 6269-6270, 2009.

GRIFFITHS-JONES, S. et al. miRBase: tools for microRNA genomics. **Nucleic Acids Research**, v. 36, p. D154-D158, 2008. Database issue. Disponível em: <<http://www.mirbase.org>>. Acesso em 30 mar. 2018.

HAN, J. et al. The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. **Genes & Development**, v. 18, n. 24, p. 3016-3027, 2004.

HE, L. et al. A microRNA component of the p53 tumour suppressor network. **Nature**, v. 447, n. 7148, p. 1130-1134, 2007.

HERMANN, A.; GOWHER, H.; JELTSCH, A. The Dnmt1 DNA-(cytosine-C5)-methyltransferase methylates DNA processively with high preference for hemimethylated target sites. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 279, n. 46, p. 48350-48359, 2004.

HORNSTEIN, E.; SHOMRON, N. Canalization of development by microRNAs. *Nature Genetics*, v. 38, p. S20-S24, 2006. Supplement.

HOUBAVIY, H. B.; MURRAY, M. F.; SHARP, P. A. Embryonic stem cell-specific microRNAs. **Developmental Cell**, v. 5, n. 2, p. 351-358, 2003.

HWANG, N. S. et al. *In vivo* commitment and functional tissue regeneration using human embryonic stem cell-derived mesenchymal cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 52, p. 20641-20646, 2008.

ILLINGWORTH, R. S.; BIRD, A. P. CpG islands – 'a rough guide'. **FEBS Letters**, v. 583, n. 11, p. 1713-1720, 2009.

ITSKOVITZ-ELDOR, J. et al. Differentiation of human embryonic stem cells into embryoid bodies comprising the three embryonic germ layers. **Molecular Medicine**, v. 6, n. 2, p.88-95, 2000.

IWAKAWA, H. O.; TOMARI, Y. The functions of microRNAs: mRNA decay and translational repression. **Trends in Cell Biology**, v. 25, n. 11, p. 651-665, 2015.

JACKSON, S. J. et al. Rapid and widespread suppression of self-renewal by microRNA-203 during epidermal differentiation. **Development**, v. 140, p. 1882-1891, 2013.

JIN, Y. et al. Evaluating the microRNA targeting sites by luciferase reporter gene assay. **Methods in Molecular Biology**, v. 936, p. 117-127, 2013.

JOHNNIDIS, J. B. et al. Regulation of progenitor cell proliferation and granulocyte function by microRNA-223. **Nature**, v. 451, n. 7182, p. 1125-1129, 2008.

JUDSON, R. L. et al. Embryonic stem cell-specific microRNAs promote induced pluripotency. **Nature Biotechnology**, v. 27, n. 5, p. 459-461, 2009.

JURKOWSKI, T. P. et al. Human DNMT2 methylates tRNA^{Asp} molecules using a DNA methyltransferase-like catalytic mechanism. **RNA**, v. 14, n. 8, p. 1663-1670, 2008.

JURKOWSKI, T. P.; JELTSCH, A. On the evolutionary origin of eukaryotic DNA methyltransferases and DNMT2. **PLoS One**, v. 6, n. 11, p. e28104, 2011.

KANEDA, M. et al. Essential role for de novo DNA methyltransferase *Dnmt3a* in paternal and maternal imprinting. **Nature**, v. 429, n. 6994, p. 900-903, 2004.

KATO, Y. et al. Role of the DNMT3 family in de novo methylation of imprinted and repetitive sequences during male germ cell development in the mouse. **Human Molecular Genetics**, v. 16, n. 19, p. 2272-2280, 2007.

KO, Y. G. et al. Stage-by-stage change in DNA methylation status of *Dnmt1* locus during mouse early development. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 280, n. 10, p. 9627-9634, 2005.

KULKARNI, J. S.; KHANNA, A. Functional hepatocyte-like cells derived from mouse embryonic stem cells: a novel *in vitro* hepatotoxicity model for drug screening. **Toxicology In Vitro**, v. 20, n. 6, p. 1014-1022, 2006.

LAN, J. et al. DNA methyltransferases and methyl-binding proteins of mammals. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, v. 42, n. 4, p. 243-252, 2010.

LEE, R. C.; FEINBAUM, R. L.; AMBROS, V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementary to *lin-14*. **Cell**, v. 75, n. 5, p. 843-854, 1993.

LEE, Y. et al. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. **The EMBO Journal**, v. 23, n. 20, p. 4051-4060, 2004.

LENA, A. M. et al. miR-203 represses 'stemness' by repressing *ΔNp63*. **Cell Death and Differentiation**, v. 15, p. 1187-1195, 2008.

LEWIS, B. P. et al. Prediction of mammalian microRNA targets. **Cell**, v. 115, n. 7, p. 787-798, 2003.

LI, E. Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development. **Nature Reviews. Genetics**, v. 3, n. 9, p. 662-673, 2002.

LI, J. Y. et al. Synergistic function of DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b in the methylation of *Oct4* and *Nanog*. **Molecular and Cellular Biology**, v. 27, n. 24, p. 8748-8759, 2007.

LI, M. et al. Regulatory mutations of mir-48, a *C. elegans* let-7 family microRNA, cause developmental timing defects. **Developmental Cell**, v. 9, n. 3, p. 415-422, 2005.

LIAO, J. et al. Targeted disruption of *DNMT1*, *DNMT3A* and *DNMT3B* in human embryonic stem cells. **Nature Genetics**, v. 47, n. 5, 469-480, 2015.

LISTER, R. et al. Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. **Nature**, v. 462, p. 315-322, 2009.

LIU, S. et al. Embryonic stem cells differentiate into oligodendrocytes and myelinate in culture and after spinal cord transplantation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 11, p. 6126-6131, 2000.

LU, J. et al. MiR-26a inhibits cell growth and tumorigenesis of nasopharyngeal carcinoma through repression of EZH2. **Cancer Research**, v. 71, n. 1, p. 225-33, 2011.

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

LYTLE, J. R.; YARIO, T. A.; STEITZ, J. A. Target mRNAs are repressed as efficiently by microRNA-binding sites in the 5' UTR as in the 3' UTR. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 23, p. 9667-9672, 2007.

MARSON, A. et al. Connecting microRNA genes to the core transcriptional regulatory circuitry of embryonic stem cells. **Cell**, v. 134, n. 3, p. 521-533, 2008.

MOHN, F. et al. Lineage-specific Polycomb targets and *de novo* DNA methylation define restriction and potential of neuronal progenitors. **Molecular Cell**, v. 30, p. 755-766, 2008.

MONK, M.; BOUBELIK, M.; LEHNERT, S. Temporal and regional changes in DNA methylation in the embryonic, extraembryonic and germ cell lineages during mouse embryo development. **Development**, v. 99, n. 3, p. 371-382, 1987.

NAN, X. et al. Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. **Nature**, v. 393, n. 6683, p. 386-389, 1998.

NEO, W. H. et al. MicroRNA miR-124 controls the choice between neuronal and astrocyte differentiation by fine-tuning Ezh2 expression. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 30, p. 20788-20801, 2014.

NISSAN, X. et al. miR-203 modulates epithelial differentiation of human embryonic stem cells towards epidermal stratification. **Developmental Biology**, v. 356, p. 506-515, 2011.

NOAKSSON, K. et al. Monitoring differentiation of human embryonic stem cells using real-time PCR. **Stem Cells**, v. 23, n. 10, p. 1460-1467, 2005.

OLIVEIRA, A. C. et al. Combining results from distinct microRNA target prediction tools enhances the performance of analysis. **Frontiers in Genetics**, v. 8, n. 59, 2017.

OKAMOTO, Y. et al. DNA methylation dynamics in mouse preimplantation embryos revealed by mass spectrometry. **Scientific Reports**, v. 6, p. 19134, 2016.

OKANO, M. et al. DNA methyltransferases DNMT3A and DNMT3B are essential for *de novo* methylation and mammalian development. **Cell**, v. 99, n. 3, p. 247-257, 1999.

OKANO, M.; XIE, S.; LI, E. Cloning and characterization of a family of novel mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases. **Nature Genetics**, v. 19, n. 3, p. 219-220, 1998.

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

REINHART, B. J. et al. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. **Nature**, v. 403, n. 6772, p. 901-906, 2000.

RIJLAARSDAM, M. A. et al. DMRforPairs: identifying differentially methylated regions between unique samples using array based methylation profiles. **BMC Bioinformatics**, v. 15, n. 141, 2014.

RODRIGUEZ, A. et al. Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. **Genome Research**, v. 14, n. 10A, p. 1902-1910, 2004.

SATO, F. et al. MicroRNAs and epigenetics. **The FEBS Journal**, v. 278, n. 10, p. 1598-1609, 2011.

SATO, N. et al. Molecular signature of human embryonic stem cells and its comparison with the mouse. **Developmental Biology**, v. 260, n. 2, 404-413, 2003.

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

SCHWARZ, D. S. et al. Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. **Cell**, v. 115, n. 2, p. 199-208, 2003.

SHAMBLOTT, M. J. et al. Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 23, p. 13726-13731, 1998.

SINKKONEN, L. et al. MicroRNAs control de novo DNA methylation through regulation of transcriptional repressors in mouse embryonic stem cells. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 15, n. 3, p. 259-267, 2008.

SMALLWOOD, S. A.; KELSEY, G. *De novo* DNA methylation: a germ cell perspective. **Trends in Genetics**, v. 28, n. 1, p. 33-42, 2012.

SMITH, Z. D. et al. DNA methylation dynamics of the human preimplantation embryo. **Nature**, v. 511, n. 7511, p. 611-615, 2014.

STEFANI, G.; SLACK, F. J. Small non-coding RNAs in animal development. **Nature Reviews. Molecular Cell Biology**, v. 9, n. 3, p. 219-230, 2008.

SUGANUMA, T.; WORKMAN, J. L. Signals and combinatorial functions of histone modifications. **Annual Review of Biochemistry**, v. 80, p. 473-499, 2011.

TAKADA, S. et al. Potential role of miR-29b in modulation of Dnmt3a and Dnmt3b expression in primordial germ cells of female mouse embryos. **RNA**, v. 15, n. 8, p. 1507-1514, 2009.

TAY, Y. et al. MicroRNAs to *Nanog*, *Oct4* and *Sox2* coding regions modulate embryonic stem cell differentiation. **Nature**, v. 455, n. 7216, p. 1124-1128, 2008a.

TAY, Y. M. et al. MicroRNA - 134 modulates the differentiation of mouse embryonic stem cells, where it causes post - transcriptional attenuation of Nanog and LRH1. **Stem Cells**, v. 26, n. 1, p. 17-29, 2008b.

THOMSON, J. A. et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. **Science**, v. 282, n. 5391, p. 1145-1147, 1998.

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

VIRÉ, E. et al. The Polycomb group protein EZH2 directly controls DNA methylation. **Nature**, v. 439, n. 7078, p. 871-4, 2006.

WANG, Y. et al. Embryonic stem cell-specific microRNAs regulate the G1-S transition and promote rapid proliferation. **Nature Genetics**, v. 40, n. 12, p. 1478-1483, 2008.

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

WELLNER, U. et al. The EMT-activator ZEB1 promotes tumorigenicity by repressing stemness-inhibiting microRNAs. **Nature Cell Biology**, v. 11, n. 12, p. 1487-1495, 2009.

WOLFFE, A. P. Histone deacetylase: a regulator of transcription. **Science**, v. 272, n. 5260, p. 371-372, 1996.

WOLFFE, A. P.; HAYES, J. J. Chromatin disruption and modification. **Nucleic Acids Research**, v. 27, n. 3, p. 711-720, 1999.

WOLFFE, A. P.; MATZKE, M. A. Epigenetics: regulation through repression. **Science**, v. 286, n. 5439, p. 481-486, 1999.

WONG, C. F.; TELLAM, R. L. MicroRNA-26a targets the histone methyltransferase Enhancer of Zeste Homolog 2 during myogenesis. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 15, p. 9836-9843, 2008.

WU, S. et al. Multiple microRNAs modulate p21Cip1/Waf1 expression by directly targeting its 3' untranslated region. **Oncogene**, v. 29, n. 15, p. 2302-2308, 2010.

WYATT, G. R. Occurrence of 5-methyl-cytosine in nucleic acids. **Nature**, v. 166, p. 237-238, 1950.

XU, N. et al. MicroRNA-145 regulates *OCT4*, *SOX2*, and *KLF4* and represses pluripotency in human embryonic stem cells. **Cell**, v. 137, n. 4, p. 647-658, 2009.

YI, R. et al. A skin microRNA promotes differentiation by repressing 'stemness'. **Nature**, v. 452, p. 225-230, 2008.

YI, R. et al. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. **Genes & Development**, v. 17, n. 24, p. 3011-3016, 2003.

YODER, J. A.; BESTOR, T. H. A candidate mammalian DNA methyltransferase related to *pmt1p* of fission yeast. **Human Molecular Genetics**, v. 7, n. 2, p. 279-284, 1998.

ZHAO, Z.; HAN, L. CpG islands: algorithms and applications in methylation studies. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 382, n. 4, p. 643-645, 2009.