

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

**INSTITUTO CARLOS CHAGAS  
MESTRADO EM BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA**

**O EFEITO DO SILENCIAMENTO GÊNICO DE PUMILIO NA PLURIPOTÊNCIA E  
CARDIOMIOGÊNESE DE CÉLULAS-TRONCO EMBRIONÁRIAS HUMANAS**

**ISABELLE LETICIA ZABOROSKI SILVA**

**CURITIBA/PR  
2018**



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

**INSTITUTO CARLOS CHAGAS  
MESTRADO EM BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA**

*ISABELLE LETICIA ZABOROSKI SILVA*

O efeito do silenciamento gênico de PUMILIO na pluripotência e cardiomiogênese de células-tronco embrionárias humanas

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, do Instituto Carlos Chagas, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientadores: Dra. Patrícia Shigunov  
Dra. Daniela Fiori Gradia

**CURITIBA/PR  
2018**

Silva, Isabelle Leticia Zaboroski.

O efeito do silenciamento gênico de PUMILIO na pluripotência e cardiomiogênese de células-tronco embrionárias humanas / Isabelle Leticia Zaboroski Silva. - Curitiba, 2018.

xiv, 125p f.; il.

Dissertação (Mestrado) - Instituto Carlos Chagas, Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia, 2018.

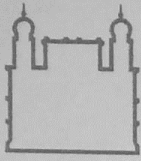
Orientadora: Patrícia Shigunov.

Co-orientadora: Daniela Fiori Gradia.

Bibliografia: f. 62-80

1. Células-tronco embrionárias. 2. Pumilio. 3. Cardiomiogênese. I. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da Biblioteca de Manguinhos/ICICT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ - PARANÁ**  
**Instituto Carlos Chagas**

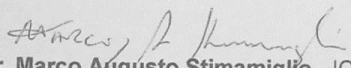
Ata da Sessão Pública de exame de dissertação para obtenção do grau de Mestre em  
Bióciências e Biotecnologia.

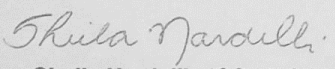
Aos 07 dias do mês de março de dois mil e dezoito, às 09 horas, nas dependências do Instituto Carlos Chagas/Fiocruz Paraná, reuniu-se a Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia, composta pelos Professores: Dr. Marco Augusto Stimamiglio, Dra. Sheila Nardelli e Dra. Alexandra Senegaglia, com a finalidade de julgar a dissertação da candidata **Isabelle Leticia Zaboroski Silva**, intitulada: “**O efeito do silenciamento gênico de Pumilio na pluripotência e cardiomiogênese de células-tronco embrionárias humanas**”, sob a orientação de Dra. Patricia Shigunov e co-orientação de Dra. Daniela Fiori Gradia, para obtenção do grau de **Mestre** em Biociências e Biotecnologia. A candidata teve até 45 (quarenta e cinco) minutos para a apresentação, e cada examinador teve um tempo máximo de arguição de 30 (trinta) minutos, seguido de 30 (trinta) minutos para resposta do(a) candidato(a) ou de 60 (sessenta) minutos quando houve diálogo na arguição. O desenvolvimento dos trabalhos seguiu o roteiro de sessão de defesa, estabelecido pela Coordenação do Programa, com abertura, condução e encerramento da sessão solene de defesa feito pelo Presidente **Dr. Marco Augusto Stimamiglio**. Após haver analisado o referido trabalho e arguido a candidata, os membros da banca examinadora deliberaram pela:

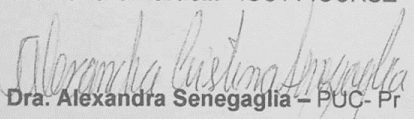
- Aprovação da dissertação por unanimidade
- Aprovação somente após satisfazer as exigências de modificações no prazo fixado pela banca (não superior a noventa dias).
- Reprovação da dissertação

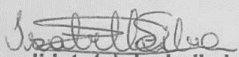
Na forma regulamentar foi lavrada a presente ata que é abaixo assinada pelos membros da banca, na ordem acima determinada, e pela candidata.

Curitiba, 07 de março de 2018

  
**Dr. Marco Augusto Stimamiglio - ICC / FIOCRUZ**

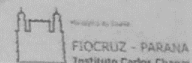
  
**Dra. Sheila Nardelli - ICC / FIOCRUZ**

  
**Dra. Alexandra Senegaglia - PUC- Pr**

  
**Candidato(a): Isabelle Leticia Zaboroski Silva**

+55(41)3316-3230

Rua Prof. Algacyr Munhoz Mader, 3775 - CIC 81350-010 Curitiba/PR, Brasil



## RESUMO

A regulação pós transcricional em células-tronco embrionárias (ESC) desempenha um papel fundamental em diferentes processos biológicos. Diversos trabalhos demonstram que múltiplos mRNAs são co-regulados por uma ou mais proteínas de ligação a RNA (RBPs) que orquestram sua expressão. As proteínas PUF formam uma família de RBPs evolutivamente conservadas e as proteínas Pumilio (membros dessa família) têm sido associadas com a manutenção do estado indiferenciado de células germinativas. Em humanos, são encontrados dois homólogos dessa família: PUM1 e PUM2. Em estudos com hESC, PUM2 parece estar associada ao estado indiferenciado dessas células, sendo mais expressa em relação a PUM1. Para buscar entender o papel destas duas proteínas em hESC, esse trabalho teve como objetivo o silenciamento gênico de *PUM1* e *PUM2* em hESC, tanto na forma indiferenciada quanto durante a diferenciação cardiomiogênica, utilizando o sistema lentiviral. A expressão de *PUM1* e *PUM2* foi analisada ao longo do processo de cardiomiogênese. Ambos mRNAs apresentam um aumento da sua expressão em nível de RNA total ao longo da diferenciação. Após estas análises, a estratégia de silenciamento gênico foi empregada. Os lentivírus utilizados como ferramenta no processo de silenciamento foram produzidos em células HEK293FT, contendo o vetor pLKO-1. Esse vetor contém sequências de shRNA que reconhecem o mRNA de *PUM1* ou *PUM2*. As hESC foram silenciadas utilizando os vetores lentivirais na diluição determinada na titulação, e, após 24 horas de transdução, RNA e proteínas foram extraídos para análise dos efeitos do silenciamento de *PUMILIO* em hESC. O silenciamento foi confirmado pela análise da expressão de *PUM1* e *PUM2* por qPCR. Foi observado também por qPCR que genes relacionados a pluripotência; *OCT4* e *NANOG*, sofreram uma diminuição nos seus níveis de mRNA. Para análise dos efeitos do silenciamento durante cardiomiogênese, RNA foi extraído de 3 pontos ao longo do processo de diferenciação (dias 1, 4 e 9). O silenciamento de *PUMILIO* não se manteve ao longo do processo de diferenciação, porém a eficiência de diferenciação aumentou nas células silenciadas. Esse resultado indica que *PUMILIO* pode ter um papel no início da diferenciação, até mesmo na manutenção da pluripotência. Alvos de Pumilio podem estar livres no citoplasma ou associados à polissomos, indicando que estão sendo traduzidos. A análise de ontologia gênica dos mRNAs nestas duas frações poderia sugerir quais estão participando do processo de diferenciação. *NFIA* (Nuclear Factor I A), um gene que codifica um fator de transcrição descrito como regulador da via Notch, participando no desenvolvimento de mesoderme e linhagem cardíaca, é um alvo de *PUMILIO*. *NFIA* mostrou-se aumentado durante a diferenciação cardiomiogênica. Os dados obtidos nesse trabalho sugerem que *PUMILIO* participe da regulação da pluripotência e cardiomiogênese de hESC.

**Palavras-chave:** células-tronco embrionárias, Pumilio, cardiomiogênese.

## ABSTRACT

Post transcriptional regulation in embryonic stem cells (ESC) plays a key role in different biological processes. Several works demonstrate that multiple mRNAs are co-regulated by one or more RNA binding proteins (RBPs) that orchestrate their expression. PUF proteins form a family of evolutionarily conserved RBPs and Pumilio proteins (members of this family) have been associated with maintenance of undifferentiated germ cell status. In humans, two homologues of this family are found: PUM1 and PUM2. In studies with hESC, PUM2 appears to be associated with the undifferentiated state of these cells, being more expressed in relation to PUM1. In order to understand the role of these two proteins in hESC, this work aimed to gene silencing of *PUM1* and *PUM2* in hESC, both in undifferentiated form and during cardiomyogenic differentiation, using the lentiviral system. Expression of *PUM1* and PUM2 was analyzed through cardiomyogenesis process. Both mRNAs show an increase in their expression at the level of total RNA throughout the differentiation. After these analyzes, gene silencing strategy was employed. Lentiviruses used as a tool in silencing process were produced in HEK293FT cells, containing vector pLKO-1. This vector contains shRNA sequences that recognize the mRNA of *PUM1* or *PUM2*. hESC were silenced using the lentiviral vectors at dilution determined in the titration, and after 24 hours of transduction, RNA and proteins were extracted to analyze the effects of silencing of PUMILIO on hESC. Silencing was confirmed by analysis of the expression of *PUM1* and *PUM2* by qPCR. Genes related to pluripotency; *OCT4* and *NANOG* decreased in their mRNA levels. For analysis of the effects of silencing during cardiomyogenesis, RNA was extracted from 3 points throughout the differentiation process (days 1, 4 and 9). Silencing of PUMILIO was not maintained through differentiation process, but the efficiency of differentiation increased in the silenced cells. This result indicates that PUMILIO may play a role early in differentiation, even in maintenance of pluripotency. Pumilio targets may be free in the cytoplasm or associated with polysomes, indicating that they are being translated. Genetic ontology analysis of the mRNAs in these two fractions could suggest which are participating in the differentiation process. *NFIA* (Nuclear Factor IA), a gene that encodes for transcription factor described as regulator of the Notch pathway, participating in the development of mesoderm and cardiac lineage, is a target of PUMILIO. *NFIA* was increased during cardiomyogenic differentiation. The data obtained in this study suggest that PUMILIO participates in the regulation of pluripotency and cardiomyogenesis of hESC.

**Key-words:** embryonic stem cells, Pumilio, cardiomyogenesis.

Não aprendemos a fazer ciência criando regras sobre como fazer ciência, mas a partir da experiência de fazer ciência, movidos pelo desejo de sentir o prazer que sentimos quando nossos métodos conseguem explicar alguma coisa.

-Steven Weinberg

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, primeiramente, por me permitir exercer os dons da sabedoria, da ciência e do entendimento, e sempre me desafiando a exercitar o dom da fortaleza.

Agradeço à Fiocruz e órgãos de fomento (CNPq, CAPES e Fundação Araucária) pelo apoio financeiro.

Agradeço às Plataformas de Citometria de Fluxo e de Microscopia, à todo o pessoal do Instituto Carlos Chagas, por propocionar a estrutura para que este projeto fosse realizado.

Agradeço às minha orientadoras, Patrícia e Daniela, pela amizade, pelo carinho na orientação, pela parceria nos experimentos aos finais de semana, pela dedicação por me ensinar a ser um pouco das cientistas que são.

Agradeço ao Dr. Bruno Dallagiovanna, que inicialmente aceitou me orientar.

Agradeço aos demais pesquisadores do LabCet, Dr. Alejandro Correa, Dr. Marco Stimamiglio e Dra Alessandra Aguiar, pelos conselhos e dicas, e pela parceria.

Agradeço à todo o pessoal do LabCet: Ariane, Maria Julia, Cintia, Bernardo, Marina, Amanda, Crisciele, Alan, Jhonatan, Lucas, Thamile, Bruna Marcon, Bruna Falavinha, Ana Paula, Addeli, Isabela e Anny, pela amizade, pela ajuda, pelo apoio, por me acolherem nesses dois anos.

Agradeço aos meus pais, Célio e Matilde, pelo apoio e amor incondicional, pelo crescimento pessoal que se refletiu no crescimento profissional ao longo dessa caminhada.

Agradeço ao meu irmão Lucas, que, embora não saiba ainda, manteve viva em mim a curiosidade, a alegria e a esperança de uma criança.

Agradeço à minha família, que mesmo sem às vezes compreender os motivos das viagens adiadas e das reuniões perdidas, é minha base para ter chegado até aqui.

Agradeço à Gabriele, pela amizade que dura uma década e pode me fornecer apoio sempre que precisei, mesmo de longe.

Agradeço à Fernanda, pela amizade na vida, pelas visitas, risadas e passeios gastronômicos.

Agradeço aos meus colegas de profissão e amigos, Bruna, Giovanna, Nathalia, Thays, Valéria e Paulo, que aguentaram comigo as dores e dividiram comigo as vitórias deste projeto.

Agradeço ao Filipe, por ter feito metade desse tempo mais doce, me aturado quando nem eu me aguentava mais, por ter sido a melhor pessoa que eu poderia pedir para ser meu apoio, por tornar os dias mais leves quando tudo parecia desandar.

Agradeço à todas as pessoas que passaram pela minha vida ao longo desta caminhada, contribuindo de alguma forma, com um conselho, um ombro amigo ou um bolo.



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|                 |   |
|-----------------|---|
| BSA             | Albumina de soro bovino ( <i>Bovine Serum Albumin</i> )   |
| cAMP            | Adenosina Monofosfato cíclico   |
| cDNA            | DNA complementar  |
| CE              | Corpos embrióides   |
| CLIP-seq        | Crosslinking e imunoprecipitação seguido de sequenciamento<br>(Crosslinking and immunoprecipitation followed by sequencing) |
| cm <sup>2</sup> | Centímetros quadrados   |
| DAPI            | 4,6-diamidino-2-phenylindole  |
| DMEM            | Dulbecco's Modified Eagle's Medium  |
| DNA             | Ácido Desoxirribonucleico   |
| DNase           | Desoxirribonuclease   |
| ESC             | Célula-tronco embrionária ( <i>Embryonic Stem Cell</i> )  |
| GO              | Ontologia Gênica ( <i>Gene Ontology</i> )   |
| hESC            | Célula-tronco embrionária humana ( <i>human Embryonic Stem Cell</i> )   |
| iPSC            | Célula-tronco de pluripotência induzida ( <i>induced Pluripotent Stem Cell</i> )  |
| IRES            | Sítio de Reconhecimento Interno de Ribossomo  |
| mESC            | Célula-tronco embrionária murina ( <i>murine Embryonic Stem Cell</i> )  |
| miRNA           | Micro RNA   |
| ml              | Mililitros  |
| mRNA            | RNA mensageiro  |
| ng              | Nanogramas  |
| PBS             | Solução salina tamponada ( <i>Phosphate Buffered Saline</i> )   |
| PCR             | Reação em Cadeia da Polimerase ( <i>Polymerase Chain Reaction</i> )   |
| PUM-HD          | Domínio de homologia de PUMILIO ( <i>PUMILIO Homology Domain</i> )  |
| PRE             | Elemento de reconhecimento de PUMILIO ( <i>PUMILIO Response Element</i> )   |
| PS              | Penicilina e Streptomicina  |
| PUF             | Família de proteínas Pumilio-FBF  |
| qPCR            | PCR em tempo real quantitativa  |
| RBP             | Proteínas de ligação ao RNA ( <i>RNA binding proteins</i> )   |
| RIP-seq         | Imunoprecipitação e sequenciamento de RNA ( <i>RNA immunoprecipitation and sequencing</i> )                                 |
| RNP             | Ribonucleoproteínas   |

|          |  |
|----------|--|
| RNA      | Ácido ribonucleico   |
| RNAi     | RNA de interferência   |
| RNase    | Ribonuclease   |
| RNA-seq  | Sequenciamento de RNA  |
| SDS      | Dodecil Sulfato de Sódio                                       |
| SDS-PAGE | Eletroforese em gel de poliacrilamida                          |
| shRNA    | RNA com curto hairpin (short hairpin RNA)                      |
| siRNA    | RNA pequeno de interferência ( <i>small interference RNA</i> ) |
| SNC      | Sistema nervoso central  |
| TBS      | Solução salina tamponada ( <i>Tris Buffered Saline</i> )       |
| µg       | Microgramas  |
| µl       | Microlitros  |
| µm       | Micrometros  |
| UTR      | Região não traduzida ( <i>Untranslated Region</i> )            |
| V        | Volts  |

## LISTA DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| Figura 1.1 – Tipos de células-tronco e suas fontes. ....   | 2  |
| Figura 1.2 – Folhetos embrionários e tecidos derivados .....   | 3  |
| Figura 1.3 – Tipos de cultivos iniciais de hESC para diferenciação <i>in vitro</i> .....   | 5  |
| Figura 1.4 – Marcadores expressos durante a diferenciação cardiomiogênica <i>in vitro</i><br>.....                                     | 6  |
| Figura 1.5 - Desenvolvimento cardíaco inicial .....  | 7  |
| Figura 1.6 - Pontos chave onde a expressão gênica pode ser regulada.....   | 9  |
| Figura 1.7 - Estrutura de PUM-HD e o sítio PRE .....   | 13 |
| Figura 1.8 – Mecanismos de regulação de PUMILIO .....  | 17 |
| Figura 1.9 – Mecanismo de expressão e ação de miRNA.....   | 18 |
| Figura 1.10 – Mecanismos de RNAi <i>in vitro</i> .....   | 20 |
| Figura 4.1 – Esquema de produção dos lentivírus .....  | 24 |
| Figura 4.2 – Esquema da análise dos alvos de PUM envolvidos na cardiomiogênese<br>.....  | 31 |
| Figura 5.1 - Fragmentos das sequências proteica e do mRNA de PUM1 e PUM2<br>humanas.....   | 32 |
| Figura 5.2 – hESC e diferenciação cardiomiogênica.....   | 33 |
| Figura 5.3 – Análise de marcadores linhagem-específicos como pontos de checagem<br>durante a cardiomiogênese .....                     | 35 |
| Figura 5.4 - Expressão dos mRNAs de <i>PUM1</i> e <i>PUM2</i> ao longo da diferenciação ..   | 36 |
| Figura 5.5 – Análise morfológica das células após adição de puomicina .....  | 37 |
| Figura 5.6 – Gráfico representando a viabilidade celular após a adição de puomicina<br>.....   | 37 |
| Figura 5.7 – Titulação dos vetores lentivirais produzidos .....  | 38 |
| Figura 5.8 – Morfologia das colônias de hESC .....   | 39 |
| Figura 5.9 – Morfologia das hESCs após o silenciamento de <i>PUMILIO</i> .....   | 40 |
| Figura 5.10 – Análise de expressão de <i>PUMILIO</i> , <i>OCT4</i> e <i>NANOG</i> após o<br>silenciamento .....                        | 41 |
| Figura 5.11 – Nível proteico de PUMILIO após o silenciamento em hESC .....   | 41 |
| Figura 5.12 – Morfologia das células silenciadas para <i>PUMILIO</i> durante<br>cardiomiogênese .....                                  | 43 |
| Figura 5.13 – Análise de marcadores linhagem-específicos em células silenciadas<br>para <i>PUMILIO</i> durante a cardiomiogênese ..... | 44 |

|   |    |
|---|----|
| Figura 5.14 – Porcentagem das células com expressão dos marcadores linhagem-específicos durante cardiomiogênese de hESC silenciadas para <i>PUMILIO</i> ..... | 45 |
| Figura 5.15 – Quantificação dos mRNAs de <i>PUM1</i> e <i>PUM2</i> após silenciamento ao longo da diferenciação cardiomiogênica .....                         | 46 |
| Figura 5.16 - Nível proteico de PUMILIO após o silenciamento nos dias 1 e 15 da cardiomiogênese. ....   | 46 |
| Figura 5.17 – <i>Clusters</i> do comportamento dos alvos de PUMILIO durante a cardiomiogênese presentes na fração livre. ....                                 | 47 |
| Figura 5.18 – <i>Clusters</i> do comportamento dos alvos de PUMILIO durante a cardiomiogênese presentes na fração polissomal.....                             | 47 |
| Figura 5.19 – <i>Clusters</i> analisados .....  | 48 |
| Figura 5.20 – Classificação dos genes de LIVRE3 pelo software <i>Panther</i> .....  | 49 |
| Figura 5.21 – Classificação dos genes de POLI5 pelo software <i>Panther</i> .....   | 50 |
| Figura 5.22 – Processos biológicos dos <i>clusters</i> LIVRE3 e POLI5 .....   | 51 |
| Figura 5.23 – Funções moleculares dos <i>clusters</i> LIVRE3 e POLI5 .....  | 52 |
| Figura 5.24 – Alvos de PUMILIO envolvidos em desenvolvimento e comunicação celular/fator transcricional.....  | 53 |
| Figura 5.25 – Expressão de <i>FOXA1</i> ao longo da cardiomiogênese .....   | 54 |
| Figura 5.26 – Expressão de <i>NFIA</i> ao longo da cardiomiogênese .....  | 54 |

## SUMÁRIO

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1 INTRODUÇÃO</b> .....   | <b>1</b>  |
| 1.1 CÉLULAS-TRONCO .....  | 1         |
| <b>1.1.1 Células-tronco embrionárias</b> .....                                | <b>2</b>  |
| <b>1.1.2 Diferenciação <i>in vitro</i></b> .....                              | <b>4</b>  |
| 1.2 DIFERENCIAÇÃO CARDIOMIOGÊNICA <i>IN VITRO</i> .....                       | 5         |
| 1.3 DESENVOLVIMENTO CARDIOMIOGÊNICO <i>IN VIVO</i> .....                      | 7         |
| 1.4 REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA .....                                       | 8         |
| <b>1.4.1 Regulação pós-transcricional</b> .....                               | <b>10</b> |
| <b>1.4.2 Proteínas de ligação ao RNA</b> .....                                | <b>11</b> |
| 1.5 PUMILIO .....   | 12        |
| <b>1.5.1 Parceiros de Pumilio</b> .....                                       | <b>14</b> |
| <b>1.5.2 Mecanismos de ação de Pumilio</b> .....                              | <b>15</b> |
| <b>1.5.3 Regulação de Pumilio</b> .....                                       | <b>16</b> |
| 1.6 SILENCIAMENTO GÊNICO .....  | 17        |
| <b>2 JUSTIFICATIVA</b> .....  | <b>21</b> |
| <b>3 OBJETIVOS</b> .....  | <b>22</b> |
| 3.1 OBJETIVO GERAL .....  | 22        |
| 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....   | 22        |
| <b>4 METODOLOGIA</b> .....  | <b>23</b> |
| 4.1 COMITÊ DE ÉTICA .....   | 23        |
| 4.2 ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS DE PUMILIO .....                               | 23        |
| 4.3 PRODUÇÃO DE LENTIVÍRUS .....  | 23        |
| 4.4 CULTIVO DE hESC .....   | 24        |
| 4.5 CURVA DE PUROMICINA .....   | 24        |
| 4.6 TITULAÇÃO DOS VETORES LENTIVIRAIS .....                                   | 25        |
| 4.7 TRANSDUÇÃO DAS HESC PARA O SILENCIAMENTO DE PUMILIO .....                 | 25        |
| 4.8 EXTRAÇÃO DE RNA, SÍNTESE DE cDNA E PCR .....                              | 26        |
| 4.9 EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS E WESTERN BLOT .....                                | 27        |
| 4.10 DIFERENCIAÇÃO CARDIOMIOGÊNICA .....                                      | 27        |
| 4.11 CITOMETRIA DE FLUXO .....  | 28        |
| 4.12 ANÁLISE DOS ALVOS DE PUMILIO ENVOLVIDOS NA CARDIOMIOGÊNESE DE hESC ..... | 29        |
| <b>5 RESULTADOS</b> .....   | <b>32</b> |
| 5.1 ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS DE PUMILIO .....                               | 32        |

|  |           |
|--|-----------|
| 5.2 MORFOLOGIA DAS HESC E CARDIOMIOGÊNESE .....  | 33        |
| 5.3 EXPRESSÃO DE PUMILIO EM hESC E DIFERENCIAÇÃO CARDIOMIOGÊNICA .....                                   | 35        |
| 5.4 CURVA DE SELEÇÃO COM PUROMICINA.....   | 36        |
| 5.5 TITULAÇÃO DOS VETORES LENTIVIRAIS.....   | 38        |
| 5.6 EFEITO DO SILENCIAMENTO DE PUMILIO NA PLURIPOTÊNCIA DE hESC .  | 39        |
| 5.7 EFEITO DO SILENCIAMENTO DE PUMILIO AO LONGO DA DIFERENCIAÇÃO CARDIOMIOGÊNICA .....                   | 41        |
| 5.8 PERFIL DE EXPRESSÃO DE PUMILIO AO LONGO DA CARDIOMIOGÊNESE APÓS O SILENCIAMENTO .....                | 45        |
| 5.9 ALVOS DE PUMILIO ENVOLVIDOS NA CARDIOMIOGÊNESE .....   | 46        |
| 5.10 EXPRESSÃO DOS ALVOS DE PUMILIO AO LONGO DA DIFERENCIAÇÃO CARDIOMIOGÊNICA APÓS O SILENCIAMENTO ..... | 53        |
| <b>6 DISCUSSÃO .....</b>   | <b>55</b> |
| <b>7 CONCLUSÕES .....</b>  | <b>61</b> |
| <b>REFERÊNCIAS.....</b>  | <b>62</b> |
| <b>ANEXOS .....</b>  | <b>81</b> |

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 CÉLULAS-TRONCO

Células-tronco são células com capacidade de autorrenovação por ciclos indefinidos e diferenciação em diversas linhagens celulares (WEISSMAN, 2000). Além do desenvolvimento embrionário, essas células são importantes na reparação de danos e renovação natural dos tecidos, como acontece com intestino, pele e sangue (FUCHS; SEGRE, 2000).

As células-tronco podem ser classificadas de acordo com seu potencial de diferenciação (totipotentes, pluripotentes ou multipotentes) ou sua origem (adultas ou embrionárias). Células totipotentes possuem a capacidade de diferenciação que engloba todos os tecidos adultos e embrionários, até mesmo os anexos embrionários (estruturas extraembrionárias), como placenta. Células pluripotentes conseguem se diferenciar em linhagens dos três folhetos embrionários, perdendo a capacidade de diferenciação para as estruturas extraembrionárias. Células multipotentes possuem a capacidade de diferenciação mais restrita, dando origem a poucas linhagens celulares tecido-específicas (MUMMERY et al., 2014).

Células-tronco adultas são encontradas nos tecidos fetal e adulto. Essas células são multipotentes, mantendo sua capacidade de diferenciação principalmente no tecido residente, seja ele medula óssea, tecido pancreático ou tecido nervoso (Figura 1.1C) (MUMMERY et al., 2014). Entretanto, essas células são capazes de transdiferenciar em linhagens celulares de outros tecidos (revisado em ROMANIUK et al., 2013). Ainda que encontradas em muitos tecidos, sua população é pequena, em torno de 0,01% em 1 g de tecido (PITTENGER et al., 1999), o que dificultou inicialmente o uso em terapias. Atualmente, é possível expandir estas células para serem usadas na terapia celular (revisado em JOSSEN et al., 2018; PLANCHON et al., 2018). Outra capacidade descrita das células-tronco adultas, além do reparo tecidual *in situ*, é a de imunomodulação, tornando seu uso interessante em algumas terapias (revisado em ROMANIUK et al., 2013).

Em 2006, Takahashi e Yamanaka reprogramaram fibroblastos murinos adultos, adicionando fatores de pluripotência exógenos, tornando essas células pluripotentes (TAKAHASHI; YAMANAKA, 2006). Em 2007, ensaios similares foram realizados em fibroblastos adultos humanos (TAKAHASHI et al., 2007). Essas células passaram a ser conhecidas como células-tronco pluripotentes induzidas (iPSC, *induced Pluripotent Stem Cells*). As iPSCs são células reprogramadas ao estado de pluripotência, expressando os marcadores encontrados em células-tronco

embrionárias (Figura 1.1B) (THOMSON et al., 1998; TAKAHASHI; YAMANAKA, 2006; TAKAHASHI et al., 2007). Essas células têm sido utilizadas para estudos de doenças genéticas, onde células somáticas de pacientes são reprogramadas e diferenciadas no tecido de interesse. Pode-se observar o desenvolvimento da doença e estabelecer estudos de triagem de drogas ao diferenciar essas células em hepatócitos ou observar a toxicidade de uma determinada droga *in vitro*, por exemplo (revisado em YAMANAKA, 2009).

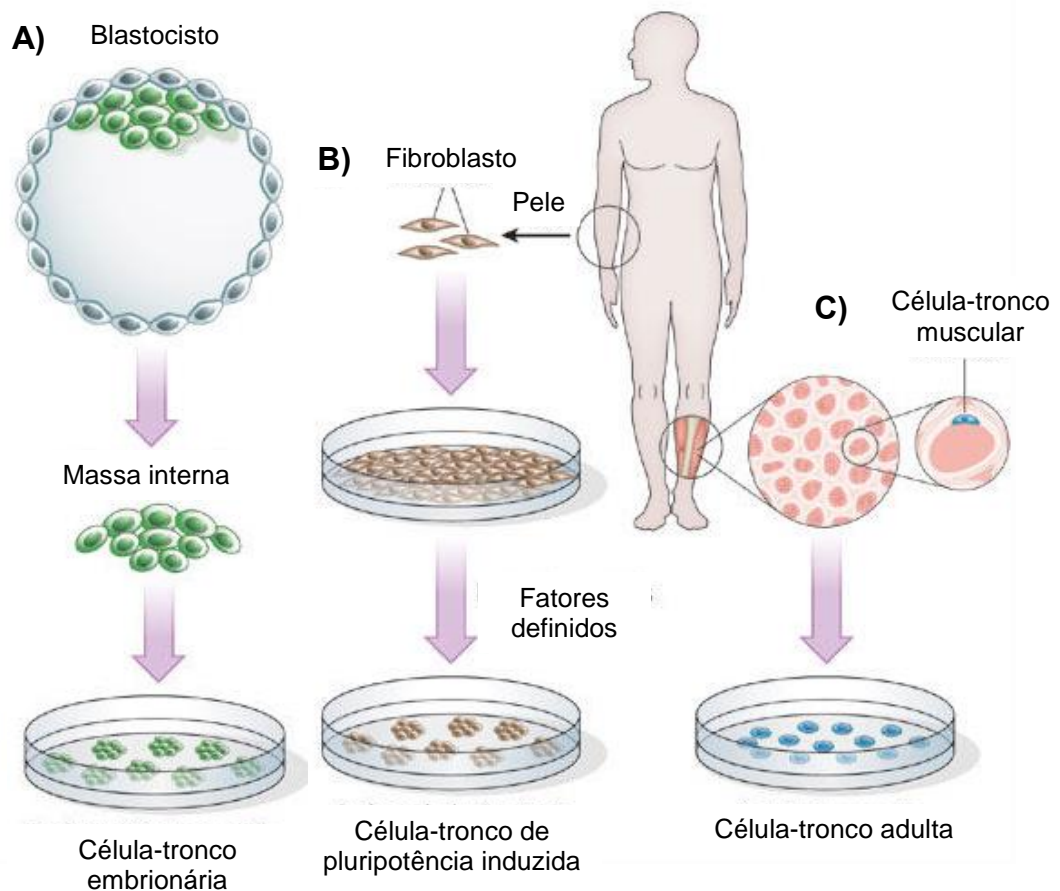


Figura 1.1 – Tipos de células-tronco e suas fontes. A) Células-tronco embrionárias, derivadas da massa interna do blastocisto, são células pluripotentes. B) Células-tronco de pluripotência induzida, células somáticas que foram reprogramadas a um estado de pluripotência. C) Células-tronco adultas, derivadas de diversos tecidos do organismo, como tecido adiposo, medula óssea e músculo esquelético, são células multipotentes. Fonte: adaptado de LUTOLF et al., 2009.

### 1.1.1 Células-Tronco embrionárias

Células-tronco embrionárias (ESC, *Embryonic Stem Cells*) são células pluripotentes derivadas da massa interna do blastocisto (Figura 1.1A) (BRADLEY, 1990; FUCHS; SEGRE, 2000), isoladas pela primeira vez a partir de embriões murinos por Gail Martin (MARTIN, 1981). Em 1998, ESC foram isoladas da massa interna de



blastocisto humano, apresentando capacidade de se proliferar *in vitro*, permanecendo indiferenciadas, e apresentando um potencial para diferenciação nos três folhetos embrionários (THOMSON et al., 1998). A endoderme dará origem ao epitélio que reveste os órgãos internos, a ectoderme dará origem à pele e seus acessórios e ao sistema nervoso, e a mesoderme dará origem aos músculos e tecido conjuntivo (Figura 1.2) (MOORE et al., 2012).

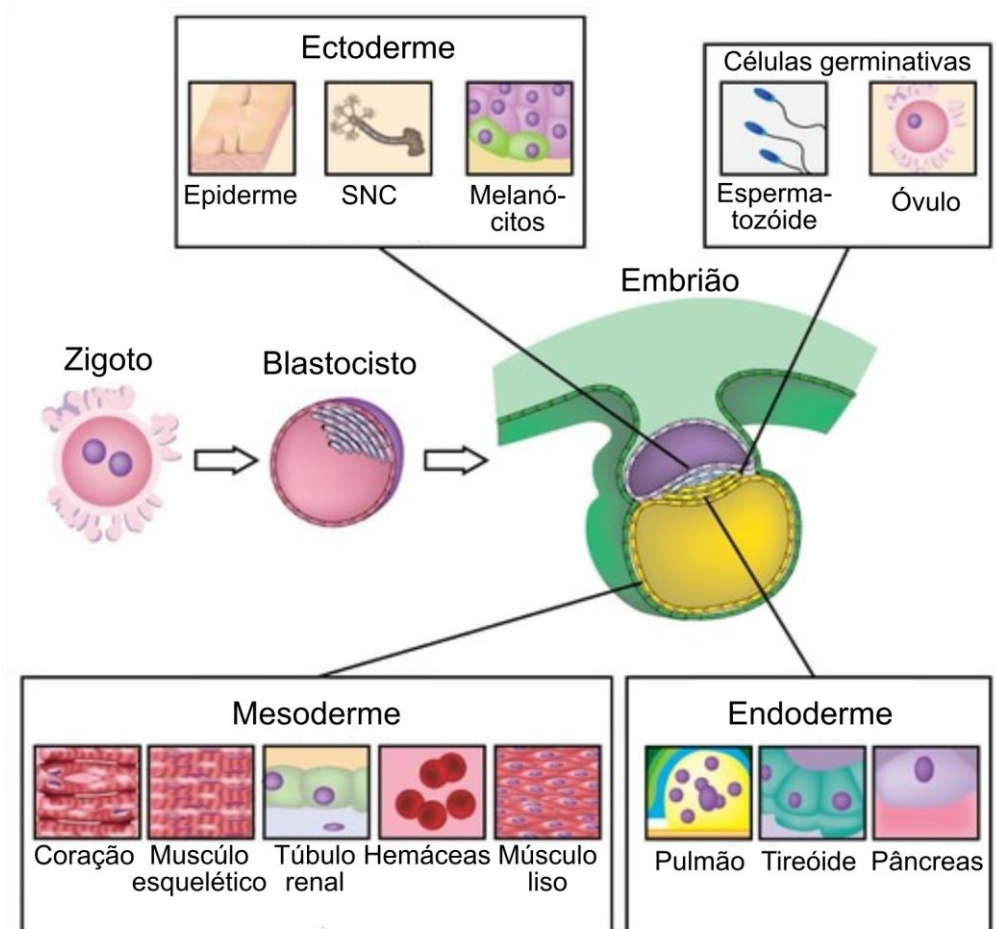


Figura 1.2 – Folhetos embrionários e tecidos derivados. A partir da massa interna do blastocisto (ou embrioblasto), originam-se três folhetos embrionários após a gastrulação: endoderme, mesoderme e ectoderme. Cada um desses folhetos dará origem a diferentes tecidos e órgãos durante o desenvolvimento embrionário. Fonte: adaptada de Terese Winslow, Caitlin Duckwall ©, 2001 (NIH).

Quando ESC são injetadas *in vivo* formam teratomas, ou seja, tumores com células derivadas dos três folhetos embrionários. *In vitro*, ESC são caracterizadas pela expressão de marcadores de superfície, como SSEA-3/4, TRA-1-60 e TRA-1-81, e de fatores de transcrição, como *OCT4* (CARPENTER et al., 2003).

### 1.1.2 Diferenciação *in vitro*

Durante o estado indiferenciado, ESC expressa genes chave para manter a pluripotência: *OCT4* (*POU class 5 homeobox 1*), *SOX2* (*SRY-box 2*) e *NANOG* (*Nanog homeobox*). Esses três fatores de transcrição são responsáveis por regular positivamente a si mesmos e a genes que ajudam a manter a pluripotência, e contribuem na repressão de genes linhagem-específicos (revisado em YOUNG, 2011).

A manutenção da pluripotência ou a diferenciação são induzidos por estímulos externos. As moléculas da família TGF Activina A e Nodal, por exemplo, sinalizam para que SMAD2/3, fatores de transcrição, mantenham a expressão de *NANOG* (XU et al., 2008; VALLIER et al., 2009). Já antagonistas de Nodal, LEFTY1/2, desencadeiam a diferenciação endodermal (CHAZAUD et al., 2006; TAKAOKA et al., 2006), enquanto BMP4 sinaliza para que SMAD1/5/8 inibam a expressão de *NANOG* (GREBER et al., 2007). A regulação dessa sinalização deve ser precisa, uma vez que uma molécula pode causar diferentes respostas em hESC, dependendo da sua interação. Por exemplo, FGF2 (*Fibroblast Growth Factor 2*) leva à produção de IGF2 (*Insulin like Growth Factor 2*), molécula que bloqueia a sinalização de activina A ou Nodal, prevenindo a diferenciação endodermal (MCLEAN et al., 2007). Mas FGF2 agindo em conjunto com a via de MEK-ERK pode induzir a diferenciação para células neurais, e essa ação é bloqueada pela ação de activina A ou Nodal (VALLIER et al., 2009; WANG et al., 2009). Outra via de sinalização estudada em ESC é a via Wnt. Inicialmente, estudos indicavam que a ativação da via por WNT3A levava à autorrenovação das células (SATO et al., 2004; CAI et al., 2007; ULLMANN et al., 2008), mesmo que por um curto espaço de tempo (DRAVID et al., 2005; DAVIDSON et al., 2012; NAKANISHI et al., 2017). Porém, o acúmulo de  $\beta$ -catenina, molécula efetora da via, na célula parece levar à rápida diferenciação em progenitores mesodermis, e o bloqueio da via aumenta a autorrenovação e a propagação de ESC (SUMI et al., 2008; DAVIDSON et al., 2012; KIM et al., 2013; BERGE et al., 2014). Curiosamente, essas respostas à estímulos externos para diferenciação parecem ser mais efetivos em células na fase G1 do ciclo celular (revisado em BOWARD et al., 2016).

À medida que a ESC avança para a diferenciação, a expressão de genes associados à pluripotência, como *Oct4*, *Klf4*, *Nanog* e *cMyc*, são regulados negativamente, e genes associados com o folheto embrionário com a qual está se comprometendo são regulados positivamente (STUMPF et al., 2017). Exemplos de

genes linhagem—específicos são a Nestina (ectoderme) (SIDHU; TUCH, 2006), Sox17 (endoderme) (KING et al., 2008) e Brachyury T (mesoderme) (BAUWENS et al., 2009).

As células-tronco embrionárias humanas (hESC) já foram diferenciadas *in vitro* em diversas linhagens (ITSKOVITZ-ELDOR et al., 2000; SCHULDINER et al., 2000), como neural (ZHANG et al., 2001; LEE, G. et al., 2007), pancreática (D'AMOUR et al., 2006; KROON et al., 2008) e cardíaca (KEHAT; KENYAGIN-KARSENTI, 2001; MORETTI et al., 2006). Existem diferentes protocolos para o início da diferenciação de hESC para essas linhagens, tanto a partir de co-cultivo com células da endoderme visceral (MUMMERY et al., 2003) como de monocamada de células hESC (LAFLAMME et al., 2007; PAIGE et al., 2010). Ainda, o primeiro protocolo, e um dos mais utilizados até hoje, é a partir da formação de corpos embrióides (CEs) (Figura 1.3) (STEVENS, 1960; XU et al., 2002; HE et al., 2003; BURRIDGE et al., 2007; NG et al., 2011).

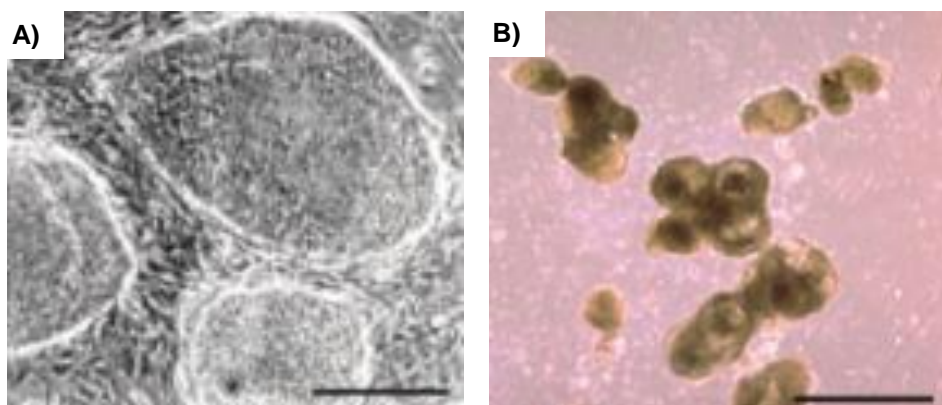


Figura 1.3 – Tipos de cultivos iniciais de hESC para diferenciação *in vitro*. A) colônias de hESC em co-cultivo com MEF (*Mouse Embryonic Fibroblast*, Fibroblasto Embrionário Murino). B) Corpos embrióides (CEs). Barra de escala: 400µm. Fonte: adaptado de XU et al., 2002.

A diferenciação cardiomiogênica *in vitro* das hESC muitas vezes mimetiza o desenvolvimento embrionário, podendo ser usada como modelo para estudos do desenvolvimento cardíaco *per se* e como modelo para pesquisas que abrangem desde a eletrofisiologia do tecido até triagem de drogas (revisado em MUMMERY et al., 2012).

## 1.2 DIFERENCIAÇÃO CARDIOMIOGÊNICA *IN VITRO*

Na diferenciação cardiomiogênica *in vitro*, após a formação de CEs, as células são induzidas a diferenciar em progenitores mesodermiais, onde vão deixando de expressar marcadores de hESC, como EpCAM, e começam a expressar marcadores

de mesoderme, como CD56 (Figura 1.4) (EVSEENKO et al., 2010). Após confirmar que as hESC estão no caminho de diferenciação mesodermal pela expressão dos marcadores como o CD56, essas células são induzidas ao estágio de progenitores cardíacos. Inicialmente, KDR e SSEA-1 eram utilizados como marcadores de progenitores cardíacos (KATTMAN et al., 2006; BLIN et al., 2010). Porém, KDR é expresso também em outras linhagens derivadas de mesoderme (KATTMAN et al., 2011) e SSEA-1 também marca células em diferenciação endotelial (BLIN et al., 2010). Como alternativa para esse problema, células transgênicas com a sequência que codifica GFP (*Green Fluorescent Protein*) em *loci* de fatores de transcrição envolvidos nessa fase da diferenciação vêm sendo utilizadas (MORETTI et al., 2006; WU et al., 2006; ELLIOTT et al., 2011). Assim, células que deixam ou começam a expressar GFP podem ser facilmente identificadas por microscopia de fluorescência ou citometria de fluxo, indicando que estão comprometidas com determinada linhagem celular (revisado em MUMMERY et al., 2012).

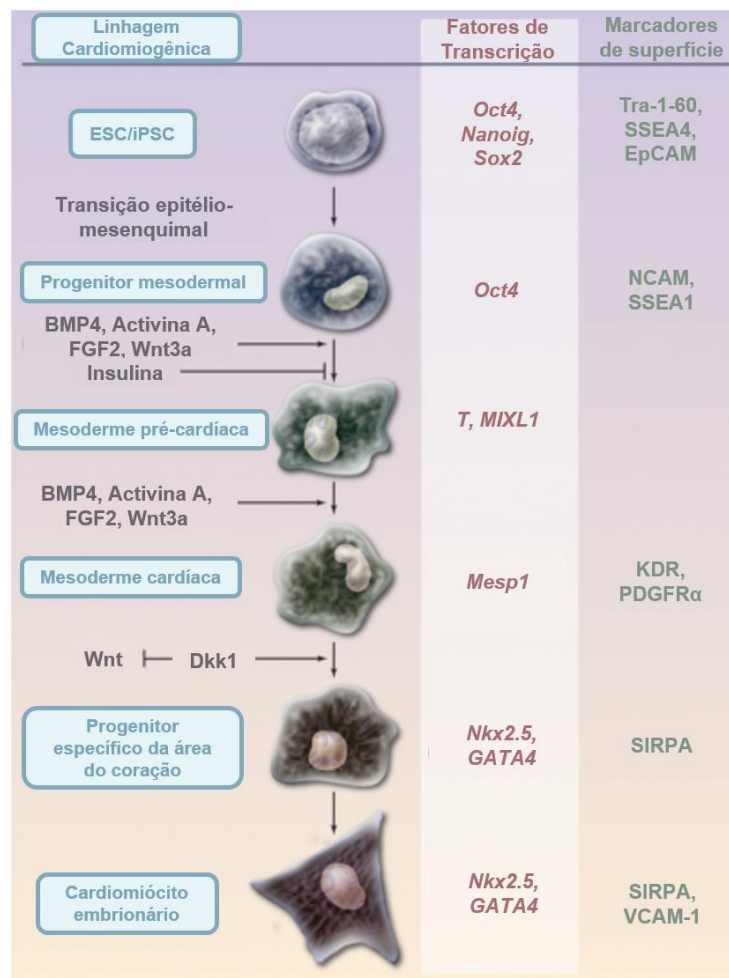


Figura 1.4 – Marcadores expressos durante a diferenciação cardiomiogênica *in vitro*. Ao longo da diferenciação, as ESC vão perdendo a expressão de marcadores de pluripotência, como Oct4, Nanog

e Sox2, e passam a expressar genes que identificam a linhagem para a qual estão diferenciando. Fonte: adaptado de MUMMERY et al., 2012.

Utilizando células que expressam GFP sob o comando de *NKX2-5* foi possível identificar um marcador de superfície presente a partir do momento que a célula se compromete com a linhagem cardíaca, a proteína SIRPA (*Signal Regulatory Protein- $\alpha$* ) (Figura 1.4) (DUBOIS et al., 2011). Uma vez que as células comecem a expressar Troponina-T e apresentar contração, são consideradas cardiomiócitos diferenciados (ZHANG et al., 2010).

### 1.3 DESENVOLVIMENTO CARDIOMIOGÊNICO *IN VIVO*

Durante o desenvolvimento do coração no embrião, células da crescente cardíaca, originadas da mesoderme, se movem em direção ao ventre e se fundem, formando o tubo cardíaco. Na parte superior do tubo estão localizado os tubos arteriais, e na parte inferior, os tubos venosos. Nessa fase, o tubo cardíaco é povoado por células endoteliais e miocárdio, e já possui batimentos, formando um fluxo sanguíneo arterio-venoso. À medida que o desenvolvimento avança, o tubo cardíaco cresce e forma um *loop* (dobramento), aproximando os tubos arteriais e venosos. A porção que dará origem aos átrios move-se para cima e para trás, e nessa fase já é possível observar quais porções darão origem às câmaras cardíacas (Figura 1.5). Os átrios e ventrículos são divididos pela invaginação de células endoteliais, originando as válvulas cardíacas, e posteriormente são divididos em direito e esquerdo. O tubo arterial é bifurcado para dar origem às artérias aorta e pulmonar (revisado em DUNWOODIE, 2007).

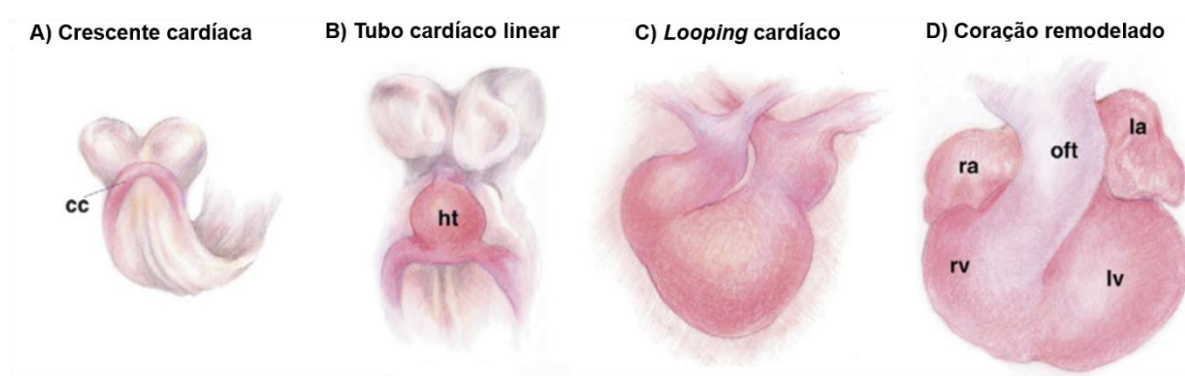


Figura 1.5 - Desenvolvimento cardíaco inicial. cc:crescente cardíaca; ht: tubo cardíaco; oft: tubo arterial; ra: átrio direito; rv: ventrículo direito; la: átrio esquerdo; lv: ventrículo esquerdo. Fonte: adaptado de DUNWOODIE, 2007.

Em nível molecular, vários fatores são regulados positivamente ou negativamente durante o desenvolvimento cardíaco. Nos estágios iniciais, proteínas das famílias BMPs, WNTs e FGFs estão envolvidos no processo. BMP sinaliza para a cardiomiogênese, WNT para especificação cardíaca e FGF leva à diferenciação miocárdica. Uma vez que as células receberam os estímulos desses fatores para comprometimento cardíaco, começam a expressar o fator de transcrição T (*T-box factor Brachyury*) e a proteína Mix11. Antes de migrar para a crescente cardíaca, a expressão do fator de transcrição Mesp1 (*mesoderm posterior 1*) é ativada. À medida que essas células vão migrando para tubo cardíaco, começam a expressar Nkx2-5, Tbx5 e Is11. Nkx2-5 recebe os sinais do tubo cardíaco e, juntamente com Tbx5, participa da formação dos compartimentos atrial e ventricular. Nkx2-5 e Tbx5 também se associam com proteínas da família GATA (GATA4/5/6) e a SRF (*Serum Response Factor*) para ativação da expressão gênica de actinas, miosinas, troponinas e estruturas de células cardíacas. GATA4 também participa da formação do pré-epicárdio e desenvolvimento cardíaco. Membros da família MEF2 (*Myocyte Enhancer Factor 2*) também participam na ativação da expressão dos genes estruturais (revisado em MUMMERY et al., 2012). Essa rede complexa de expressão gênica é o início da sinalização molecular que dará origem ao coração. Isso só é possível pois uma fina regulação da expressão gênica é realizada durante o desenvolvimento embrionário.

#### 1.4 REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA

A expressão gênica é altamente regulada, desde a formação do transcrito até a geração da proteína funcional (Figura 1.6). Essa regulação é necessária para criar tipos celulares especializados, fazer com que seja expresso o que é necessário para um dado momento para a célula, e responder adequadamente aos estímulos ambientais (ALBERTS et al., 2010).

A regulação da expressão gênica pode ser dividida didaticamente em três etapas: i) controle transcricional, ocorrendo em nível de transcrição de um gene; ii) controle pós-transcricional, regulando o RNA transcrito; e iii) controle pós traducional, ocorrendo em nível de proteína, com adição de modificações pós-traducionais e formação de estruturas terciária e quaternária (ALBERTS et al., 2010; LODISH et al., 2014).

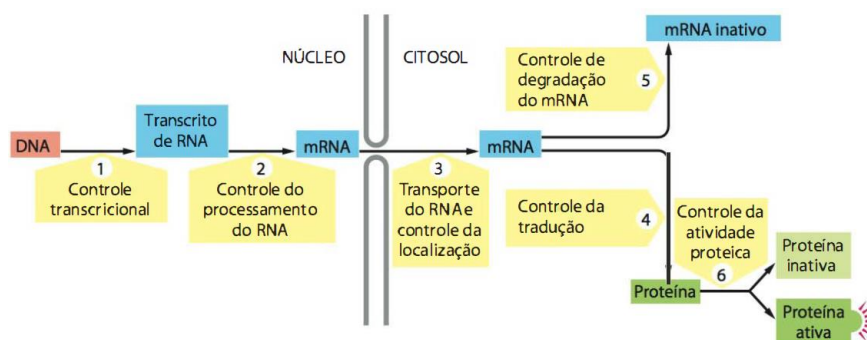


Figura 1.6 - Pontos chave onde a expressão gênica pode ser regulada. Fonte: ALBERTS et al., 2010.

O controle transcricional consiste no controle durante a transcrição do DNA para o RNA, no núcleo. Entre os pontos chave do controle transcricional, estão elementos regulatórios que residem distantes do gene, requerendo uma combinação de fatores de transcrição corretos para iniciar a transcrição, o enovelamento da cromatina, levando em conta modificações nas histonas e metilação no DNA, o que dificulta ou facilita o acesso da maquinaria de transcrição ao gene (ALBERTS et al., 2010).

O enovelamento do DNA permite ou não o acesso da maquinaria de transcrição para iniciar a transcrição. Quanto mais compactado estiver o DNA, principalmente na heterocromatina, menor a chance daquela sequência ser transcrita, pois a maquinaria de transcrição não consegue ter acesso à dupla fita (LODISH et al., 2014). Outra forma de sinalizar que aquela sequência não deve ser transcrita é pela modificação nas caudas das histonas, conhecida como “código de histonas”. Essas modificações consistem em adição ou remoção de moléculas, como grupamentos acetil, metil e fosfato, nas caudas expostas das histonas onde o DNA está enovelado no nucleossomo. Esse código é reconhecido por proteínas, e sinaliza se a cromatina deve estar mais ou menos compactada. A metilação do DNA, em citosinas (C) seguidas de guaninas (G) (ilhas CpG) auxiliam na regulação da expressão gênica, ao impedir que proteínas e fatores de transcrição se liguem em regiões promotoras do DNA (ALBERTS et al., 2010).

Os fatores de transcrição agem como reguladores da expressão gênica, uma vez que são ativados em resposta a diferentes vias de sinalização, podendo ativar ou reprimir a expressão de genes alvo de determinadas vias. Além disso, fatores de transcrição podem combinar entre si e com co-fatores, criando maquinarias de transcrição únicas, respondendo a um determinado estímulo recebido pela célula. A distância dos sítios de reconhecimento desses fatores de transcrição em relação ao gene alvo também é um ponto de controle, exigindo a combinação exata de proteínas

para recrutamento da maquinaria de transcrição (revisado em WEINGARTEN-GABBAY; SEGAL, 2014). Uma vez recrutada a maquinaria de transcrição, a informação contida no gene passa a ser transcrita (ALBERTS et al., 2010).

#### 1.4.1 Regulação pós-transcricional

A regulação pós-transcricional da expressão gênica acontece em nível de RNA, seja no seu transporte, maturação, modificação ou degradação. Consiste em uma das etapas de regulação mais importante para a célula, uma vez que 7% dos genes codificantes para proteína estão envolvidos com a regulação pós-transcricional e aproximadamente 25% do transcriptoma está envolvido em algum nível com o metabolismo de RNA (GERSTBERGER et al., 2014).

O *splicing* alternativo é uma forma de regular a expressão gênica, promovendo a expressão de isoformas proteicas a partir de um mesmo gene, e que podem exercer papéis diferentes dentro da célula. Um exemplo disso é o gene *OCT4*, que pode expressar tanto OCT4A ou OCT4B, dependendo de como ele é processado. OCT4A possui um papel fundamental na pluripotência de células-tronco, enquanto OCT4B tem seu real papel pouco estudado e é expresso em células sem capacidade de pluripotência (ATLASI et al., 2008).

Muitos genes possuem sítios de poliadenilação na região 3'-UTR (70-80% dos RNAs em mamíferos), sendo uma das maneiras de regular a expressão (SHEPARD et al., 2011; DERTI et al., 2012), uma vez que uma cauda poly-A maior tem sido associada à pluripotência em ESC (JI et al., 2009; SHEPARD et al., 2011) e uma atividade menor das poliadenilases está associada com menor proliferação e menor eficiência de reprogramação de células somáticas (JI; TIAN, 2009; SANDBERG et al., 2012).

O *splicing* alternativo também pode aumentar a eficiência de tradução e estabilidade do mRNA se realizado em regiões regulatórias, ou aumentar a diversidade de moléculas proteicas se realizada na região codificadora do mRNA (revisado em YE; BLELLOCH, 2014). Além disso, o mRNA maduro pode ser editado, mudando o sentido da informação. As modificações mais comuns são: i) as desaminações, levando à mudanças de base, como adenosina (A) para uma inosina (I), ou citosina (C) para uracila (U); e ii) deleções e inserções de nucleotídeos (ALBERTS et al., 2010). A quantidade de edições no mRNA pode regular negativa ou positivamente a sua expressão, como já foi observado em *let-7* em ESC. Quando o



pré RNA de *let-7* possui adição de algumas uracilas na extremidade 3'-UTR, é levado à degradação (HEO et al., 2008), mas quando é apenas uma uracila, o efeito é de maturação do RNA (HEO et al., 2012).

A exportação nuclear do mRNA para o citoplasma também pode ser um ponto chave da regulação da expressão. Um exemplo disso em ESC são as proteínas Thoc2 e Thoc5 do complexo THO, que fazem a mediação entre a transcrição e a exportação nuclear do mRNA, e que, quando silenciadas, impedem a exportação de mRNAs importantes para a manutenção da pluripotência dessas células, como *Nanog* e *Sox2*, promovendo a diferenciação de ESC. Já em células que superexpressam essas proteínas, a diferenciação é adiada (WANG et al., 2013).

A estabilidade da molécula de mRNA é um ponto importante na regulação da expressão gênica, uma vez que moléculas instáveis são rapidamente degradadas pela célula, levando à queda na expressão proteica. A estabilidade do transcrito também depende de sua localização na célula e está geralmente associada a sítios regulatórios presentes na região 3'-UTR dos mRNAs, reconhecidos por proteínas e microRNAs (NEFF et al., 2012).

Outro ponto chave da regulação pós-transcricional é o controle da tradução que é coordenado por proteínas que se ligam na região 5'-UTR dos mRNAs. Essas proteínas podem facilitar ou dificultar a ligação dos fatores de início de tradução, podem promover a tradução por sítios IRES (Sítio de Entrada Interna do Ribossomo, *Internal Ribosome Entry Site*), e ainda regular o deslizamento dos ribossomos ao longo do mRNA (revisado em YE; BLELLOCH, 2014).

As moléculas centrais da regulação pós-transcricional, responsáveis pelos pontos de regulação já descritos, são as proteínas de ligação ao RNA (RBP, *RNA Binding Proteins*) (GERSTBERGER et al., 2014).

#### **1.4.2 Proteínas de Ligação ao RNA**

As RBPs são proteínas que possuem domínios de ligação ao RNA, que quando associados formam complexos ribonucleoproteicos (RNPs). As RBPs podem exercer uma função conjunta nesses complexos RNPs, como ocorre com os ribossomos, ou esse RNP pode ser transiente, onde a RBP exercerá algum papel na maturação, localização ou decaimento do RNA. A dinâmica desses complexos depende de sua composição, alvos e cofatores (GERSTBERGER et al., 2014).

A evolução dos métodos *in vitro* e de sequenciamento permitiu descobrir as estruturas dos domínios de ligação ao RNA das RBPs e quais são seus alvos. As técnicas de sequenciamento, como *CLIP-Seq* (*Crosslinking and immunoprecipitation followed by sequencing*) e *RIP-Seq* (*RNA immunoprecipitation and sequencing*), geralmente são utilizadas para a obtenção das sequências nos RNAs alvos. Apesar do avanço, o mecanismo e a regulação de algumas RBPs ainda não é bem entendido (GERSTBERGER; HAFNER; TUSCHL, 2014). Em *Drosophila* e *C. elegans* 2% de seus genomas codificam para RBPs, e esse número aumenta para 5-8% em leveduras (LASKO, 2000; KEENE, 2001; LEE; SCHEDL, 2006), destacando a importância das RBPs na regulação fina da expressão gênica.

RBPs possuem um ou mais domínios de ligação ao RNA e são classificadas em famílias de acordo com a anotação desses domínios, como por exemplo os domínios RRM, KH, CSD, zinc-finger e PUF. Analisar a estrutura das RBPs pode ajudar a entender a sua função e como seus domínios interagem com o RNA (revisado em GLISOVIC et al., 2008; GERSTBERGER et al., 2014).

## 1.5 PUMILIO

A família de RBPs conhecida como PUF (Pumilio-Fem-3 binding factor) é altamente conservada entre as espécies, sendo encontrada em plantas (ABBASI et al., 2011), insetos (PARISI; LIN, 1999; EDWARDS et al., 2003), nematelmintos (VAID et al., 2013; PRASAD et al., 2016) e mamíferos (MOORE et al., 2003; SPASSOV, D. S.; JURECIC, 2003; ETTEN et al., 2012; SHIGUNOV et al., 2012).

As proteínas PUF possuem um domínio de ligação ao RNA conhecido como Domínio de Homologia de Pumilio (PUM-HD, *Pumilio Homology Domain*). Esse domínio está localizado na região C-terminal da cadeia polipeptídica, e possui oito repetições PUF em *tandem* formando um arco. Cada repetição é composta por 36 aminoácidos que formam três  $\alpha$ -hélices (Figura 1.7A) (EDWARDS et al., 2001; WANG et al., 2001, 2002).

Na face interna desse arco, na altura da hélice 2 de cada repetição, estão presentes aminoácidos de características aromáticas e básicas, que interagem com o RNA. Essa interação ocorre na extremidade 3'UTR de RNAs alvos, região que possui uma sequência consenso de 8 nucleotídeos, conhecida como Elemento de Reconhecimento de Pumilio (Figura 1.7B) (PRE, *Pumilio Response Element*). Essa sequência se apresenta bastante conservada entre as espécies, contendo o triplete

UGU no seu início, sendo o restante das bases diferentes entre as PUFs de diferentes espécies (WANG et al., 2002).

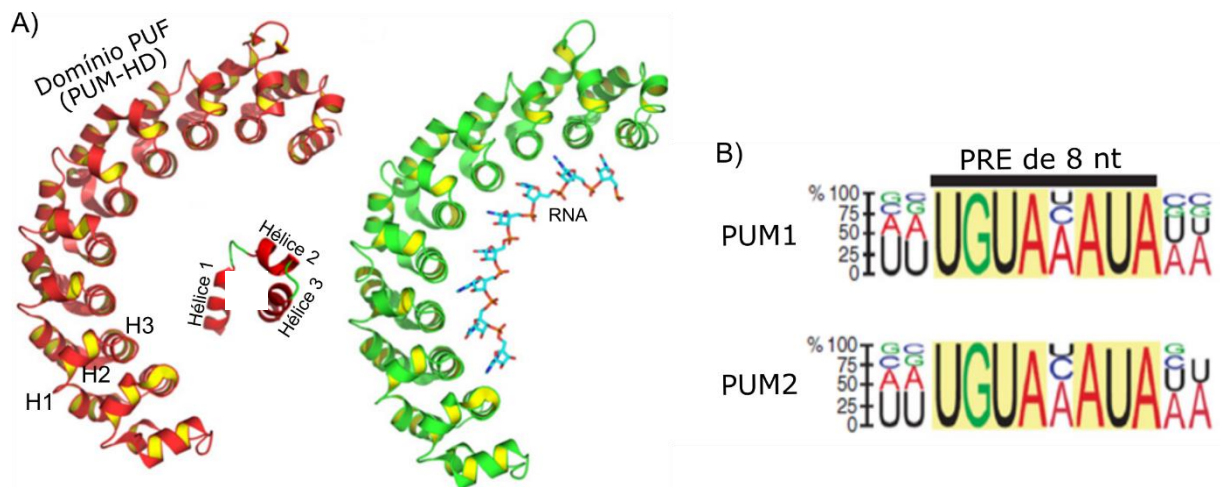


Figura 1.7 - Estrutura de PUM-HD e o sítio PRE. A) Em vermelho, apenas o domínio e suas repetições. Em verde, o domínio interagindo com o RNA. B) A sequência consenso PRE, presente nos mRNAs alvos. Fonte: adaptado de MILLER; OLIVAS, 2011 e EDWARDS, 2015.

A face externa do domínio interage com outras proteínas, como NOS1 (JARUZELSKA et al., 2003), BOULE (URANO et al., 2005), STAU (DUBNAU et al., 2003) e DAZL (MOORE et al., 2003). Essas proteínas formam complexos proteicos envolvidos na regulação pós-transcricional em diferentes organismos, incluindo humanos (XU et al., 2001; JARUZELSKA et al., 2003; MOORE et al., 2003; FOX et al., 2005).

A região N-terminal da cadeia polipeptídica não é tão conservada, ainda que apresente regiões que podem ser regulatórias, como motivos ricos em glutamina e asparagina, o que facilita a agregação das moléculas (SPASSOV, D. S.; JURECIC, 2003; SALAZAR et al., 2010).

Em humanos, são encontrados dois homólogos da família PUF: PUMILIO 1 (PUM1) e PUMILIO 2 (PUM2). Esses homólogos possuem 91% de identidade em relação ao domínio de ligação ao RNA (ETTEN et al., 2012). Já foi observada expressão de PUM1 e PUM2 em hESC e diversos tecidos humanos fetais e adultos, indicando uma possível participação na manutenção de células germinativas (MOORE et al., 2003). Em um estudo com ESC de camundongo, Pum1 foi descrita como reguladora negativa de mRNAs que codificam a fatores transcricionais que mantém a capacidade de autorrenovação, enquanto Pum2 não mostrou o mesmo efeito (LEEB et al., 2014).

### 1.5.1 Parceiros de Pumilio

A interação de Pumilio com Nanos é bem caracterizada e descrita em *Drosophila*, onde a interação proteína-proteína ocorre nas repetições 7 e 8 do domínio PUM-HD. Essa interação expõe o domínio CCHZ dedos de zinco de Nanos, o qual interage com o mRNA alvo. Pumilio também sofre uma mudança conformacional para expor um sítio onde Brat, uma RBP, interage através de seu domínio NHL. Esse complexo, chamado complexo quaternário, recruta deadenilases e promovem o decaimento do mRNA alvo (WREDEN et al., 1997; SONODA; WHARTON, 1999, 2001; EDWARDS et al., 2003).

Complexos como esse são formados em diferentes organismos. Em *C. elegans*, FBF interage com Nanos-3 para recrutar deadenilases (KRAEMER et al., 1999; BERNSTEIN et al., 2005; SUH et al., 2009). Em *Xenopus*, XPum1 interage com Xcat-2, homólogo de Nanos, e CPEB, para regular o transcrito de ciclina B (NAKAHATA et al., 2003; PIQUÉ et al., 2008). Em *Sacharomyces cerevisiae*, Puf4 forma um complexo de deadenilação ao interagir diretamente com Pop2, e recrutar Ccr4 e o restante do complexo NOT (GOLDSTROHM et al., 2007). Em humanos, PUM1 e PUM2 possuem uma interação física com CNOT7 e CNOT8, que por sua vez, interagem com CNOT6 e CNOT6L, formando um complexo de deadenilação (ETTEN et al., 2012).

PUM1 e PUM2 interagem também com DAZ, DAZL e BOULE, embora seu mecanismo de ação ainda não tenha sido bem elucidado (MOORE et al., 2003; URANO et al., 2005; revisado em KIANI et al., 2017). DAZ é associada com a espermatogênese, sendo expresso somente em células germinativas masculinas. DAZL, seu homólogo ancestral, é expresso em células germinativas masculina e feminina (REIJO et al., 2000, 2005). A interação entre PUM e DAZ ocorre nas regiões de ligação ao RNA das duas proteínas, PUM-HD e DAZ, respectivamente. Essa interação forma um complexo estável, sendo capaz de reconhecer PRE em mRNA alvos (MOORE et al., 2003).

BOULE (BOL) é uma RBP da família DAZ/BOL. Sua interação com PUM2 ocorre entre a região de ligação ao RNA, RRM (*RNA recognition motif*, motivo de reconhecimento de RNA) e repetições DAZ em BOL e repetição PUF-1 e regiões flangeadoras do domínio PUM-HD em PUM2 (URANO et al., 2005). Em *Drosophila* e *Xenopus*, Pumilio foi associada com a regulação de ciclina B (ASAOKA-TAGUCHI et al., 1999; NAKAHATA et al., 2003). Em moscas, camundongos e humanos, BOL foi associado com a regulação de Cdc25, proteína requerida no complexo cdc2/ciclina B,

na progressão do ciclo celular de G2 para M (MITRA; SCHULTZ, 1996; XU et al., 2003; LUETJENS et al., 2004).

Staufen (STAU) é uma RBP que reconhece RNA de dupla fita (dsRNA, *double strand RNA*) (KRICHEVSKY; KOSIK, 2001). Participa da localização celular de mRNAs alvo em oócitos e neurônios de *Drosophila* (JOHNSTON et al., 1991; LI et al., 1997; MICKLEM; ADAMS, 2000; ROEGIERS; JAN, 2000). Em mamíferos pode ser encontrada em grânulos dendríticos (TANG et al., 2001). Em *Drosophila*, Stau foi descrita como possível parceira de Orb, um homólogo de CPEB (LANTZ et al., 1994). Nesse mesmo organismo, Pumilio está associada com agregação de CPEB através do seu motivo rico em asparagina e glutamina, regulando o tamanho da cauda poli-A de mRNAs (PIMENTEL; BOCCACCIO, 2014). A interação com Pumilio foi descrita em *Drosophila*, onde, juntas, regulavam a memória da mosca (DUBNAU et al., 2003). Mais tarde, Orb foi associado aos grânulos de Pumilio e Stau nos neurônios de *Drosophila* (PAI et al., 2013). Em mamíferos, Pum2 forma um complexo com Stau2, impedindo a diferenciação precoce do precursor de glia radial em neurônio, regulando mRNAs de genes como Trim32 e  $\beta$ -actina (LIEGRO et al., 2014).

### 1.5.2 Mecanismos de ação de Pumilio

O mecanismo de ação de Pumilio primeiramente descrito foi pela formação de um complexo Pumilio-RNA em *Drosophila*. Nesse organismo, Pumilio forma um gradiente ao longo do embrião e exerce um efeito repressor ao se ligar à região 3'UTR do mRNA do gene *hunchback* durante o desenvolvimento embrionário. Isso permite a formação do abdomen da mosca (MURATA et al., 1995; GAMBERI et al., 2002).

Além do gene *hunchback*, ainda em *Drosophila*, Pumilio suprime mRNA de ciclina B em células da linhagem germinativa, promovendo a autorrenovação das células por divisões assimétricas, mantendo as células-tronco e regulando a diferenciação (KADYROVA et al., 2007; CATELAIN et al., 2014). Em *C. elegans*, proteínas FBF regulam a expressão de *gld-1*, assegurando a autorrenovação de células-tronco (CRITTENDEN et al., 2002). Em *Dyctiostelium*, PufA regula PKA-C, a unidade catalítica da cinase dependente de cAMP, promovendo o crescimento mitótico de células-tronco (SOUZA et al., 1999).

Entre os alvos de Pumilio, também estão componentes de vias de sinalização importantes para a célula. Em camundongos, Pum1 suprime a expressão de componentes das vias de p53, de sinalização de MAP-kinase e do ciclo celular

(revisado em BLACKINTON; KEENE, 2014). Em humanos, PUM2 é capaz de reprimir a expressão dos mRNAs de *ERK2* e *p38A*, participantes da via de sinalização MAP-kinase (LEE, M. H. et al., 2007). PUM1 parece regular componentes das vias Wnt e Ras (GALGANO et al., 2008). E PUM1 e PUM2 regulam a via do interferon (IFN), ativa durante infecções virais (NARITA et al., 2014).

Foi descrito recentemente que PUM1 pode levar ao decaimento de mRNAs alvos, recrutando principalmente deadenilases do complexo CCR4-NOT, levando ao encurtamento da cauda poli A (GOLDSTROHM et al., 2007; ETTEN et al., 2012). Em outros organismos, foi descrito que Pumilio pode recrutar outras deadenilases, como Pan2 (LEE et al., 2010) e PARN (KIM; RICHTER, 2006).

Outro mecanismo da ação da Pumilio proposto é dessa proteína evitar a ligação dos fatores de início de tradução, como o eIF4E e eIF5B, ao mRNAs, impedindo o início da tradução ou, até mesmo, interagindo com o cap 5' (CHO et al., 2006; DENG et al., 2008; CAO et al., 2010)

As interações proteicas das proteínas PUF ou sua localização celular podem alterar o seu mecanismo de ação (revisado em KIANI et al., 2017). Em *Xenopus*, durante a maturação de oócitos, XPum1 é recrutada no complexo CPEB para ativar a tradução dos transcritos de ciclina B (KIM; RICHTER, 2006). Em leveduras, Puf3 medeia a translocação de transcritos codificantes de proteínas mitocondriais entre o núcleo e a mitocôndria (GARCÍA-RODRÍGUEZ et al., 2007; SAINT-GEORGES et al., 2008; ELIYAHU et al., 2010). Semelhante à Puf3, em humanos, PUM2 parece ter a mesma função em neurônios (VESSEY et al., 2006, 2010).

Pumilio também tem sido amplamente associada com o sistema de regulação via microRNAs. Em humanos, PUM1 reconhece sítios PRE nos transcritos de *p27*, levando a uma mudança conformacional do transcrito, expondo sítios de miR-221 e miR-222 (KEDDE et al., 2010). O mesmo é observado na interação entre PUM e o transcrito do oncogene *E2F3* (MILES; TSCHÖP; HERR; JI, J.-Y.; et al., 2012). Em células germinativas masculinas, PUM2 e NANOS1 formam complexos com GEMIN3, uma proteína que auxilia no silenciamento gênico mediado por miRNAs (SCHWAMBORN et al., 2009).

### **1.5.3 Regulação de Pumilio**

Algumas formas de regular a expressão e a ação de Pumilio foram descritas na literatura, como a fosforilação de Puf6 em leveduras (DENG et al., 2008) e a

competição de um inibidor pelo sítio no domínio PUM-HD que reconhece PRE, em *Drosophila* e *C. elegans* (ECKMANN et al., 2002; KIM et al., 2010).

Em humanos, uma das formas descritas é a autorregulação de PUM. Os transcritos de *PUM1* e *PUM2* possuem sítios PRE, e são autorregulados por PUM1 (Figura 1.8A) (MORRIS et al., 2008). Outra forma descrita é através de *NORAD*, um RNA não codificante longo (lncRNA, *long non-coding RNA*), que possui 15 sítios PRE e age como uma esponja de moléculas de PUM, impedindo que essas RBPs se liguem nos mRNAs alvo (Figura 1.8C) (LEE et al., 2016). Uma terceira forma do controle da expressão gênica é por silenciamento gênico mediado microRNA. Um sítio conservado de ligação do miR-134 já foi identificado na região 3'UTR de *PUM2*, o que indica uma possível regulação por essa via (Figura 1.8B) (FIORE et al., 2009).

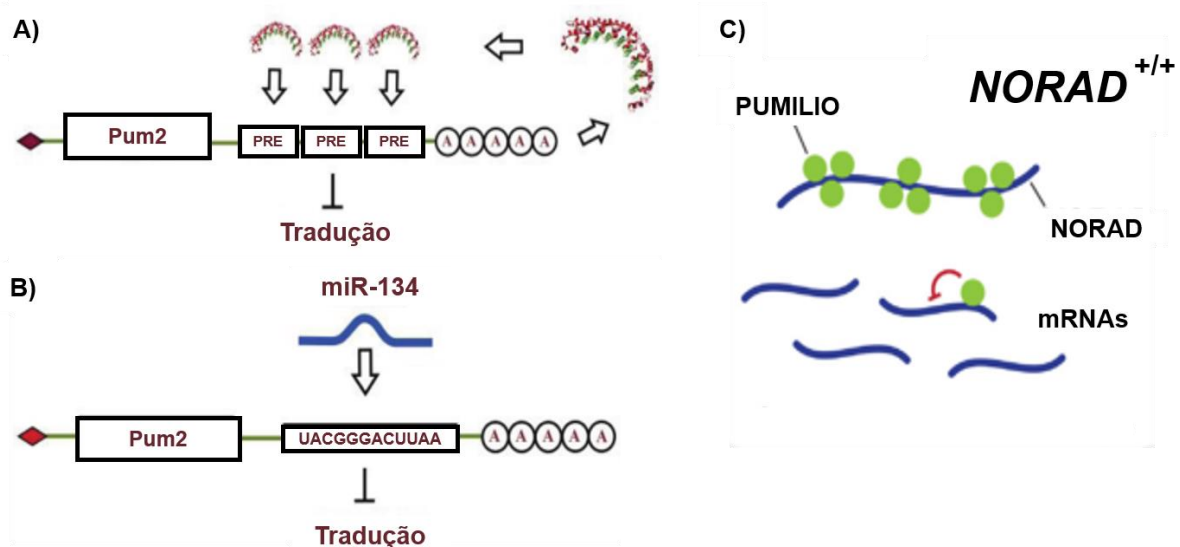


Figura 1.8 – Mecanismos de regulação de PUMILIO. A) Autorregulação de PUM2 pela presença de PRE na região 3'UTR do mRNA. B) Regulação de PUMILIO através de miRNA. A região 3'UTR de PUM2 possui um sítio de ligação a miR-134. C) Regulação de PUMILIO através de lncRNA. O lncRNA NORAD possui 15 sítios PRE, agindo como uma esponja das moléculas proteicas de PUMILIO, regulando sua atividade. Fonte: adaptado de LEE et al., 2016 e KIANI et al., 2017.

## 1.6 SILENCIAMENTO GÊNICO

O mecanismo de RNA de interferência (RNAi, *RNA interference*) controla a expressão gênica, levando ao silenciamento gênico através da associação de pequenos RNAs não codificantes ao complexo de indução do silenciamento por RNA (RISC, *RNA-induced silencing complex*), levando o mRNA alvo à degradação (TABERNERO et al., 2013; revisado em KOBAYASHI; TOMARI, 2016).

Existem diferentes tipos de pequenos RNAs que participam do silenciamento gênico. O microRNA (miRNA), de aproximadamente 22 nucleotídeos, foi descrito

primeiramente em *C. elegans* em 1993, por Ambros e colaboradores, regulando o gene *lin-4* (LEE et al., 1993). Ele é sintetizado pela RNA-polimerase II como um pri-RNA (miRNA primário), contendo *loops* em sua estrutura (LEE et al., 2004). Ainda no núcleo, o pri-miRNA é reconhecido por seus *loops* pelo complexo Drosha-DGCR8, clivando o pri-miRNA à pré-miRNA (precursor) numa estrutura de grampo de cabelo (*hairpin*) (HAN et al., 2004). Esse *hairpin* é exportado para o citoplasma pela Exportina-5 (YI et al., 2003) e reconhecido pela enzima Dicer, que fará a retirada do *loop* do *hairpin* e clivará o miRNA no tamanho de 20 a 24 nucleotídeos, deixando-o dupla fita e com pontas coesivas nas extremidades 3'. Esse miRNA é reconhecido pela Argonata, proteína que faz parte do complexo RISC. De modo geral, a fita mais estável da dupla fita irá compor o complexo, e a outra degradada (HUTVAGNER, 2005). Já no complexo RISC, o miRNA (sequencia *seed*) pareia com mRNA alvo que contém a sequência complementar. Geralmente, o pareamento do miRNA é parcial, direcionando o mRNA aos corpos de processamento (*p-bodies*) (Figura 1.9) (revisado em HAMMOND, 2005; ALBERTS et al., 2010; LODISH et al., 2014; WATSON et al., 2015).

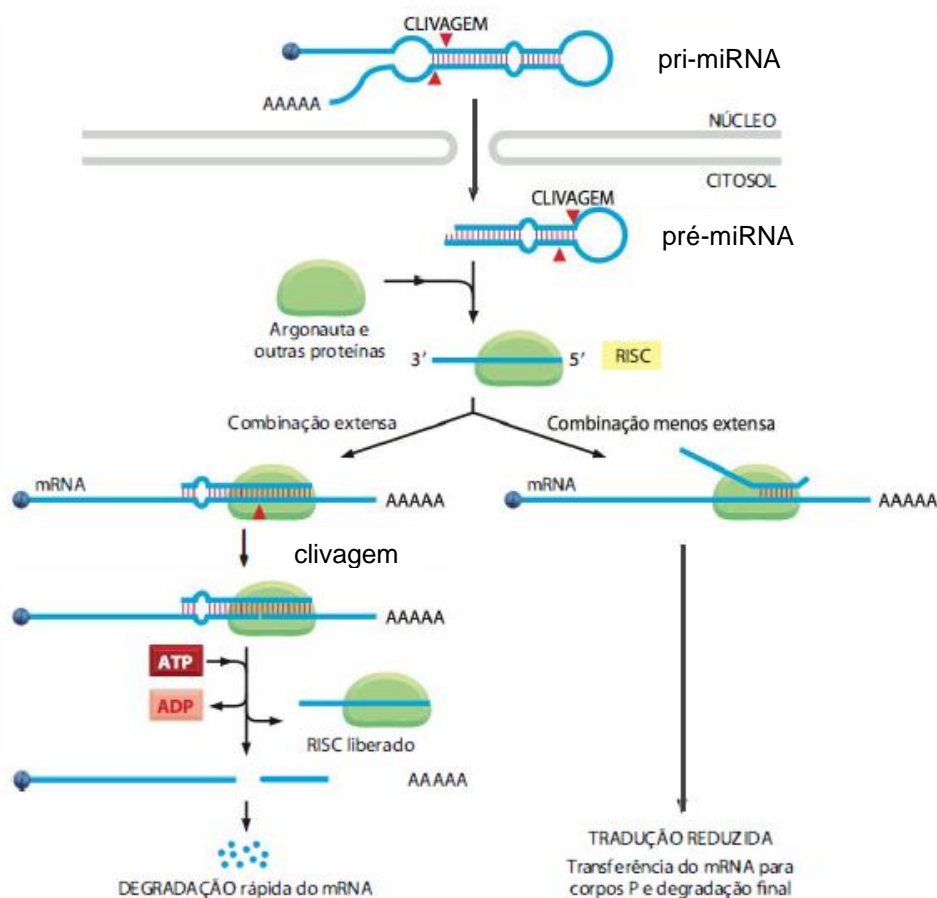


Figura 1.9 – Mecanismo de expressão e ação de miRNA. Fonte: adaptado de ALBERTS et al., 2010.



Os RNAs pequenos de interferência (siRNA, *small interfering RNAs*) são RNAs não codificantes de aproximadamente 21 nucleotídeos, derivados de RNAs dupla fita, podendo ser endógeno ou exógeno (WATSON et al., 2015). Foram descritos pela primeira vez em 1998 por Fire e colaboradores em *C. elegans* (FIRE et al., 1998). Sua biogênese começa com um dsRNA longo, que é processado pela Dicer, seguindo pelo caminho semelhante ao miRNA. O pareamento com o mRNA alvo é total, levando à clivagem do mRNA pela própria Argonata presente no RISC (WATSON et al., 2015; revisado em KOBAYASHI; TOMARI, 2016).

*In vitro*, é possível inserir siRNA em células, como sequência complementar de um gene de interesse, levando ao silenciamento desse gene através do decaimento do seu mRNA, também conhecido como *knockdown*. A forma mais simples é transfectar siRNA sintéticos diretamente na célula (Figura 1.10 A), porém o efeito é transiente e a capacidade de transfecção depende do tipo de célula (MOORE, C. B. et al., 2010). Outra maneira é introduzir um vetor plasmidial contendo a sequência que codifica para um *short hairpin RNA* (shRNA), que mimetiza a biogênese de miRNAs a partir de seu processamento pela Drosha (Figura 1.10 B) (PADDISON et al., 2002; WETERING et al., 2003). Entretanto, os limites dessa técnica são parecidos com a citada anteriormente: a célula precisa ser capaz de ser transfectada e o vetor precisa chegar ao núcleo para ser transcrito.

O sistema lentiviral, descrito por Naldini e colaboradores (1996), consiste na construção de vetores lentivirais, não replicativos, com capacidade de inserir no genoma da célula transduzida uma sequência de interesse. Uma vez integrada no genoma, essa sequência será transcrita e expressa constitutivamente (NALDINI et al., 1996). A sequência de interesse contida no vetor lentiviral poderá dar origem a um shRNA (PADDISON et al., 2002), que será transcrita e processada similarmente como ocorre naturalmente pela célula (Figura 1.10 C) (MOORE et al., 2010A).

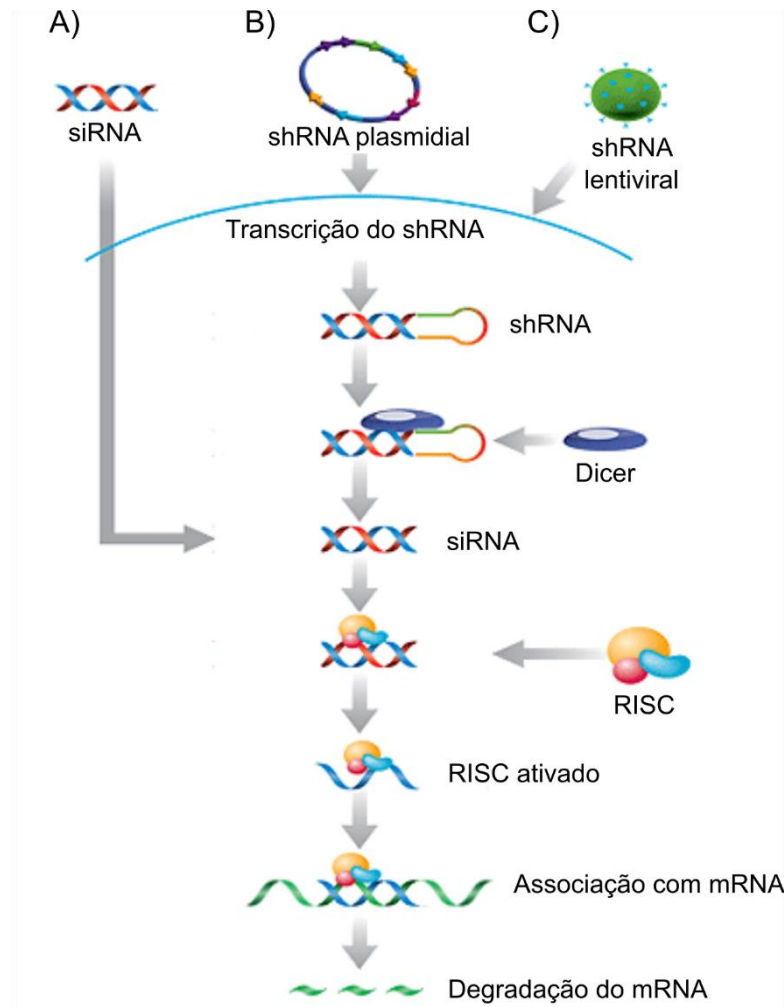


Figura 1.10 – Mecanismos de RNAi *in vitro*. A) Transfecção com siRNA. B) Transfecção com vetor plasmidial contendo uma sequência que dará origem a um shRNA. C) Transdução com vetor lentiviral contendo uma sequência que dará origem a um shRNA. Fonte: adaptado de SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY.

## 2 JUSTIFICATIVA

Desde seu isolamento (THOMSON et al., 1998), as hESC têm mostrado grande potencial para aplicação em terapias celulares, principalmente pela sua capacidade de propagação *in vitro* e sua pluripotência, mostrando eficácia e segurança em tratamentos com pacientes portadores de doenças pancreáticas, oculares e neurodegenerativas (revisado em TROUNSON; DEWITT, 2016). Doze anos após o primeiro isolamento de hESC, foi realizado o primeiro ensaio clínico com essas células, visando a correção de uma injúria da medula espinhal (revisado em ILIC; OGILVIE, 2017). Segundo o site *Clinical trials* (iniciativa do *U.S. National Institutes of Health*, acesso em [clinicaltrials.gov](http://clinicaltrials.gov)), em 2017, cerca de 51 estudos clínicos usando ESC estão sendo conduzidos. Entre as doenças estudadas estão: infertilidade (ClinicalTrials Identifier: NCT00353197, NCT02713854, NCT00353210); degeneração macular (NCT02590692, NCT02903576, NCT02755428, NCT01344993); Parkinson (NCT03119636), e isquemia aguda do miocárdio (NCT02057900). Logo, entender como hESC regulam sua expressão gênica é buscar caminhos que levem à melhor aplicação dessas células clinicamente.

Entre as moléculas que auxiliam na regulação da expressão gênica, está Pumilio, uma RBP altamente conservada entre as espécies. Em humanos, os dois homólogos de PUMILIO são encontradas em hESC (MOORE et al., 2003), porém seu papel na pluripotência e nos processos de diferenciação dessas células são poucos elucidados. Uma vez que essa RBP tem sido associada a esses processos em outros organismos, elucidar seu papel na regulação de hESC pode ajudar a direcionar a diferenciação para uma linhagem de interesse, aumentando a eficiência e segurança no uso dessas células na terapia celular.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar o efeito do silenciamento gênico de PUMILIO na manutenção do estado não diferenciado e diferenciação cardiomiogênica de células-tronco embrionárias humanas, utilizando o sistema lentiviral.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Analisar a expressão de *PUM1* e *PUM2* em hESC e durante diferenciação cardiomiogênica;
- 2) Silenciar de forma constitutiva a expressão de *PUM1* e *PUM2*, separada e simultaneamente, em hESC através do sistema lentiviral;
- 3) Avaliar o efeito do silenciamento no estado indiferenciado e no processo de diferenciação cardiomiogênica;
- 4) Analisar a expressão de: marcadores de pluripotência, de cardiomiogênese, e de alvos de PUMILIO durante o processo de diferenciação das hESC silenciadas;
- 5) Buscar identificar as redes de regulação controladas pelas proteínas PUMILIO, durante a cardiomiogênese, baseado na expressão dos alvos de PUMILIO envolvidos no processo.

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 COMITÊ DE ÉTICA

Esse projeto teve aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), sob o parecer nº 1.308.195 (CAAE: 48374715.8.0000.5248) (Anexo X).

### 4.2 ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS DE PUMILIO

As sequências de mRNA e proteica de PUM1 (NM\_001020658.1) e PUM2 (NM\_001282752.2) foram retiradas do GenBank, alinhadas utilizando algoritmo *Muscle* (EMBL-EBI, v3.8.31) e analisadas no software de alinhamento de sequências *GeneDoc* (v2.7). Na sequência proteica de PUM1 e PUM2, foi identificada a região de ligação ao RNA, segundo Wang e colaboradores (2001). Na sequência de mRNA, foram identificadas as regiões de pareamento do shRNA, tanto em *PUM1* quanto em *PUM2*.

### 4.3 PRODUÇÃO DE LENTIVÍRUS

As células HEK293FT foram cultivadas em garrafas de 75 cm<sup>2</sup> em 10 mL de DMEM suplementado (10% de soro fetal bovino, 1% de L-glutamina e 1% de penicilina e streptomocina) em normóxia (5% CO<sub>2</sub>) à 37°C. Após uma semana, foi dado início ao protocolo de produção, que consiste em 5 dias. No dia 1, as células foram cultivadas em placas de Petri de 100 mm, em uma concentração de 5x10<sup>5</sup> células por placa, em 10 mL de DMEM suplementado, à 37°C. No dia 2, o meio foi substituído por 4 mL de Optimem<sup>®</sup> (Thermo Fisher Scientific) por 30 minutos, em normóxia à 37°C. Foram feitas duas soluções: a primeira contendo 500 µL de Optimem<sup>®</sup> e 30 µl de Lipofectamina 2000 (Invitrogen), e a segunda contendo 500 µL de Optimem<sup>®</sup>, 10 µl do Mix Lentiviral MISSION<sup>®</sup> (Sigma-Aldrich) e 5 µg do plasmídeo pKLO (Anexo I) contendo a sequência shRNA para *PUM1*, *PUM2* ou um plasmídeo contendo uma sequência de shRNA embaralhada, denominada *scrambled* (*Sc*), usada como controle. Cada solução foi incubada separadamente por 10 minutos. Após esse tempo, as duas foram incubadas juntas por 20 minutos e então, adicionadas sobre as células, para a transdução viral. Após 4 horas, o meio foi substituído por 10 mL de DMEM suplementado. No dia 3, o meio foi trocado e descartado. No dia 4, foi feita a primeira coleta do meio com as partículas virais. No dia 5, foi feita a segunda coleta do meio e essas coletas foram processadas. Esse processamento consiste em filtrar o meio com filtro com poros de 0,22 µm e centrifugados em ultracentrifuga Himac

CP80WX (Hitachi) à 141000  $\times$  g (Figura 4.1). As partículas virais foram ressuspensas em PBS/BSA 1% (soluções e tampões descritos no Anexo II), aliquotadas e estocadas à -80°C.

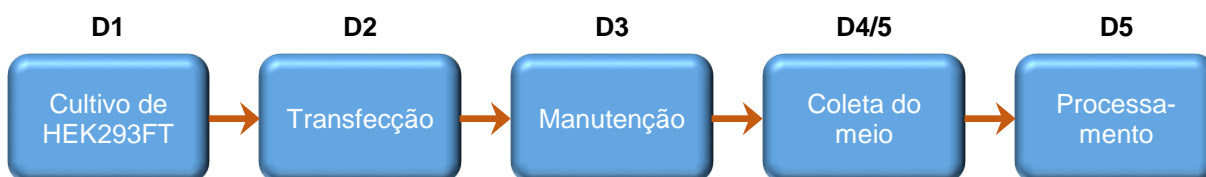


Figura 4.1 – Esquema de produção dos lentivírus. No dia 1 (D1), as células são cultivadas. No dia 2 (D2), é realizada a transfecção dos plasmídeos de montagem das partículas virais e do plasmídeo contendo o shRNA de interesse. No dia 3 (D3), o meio é trocado por um fresco. Nos dias 4 e 5 (D4/5), o meio é coletado e no dia 5 (D5), esse meio coletado é processado por filtragem e centrifugações para purificar as partículas virais.

#### 4.4 CULTIVO DE hESC

A linhagem utilizada nesse projeto é a h32.5/GFP, doada pelo Instituto de Pesquisa Pediátrica Murdoch, em Melbourne, na Austrália (Termo de Doação de Material no Anexo IX). Essas células possuem *GFP* associado ao promotor de *NKX2.5*, fator de transcrição envolvido no início do processo de diferenciação cardiomiogênica (ELLIOT et al, 2011).

As células foram cultivadas de duas maneiras: Matrigel e MEF (fibroblastos embrionários murinos, *Murine Embryonic Fibroblast*). Na primeira maneira, as placas utilizadas (Petri de 60 mm ou placas com 6 poços) foram tratadas com matriz de Matrigel® (Corning) preparado com 3 mL de DMEM/F12 um dia antes do descongelamento das células. As células foram plaqueadas nas placas tratadas com Matrigel® e cultivadas com 3 mL de mTeSR1™ (Stemcell technologies), meio específico para células-tronco pluripotentes, suplementado com 0,7% de penicilina e streptomicina (PS), em normóxia (5% CO<sub>2</sub>) à 37°C. Na segunda maneira, MEF foram cultivados em placa de 6 poços em meio 2 mL de DMEM suplementado (10% de soro fetal bovino, 1% de L-glutamina e 1% de penicilina e streptomicina) em normóxia à 37°C, por 24 horas. As hESC foram, então, plaqueadas sobre a MEF, em meio 3 mL de DMEM/F12 suplementado (20% de soro *knockout*, 1% de L-glutamina, 1% de penicilina e streptomicina, 1% de aminoácidos não essenciais, 0,1% de β-mercaptoetanol 55 mM e bFGF 1 µl/ml).

#### 4.5 CURVA DE PUROMICINA

As hESC transduzidas com os vetores lentivirais foram selecionadas com o uso de puromicina, pois os vetores possuem a sequência de shRNA e também possuem

um gene que confere resistência à puromicina. Para determinar a concentração de puromicina necessária para eliminar apenas as células não transduzidas, foi necessário fazer um ensaio, com diferentes concentrações da droga em células sem os vetores lentivirais. Uma placa de 96 poços foi preparada com matriz de Matrigel® e, 24 horas depois, foram plaqueadas  $2 \times 10^4$  células por poço. Após 96 horas do plaqueamento, o antibiótico foi adicionado à cultura em concentrações que variaram de 10 a 750 ng/ml, após dois dias a puromicina foi adicionada novamente. No dia 7, a viabilidade das células foi conferida pelo ensaio de captação do vermelho neutro.

A captação do vermelho neutro foi realizada lavando-se o poço com 50  $\mu$ l de PBS 1X, e adicionando 250  $\mu$ l da solução de corante vermelho neutro diluído em meio de cultivo (758  $\mu$ l de vermelho neutro concentrado para cada 100 ml de meio de cultivo). As células foram incubadas por 3 horas à 37°C em normóxia. Então, o meio foi retirado e foi adicionado 100  $\mu$ l de solução etanol 50%/ácido acético 1%. Essa solução solubiliza o vermelho neutro que estava nos lisossomos das células viáveis, deixando a solução corada. A leitura foi realizada em leitor de absorbância, à 540 nm.

#### 4.6 TITULAÇÃO DOS VETORES LENTIVIRAIS

As hESC foram plaqueadas em placa de 96 poços, numa concentração de  $2 \times 10^4$  células por poço usando 100  $\mu$ l do meio mTeSR, em matriz de Matrigel preparada 24 horas antes. O meio é trocado todos os dias e, após 96 horas, as células atingiram uma confluência de 80%. O protocolo de titulação dura 14 dias a partir da adição dos vírus. No dia 1, os vetores lentivirais foram diluídos seriadamente ( $10^{-1}$  à  $10^{-7}$ ) em meio contendo polibrene na concentração final de 8  $\mu$ g/ml, para aumentar a eficiência de transdução (DAVIS et al., 2002), e adicionados sobre as células (50  $\mu$ l). No dia 2, o meio foi trocado. A partir do dia 3, a cada dois dias o meio foi trocado (200  $\mu$ l) com a adição de 250 ng/ml de puromicina. No dia 14, as células foram coradas com DAPI e visualizadas em microscópio ótico. As fotos foram obtidas de cinco campos de cada poço e as colônias resistentes foram contadas manualmente.

#### 4.7 TRANSDUÇÃO DAS hESC PARA O SILENCIAMENTO DE PUMILIO

As hESC foram cultivadas em MEF (item 4.4) até atingirem uma confluência de 80%. As células foram tripsinizadas, plaqueadas em placa de 6 poços tratada com Matrigel® com Fator de Crescimento Reduzido (Corning) e incubadas em normóxia à 37°C por 24 horas. Os vetores lentivirais foram adicionados sobre as células na diluição  $10^{-3}$ , em meio contendo polibrene (8 ng/ml) e as células foram incubadas em

normóxia à 37°C por 24 horas. Após esse período, a morfologia das células foi analisada e foram extraídos RNA e proteínas para confirmar o silenciamento por RT-qPCR e *Western blot*.

#### 4.8 EXTRAÇÃO DE RNA, SÍNTESE DE cDNA E PCR

A extração de RNA foi feita com kit RNeasy (QIAGEN), seguindo as instruções do fabricante para células animais. As células foram lisadas com 600µl de tampão RLT com 1% de β-mercaptoetanol. Então, foi adicionado 600µl de etanol 70% e o lisado foi centrifugado em coluna do kit por 15 segundos a 8000 x g. O filtrado foi descartado e a coluna lavada com 350 µl do tampão RW1, por 15 segundos a 8000 x g. O filtrado foi descartado e a coluna foi tratada com uma solução de 10 µl de DNase I (50 U) e 70 µl de tampão RDD, por 15 minutos, à temperatura ambiente. A coluna foi lavada com 350 µl de tampão RW1, por 15 segundos à 10000 x g. O filtrado foi descartado, e a coluna lavada com 500 µl do tampão RPE, por 15 segundos à 10000 x g. Em um novo tubo de coleta, a coluna foi centrifugada mais uma vez por 1 minuto à 10000 x g. Em um tubo de coleta livre de RNase, o RNA foi eluído da coluna com adição de 30 µl de água (livre de RNase), por 1 minuto à 10000 x g. A quantificação do RNA foi realizada em equipamento *NanoDrop 2000* (Thermo Fisher Scientific) e estocado à -80°C.

A síntese de cDNA foi feita com a enzima transcriptase reversa Improm II (Promega), seguindo as instruções do fabricante. Resumidamente, foi aliquotado 1 µg de RNA em até 10,1 µl. Então, 1 µl de oligoDT foi adicionado e a solução foi incubada por 5 minutos à 70°C e por 5 minutos no gelo. Foi adicionado 8,9 µl da solução da reação (Anexo II), e a amostra foi incubada por 5 minutos à 25°C, por 60 minutos à 42°C e 15 minutos à 70°C. Após o término da reação, foi adicionado 100 µl de água ultrapura. O cDNA foi estocado à -20°C.

A reação em cadeia da polimerase em tempo real quantitativa (*quantitative Polymerase Chain Reaction*, qPCR) foi realizada utilizando o reagente *SyBR Green Master Mix* (Thermo Fisher Scientific), oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) específicos para o gene de interesse (as sequências de *primers* estão presentes no Anexo III) e água ultrapura, nas proporções especificadas no Anexo II. As reações ocorreram em equipamento *LightCycler 96*® (Roche). A análise da expressão foi feita normalizando o Ct com o Ct de um gene normalizador, GAPDH, e usando a fórmula de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , que fornece a quantificação relativa (HAIMES; KELLEY, 2014).



#### 4.9 EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS E WESTERN BLOT

Para extração de proteínas, as células foram coletadas em tubos de polipropileno, centrifugadas a 250 x g e lavadas 2 vezes com PBS 1X. As células foram suspensas em 100 µl de Tampão de Amostra 1X (TA 4X diluído em PBS 1X, Anexo II). As amostras foram aquecidas a 94°C por 10 minutos e armazenadas a -20°C.

Para ensaio de *Western blot*, as amostras foram aplicadas no gel em um volume de 35 µl. As proteínas foram separadas em SDS-PAGE (Anexo II) em gel de poliacrilamida 10%, a 30 mA por 2 horas, e transferidas para membrana de nitrocelulose a 60 V, 4°C por 2 horas. O bloqueio da membrana foi realizado em tampão TBS 1X 0,1% Tween 20 5% leite 3% BSA 1% soro humano, *overnight*, e a incubação do anticorpo primário anti PUM1 ou anti PUM2 (1:5000) e anti-β actina (1:1000) (Anexo IV) foi feito em TBS 1X Tween 20 0,1%, à 4°C *overnight* sob agitação. A membrana foi lavada 3 vezes com TBS 1X 0,1% Tween 20, por 5 minutos. A incubação do anticorpo secundário conjugado com peroxidase (1:2500) foi realizado em TBS 1X 0,1% Tween 20, a temperatura ambiente por 1 hora. A membrana foi lavada 3 vezes com TBS 1X 0,1% Tween 20, por 5 minutos. A revelação da membrana foi feita com kit *HRP Chemiluminescent Substrate Reagent* (Thermo Fisher Scientific). A leitura do sinal foi feita no equipamento *ChemiExpress* (Loccus Biotecnologia), com tempo de exposição da membrana entre 30 segundos a 2 minutos.

#### 4.10 DIFERENCIAÇÃO CARDIOMIOGÊNICA

O protocolo de diferenciação, adaptado de Kattman e colaboradores (2011), foi iniciado quando as células alcançaram 80-90% de confluência.

Primeiramente, as células são induzidas a formar corpos embriões (CEs), agregados com 10-20 células (D0), para isso, as células são submetidas ao tratamento com Colagenase I (1 µg/ml) por 20 minutos à 37°C. Após esse período, a Colagenase I foi retirada e foi adicionada Tripsina (0,25%) de 1 a 2 minutos. Após esse tempo, a Tripsina foi inativada com adição de meio DMEM F12 50% SFB 50% DNase (1 µl/mL, 210 U). As células foram coletadas mecanicamente com auxílio de um rodinho para suspensão e foram centrifugadas à 230 x g por 5 minutos. O sobrenadante foi desprezado e as células foram ressuspensas em meio base, composto por Stempro34, suplementado com penicilina e estreptomicina 1%, glutamina 1%, transferrina 150 µg/mL, ácido ascórbico 50 µg/mL e MTG 0,09 µL/mL, e adição de BMP4 (0,5 ng/ml). As células foram plaqueadas em placa de 6 poços não

aderente e incubadas em estufa com 5% de CO<sub>2</sub>, 5% de O<sub>2</sub> (hipóxia), à 37°C por 24 horas.

No dia seguinte, os CEs foram induzidos à diferenciação de mesoderme (D1). Para isso, os CEs foram transferidos para tubos de 12 ml com fundo redondo, e incubados em estufa de normóxia por 40 minutos, para decantação dos CEs. Após esse tempo, o meio foi gentilmente retirado e os CEs foram ressuspensos em meio base (descrito acima), com adição de BMP4 (10 ng/ml), Activina A (6 ng/ml) e  $\beta$ FGF (5 ng/ml), e retornaram para placa de 6 poços não aderentes. Os CEs foram, então incubados novamente em hipóxia, à 37°C, até D3/D4.

Em D3/D4, a diferenciação para linhagem mesodermal foi confirmada por citometria de fluxo, com marcação positiva para CD56. Obtendo uma marcação positiva maior que 40%, os CEs foram decantados novamente, como descrito acima, e foi adicionado o meio base suplementado com VEGF (10 ng/mL), fator de crescimento, e XAV 939 (10  $\mu$ M/mL), inibidor da via Wnt. Os CEs retornaram para estufa de hipóxia, à 37°C. Após 4 dias, o meio foi trocado pelo meio base sem suplementação e retornaram para estufa de hipóxia até D15, com meio sendo trocado a cada 3 dias.

Em D9, foi possível observar CEs contraindo e a expressão de GFP, que caracteriza a ativação da expressão do gene *NKX2.5*. Em D15, foi feita análise da expressão de Troponina T por citometria de fluxo.

#### 4.11 CITOMETRIA DE FLUXO

Para marcação de CD56 em D3, 100  $\mu$ l dos CEs de cada tratamento foram aliqüotados em tubos de polipropileno de 1,5 ml e centrifugados a 300 x g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado, as células foram ressuspensas em 200  $\mu$ l de Tripsina 0,25% e incubadas à 37°C por 5 minutos. A enzima foi inativada com 500  $\mu$ l de meio DMEM F12 50% SFB 50% DNase (1  $\mu$ l/mL, 210 U) e centrifugada à 300 x g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado. As células dos tratamentos foram ressuspensas em 50  $\mu$ l de PBS 1X 0,5% BSA e as células do controle foram ressuspensas em 75  $\mu$ l de PBS 1X 0,5% BSA, onde 25  $\mu$ l são aliqüotados em um novo tubo para ser o controle não marcado. Em todos os tubos (com exceção do controle não marcado) foi adicionado anticorpo anti-CD56 (BD) na proporção 1:12,5 e incubado à 4°C por 20 minutos. Foi adicionado 500  $\mu$ l de PBS 1X 0,5% BSA e realizada centrifugação a 300 x g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado, as células foram ressuspensas em 200  $\mu$ l de PBS 1X 0,5% BSA e foi adicionado 10  $\mu$ l

de DAPI em cada tubo. As amostras foram lidas em seguida no citômetro de fluxo FACSCanto (BD).

Para expressão de GFP em D9, os CEs foram aliquotados e tripsinizados como descrito acima. Após inativação da enzima e centrifugação, as células foram ressuspensas em 200 µl de PBS 1X 0,5% BSA e foi adicionado 10 µl de DAPI em cada tubo. As amostras foram lidas em seguida no citômetro FACSCanto.

Para marcação de Troponina T em D15, os CEs foram coletados e tripsinizados (500 µl, à 37°C, por 20 minutos). Foi adicionado 800 µl de meio DMEM F12 50% SFB 50% DNase (1 µl/mL, 210 U) e centrifugada à 300 x g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado, adicionado 250 µl de PFA 4% e as amostras foram incubadas por 20 minutos sob agitação a temperatura ambiente. Para o controle não marcado, foi aliquotado 40 µl de cada amostra e adicionados em um único tubo. As amostras foram centrifugadas a 700 x g por 5 minutos, o sobrenadante descartado e as células ressuspensas em 200 µl de PBS 1X 0,5% Triton X-100 e incubado por 20 minutos a temperatura ambiente. As amostras foram centrifugadas a 800 x g por 5 minutos, o sobrenadante descartado e as células ressuspensas em 100 µl de PBS 1X 0,5% BSA. O anticorpo anti-Troponina T (Thermo Scientific™) foi adicionado na proporção 1:100 (exceto no controle não marcado) e as amostras foram incubadas por 30 minutos a temperatura ambiente. Foram realizadas duas lavagens com 400 µl de PBS 1X 0,5% BSA seguidas de centrifugações a 1000 x g. Então, o anticorpo secundário Alexa Fluor 633 anti- IgG de camundongo na proporção de 1:1000 foi adicionado e incubado por 30 minutos a temperatura ambiente, protegido da luz. Foram realizadas duas lavagens como já descritas e as amostras foram ressuspensas em 250 µl de PBS 1X 0,5% BSA. As amostras podem ser armazenadas à 4°C protegidas da luz até leitura no dia seguinte ou lidas ao final da marcação, em citômetro FACSCanto. A porcentagem de marcação positiva foi considerada a porcentagem de sucesso da diferenciação.

#### 4.12 ANÁLISE DOS ALVOS DE PUMILIO ENVOLVIDOS NA CARDIOMIOGÊNESE DE hESC

Em um trabalho prévio do grupo (PEREIRA, I.T), foi realizado sequenciamento de RNA (RNA-seq) durante a cardiomiogênese (Dias 0, 1, 4, 9 e 15) de hESC, tanto de mRNAs presentes na fração livre (fração onde acredita-se estarem representados mRNAs que não estejam sendo traduzidos) quanto de mRNAs presentes na fração polissomal (mRNAs ligados à polissomos, os quais acredita-se que estejam sendo

traduzidos). Com base nesses resultados de RNA-seq, os alvos de PUM (Anexo V) foram organizados em conjuntos (*clusters*), de acordo com o seu perfil de expressão ao longo da cardiomiogênese. Essa análise foi realizada em colaboração com a Dra. Lucia Spangenberg e Guillermo Cabrera, do Instituto Pasteur, em Montevideo, no Uruguai. De maneira geral, 1809 genes alvos de PUM1 e PUM2 descritos na literatura (GALGANO et al., 2008) foram analisados. Destes, 1789 genes estavam representados nos dados de RNA-seq realizado ao longo da cardiomiogênese. Para avaliar a variabilidade biológica, as amostras foram organizadas em *clusters* de *k-means*, e réplicas biológicas foram resumidas em *counts* por milhão (cpm) médio e transformadas em log-2 (mais 1) (*clusters* e suas respectivas listas de genes estão no Anexo VI). Em análise de dados, agrupamento *k-means* é um método de *clustering* que objetiva particionar *n* observações dentre *k* grupos onde cada observação pertence ao grupo mais próximo da média (KANUNGO et al., 2002). Nesse caso, possibilita visualizar os *clusters* gênicos baseado no seu comportamento, pois genes agrupados em um mesmo *cluster* tendem a se comportar similarmente, o que pode revelar possíveis associações entre eles.

Os *clusters* foram analisados quanto a sua ontologia gênica (*Gene Ontology*, GO) utilizando os softwares *Panther* (v. 13.0, online) e *FunRich* (v. 3.0). No software *Panther*, o foco da análise de GO foi em processos biológicos. Os parâmetros utilizados pelo software são descritos por Mi e colaboradores (MI et al., 2013). No software *FunRich*, a lista de genes dos *clusters* foi analisada individual e comparativamente, e atividades mais presentes dentro de determinadas categorias foram escolhidas como fatores de comparação entre as análises de GO resultantes dos dois softwares. Essa comparação foi realizada pelo software online *Venny* (v. 2.1). A partir desses dados, foram excluídos genes presentes tanto na fração livre quanto na fração polissomal, permanecendo alvos de PUM envolvidos na cardiomiogênese, presentes apenas em uma das frações, indicando possíveis pontos de regulação de PUM ao longo da diferenciação (Figura 4.2).

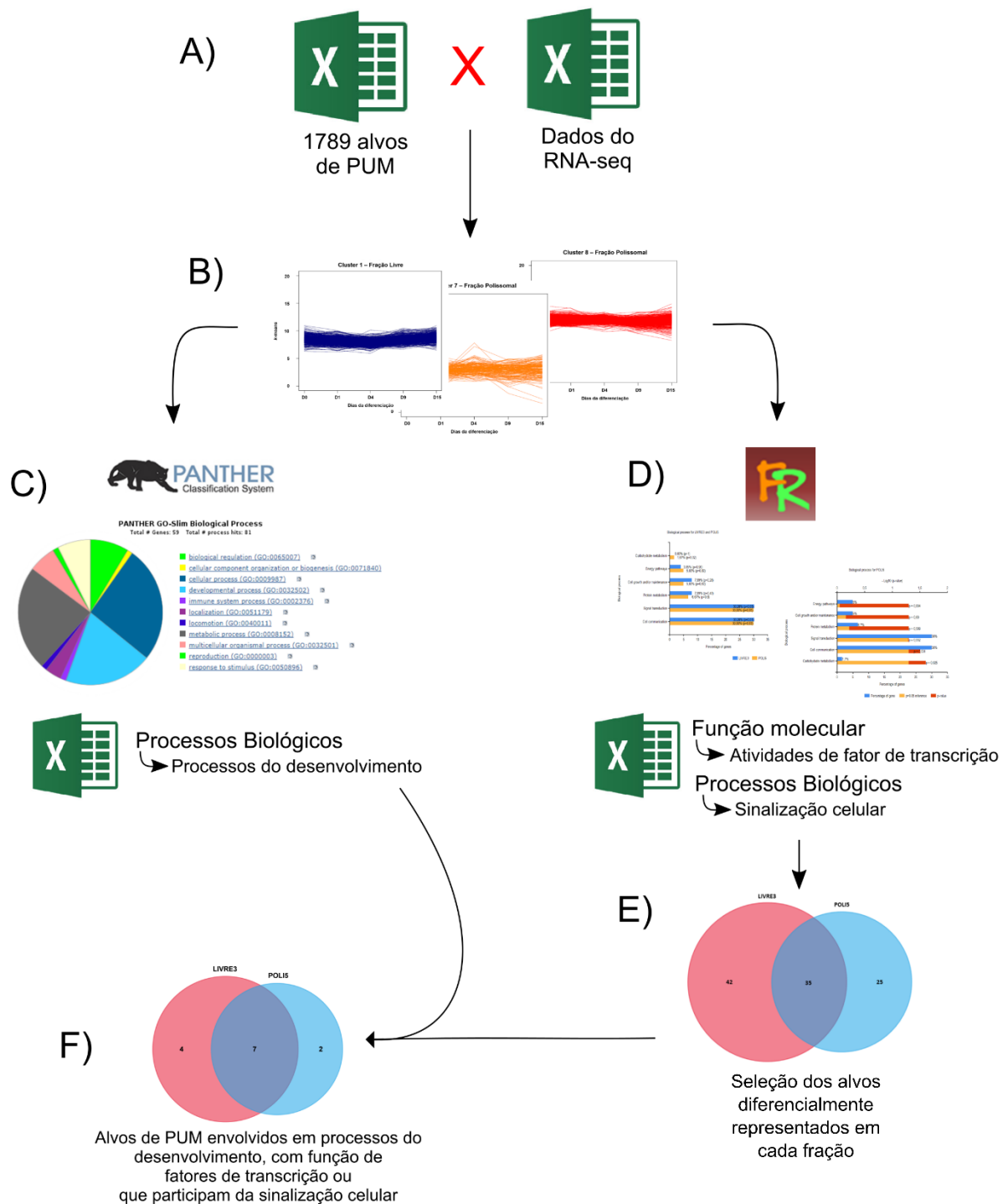


Figura 4.2 – Esquema da análise dos alvos de PUM envolvidos na cardiomiogênese. A) Dados de RNA-seq durante a cardiomiogênese das frações livre e polissomal foram comparados com lista de alvos de PUM1 e PUM2 descritos na literatura. B) Esses alvos foram organizados em *clusters*, de acordo com o seu perfil de expressão gênica ao longo da diferenciação. C) Os *clusters* foram analisados no software *Panther*, com enfoque em processos biológicos, o que gerou uma lista de alvos envolvidos em processos do desenvolvimento. D) Os mesmos *clusters* foram analisados no software *FunRich*, para determinar as categorias com maior número de alvos envolvidos em ambas as frações. E) Alvos das frações livre e polissomal, presentes nas categorias mais predominantes, foram cruzados, selecionando os mRNAs diferencialmente representados em ambas as frações. F) Com alvos exclusivos de cada fração, esses dados foram cruzados com os dados do *Panther*, a fim de se determinar alvos de PUM envolvidos em processos do desenvolvimento e que possuam alguma atividade na célula.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS DE PUMILIO

Em humanos, a família PUF possui os homólogos PUM1 e PUM2 com 91% de identidade em relação ao domínio de ligação ao RNA (ETTEN et al., 2012). Uma análise comparativa das sequências proteicas e de mRNA foi realizada a fim de determinar suas diferenças e confirmar a localização em que o shRNA pode interagir em cada sequência (Figura 5.1). O alinhamento proteico foi realizado basicamente com a sequência do domínio de ligação ao RNA de Pumilio, destacado em amarelo (Figura 5.1 A). Os vetores com as sequências para a expressão dos shRNA de *PUM1* ou *PUM2* foram cedidos pelo Dr. Miles Wayne (MILES; TSCHÖP; HERR; JI, J. Y.; et al., 2012). A figura 5.1 B apresenta o alinhamento das sequências dos mRNAs e a região de pareamento dos shRNA que está destacado em amarelo (*PUM1*) e verde (*PUM2*). É possível observar que a sequência shRNA de *PUM1* (amarelo) possui 21 nucleotídeos que pareiam totalmente no mRNA de *PUM1* e 15 nucleotídeos que pareiam com a sequência do mRNA de *PUM2*. O mesmo acontece com shRNA de *PUM2* (verde) que pareia com 13 nucleotídeos do mRNA de *PUM1*.

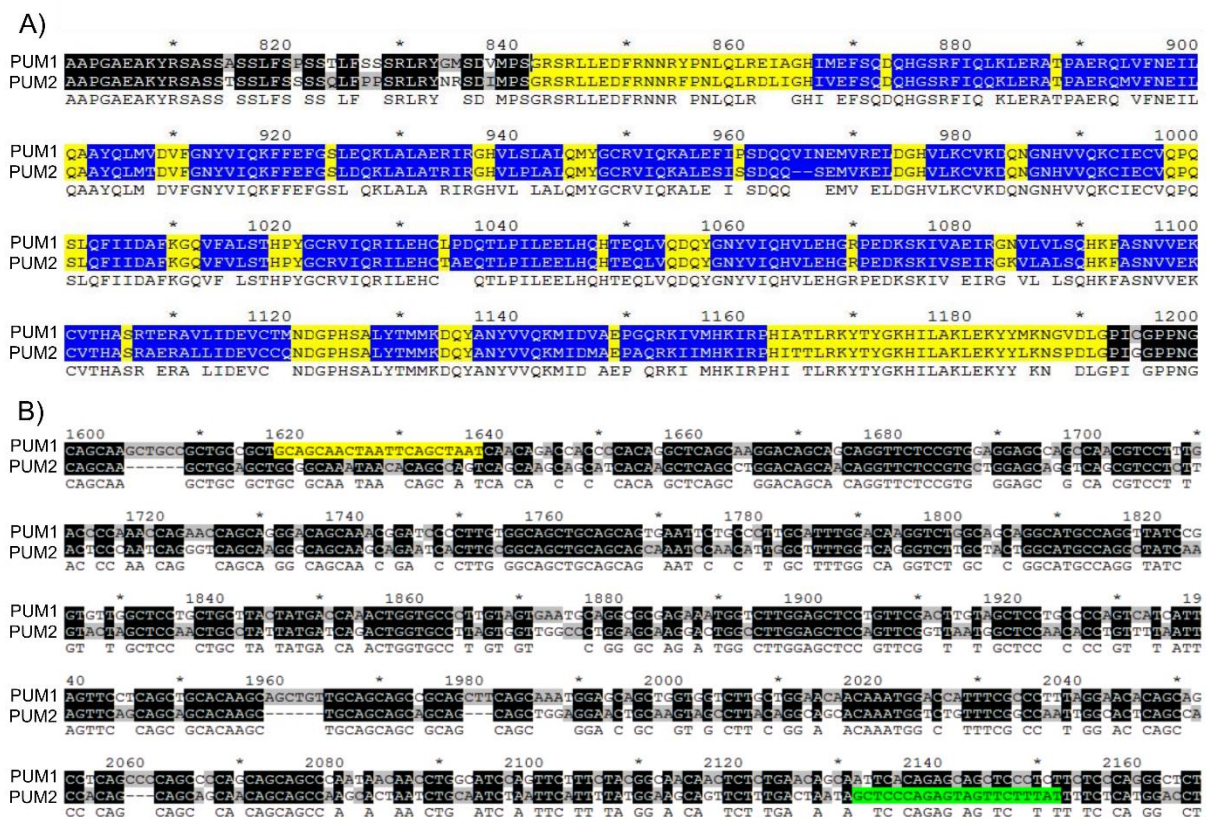


Figura 5.1 - Fragmentos das sequências proteica e do mRNA de PUM1 e PUM2 humanas. A) Fragmento das sequências proteicas de PUMILIO 1 e 2 humanas, destacando a região de ligação ao RNA (PUM-HD, amarelo). PUM-HD contém 8 repetições PUF, e cada repetição contém 3 alfa-hélices. As alfa-hélices das repetições estão destacadas em azul. Abaixo do alinhamento das duas sequências, está a sequência consenso. B) Fragmento das sequências de mRNA de PUMILIO 1 e 2 humanas. Em

amarelo, região onde o shRNA pode se ligar para silenciar *PUM1*. Em verde, região onde shRNA pode se ligar para silenciar *PUM2*.

## 5.2 MORFOLOGIA DAS hESC E CARDIOMIOGÊNESE

Prosseguindo para os ensaios *in vitro*, as hESC foram descongeladas e cultivadas em Matrigel e MEF (Figura 5.2).

A diferenciação cardiomiogênica foi realizada em triplicata, em um protocolo que dura 15 dias. A morfologia das células durante a diferenciação pode ser visualizada na Figura 5.2 B. No dia 9, foi possível visualizar a contração de alguns corpos embrióides, mimetizando a contração do músculo. No dia 15, muitos corpos embrióides apresentaram contração.

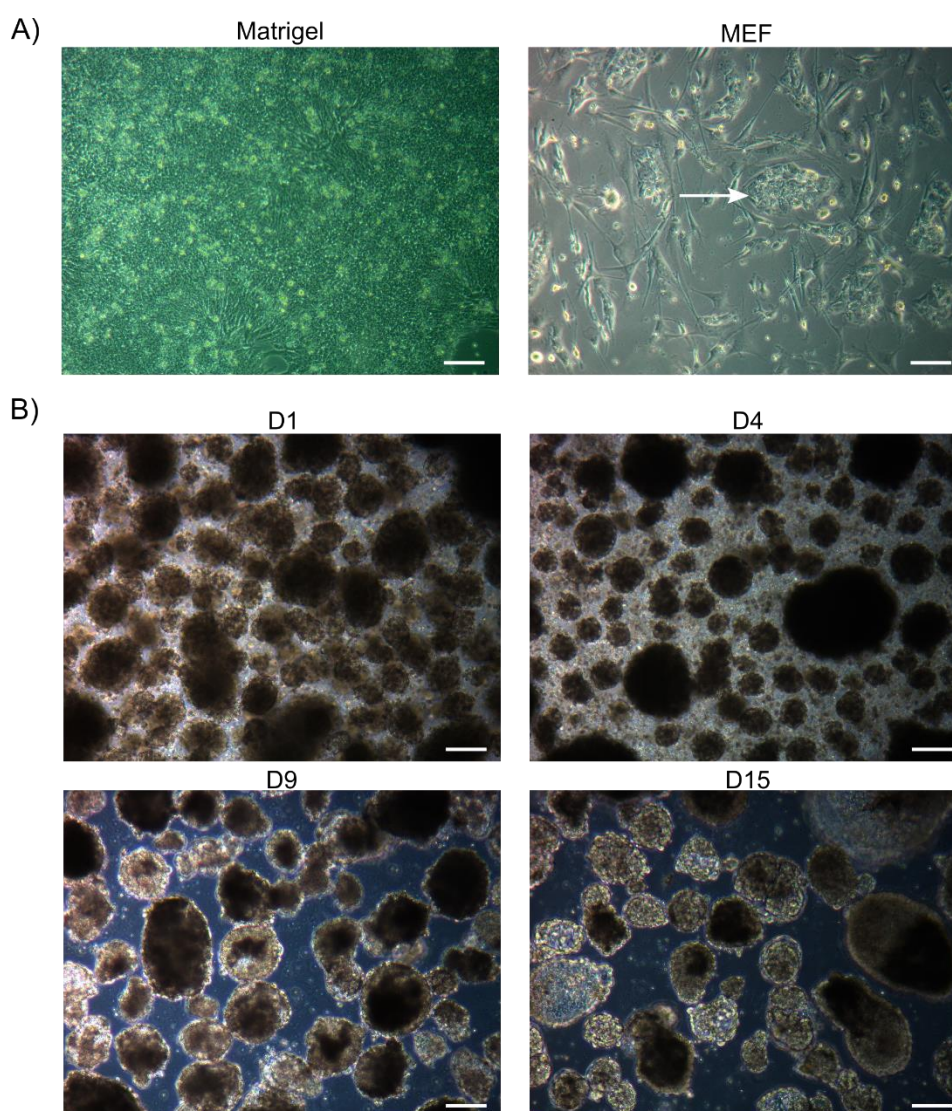


Figura 5.2 – hESC e diferenciação cardiomiogênica. A) células na linhagem h32.5/GFP, cultivadas tanto em Matrigel® quanto sobre MEF (células alongadas, e uma colônia de hESC indicada pela seta branca). B) Morfologia das células durante a diferenciação cardiomiogênica. Os corpos embrióides são estabelecidos no dia 1 quanto a tamanho, formato e número. Muitas células morrem durante o processo. No dia 9, a morfologia se torna mais arredondada. Barras de escala: 100  $\mu\text{m}$ .

Durante a diferenciação, as células foram analisadas por citometria de fluxo para: i) CD56, marcador de mesoderme, no dia 3 (D3); ii) para GFP, proteína fluorescente sob o comando do promotor do *NKX2.5* (marcador do comprometimento com a linhagem cardíaca), que começa a ser expresso no dia 9 (D9); iii) e para troponina T, marcador de cardiomiócito, no dia 15. No terceiro dia de diferenciação, aproximadamente 53% das células estavam marcadas para CD56 (Figura 5.3 A). No nono dia, em torno de 30% das células expressavam GFP (Figura 5.3 B). Já no décimo quinto dia, ao final da diferenciação, em torno de 26% das células estavam marcadas para Troponina-T (Figura 5.3 C). Esse protocolo de diferenciação é considerado eficiente quando a marcação de troponina T é de no mínimo 40% da população de CEs, porém o ensaio varia muito de uma replicata para outra. Isso é melhor visualizado quando representamos os resultados da triplicata em um gráfico, onde o desvio padrão entre as réplicas é grande (Figura 5.3 D). Apesar de o desvio padrão ser grande entre as replicatas, seguimos com este protocolo de diferenciação, uma vez que este é bem estabelecido no nosso laboratório, com resultados em torno de 60% de eficiência de diferenciação (PEREIRA, I.T.). Além disso, este ensaio de diferenciação das células não transduzidas foi realizado simultaneamente com os ensaios das células transduzidas, as quais obtiveram o mínimo de 40% de células diferenciadas, como apresentado no item 5.7. Os dados completos de citometria estão presentes no Anexo VII.



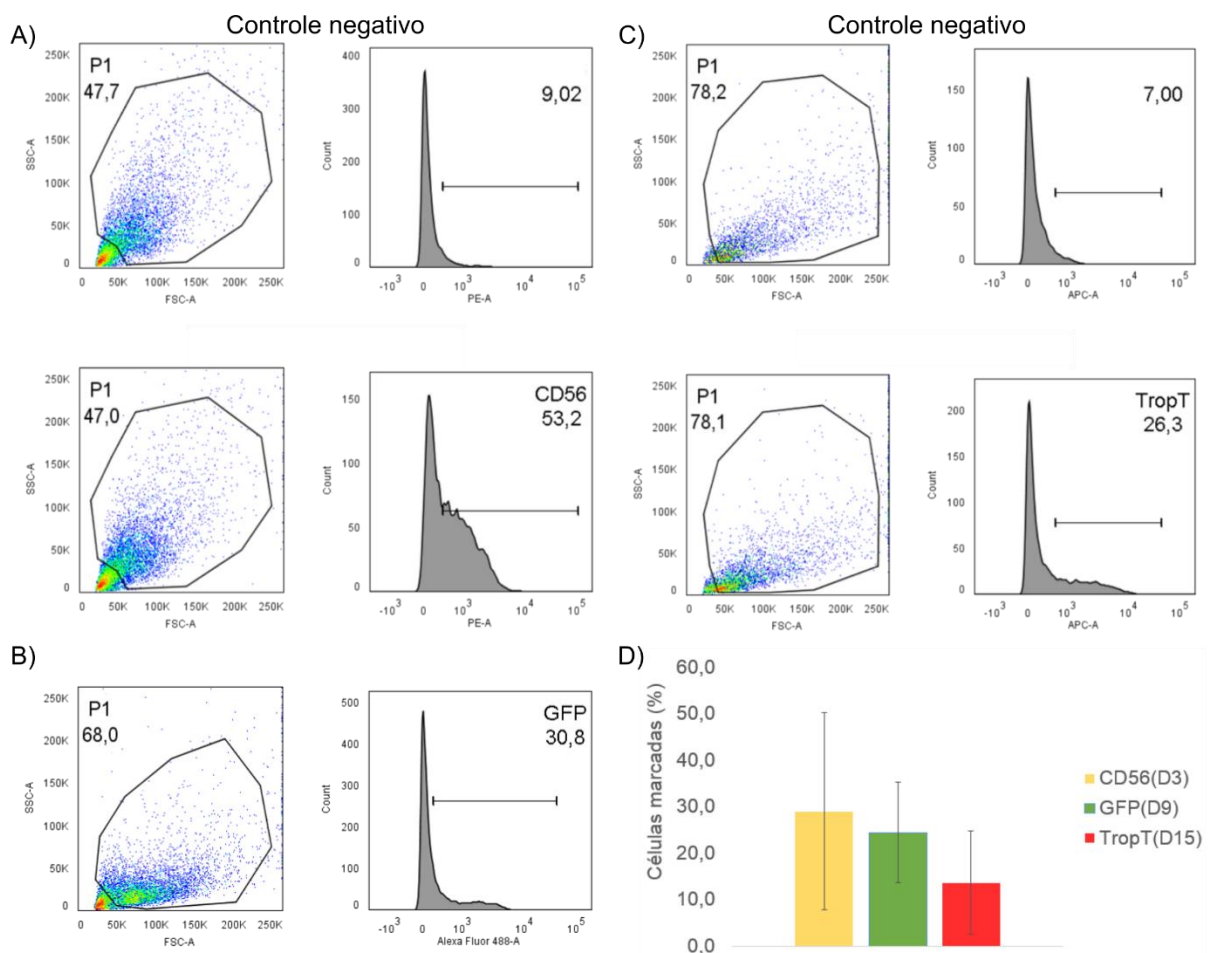


Figura 5.3 – Análise de marcadores linhagem-específicos como pontos de checagem durante a cardiomiogênese. A) Marcação para CD56, marcador de mesoderme. O gráfico de cima corresponde ao controle sem marcação com anticorpo primário. B) Expressão de GFP, marcador de progenitor cardíaco. C) Marcação para Troponina T, marcador de cardiomiócito. O gráfico de cima corresponde ao controle sem marcação com anticorpo primário. Primeiro gráfico (*dotplot*) representa a separação das células por tamanho (FSC-A, eixo x) e granulosidade (SSC-A, eixo y). O segundo gráfico representa a intensidade de fluorescência. PE-A é o fluoróforo conjugado no anticorpo secundário de CD56. Alexa Fluor 488-A representa a intensidade de GFP, que fluoresce na mesma faixa deste fluoróforo. APC-A é o fluoróforo conjugado no anticorpo secundário de Troponina T. D) Média de marcação entre as replicatas para cada dia da diferenciação.

### 5.3 EXPRESSÃO DE PUMILIO EM hESC E DIFERENCIAÇÃO CARDIOMIOGÊNICA

O RNA total foi extraído em duplicata de diferenciação, em quatro pontos: dia 1 (D1), dia 4 (D4), dia 9 (D9) e dia 15 (D15). O dia 1 corresponde ainda ao estado pluripotente das células, quando estas estão em corpos embrióides (CEs). O dia 4 corresponde à diferenciação em mesoderme. O dia 9 corresponde à diferenciação em progenitor cardíaco. O dia 15 corresponde ao final da diferenciação em cardiomiócitos. Após a extração do RNA total destes pontos, as amostras foram dosadas, e as condizentes ao dia 15 obtiveram uma dosagem de 0 µg/µl de RNA, impossibilitando a reação de cDNA e posterior análise por RT-qPCR. Portanto, os dados apresentados de RT-qPCR referentes à cardiomiogênese foram analisados apenas aos dias 1, 4 e 9.

Foi observado que durante a diferenciação cardiomiogênica, a expressão de *PUM1* e *PUM2* aumenta com o passar do tempo no RNA total (Figura 5.4 A). Ao analisar a expressão de *PUMILIO* durante a cardiomiogênese na fração polissomal obtida do RNA-seq (PEREIRA, I.T.), vemos que *PUM1* e *PUM2* se mantêm constantes ao longo de todo processo (Figura 5.4 B). Isso pode indicar uma possível função de *PUM* na cardiomiogênese, uma vez que se observa uma diferença na expressão de *PUM1* e *PUM2* no RNA total e na fração polissomal e, conseqüentemente, uma possível regulação de *PUMILIO* ao longo do processo.

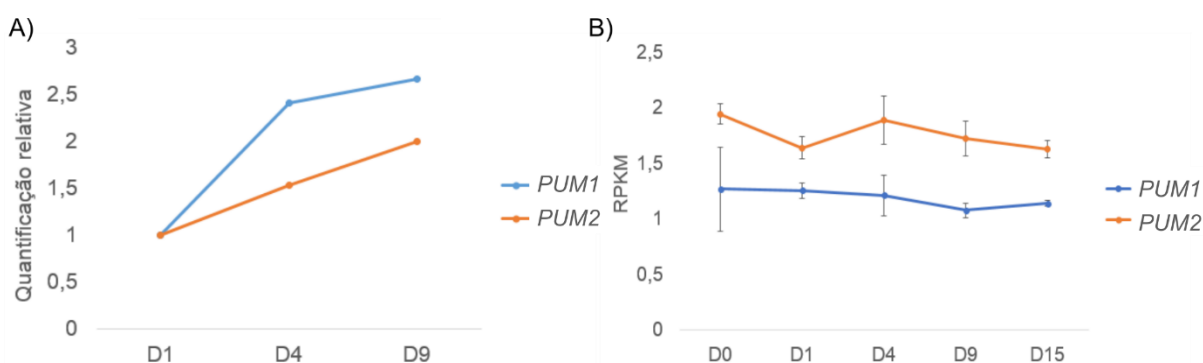


Figura 5.4 - Expressão dos mRNAs de *PUM1* e *PUM2* ao longo da diferenciação. A) Expressão de *PUM1* e *PUM2* ao longo da diferenciação cardiomiogênica, presente no RNA total. Gene normalizador: *GAPDH*. B) Expressão de *PUM1* e *PUM2* ao longo da diferenciação cardiomiogênica, na fração polissomal (RNA Seq – PEREIRA, I.T.).

#### 5.4 CURVA DE SELEÇÃO COM PUROMICINA

Como as partículas lentivirais com a sequência *shPUM1* ou *shPUM2* possuem gene de resistência a puromicina, uma curva de concentração da droga foi avaliada nas ESC, a fim de identificar a menor concentração de droga necessária à seleção da população. A puromicina foi adicionada entre as concentrações 125-250 ng/ml e após 7 dias de cultivo já era possível observar o aumento na morte celular (Figura 5.5). Como outra forma de analisar a viabilidade celular além da microscopia, foi usada a técnica de captação do vermelho neutro, em que os lisossomos de células viáveis são corados e o corante é solubilizado em solução de etanol/ácido acético, onde sua absorbância é lida. Assim, a concentração de 250 ng/ml apresentou absorbância similar com o controle negativo (poço sem células), sendo a escolhida para a seleção das colônias resistentes após a transdução (Figura 5.6).

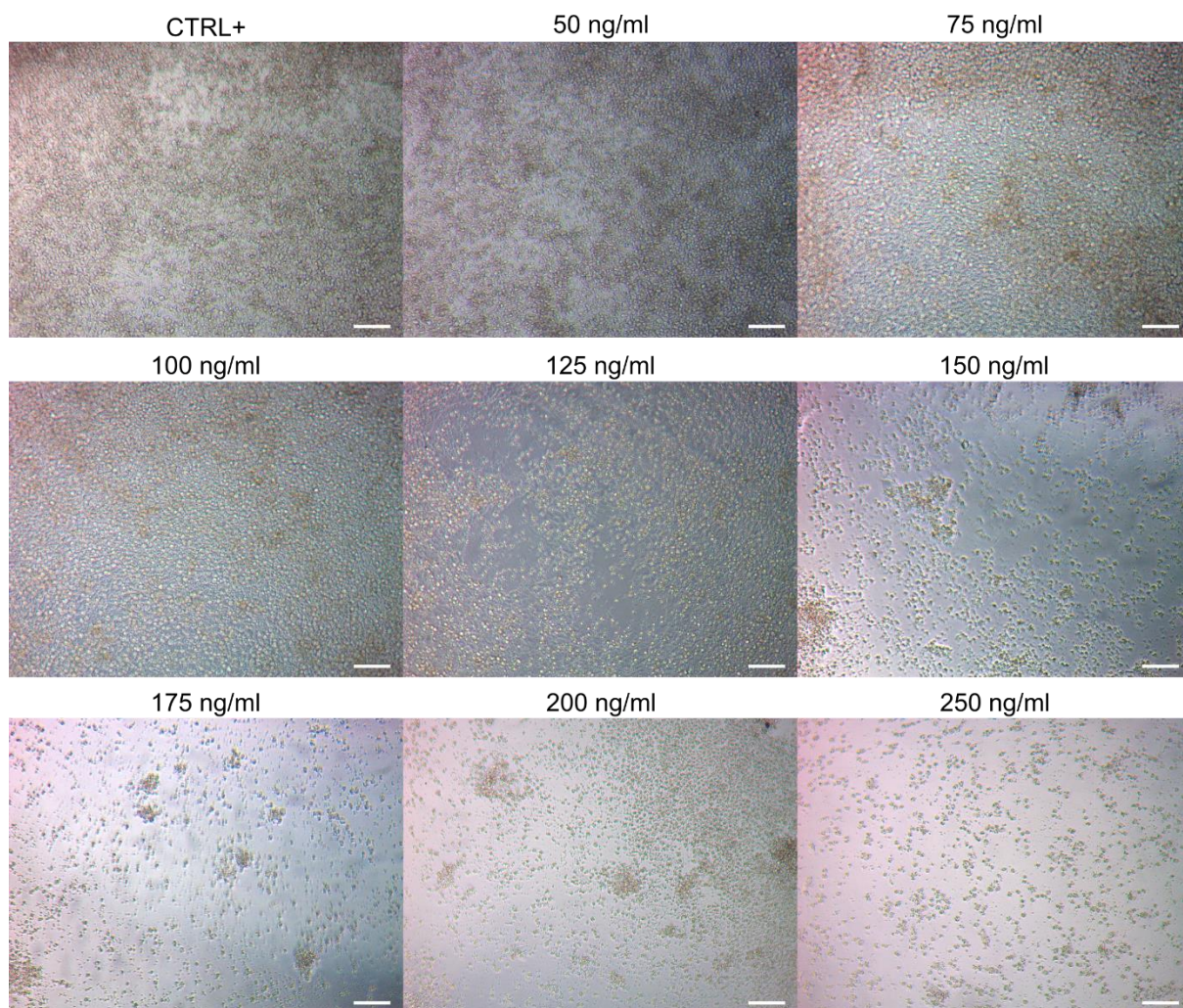


Figura 5.5 – Análise morfológica das células após adição de puromicina. O controle positivo de células viáveis (CTRL+) corresponde à nenhuma concentração de droga administrada (0 ng/ml). As células começam a apresentar morte celular a partir da concentração de 125 ng/ml. Imagens capturadas no último dia do ensaio, logo antes do ensaio de captação do vermelho neutro. Barras de escala: 100  $\mu$ m.

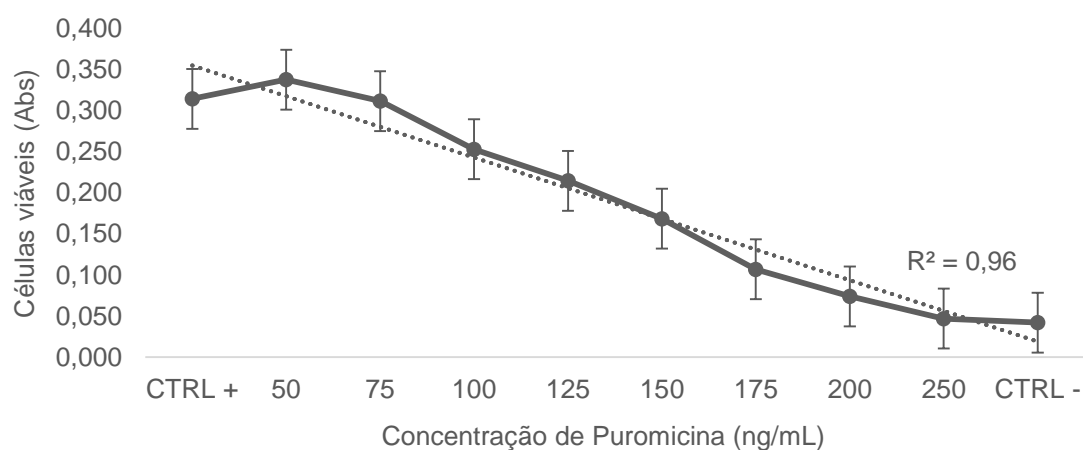


Figura 5.6 – Gráfico representando a viabilidade celular após a adição de puromicina. O controle positivo de células viáveis (CTRL+) corresponde à nenhuma concentração de droga administrada (0 ng/ml). O controle negativo de células viáveis (CTRL-) corresponde a um poço sem células e sem administração de drogas.

## 5.5 TITULAÇÃO DOS VETORES LENTIVIRAIS

A produção dos vetores lentivirais para *shPUM1*, *shPUM2* ou *shScramble* (*shSc*) foi realizada conforme descrito na seção materiais e métodos. Com o objetivo de identificar a melhor diluição das partículas virais para os experimentos seguintes, ensaios de titulação foram realizados adicionando sobre as células diferentes diluições dos vírus ( $10^{-1}$  a  $10^{-7}$ ). A partir do terceiro dia da transdução, a puromicina foi adicionada e as colônias selecionadas analisadas após 15 dias.

A análise das colônias resistentes revelou que a diluição  $10^{-3}$  ( $1E-03$ ) das partículas lentivirais teve um número maior de colônias resistentes para os vírus contendo *shPUM1* e *shSc* (Figura 5.7 A e C). A diluição  $10^{-4}$  resultou em um número maior de colônias resistentes transduzidas com vírus contendo *shPUM2* (Figura 5.7 B). Porém, essa diluição apresentava colônias menos saudáveis. Logo, optamos por diminuir a diluição para  $10^{-3}$ , pois a diferença em relação ao número de colônias não foi grande, e a morfologia das colônias desta última diluição era mais saudável em relação à diluição  $10^{-4}$ . Portanto, a titulação forneceu um resultado qualitativo do volume de lentivírus em suspensão para ser utilizado nos ensaios subsequentes.

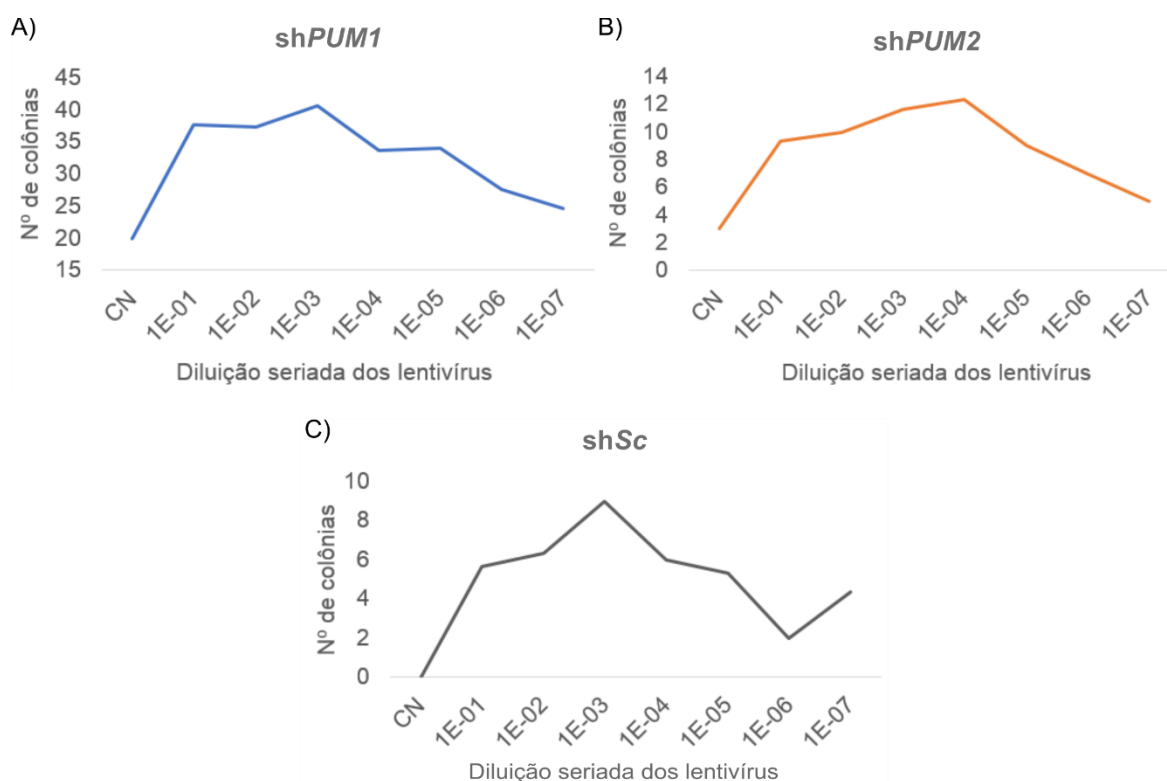


Figura 5.7 – Titulação dos vetores lentivirais produzidos. A) Número de colônias resistentes encontradas para vetores lentivirais contendo *shPUM1*. B) Número de colônias resistentes encontradas para vetores lentivirais contendo *shPUM2*. C) Número de colônias resistentes encontradas para vetores lentivirais contendo *shSc*.

Em uma análise da morfologia das colônias resistentes, o número e tamanho de colônias foi reduzido e as colônias não apresentaram aspecto saudável (Figura 5.8), características que poderiam afetar os próximos ensaios de diferenciação cardíaca, por exemplo. Dessa forma, o processo de seleção com antibiótico após a transdução foi excluído dos ensaios seguintes.

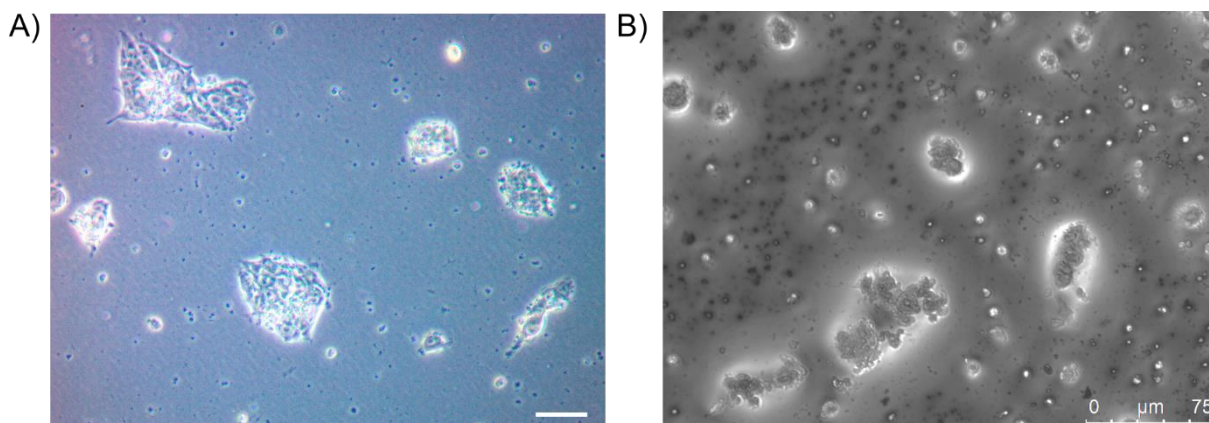


Figura 5.8 – Morfologia das colônias de hESC. A) hESC em colônia após 24 horas de crescimento. Colônias uniformes e com muitas células. Barra de escala: 100  $\mu\text{m}$ . B) Imagem representativa das poucas e pequenas colônias ao fim da titulação, após 10 dias de seleção de colônias resistentes com puromicina.

## 5.6 EFEITO DO SILENCIAMENTO DE PUMILIO NA PLURIPOTÊNCIA DE hESC

A determinação da diluição dos vetores lentivirais para a transdução possibilitou seguir com a próxima etapa do trabalho que foi o silenciamento de *PUM1* e *PUM2* nas hESCs e a análise dos efeitos desse silenciamento na pluripotência.

A transdução foi realizada em triplicata conforme descrita no item 4.7. Após 24 horas, as células foram analisadas morfologicamente, observando se haviam diferenças entre o shSc e os tratamentos (sh*PUM1*, sh*PUM2* e sh*PUM1-2*). Não foram observadas mudanças significativas nas células silenciadas em relação ao controle do experimento (shSc) (Figura 5.9).

Dessa forma, RT-qPCR foi realizada para confirmar o silenciamento de *PUM1*, *PUM2* e ambas, à nível de mRNA. Os resultados demonstraram que houve uma redução significativa de mRNAs de *PUM1* e *PUM2* com o silenciamento comparada com o controle, inclusive com as células duplo silenciadas (Figura 5.10 A). O sh*PUM1* interferiu também na redução dos níveis de expressão do mRNA de *PUM2* e vice-versa, sugerindo uma baixa especificidade. O duplo-silenciamento teve uma eficiência melhor do silenciamento de ambas *PUMILIO*: 92% para *PUM1* e 90% para *PUM2*. A confirmação do silenciamento em nível de proteína por *Western Blot*, infelizmente não foi possível. Mesmo após inúmeros protocolos, vários problemas com a obtenção de

extratos proteicos, definição dos géis e especificidade do anticorpo comprometeram a reprodutibilidade dos resultados (Figura 5.11). Acreditamos que a ausência de resultados conclusivos no ensaio de *Western Blot* não compromete os dados obtidos *a posteriori*, pois a confirmação do silenciamento em nível de mRNA já permite visualizar efeitos na pluripotência das hESC. De toda forma, a expressão dos genes de pluripotência *OCT4* e *NANOG* foi realizada por qPCR, a fim de observar se o silenciamento de *PUM1* e *PUM2* havia alterado os níveis de mRNA desses genes. Interessantemente, os níveis de mRNA de *OCT4* e *NANOG* reduziram significativamente nas células silenciadas para *PUM1*, *PUM2* e duplo silenciamento em relação ao controle (Figura 5.10 B). Esses resultados sugerem que *PUM1* e *PUM2* podem estar envolvidos na manutenção da pluripotência de hESC.

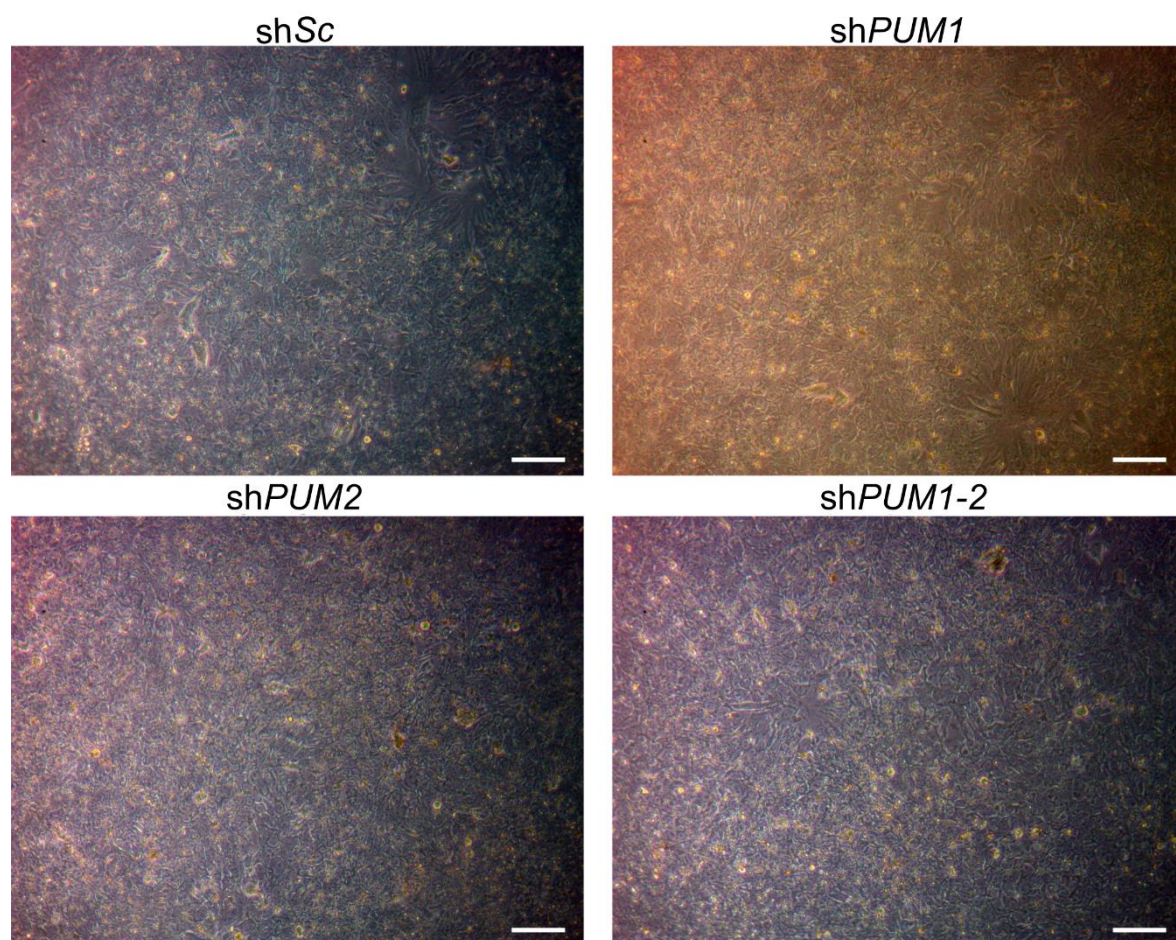


Figura 5.9 – Morfologia das hESCs após o silenciamento de *PUMILIO*. É possível observar que a morfologia das células permanece semelhante ao controle (shSc), com pouca morte celular, pois a confluência permanece inalterada. Barras de escala: 100  $\mu$ m.

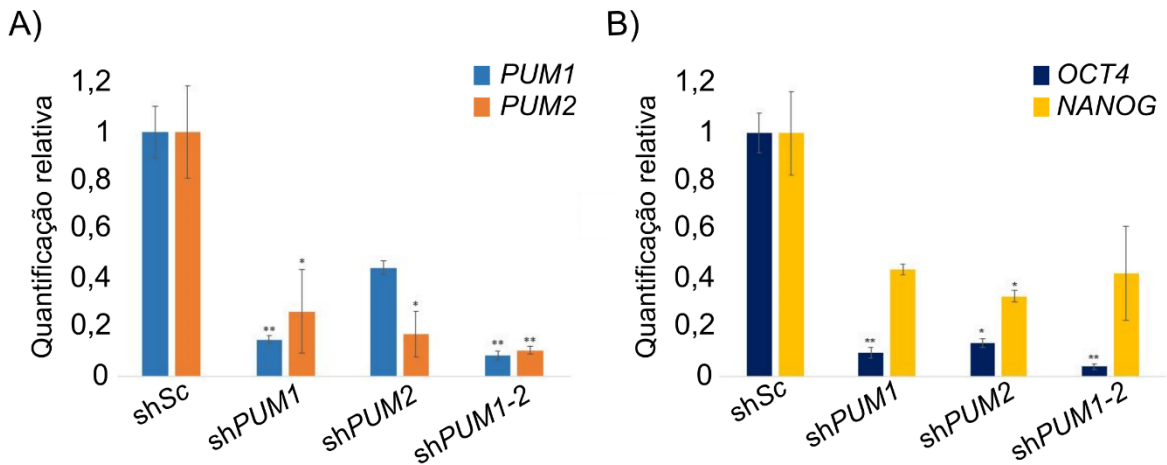


Figura 5.10 – Análise de expressão de *PUMILIO*, *OCT4* e *NANOG* após o silenciamento. A) Expressão de *PUM1* e *PUM2* após os silenciamentos individuais e duplo. B) Expressão de *OCT4* e *NANOG* após o silenciamento de *PUMILIO*. Teste t. \* $p \leq 0,05$ . \*\* $p \leq 0,01$ .

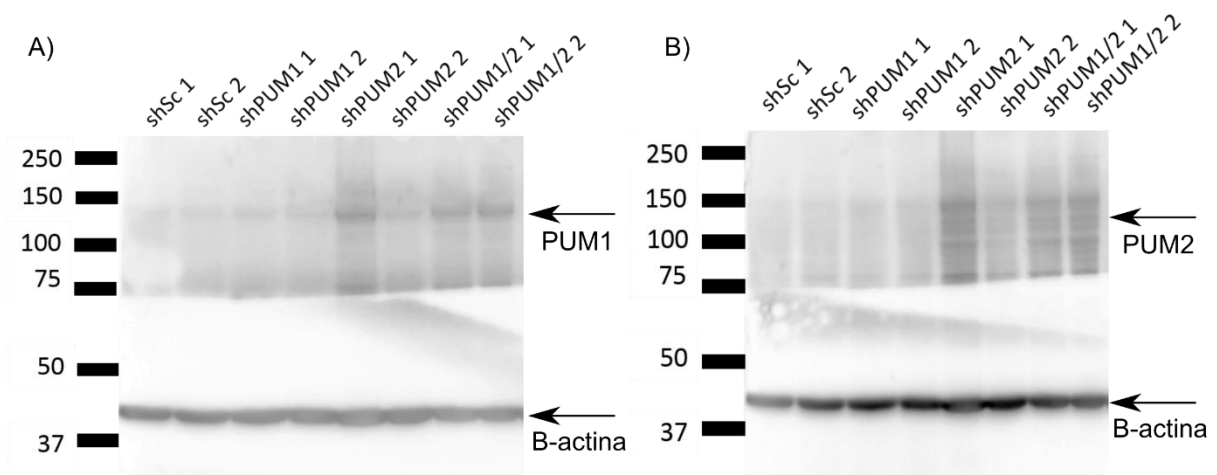


Figura 5.11 – Nível proteico de *PUMILIO* após o silenciamento em hESC. A) Marcação para *PUM1* (126 kDa) nas amostras silenciadas de hESC. B) Marcação para *PUM2* (114 kDa) nas amostras silenciadas de hESC.  $\beta$ -actina: 45 kDa. Marcador de massa molecular: Odyssey® one-color (Li-Cor).

Sabendo que o protocolo de silenciamento funciona e que o silenciamento de *PUMILIO* leva à queda nos níveis de mRNA de *OCT4* e *NANOG*, genes que fazem parte do núcleo de pluripotência em hESC, em seguida foi analisado o efeito do silenciamento de *PUMILIO* durante a diferenciação cardiomiogênica.

## 5.7 EFEITO DO SILENCIAMENTO DE *PUMILIO* AO LONGO DA DIFERENCIAÇÃO CARDIOMIOGÊNICA

O protocolo de diferenciação cardiomiogênica teve algumas adaptações devido a etapa de transdução das células com os lentivirus, assim a diferenciação foi induzida após 48 horas da transdução e foi realizada em triplicata. A morfologia dos corpos embrionários foi acompanhada em todos os dias de troca de meio e/ou ensaio de

citometria e extração de RNA. Nos dias 1 e 4, foi possível observar que os corpos embriões do controle e dos silenciados individuais estão uniformes em tamanho e quantidade, enquanto que os corpos embriões de *shPUM1-2* são um pouco menores, embora em quantidade maior em relação aos outros tratamentos e controle (Figura 5.12). A quantidade de corpos embriões observados na transdução com *shSc* foi menor em relação aos silenciamentos em D9 e D15, porém foi considerada normal se comparado ao controle sem transdução com lentivírus (item 5.2). Aparentemente os corpos embriões de *shPUM1*, *shPUM2* e *shPUM1-2* também apresentaram um tamanho maior. Os corpos embriões de *shPUM2* e *shPUM1-2* permanecem semelhantes até o dia 15, final da diferenciação. A morfologia final dos corpos foi bastante semelhante à morfologia no experimento de diferenciação de células que não foram transduzidas com lentivírus e com o protocolo de diferenciação previamente caracterizado (Figura 5.2 B). Os corpos embriões de *shPUM1* apresentaram formatos não esféricos em maior quantidade em comparação com *shSc*, *shPUM2* e *shPUM1-2*. A partir do 9º dia, todos os tratamentos, inclusive o controle *shSC*, apresentaram corpos embriões com contração (pulsção, batimento primitivo), semelhante à diferenciação em células sem transdução com lentivírus. Entretanto, as células silenciadas para *PUMILIO* aparentemente apresentaram maior número de corpos embriões com contração e que se manteve até o 15º dia.



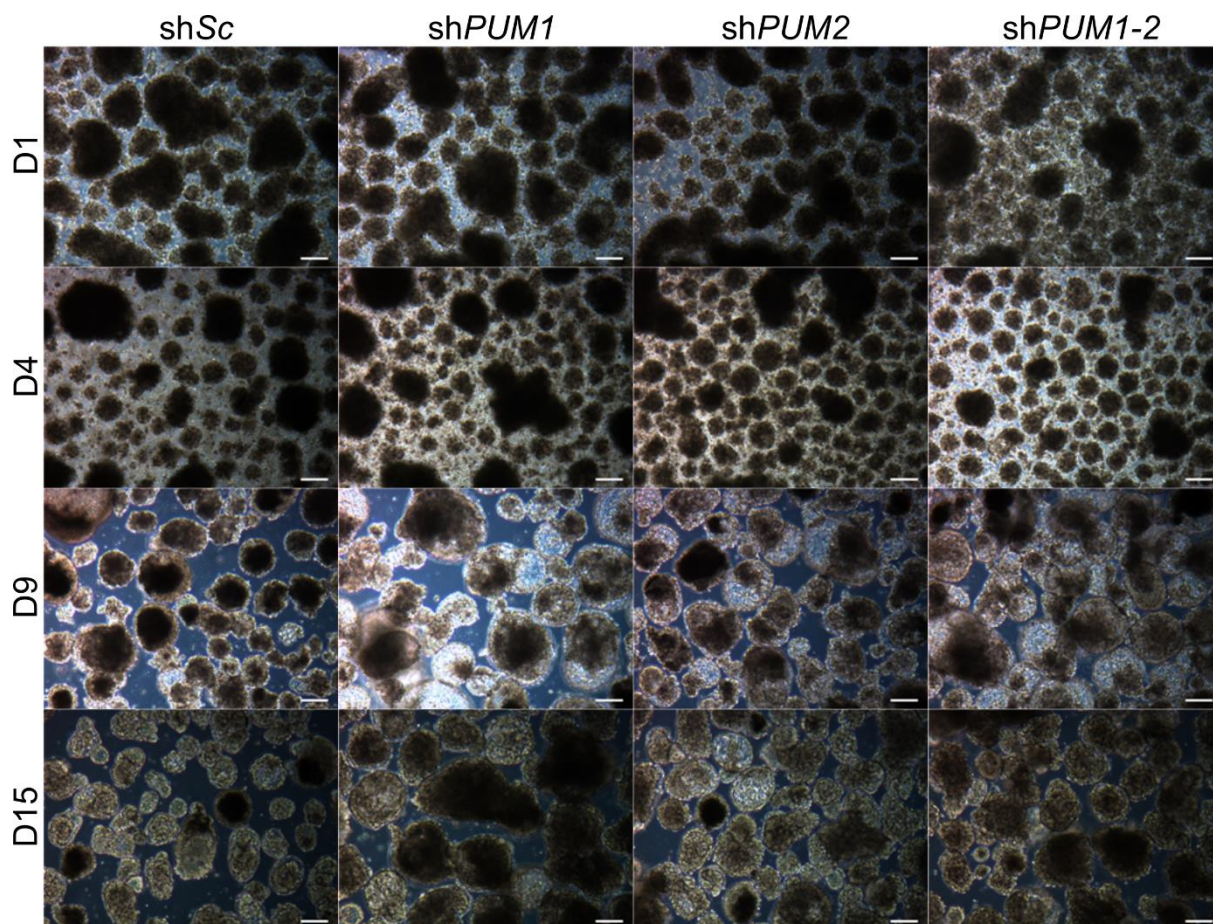


Figura 5.12 – Morfologia das células silenciadas para *PUMILIO* durante cardiomiogênese. A morfologia dos corpos embriões silenciados para *PUMILIO* apresentou diferenças em comparação ao controle (shSc). Barras de escala: 100  $\mu$ m.

A citometria de fluxo para marcadores de mesoderme, progenitor cardíaco e cardiomiócito durante a diferenciação também foi realizada. No dia 3, a marcação para CD56 (marcador de mesoderme) foi maior nas células silenciadas em relação ao controle (Figura 5.13 A). Essa diferença persistiu no dia 9, na expressão de GFP (Figura 5.13 B), e no dia 15, na marcação para troponina T (Figura 5.13 C). As células duplo silenciadas para *PUM1-2* tiveram aumento estatisticamente significativo na expressão do CD56, marcador de mesoderme (D3), e de GFP, marcador de progenitor cardíaco (D9). As células silenciadas individualmente para *PUM1* e *PUM2* aumentaram significativamente a eficiência de diferenciação, expressa pela marcação com Troponina T (D15) (Figura 5.14). Os dados completos de citometria estão presentes no Anexo VII.

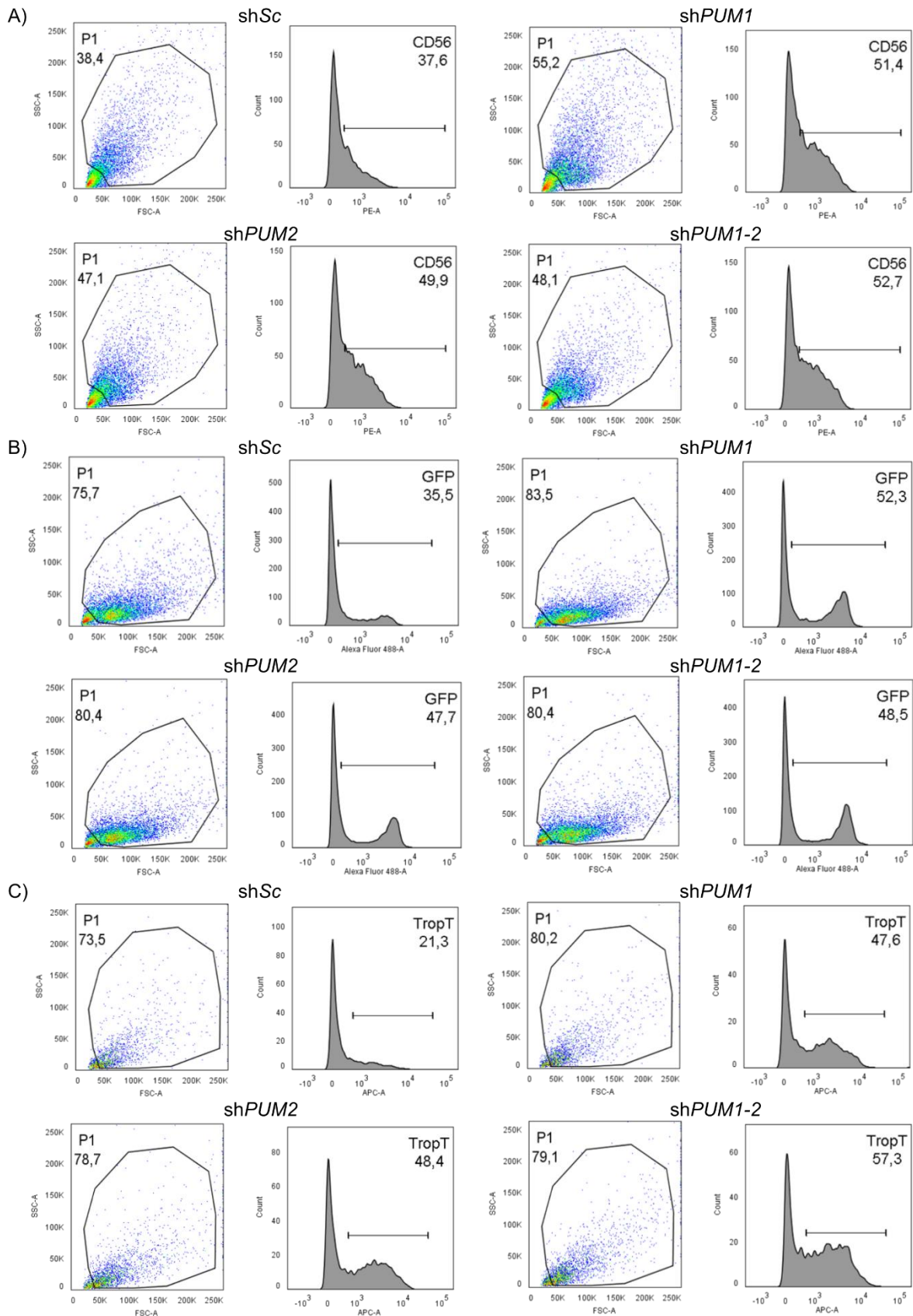


Figura 5.13 – Análise de marcadores linhagem-específicos em células silenciadas para *PUMILIO* durante a cardiomiogênese. A) Marcação para CD56, marcador de mesoderme. B) Expressão de GFP, marcador de progenitor cardíaco. C) Marcação para Troponina T, marcador de cardiomiócito. Primeiro gráfico (*dotplot*) representa a separação das células por tamanho (FSC-A, eixo x) e granulosidade (SSC-A, eixo y). O segundo gráfico representa a intensidade de fluorescência. PE-A é o fluoróforo conjugado no anticorpo secundário de CD56. Alexa Fluor 488-A representa a intensidade de GFP, que

fluoresce na mesma faixa deste fluoróforo. APC-A A é o fluoróforo conjugado no anticorpo secundário de Troponina T. Controles negativos de CD56 e Troponina T presentes na Figura 5.3.

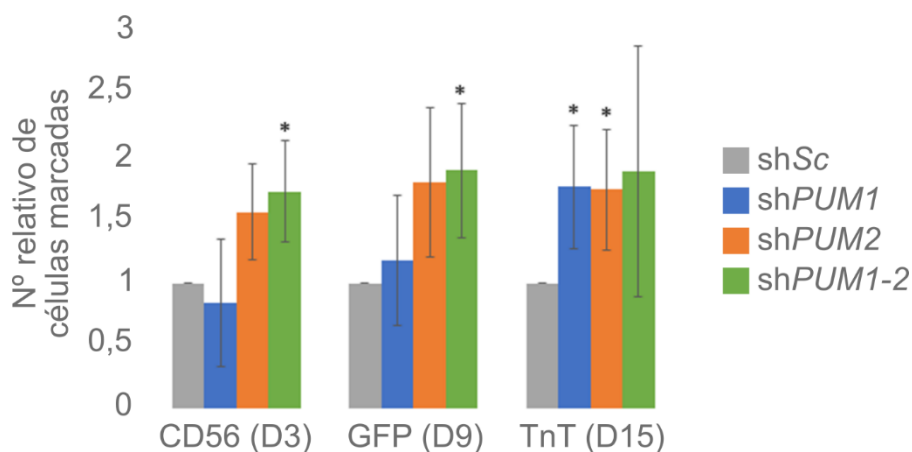


Figura 5.14 – Porcentagem das células com expressão dos marcadores linhagem-específicos durante cardiomiogênese de hESC silenciadas para *PUMILIO*. As replicatas foram normalizadas em relação ao controle shSc, para diminuir a variabilidade entre elas. Teste t. \* $p \leq 0,05$ . (n=3).

## 5.8 PERFIL DE EXPRESSÃO DE PUMILIO AO LONGO DA CARDIOMIOGÊNESE APÓS O SILENCIAMENTO

A fim de verificar se o silenciamento em nível de mRNA se mantinha durante toda a cardiomiogênese, a expressão de *PUM1* e *PUM2* foi acompanhada por qPCR. Após 48 horas da transdução com os lentivirus (D0), os níveis de mRNA de *PUM1* e *PUM2* tiveram uma redução de aproximadamente 85% e 83%, respectivamente, caracterizando o silenciamento. Entretanto, a partir do 1º dia da diferenciação, a expressão de *PUM1* e *PUM2* se igualou ou foi superior a expressão do controle (Figura 5.15). Outra forma de investigar se o silenciamento permaneceria até o final da diferenciação foi a análise da expressão proteica de *PUM1* e *PUM2* por *Western Blot* dos dias 1 e 15. Infelizmente, a confirmação do silenciamento em nível de proteína em hESC não foi possível devido a vários problemas com a obtenção de extratos proteicos, definição dos géis, especificidade do anticorpo e reprodutibilidade dos resultados (Figura 5.16). Qualitativamente, não conseguimos visualizar qualquer silenciamento de *PUM1* ou *PUM2* no dia 1 (Figura 5.16). No dia 15, a baixa quantidade de proteínas presente na amostra dificulta a visualização até mesmo de  $\beta$ -actina, impossibilitando até mesmo uma análise visual. A quantificação e normalização pelo normalizador ( $\beta$ -actina) ficou comprometida com a resolução da técnica. Ainda assim, acreditamos que a ausência de resultados conclusivos no ensaio de *Western Blot* não compromete os dados obtidos *a priori*, pois a confirmação do silenciamento em nível

de mRNA apenas em D0 já permite visualizar efeitos durante a diferenciação cardiomiogênica, como já foi observado no item 5.7.

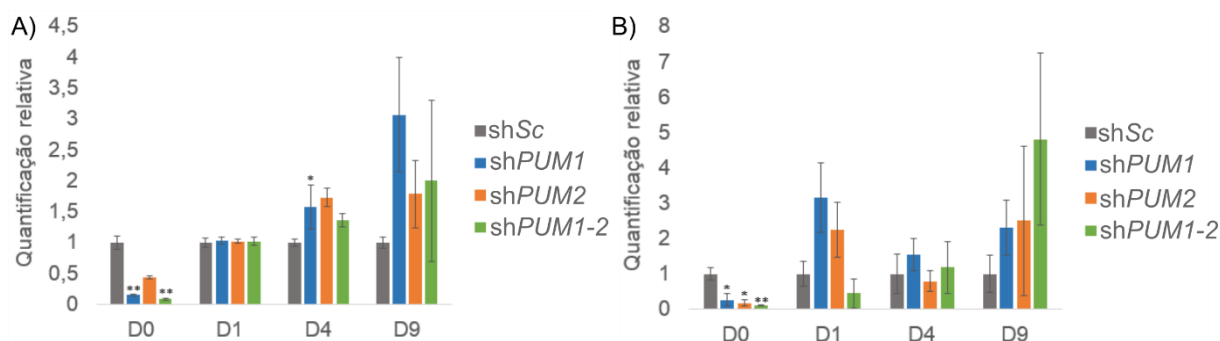


Figura 5.15 – Quantificação dos mRNAs de *PUM1* e *PUM2* após silenciamento ao longo da diferenciação cardiomiogênica. A) Níveis de mRNA de *PUM1* durante a diferenciação. B) Níveis de mRNA de *PUM2* durante a diferenciação. Teste t. \*p<0,05. \*\*p<0,01. (n=2)

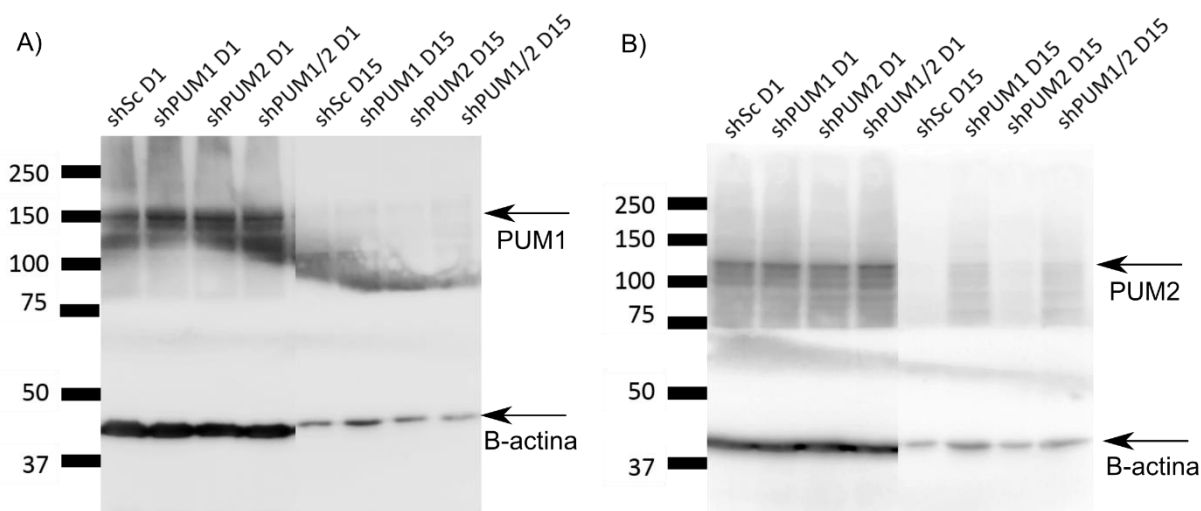


Figura 5.16 - Nível proteico de PUMILIO após o silenciamento nos dias 1 e 15 da cardiomiogênese. A) Marcação para PUM1 (126kDa) nas amostras silenciadas em D1 e D15 da diferenciação. B) Marcação para PUM2 (114kDa) nas amostras silenciadas em D1 e D15 da diferenciação.  $\beta$ -actina: 45 kDa. Marcador de massa molecular: Odyssey® one-color (Li-Cor).

## 5.9 ALVOS DE PUMILIO ENVOLVIDOS NA CARDIOMIOGÊNESE

Observando os dados de silenciamento de *PUMILIO* na pluripotência e cardiomiogênese de hESC, notamos que o efeito de *PUMILIO* parece se dar no início da diferenciação. Porém, uma vez que *PUMILIO* possui uma expressão crescente ao longo da diferenciação, é possível que seus alvos estejam envolvidos no processo, indicando pontos de regulação da cardiomiogênese que envolvem *PUMILIO*. Partindo dessa ideia, os perfis de expressão de alvos de *PUMILIO* durante a cardiomiogênese foram analisados utilizando dados de sequenciamento prévios do grupo (PEREIRA, I.T.). O sequenciamento de RNAs presentes na fração livre (fração onde acredita-se

conter mRNAs que não estejam sendo traduzidos) e RNAs presentes na fração polissomal (mRNAs ligados à polissomos, onde acredita-se que estejam sendo traduzidos) foram obtidos durante a cardiomiogênese (Dias 0, 1, 4, 9 e 15) de hESC. A fim de encontrar esses pontos de regulação, os perfis de expressão dos alvos de PUMILIO foram classificados em 8 diferentes conjuntos (*clusters*) de acordo com seu comportamento ao longo da diferenciação (Figuras 5.17 e 5.18).

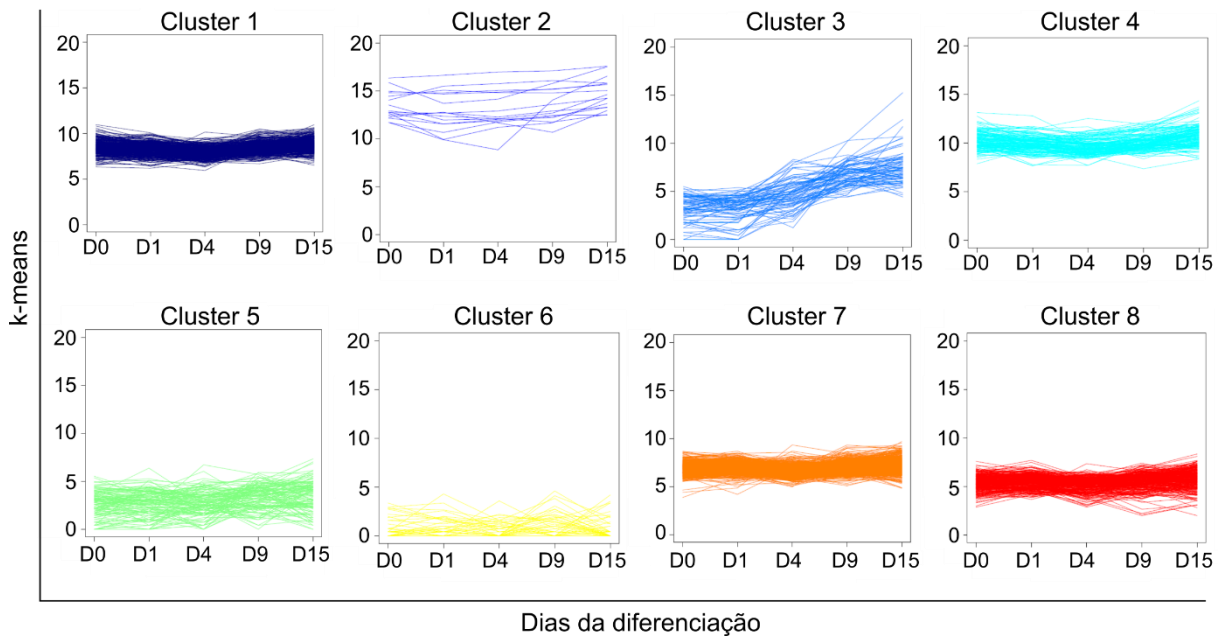


Figura 5.17 – *Clusters* do comportamento dos alvos de PUMILIO durante a cardiomiogênese presentes na fração livre.

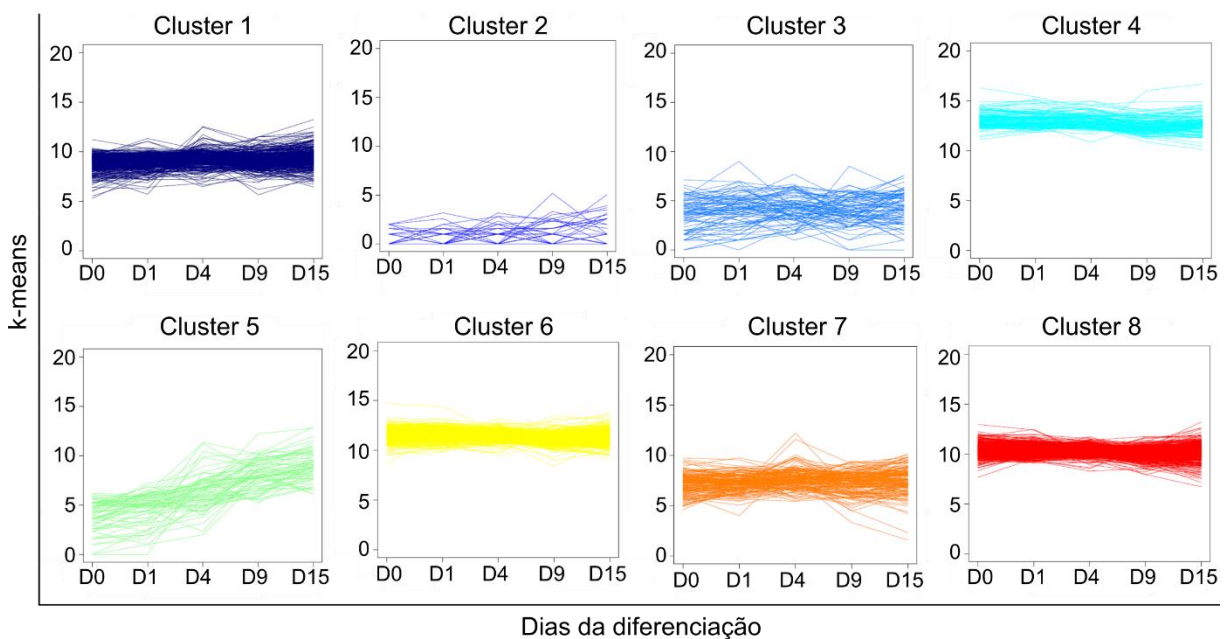


Figura 5.18 – *Clusters* do comportamento dos alvos de PUMILIO durante a cardiomiogênese presentes na fração polissomal.

Dois *clusters* apresentaram um perfil interessante, de aumento ao longo da diferenciação: o *cluster 3* da fração livre (LIVRE3); e o *cluster 5* da fração polissomal (POLI5) (Figura 5.19). Ambos os *clusters* possuem mRNAs que tem sua representatividade aumentada em cada fração, ao longo da diferenciação. Assim, mRNAs que estejam aumentando na fração livre possivelmente podem estar sendo menos expressos ao longo do processo, bem como mRNAs que estejam aumentando na fração polissomal podem estar sendo mais expressos ao longo do processo. A lista completa dos mRNAs presentes em cada *cluster* está presente no Anexo VI.

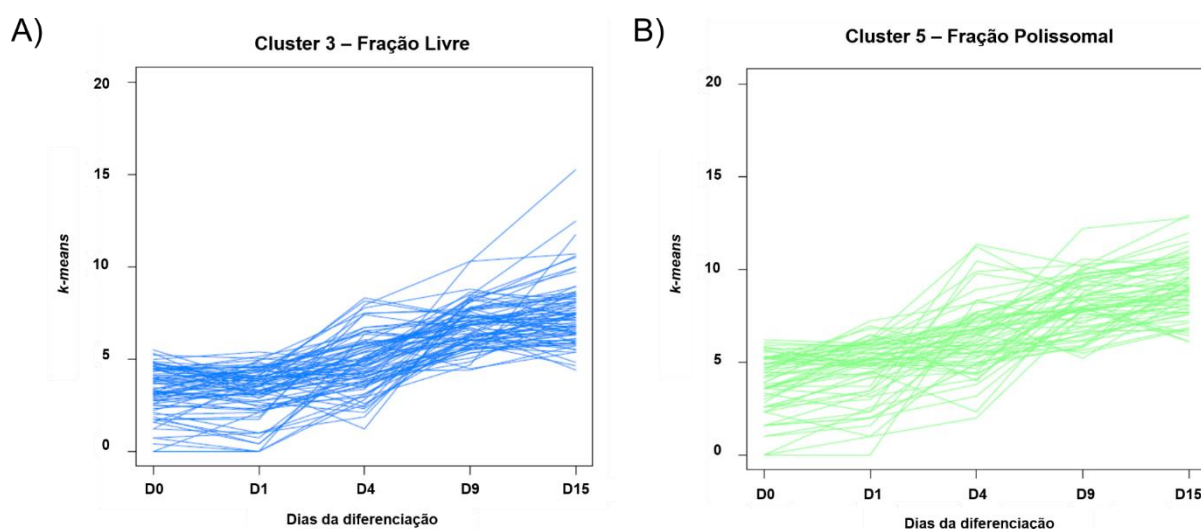


Figura 5.19 – *Clusters* analisados. A) *Cluster 3* da fração livre, onde estão classificados genes que aumentam nessa fração ao longo da cardiomiogênese, sugerindo que estes possam estar sendo desligados ao longo do processo. B) *Cluster 5* da fração polissomal, onde estão classificados genes que aumentam nessa fração ao longo da cardiomiogênese, sugerindo que estes possam estar sendo ligados ao longo do processo de diferenciação.

Definidos os *clusters*, os mRNAs de cada um foram analisados por ontologia gênica (*Gene Ontology*, GO). Análise pelo *Panther* forneceu dados sobre os processos biológicos nos quais os genes agrupados em LIVRE3 e POLI5 estão envolvidos. O que chamou a atenção foi que muitos mRNAs, tanto de LIVRE3 quanto de POLI5 foram classificados em processos do desenvolvimento. Em LIVRE3, indo mais a fundo em processos do desenvolvimento, muitos mRNAs estão envolvidos em desenvolvimento de ectoderme e de sistemas, entre eles o sistema nervoso (Figura 5.20). Uma vez que o *cluster* LIVRE3 apresenta mRNAs enriquecidos na fração livre, que podem estar sendo desligados ao longo da diferenciação, era esperado a presença de genes relacionados ao desenvolvimento de outros folhetos e sistemas que não o cardíaco.

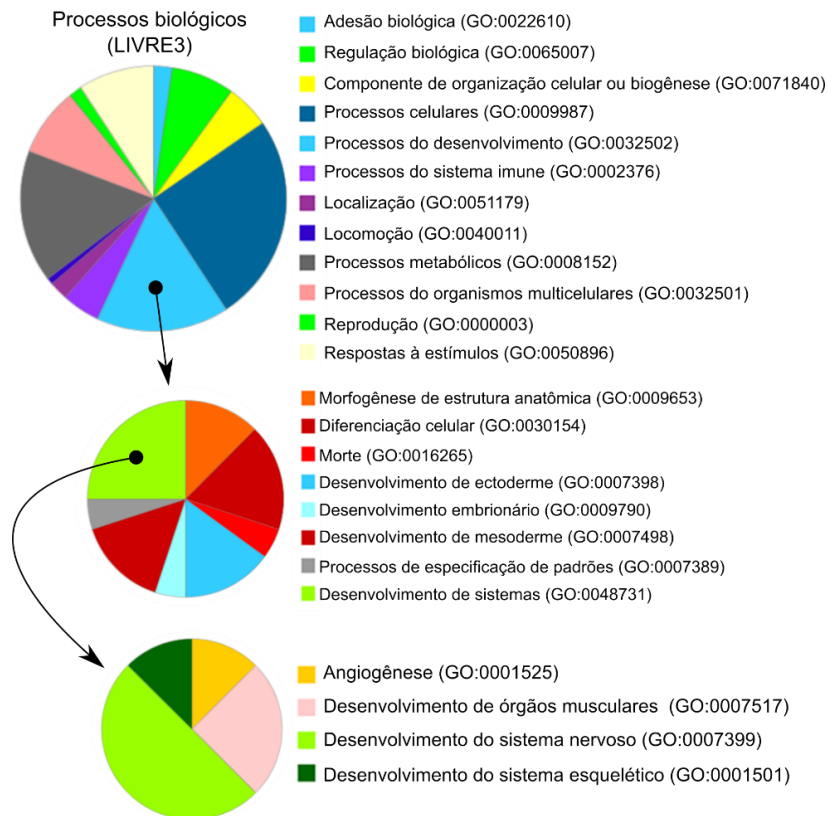


Figura 5.20 – Classificação dos genes de LIVRE3 pelo software *Panther*. Alguns genes presentes neste *cluster* estão relacionados com processos de desenvolvimento, em última instância, de desenvolvimento de sistemas como o nervoso e o esquelético. Isso sugere que genes relacionados com o desenvolvimento de sistemas não cardíacos podem estar sendo desligados ao longo do processo de diferenciação cardiomiogênica *in vitro*.

Em relação à análise de POLI5, muitos mRNAs foram classificados em desenvolvimento de mesoderme (Figura 5.21). Uma vez que mRNAs que estão enriquecidos na fração polissomal sugerem que sua expressão em nível de tradução esteja aumentando também, é esperado a relação com o desenvolvimento do folheto do qual o tecido cardíaco deriva. Outro processo que se destaca é do desenvolvimento de sistemas, onde se destaca desenvolvimento dos sistemas nervoso e cardíaco.

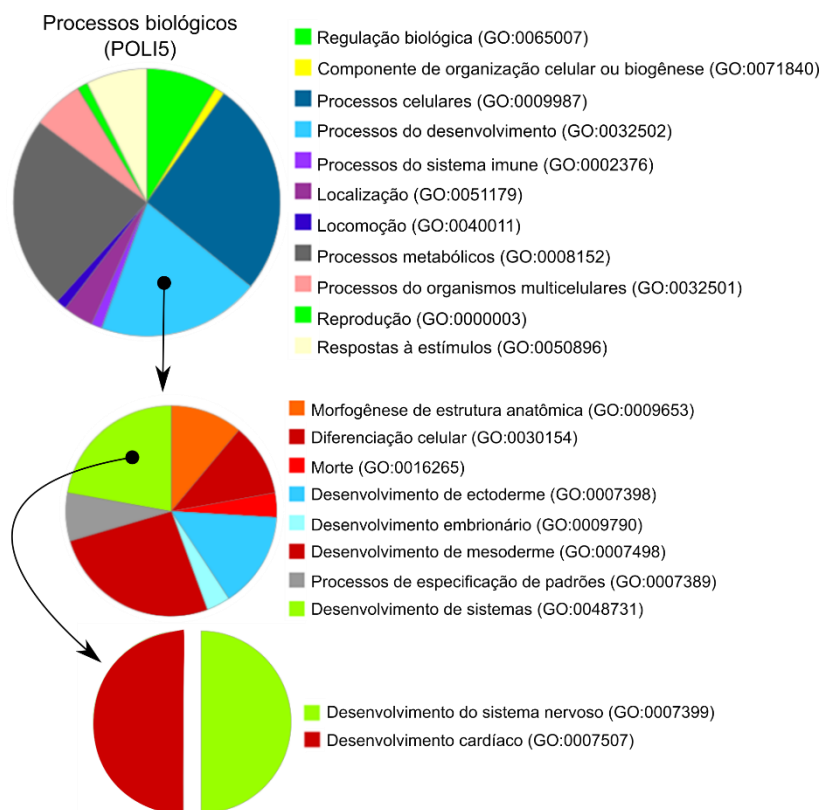


Figura 5.21 – Classificação dos genes de POLI5 pelo software *Panther*. Alguns genes presentes neste *cluster* estão relacionados com processos de desenvolvimento, em última instância, de desenvolvimento de mesoderme e do sistema cardíaco. Isso sugere que genes relacionados com o desenvolvimento do sistema cardíaco podem estar sendo ligados ao longo do processo de diferenciação cardiomiogênica *in vitro*.

Esses dados sugerem que mRNAs relacionados a processos biológicos que não envolvem o desenvolvimento do sistema cardíaco estejam sendo desligados ao longo da diferenciação, enquanto mRNAs que estão relacionados com esse desenvolvimento estejam sendo ligados durante o processo.

Na tentativa de enriquecer as informações sobre os alvos de PUMILIO, os mRNAs dos dois *clusters* também foram analisados no *FunRich*, para se chegar a processos comuns entre as duas frações.

Na análise focando em processos biológicos, LIVRE3 apresenta mRNAs muito relacionados com comunicação celular e transdução de sinal (Figura 5.22 A). Outros processos estão relacionados com crescimento, metabolismo de proteínas e vias de energia. POLI5 apresenta um perfil parecido, com adição de metabolismo de carboidratos em seus processos (Figura 5.22 B). Comparativamente, ambas as frações apresentaram processos em comum, sendo os maiores deles comunicação celular e transdução de sinal (Figura 5.22 C). Após definir os processos biológicos comuns entre as duas frações (comunicação celular), os mRNAs de cada *cluster* foram cruzados, a fim de selecionar os mRNAs diferenciantemente representados. Dos



23 mRNAs de LIVRE3 e 18 de POLI5 que participam de comunicação celular, 9 são comuns em ambas as frações (Figura 5.22 D).

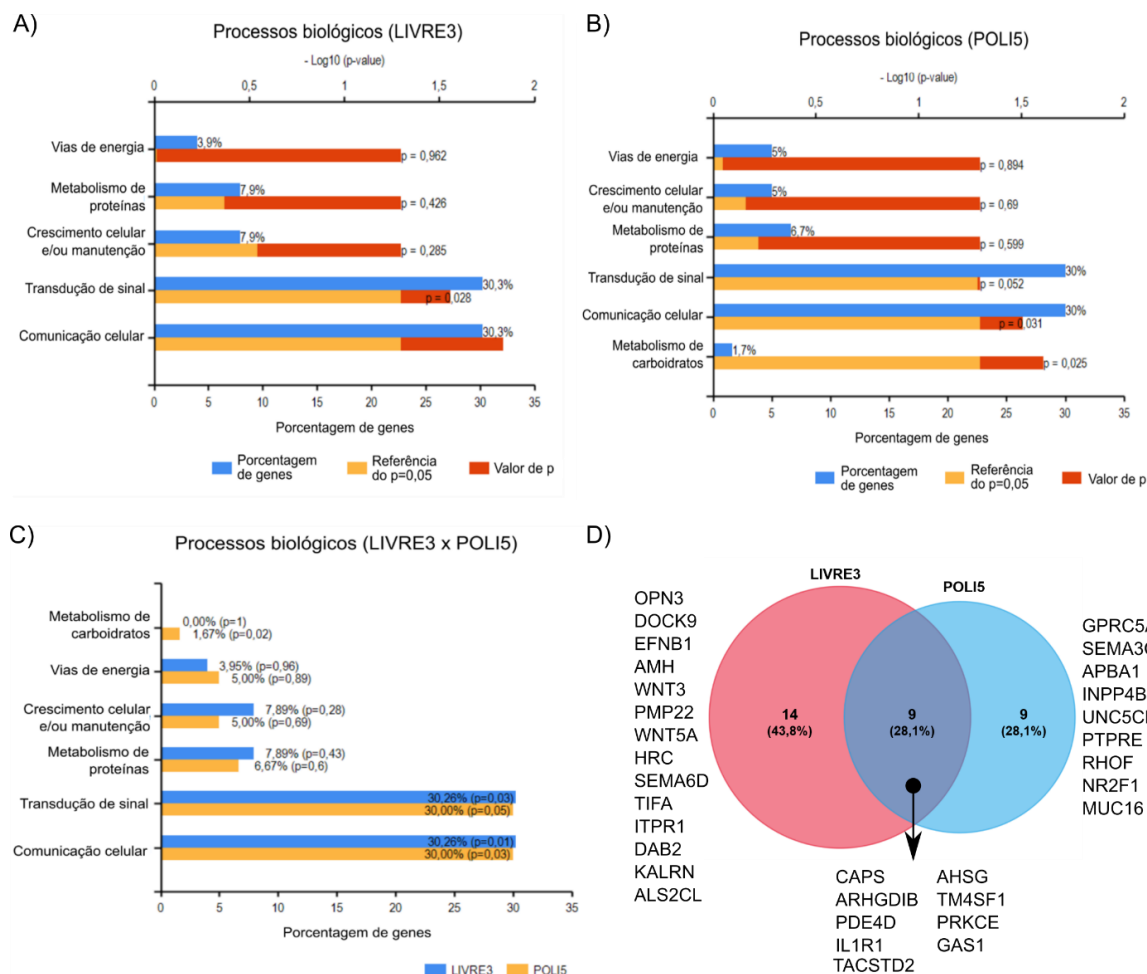


Figura 5.22 – Processos biológicos dos *clusters* LIVRE3 e POLI5. A) Classificação dos mRNAs de LIVRE3 em processos biológicos predominantes. B) Classificação dos mRNAs de POLI5 em processos biológicos predominantes. C) Comparação dos mRNAs de LIVRE3 e POLI5 em processos biológicos predominantes. D) mRNAs presentes apenas em uma ou em ambas as frações referentes à comunicação celular. Os mRNAs comuns foram excluídos da seleção de possíveis alvos para análise durante o silenciamento.

Quando são analisadas as funções moleculares de cada *cluster*, tanto LIVRE3 quanto POLI5 apresentam a atividade de fator de transcrição como uma das funções mais predominantes (Figura 5.23 A, B e C). Logo, foi a função molecular escolhida para ser comparada entre as duas frações (Figura 5.23 D). Dos 11 mRNAs de LIVRE3 e 9 genes de POLI5, 7 são comuns entres os *clusters*.

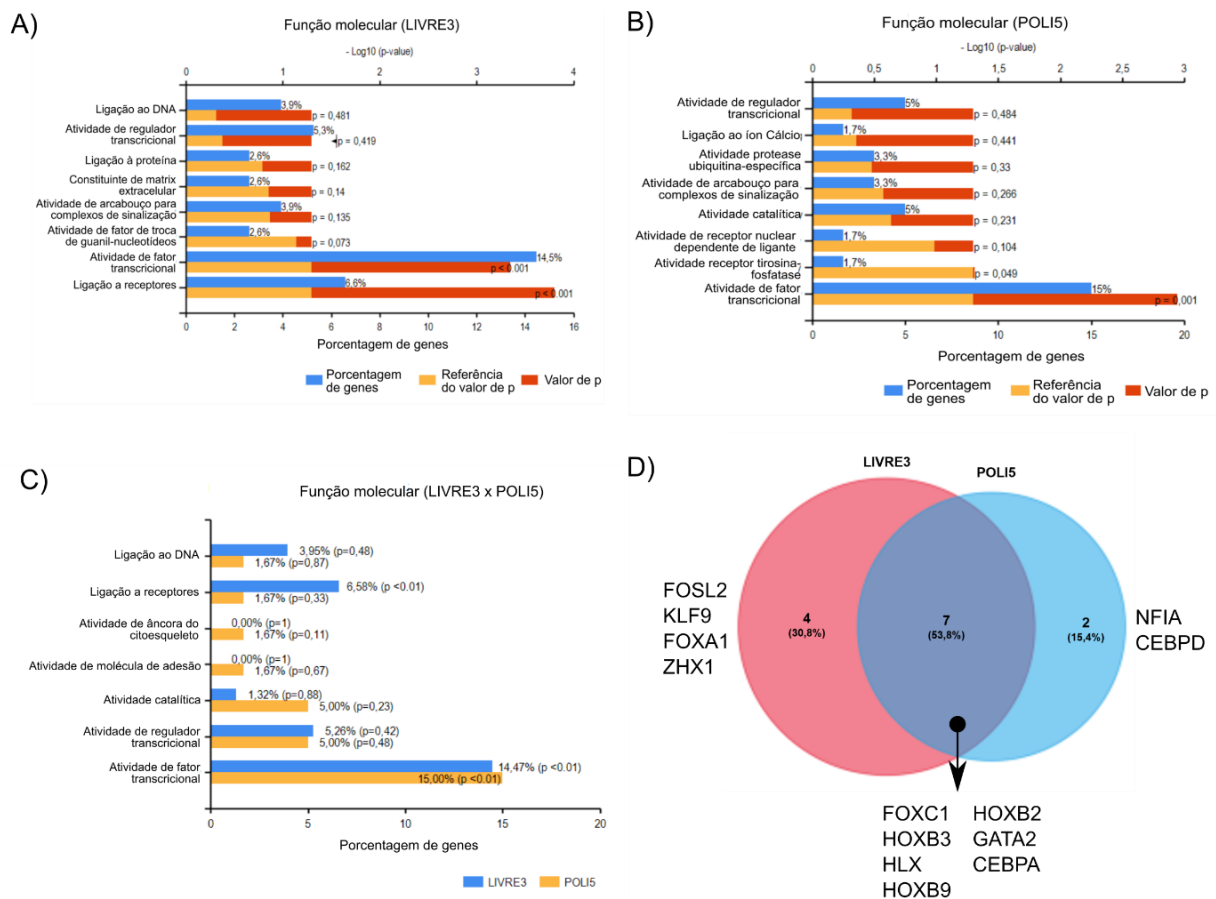


Figura 5.23 – Funções moleculares dos *clusters* LIVRE3 e POLI5. A) Classificação dos mRNAs de LIVRE3 em funções moleculares predominantes. B) Classificação dos mRNAs de POLI5 em funções moleculares predominantes. C) Comparação dos mRNAs de LIVRE3 e POLI5 em funções moleculares predominantes. D) mRNAs presentes apenas em uma ou em ambas as frações referentes à atividade de fator de transcrição. Os genes comuns foram excluídos da seleção de possíveis alvos para análise durante o silenciamento.

Finalmente, os alvos de PUMILIO envolvidos em processos do desenvolvimento (classificados pelo *Panther*) e envolvidos em comunicação celular ou com atividade de fator de transcrição (classificados pelo *FunRich*) foram comparados, a fim de determinar quais alvos de PUMILIO poderiam ter alguma participação no desenvolvimento, desempenhando papel de comunicação celular ou como fator de transcrição. Em LIVRE3, entre os 21 mRNAs envolvidos em processos do desenvolvimento e os 23 mRNAs envolvidos em comunicação celular, 5 aparecem como comuns para ambos os processos biológicos. Entre os 11 mRNAs com atividade de fator de transcrição, 7 também estão envolvidos em processos do desenvolvimento (Figura 5.24 A). Em POLI5, entre os 19 mRNAs envolvidos em processos do desenvolvimento e 18 envolvidos em comunicação celular, 4 estão envolvidos em ambos os processos. Entre os 9 mRNAs com atividade de fator de transcrição, 8 também estão envolvidos em processos de desenvolvimento (Figura 5.24 B). Ainda,

excluindo os mRNAs comuns entre as duas frações, e, baseado na literatura sobre genes envolvidos em cardiomiogênese, foram escolhidos 5 alvos de PUMILIO para serem analisados durante a diferenciação após o silenciamento. Em LIVRE3, foram escolhidos *WNT3*, *WNT5A* e *FOXA1* (2 de comunicação celular e um fator de transcrição). Em POLI5, foram escolhidos *INPP4B* e *NFIA* (1 de comunicação celular e 1 fator de transcrição).

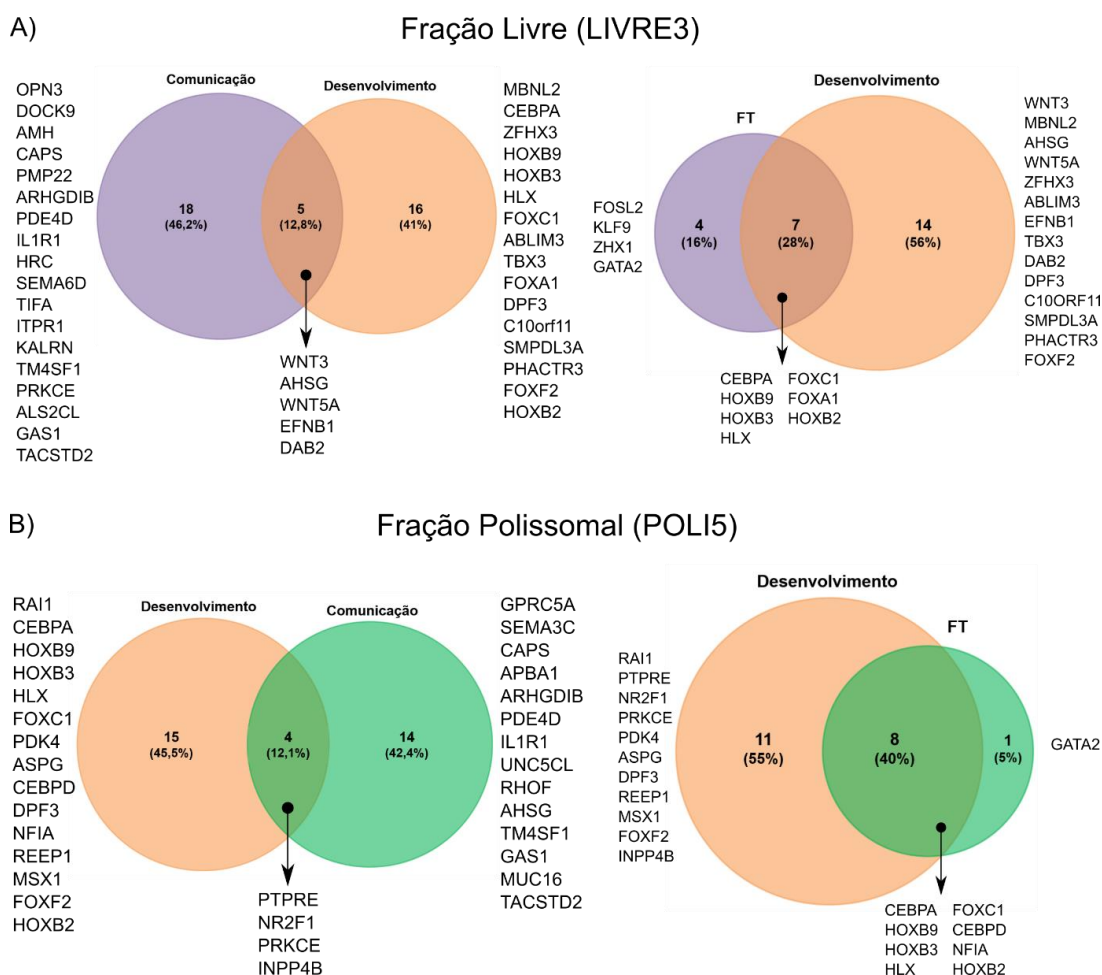


Figura 5.24 – Alvos de PUMILIO envolvidos em desenvolvimento e comunicação celular/fator transcrricional. A) Genes de LIVRE3, classificados como envolvidos em processos do desenvolvimento, cruzados com genes classificados em comunicação celular ou que genes que possuem atividade de fator de transcrição. B) Genes de POLI5, classificados como envolvidos em processos do desenvolvimento, cruzados com genes classificados em comunicação celular ou que genes que possuem atividade de fator de transcrição.

## 5.10 EXPRESSÃO DOS ALVOS DE PUMILIO AO LONGO DA DIFERENCIAÇÃO CARDIOMIOGÊNICA APÓS O SILENCIAMENTO

Após a escolha dos alvos de PUMILIO para serem analisados após o silenciamento, apenas *FOXA1* e *NFIA* foram analisados por qPCR. Os primers dos outros alvos (*WNT3*, *WNT5A* e *INPP4B*) não obtiveram eficiência dentro do padrão para serem utilizados para análise por qPCR.

A expressão de *FOXA1* sofre um aumento nas células silenciadas ao longo da diferenciação, porém este aumento não é significativo em relação ao controle (Figura 5.25 A). Ao voltar para os dados de RNA-seq, percebemos que *FOXA1* possui um pico de expressão no dia 4 da diferenciação na fração polissomal, seguida de uma queda no dia 9, que se mantém até o dia 15 (Figura 5.25 B). Isso sugere um possível papel durante a fase mesodermal da diferenciação cardiomiogênica.

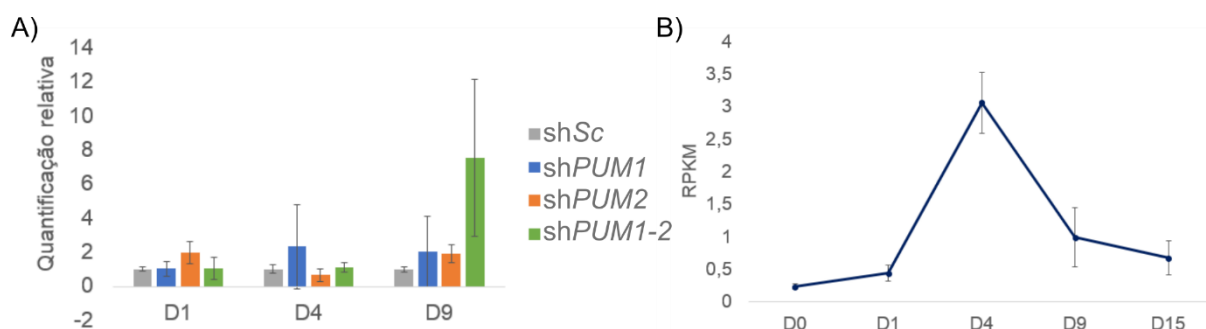


Figura 5.25 – Expressão de *FOXA1* ao longo da cardiomiogênese. A) Expressão de *FOXA1* ao longo da diferenciação cardiomiogênica, presente no RNA total. Gene normalizador: *GAPDH*. B) Expressão de *FOXA1* ao longo da diferenciação cardiomiogênica, na fração polissomal (RNA Seq – PEREIRA, I.T.).

A expressão de *NFIA* também foi analisada por qPCR, apresentando um aumento no dia 1 da cardiomiogênese em *shPUM1* e *shPUM2*. Esse aumento se repete no dia 4, sendo significativo em relação ao controle (*shSc*). No dia 9 da diferenciação, o aumento de sua expressão também acontece no duplo silenciamento (Figura 5.26 A). Nos dados de RNA-seq, percebemos uma pequena queda de sua expressão no dia 1, e um aumento gradual de *NFIA* na fração polissomal ao longo do restante da cardiomiogênese (Figura 5.26 B). Isso sugere que *NFIA* participa do processo de diferenciação cardiomiogênica até o final.

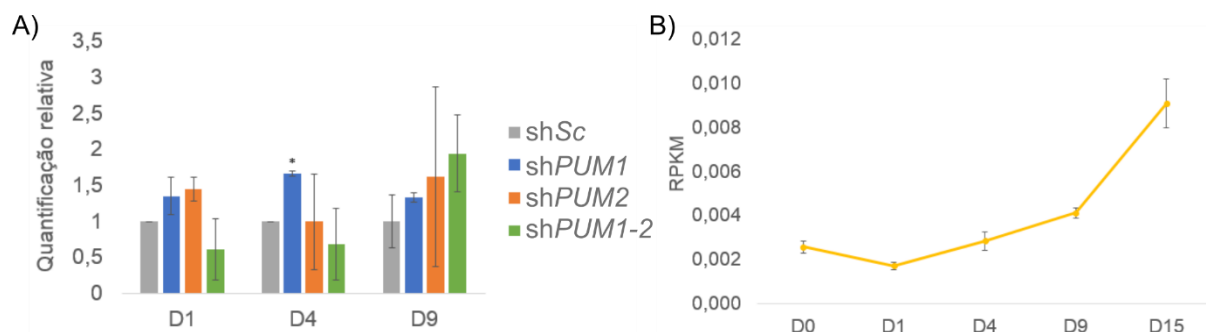


Figura 5.26 – Expressão de *NFIA* ao longo da cardiomiogênese. A) Expressão de *NFIA* ao longo da diferenciação cardiomiogênica, presente no RNA total. Gene normalizador: *GAPDH*. B) Expressão de *NFIA* ao longo da diferenciação cardiomiogênica, na fração polissomal (RNA Seq – PEREIRA, I.T.).

## 6 DISCUSSÃO

A análise da expressão de PUMILIO na linhagem h32.5/GFP e durante a diferenciação cardiomiogênica foi realizada com o objetivo de estabelecer a expressão de *PUMILIO* em condições normais (sem silenciamento) e qual era o seu perfil ao longo da diferenciação. Percebemos que *PUM1* e *PUM2* possuem um aumento gradual em nível de mRNA ao longo do processo de cardiomiogênese, pelo menos até o dia 9. Pouco é descrito na literatura sobre a regulação da expressão de *PUMILIO* durante processos de diferenciação. Em *Drosophila*, *Rbfox1* promove a desestabilização e silenciamento traducional do mRNA de *pumilio* para que a diferenciação de células germinativas ocorra (CARREIRA-ROSARIO et al., 2016). Isso pode indicar a importância de *PUMILIO* para a manutenção da pluripotência.

Não conseguimos dados do dia 15 para verificar se esse aumento se manteria ou reduziria em um cardiomiócito diferenciado. Isso se deve à dificuldade de extrair RNA total dos corpos embriões no dia 15. Nossas hipóteses foram: i) a matriz extracelular dos corpos dificulta a dissociação das células e a obtenção do RNA; ii) o número reduzido de células ao final da diferenciação, tanto por morte celular quanto pelas alíquotas para citometria de fluxo e extração de RNA e proteínas; iii) o método de extração de RNA. Para testar a primeira hipótese, adicionamos uma etapa de tripsinização de 20 minutos antes da lise celular, tal qual utilizada para citometria de fluxo do dia 15, porém também não obtivemos sucesso. Quanto ao número de células, nós vemos mesmo uma redução na quantificação de RNA ao longo do tempo, sendo nos dias 0 e 1 aqueles com uma quantificação de RNA maior, e o dia 9 com as menores quantidades. A extração de RNA neste projeto foi realizado pelo kit comercial RNeasy. Um trabalho prévio do grupo utilizou extração com o reagente TRIzol, obtendo uma quantificação de RNA satisfatória no dia 15. Optamos por não mudar a técnica de extração de RNA ao longo do ensaio, pois já foi descrito que estas duas diferentes técnicas de extração de RNA favorecem um ou outro grupo de RNAs (SULTAN et al., 2014). Sendo a diferenciação cardiomiogênica um ensaio custoso, tanto de tempo quanto financeiramente, optamos por prosseguir os ensaios sem a análise do dia 15. Sugerimos que ensaios futuros de extração de RNA da diferenciação cardiomiogênica utilizando corpos embriões de hESC sejam realizados com um aprimoramento da técnica usada neste estudo, ou por outra técnica de extração de RNA disponível.

Sendo *PUM1* e *PUM2* expressas tanto em hESC indiferenciadas quanto durante a cardiomiogênese, partimos para a padronização da técnica que seria

utilizada para o silenciamento de *PUMILIO*: o sistema lentiviral. A transdução de ESC com vetores lentivirais já foi descrita tanto em células humanas (ZAEHRES et al., 2005; KARABEKIAN et al., 2015), como em células murinas (LIU et al., 2013; CORTÉS et al., 2016). Karabekian e colaboradores silenciaram o gene B2M em uma linhagem de hESC (RUES2), utilizando o sistema lentiviral MISSION® e obtiveram uma eficiência de silenciamento de 90%. Nesse trabalho, os autores também induziram a diferenciação cardiomiogênica das células silenciadas, que apresentaram uma boa eficiência de diferenciação (KARABEKIAN et al., 2015). A titulação dos vetores lentivirais nos forneceu dados qualitativos sobre qual diluição deveria ser utilizada para o silenciamento de *PUMILIO*. Não foi possível calcular a quantidade de partículas virais produzidas devido a linhagem celular utilizada apresentar crescimento em colônias (aglomerados de células, onde o limite entre uma células e outra é indistinguível). O número de células inicial não poderia ser associado ao número de colônias resistentes final, impedindo que as fórmulas matemáticas fornecidas no protocolo do fabricante pudessem ser aplicadas. Além disso, as hESC foram mais sensíveis à puromicina, restando poucas colônias resistentes à droga, e mesmo estas não apresentavam um aspecto saudável. Moore e colaboradores (2010B) observaram fenômeno parecido em hESC da linhagem H9 transfectadas por eletroporação. Nesse estudo, os autores sugerem que a aplicação da puromicina para seleção de colônias resistentes seja realizada 96 horas após a transfecção/transdução, para que as células que foram transfectadas e que contêm o gene de resistência à puromicina possam formar colônias maiores e, assim, aumentem suas chances de sobrevivência (MOORE et al., 2010B). Outros trabalhos apresentam a seleção de colônias de ESC com drogas, como puromicina, neomicina e blasticidina em concentrações menores das drogas e por menos tempo (LIU et al., 2013; KARABEKIAN et al., 2015; CORTÉS et al., 2016). Um trabalho de transdução de hESC sem seleção com drogas das células transduzidas apresentou uma eficiência de transdução em torno de 50% para inserção do gene que expressa GFP (ZAEHRES et al., 2005), mostrando ser possível verificar algum efeito da transdução sem a necessidade de seleção com drogas.

Analisando o efeito do silenciamento de *PUMILIO* na pluripotência de hESC, observamos que o sh*PUM1* afetou os níveis de *PUM1* e *PUM2* e vice-versa. Como já observado nos alinhamentos dos shRNAs utilizados neste trabalho com os mRNAs de *PUM1* e *PUM2*, havia uma complementariedade parcial entre as sequências ortólogas de *PUMILIO*, mesmo que em um estudo prévio, os silenciamentos com estes shRNAs tenham sido considerados específicos e com boa eficiência (MILES;

TSCHÖP; HERR; JI, J.-Y.; et al., 2012). A interferência de RNA (RNAi) é uma ferramenta poderosa para o silenciamento pós-transcricional de genes. No entanto, a fita de siRNA pode parear em outros mRNAs via complementaridade de sequência parcial por um mecanismo que se assemelha muito com o silenciamento por microRNA (JACKSON et al., 2006). Embora os siRNA tenham sido inicialmente considerados altamente específicos, eles foram posteriormente vistos interagindo com outros RNAs mensageiros não previstos (JACKSON et al., 2003; BIRMINGHAM et al., 2006). Uma vez que o duplo silenciamento teve um efeito mais pronunciado nos níveis de mRNA de *PUM1* e *PUM2*, as análises dos seus efeitos continuaram. Após o silenciamento de *PUM1*, *PUM2* e ambas, os níveis dos genes considerados do core de pluripotência, *OCT4* e *NANOG*, reduzem significativamente. Isso indica que *PUMILIO* pode estar exercendo um papel de manutenção da pluripotência como descrito em outros organismos (revisado em WICKENS et al., 2002; e em SPASSOV, D.; JURECIC, 2003), uma vez que a ausência, mesmo que parcial, de *PUM1*, *PUM2* ou ambas leva à redução dos genes de pluripotência, e, imagina-se, do próprio estado de pluripotência. Já foi descrito que o silenciamento de *OCT4* e *NANOG* provoca a diferenciação de mESC e hESC (ZAEHRES et al., 2005). Leeb e colaboradores (2014) observaram que o silenciamento de *Pum1* em camundongo leva a uma demora na queda dos níveis de Nanog (LEEB et al., 2014). *Pum1* já foi descrita em camundongo como parte do interatoma de Nanog, embora como essa interação ocorre não tenha sido elucidada (GAGLIARDI et al., 2013).

Vendo o possível efeito de queda na pluripotência com o silenciamento de *PUMILIO*, demos início à análise dos efeitos do silenciamento durante um processo de diferenciação, no caso, cardiomiogênica. Ao analisar morfologicamente os corpos embrióides formados pelas células silenciadas e pelo controle, de forma qualitativa notamos algumas diferenças no tamanho e na quantidade dos corpos embrióides formados pelas células silenciadas para *PUM1*, *PUM2* e ambas. *Pum1* já foi descrita como uma facilitadora da saída para a diferenciação em mESC, ao degradar fatores de pluripotência, enquanto *Pum2* não possui o mesmo efeito (LEEB et al., 2014). O efeito observado no presente trabalho é que a ausência de *PUMILIO* parece levar a uma maior eficiência da diferenciação cardiomiogênica, ou seja, *PUMILIO* parece manter a pluripotência em hESC.

As diferenças também aparecem na citometria de fluxo, já no dia 3, onde as células silenciadas apresentam maior marcação para mesoderme (CD56+). Seguindo o processo, no dia 9, um maior número de corpos embrióides apresentam contração

em comparação com o controle, o que é refletido na citometria de fluxo, onde, novamente, as células silenciadas possuem uma maior expressão de GFP, marcador de progenitor cardíaco. Esse resultado se repete na marcação para Tropoinina T, marcador de cardiomiócito. Ao analisar os níveis de *PUMILIO* nos silenciamentos, notamos que este foi apenas inicial, não se mantendo até o final da diferenciação. Nossa hipótese principal é que a não seleção com puromicina, que não gerou uma linhagem exclusivamente silenciada para *PUM1*, *PUM2* ou ambas para o início da diferenciação, pode ter mascarado os níveis de mRNA de *PUMILIO*. Outra hipótese é que as células silenciadas podem sinalizar de alguma forma para que as células não silenciadas compensem a produção de *PUMILIO*, mascarando novamente os níveis de mRNA de *PUMILIO* das células silenciadas. Essa segunda hipótese está apenas no campo da especulação e precisaria de mais estudos para saber se essa comunicação celular realmente poderia resultar no efeito observado.

Outra questão observada experimentalmente neste e em trabalhos prévios do grupo, e que vale a pena ser levantada, é a variabilidade entre os ensaios de cardiomiogênese. Entre uma réplica e outra do ensaio, mesmo utilizando os mesmos materiais, protocolos, meio de cultivo, reagentes e células na mesma passagem, a variabilidade da eficiência de diferenciação permanece alta entre as replicatas. Isso reflete desde o primeiro ensaio de citometria de fluxo, no dia 3, até o último, no dia 15, e também nas concentrações de RNA extraídos ao longo do processo. Esse fenômeno fica evidente quando representamos os dados em um gráfico com os resultados das médias e desvios padrões das replicatas (como apresentado nas figuras 5.3 D e 5.14). Neste estudo, não foram encontradas razões para que tal fenômeno ocorra, permanecendo como variável da própria técnica.

Sabendo que *PUMILIO* é expressa por quase toda a diferenciação cardiomiogênica, para observar o efeito do seu silenciamento sobre alguns alvos, precisávamos escolher aqueles envolvidos na cardiomiogênese, e observar o seu comportamento durante o processo. Para isso, análises de bioinformática nos permitiram organizar em *clusters* o perfil de comportamento de 1789 alvos de *PUMILIO* descritos na literatura, e através de análises de GO, classificar estes alvos em processos e funções que podem estar envolvidos na cardiomiogênese. Assim, conseguimos reduzir de 1789 alvos para 5 alvos de *PUMILIO* envolvidos em processos do desenvolvimento que possuem papel na comunicação celular ou como fator de transcrição. Começando pela fração livre, sabemos que proteínas da via Wnt estão envolvidas na cardiomiogênese. Esta via precisa ser inicialmente desligada para



que as células se comprometam com a linhagem cardíaca (revisado em MUMMERY et al., 2012). Logo, a presença de proteína da família Wnt na fração livre é esperada, pois acredita-se que proteínas presentes nesta fração não estão sendo expressas ao longo do processo. *Wnt5a* já foi descrita como tendo um papel tanto de reprimir quanto de ativar a via Wnt canônica em camundongos (AMERONGEN et al., 2012), e importante para desenvolvimento de diferentes sistemas, como nervoso (ANDERSSON et al., 2013), esquelético (KELLER et al., 2015) e até mesmo cardíaco (COHEN et al., 2012; BISSON et al., 2015). *Wnt3* já foi associada com o desenvolvimento de trofoectoderme (KRIVEGA et al., 2015) e endoderme (JIANG et al., 2013). *FOXA1* é um fator de transcrição associado com o desenvolvimento principalmente da endoderme e possui expressão em tecidos derivados da ectoderme (revisado em BERNARDO; KERI, 2012). Sendo *WNT3*, *WNT5A* e *FOXA1* também alvos de PUMILIO, analisar o efeito do silenciamento de *PUMILIO* sobre estas proteínas poderia ser interessante. Na fração polissomal, encontramos *INPP4B*, uma proteína envolvida na comunicação celular, muito descrita em alguns tipos de câncer (BALAKRISHNAN; CHAILLET, 2013; KOFUJI et al., 2015; SHOWLER et al., 2017) e no desenvolvimento do sistema nervoso (JI et al., 2016). *NFIA* é um fator de transcrição descrito no desenvolvimento do cérebro e medula óssea e alguns tipos de câncer desses tecidos (revisado em CHEN et al., 2017). Nem *INPP4B* nem *NFIA* foram descritos ainda no desenvolvimento de mesoderme ou do sistema cardiovascular. Mesmo assim, foram escolhidos por seguirem os critérios de seleção de alvos de PUMILIO neste projeto, além de apresentarem um comportamento de aumento na fração polissomal durante a cardiomiogênese, sugerindo que, por estar aumentando a sua expressão, podem ter um papel no processo.

Quando analisamos a expressão do alvo *FOXA1*, vemos que embora sua expressão aumente nas células silenciadas, este aumento não chega a ser significativo em relação ao controle. Surpreendentemente, *FOXA1* apresenta um aumento na fração polissomal no dia 4 da diferenciação cardiomiogênica, fase onde as células estão diferenciadas em mesoderme. *FOXA1* foi descrito no desenvolvimento de endoderme e ectoderme, tendo participação em alguns tecidos de mesoderme, como o tecido renal (revisado em BERNARDO; KERI, 2012). Este fator de transcrição também não foi localizado em tecido cardíaco em camundongos (WERT et al., 2004). Isso justifica a queda na expressão na fração polissomal e o aumento da expressão na fração livre nos dias 9 e 15 da diferenciação. Outro alvo de PUMILIO, *NFIA*, apresenta um aumento de sua expressão ao longo da diferenciação

das células silenciadas, sendo este aumento significativo apenas no dia 4 no silenciamento de *PUM1*. Os dados de RNA-seq também mostram um aumento neste fator de transcrição na fração polissomal ao longo da cardiomiogênese. *NFIA* já foi descrito como regulador da via de sinalização Notch no desenvolvimento do sistema nervoso central (NAMIHIRA et al., 2009; PIPER et al., 2010). A via Notch é associada também com o desenvolvimento cardíaco, tendo descrita a interação com BMP2, outro alvo de PUMILIO (Anexo V) (revisado em ZHOU; LIU, 2014). Além disso, foi demonstrado *in vivo* que a via Notch pode ser ativada com a adição de Activina A para induzir a formação de mesoderme (ABE et al., 2004). O aumento da expressão de *NFIA* ao longo da diferenciação pode indicar uma possível rede de regulação de PUMILIO da via Notch no desenvolvimento de mesoderme e cardíaco.

Com os dados obtidos, nós observamos que o silenciamento de *PUMILIO* possui um efeito na saída da pluripotência e na eficiência da diferenciação cardiomiogênica de hESC. Esses efeitos aumentam levemente quando *PUM1* e *PUM2* são silenciadas conjuntamente. Uma vez que o silenciamento não se manteve até o final do processo de cardiomiogênese, sugerimos que o efeito de PUMILIO esteja agindo no início da diferenciação, mais especificamente na manutenção da pluripotência de hESC. Na ausência destas proteínas, a célula se compromete com a diferenciação e esse efeito se estende até a diferenciação completa. Este trabalho corrobora com outros estudos que descrevem proteínas da família Puf como envolvidas na manutenção do estado indiferenciado de células germinativas e células-tronco de diferentes organismos (revisado em KIANI et al., 2017), mostrando que em humanos, as proteínas PUMILIO conservam o seu papel ancestral.

## 7 CONCLUSÕES

- 1) *PUM1* e *PUM2* são expressas constitutivamente em hESC e durante o processo de diferenciação cardiomiogênica;
- 2) O silenciamento de *PUMILIO* em hESC mostrou uma redução nos níveis dos mRNAs de *OCT4* e *NANOG*, relacionados à pluripotência;
- 3) O silenciamento de *PUMILIO* durante a cardiomiogênese aumentou a eficiência da diferenciação, mesmo que o silenciamento não tenha se mantido até o fim do processo;
- 4) O perfil de expressão de alguns alvos de *PUMILIO* são variáveis ao longo da diferenciação cardiomiogênica e podem exercer papel no processo;
- 5) A expressão de alvos de *PUMILIO* ao longo da cardiomiogênese pode indicar a participação da regulação de *PUMILIO* em vias associadas com a pluripotência e cardiomiogênese, como a via Notch.

## REFERÊNCIAS

- ABBASI, N.; PARK, Y.-I.; CHOI, S.-B. Pumilio Puf domain RNA-binding proteins in Arabidopsis. **Plant Signaling & Behavior**, v. 6, n. 3, p. 364–368, 2011.
- ABE, T. et al. Activin-like signaling activates Notch signaling during mesodermal induction. **Int J Dev Biol**, v. 332, p. 327–332, 2004.
- ALBERTS, B. et al. **Biologia Molecular da Célula**. 5th ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.
- AMERONGEN, V.; FUERER, C.; MIZUTANI, M.; NUSSE, R. Wnt5a can both activate and repress Wnt / b -catenin signaling during mouse embryonic development. **Developmental Biology**, v. 369, p. 101–114, 2012.
- ANDERSSON, E. R. et al. Wnt5a cooperates with canonical Wnts to generate midbrain dopaminergic neurons in vivo and in stem cells. **Pnas**, v. 110, n. 7, p. E-602-E610, 2013.
- ASAOKA-TAGUCHI, M.; YAMADA, M.; NAKAMURA, A.; HANYU, K.; KOBAYASHI, S. Maternal Pumilio Acts Together with Nanos in Maternal Pumilio acts together with Nanos in germline development in Drosophila embryos. **Nat Cell Biol**, v. 1, p. 431–437, 1999.
- ATLASI, Y.; MOWLA, S. J.; ZIAEE, S. A. M.; GOKHALE, P. J.; ANDREWS, P. W. OCT4 Spliced Variants Are Differentially Expressed in Human Pluripotent and Nonpluripotent Cells. **Stem Cells**, v. 26, p. 3068–3074, 2008.
- BALAKRISHNAN, A.; CHAILLET, J. R. Role of the inositol polyphosphate-4-phosphatase type II Inpp4b in the generation of ovarian teratomas Ashwini. **Developmental Biology**, v. 373, n. 1, p. 118–129, 2013.
- BAUWENS, L. et al. Generation of Human Embryonic Stem Cell-Derived Mesoderm and Cardiac Cells Using Size-Specified Aggregates in an Oxygen-Controlled Bioreactor. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 102, n. 2, p. 493–507, 2009.
- BERGE, D. T. et al. Embryonic stem cells require Wnt proteins to prevent differentiation to epiblast stem cells. **Nat Cell Biol**, v. 13, n. 9, p. 1070–1075, 2014.
- BERNARDO, G. M.; KERI, R. A. FOXA1 : a transcription factor with parallel functions in development and cancer. **Biosci. Rep.**, v. 32, p. 113–130, 2012.
- BERNSTEIN, D.; HOOK, B.; HAJARNAVIS, A.; OPPERMAN, L.; WICKENS, M.

Binding specificity and mRNA targets of a *C. elegans* PUF protein, FBF-1, v. 1, p. 447–458, 2005.

BIRMINGHAM, A. et al. 3' UTR seed matches, but not overall identity, are associated with RNAi off-targets. **Nature Methods**, v. 3, p. 199–204, 2006.

BISSON, J. A.; MILLS, B.; HELT, J. P.; ZWAKA, T. P.; DAVID, E. Wnt5a and Wnt11 inhibit the canonical Wnt pathway and promote cardiac progenitor development via the Caspase-dependent degradation of AKT. **Developmental Biology**, v. 398, n. 1, p. 80–96, 2015.

BLACKINTON, J. G.; KEENE, J. D. Post-transcriptional RNA regulons affecting cell cycle and proliferation. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v. 34, p. 44–54, 2014.

BLIN, G. et al. A purified population of multipotent cardiovascular progenitors derived from primate pluripotent stem cells engrafts in postmyocardial infarcted nonhuman primates. **Journal of Clinical Investigation**, v. 120, n. 4, p. 1125–1139, 2010.

BOWARD, B.; WU, T.; DALTON, S. Control of Cell Fate Through Cell Cycle and Pluripotency Networks. **Stem Cells**, v. 34, p. 1427–1436, 2016.

BRADLEY, A. Embryonic Stem Cells: proliferation and differentiation. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 2, p. 1013–1017, 1990.

BURRIDGE, P. W. et al. Improved Human Embryonic Stem Cell Embryoid Body Homogeneity and Cardiomyocyte Differentiation from a Novel V-96 Plate Aggregation System Highlights Interline Variability. **Stem Cells**, v. 25, n. 4, p. 929–938, 2007.

CAI, L.; YE, Z.; ZHOU, B. Y.; ZHOU, C.; CHENG, L. Promoting human embryonic stem cell renewal or differentiation by modulating Wnt signal and culture conditions. **Cell Research**, v. 17, p. 62–72, 2007.

CAO, Q.; PADMANABHAN, K.; RICHTER, J. D. Pumilio 2 controls translation by competing with eIF4E for 7-methyl guanosine cap recognition. **RNA**, v. 16, n. 1, p. 221–227, 2010.

CARPENTER, M. K.; ROSLER, E.; RAO, M. S. Characterization and Differentiation of Human Embryonic Stem Cells. **Cloning and Stem Cells**, v. 5, n. 1, p. 79–88, 2003.

CARREIRA-ROSARIO, A.; BHARGAVA, V.; HILLEBRAND, J.; et al. Repression of

Pumilio Protein Expression by Rbfox1 Promotes Germ Cell Differentiation.

**Developmental Cell**, v. 36, n. 5, p. 562–571, 2016.

CATELAIN, C. et al. The Notch Delta-4 ligand helps to maintain the quiescence and the short-term reconstitutive potential of haematopoietic progenitor cells through activation of a key gene network. **Stem Cell Research**, v. 13, n. 3, p. 431–441, 2014.

CHAZAUD, C.; YAMANAKA, Y.; PAWSON, T.; ROSSANT, J. Early Lineage Segregation between Epiblast and Primitive Endoderm in Mouse Blastocysts through the Grb2-MAPK Pathway. **Developmental Cell**, v. 10, p. 615–624, 2006.

CHEN, K.; LIM, J. W. C.; RICHARDS, L. J.; BUNT, J. The convergent roles of the nuclear factor I transcription factors in development and cancer. **Cancer Letters**, v. 410, p. 124–138, 2017.

CHO, P. F. et al. Report Cap-Dependent Translational Inhibition Establishes Two Opposing Morphogen Gradients in Drosophila Embryos. **Curr Opin Genet Dev**, v. 16, p. 2035–2041, 2006.

COHEN, E. D.; MILLER, M. F.; WANG, Z.; MOON, R. T.; MORRISEY, E. E. Wnt5a and Wnt11 are essential for second heart field progenitor development. **Development**, v. 139, p. 1931–1940, 2012.

CORTÉS, D.; ROBLEDO-ARRATIA, Y.; HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, R.; et al. Transgenic GDNF Positively Influences Proliferation , Differentiation , Maturation and Survival of Motor Neurons Produced from Mouse Embryonic Stem Cells. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 10, n. September, p. 217, 2016.

CRITTENDEN, S. L. et al. A conserved RNA-binding protein controls germline stem cells in *Caenorhabditis elegans*. **Nature**, v. 417, p. 4–7, 2002.

D'AMOUR, K. A. et al. Production of pancreatic hormone–expressing endocrine cells from human embryonic stem cells. **Nature Biotechnology**, v. 24, n. 11, p. 1392–1401, 2006.

DAVIDSON, K. C. et al. Wnt/ $\beta$ -catenin signaling promotes differentiation, not self-renewal , of human embryonic stem cells and is repressed by Oct4. **Pnas**, v. 109, n. 12, p. 4485–4490, 2012.

DAVIS, H. E.; MORGAN, J. R.; YARMUSH, M. L. Polybrene increases retrovirus gene transfer efficiency by enhancing receptor-independent virus adsorption on target cell membranes. **Biophysical Chemistry**, v. 97, p. 159–172, 2002.

- DENG, Y.; SINGER, R. H.; GU, W. Translation of ASH1 mRNA is repressed by Puf6p – Fun12p / eIF5B interaction and released by CK2 phosphorylation. **Genes & Development**, v. 22, p. 1037–1050, 2008.
- DERTI, A.; et al. A quantitative atlas of polyadenylation in five mammals. **Genome Research**, v. 22, p. 1173–1183, 2012.
- DRAVID, G. et al. Defining the Role of Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling in the Survival, Proliferation, and Self-Renewal of Human Embryonic Stem Cells. **Stem Cells**, v. 23, p. 1489–1501, 2005.
- DUBNAU, J. et al. The staufen/pumilio pathway is involved in drosophila long-term memory. **Current Biology**, v. 13, n. 4, p. 286–296, 2003.
- DUBOIS, N. C. et al. SIRPA is a specific cell-surface marker for isolating cardiomyocytes derived from human pluripotent stem cells. **Nature Biotechnology**, v. 49, n. 11, p. 1011–1018, 2011.
- DUNWOODIE, S. L. Combinatorial signaling in the heart orchestrates cardiac induction , lineage specification and chamber formation. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 18, p. 54–66, 2007.
- ECKMANN, C. R.; KRAEMER, B.; WICKENS, M.; KIMBLE, J. GLD-3 , a Bicaudal-C Homolog that Inhibits FBF to Control Germline Sex Determination in *C. elegans*. **Developmental Cell**, v. 3, p. 697–710, 2002.
- EDWARDS, T. A. Bespoke RNA recognition by Pumilios. **Biochemical Society Transactions**, v. 43, n. 5, p. 801–806, 2015.
- EDWARDS, T. A.; PYLE, S. E.; WHARTON, R. P.; AGGARWAL, A. K. Structure of pumilio reveals similarity between RNA and peptide binding motifs. **Cell**, v. 105, n. 2, p. 281–289, 2001.
- EDWARDS, T. A.; WILKINSON, B. D.; WHARTON, R. P.; AGGARWAL, A. K. Model of the Brain Tumor – Pumilio translation repressor complex. **Genes & Development**, v. 17f, p. 2508–2513, 2003.
- ELIYAHU, E.; et al. Tom20 Mediates Localization of mRNAs to Mitochondria in a Translation-Dependent Manner. **Molecular and Cellular Biology**, v. 30, n. 1, p. 284–294, 2010.
- ELLIOTT, D. A. et al. NKX2-5eGFP/w hESCs for isolation of human cardiac progenitors and cardiomyocytes. **Nature Methods**, v. 8, n. 12, p. 1037–1043, 2011.

- ETTEN, J. V. et al. Human pumilio proteins recruit multiple deadenylases to efficiently repress messenger RNAs. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 43, p. 36370–36383, 2012.
- EVSEENKO, D. et al. Mapping the first stages of mesoderm commitment during differentiation of human embryonic stem cells. **Pnas**, v. 3, n. 31, p. 13742–13747, 2010.
- FIORE, R. et al. Mef2-mediated transcription of the miR379–410 cluster regulates activity-dependent dendritogenesis by fine-tuning Pumilio2 protein levels. **The EMBO Journal**, v. 28, n. 6, p. 697–710, 2009.
- FIRE, A. et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. **Nature**, v. 391, p. 806–811, 1998.
- FOX, M.; URANO, J.; PERA, R. A. R. Identification and characterization of RNA sequences to which human PUMILIO-2 ( PUM2 ) and deleted in Azoospermia-like ( DAZL ) bind. **Genomics**, v. 85, p. 92–105, 2005.
- FUCHS, E.; SEGRE, J. A. Stem cells: a new lease on life. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 143–155, 2000.
- GAGLIARDI, A. et al. A direct physical interaction between Nanog and Sox2 regulates embryonic stem cell self-renewal. **The EMBO Journal**, v. 32, n. 16, p. 2231–2247, 2013.
- GALGANO, A. et al. Comparative analysis of mRNA targets for human PUF-family proteins suggests extensive interaction with the miRNA regulatory system. **PLoS ONE**, v. 3, n. 9, 2008.
- GAMBERI, C.; PETERSON, D. S.; HE, L.; GOTTLIEB, E. An anterior function for the *Drosophila* posterior determinant Pumilio. **Development (Cambridge, England)**, v. 129, p. 2699–2710, 2002.
- GARCÍA-RODRÍGUEZ, L. J.; GAY, A. C.; PON, L. A. Puf3p, a Pumilio family RNA binding protein, localizes to mitochondria and regulates mitochondrial biogenesis and motility in budding yeast. **Journal of Cellular Biology**, v. 176, n. 2, p. 197–207, 2007.
- GERSTBERGER, S. et al. Evolutionary Conservation and Expression of Human RNA-Binding Proteins and Their Role in Human Genetic Disease. **Advances in experimental medicine and biology**. v. 825, p.53, 2014.



GERSTBERGER, S.; HAFNER, M.; TUSCHL, T. A census of human RNA-binding proteins. **Nature Reviews Genetics**, v. 15, n. 12, p. 829–845, 2014.

GLISOVIC, T.; BACHORIK, J. L.; YONG, J.; DREYFUSS, G. RNA-binding proteins and post-transcriptional gene regulation. **FEBS Letters**, v. 582, n. 14, p. 1977–1986, 2008.

GOLDSTROHM, A. C.; SEAY, D. J.; HOOK, B. A.; WICKENS, M. PUF protein-mediated deadenylation is catalyzed by Ccr4p. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 1, p. 109–114, 2007.

GREBER, B.; LEHRACH, H.; ADJAYE, J. Fibroblast Growth Factor 2 Modulates Transforming Growth Factor Signaling in Mouse Embryonic Fibroblasts and Human ESCs ( hESCs ) to Support hESC Self-Renewal. **Stem Cells**, v. 25, p. 455–464, 2007.

HAIMES, J.; KELLEY, M. **Demonstration of a  $\Delta\Delta Cq$  Calculation Method to Compute Relative Gene Expression from qPCR Data**. 2014.

HAMMOND, S. M. Dicing and slicing: The core machinery of the RNA interference pathway. **FEBS Letters**, v. 579, n. 26, p. 5822–5829, 2005.

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

HE, J.-Q.; MA, Y.; LEE, Y.; THOMSON, J. A.; KAMP, T. J. Human Embryonic Stem Cells Develop Into Multiple Types of Cardiac Myocytes: Action Potential Characterization. **Circulation Research**, v. 93, n. 1, p. 32–39, 2003.

HEO, I. et al. Mono-Uridylation of Pre-MicroRNA as a Key Step in the Biogenesis of Group II let-7 MicroRNAs. **Cell**, v. 151, n. 3, p. 521–532, 2012.

HEO, I. et al. Short Article Lin28 Mediates the Terminal Uridylation of let-7 Precursor MicroRNA. **Molecular Cell**, v. 32, n. 2, p. 276–284, 2008.

HUTVAGNER, G. Small RNA asymmetry in RNAi: Function in RISC assembly and gene regulation. **FEBS Letters**, v. 579, n. 26, p. 5850–5857, 2005.

ILIC, D.; OGILVIE, C. Human Embryonic Stem Cells — What Have We Done ? What Are We Doing ? Where Are We Going ? **Stem Cells**, v. 35, p. 17–25, 2017.

ITSKOVITZ-ELDOR, J. et al. Differentiation of human embryonic stem cells into embryoid bodies compromising the three embryonic germ layers. **Molecular**

**medicine (Cambridge, Mass.)**, v. 6, n. 2, p. 88–95, 2000.

JACKSON, A. L. et al. Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi. **Nature Biotechnology**, v. 21, p. 635–637, 2003.

JACKSON, A. L. et al. Widespread siRNA “off-target” transcript silencing mediated by seed region sequence complementarity. **Rna**, v. 12, p. 1179–1187, 2006.

JARUZELSKA, J. et al. Conservation of a Pumilio-Nanos complex from *Drosophila* germ plasm to human germ cells. **Development genes and evolution**, v. 213, n. 3, p. 120–126, 2003.

JI, L.; KIM, N.; HUH, S.; RHEE, H. J. Depletion of Inositol Polyphosphate 4-Phosphatase II Suppresses Callosal Axon Formation in the Developing Mice. **Molecular Cell**, v. 39, n. 6, p. 501–507, 2016.

JI, Z.; LEE, J. Y.; PAN, Z.; JIANG, B.; TIAN, B. Progressive lengthening of 3' untranslated regions of mRNAs by alternative polyadenylation. **Pnas**, v. 106, n. 17, p. 7028–7033, 2009.

JI, Z.; TIAN, B. Reprogramming of 3' Untranslated Regions of mRNAs by Alternative Polyadenylation in Generation of Pluripotent Stem Cells from Different Cell Types. **PLoS ONE**, v. 4, n. 12, p. e8419, 2009.

JIANG, W.; ZHANG, D.; BURSAC, N.; ZHANG, Y. WNT3 Is a Biomarker Capable of Predicting the Definitive Endoderm Differentiation Potential of hESCs. **Stem Cell Reports**, v. 1, n. 1, p. 46–52, 2013.

JOHNSTON, D. S.; BEUCHLE, D.; NISSLEIN-VOLHARD, C. Staufén, a Gene Required to Localize Maternal RNAs in the *Drosophila* Egg. **Cell**, v. 66, p. 51–63, 1991.

JOSSEN, V.; BOS, C. VAN DEN; EIBL, R.; EIBL, D. Manufacturing human mesenchymal stem cells at clinical scale : process and regulatory challenges. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2018.

KADYROVA, L. Y.; HABARA, Y.; LEE, T. H.; WHARTON, R. P. Translational control of maternal Cyclin B mRNA by Nanos in the *Drosophila* germline. **Development**, v. 134, p. 1519–1527, 2007.

KANUNGO, T.; MOUNT, D. M.; NETANYAHU, N. S.; et al. An Efficient k -Means Clustering Algorithm : Analysis and Implementation. **IEEE TRANSACTIONS ON PATTERN ANALYSIS AND MACHINE INTELLIGENCE**, v. 24, n. 7, p. 881–892,

2002.

KARABEKIAN, Z. et al. HLA Class I Depleted hESC as a Source of Hypoimmunogenic Cells for Tissue. **Tissue Engineering**, v. 21, p. 2559–2571, 2015.

KATTMAN, S. J.; HUBER, T. L.; KELLER, G. M. M. Multipotent Flk-1+ Cardiovascular Progenitor Cells Give Rise to the Cardiomyocyte, Endothelial, and Vascular Smooth Muscle Lineages. **Developmental Cell**, v. 11, n. 5, p. 723–732, 2006.

KATTMAN, S. J. et al. Stage-specific optimization of activin/nodal and BMP signaling promotes cardiac differentiation of mouse and human pluripotent stem cell lines. **Cell Stem Cell**, v. 8, n. 2, p. 228–240, 2011.

KEDDE, M.; KOUWENHOVE, M. VAN; ZWART, W.; et al. A Pumilio-induced RNA structure switch in p27-3' UTR controls miR-221 and miR-222 accessibility. **Nature Cell Biology**, v. 12, n. 10, p. 1014–1020, 2010.

KEENE, J. D. Ribonucleoprotein infrastructure regulating the flow of genetic information between the genome and the proteome. **Pnas**, v. 98, n. 13, 2001.

KEHAT, I.; KENYAGIN-KARSENTI, D. Human embryonic stem cells can differentiate into myocytes with structural and functional properties of cardiomyocytes. **Journal of Clinical Investigation**, v. 108, n. 3, p. 407–414, 2001.

KELLER, K. C. et al. Wnt5a supports osteogenic lineage decisions in embryonic stem cells. **Stem Cells and Development**, , n. 313453, p. 1–45, 2015.

KIANI, S. J.; TAHERI, T.; RAFATI, S.; SAMIMI-RAD, K. PUF Proteins : Cellular Functions and Potential Applications. **Current Protein and Peptide Science**, v. 18, p. 250–261, 2017.

KIM, H. et al. Modulation of  $\beta$ -catenin function maintains mouse epiblast stem cell and human embryonic stem cell self-renewal. **Nat Commun**, v. 4, n. 61, p. 2403, 2013.

KIM, J. H.; RICHTER, J. D. Opposing Polymerase-Deadenylase Activities Regulate Cytoplasmic Polyadenylation. **Molecular Cell**, v. 174, p. 173–183, 2006.

KIM, J. Y.; LEE, Y. C.; KIM, C. Direct Inhibition of Pumilio Activity by Bam and Bgcn in Drosophila Germ Line Stem Cell Differentiation. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 7, p. 4741–4746, 2010.

KING, C. C.; BEATTIE, G. M.; LOPEZ, A. D.; HAYEK, A. Generation of definitive endoderm from human embryonic stem cells cultured in feeder layer-free conditions. **Future Medicine**, v. 3, p. 175–180, 2008.

KOBAYASHI, H.; TOMARI, Y. RISC assembly : Coordination between small RNAs and Argonaute proteins. **Biochimica et Biophysica Acta journal**, v. 1859, n. 1, p. 71–81, 2016.

KOFUJI, S. et al. INPP4B Is a PtdIns (3, 4, 5)P3 Phosphatase That Can Act as a Tumor Suppressor. **Cancer Discovery**, v. 5, n. 7, p. 730–739, 2015.

KRAEMER, B.; CRITTENDEN, S.; GALLEGOS, M.; et al. NANOS-3 and FBF proteins physically interact to control the sperm – oocyte switch in *Caenorhabditis elegans*. **Current Biology**, v. 9, n. 18, p. 1009–1018, 1999.

KRICHEVSKY, A. M.; KOSIK, K. S. Neuronal RNA Granules : A Link between RNA Localization and Stimulation-Dependent Translation. **Neuron**, v. 32, p. 683–696, 2001.

KRIVEGA, M.; ESSAHIB, W.; VELDE, H. V.. WNT3 and membrane-associated B-catenin regulate trophectoderm lineage differentiation in human blastocysts. **Mol. Hum. Reprod. Advance Access**, v. 21, n. 9, p. 711–722, 2015.

KROON, E. et al. Pancreatic endoderm derived from human embryonic stem cells generates glucose-responsive insulin-secreting cells in vivo. **Nature Biotechnology**, v. 26, n. 4, p. 443–452, 2008.

LAFHAMME, M. A. et al. Cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells in pro-survival factors enhance function of infarcted rat hearts. **Nature Biotechnology**, v. 25, n. 9, p. 1015–1024, 2007.

LANTZ, V. et al. The *Drosophila orb* RNA-binding protein is required for the formation of the egg chamber and establishment of polarity. **Genes & Development**, v. 8, p. 598–613, 1994.

LASKO, P. The *Drosophila melanogaster* Genome : Translation Factors and RNA. **The Journal of Cell Biology**, v. 150, n. 2, p. 51–56, 2000.

LEE, D. et al. PUF3 Acceleration of Deadenylation in Vivo Can Operate Independently of CCR4 Activity , Possibly Involving Effects on the PAB1 – mRNP Structure. **Journal of Molecular Biology**, v. 399, n. 4, p. 562–575, 2010.

LEE, G. et al. Isolation and directed differentiation of neural crest stem cells derived

from human embryonic stem cells. **Nature Biotechnology**, v. 25, n. 12, p. 2007, 2007.

LEE, M. H. et al. Conserved regulation of MAP kinase expression by PUF RNA-binding proteins. **PLoS Genetics**, v. 3, n. 12, p. 2540–2550, 2007.

LEE, M. H.; SCHEDL, T. RNA-binding proteins. **WormBook**. p.1–13, 2006.

LEE, R. C.; FEINBAUM, R. L.; AMBROS, V. The *C. elegans* Heterochronic Gene *lin-4* Encodes Small RNAs with Antisense Complementarity to *lin-14*. **Cell**, v. 75, p. 843–854, 1993.

LEE, S. et al. Noncoding RNA NORAD Regulates Genomic Stability by Sequestering PUMILIO Proteins. **Cell**, v. 164, n. 1–2, p. 69–80, 2016.

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

LEEB, M. et al. Genetic exploration of the exit from self-renewal using haploid embryonic stem cells. **Cell Stem Cell**, v. 14, n. 3, p. 385–393, 2014.

LI, P.; YANG, X.; WASSER, M.; CAI, Y.; CHIA, W. Inscuteable and Staufen Mediate Asymmetric Localization and Segregation of prospero RNA during *Drosophila* Neuroblast Cell Divisions. **Cell**, v. 90, p. 437–447, 1997.

LIEGRO, C. M. DI; SCHIERA, G.; LIEGRO, I. DI. Regulation of mRNA transport, localization and translation in the nervous system of mammals. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 33, p. 747–762, 2014.

LIU, T.; ZHANG, S.; XIANG, D.; WANG, Y. Induction of Hepatocyte-Like Cells From Mouse Embryonic Stem Cells by Lentivirus-Mediated Constitutive Expression of *Foxa2/Hnf4a*. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 114, p. 2531–2541, 2013.

LODISH, H. et al. **Molecular Cell Biology**. 7th ed. New York: W. H. Freeman and Company, 2014.

LUETJENS, C. M. et al. Association of Meiotic Arrest with Lack of BOULE Protein Expression in Infertile Men. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 89, n. 4, p. 1926–1933, 2004.

LUTOLF, M. P.; GILBERT, P. M.; BLAU, H. M. Designing materials to direct stem-cell fate. **Nature**, v. 462, p. 433–441, 2009.

MARTIN, G. R. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured

in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 78, n. 12, p. 7634–7638, 1981.

MCLEAN, A. B. et al. Activin A Efficiently Specifies Definitive Endoderm from Human Embryonic Stem Cells Only When Phosphatidylinositol 3-Kinase. **Stem Cells**, v. 25, p. 29–38, 2007.

MI, H.; MURUGANUJAN, A.; CASAGRANDE, J. T.; THOMAS, P. D. Large-scale gene function analysis with the PANTHER classification system. **Nature Protocols**, v. 8, n. 8, p. 1551–1566, 2013.

MICKLEM, D. R.; ADAMS, J. Distinct roles of two conserved Stauf domains in oskar mRNA localization and translation. **The EMBO Journal**, v. 19, n. 6, p. 1366–1377, 2000.

MILES, W. O.; TSCHÖP, K.; HERR, A.; JI, J.-Y.; DYSON, N. J. Pumilio facilitates miRNA regulation of the E2F3 oncogene. **Genes & Development**, v. 26, p. 356–368, 2012.

MILES, W. O.; TSCHÖP, K.; HERR, A.; JI, J. Y.; DYSON, N. J. Pumilio facilitates miRNA regulation of the E2F3 oncogene. **Genes and Development**, v. 26, n. 4, p. 356–368, 2012.

MILLER, M. A.; OLIVAS, W. M. Roles of Puf proteins in mRNA degradation and translation. **Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA**, v. 2, n. 4, p. 471–492, 2011.

MITRA, J.; SCHULTZ, R. M. Regulation of the acquisition of meiotic competence in the mouse : changes in the subcellular localization of cdc2 , cyclin B1 , cdc25C and wee1 , and in the concentration of these proteins and their transcripts. **Journal of cell science**, v. 2415, p. 2407–2415, 1996.

MOORE, C. B. et al. Short Hairpin RNA (shRNA): Design, Delivery and Assessment of Gene Knockdown. **Methods in Molecular Biology**, v. 629, n. 2, p. 141–158, 2010.

MOORE, F. L. et al. Human Pumilio-2 is expressed in embryonic stem cells and germ cells and interacts with DAZ (Deleted in AZoospermia) and DAZ-like proteins.

**Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 2, p. 538–43, 2003.

MOORE, J. C.; ATZE, K.; YEUNG, P. L.; et al. Efficient , high-throughput transfection of human embryonic stem cells. **Stem Cell Research and Therapy**, v. 1, n. 23, p. 1–

10, 2010.

MOORE, K. L.; PERSAUD, T. V. N.; TORCHIA, M. G. **Embriologia Básica**. 8 ed, Elsevier, Rio de Janeiro, 248 p. 2012.

MORETTI, A. et al. Multipotent Embryonic Isl1+ Progenitor Cells Lead to Cardiac, Smooth Muscle, and Endothelial Cell Diversification. **Cell**, v. 127, n. 6, p. 1151–1165, 2006.

MORRIS, A. R.; MUKHERJEE, N.; KEENE, J. D. Ribonomic Analysis of Human Pum1 Reveals cis-trans Conservation across Species despite Evolution of Diverse mRNA Target Sets. **Molecular and Cellular Biology**, v. 28, n. 12, p. 4093–4103, 2008.

MUMMERY, C. et al. **Stem Cells: Scientific Facts and Fiction**. 2<sup>a</sup> ed. Elsevier, 2014.

MUMMERY, C. L. et al. Differentiation of Human Embryonic Stem Cells and Induced Pluripotent Stem Cells to Cardiomyocytes: A Methods Overview. **Circulation Research**, p. 344–359, 2012.

MUMMERY, C.; OOSTWAARD, D. W.; DOEVENDANS, P.; et al. Differentiation of Human Embryonic Stem Cells to Cardiomyocytes: Role of Coculture With Visceral Endoderm-Like Cells. **Circulation**, p. 2733–2741, 2003.

MURATA, Y.; WHARTON, R. P.; CAROLINA, N. Binding of Pumilio to Maternal hunchback mRNA Is Required for Posterior Patterning in Drosophila Embryos. **Cell**, v. 80, p. 747–756, 1995.

NAKAHATA, S.; KOTANI, T.; MITA, K.; KAWASAKI, T. Involvement of Xenopus Pumilio in the translational regulation that is specific to cyclin B1 mRNA during oocyte maturation. **Mechanisms of Development**, v. 120, p. 865–880, 2003.

NAKANISHI, M. et al. Directed induction of anterior and posterior primitive streak by Wnt from embryonic stem cells cultured in a chemically defined serum-free medium. **The FASEB Journal**, v. 23, n. 1, p. 114–122, 2017.

NALDINI, L. et al. In Vivo Gene Delivery and Stable Transduction of Nondividing Cells by a Lentiviral Vector. **Science**, v. 272, n. 5259, p. 263–267, 1996.

NAMIHIRA, M. et al. Article Committed Neuronal Precursors Confer Astrocytic Potential on Residual Neural Precursor Cells. **Developmental Cell**, v. 16, n. 2, p. 245–255, 2009.

- NARITA, R.; TAKAHASI, K.; MURAKAMI, E.; HIRANO, E.; YAMAMOTO, S. P. A Novel Function of Human Pumilio Proteins in Cytoplasmic Sensing of Viral Infection. **PLOS Pathogens**, v. 10, n. 10, 2014.
- NEFF, A. T.; LEE, J. Y.; WILUSZ, J.; TIAN, B.; WILUSZ, C. J. Global analysis reveals multiple pathways for unique regulation of mRNA decay in induced pluripotent stem cells. **Genome Research**, v. 22, p. 1457–1467, 2012.
- NG, E. S. et al. Forced aggregation of defined numbers of human embryonic stem cells into embryoid bodies fosters robust , reproducible hematopoietic differentiation Brief report Forced aggregation of defined numbers of human embryonic stem cells into embryoid bodies fost. **Hematopoiesis**, v. 106, n. 5, p. 1601–1603, 2011.
- NIH. Stem cell information. Disponível em:  
<<https://stemcells.nih.gov/info/2001report/chapter1.htm#figure1>>. Acesso em: 5/2/2018.
- PADDISON, P. J.; CAUDY, A. A.; BERNSTEIN, E.; HANNON, G. J.; CONKLIN, D. S. Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells. **Genes and Development**, v. 16, n. 8, p. 948–958, 2002.
- PAI, T.; CHEN, C.; LIN, H.; et al. Drosophila ORB protein in two mushroom body output neurons is necessary for long-term memory formation. **Pnas**, v. 110, p. 10–15, 2013.
- PAIGE, S. L. et al. Endogenous Wnt/B-Catenin signaling is required for cardiac differentiation in human embryonic stem cells. **PLoS ONE**, v. 5, n. 6, 2010.
- PARISI, M.; LIN, H. The Drosophila pumilio Gene Encodes Two Functional Protein Isoforms That Play Multiple Roles in Germline Development , Gonadogenesis ,. **Genetics**, v. 153, p. 235–250, 1999.
- PEREIRA, I.T. **Caracterização molecular de redes gênicas envolvidas na regulação transcricional e pós-transcricional da diferenciação cardiomiogênica**. Dados não publicados (Tese). Instituto Carlos Chagas, Curitiba.
- PIMENTEL, J.; BOCCACCIO, G. L. Translation and silencing in RNA granules : a tale of sand grains. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 7, p. 1–5, 2014.
- PIPER, M. et al. NFIA Controls Telencephalic Progenitor Cell Differentiation through through Repression of the Notch Effector Hes1. **The Journal of Neuroscience**, v. 30, n. 27, p. 9127–9139, 2010.



- PIQUÉ, M. et al. A Combinatorial Code for CPE-Mediated Translational Control. **Cell**, v. 132, p. 434–448, 2008.
- PITTINGER, M. F. et al. Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells. **Science**, v. 284, p. 143–147, 1999.
- PLANCHON, S. M. et al. Feasibility of mesenchymal stem cell culture expansion for a phase I clinical trial in multiple sclerosis. **MSJ**, 2018.
- PRASAD, A. et al. The PUF binding landscape in metazoan germ cells. **Rna**, v. 22, n. 7, p. 1026–1043, 2016.
- REIJO, R. A. et al. DAZ Family Proteins Exist Throughout Male Germ Cell Development and Transit from Nucleus to Cytoplasm at Meiosis in Humans and Mice 1. **Biology of Reproduction**, v. 1496, p. 1490–1496, 2000.
- REIJO, R. et al. Diverse spermatogenic defects in humans caused by Y chromosome deletions encompassing a novel RNA-binding protein. **Nature Genetics**, v. 10, p. 383–393, 2005.
- ROEGIERS, F.; JAN, Y. N. Staufen : a common component of mRNA transport in oocytes and neurons ? **Trends in Cell Biology**, v. 10, p. 220–224, 2000.
- ROMANIUK, M. A. et al. Mesenchymal stem cells and their use in therapy : What has been achieved ? **Differentiation**, v. 85, p. 1–10, 2013.
- SAINT-GEORGES, Y. et al. Yeast Mitochondrial Biogenesis : A Role for the PUF RNA- Binding Protein Puf3p in mRNA Localization. **PLoS ONE**, v. 3, n. 6, 2008.
- SALAZAR, A. M. et al. Regulation of Synaptic Pumilio Function by an Aggregation-Prone Domain. **The Journal of Neuroscience**, v. 30, n. 2, p. 515–522, 2010.
- SANDBERG, R. et al. Proliferating Cells Express mRNAs with Shortened 3' Untranslated Regions and Fewer MicroRNA Target Sites. **Science**, v. 1643, n. 2008, p. 1643–1647, 2012.
- SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY. Gene silencers. Disponível em: <<https://www.scbt.com/scbt/pt/whats-new/gene-silencers>>. Acesso em: 5/2/2018.
- SATO, N.; MEIJER, L.; SKALTSOUNIS, L.; GREENGARD, P.; BRIVANLOU, A. H. Maintenance of pluripotency in human and mouse embryonic stem cells through activation of Wnt signaling by a pharmacological GSK-3-specific inhibitor. **Nature Medicine**, v. 10, n. 1, p. 55–63, 2004.

SCHULDINER, M.; YANUKA, O.; ITSKOVITZ-ELDOR, J.; MELTON, D. A.; BENVENISTY, N. Effects of eight growth factors on the differentiation of cells derived from human embryonic stem cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 21, p. 11307–12, 2000.

SCHWAMBORN, J. C.; BEREZIKOV, E.; KNOBLICH, J. A. The TRIM-NHL Protein TRIM32 Activates MicroRNAs and Prevents Self-Renewal in Mouse Neural Progenitors. **Cell**, v. 136, n. 5, p. 913–925, 2009.

SHEPARD, P. J.; CHOI, E.; LU, J.; FLANAGAN, L. A.; HERTEL, K. J. Complex and dynamic landscape of RNA polyadenylation revealed by PAS-Seq. **Rna**, v. 17, p. 761–772, 2011.

SHIGUNOV, P. et al. PUMILIO-2 Is Involved in the Positive Regulation of Cellular Proliferation in Human Adipose-Derived Stem Cells. **Stem Cells and Development**, v. 21, n. 2, p. 217–227, 2012.

SHOWLER, K. et al. Analysis of genes involved in the PI3K / Akt pathway in radiation- and MNU-induced rat mammary carcinomas. **Journal of Radiation Research**, v. 58, n. 2, p. 183–194, 2017.

SIDHU, K. S.; TUCH, B. E. Derivation of Three Clones from Human Embryonic Stem Cell Lines by FACS Sorting and Their Characterization. **Stem Cells and Development**, v. 69, p. 61–69, 2006.

SONODA, J.; WHARTON, R. P. Recruitment of Nanos to hunchback mRNA by Pumilio. **Genes & Development**, v. 13, p. 2704–2712, 1999.

SONODA, J.; WHARTON, R. P. Drosophila Brain Tumor is a translational repressor. **Genes & Development**, v. 15, p. 762–773, 2001.

SOUZA, G. M.; MARIA, A.; KUSPA, A. Starvation promotes Dictyostelium development by relieving PufA inhibition of PKA translation through the Yaka kinase pathway. **Development**, v. 3274, p. 3263–3274, 1999.

SPASSOV, D.; JURECIC, R. The PUF Family of RNA-binding Proteins: Does Evolutionarily Conserved Structure Equal Conserved Function? **IUBMB Life**, v. 55, n. 7, p. 359–366, 2003.

SPASSOV, D. S.; JURECIC, R. Mouse Pum1 and Pum2 genes, members of the Pumilio family of RNA-binding proteins, show differential expression in fetal and adult hematopoietic stem cells and progenitors. **Blood cells, Molecules and**

**Diseases**, v. 30, p. 55–69, 2003.

STEVENS, L. C. Embryonic potency of embryoid bodies derived from a transplantable testicular teratoma of the mouse. **Developmental Biology**, v. 2, n. 3, p. 285–297, 1960.

STUMPF, P. S. et al. Stem cell differentiation is a stochastic process with memory. **bioRxiv**, p. 1–26, 2017.

SUH, N. et al. FBF and Its Dual Control of *gld-1* Expression in the *Caenorhabditis elegans* Germline. **Genetics**, v. 1260, n. April, p. 1249–1260, 2009.

SULTAN, M. et al. Influence of RNA extraction methods and library selection schemes on RNA-seq data. **BMC Genomics**, v. 15, n. 675, p. 1–13, 2014.

SUMI, T. et al. Defining early lineage specification of human embryonic stem cells by the orchestrated balance of canonical Wnt /  $\beta$  - catenin , Activin / Nodal and BMP signaling. **Development and Disease**, v. 2979, p. 2969–2979, 2008.

TABERNERO, J. et al. First-in-Man Trial of an RNA Interference Therapeutic Targeting VEGF and KSP in Cancer Patients with Liver Involvement. **Cancer Discovery**, v. 3, n. 4, p. 406–417, 2013.

TAKAHASHI, K. et al. Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. **Cell**, v. 131, p. 861–872, 2007.

TAKAHASHI, K.; YAMANAKA, S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. **Cell**, v. 2, p. 663–676, 2006.

TAKAOKA, K. et al. The Mouse Embryo Autonomously Acquires Anterior-Posterior Polarity at Implantation. **Developmental Cell**, v. 10, p. 451–459, 2006.

TANG, S. J. et al. A Role for a Rat Homolog of Staufen in the Transport of RNA to Neuronal Dendrites. **Neuron**, v. 32, p. 463–475, 2001.

THOMSON, J. A. et al. Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts. **Science**, v. 282, p. 1145–1148, 1998.

TROUNSON, A.; DEWITT, N. D. Pluripotent stem cells progressing to the clinic. **Nature**, v. 17, n. 3, p. 194–200, 2016.

ULLMANN, U. et al. GSK-3-specific inhibitor-supplemented hESC medium prevents the epithelial – mesenchymal transition process and the up-regulation of matrix

metalloproteinases in hESCs cultured in feeder-free conditions. **MHR-Basic Science of Reproductive Medicine**, v. 14, n. 3, p. 169–179, 2008.

URANO, J.; FOX, M. S.; REIJO PERA, R. A. Interaction of the conserved meiotic regulators, BOULE (BOL) and PUMILIO-2 (PUM2). **Molecular Reproduction and Development**, v. 71, n. 3, p. 290–298, 2005.

VAID, S. et al. PUF-8 negatively regulates RAS/MAPK signalling to promote differentiation of *C. elegans* germ cells. **Development**, v. 140, n. 8, p. 1645–1654, 2013.

VALLIER, L. et al. Activin / Nodal signalling maintains pluripotency by controlling Nanog expression. **Development**, v. 1349, p. 1339–1349, 2009.

VESSEY, J. P. et al. Mammalian Pumilio 2 regulates dendrite morphogenesis and synaptic function. **Pnas**, v. 107, n. 7, p. 3222–3227, 2010.

VESSEY, J. P. et al. Dendritic Localization of the Translational Repressor Pumilio 2 and Its Contribution to Dendritic Stress Granules. **The Journal of Neuroscience**, v. 26, n. 24, p. 6496–6508, 2006.

WANG, L. et al. The THO Complex Regulates Pluripotency Gene mRNA Export and Controls Embryonic Stem Cell Self-Renewal and Somatic Cell Reprogramming. **Stem Cell**, v. 13, n. 6, p. 676–690, 2013.

WANG, X.; LIN, G.; MARTINS-TAYLOR, K.; ZENG, H.; XU, R. Inhibition of Caspase-mediated Anoikis Is Critical for Basic Fibroblast Growth Factor-sustained Culture of Human Pluripotent Stem Cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 49, p. 34054–34064, 2009.

WANG, X.; MCLACHLAN, J.; ZAMORE, P. D.; HALL, T. M. T. Modular recognition of RNA by a human Pumilio-homology domain. **Cell**, v. 110, n. 4, p. 501–512, 2002.

WANG, X.; ZAMORE, P. D.; TANAKA HALL, T. M. Crystal structure of a Pumilio homology domain. **Molecular Cell**, v. 7, n. 4, p. 855–865, 2001.

WATSON, J. D. et al. **Biologia Molecular do Gene**. 7th ed. Porto Alegre: Artmed, 2015.

WEINGARTEN-GABBAY, S.; SEGAL, E. The grammar of transcriptional regulation. **Hum Genet**, v. 133, n. 6, p. 701–711, 2014.

WEISSMAN, I. L. Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in

evolution. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 157–168, 2000.

WERT, S. E.; HULL, W. M.; WHITSETT, J. A. Immunohistochemical localization of Foxa1 and Foxa2 in mouse embryos and adult tissues. **Gene Expression Patterns**, v. 5, p. 193–208, 2004.

WETERING, M. V. et al. Specific inhibition of gene expression using a stably integrated, inducible small-interfering-RNA vector. **EMBO reports**, v. 4, n. 6, p. 609–615, 2003.

WICKENS, M. et al. A PUF family portrait: 3'UTR regulation as a way of life. **Trends in Genetics**, v. 18, n. 3, p. 150–157, 2002.

WREDEN, C. et al. Nanos and pumilio establish embryonic polarity in *Drosophila* by promoting posterior deadenylation of hunchback mRNA. **Development**, v. 124, p. 3015–3023, 1997.

WU, S. M. et al. Developmental Origin of a Bipotential Myocardial and Smooth Muscle Cell Precursor in the Mammalian Heart. **Cell**, v. 127, n. 6, p. 1137–1150, 2006.

XU, C.; POLICE, S.; RAO, N.; CARPENTER, M. K. Characterization and enrichment of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells. **Circulation Research**, v. 91, n. 6, p. 501–508, 2002.

XU, E. Y. et al. Human BOULE gene rescues meiotic defects in infertile flies. **Human Molecular Genetics**, v. 12, n. 2, p. 169–175, 2003.

XU, E. Y.; MOORE, F. L.; PERA, R. A. A gene family required for human germ cell development evolved from an ancient meiotic gene conserved in metazoans.

**Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 13, p. 7414–9, 2001.

XU, R. et al. NANOG Is a Direct Target of TGF $\beta$  / Activin-Mediated SMAD Signaling in Human ESCs. **Cell Stem Cell**, v. 3, p. 196–206, 2008.

YAMANAKA, S. A Fresh Look at iPS Cells. **Cell**, v. 137, p. 13–17, 2009.

YE, J.; BLELLOCH, R. Regulation of pluripotency by RNA binding proteins. **Cell Stem Cell**, v. 15, n. 3, p. 271–280, 2014.

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

YOUNG, R. A. Control of the embryonic stem cell state. **Cell**, v. 144, n. 6, p. 940–954, 2011.

ZAEHRES, H. et al. High-Efficiency RNA Interference in Human Embryonic Stem Cells. **Stem Cells**, v. 23, n. 3, p. 299–305, 2005.

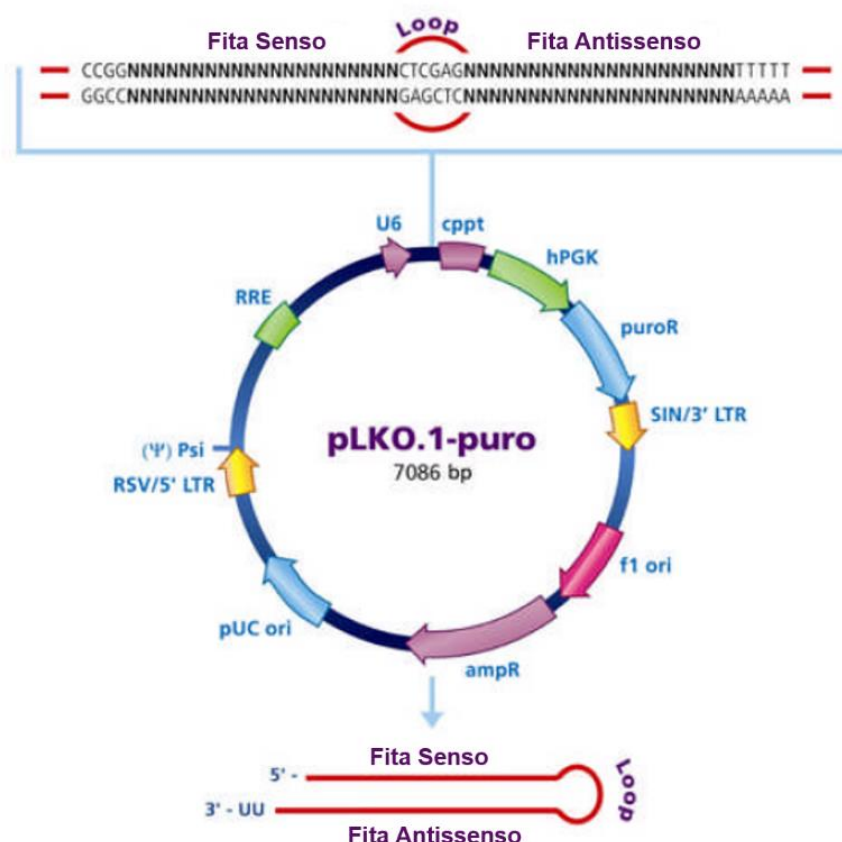
ZHANG, J. et al. Matrix-Promoted Efficient Cardiac Differentiation of Human iPS and ES Cells. **Circulation**, v. 122, n. 21, 2010.

ZHANG, S. C. et al. In vitro differentiation of transplantable neural precursors from human embryonic stem cells. **Nat.Biotechnol.**, v. 19, n. 12, p. 1129–1133, 2001.

ZHOU, X. L.; LIU, J. C. Role of Notch signaling in the mammalian heart. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 47, n. 17, p. 1–10, 2014.

## ANEXOS

### ANEXO I: MAPA DO PLASMÍDEO UTILIZADO NO SILENCIAMENTO DE PUMILIO



| Nome    | Descrição   |
|---------|---|
| U6      | Promotor U6   |
| cppt    | Extensão de polipurina central                            |
| hPGK    | Promotor eucariótico da fosfogliceratokinase humana       |
| puroR   | Gene de resistência a puomicina para seleção em mamíferos |
| SIN/3'L | Repetição terminal longa para inativação própria em 3'    |
| f1 ori  | Origem de replicação f1                                   |
| ampR    | Gene de resistência a ampicilina para seleção bacteriana  |
| pUC ori | Origem de replicação pUC                                  |
| 5' LTR  | Repetição terminal longa em 5'                            |
| Psi     | Sinal para empacotamento de RNA                           |
| RRE     | Elemento de resposta a Rev                                |

Fonte: adaptado do manual do fabricante (MISSION® Lentiviral Transduction Particle, Sigma-Aldrich, código de catálogo: SHCLNV).

## ANEXO II: SOLUÇÕES E TAMPÕES

Tabela 1 – PBS 10X

| Reagentes                        | 10X*   |
|----------------------------------|--------|
| NaCl                             | 80 g   |
| KCl                              | 2 g    |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> | 11,5 g |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>  | 2 g    |
| Água destilada                   | 1 l    |

\*Para 1X: diluir 100 ml da solução 10X em 900 ml de água destilada.

Tabela 2 – PBS 1% BSA ou 0,5% BSA

| Reagentes | 1%     | 0,5%   |
|-----------|--------|--------|
| PBS 1X    | 100 ml | 100 ml |
| BSA       | 10 g   | 5 g    |

Tabela 3 – Composição da solução de reação de cDNA.

| Reagentes         | 1X    |
|-------------------|-------|
| Buffer 5X         | 4,0µl |
| MgCl <sub>2</sub> | 2,4µl |
| dNTP              | 1,0µl |
| RNAse Out         | 0,5µl |
| RT Improm         | 1,0µl |
| Total             | 8,9µl |

Tabela 4 – Composição do mix de RT-qPCR.

| Reagentes        | Volume |
|------------------|--------|
| SyBR Green       | 5,0µl  |
| Primer Foward    | 0,5µl  |
| Primer Reverse   | 0,5µl  |
| H <sub>2</sub> O | 1,5µl  |
| Total            | 7,5µl  |

Tabela 5 – Composição do tampão de amostra 4X (TA)

| Reagentes          | 20ml   |
|--------------------|--------|
| Tris HCl pH 6,8 1M | 3,2 ml |
| SDS 10%            | 8,0 ml |
| B-mercaptoetanol   | 2,0 ml |
| Glicerol           | 4,8 ml |
| Azul de Bromofenol | 4,0 mg |

Tabela 6 – Solução de SDS-PAGE

| Reagentes      | 5X     |
|----------------|--------|
| Tris-base      | 15,1 g |
| Glicina        | 72 g   |
| SDS 10%*       | 50 ml  |
| Água ultrapura | 950 ml |

\*50 g de SDS em 50 ml de água ultrapura.

Tabela 7 – Tampão de transferência para Western Blot

| Reagentes      | 10X (1 l) | 1X (1 l)* |
|----------------|-----------|-----------|
| Tris-base      | 30 g      | -         |
| Glicina        | 144 g     | -         |
| Metanol        | -         | 200 ml    |
| Água ultrapura | 1 l       | 700 ml    |

\*Para fazer 1 l, diluir 100 ml da solução 10X em 700 ml de água e completar com 200 ml de metanol.

Tabela 8 – TBS 10X

| Reagentes          | 10X*   |
|--------------------|--------|
| Tris HCl 1M pH 8,0 | 300 ml |
| NaCl 5M            | 200 ml |
| Água destilada     | 500 ml |

\*Para 1X: diluir 100 ml da solução 10X em 900 ml de água destilada

\*\*Para TBSt 0,1%: 0,5 ml de Tween 20 em 500 ml de TBS 1X



ANEXO III: SEQUÊNCIAS DOS *PRIMERS* UTILIZADOS

| <b>Primer</b> | <b>Sequência</b>                  | <b>TF</b> | <b>Tm</b> | <b>Gene ID</b>     |
|---------------|-----------------------------------|-----------|-----------|--------------------|
| GAPDH<br>PF   | 5'- GGCGATGCTGGCGCTGAGTAC -3'     | 149       | 60        | NM_00204<br>6.3    |
| GAPDH<br>PR   | 5'- TGGTTCACACCCATGACGA -3'       |           |           |                    |
| PUM1 PF       | 5'- TGAGGTGTGCACCATGAAC -3'       | 187       | 61        | NM_00102<br>0658.1 |
| PUM1 PR       | 5'- CAGAATGTGCTTGCCATAGG -3'      |           |           |                    |
| PUM2 PF       | 5'- AGGATCAGTATGGCAATTATG -3'     | 389       | 60        | NM_00128<br>2752.1 |
| PUM2 PR       | 5'- ATACTTTTCCAACCTTGGCCAG -3'    |           |           |                    |
| OCT3/4<br>PF  | 5'- ATGCATTCAAACCTGAGGTGCCTGC -3' | 192       | 60        | NM_00117<br>3531.2 |
| OCT3/4<br>PR  | 5'- AACTTCACCTTCCCTCCAACCAGT -3'  |           |           |                    |
| NANOG<br>PF   | 5'- ACCAGAACTGTGTTCTCTTCCACC -3'  | 200       | 60        | NM_02486<br>5      |
| NANOG<br>PR   | 5'- CCATTGCTATTCTTCGGCCAGTTG -3'  |           |           |                    |
| FOXA1<br>PF   | 5'- ACCAGCGACTGGAACAGCTA -3'      | 143       | 60        | NM_00449<br>6.3    |
| FOXA1<br>PR   | 5'- ATGTTGCCGCTCGTAGTCA -3'       |           |           |                    |
| WNT3 PF       | 5'- ACTTCGGCGTGTTAGTGTCC -3'      | 176       | NA        | NM_03075<br>3.4    |
| WNT3<br>PR    | 5'- CCAGCAGGTCTTCACCTCAC -3'      |           |           |                    |
| WNT5A<br>PF   | 5'- ATTAATTCTGGCTCCACTTGTTGC -3'  | 150       | NA        | NM_00125<br>6105.1 |
| WNT5A<br>PR   | 5'- AATTACAACCTGGGCGAAGGA -3'     |           |           |                    |
| NFIA PF       | 5'- AGGCGGGGTAAAGTTCAGC -3'       | 299       | 60        | NM_00113<br>4673.3 |

|         |                                |     |    |          |
|---------|--------------------------------|-----|----|----------|
| NFIA PR | 5'- GGGGCAGAAGTGCTTCGAT -3'    |     |    |          |
| INPP4B  | 5'- AGACAAAGAGCCTTGAAACCAG -3' | 267 | NA | NM_00110 |
| PF      |                                |     |    | 1669.2   |
| INPP4B  | 5'- ATCATTGGCCTGGGCTGTAG -3'   |     |    |          |
| PR      |                                |     |    |          |

TF: Tamanho do Fragmento(em ares de base); Tm: Temperatura de anelamento (em °C); NA: Não amplificou.

#### ANEXO IV: ANTICORPOS UTILIZADOS NO WESTERN BLOT

| Anticorpo                    | Características  |
|------------------------------|--|
| Anti-PUM1 (primário)         | Goat Polyclonal IgG (Bethyl Laboratories, A300-201A)               |
| Anti-PUM2 (primário)         | Rabbit Polyclonal IgG (Bethyl Laboratories, A300-202A)             |
| Anti-β actina (primário)     | Mouse mAb (Cell Signaling Technology, 8H10D10)                     |
| Anti-goat (secundário)       | Rabbit polyclonal IgG (H+L) HRP (Thermo Fisher Scientific, #31402) |
| Anti-rabbit (secundário)     | Goat IgG polyclonal peroxidase (Sigma-Aldrich, A0545)              |
| Goat anti-mouse (secundário) | Goat polyclonal IgG (H+L) HRP (Thermo Fisher Scientific, #31430)   |

#### ANEXO V: ALVOS DE PUM1 E PUM2

##### Lista de alvos de PUMILIO (GALGANO et al., 2008)

ABCC5; ABHD10; ABHD13; ABHD5; ABI2; ABL2; ABLIM3; ACBD3; ACOT4; ACVR1; ACVR1B; ACVR2B; ADAMTS5; ADAMTS6; ADARB1; ADD3; ADM; ADSS; AGA; AGGF1; AGPAT5; AGXT; AGXT2; AHCTF1; AHDC1; AHSA1; AHSG; AIP; AKAP1; AKAP12; AKAP13; AKTIP; ALDOB; ALG10; ALKBH1; ALS2CL; AMH; AMIGO2; AMOTL2; ANGEL2; ANK3; ANKH; ANKRD12; ANKRD16; ANKRD50; ANKS1B; ANP32B; ANP32E; AOC3; AP1S1; AP4S1; APC; APP; APPL1; AQP3; AQP5; ARAF; ARCN1; AREG; ARF1; ARFGEF1; ARFGEF2; ARGLU1; ARHGAP5; ARHGDIB; ARHGEF7; ARID4B; ARID5B; ARL6; ARL6IP1; ARL6IP6; ARL8B; ARMC9; ARMCMX2; ARMCMX3; ARMCMX6; ARPC3; ASB1; ASF1A; ATAD1; ATF2; ATG3; ATP11B; ATP1B3; ATP6AP2; ATP6V1B2; ATP6V1G1; ATRN; AURKA; AXIN1; AZIN1; B3GALT1; B3GAT2; B3GNT1; B3GNT5; BAALC; BACH1; BAIAP2; BAP1; BAZ2B; BBC3;

BCAR1; BCAR3; BCKDHB; BCL10; BCL2L1; BCL2L11; BCL6; BCOR; BLMH; BMP2; BNIP2; BNIP3L; BOK; BRD2; BRD7; BRI3; BRMS1L; BRWD1; BTBD7; BTG1; BTN3A3; BUB1; BUB1B; BUB3; C12orf29; C14orf119; C17orf85; C1GALT1; C1GALT1C1; C1orf52; C20orf24; C3AR1; C5orf15; C5orf24; C6orf1; C6orf136; C9orf78; CAB39; CACHD1; CALCOCO2; CALM3; CAMKK2; CAMTA2; CAPN2; CAPRIN1; CAPS; CASC4; CASD1; CASP3; CASQ2; CAV1; CBF3; CBWD1; CBWD5; CCDC106; CCDC12; CCDC14; CCDC25; CCDC43; CCDC61; CCDC80; CCDC82; CCNB2; CCNC; CCNE2; CCNG2; CCNT2; CCNYL1; CD2AP; CD46; CD69; CD9; CDC14A; CDC14B; CDC27; CDC42SE2; CDCA8; CDK7; CDKN1A; CDKN1B; CDKN1C; CDKN2AIP; CDS2; CEBPD; CENPN; CENPO; CEP170; CEP290; CEP350; CEP55; CEP76; CFD; CFDP1; CHD1; CHD2; CHD7; CHD9; CHEK1; CHEK2; CHIC1; CHM; CHMP1A; CHMP2B; CHMP4C; CHMP7; CHPF; CISD3; CKAP2L; CKS2; CLASP2; CLCC1; CLIC2; CLIC4; CLK2; CLK4; CLPTM1; CLSTN1; CMTM3; CNOT1; CNOT8; CNTN3; CNTNAP1; COBLL1; COG6; COIL; COL1A1; COQ10B; CP; CPE; CPEB3; CPEB4; CPNE8; CPSF2; CR1L; CRBN; CREB3L2; CREBZF; CRY1; CSNK1D; CSNK1G3; CSPP1; CSTF1; CTCF; CTDSP1; CTGF; CTNND1; CUL1; CUL5; CXCR4; CYB5R3; CYLD; CYP2B6; CYP2U1; CYP3A4; CYR61; DAB2; DBF4; DBT; DCBLD1; DCK; DCP2; DCT; DCUN1D1; DCUN1D4; DDHD2; DDIT3; DDX21; DDX31; DDX55; DDX59; DEAF1; DENND4C; DEPDC1B; DEPDC7; DHRSX; DICER1; DISC1; DKK1; DLAT; DLL3; DNAJB1; DNAJB14; DNAJB5; DOCK4; DOCK9; DOK2; DSG2; DTWD1; DUSP16; DUSP6; DYNC1I2; DYRK1A; E2F3; E2F6; E2F8; EBF3; ECHDC2; ECHS1; EDEM1; EDEM3; EED; EFNA1; EFNB1; EGFR; EIF1AY; EIF3J; EIF4A3; EIF4E; EIF4G3; ELAVL4; ELF1; ELF3; ELL2; ELP4; EML2; EMP2; EMX2; ENSA; ENY2; EPB41L4B; EPC2; EPHB4; EPHX2; EPOR; EPRS; EPS15; ERH; ERN1; ESD; ESF1; ETNK1; ETS2; ETV4; EVI5; EXOC1; EXOC2; EXOC6; F13A1; F3; FAM103A1; FAM107B; FAM122A; FAM133B; FAM134A; FAM149A; FAM3C; FAM46A; FAM60A; FAM63B; FAM64A; FAM65A; FAM72B; FAM84A; FAM96A; FAM98B; FAS; FBXL14; FBXO10; FBXO18; FBXO21; FBXO25; FBXO3; FBXO30; FBXO32; FBXO34; FBXO38; FBXW11; FCER1A; FCHO2; FGB; FGFR1; FGFR1OP2; FGR; FHDC1; FJX1; FKBPL; FLT1; FMO1; FMR1; FN1; FNBP1L; FNBP4; FNDC3B; FNIP1; FOSL2; FOXA1; FOXF2; FOXM1; FOXN2; FOXN3; FOXO3; FOXP1; FOXRED1; FRMD6; FRS2; FSD1L; FST; FTH1; FXR2; FZD3; FZD6; FZD7; GAB1; GABPB2; GADD45A; GAS1; GAS2L1; GAS2L3; GAS6; GATA2; GBGT1; GCA; GCLC; GCLM; GDI1; GFM1; GINS3; GKAP1; GLCC1; GLI3; GMCL1; GNAI1; GNB5; GNE; GNG10; GNPAT1; GNPTAB; GOLGA1; GOLIM4; GOLPH3;

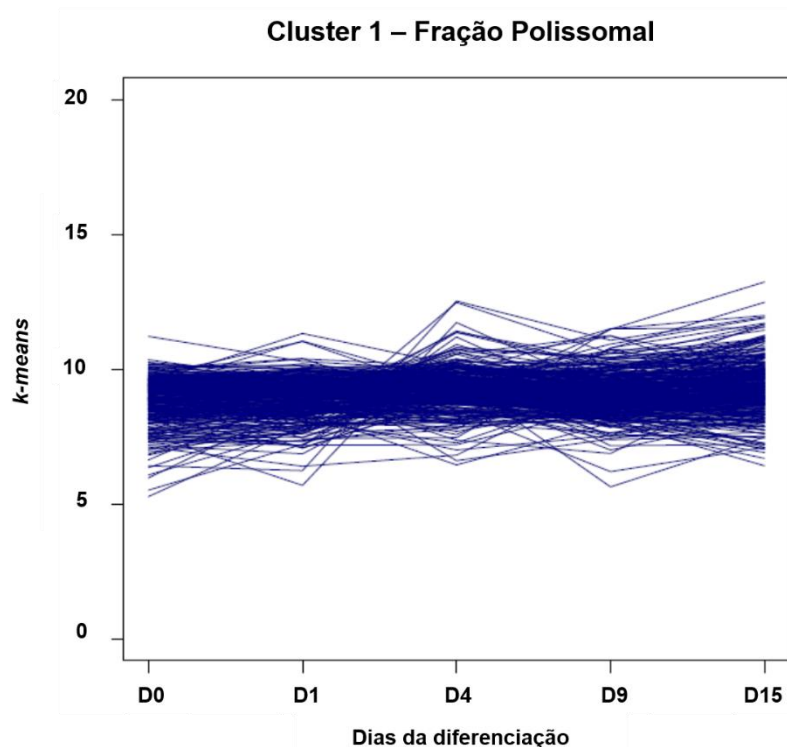
GOLT1B; GOPC; GPATCH8; GPR143; GPRC5A; GRAMD1B; GRB10; GRB2; GRHL1; GSK3A; GSTCD; GSTM3; GTF2B; GTPBP1; GTPBP10; GYG2; GCOM1; H1F0; HEATR5B; HECA; HERC3; HERC4; HESX1; HHEX; HIAT1; HIPK2; HIST1H2AC; HK2; HLX; HMBS; HMGB3; HMGCR; HMOX1; HNMT; HNRNPR; HORMAD1; HOXA11; HP1BP3; HSD17B12; HSF2; HTR2A; ID2; IDH3A; IDI1; IER3IP1; IER5; IFI16; IFIT1; IFNAR1; IFNGR1; IFNGR2; IFT80; IGBP1; IL15; IL16; IL1R1; IL1RAP; IMPA1; INPP4B; INTS10; INTS2; INTS5; INTS6; INTS8; IPO7; IREB2; IRF2; IRS2; ISCA1; ISCU; ITGA2; ITGA6; ITGB3BP; ITPR1; ITS2; IVNS1ABP; JAG2; JMJD1C; JUN; KALRN; KBTBD2; KBTBD7; KCNAB2; KCNK1; KCNT2; KCTD3; KIAA0247; KIAA0391; KIAA0907; KIAA1109; KIAA1143; KIAA1147; KIAA1429; KIAA1432; KIAA1468; KIAA1715; KIAA2026; KIF11; KIF1B; KLF13; KLF5; KLF9; KLHDC9; KLHL20; KLHL29; KPNA2; KRIT1; L1CAM; L3MBTL3; LACTB2; LBR; LEMD3; LGR4; LIFR; LIN54; LIX1L; LMBR1; LMBRD1; LPP; LRIG2; LRP8; LRRC57; LRRC58; LRRFIP2; LSM1; LSM14A; LSM14B; LSM5; LTBP3; LTV1; LYPD6; LYRM7; LZTS2; MAFG; MAN1C1; MAP3K1; MAP4K3; MAPK1; MAPK6; MAPKAP1; MAPKAPK5; MAPKBP1; MAPRE3; MARK4; MASTL; MATN2; MBIP; MBL2; MBNL1; MBNL2; MBOAT2; MBTD1; MCM3; MCM4; MCRS1; MED13; MED17; MED28; MED4; MED6; MEF2D; MEGF10; MEGF9; MET; MFAP1; MFAP3; MFGE8; MFN1; MGAT4B; MGEA5; MIB1; MIB2; MIER1; MIER3; MINA; MKL2; MKNK2; MKRN1; MLLT10; MLLT4; MNT; MON1B; MORF4L2; MOSPD2; MOSPD3; MPHOSPH8; MPL; MPP6; MPZL2; MRPL16; MRPL18; MRPL22; MRPL34; MRPS18A; MRPS18B; MRPS23; MRPS25; MRPS26; MRPS35; MS4A1; MSX1; MT1E; MT1H; MTAP; MTDH; MTF2; MTM1; MTMR1; MTMR12; MTPN; MUC15; MYD88; MYSM1; NASP; NBEA; NCAPH; NCDN; NCK1; NCL; NCOA1; NCOA3; NDC80; NDFIP1; NDUFS3; NDUFV2; NEK3; NENF; NEXN; NF1; NFE2L2; NFIA; NFIL3; NFKBIA; NFKBIZ; NFYA; NFYB; NGDN; NIF3L1; NIPA2; NISCH; NKTR; NLE1; NLGN2; NLGN4X; NLK; NLRP2; NOL8; NOV; NPAT; NPEPPS; NR2C2; NR2F1; NR3C1; NR4A1; NRIP1; NRXN2; NSL1; NTN4; NUDCD1; NUDT4; NUF2; NUFIP2; NUP153; NUP160; NUPL1; NUSAP1; NXF1; OAS2; OPA1; ORMDL3; OSBPL10; OSBPL6; OSBPL9; OTUD4; OTUD6B; OXR1; PAH; PAIP1; PAK1IP1; PAK2; PALB2; PAM; PANK1; PANK2; PAPD4; PAPOLA; PAQR3; PARD3B; PARD6B; PARG; PARP2; PARP6; PATL1; PBX3; PCDH11Y; PCDH7; PCF11; PCM1; PCNA; PCNP; PCSK2; PDCD10; PDCD7; PDE7B; PDHX; PDIK1L; PDK4; PDS5B; PEX11B; PEX14; PEX3; PFDN1; PFDN6; PGGT1B; PGRMC2; PHACTR2; PHC2; PHF10; PICALM; PIGY; PIK3C2A; PIK3CB; PIM1; PIM2; PITPNA; PITPNB; PITX2; PJA2; PLA2G6; PLA2R1; PLEKHA1; PLK4; PLSCR1;

PMP22; PNN; PNO1; PNRC1; PNRC2; PODN; PODXL; POFUT1; POLD2; POLR1C; POLR2B; POLR2F; POLR2J; POLR2K; PPAT; PPHLN1; PPIH; PPM1H; PPM1K; PPP1R10; PPP1R12A; PPP2R2D; PPP2R5A; PPP6C; PRDM10; PRDM4; PRDX6; PRICKLE4; PRKAA1; PRKCD; PRKCE; PRKD3; PRKDC; PRMT2; PROM1; PRPF18; PRPF40A; PRRC1; PRSS23; PSMA4; PSMG2; PSMG3; PTCH1; PTEN; PTP4A1; PTPN1; PTPN13; PTPRA; PTS; PUM2; PURB; PUS7; PVRL3; PWP1; PWWP2A; PXDN; QKI; RAB12; RAB18; RAB22A; RAB27A; RAB2A; RAB3GAP2; RAB4A; RAB5B; RAB6A; RAB7A; RABGEF1; RABGGTB; RABL3; RAC1; RAD1; RAD17; RAD18; RAD23B; RAD50; RAD54B; RAE1; RAI1; RALGPS2; RAN; RANBP2; RAPGEF2; RASSF8; RBBP6; RBM12B; RBM15B; RBM23; RBM25; RBM27; RBM28; RBM39; RBM6; RBM7; RBMS1; RCAN1; REEP1; RELL1; REV1; RFC3; RFC4; RGMB; RHEB; RHOB; RHOF; RHOJ; RHOT1; RHPN2; RICTOR; RIF1; RIOK1; RMND5B; RNF122; RNF138; RNF139; RNF180; RNF19A; RNF216; RNF8; ROBO1; ROCK2; RPE; RPL22L1; RPS14; RPS20; RPS29; RPS6KA3; RPS6KA5; RQCD1; RRM2B; RRN3; RRP1B; RSNB1; RSNB1L; RSRC2; RTKN; RUFY2; RUNX1T1; RWDD3; S100A7; SACM1L; SAMM50; SAP18; SAP30L; SAV1; SCAMP1; SCAMP2; SCAND1; SCARB2; SCML2; SDHA; SEL1L; SEMA3C; SEMA6D; SENP2; SENP6; SEPHS1; SERBP1; SERPINA1; SERPINB5; SERPINB8; SETD1A; SF3B1; SF3B2; SFTPFB; SGOL1; SGPP1; SGSM1; SH2D5; SH3BGRL; SHC1; SHMT2; SIAH1; SIN3A; SIRT1; SKP1; SLBP; SLC12A7; SLC13A5; SLC16A1; SLC17A5; SLC1A1; SLC20A2; SLC25A12; SLC25A32; SLC25A37; SLC25A40; SLC25A44; SLC26A2; SLC2A1; SLC30A5; SLC30A6; SLC30A7; SLC35A1; SLC35A3; SLC35A5; SLC37A1; SLC38A1; SLC38A2; SLC39A10; SLC39A9; SLC6A15; SLC7A11; SLC9A6; SLMO2; SLTM; SMAD2; SMAD7; SMAP1; SMARCA2; SMARCAD1; SMC3; SMEK2; SMNDC1; SMPDL3A; SNAP29; SNCA; SNRK; SNRPB; SNTB2; SNTG1; SNUPN; SNX12; SNX13; SNX2; SNX4; SOCS5; SOCS6; SORBS2; SOS2; SPAG1; SPAST; SPIRE1; SPIRE2; SPRY2; SPTBN1; SPTLC2; SREBF1; SRFBP1; SRRM1; SS18L2; SSTR1; SSX2IP; STAG2; STAM; STAM2; STAMBP; STARD3NL; STARD4; STAT1; STC2; STK24; STK4; STOM; STRN3; STT3B; STX12; STX16; STX17; STX2; STXBP3; SUMO2; SURF2; SUV420H1; SVIL; SWAP70; SYF2; SYNCRIP; TACC2; TACSTD2; TAF5; TANK; TARDBP; TATDN3; TBC1D1; TBC1D12; TBC1D23; TBK1; TBP; TBPL1; TBX3; TCEA1; TCF12; TCF4; TCF7L2; TEC; TENC1; TES; TFAM; TFAP2C; TFDP2; TFPI; TGS1; THAP5; THNSL1; THRB; THUMPD3; THYN1; TIA1; TIAM2; TIFA; TIMM8B; TLE3; TLK1; TM2D3; TM4SF1; TM9SF2; TM9SF3; TMBIM4; TMCC1; TMED10; TMED4; TMED5; TMEM106B; TMEM165; TMEM174; TMEM181;

TMEM41B; TMEM50B; TMEM54; TMEM55B; TMEM63B; TMEM68; TMEM69; TMF1; TMOD3; TNFAIP6; TNFRSF10D; TNPO1; TNRC6A; TOP1; TOP2A; TOPBP1; TOR1AIP1; TP53BP1; TPBG; TPD52L2; TPM1; TRAK1; TRAPPC4; TRAPPC6B; TRIAP1; TRIB2; TRIM23; TRIM33; TRIO; TRRAP; TRUB1; TSC22D1; TSC22D2; TSPAN3; TTBK2; TTC17; TTC30A; TTC32; TTC9; TTK; TUBE1; TULP4; TUSC2; TXNL1; UBA2; UBE2A; UBE2B; UBE2G1; UBE2V2; UBE2W; UBE2Z; UBL3; UBLCP1; UBQLN1; UBQLN4; UBT2D2; UGCG; UGT3A1; UNC119; UNC50; UNC5CL; USP1; USP12; USP21; USP32; USP33; USP42; USP53; USP6; USP8; VAMP2; VAMP4; VAV3; VCIPI1; VGLL3; VHL; VKORC1L1; VPS13B; VPS26A; VPS33B; VPS4B; VTA1; WARS2; WASF2; WASL; WDR13; WDR19; WDR20; WDR36; WDR44; WDR48; WDR5; WDR59; WDR75; WDR82; WEE1; WIPF2; WIPI2; WNT3; WNT5A; WNT9A; WSB1; WTAP; XPNPEP3; XPOT; XRCC1; XRCC4; YAP1; YEATS4; YIPF4; YIPF6; YPEL2; YPEL3; YPEL4; YWHAG; ZBTB11; ZBTB33; ZBTB34; ZBTB38; ZBTB44; ZC3H15; ZC3H18; ZC3H8; ZC3HAV1L; ZDHHC3; ZDHHC6; ZFAND3; ZFAND6; ZFH3; ZFP1; ZFP36; ZFP37; ZFX; ZHX1; ZHX2; ZIC2; ZMYM2; ZMYND11; ZMYND19; ZMYND8; ZNF124; ZNF131; ZNF146; ZNF148; ZNF217; ZNF230; ZNF236; ZNF263; ZNF275; ZNF292; ZNF326; ZNF507; ZNF510; ZNF532; ZNF585A; ZNF605; ZNF609; ZNF639; ZNF644; ZNF664; ZNF7; ZNF706; ZNF714; ZNF812; ZNF92; ZRANB2; ZWILCH; ABCA5; ABHD2; ACADS; ACER3; ACSL4; ADAM23; AGAP1; AGBL1; AGBL4; AIM1; AK7; AKAP6; AKAP8L; AKIRIN1; ALDH18A1; ALDH1A2; ALG9; ALOX5AP; AMMECR1L; ANKLE2; ANKRD40; ANO4; AP1G1; AP2B1; APBA1; APEX1; RNASE10; APOA1; ARHGAP20; ARHGAP22; ARHGAP25; ARRB1; ASAH1; ASPG; ATF7IP; ATL2; ATL3; ATP10A; ATP1B1; ATP6V0E1; ATRNL1; ATXN3; B4GALNT3; BBS10; BCR; BGN; BICD1; BIVM; BPI; C10orf11; C10orf71; C11orf42; C11orf80; C12orf57; C12orf76; C15orf26; C18orf25; C2CD3; C6orf62; CADM1; CALM1; CAMK2G; SPAG7; CASK; CBX3; CCDC60; CCNI; CCNT1; CCNY; CD276; CD5; CDC123; CDH23; CDH7; CDK1; CDON; CDV3; CEBPA; CELF1; CELF2; CENPT; CHST11; CHTF8; CLEC2D; CLK1; CLSPN; CNNM1; CNTN5; COL13A1; COL15A1; COL4A2; COX10; CPSF7; CPT1A; CREB1; CST6; CTDSPL; CTDSPL2; CTR9; CXADR; CXorf22; DCAF5; DCN; DCUN1D5; DENND5B; DGKE; DIO2; DLG2; DLST; DMXL1; DNAJC3; DOCK1; DOCK3; DPF3; DPP6; DUT; DYDC1; DYNLL1; DYRK4; EHD1; EIF4B; ELK1; EML4; EN2; ENOX1; ERC1; ERCC6; ERMP1; EVL; FAM155A; FAM168A; FAM19A5; FAM21C; ANTXRL; FAM35A; FAM65B; FAM71D; FANCI; FAR2; FARP1; FBXL20; FCHSD2; FIS1; FMNL3; FOS; FOXC1; FRA10AC1; FRMD5; FRMPD2; G2E3; GAPDH; GBF1; GMDS;

GNG12; GNG2; GNL3; GOLGA8A; GOLGA8B; GPATCH2; GPR149; GRTP1; GSG2; GSPT1; GTF2IRD2; H2AFY2; HAUS4; HES1; HIP1R; HLCS; HMGB2; HMGXB4; HNRNPH3; HNRNPK; HOXB2; HOXB3; HOXB9; HPSE2; HRAS; HRC; HS6ST1; HSD17B7; HSPE1; HSPH1; HTR7; HUNK; HYDIN; IARS2; IL2RA; INPP5A; IQCH; IRF2BP2; ITFG2; ITPK1; ITPR2; KAT5; KCNH5; KCNIP1; KCNJ5; KCNJ6; KDM3A; KDM3B; KIAA0100; KIAA1191; KIAA1462; KIAA1467; KIF5B; KIRREL3; KLHDC10; KLHL15; KLRF2; KRT18; KRT23; L2HGDH; L3MBTL4; LGALS3BP; LGR5; LIN28B; LMOD3; FGF14; LRP5; LRRC28; LUZP6; MAFK; MAP3K3; MCM3AP; MDC1; MED31; METTL4; MEX3A; MIPEP; MIPOL1; MN1; MND1; MON2; MORC3; MORN4; MPHOSPH9; MUC16; MYH11; MYO3A; NAALADL2; NADSYN1; NAV2; NAV3; NCAPD3; NCKAP5L; NCOR2; NDFIP2; NDRG3; NDST3; NELL2; NFE2L1; NHLRC2; NIPA1; NLGN4Y; NOS1; NPM1; NPTX1; NR2C1; NRG3; NRL; NRXN3; NSMCE4A; NTM; NUP205; OPN3; CHML; OXA1L; PABPC4; PAK1; PAPD5; PARD3; PARK2; PCBD2; PCBP2; PCSK7; PCYT1B; PDCD6IP; PDCL; PDE3A; PDE4D; PDIA3; PEG10; PELI2; PFKFB3; PGAM1; PGBD1; PGS1; PHACTR3; PHACTR4; PHF13; PHF21A; PIBF1; PIK3CA; PLCH1; PMPCB; POU2F1; POU2F3; PPM1A; PPP1R13B; PPP1R1A; PPP1R9B; PPP2R1A; PPP2R5C; PPP2R5D; PPP4R1; PPTC7; PRAME; PRICKLE1; PRKG1; PRMT8; PRPS2; PTGES3; PTGFRN; PTPLB; PTPN5; PTPRE; PTPRK; PTPRO; PUM1; PXMP4; RAB11A; RAB11FIP4; RAB21; RAB30; RAB3IP; RABL2B; RAP1A; RAP1B; RBM19; RBM33; RCOR1; RDH14; RFX4; RGS2; RLIM; RNF165; RNF213; RNF31; RNPS1; RPAP3; RPL15; RPL6; RPN2; RPS13; RYR3; SAMD8; SBF2; SBNO1; SDCCAG8; SERF2; SERINC3; SETD1B; SETD3; SF3B4; SFMBT2; SFSWAP; SGMS1; SH3PXD2A; SH3RF2; SHOC2; SIK3; SLC1A2; SLC39A13; SLC43A1; SLC7A1; SLC8A1; SMAD3; SMAD5; SMARCC2; SNAPC1; SNIP1; SNX1; SORCS1; SORCS3; SPAG16; SPEN; SPI1; SPOCK2; SPON1; SREK1; SRRM4; SRSF7; ST8SIA6; STAMBPL1; STARD13; STX3; SUCLG2; SUMO3; SVEP1; SYCE1L; TAF15; TAF4; TBCCD1; TCEB1; TDRD9; TEKT1; TET1; TFDP1; TFDP3; THAP2; THSD4; TIGD3; TJP1; TLE4; TMBIM6; TMEM117; TMEM132C; TMEM132D; TMEM50A; TMPO; TMTC1; TMTC2; TNIK; TNRC18; TNS3; TOMM20; TPP1; TRIM2; TRIM44; TRIM69; TRMT5; TRPM3; TSPAN8; TTC23L; TUBA1B; TXLNA; TXNL4B; UBE2C; UBE2N; UBE2NL; UBE3C; UBQLN2; UBR1; UBXN6; UCK2; UHRF1BP1L; ULK4; UNC13C; UST; VAPA; VPS13D; VTI1A; WBSCR17; WDFY3; WDR64; ZBTB20; ZC3H6; ZDHHC21; ZDHHC7; ZFH2; ZKSCAN1; ZMIZ1; ZNF384; ZNF398; ZNF438; ZNF440; ZNF503; ZNF521; ZNF536; ZNF557; ZNF577; ZNF710; ZNF711.

## ANEXO VI: CLUSTERS



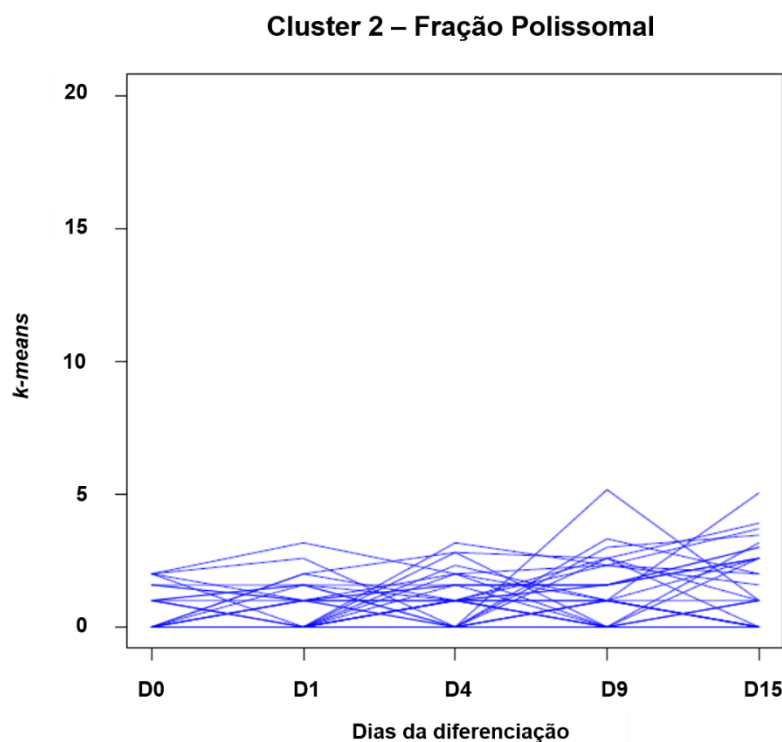
### Genes do Cluster 1 da FP

POLR2J; HEATR5B;  
 DYRK4; ABHD5; NCDN;  
 GRAMD1B; SNAPC1;  
 GCLM; HSF2; MIPEP;  
 PEX3; AGA; MED17;  
 ZIC2; SDCCAG8;  
 ZNF275; CDON; FAR2;  
 ZBTB11; EVI5; IFT80;  
 GNB5; RAB27A; MNT;  
 SREBF1; EED; TUBE1;  
 SLC25A40; KLHL20;  
 RUNX1T1; CDC14A;

SMARCA2; RSBN1; ZNF510; PIBF1; KIAA1467; MAPRE3; TFAP2C; DOCK3;  
 PPP1R13B; YPEL3; EFN1; CCDC80; HAUS4; RNF31; CLSPN; GPATCH2;  
 MAP3K1; MRPS18A; HMOX1; ALKBH1; KIAA0247; BRMS1L; METTL4; CEP76;  
 ANKRD12; GPR143; PRPS2; WDR13; SCML2; CENPT; CSPP1; BBC3; GTPBP10;  
 CAV1; MET; MOSPD3; USP42; FSD1L; TLE4; DKK1; TBC1D12; FBXL20; INTS2;  
 CAMTA2; LGALS3BP; CNTNAP1; PPP1R9B; ELP4; CPT1A; AIP; ITFG2; C12orf57;  
 FAM65B; SMAP1; HECA; GMDS; CLK4; NR3C1; TRIM23; TBCCD1; BCL6; WNT5A;  
 HES1; PLCH1; STAM2; ACVR1; COQ10B; SLC25A12; GADD45A; RGS2; WARS2;  
 VAMP4; MAN1C1; NENF; DDX59; FOXO3; KLF9; SLC17A5; KBTBD7; EPHX2; COIL;  
 MND1; PAPD5; PIK3CA; TMEM54; CLCC1; CXCR4; FAM35A; ITPR2; PARD6B;  
 RAB22A; DDX31; EML2; AHDC1; ZNF384; SGPP1; RAP1B; GNAI1; ZFP36; DOCK4;  
 E2F8; CDKN1C; SGOL1; MOSPD2; TULP4; HRC; TAF4; ZNF236; PEX11B; RHPN2;  
 VPS13B; MATN2; C12orf29; TMTTC1; RNF122; TTC9; MED6; VAV3; SPIRE1; BIVM;  
 APC; TBX3; PPP1R1A; ARMC9; TNS3; ZFH2; TANK; HS6ST1; GOLGA1; PGBD1;  
 FHDC1; FCHSD2; ARRB1; RAB30; MAPKBP1; SEMA6D; BCAR3; CEP55; HERC3;  
 CCNG2; PRICKLE1; AMIGO2; GAS2L3; GRTP1; FRMD6; ZNF710; HUNK; IFNAR1;  
 TMEM50B; PEX14; BCL10; USP21; CEP170; ZC3H8; RABL3; MEGF10; TPBG;



TIAM2; ZNF92; LACTB2; ZNF7; SURF2; TAF5; SLC43A1; NPAT; HNMT; PRSS23; PTS; ITPR1; SRFBP1; VTI1A; XRCC4; MBNL1; DAB2; AHCTF1; ANKH; SORBS2; CYP2U1; FCHO2; LRP8; PSMG3; RCAN1; HLCS; GNE; KALRN; SLC37A1; ZNF577; FMNL3; NEXN; KCNT2; SLC30A7; IER5; CCNYL1; ELF3; IFI16; PPM1K; SNRK; SNIP1; PGGT1B; DCBLD1; CHMP4C; OXR1; SLC25A32; NFIL3; ZHX1; KIAA1462; SLC39A13; IDH3A; AKTIP; NCKAP5L; FTH1; C2CD3; LMBRD1; IRF2; SNTB2; LRRC28; E2F6; MN1; EFNA1; SNUPN; CKAP2L; PCDH7; PRDM10; FOXN2; MINA; MTM1; SOCS5; C1GALT1C1; MORN4; SCAND1; CHST11; POLR1C; FRMD5; FAM21C; CBWD1; NADSYN1; NBEA; KAT5; TNFRSF10D; CCDC106; C11orf80; RGMB; C12orf76; HRAS; VCIPI1; YPEL2; DDIT3; GOLGA8A; LSM1; BAIAP2; ZDHHC21; DEAF1; ZBTB38; JUN; THAP5; ERN1; ZHX2; TMTTC2; BBS10; LRRC57; GINS3; TNRC18; BGN; GAS6; TTC32; VPS33B; PLA2G6; ZFP1; INTS5; WBSCR17; THNSL1; TRIM69; IRS2; GNG2; LYRM7; LYPD6; RSBN1L; EPOR; B3GALTL; THSD4; ZC3H6; LIN54; XPNPEP3; ZNF124; TSC22D2; ZNF605; SIAH1; FAM3C; ADARB1; COL13A1; MIB2; TTC30A; CEP290; ZNF521; SFMBT2; L1CAM; L3MBTL3; ARM CX6; TATDN3; CHIC1; RUFY2; FAM155A; C6orf136; GOLGA8B; FNIP1; RDH14; SPON1; LIX1L.

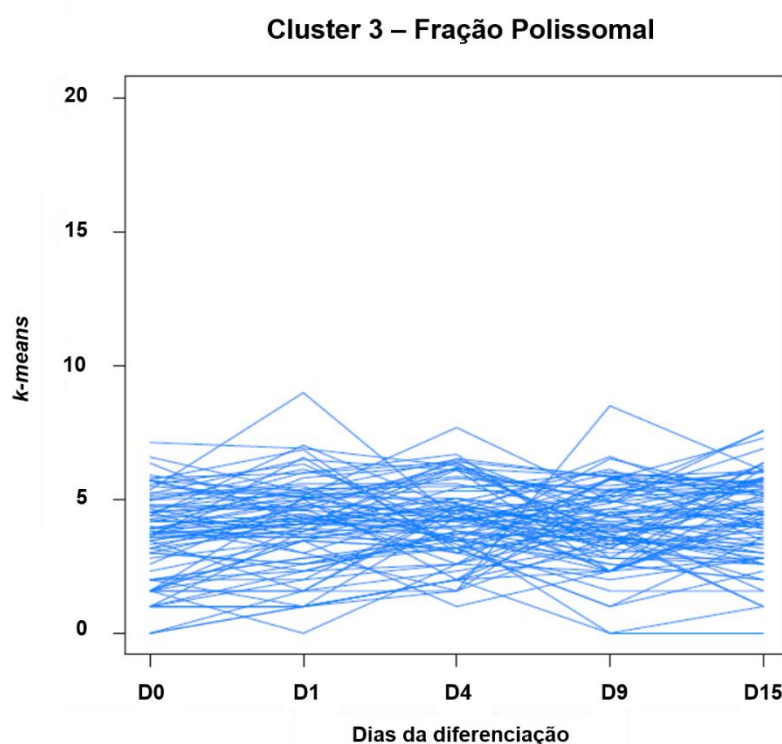


**Genes do Cluster 2 da FP**

HOXA11; PCDH11Y;  
 BPI; HTR2A; CD5; CD69;  
 RFX4; TSPAN8;  
 ALOX5AP; IL2RA;  
 HORMAD1; S100A7;  
 C15orf26; TDRD9;  
 MS4A1; WDR64;  
 LMOD3; TMEM174; EN2;  
 NLGN4Y; MBL2; TEK1;  
 SFTP B; DYDC1; C3AR1;  
 GPR149; FCER1A;  
 C11orf42; RNASE10;

TFDP3; PRAME; ZNF536; EIF1AY; MRPS18B; SERPINB5; PFDN6; MDC1; C6orf136; PPP1R10; BRD2; FKBPL; MRPS18B; C6orf136; FKBPL; MDC1; PFDN6; MDC1;

MRPS18B; MRPS18B; PPP1R10; MDC1; MRPS18B; BRD2; FKBPL; PPP1R10; MDC1; PPP1R10; C6orf136; C6orf136; MRPS18B; MDC1; BRD2; BRD2; PPP1R10; BRD2; PFDN6; BRD2; C6orf136; MDC1; C6orf136; PFDN6; PPP1R10; PIGY; KLRF2; SNTB2; CLK2; ANO4; KIAA1147; IFNGR2; LSM14A; TMEM50B; KRT23; FSBP; LUZP6; RP11-133L19.3; AC001228.1; NLRP2; PTPRK; ANTXRL; CFD; NLRP2; CISD3; ITPK1; PRAME; NLRP2; NLRP2; KLF13; NLRP2; NLRP2; SDCCAG8; FAM60A; MYH11; SLC12A7; APBA1; HRAS; RAD17; CEP170; TAF15; NALP2; BTBD7; CDK7; SERPINA1; TJP1; WNT3; WNT3; AC018901.1; PRICKLE4; RRN3; NLRP2; NLRP2.

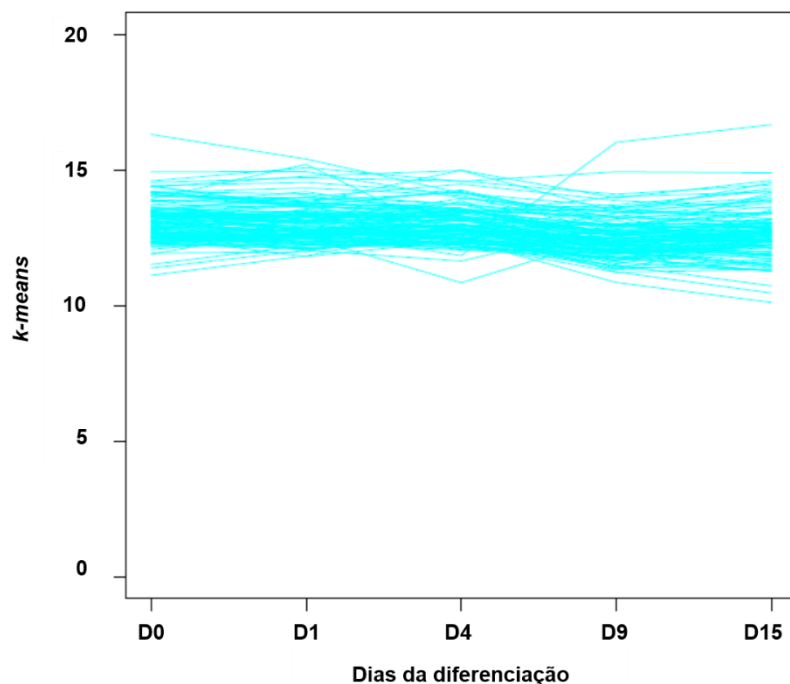


**Genes do Cluster 3 da FP**

FGR; FMO1; CP; SPI1;  
 NAV3; DCT; CDH7;  
 NOS1; POLR2F; PXMP4;  
 FGF14; AMH; AREG;  
 SLC1A2; PRMT8; OAS2;  
 BTN3A3; B3GAT2;  
 AGXT2; CNTN3; MPL;  
 CASQ2; ENOX1;  
 TNFAIP6; F13A1;  
 PCSK2; RHOJ; NRL;  
 MYH11; ALDOB; NOV;  
 ARHGAP20; UNC13C;

GCOM1; SSTR1; KCNH5; DOK2; SNTG1; CBWD5; KIRREL3; CNTN5; PTPRO;  
 RABGEF1; ADAMTS5; CLIC2; SORCS3; HYDIN; KCNJ6; CYP3A4; AQP5; ELAVL4;  
 NDST3; IL15; MT1E; FRMPD2; EMX2; NPTX1; PDE7B; IL16; AGXT; FAM71D;  
 HPSE2; TIGD3; PODN; CST6; ACOT4; NAALADL2; ZBTB20; KCNIP1; ANKS1B;  
 GTF2IRD2; CYP2B6; CR1L; CFD; COL15A1; SYCE1L; MT1H; TTC23L; ATP10A;  
 AC009961.3; GNG10.

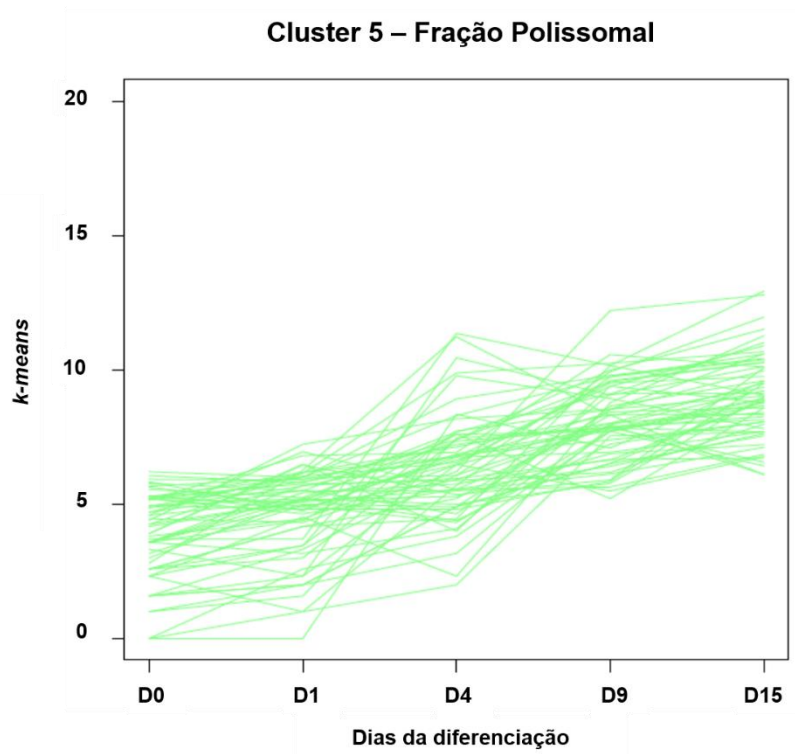
### Cluster 4 – Fração Polissomal



### Genes do Cluster 4 da FP

AP2B1; RPS20; HMGB3;  
 PSMA4; DSG2; EIF4B;  
 ATP1B3; RAB7A;  
 TM9SF3; FGFR1; PCNP;  
 NFE2L1; TNPO1;  
 SEPHS1; SF3B2;  
 DYNLL1; PAPOLA;  
 CDV3; ARCN1;  
 HNRNPH3; ERH; APEX1;  
 PNN; TPD52L2; VAPA;  
 STAG2; TSC22D1;  
 RAB11A; PPP2R1A;

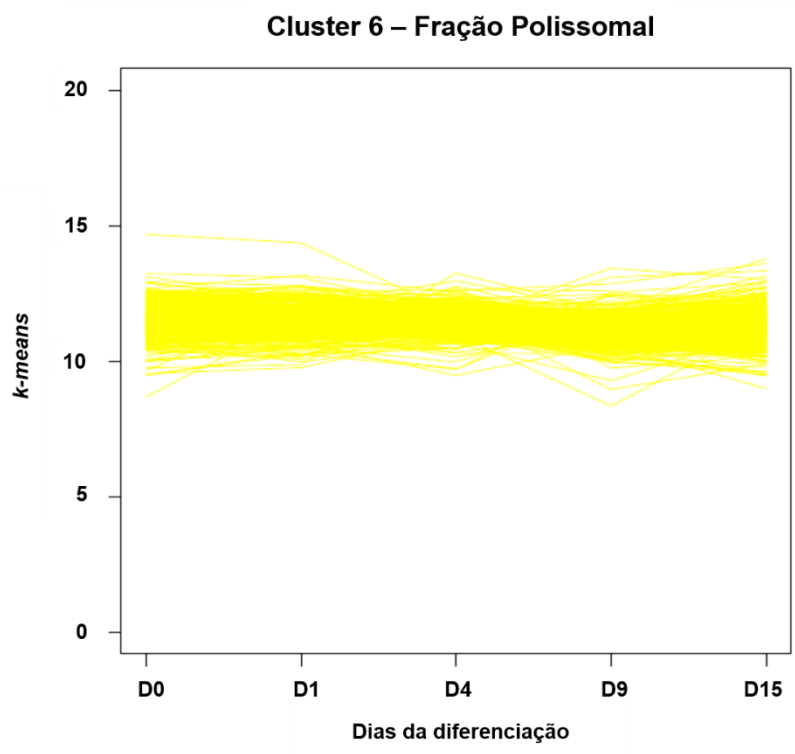
MTPN; NUFIP2; COL1A1; WSB1; PTGES3; SLC38A1; RAB5B; GAPDH; MCM3;  
 PTP4A1; C6orf62; QKI; GOLPH3; SKP1; NKTR; NCL; SPTBN1; FN1; SF3B1; SRSF7;  
 TIA1; IVNS1ABP; SLC2A1; PRDX6; OSBPL9; MED28; RPN2; CCNI; RAD23B;  
 RBM25; ZMYM2; CBX3; MORF4L2; CNOT1; SNRPB; HNRNPR; UBA2; PODXL;  
 MLLT4; PXDN; RBM39; NDFIP1; TOP2A; RAN; PCNA; NASP; SLC38A2; UBQLN1;  
 CAPRIN1; RAC1; ATP6V1G1; YAP1; ABI2; FAM60A; TMBIM6; SERF2; TSPAN3;  
 TPM1; MFGE8; APP; SERBP1; ANP32E; ENSA; ARF1; CELF1; SAP18; AZIN1;  
 SLC16A1; FZD7; CALM3; STT3B; WDR82; HMGB2; RPS14; HNRNPK; PDIA3;  
 ZNF146; CLIC4; YWHAG; TMED10; ARL6IP1; DCP2; TOMM20; AKIRIN1; RPL15;  
 GRB2; ZNF664; NPM1; ATP6AP2; KPNA2; TMEM50A; XPOT; H1F0; PCBP2;  
 MGEA5; CTNND1; CALM1; BRD2; IPO7; PEG10; LSM14A; TAF15.



**Genes do Cluster 5 da FP**

PDK4; DCN; GPRC5A;  
 FOXC1; REEP1;  
 SEMA3C; PHACTR3;  
 C20orf24; CAPS; APBA1;  
 KRT23; RAI1; INPP4B;  
 ARHGDI3; PDE4D;  
 IL1R1; HOXB3; KCNJ5;  
 UNC5CL; ALDH1A2;  
 AOC3; PTPRE; GSTM3;  
 HLX; FOXF2; TMEM117;  
 RHOF; MBNL2; RNF165;  
 AHSG; C10orf11;

AKAP6; SH3RF2; FBXO32; NFIA; FAM84A; MSX1; BAALC; ZNF503; ASPG; MUC15;  
 TM4SF1; HOXB9; PRKCE; FGB; HOXB2; NR2F1; C10orf71; GATA2; GAS1; MUC16;  
 SLC8A1; CCDC60; TACSTD2; GAS2L1; SERPINA1; DPF3; DIO2; CEBPD; CEBPA.



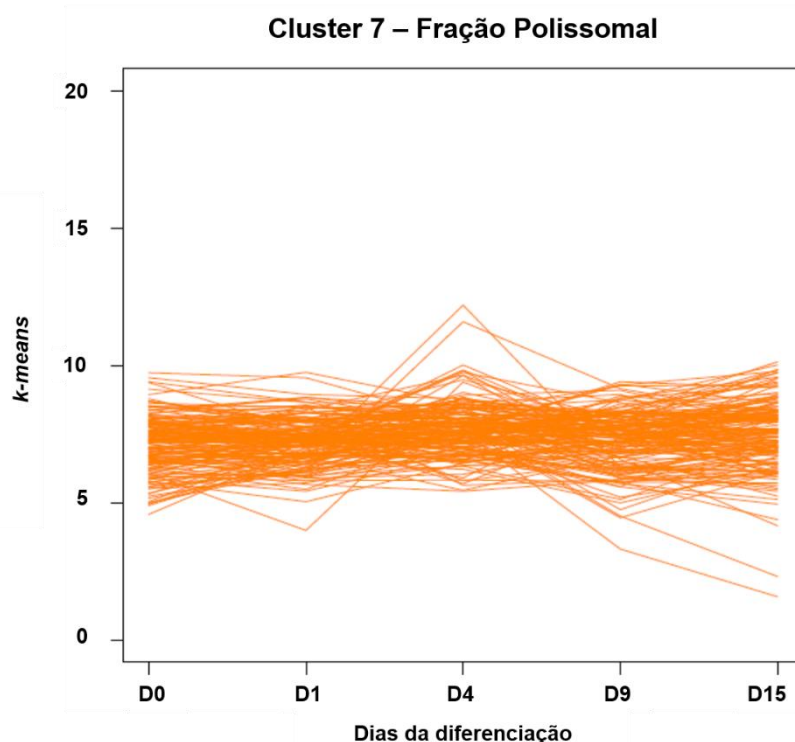
**Genes do Cluster 6 da FP**

GCLC; RBM6; MARK4;  
 KIAA0100; UBE3C;  
 VTA1; STARD3NL; CD9;  
 NISCH; MBTD1;  
 PIK3C2A; SNX1;  
 SLC39A9; NUP160;  
 ADSS; TRIO; POLR2B;  
 GOPC; RRM2B; CELF2;  
 TTC17; FOXN3; KIF1B;  
 CUL1; PUM2; GYG2;  
 PPP1R12A; ALDH18A1;  
 MRPS35; HIPK2; SPEN;

ZC3H15; TBC1D1; PPP2R5A; ARFGEF1; IDI1; IARS2; CBF3; ACSL4; MAPK6;  
 FBXW11; PICALM; C17orf85; ZNF532; EIF4G3; USP33; UBE2A; PPP2R5C; MLLT10;

PCM1; RIF1; RAB21; CDC14B; CCNT2; CHMP2B; SCAMP1; EPS15; ZFAND6; RPL6; RCOR1; PABPC4; TNRC6A; TXNL1; ITGA6; SPAG7; SIRT1; RAB18; H2AFY2; MKNK2; MAPK1; GTPBP1; CYB5R3; SAMM50; RBM23; AHSA1; DICER1; ARHGAP5; ZMYND8; CDS2; POFUT1; MIB1; FMR1; PIM2; PCYT1B; ARMCX3; STK24; FLT1; CTCF; WDR59; GSPT1; CD276; TJP1; EIF3J; RAB2A; MCM4; ASAH1; BNIP3L; CLPTM1; GSK3A; PMPCB; LMBR1; GRB10; ZKSCAN1; WASL; LSM5; C1GALT1; TMEM106B; POLD2; PLEKHA1; SH3PXD2A; SMC3; TFAM; CCNY; ZMIZ1; MED13; BLMH; CPE; RAPGEF2; FNBP4; SUV420H1; RSRC2; KRT18; PPM1H; FOXM1; ARPC3; DUSP16; GOLT1B; CCNC; PPP2R5D; SENP6; PFDN1; HMGCR; C5orf15; LIFR; SMAD5; ATP6V0E1; STC2; PDCD10; ACVR2B; WDR48; ABCC5; WDR75; HSPE1; KDM3A; ID2; PRKD3; ATF2; NFE2L2; RALGPS2; PHF13; CD46; APOA1; CREB1; PPP6C; MAPKAP1; DLST; ATL2; SMNDC1; ENY2; HSPH1; KDM3B; TMPO; NFYB; TARDBP; KIAA1191; RBBP6; ZNF644; VPS26A; TUBA1B; CKS2; STX16; STAMBP; NUP153; TM9SF2; MRPS26; HP1BP3; ECHS1; DUT; PHF10; AKAP12; CHMP1A; SH3BGRL; DNAJB1; UBE2G1; ZRANB2; PTPRA; SERINC3; SRRM1; MKRN1; BTG1; ARL8B; PPHLN1; FBXO18; PUM1; TMEM165; COL4A2; ARGLU1; FBXO21; SYNCRIP; ACVR1B; CAB39; ISCU; SPRY2; IREB2; EPRS; KCTD3; ANP32B; DCUN1D5; CTDSPL2; SLTM; NUSAP1; FNBP1L; RABGGTB; ATAD1; TACC2; TET1; KIAA1109; SCARB2; ETNK1; NUPL1; ESD; DCAF5; NIPA2; TCF12; BNIP2; SCAMP2; FANCI; CMTM3; NPEPPS; EIF4A3; CSNK1D; MTF2; ATP1B1; POU2F1; SF3B4; LBR; RHOB; EML4; FAM134A; CTDSP1; RQCD1; LPP; PAM; SLC30A5; PNRC1; TMEM181; WTAP; PURB; SNX12; ATP6V1B2; CCDC25; SLC25A37; MTDH; POLR2K; STOM; PARD3; HERC4; ADD3; TCF7L2; ADM; HSD17B12; PAK1; CPSF7; LSM14B; DOCK1; DLAT; CDC123; THYN1; FARP1; PTPRK; RANBP2; RBMS1; CFDP1; ZDHHC7; SREK1; BUB3; TCEB1; CXADR; PPP4R1; ANKRD40; AGPAT5; OXA1L; CNOT8; NUP205; BACH1; ZFAND3; HIAT1; CCNB2; DYRK1A; WIPI2; WASF2; TMED4; CACHD1; UBE2Z; RRP1B; MCM3AP; PRMT2; SHC1; MGAT4B; MYSM1; USP1; ZNF326; CAPN2; SMARCAD1; RPL22L1; PTPN13; TOPBP1; ZDHHC3; SENP2; RFC4; BAP1; GNL3; SLBP; PGRMC2; OTUD4; STARD4; PRRC1; CASP3; DDX21; CPSF2; TRIM44; TPP1; WEE1; AP1G1; FAM96A; NAV2; PATL1; STX3; MRPL16; PBX3; UBTD2; SLC20A2; CHTF8; UBE2V2; SIN3A; BUB1; ROBO1; KLF13; NLGN2; PDCD6IP; CDK1; KIF5B; KBTBD2; TRIAP1; FAM98B; BCL2L1; CLSTN1; ATF7IP; ZNF217; JMJD1C; ORMDL3; CHD2; PITPNA; UBE2C; SMAD2; CCDC14; RAB6A; CHD9; NR2C2; UBE2N; C14orf119; ZNF609; PAK2; PITPNB; MRPS23; YIPF6; CREB3L2;

SHMT2; TRAK1; CADM1; BCOR; SETD3; RBM33; ARMCX2; SUMO3; BRWD1; GPATCH8; BCR; TCEA1; LIN28B; MCERS1; SUMO2; ZNF292; PNRC2; ZBTB44; WDR5; TRRAP; EPHB4; NCOR2; PRPF40A; NF1; SLC39A10; SVIL; TRIM33; CD2AP; TFDP1; TLK1; OPA1; TOP1; PJA2; GDI1; MRPS18B; PPP1R10; LGR4; SNX2; RNPS1; NDUFS3; RPS29; FIS1; PRKDC; MEX3A; RBM15B; SMEK2.

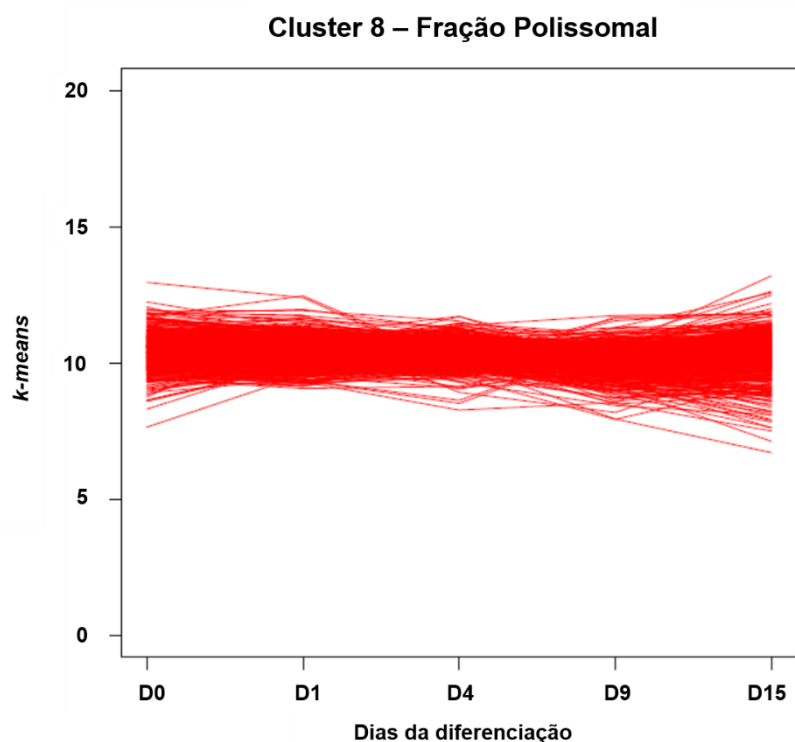


**Genes do Cluster 7 da FP**

NRXN3; FAS;  
 ADAMTS6; OPN3;  
 KCNAB2; CLEC2D;  
 SLC6A15; NTN4;  
 FOSL2; OSBPL6;  
 RABL2B; COBLL1;  
 TRPM3; ALG9; DLL3;  
 MYO3A; AP4S1;  
 RPS6KA5; KIAA0391;  
 KLF5; IQCH; SPAG1;  
 CCDC61; SLC1A1;  
 MEGF9; ATRNL1;

CDH23; SPOCK2; CPEB3; EBF3; SORCS1; WNT3; MED31; PMP22; FAM149A; NRXN2; PTPN5; TENC1; AIM1; FAM46A; ARL6; TFDP2; PARD3B; F3; KLHL29; CNNM1; DEPDC7; RWDD3; ACADS; NR4A1; ARHGAP22; USP6; FOXA1; DPP6; ZNF557; HIP1R; HSD17B7; PCBD2; STARD13; GRHL1; ANKRD16; TEC; KCNK1; ZFP37; POU2F3; STAMBPL1; EXOC6; CPNE8; ALG10; LGR5; SRRM4; AK7; TXNL4B; ZFH3; SLC13A5; GABPB2; WNT9A; NFKBIZ; SNCA; TIFA; UGT3A1; EGFR; ZC3HAV1L; FBXO10; GBGT1; ST8SIA6; HTR7; MPZL2; ARID5B; DLG2; THRB; MIPOL1; ANO4; TMEM132D; HHEX; PLA2R1; DGKE; ABCA5; L3MBTL4; TMBIM4; ZNF230; KLHDC9; DISC1; ARHGAP25; HESX1; PITX2; ITGA2; RNF180; SLC35A1; GKAP1; SVEP1; AQP3; PRPF18; SERPINB8; YPEL4; SGSM1; ULK4; LTBP3; FAM103A1; ZNF440; PAH; FBXL14; PDE3A; SMPDL3A; ABLIM3; THAP2; PDIK1L; CCNE2; B3GNT5; GSG2; ALS2CL; NDUFV2; FJX1; HIST1H2AC; TMEM132C; RELL1; NTM; ZNF438; JAG2; PARK2; PRKG1; NRG3; IFIT1; AGLB4;

C6orf1; FAM72B; SH2D5; IL1RAP; ZNF585A; RAD54B; MAFK; RYR3; FKBPL; SPIRE2; VGLL3; FAM19A5; ERCC6; FAM133B; UBE2NL; CISD3.



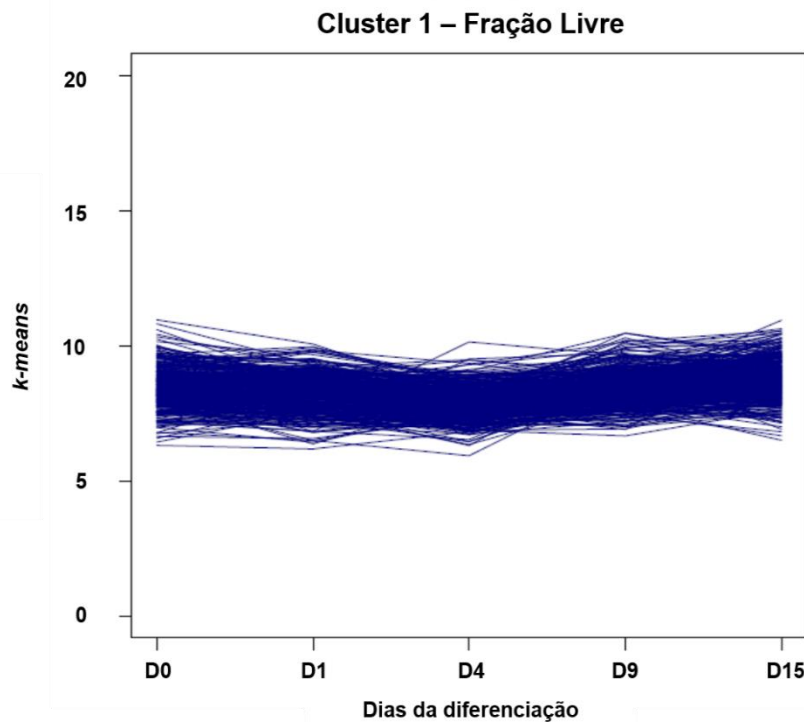
**Genes do Cluster 8 da FP**

NFYA; KRIT1; TFPI;  
 CDC27; RPAP3; ZFX;  
 ZNF263; DBF4; COX10;  
 PROM1; SS18L2; CRY1;  
 BTBD7; AKAP8L;  
 RNF216; MAP4K3;  
 CLK1; ZMYND11;  
 SPAST; NLRP2;  
 ZDHHC6; IFNGR1;  
 TBPL1; RNF19A;  
 DEPDC1B; TBC1D23;  
 MFAP3; FAM65A;

DCUN1D1; VPS13D; BCAR1; PIK3CB; MPHOSPH9; ARID4B; FAM168A; ATP11B;  
 SFSWAP; MON2; MTMR1; ASB1; FAM107B; ATXN3; TP53BP1; INPP5A; RAD18;  
 SNX13; SEL1L; TRIB2; NLE1; SDHA; FNDC3B; RBM7; DYNC1I2; ARAF; ACER3;  
 NDC80; MRPL22; ERC1; PALB2; BCKDHB; PDS5B; CYLD; TXLNA; NCOA1; RRN3;  
 DDHD2; NLK; PGS1; L2HGDH; GMCL1; AURKA; DOCK9; ATRN; MAPKAPK5; ESF1;  
 IGBP1; PDCD7; EXOC1; RBM27; PUS7; G2E3; LRRFIP2; EPB41L4B; ERMP1;  
 SETD1A; MTAP; SNAP29; HMGXB4; SOS2; GNPAT1; SPTLC2; ITPK1; PPM1A;  
 NFKBIA; NDRG3; STK4; CSTF1; RAE1; SLMO2; SMAD7; NDFIP2; DNAJC3;  
 ARHGEF7; INTS6; MON1B; AXIN1; DTWD1; FZD3; UBE2W; INTS10; MPP6; RBM28;  
 AP1S1; GLCCI1; GLI3; RHEB; RIC1; NSMCE4A; LZTS2; GBF1; SHOC2; UNC119;  
 DCUN1D4; GAB1; TRIM2; EHD1; FOXRED1; FBXO3; PDHX; PRDM4; CAMKK2;  
 CDKN1B; DDX55; STX2; UHRF1BP1L; GNPTAB; FGFR1OP2; PAK1IP1; ASF1A;  
 UST; MRPL18; RNF8; E2F3; PHACTR2; TBP; EXOC2; TTK; RAD1; SLC12A7;  
 RAD50; CPEB4; CRBN; AMOTL2; TUSC2; SNX4; FOXP1; ADAM23; RTKN; GCA;  
 STAT1; UNC50; PNO1; STXBP3; EDEM3; RAP1A; MEF2D; SSX2IP; TMED5; SYF2;  
 SLC35A3; NSL1; STX12; FBXO30; CTGF; RAB3GAP2; ELL2; UBE2B; VPS4B;  
 YIPF4; NUDCD1; MASTL; ELF1; NR2C1; ZNF706; AKAP1; NCAPH; ECHDC2;

ZNF639; UBL3; RBM19; RASSF8; BAZ2B; CHPF; NCOA3; ARFGF2; CDKN1A; RIOK1; PANK2; BMP2; ELK1; TRMT5; RHOT1; RAB3IP; YEATS4; CASD1; PPAT; KLHDC10; PSMG2; TTBK2; FAM63B; FAM64A; FXR2; CCNT1; NGDN; PARP2; MRPL34; RAB11FIP4; RLIM; MRPS25; WDR44; PRKAA1; KIAA0907; COG6; RFC3; IMPA1; SWAP70; SBF2; IER3IP1; CDK7; THUMPD3; VHL; EDEM1; PTGFRN; ROCK2; FST; KIAA1468; PHC2; CDCA8; RNF138; WDR36; ISCA1; TES; PHF21A; LTV1; CEP350; REV1; EPC2; PWP1; NEK3; MED4; CALCOCO2; STAM; C9orf78; STX17; PDCL; DNAJB5; DENND4C; PIM1; TMEM63B; MDC1; CREBZF; TGS1; PARP6; GTF2B; DBT; CENPO; KIF11; SLC35A5; USP8; TMOD3; GSTCD; B4GALNT3; DUSP6; SLC7A1; SMARCC2; SBNO1; SETD1B; ABHD13; PELI2; WDR20; MFAP1; TLE3; ABHD2; PLK4; ITGB3BP; CYR61; UCK2; NUF2; ABL2; TOR1AIP1; MBOAT2; AMMECR1L; KIAA1715; SPAG16; OSBPL10; CTDSPL; TMF1; ABHD10; ATG3; USP53; FBXO38; RMND5B; NLGN4X; CASK; ZNF711; FBXO25; CHMP7; UGCG; CAMK2G; FRA10AC1; CCDC82; CHEK1; MTMR12; TIMM8B; SLC7A11; ANK3; EIF4E; CSNK1G3; MBIP; ANKRD50; NCAPD3; BICD1; SAV1; C18orf25; USP12; SLC30A6; PANK1; RAD17; BCL2L11; CHD1; TNIK; OTUD6B; MIER3; SLC26A2; DCK; SAMD8; BUB1B; APPL1; ETS2; WDR19; AGAP1; NCK1; ZC3H18; CDC42SE2; IFNGR2; MORC3; HK2; UBR1; TMEM69; ZNF714; SIK3; PCSK7; SLC25A44; CCDC12; UBQLN4; NXF1; LRP5; C1orf52; PAQR3; LRRC58; CLASP2; WDFY3; KIAA1143; ZNF148; PRKCD; DNAJB14; AGGF1; RICTOR; PAPD4; UBLCP1; SAP30L; BRI3; FZD6; INTS8; KIAA1429; PCF11; ZMYND19; TMEM55B; TRUB1; BRD7; FRS2; CUL5; CENPN; TMEM41B; CASC4; SMAD3; UBXN6; TMEM68; RAB4A; IRF2BP2; CDKN2AIP; ZNF507; GFM1; DHRSX; NIPA1; PWWP2A; FOS; DENND5B; PFKFB3; SOCS6; AKAP13; USP32; RNF139; MFN1; PGAM1; CHD7; WIPF2; PTEN; PPIH; PAIP1; ZNF131; SUCLG2; GNG12; TMCC1; DMXL1; MYD88; NUDT4; RNF213; GOLIM4; KLHL15; LEMD3; ZWILCH; ANGEL2; B3GNT1; PPP2R2D; ETV4; CLK2; BOK; ANKLE2; ZBTB34; RPS6KA3; ZBTB33; PVRL3; ARL6IP6; FBXO34; CCDC43; NRIP1; C5orf24; TRAPPC6B; ACBD3; KIAA2026; TBK1; CHEK2; RBM12B; TM2D3; NELL2; ATL3; PTCH1; MKL2; FAM122A; UBQLN2; PLSCR1; CHM; MPHOSPH8; NIF3L1; PTPN1; EVL; TCF4; TRAPPC4; VKORC1L1; STRN3; PPTC7; NHLRC2; ZNF398; MAFG; RPE; NOL8; MIER1; ITSN2; SLC9A6; CTR9; LRIG2; MAP3K3; SGMS1; CHML; PHACTR4; PFDN6; RAB12; PTPLB; SACM1L; EMP2; VAMP2; PARG; HMBS; KIAA1147.



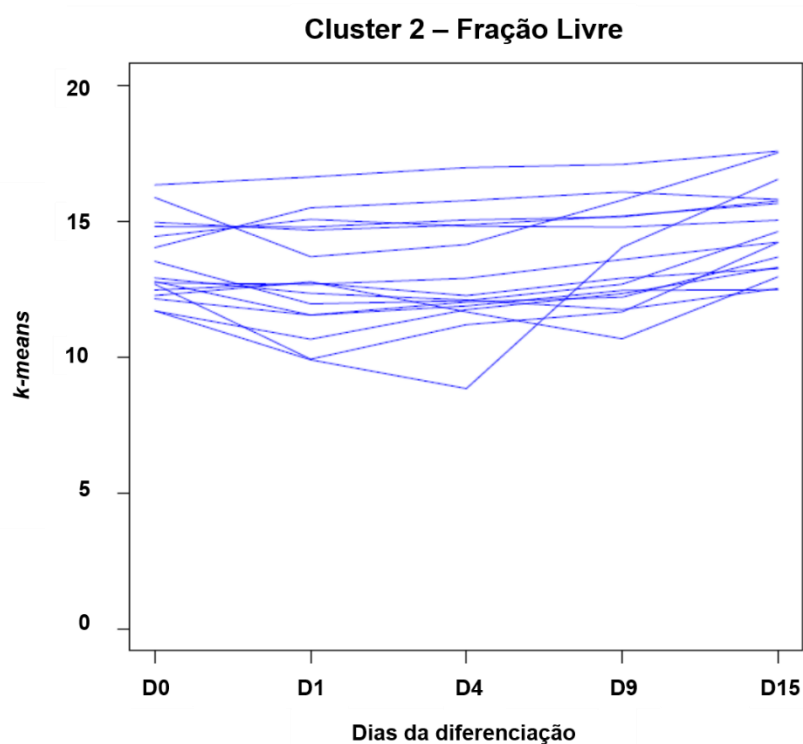


**Genes do Cluster 1 da FL**

TFPI; RBM6; AP2B1;  
 ZNF263; COX10;  
 MARK4; SS18L2;  
 VTA1; DYRK4; CD9;  
 NISCH; AKAP8L;  
 NLRP2; ZDHHC6;  
 SNX1; TBPL1;  
 NUP160; ADSS; AGA;  
 DSG2; TTC17; FOXN3;  
 CUL1; ALDH18A1;  
 MRPS35; SFSWAP;  
 SPEN; ZC3H15; ASB1;

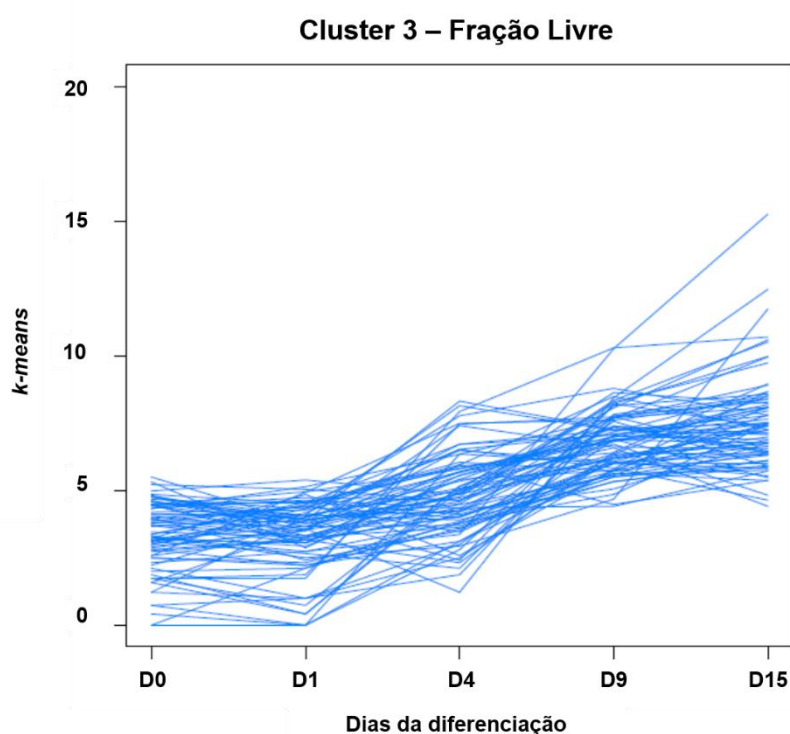
TBC1D1; PPP2R5A; ATXN3; IDI1; IARS2; INPP5A; NLE1; SDHA; ZNF532; RBM7;  
 TM9SF3; UBE2A; MLLT10; PCM1; MRPL22; NFE2L1; ZFAND6; PGS1; SF3B2;  
 AURKA; MAPKAPK5; TNRC6A; DLL3; CDV3; HAUS4; ARCN1; MRPS18A; RAB18;  
 H2AFY2; MKNK2; MAPK1; GTPBP1; HMOX1; AHSA1; ITPK1; PPM1A; NFKBIA;  
 ZMYND8; NDRG3; CSTF1; RAE1; CDS2; GPR143; WDR13; STAG2; PCYT1B;  
 NDFIP2; STK24; CENPT; WDR59; GSPT1; CD276; DTWD1; TJP1; EIF3J; FZD3;  
 RAB2A; INTS10; MCM4; BNIP3L; CLPTM1; BBC3; GSK3A; MTPN; GRB10;  
 ZKSCAN1; MOSPD3; AP1S1; C1GALT1; RHEB; NSMCE4A; LZTS2; CCNY; ZMIZ1;  
 NUFIP2; ELP4; FNBP4; KMT5B; FOXRED1; RSRC2; FOXM1; CDKN1B; SLC38A1;  
 RAB5B; FGFR1OP2; ASF1A; MCM3; RNF8; PTP4A1; QKI; TBP; HMGCR; GOLPH3;  
 RAD1; C5orf15; STC2; CRBN; PDCD10; HES1; ABCC5; NKTR; FOXP1; RTKN;  
 UNC50; PNO1; TIA1; NFE2L2; IVNS1ABP; GADD45A; CD46; SYF2; NSL1; OSBPL9;  
 CREB1; CTGF; DLST; RBM25; ATL2; SMNDC1; KDM3B; NR2C1; TMPO; TARDBP;  
 ZNF706; MND1; ECHDC2; ZMYM2; ZNF639; RBBP6; CHPF; RAB22A; STX16;  
 STAMBP; CNOT1; TM9SF2; EML2; PANK2; BMP2; HNRNPR; UBA2; ELK1; TRMT5;  
 RAB3IP; YEATS4; HP1BP3; ZFP36; DUT; PIMREG; NGDN; CDKN1C; AFDN; PXDN;  
 CHMP1A; SH3BGRL; MRPS25; NDFIP1; TOP2A; UBE2G1; ZRANB2; PTPRA;  
 KIAA0907; NASP; SERINC3; SRRM1; MKRN1; IER3IP1; THUMPD3; PPHLN1;  
 SLC38A2; PUM1; PHC2; CDCA8; RNF138; TMEM165; COL4A2; ARGLU1; UBQLN1;  
 ISCA1; SYNCRIP; PHF21A; PWP1; MED4; CALCOCO2; EPRS; C9orf78; PIM1;  
 CREBZF; DCUN1D5; YAP1; SLTM; NUSAP1; PARP6; ATAD1; TACC2; CCNG2;

FAM60A; DUSP6; SBNO1; ABHD13; GRTP1; DCAF5; SCAMP2; NPEPPS; EIF4A3; CSNK1D; PEX14; ITGB3BP; CYR61; MTF2; ATP1B1; UCK2; USP21; MBOAT2; RETREG2; CTDSP1; CNOT9; ATG3; SLC30A5; RMND5B; TPBG; PURB; SNX12; FBXO25; ATP6V1B2; CCDC25; SLC25A37; ZNF7; SURF2; HERC4; ADD3; HSD17B12; CELF1; PAK1; CPSF7; CHEK1; DLAT; PTS; MBIP; CDC123; THYN1; BICD1; FARP1; CFDP1; ANKH; PPP4R1; AZIN1; AGPAT5; CNOT8; FZD7; ZFAND3; MFSD14A; WIPI2; NCK1; WASF2; TMED4; UBE2Z; SHC1; CCDC12; NXF1; C1orf52; IER5; CAPN2; STT3B; PTPN13; ZDHHC3; SENP2; RFC4; BAP1; SLBP; UBLCP1; NFIL3; ZMYND19; TMEM55B; SLC39A13; BRD7; TPP1; TMEM41B; WEE1; STX3; MRPL16; PDIA3; PBX3; ZNF146; UBXN6; TMEM68; UBTD2; IRF2BP2; SLC20A2; CHTF8; DHRSX; UBE2V2; EFNA1; CLIC4; YWHAG; PDCD6IP; CDK1; FOS; KBTBD2; RNF139; MORN4; POLR1C; CLSTN1; ATF7IP; PTEN; PPIH; ORMDL3; PAIP1; DCP2; DMXL1; NADSYN1; THAP2; CHD2; CCDC106; PITPNA; C12orf76; HRAS; DDIT3; LSM1; ETV4; CLK2; BOK; ANKLE2; CHD9; GRB2; ARL6IP6; ZNF664; PITPNB; MRPS23; ATP6AP2; GAS6; SETD3; CHEK2; TM2D3; XPOT; RBM33; ARM CX2; BRWD1; TRIM69; GPATCH8; EPOR; TCEA1; MCRS1; FAM122A; PLSCR1; PNRC2; XPNPEP3; NIF3L1; ZBTB44; WDR5; EPHB4; SIAH1; NCOR2; PRPF40A; TRAPPC4; VKORC1L1; MIB2; MGEA5; CTNND1; ARM CX6; PFDN6; FKBPL; C6orf136; PPP1R10; SNX2; IPO7; RAB12; FAM19A5; VAMP2; RDH14; PEG10; PRKDC; MEX3A; HMBS; PPP4R3B.



### Genes do Cluster 2 da FL

RPS20; RPL6; APEX1;  
 GAPDH; PRDX6; RAN;  
 SERF2; TPM1; OXA1L;  
 RPL22L1; RPS14;  
 FTH1; RPL15; NPM1;  
 PCBP2; RPS29.

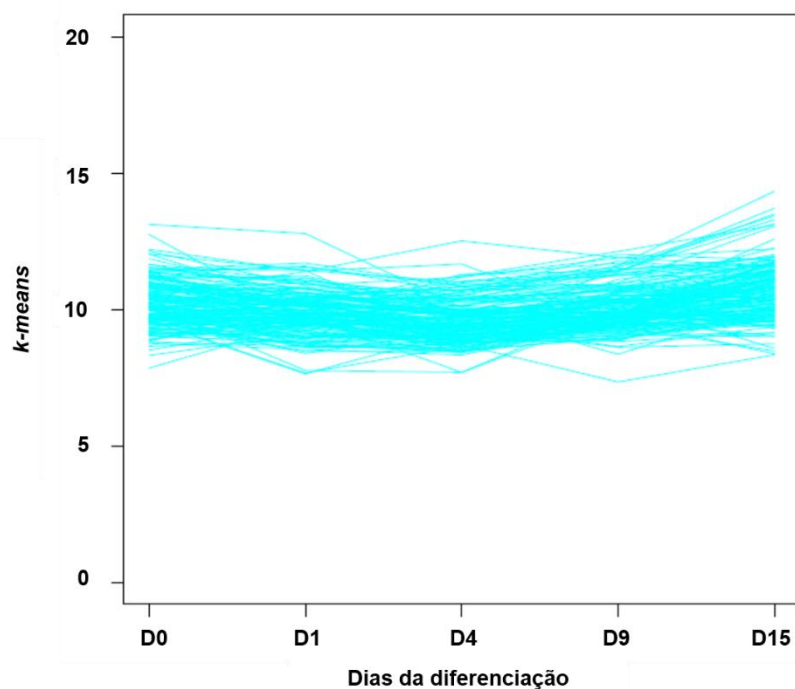


### Genes do Cluster 3 da FL

DCN; ADAMTS6;  
 OPN3; FOXC1; REEP1;  
 FOSL2; COBLL1;  
 MAPRE3; PHACTR3;  
 DOCK9; PPP1R13B;  
 EFN1; CCDC80;  
 SUSL6; AMH; CAPS;  
 KRT23; WNT3; RAI1;  
 PMP22; ARHGDI1;  
 FAM46A; PDE4D;  
 WNT5A; IL1R1; KLF9;  
 HOXB3; KCNJ5;

FOXA1; HRC; GSTM3; TBX3; HLX; FOXF2; MAPKBP1; SEMA6D; HERC3; MBNL2;  
 ZFH3; AHSG; TIFA; LRMDA; ITPR1; DAB2; SH3RF2; FBXO32; KALRN; NEXN;  
 ARHGAP25; IFI16; BAALC; ZHX1; ZNF503; KIAA1462; ASPG; TM4SF1; HOXB9;  
 PRKCE; FGB; SMPDL3A; ABLIM3; HOXB2; YPEL2; ALS2CL; GATA2; GAS1;  
 TNRC18; SLC8A1; CCDC60; ZNF438; TACSTD2; SERPINA1; COL13A1; ZNF521;  
 DPF3; CEBPA; LIX1L.

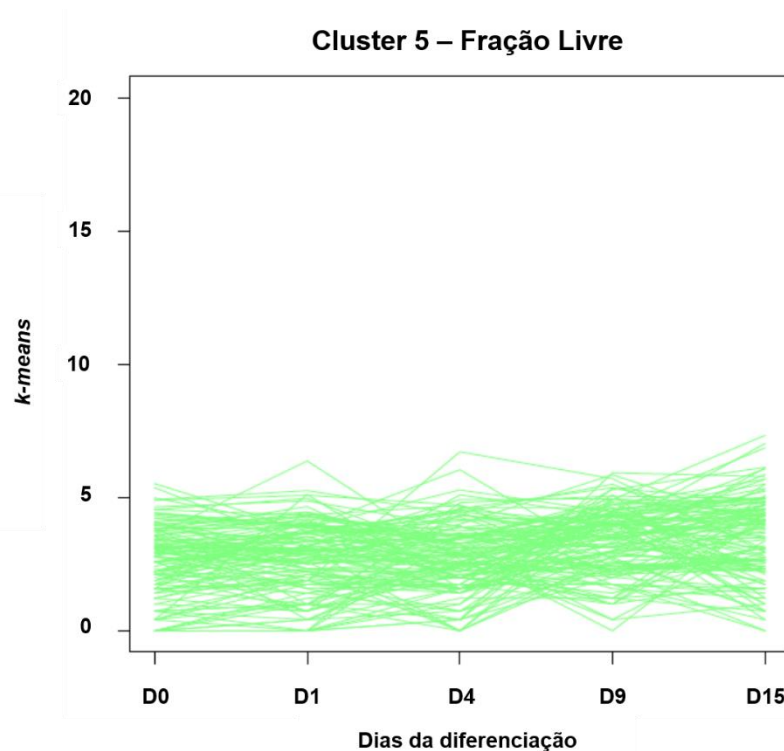
### Cluster 4 – Fração Livre



### Genes do Cluster 4 da FL

POLR2J; STARD3NL;  
 CLK1; HMGB3; PSMA4;  
 EIF4B; ATP1B3; RAB7A;  
 FGFR1; ARAF;  
 PPP2R5C; PCNP;  
 SEPHS1; DYNLL1;  
 IGBP1; PAPOLA;  
 YPEL3; PABPC4;  
 TXNL1; SPAG7;  
 HNRNPH3; CYB5R3;  
 SAMM50; ERH; PNN;  
 TPD52L2; VAPA; PIM2;

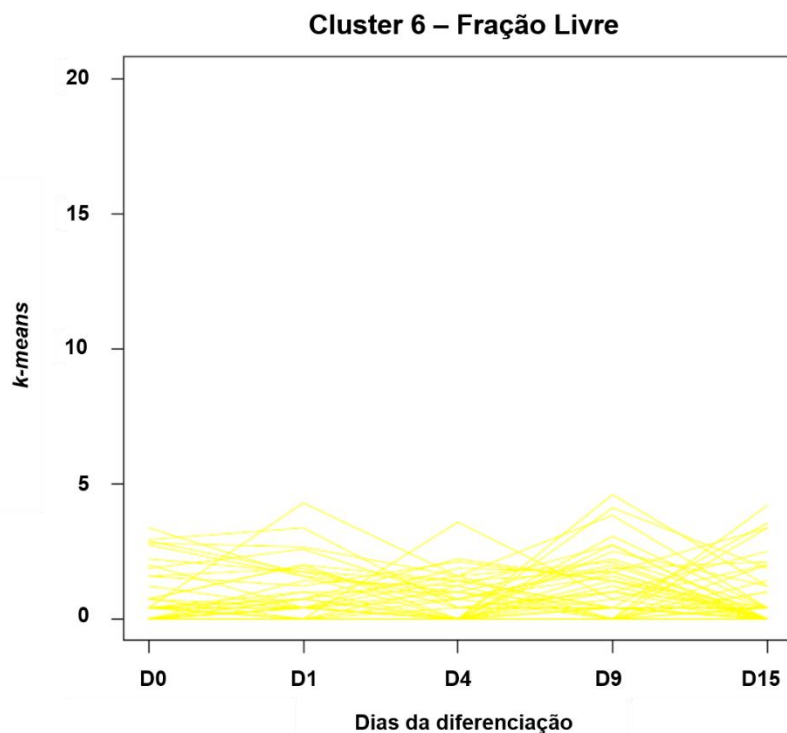
TSC22D1; RAB11A; ASAH1; PPP2R1A; PMPCB; LSM5; POLD2; BLMH; COL1A1;  
 WSB1; UNC119; AIP; PTGES3; KRT18; ARPC3; C12orf57; MRPL18; CCNC; C6orf62;  
 PFDN1; SKP1; ATP6V0E1; TUSC2; NCL; SPTBN1; FN1; SF3B1; HSPE1; ID2;  
 SRSF7; RAP1A; SLC2A1; NENF; APOA1; MED28; RPN2; CCNI; UBE2B; RAD23B;  
 PPP6C; MAPKAP1; ENY2; NFYB; TMEM54; KIAA1191; CBX3; TUBA1B; MORF4L2;  
 CKS2; CDKN1A; SNRPB; MRPS26; ECHS1; PODXL; PSMG2; MRPL34; AKAP12;  
 RBM39; DNAJB1; PCNA; BTG1; CDK7; CAPRIN1; PPP1R1A; ISCU; SPRY2; RAC1;  
 ATP6V1G1; ANP32B; RABGGTB; ABI2; TMBIM6; ESD; TSPAN3; MFGE8; CMTM3;  
 APP; SERBP1; SF3B4; ENSA; ARF1; RHOB; PNRC1; WTAP; POLR2K; ADM;  
 SAP18; TIMM8B; BUB3; ELOC; SLC16A1; CCNB2; PSMG3; IFNGR2; TMEM69;  
 CALM3; PRMT2; MGAT4B; GNL3; PGRMC2; HMGB2; BRI3; HNRNPK; PCF11;  
 CENPN; FAM96A; RAB4A; LRRC28; TMED10; ARL6IP1; TRIAP1; SCAND1; BCL2L1;  
 TOMM20; AKIRIN1; UBE2C; SMAD2; PPP2R2D; DEAF1; UBE2N; C14orf119;  
 SHMT2; KPNA2; TMEM50A; SUMO3; SMIM29; SUMO2; H1F0; EVL; TFDP1; CALM1;  
 GDI1; BRD2; MRPS18B; RNPS1; NDUFS3; FIS1; LSM14A; RBM15B; TAF15.



### Genes do Cluster 5 da FL

FGR; PDK4; FMO1;  
 GPRC5A; NRXN3; SPI1;  
 SLC6A15; NTN4;  
 SEMA3C; CDH7;  
 POLR2F; PXMP4; IQCH;  
 SPAG1; SLC1A1;  
 MEGF9; SPOCK2;  
 CPEB3; EBF3; SORCS1;  
 AREG; INPP4B; NRXN2;  
 SLC1A2; PRMT8;  
 BTN3A3; B3GAT2;  
 AGXT2; CNTN3;

PARD3B; KLHL29; CNNM1; ENOX1; PCSK2; RHOJ; ALDH1A2; DPP6; PTPRE;  
 STARD13; MYH11; ALDOB; NOV; UNC13C; GCOM1; CPNE8; ALG10; TMEM117;  
 LGR5; GAS2L3; SSTR1; WNT9A; EGFR; ZC3HAV1L; DOK2; SNTG1; CBWD5;  
 ST8SIA6; KIRREL3; CNTN5; ARID5B; AKAP6; ANO4; TMEM132D; PLA2R1; ABCA5;  
 ADAMTS5; SORCS3; KCNJ6; ELAVL4; NFIA; DISC1; FAM84A; LMOD3; NDST3;  
 IL15; ITGA2; RNF180; SVEP1; MUC15; FRMPD2; DYDC1; MTM1; NPTX1; PDE7B;  
 IL16; AGXT; PDE3A; FAM71D; HPSE2; TIGD3; PODN; CCNE2; CST6; NR2F1;  
 C10orf71; ACOT4; NAALADL2; MUC16; TMEM132C; ZBTB20; RELL1; KCNIP1;  
 NTM; ANKS1B; PRKN; NRG3; THSD4; IL1RAP; GTF2IRD2; ZNF585A; MAFK; RYR3;  
 COL15A1; FAM155A; MT1H; TTC23L; ATP10A; VGLL3; DIO2; ERCC6; AC009961.1;  
 GNG10; UBE2NL.

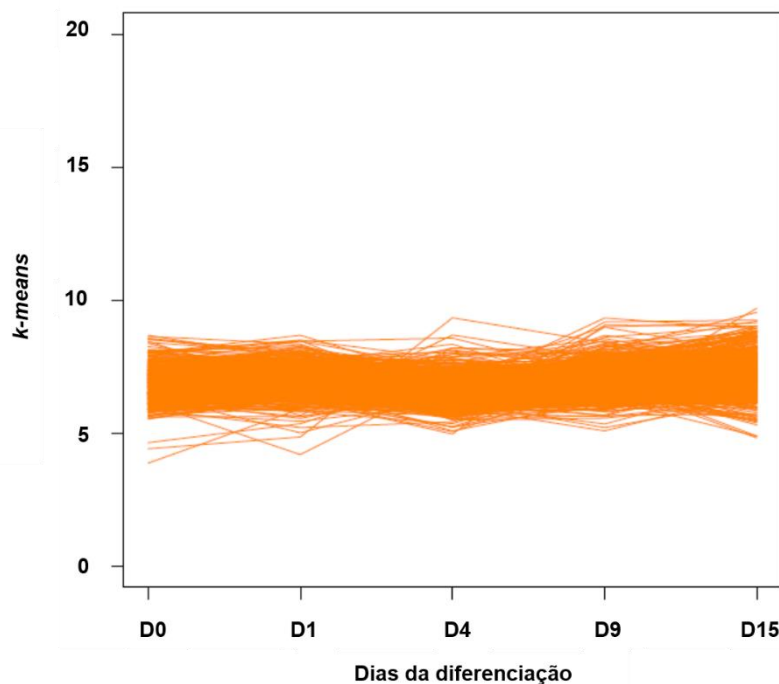


**Genes do Cluster 6 da FL**

HOXA11; CP; NAV3;  
 DCT; NOS1; PCDH11Y;  
 BPI; FGF14; HTR2A;  
 APBA1; CD5; CD69;  
 OAS2; RFX4; MPL;  
 CASQ2; TNFAIP6;  
 F13A1; TSPAN8;  
 ALOX5AP; IL2RA;  
 ARHGAP20; KCNH5;  
 HORMAD1; S100A7;  
 PTPRO; CFAP161;  
 TDRD9; MS4A1; HYDIN;

CYP3A4; WDR64; TMEM174; EN2; NLGN4Y; MBL2; TEKT1; SFTPB; EMX2; C3AR1;  
 GPR149; FCER1A; C11orf42; RNASE10; TFDP3; PRAME; CYP2B6; CR1L; ZNF536;  
 EIF1AY; MRPS18B; SERPINB5; PFDN6; MDC1; C6orf136; PPP1R10; BRD2; FKBPL;  
 MRPS18B; C6orf136; FKBPL; MDC1; PFDN6; MDC1; MRPS18B; MRPS18B;  
 PPP1R10; MDC1; MRPS18B; BRD2; FKBPL; PPP1R10; MDC1; PPP1R10; C6orf136;  
 C6orf136; MRPS18B; MDC1; BRD2; BRD2; PPP1R10; BRD2; PFDN6; BRD2;  
 C6orf136; MDC1; C6orf136; PFDN6; PPP1R10; PIGY; KLRF2; SNTB2; CLK2; ANO4;  
 KIAA1147; IFNGR2; LSM14A; TMEM50B; KRT23; FSBP; LUZP6; AGBL1; CDKN1C;  
 NLRP2; PTPRK; ANTXRL; CFD; NLRP2; CISD3; ITPK1; PRAME; NLRP2; NLRP2;  
 KLF13; NLRP2; NLRP2; SDCCAG8; FAM60A; MYH11; SLC12A7; APBA1; HRAS;  
 RAD17; CEP170; TAF15; NLRP2; BTBD7; CDK7; SERPINA1; TJP1; WNT3; WNT3;  
 TRIM69; PRICKLE4; RRN3; NLRP2; NLRP2.

### Cluster 7 – Fração Livre



### Genes do Cluster 7 da FL

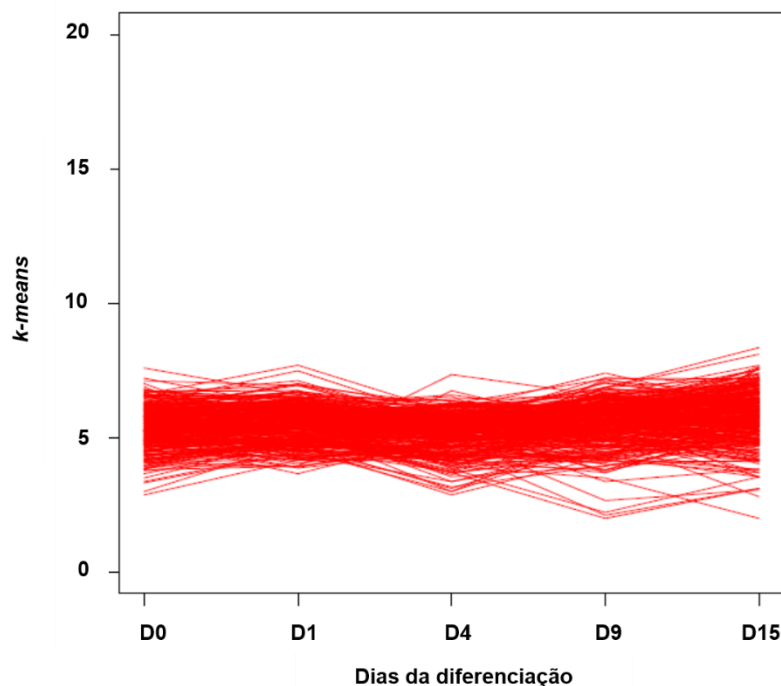
GCLC; NFYA; CDC27;  
 RPAP3; DBF4;  
 KIAA0100; UBE3C;  
 BTBD7; ABHD5; MBTD1;  
 RNF216; PIK3C2A;  
 MAP4K3; ZMYND11;  
 NCDN; SNAPC1; HSF2;  
 IFNGR1; SLC39A9;  
 DEPDC1B; TBC1D23;  
 TRIO; RIPOR1; MED17;  
 DCUN1D1; ZIC2;  
 POLR2B; GOPC;

VPS13D; CELF2; BCAR1; PIK3CB; SDCCAG8; KIF1B; FAM168A; PUM2; GYG2;  
 PPP1R12A; HIPK2; FAR2; FAM107B; ARFGEF1; TP53BP1; CBF3; ACSL4; MAPK6;  
 GNB5; SNX13; TRIB2; SREBF1; FBXW11; PICALM; EED; NCBP3; TUBE1; EIF4G3;  
 SLC25A40; FNDC3B; USP33; DYNC1I2; RIF1; RAB21; NDC80; CDC14B; CCNT2;  
 ERC1; BCKDHB; TNPO1; CHMP2B; TXLNA; SCAMP1; RRN3; DDHD2; EPS15; NLK;  
 GMCL1; DOCK3; ATRN; RCOR1; PDCD7; EXOC1; PUS7; ITGA6; G2E3; LRRFIP2;  
 EPB41L4B; SIRT1; ERMP1; SETD1A; MTAP; SNAP29; HMGXB4; RBM23; AP4S1;  
 GNPAT1; SPTLC2; ALKBH1; DICER1; ARHGAP5; STK4; PRELID3B; POFUT1;  
 METTL4; CEP76; SMAD7; MIB1; PRPS2; FMR1; ARMCMX3; ARHGEF7; FLT1; INTS6;  
 CTCF; MON1B; AXIN1; UBE2W; MPP6; LMBR1; WASL; RBM28; TMEM106B; GLI3;  
 PLEKHA1; GBF1; SH3PXD2A; DKK1; SMC3; TFAM; FBXL20; MED13; LGALS3BP;  
 PPP1R9B; DCUN1D4; CPE; TRIM2; RAPGEF2; EHD1; PDHX; PRDM4; CAMKK2;  
 ITFG2; DUSP16; DDX55; STX2; GNPTAB; GOLT1B; PAK1IP1; UST; E2F3;  
 PHACTR2; PPP2R5D; EXOC2; GMDS; SENP6; TTK; CLK4; SLC12A7; RAD50;  
 SMAD5; AMOTL2; SNX4; ACVR2B; WDR48; GCA; WDR75; STAT1; COQ10B;  
 KDM3A; PRKD3; SLC25A12; ATF2; RALGPS2; STXBP3; PHF13; MEF2D; RGS2;  
 WARS2; TMED5; F3; VAMP4; STX12; DDX59; FBXO30; RAB3GAP2; YIPF4;  
 NUDCD1; MASTL; HSPH1; EPHX2; AKAP1; COIL; NCAPH; CXCR4; UBL3; FAM35A;  
 ZNF644; VPS26A; RBM19; ACADS; RASSF8; BAZ2B; NCOA3; ARFGEF2; UNC5CL;  
 RIOK1; NUP153; DDX31; AHDC1; ZNF384; RHOT1; RAP1B; CASD1; PPAT;  
 KLHDC10; ARHGAP22; FXR2; CCNT1; PARP2; PHF10; TAF4; RAB11FIP4; RLIM;

PEX11B; PRKAA1; RFC3; C12orf29; IMPA1; SWAP70; SBF2; RNF122; MED6; VHL; ARL8B; FST; KIAA1468; FBXO18; FBXO21; TES; ACVR1B; LTV1; KCNK1; CEP350; ARMC9; CAB39; REV1; EPC2; NEK3; IREB2; TANK; KCTD3; STX17; GOLGA1; PDCL; DNAJB5; TMEM63B; MDC1; PGBD1; ARRB1; TGS1; CTDSPL2; FNBP1L; GTF2B; CENPO; KIF11; TET1; SLC35A5; USP8; KIAA1109; SCARB2; B4GALNT3; ETNK1; NUP58; SLC7A1; SMARCC2; SETD1B; WDR20; NIPA2; MFAP1; TCF12; BNIP2; TLE3; FANCI; RNF165; IFNAR1; TMEM50B; PLK4; BCL10; POU2F1; NUF2; ANP32E; LBR; EML4; ZC3H8; AMMECR1L; SPAG16; OSBPL10; CTDSPL; NFKBIZ; ABHD10; LPP; USP53; PAM; FBXO38; TMEM181; ZNF92; NLGN4X; CASK; CHMP7; LACTB2; MTDH; STOM; GBGT1; PARD3; CAMK2G; FRA10AC1; TCF7L2; SLC43A1; LSM14B; HNMT; PRSS23; MTMR12; DOCK1; ANK3; EIF4E; CSNK1G3; NCAPD3; VTI1A; SAV1; C18orf25; XRCC4; USP12; SLC30A6; PANK1; HHEX; PTPRK; RAD17; BCL2L11; RANBP2; RBMS1; ZDHHC7; SREK1; CHD1; TNIK; CXADR; RABGEF1; ANKRD40; NUP205; DCK; BUB1B; APPL1; DYRK1A; ETS2; WDR19; AGAP1; ZC3H18; CACHD1; CDC42SE2; HK2; SLC37A1; RRP1B; MCM3AP; ZNF714; SIK3; SLC25A44; ZNF577; FMNL3; LRP5; MYSM1; USP1; ZNF326; KLHDC9; SMARCAD1; MSX1; CCNYL1; PAQR3; ELF3; CLASP2; WDFY3; HESX1; TOPBP1; KIAA1143; SNIP1; PRKCD; WDR82; STARD4; PRRC1; CASP3; PAPD4; SAP30L; SLC25A32; INTS8; KIAA1429; GKAP1; DDX21; CPSF2; FRS2; CUL5; TRIM44; AP1G1; NAV2; PATL1; SMAD3; AKTIP; LMBRD1; CDKN2AIP; GFM1; E2F6; SNUPN; SIN3A; BUB1; ROBO1; KLF13; NLGN2; NIPA1; PWWP2A; DENND5B; PFKFB3; SOCS6; KIF5B; AKAP13; MFN1; SOCS5; C1GALT1C1; FAM98B; CHST11; PGAM1; CHD7; WIPF2; ZNF217; JMJD1C; ZNF131; SUCLG2; TMCC1; CBWD1; MYD88; KAT5; TNFRSF10D; NUDT4; C11orf80; RNF213; LEMD3; ZWILCH; ANGEL2; B4GAT1; CCDC14; RAB6A; BAIAP2; NR2C2; JUN; THAP5; NECTIN3; FBXO34; TMTC2; FJX1; BBS10; CCDC43; ZNF609; PAK2; HIST1H2AC; YIPF6; C5orf24; GINS3; CREB3L2; TRAPPC6B; BGN; TRAK1; CADM1; BCOR; TBK1; RBM12B; TTC32; VPS33B; PLA2G6; NELL2; ATL3; INTS5; GAS2L1; PTCH1; IRS2; AGL4; MKL2; BCR; LYPD6; RSN1L; LIN28B; UBQLN2; CHM; ZNF292; MPHOSPH8; TRRAP; PTPN1; ZNF124; TSC22D2; TCF4; NF1; NHLRC2; SLC39A10; ZNF398; MAFG; SVIL; TRIM33; RPE; NOL8; CD2AP; MIER1; TLK1; CTR9; LRIG2; OPA1; TOP1; MAP3K3; PJA2; SGMS1; TATDN3; PHACTR4; SYCE1L; LGR4; SACM1L; EMP2; PARG; KIAA1147; CISD3.



### Cluster 8 – Fração Livre



### Genes do Cluster 8 da FL

KRIT1; ZFX; PROM1;  
 CRY1; HEATR5B;  
 SPAST; GRAMD1B;  
 GCLM; FAS; MIPEP;  
 RNF19A; PEX3; MFAP3;  
 RRM2B; MPHOSPH9;  
 ARID4B; ATP11B;  
 MON2; ZNF275; MTMR1;  
 CDON; ZBTB11; EVI5;  
 IFT80; KCNAB2;  
 CLEC2D; RAB27A; MNT;  
 RAD18; SEL1L; KLHL20;

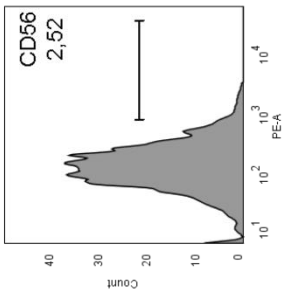
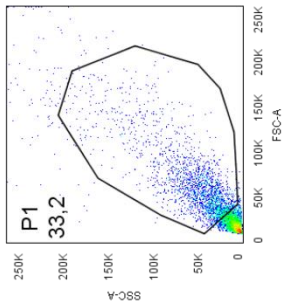
ACER3; RUNX1T1; OSBPL6; CDC14A; RABL2B; SMARCA2; RSNB1; ZNF510;  
 TRPM3; PALB2; PIBF1; PDS5B; CYLD; FAM234B; NCOA1; ALG9; L2HGDH;  
 TFAP2C; ESF1; RBM27; RNF31; CLSPN; GPATCH2; MAP3K1; MYO3A; SOS2;  
 RPS6KA5; KIAA0391; BRMS1L; C20orf24; ANKRD12; SCML2; KLF5; DNAJC3;  
 CSPP1; CCDC61; GTPBP10; CAV1; MET; USP42; GLCCI1; FSD1L; TLE4; RIC1;  
 ATRNL1; CDH23; SHOC2; TBC1D12; INTS2; CAMTA2; MED31; CNTNAP1; GAB1;  
 FAM149A; CPT1A; FBXO3; PTPN5; TNS2; PPM1H; UHRF1BP1L; RIPOR2;  
 CRYBG1; SMAP1; HECA; NR3C1; LIFR; TRIM23; CPEB4; TBCCD1; BCL6; ARL6;  
 TFDP2; PLCH1; ADAM23; STAM2; ACVR1; EDEM3; SSX2IP; SLC35A3; MAN1C1;  
 FOXO3; ELL2; VPS4B; SLC17A5; ELF1; KBTBD7; PAPD5; DEPDC7; PIK3CA;  
 CLCC1; RWDD3; ITPR2; NR4A1; PARD6B; SGPP1; GNAI1; DOCK4; TTBK2;  
 MINDY2; E2F8; USP6; NRL; SGO1; MOSPD2; TULP4; ZNF557; HIP1R; ZNF236;  
 AOC3; WDR44; RHPN2; HSD17B7; VPS13B; MATN2; PCBD2; COG6; TMTC1;  
 TTC9; EDEM1; VAV3; PTGFRN; SPIRE1; GRHL1; ROCK2; ANKRD16; BIVM; APC;  
 WDR36; TEC; TNS3; ZFH2; HS6ST1; STAM; ZFP37; DENND4C; FHDC1; FCHSD2;  
 RAB30; POU2F3; BCAR3; DBT; STAMBPL1; CEP55; EXOC6; TMOD3; GSTCD;  
 PRICKLE1; AMIGO2; RHOF; SRRM4; FRMD6; PELI2; AK7; ABHD2; ZNF710;  
 TXNL4B; SLC13A5; HUNK; ABL2; TOR1AIP1; GABPB2; CEP170; LNPBK; TMF1;  
 RABL3; SNCA; UGT3A1; MEGF10; TIAM2; ZNF711; FBXO10; UGCG; HTR7; TAF5;  
 CCDC82; NPAT; MPZL2; DLG2; SLC7A11; THRB; SRFBP1; MIPOL1; ANKRD50;  
 MBNL1; AHCTF1; DGKE; SORBS2; L3MBTL4; CYP2U1; OTUD6B; MIER3;

SLC26A2; TMBIM4; CLIC2; BACH1; SAMD8; FCHO2; LRP8; RCAN1; MORC3; HLCS; UBR1; ZNF230; GNE; PCSK7; UBQLN4; AQP5; KCNT2; SLC30A7; LRRC58; PPM1K; SNRK; ZNF148; DNAJB14; PITX2; OTUD4; PGGT1B; AGGF1; RICTOR; SLC35A1; DCBLD1; CHMP4C; OXR1; FZD6; AQP3; PRPF18; TRUB1; SERPINB8; IDH3A; CASC4; YPEL4; SGSM1; NCKAP5L; C2CD3; ULK4; LTBP3; IRF2; SNTB2; ZNF507; MN1; CKAP2L; FAM103A1; MT1E; PCDH7; PRDM10; FOXN2; USP32; RIOX2; ZNF440; PAH; FBXL14; FRMD5; GNG12; WASHC2C; NBEA; GOLIM4; KLHL15; RGMB; VCP1P1; PDIK1L; GOLGA8A; ZDHHC21; B3GNT5; ZBTB34; RPS6KA3; ZBTB38; ZBTB33; GSG2; NDUFV2; ERN1; ZHX2; NRIP1; LRRC57; ACBD3; KIAA2026; ZFP1; JAG2; WBSCR17; PRKG1; IFIT1; THNSL1; GNG2; LYRM7; B3GLCT; ZC3H6; FAM72B; LIN54; SH2D5; ZNF605; STRN3; PPTC7; FAM3C; RAD54B; ADARB1; TTC30A; CFD; ITSN2; SLC9A6; CEP290; SFMBT2; L1CAM; L3MBTL3; CHML; CHIC1; RUFY2; SPIRE2; HACD2; GOLGA8B; FNIP1; CEBPD; FAM133B; SPON1.

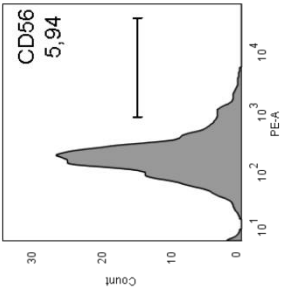
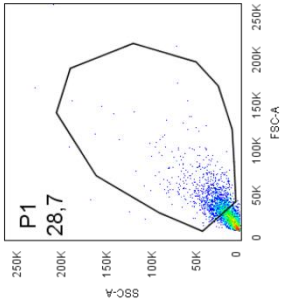
ANEXO VII: CITOMETRIA DE FLUXO

D3 - Réplica 1

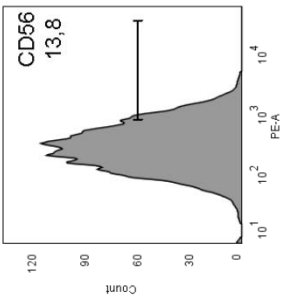
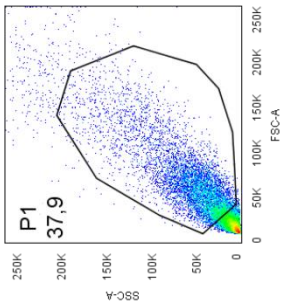
Controle não marcado



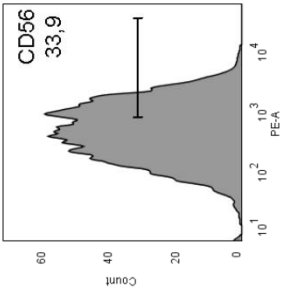
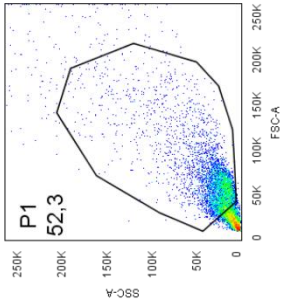
shPUM1



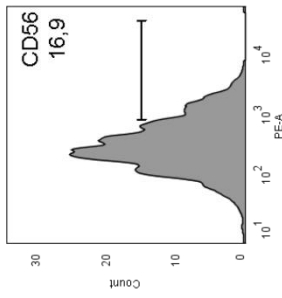
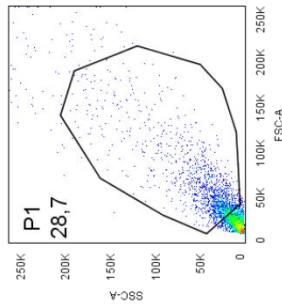
Sem silenciamento



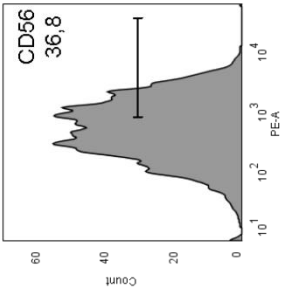
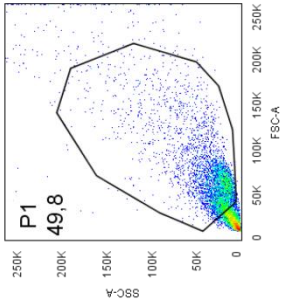
shPUM2



shSc

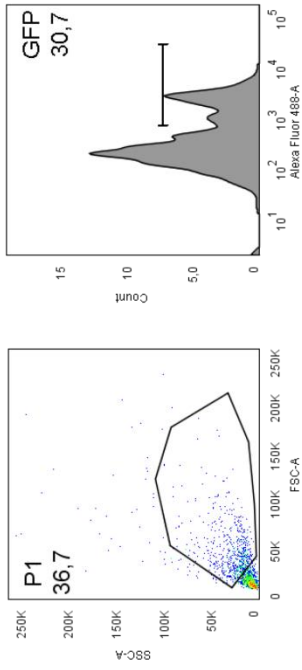


shPUM1-2

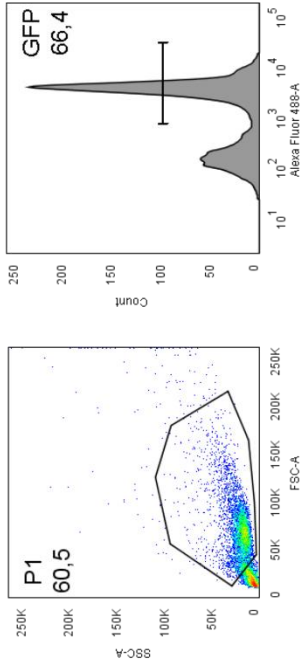


# D9 - Réplica 1

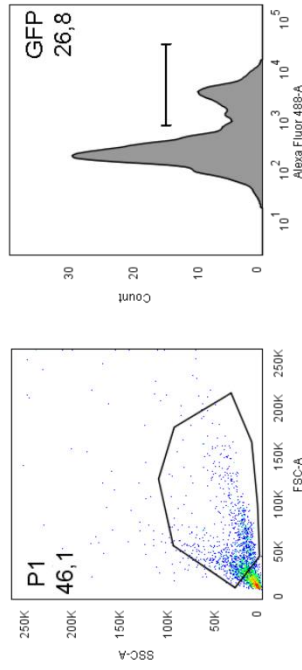
## Sem silenciamento



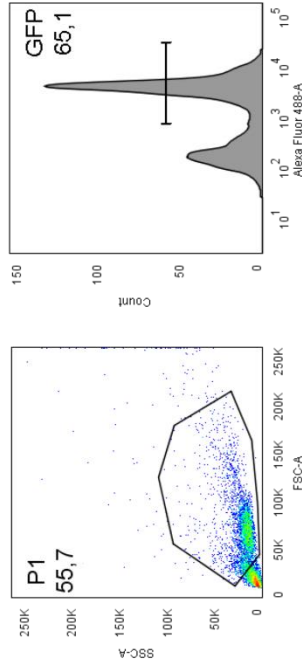
## shPUM2



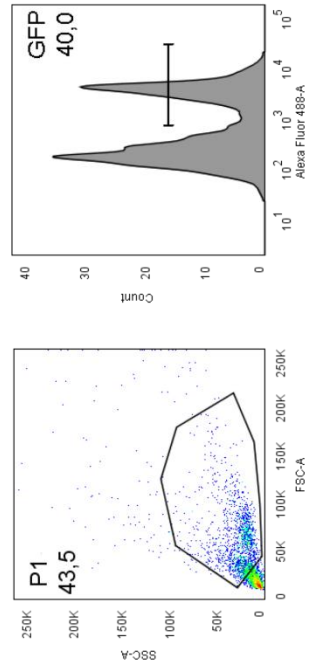
## shSc



## shPUM1-2

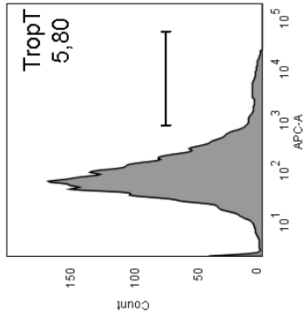
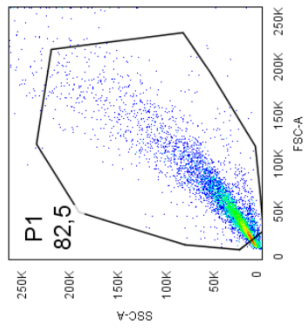


## shPUM1

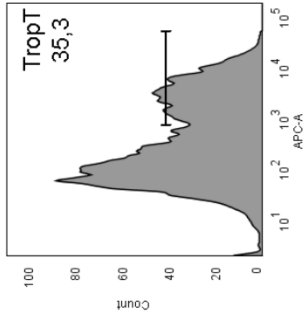
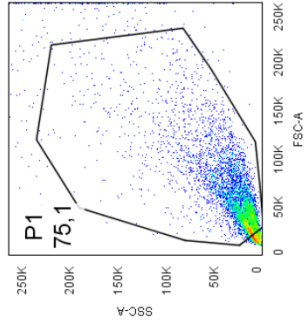


# D15 - Réplica 1

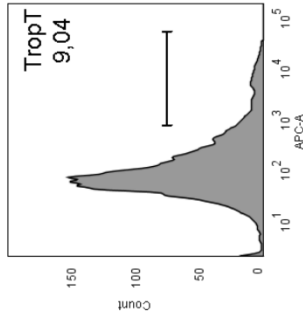
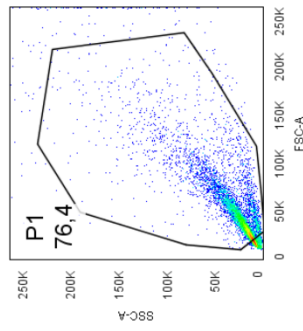
## Controle não marcado



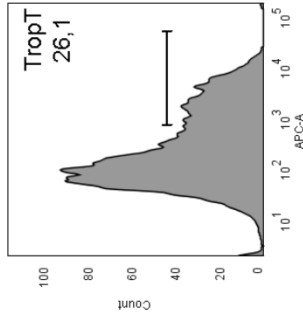
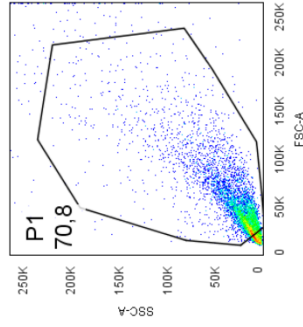
## shPUM1



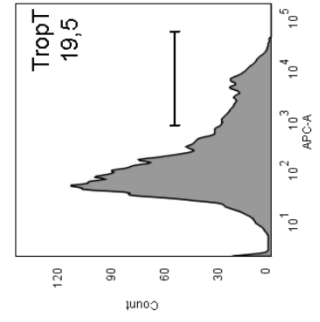
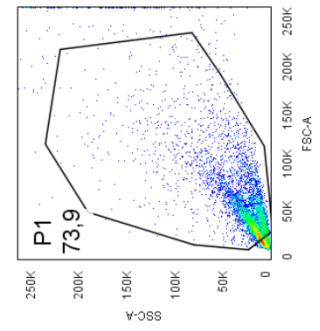
## Sem silenciamento



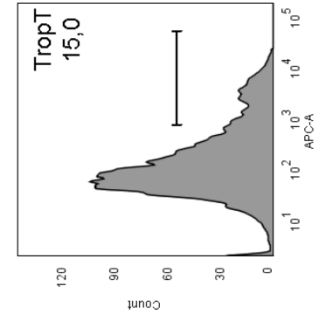
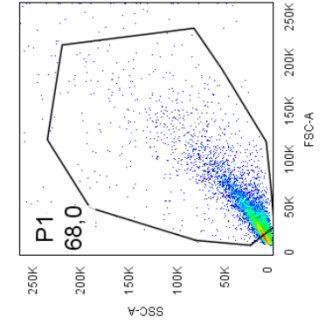
## shPUM2



## shSc

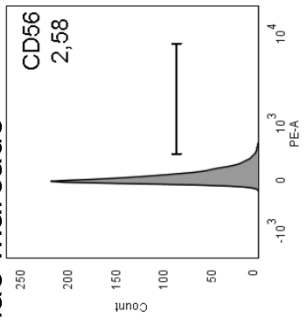
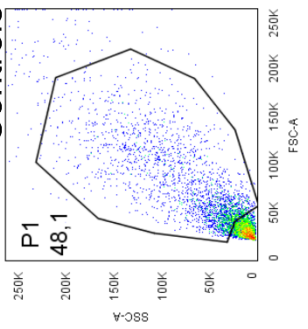


## shPUM1-2

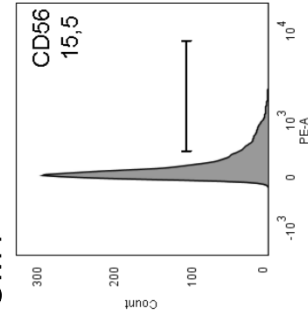
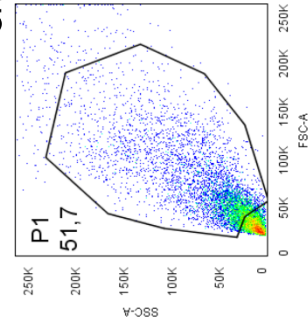


## D3 - Réplica 2

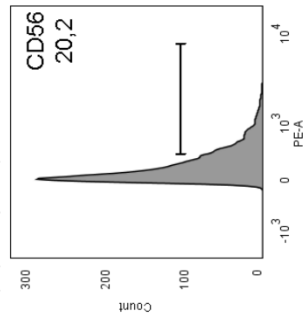
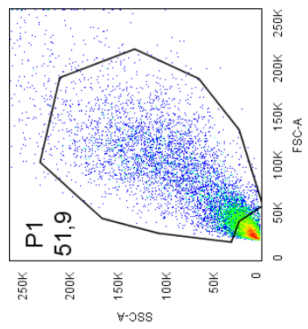
### Controle não marcado



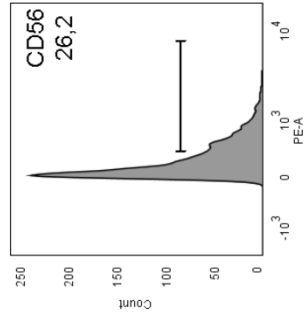
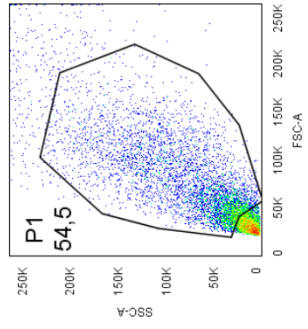
### shPUM1



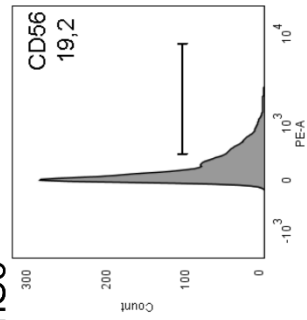
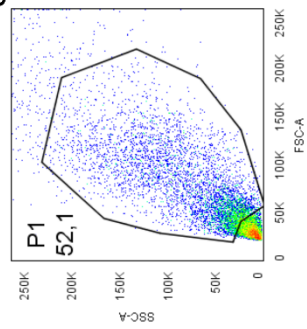
### Sem silenciamento



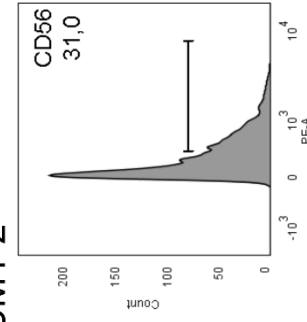
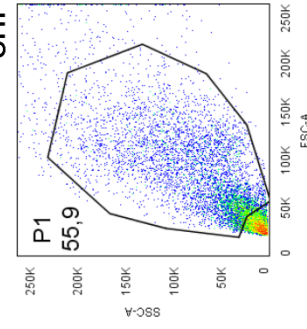
### shPUM2



### shSc

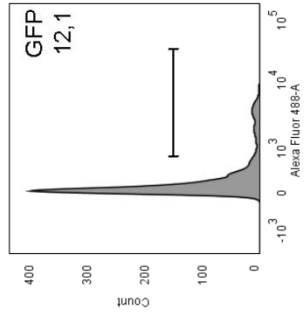
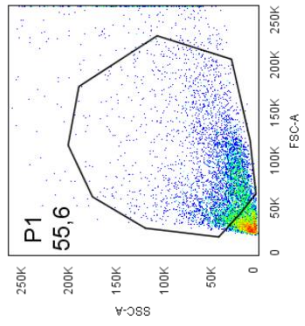


### shPUM1-2

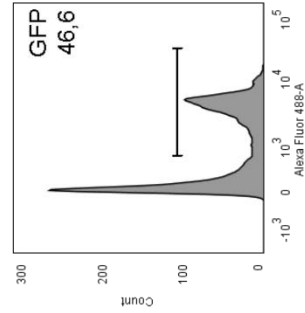
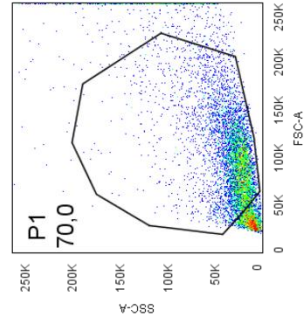


## D9 - Réplica 2

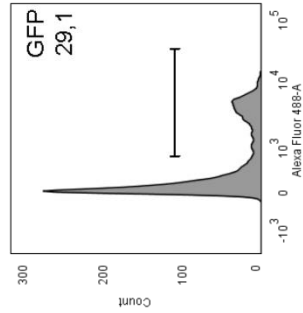
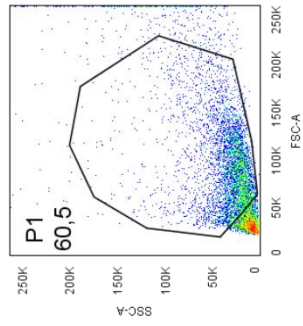
### Sem silenciamento



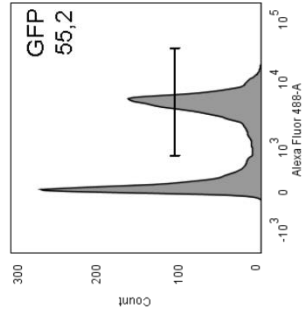
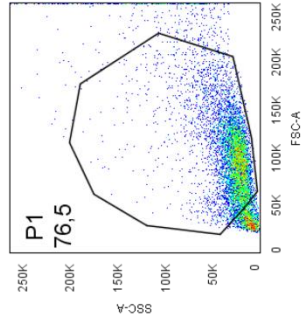
### shPUM2



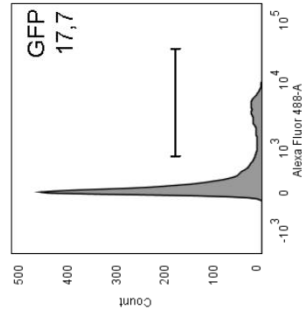
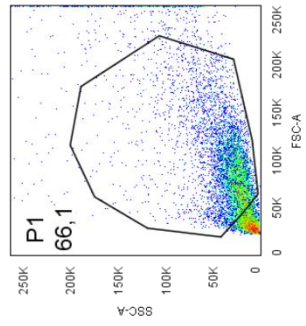
### shSc



### shPUM1-2

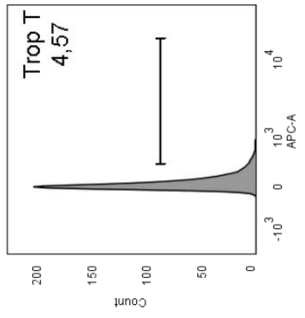
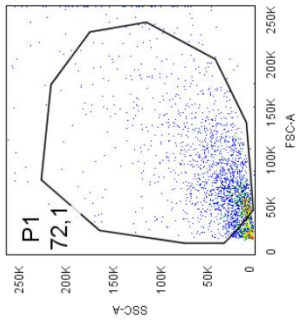


### shPUM1

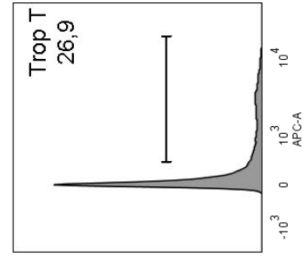
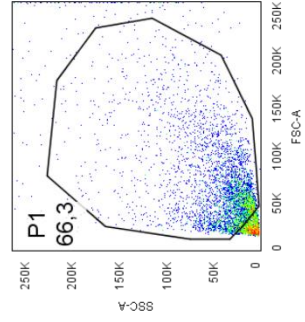


## D15 - Réplica 2

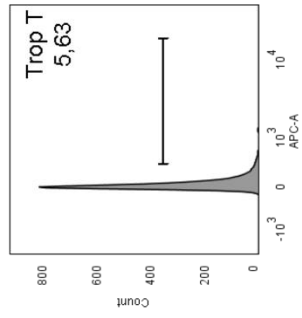
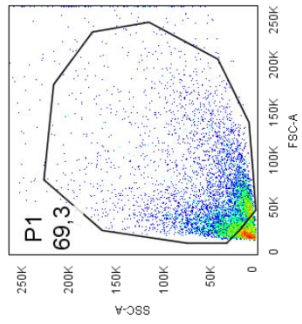
### Controle não marcado



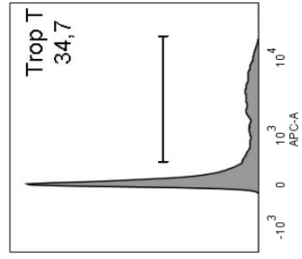
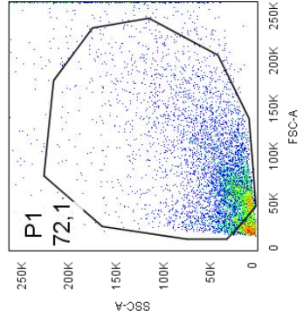
### shPUM1



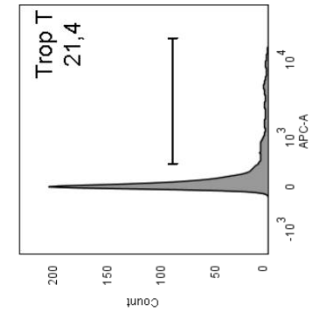
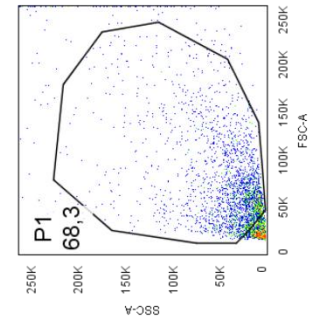
### Sem silenciamento



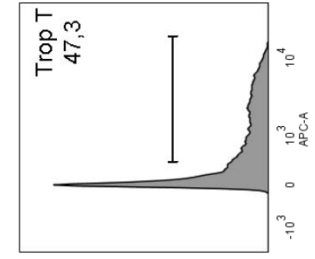
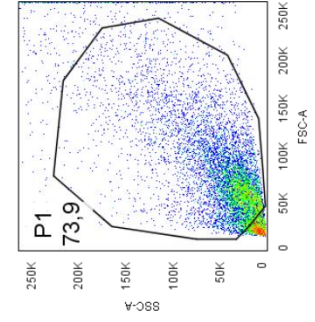
### shPUM2



### shSc



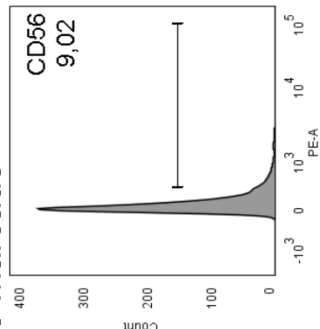
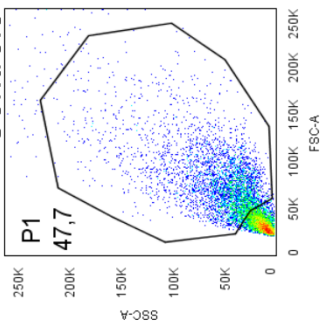
### shPUM1-2



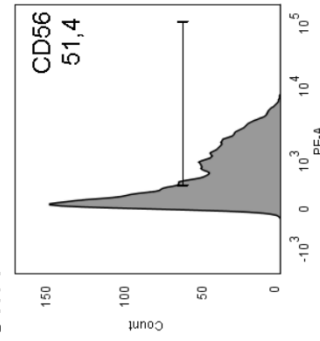
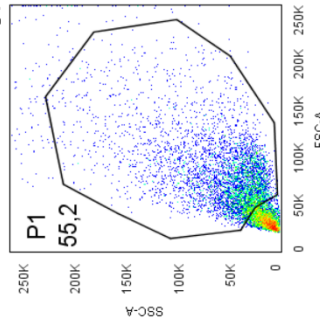


### D3 - Réplica 3

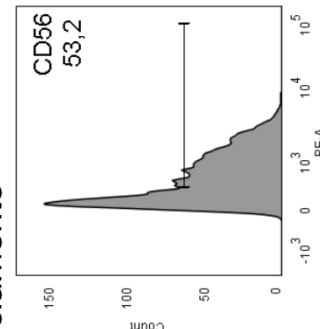
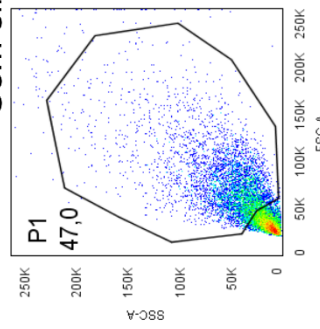
Controle não marcado



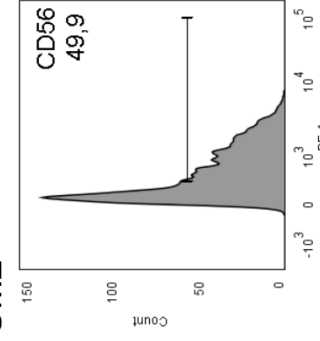
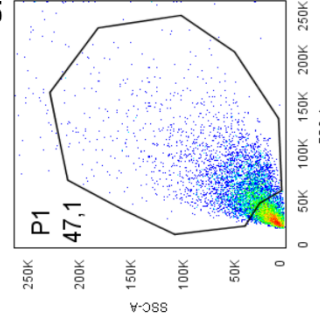
shPUM1



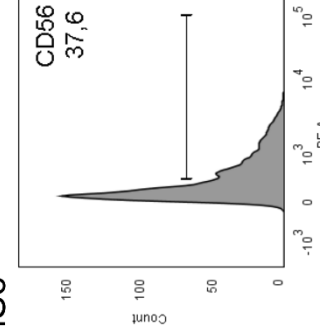
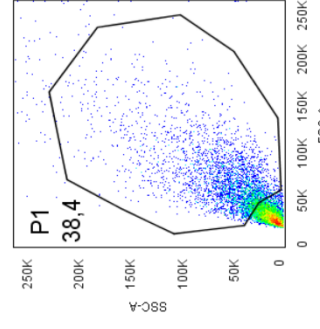
Sem silenciamento



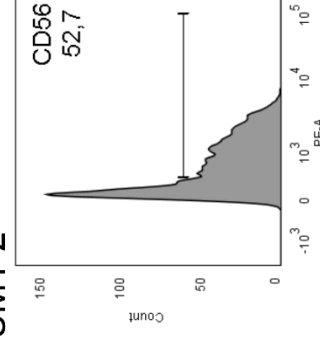
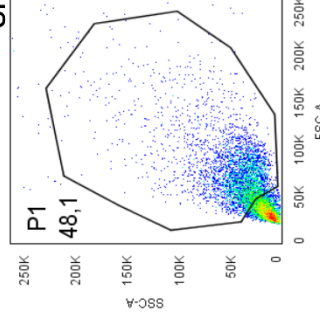
shPUM2



shSc

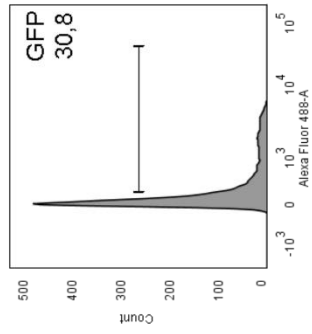
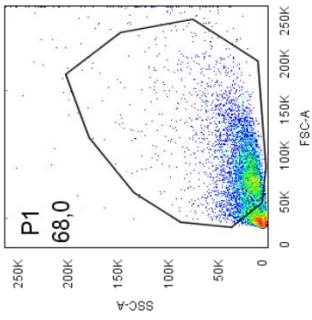


shPUM1-2

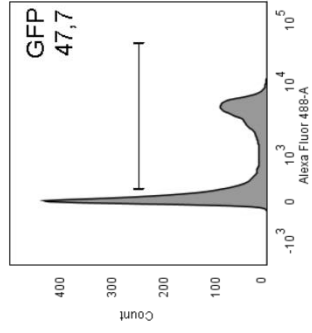
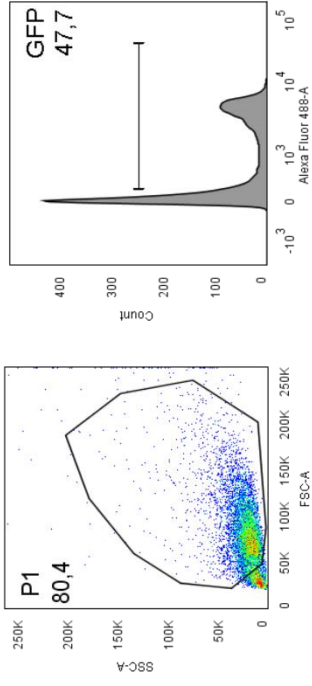


### D9 - Réplica 3

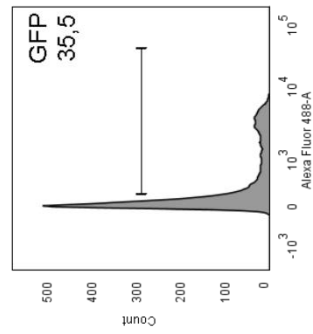
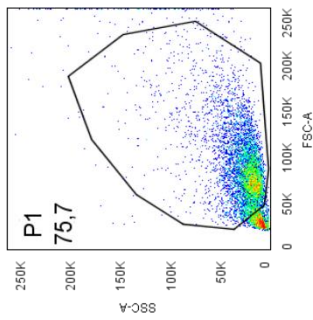
#### Sem silenciamento



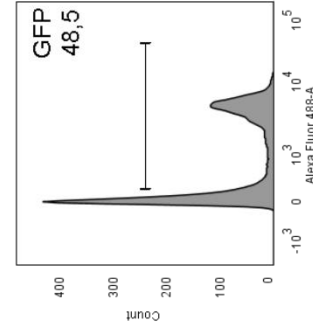
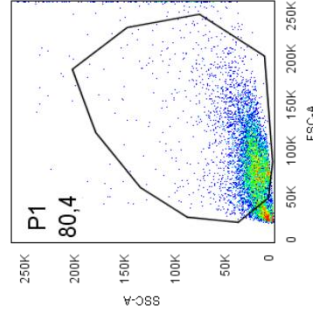
#### shPUM2



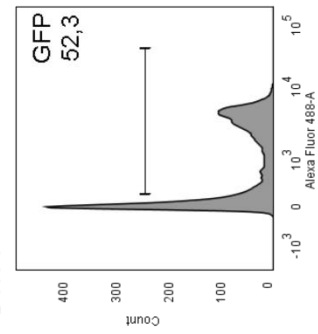
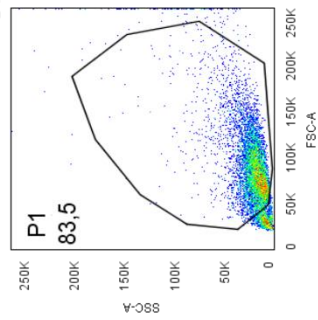
#### shSc



#### shPUM1-2

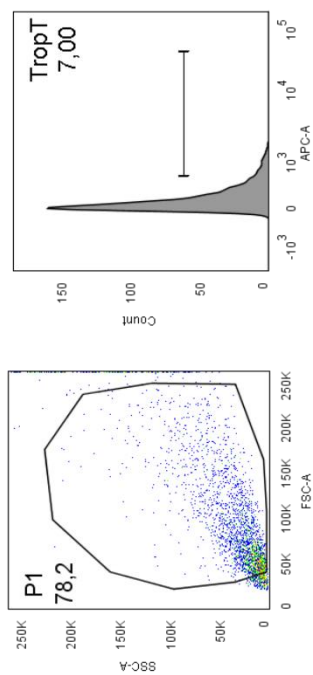


#### shPUM1

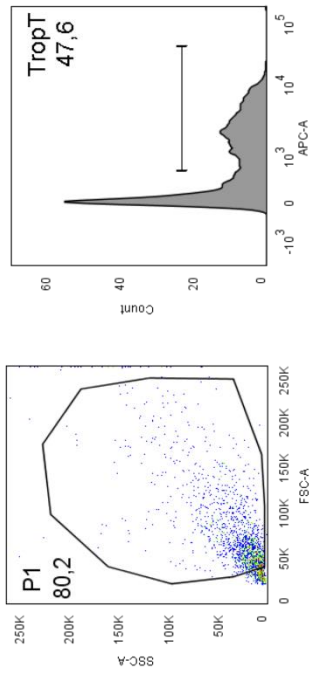


### D15 - Réplica 3

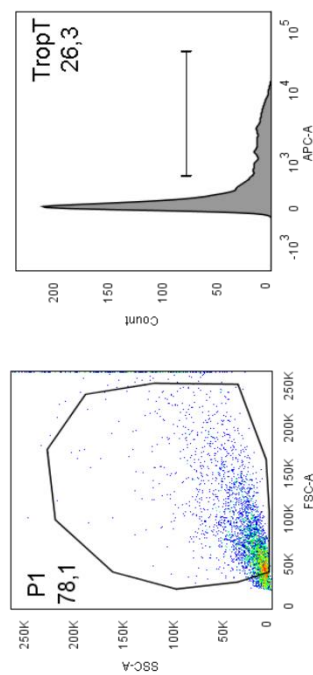
Controle não marcado



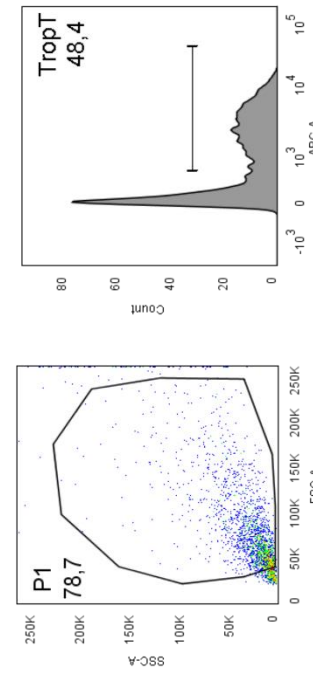
shPUM1



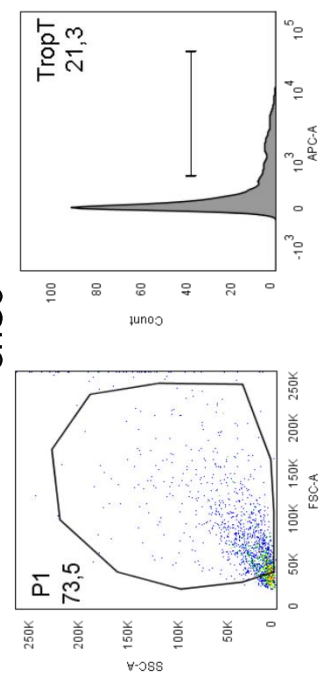
Sem silenciamento



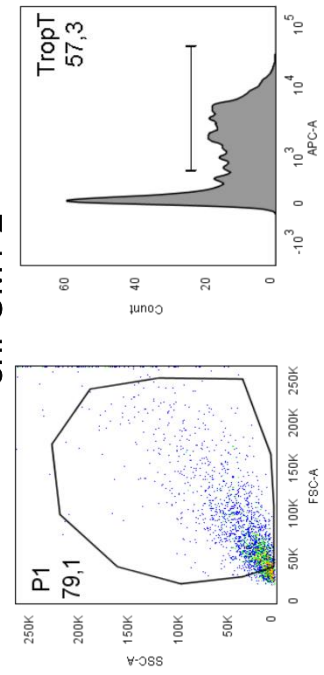
shPUM2



shSc



shPUM1-2



## ANEXO VIII: PRODUÇÃO INTELECTUAL

Esse trabalho foi apresentado no I Simpósio Araucária de Biologia Celular e Molecular (UFPR, Curitiba, 2017).

# ANEXO IX: TERMO DE TRANSFERÊNCIA DE MATERIAL



## Material transfer agreement

### Parties

Murdoch Childrens Research Institute (ABN 21 006 566 972) of Royal Children's Hospital, Flemington Road Parkville Victoria 3052 Australia (**MCRI**)

and

Carlos Chagas Institute of Oswaldo Cruz Foundation – Rua Algacyr Munhoz Mader, 3775, CIC 81350-010, Curitiba, Brasil (**Recipient**)

### Background

MCRI proposes to provide, or as at the date of this agreement has provided, the Recipient with the Materials (as defined below) and any related Confidential Information for the purpose of the Research Project "Cellular and molecular characterization of the differentiation potential of stem cells". (**Purpose**).

The Recipient has agreed to use the Material and to keep confidential all Confidential Information of the MCRI subject to the following terms and conditions of this agreement.

### Description of the Materials

The Materials being provided by MCRI to the Recipient include the following human cell line: NKX2-5<sup>eGFP/w</sup> Embryonic Stem Cell.

## 1 Defined terms

In this document:

**Confidential Information** of the MCRI includes the following, whether or not in material form:

- (a) all information that is confidential to the MCRI and that is disclosed (whether before or after the execution of this agreement) by the MCRI to the Recipient including but not limited to all information relating to the Material and any confidential know-how, data, results, models, samples, intellectual property, technology, trade secrets, drawings, processes, formulae, product development plans,

but excludes the following information, being information that:

- (b) is public knowledge or is lawfully known to or in the possession or control of the Recipient, other than as a result of a breach of confidentiality or this agreement;
- (c) is independently developed by the Recipient without the use of the MCRI confidential information and/or Materials; or
- (d) is required by law to be disclosed.

**Intellectual Property Rights** means all intellectual property rights subsisting anywhere in the world, including the following rights:

- (a) patents, copyright (including future copyright and software), rights in circuit layouts, designs, trade and service marks (including goodwill in those marks), domain names and trade

names, confidential information and any right to have confidential information kept confidential whether or not such rights are registered or capable of being registered; and

- (b) to the extent available any application or right to apply for registration of any of the rights referred to in paragraph (a).

## 2 Conditions for provision of Material

### 2.1 Use generally

The Recipient:

- (a) may only use the Material for the Purpose;
- (b) must not use the Material or any products containing any part of the Material or resulting from the use of the Material, for any commercial purpose without the prior written consent of the MCRI;
- (c) must comply with any applicable laws in relation to the importation, transportation, use, maintenance or disposal of the Material;
- (d) must not distribute or release the Material (nor any unmodified derivatives or genetically engineered modifications which are based on the Material) to any person other than the employees of the Recipient, and must make sure that no one is allowed to take or send the Material to any location other than a location under the control of the Recipient without prior written permission from the MCRI.

### 2.2 Results

The Recipient must inform the MCRI in writing of any and all research results produced by or on behalf of the Recipient related to the use of the Material. The Recipient must maintain the confidentiality of any information in relation to the Material and will not disclose any such information without the MCRI's prior written approval.

### 2.3 Intellectual Property Rights in Results

In consideration of MCRI supplying the Materials to the Recipient, the Recipient will, as soon as practicable, inform MCRI of any Intellectual Property developed from use of the Materials. The Recipient and MCRI will enter into negotiations to discuss their respective ownership rights in relation to the Intellectual Property.

### 2.4 Recipient acknowledgements

The Recipient acknowledges and agrees that:

- (a) the Material is made available for investigational use only;
- (b) the MCRI retains all ownership and Intellectual Property Rights in the Material and derivatives of the Material;
- (c) it will not obtain or attempt to obtain any patent protection in relation to:
  - i. any part of the Material (or any modification or use of any part of the Material); or
  - ii. any materials that could not have been made but for having access to the Materials,  
without the written consent of the Head of Commercialisation and Legal within the MCRI;
- (d) this transfer does not constitute a public disclosure;
- (e) the Material is experimental in nature and may have hazardous properties and is provided to the Recipient 'as is', without any warranty of merchantability, fitness for any particular purpose, ownership, or any other warranty, express, implied, statutory or otherwise. To the extent permitted by any applicable laws, the MCRI excludes any and all warranties in relation to the Material; and
- (f) the MCRI makes no representation or warranty that the Material or the use of any of the Material will not infringe any third party's intellectual property rights.

### 2.5 Publication

- (a) The Recipient shall have the right to publish its findings and results from the research with the Materials, provided that:
  - (i) all publications resulting from research using the Materials acknowledge the MCRI and Monash University;

- (ii) a copy of the proposed publication is provided to the MCRI thirty (30) days prior to the proposed publication, for the purpose of determining whether it contains Confidential Information. The MCRI may require amendment of the proposed publication (including as to authorship) or seek a delay in publication if the MCRI has a patent application which would be prejudiced by publication. The parties will negotiate in good faith the extent of any amendment or period of delay. In no case should the delay exceed ninety (90) days following the day on which a copy of the proposed publication is provided to the MCRI.

### 3 Use and disclosure of Confidential Information

The Recipient agrees to use all Confidential Information solely for the Purpose and to keep it confidential. The Recipient may only disclose Confidential Information to those of its employees and officers who have a need to know and are aware that the Confidential Information must be kept confidential.

The Recipient must establish and maintain effective security measures to safeguard the Confidential Information from access or use not authorised by this agreement and must keep the Confidential Information under its control.

### 4 Agreement end and return or destruction of Material and any Confidential Information after agreement ends

Unless otherwise agreed, this agreement ends on the date the associated research project (for which the Materials have been obtained) ends.

Immediately upon the request of the MCRI (including after termination of this agreement in accordance with clause 6) or at agreement end, the Recipient must follow the MCRI's instructions in relation to destroying or returning the Material and/or Confidential Information of the MCRI.

### 5 Recipient liability

Except to the extent prohibited by law, the Recipient assumes all liability for damages which may arise from its use, storage or disposal of the Material. MCRI will not be liable to the Recipient for any loss, claim or demand made by the Recipient, or made against the Recipient by any other party, due to or arising from the use of the Material by the Recipient, except to the extent permitted by law when caused by the gross negligence or wilful misconduct of MCRI.

### 6 Termination

- (a) The MCRI may terminate this agreement at any time with immediate effect by giving written notice to the Recipient.

(b) Any obligations of confidentiality under this agreement continue to apply to the parties to this agreement after termination.

(c) Termination of this agreement does not affect any accrued rights or remedies the MCRl may have.

7 **Miscellaneous**

(a) This agreement may be executed in any number of counterparts. All counterparts will constitute one instrument. The parties agree that facsimile or email signatures will be accepted as originals.

(b) A party must not assign or otherwise transfer any or all of its rights arising out of this agreement without the written consent of the other party.

(c) This agreement constitutes the entire agreement between the parties with respect to the transfer of Material to the Recipient. This agreement may be amended only by written agreement of both parties.

**Executed as an agreement**

Date: 21 November 2016

Signed for Murdoch Childrens Research Institute

by its authorised representative:



Signature

Phoebe Mackred - Legal

Print Name Counsel

Read, understood and accepted by:



Signature (MCRl Investigator)

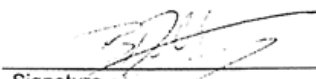
Print Name

Date:

Date:

Signed for Oswaldo Cruz Foundation

by its authorised representative:



Signature

Bruno Dallagiovanna Muniz  
Pesquisador  
Mat.: 1555795

Print Name



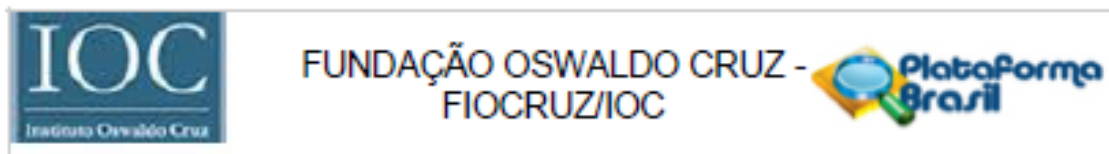
Signature (Recipient Investigator)

Marco Augusto Stinamiglio  
Pesquisador  
Mat.: 1985722  
Flocruz PR - ICC

Print Name

Date: November 18, 2016

## ANEXO X: PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** CARACTERIZAÇÃO CELULAR E MOLECULAR DO POTENCIAL DE DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO

**Pesquisador:** Bruno Dallagiovanna Muniz

**Área Temática:** Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

**Versão:** 2

**CAAE:** 48374715.8.0000.5248

**Instituição Proponente:** FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

**Patrocinador Principal:** Fundação Oswaldo Cruz

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 1.308.195

#### Apresentação do Projeto:

As células-tronco estão presentes em diversos tecidos, são autorrenováveis e possuem potencial em diferenciar em diversos tipos celulares específico, além de possuir papel imunorregulatório. Há um grande interesse na sua aplicação dessas células para o tratamento de diversas doenças, embora existam questões em aberto quanto aos mecanismos celulares e moleculares dos processos de ativação, diferenciação e autorrenovação. Neste contexto, pretendemos analisar os mecanismos celulares e moleculares envolvidos com o processo de diferenciação,

ativação e autorrenovação de células-tronco com fins de estudar sua biologia básica e também avaliar possíveis implicações em terapias futuras.

Além disso, estudos epigenéticos da diferenciação de células mesenquimais também serão realizados para buscar compreender o papel destas alterações na biologia básica destes processos.

#### Objetivo da Pesquisa:

**Objetivo Primário:**

Estudar os mecanismos celulares e moleculares da resposta das células-tronco de diferentes

**Endereço:** Av. Brasil 4036, Sala 705 (Campus Expansão)

**Bairro:** Manguinhos

**CEP:** 21.040-360

**UF:** RJ

**Município:** RIO DE JANEIRO

**Telefone:** (21)3882-9011

**Fax:** (21)2561-4815

**E-mail:** cepfocruz@ioc.fiocruz.br

Continuação do Parecer: 1.308.195

origens quanto a diferentes abordagens experimentais visando seu potencial de diferenciação para terapias celulares.

**Objetivo Secundário:**

Subprojeto 1: Isolamento e caracterização de células-tronco adultas / progenitores de diferentes fonte e seus derivados (microvesículas, DNA, RNA, proteína etc.) e tecido de origem; Subprojeto 2: Potencial de diferenciação de células-tronco em diversas linhagens celulares utilizando método de cocultivo, meio condicionado, extrato de tecidos, potenciais indutores e entre outros; Subprojeto 3: Mecanismos pós-transcricionais da regulação da autorrenovação e diferenciação de células-tronco adultas de diferentes fontes e linhagens pluripotentes. Subprojeto 4: Estudos metabólicos em células-tronco adultas de diferentes fontes e linhagens pluripotentes. Subprojeto 5: Análise epigenética e de expressão gênica de células-tronco adultas de diferentes fontes durante a proliferação, diferenciação e outras condições; Subprojeto 6: Construção de ferramentas para acompanhamento do processo de proliferação e diferenciação celular (Plasmídeos, vetores lentivirais e entre outros). Subprojeto 7: Estudo da interação de patógenos com células-tronco e/ou subprodutos celulares de diferentes fontes. Subprojeto 8: Transplante de células-tronco adultas / progenitores humanas e seus derivados em modelo animal em ensaios pré-clínicos; Subprojeto 9: Caracterização e diferenciação de linhagem de células-tronco pluripotentes.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Apesar de todos os esforços para manter a confidencialidade dos doadores com o uso de códigos e termo de confidencialidade de todos os pesquisadores relacionados ao projeto, ainda assim há riscos de quebra de confidencialidade. Além disso, apesar do objetivo principal do projeto de pesquisa ser o entendimento da biologia básica das células-tronco adultas humanas de diferentes fontes, haverá riscos aos doadores do material biológico durante a intervenção que o doador for submetido por questões médicas contudo o procedimento de coleta das amostras não confere risco adicional ao procedimento; amostras como sangue menstrual (opcional, não invasivo e descartado) e leite materno (opcional, não invasivo e as vezes descartado quando há excesso de produção) são procedimentos não invasivos realizados pela doadora e voluntárias, não constituindo intervenção médica.

**Benefícios:**

Não existe benefício direto e imediato ao sujeito da pesquisa com a realização deste projeto. Contudo espera-se como principal benefício deste projeto o desenvolvimento científico e

Endereço: Av. Brasil 4036, Sala 705 (Campus Expansão)  
Bairro: Manguinhos CEP: 21.040-360  
UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO  
Telefone: (21)3882-9011 Fax: (21)2561-4815 E-mail: cepfocruz@ioc.fiocruz.br



Continuação do Parecer: 1.308.198

tecnológico do país.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Projeto de grande relevância, na área de genética humana. Metodologia adequada, cronograma adequado. (segunda versão)

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Atendendo todas as exigências de apresentação dos termos obrigatórios.

**Recomendações:**

Não há recomendações. Projeto segunda versão.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

O pesquisador atendeu as pendências deste comitê (CAAE -48374715.8.0000.5248) respondendo em carta os seguintes itens:

- 1- Descrever o transporte e armazenamento de cada material coletado na pesquisa, o qual foi descrito em carta.
- 2- Anexar ficha de Informação extra dos voluntários - a qual se encontra no final de cada TCLE.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

| Tipo Documento                            | Arquivo                                      | Postagem               | Autor                     | Situação |
|---|--|------------------------|---------------------------|----------|
| Informações Básicas do Projeto            | PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_524967.pdf | 01/09/2015<br>10:09:56 |                           | Acelto   |
| Outros                                    | Ficha_de_cadastro.pdf                        | 01/09/2015<br>10:09:09 | Bruno Dallagiovanna Muniz | Acelto   |
| Projeto Detalhado / Brochura Investigador | PROJETO_DETALHADO_2015_V2.pdf                | 01/09/2015<br>10:06:33 | Bruno Dallagiovanna Muniz | Acelto   |
| Outros                                    | Carta_CEP_2015.pdf                           | 01/09/2015<br>10:06:15 | Bruno Dallagiovanna Muniz | Acelto   |
| Folha de Rosto                            | Folha_de_rosto.pdf                           | 01/09/2015<br>10:05:44 | Bruno Dallagiovanna Muniz | Acelto   |
| Outros                                    | Termo de confidencialidade_PUC.pdf           | 10/08/2015<br>11:04:36 |                           | Acelto   |
| Outros                                    | Termo de confidencialidade_IOC_2.            | 10/08/2015             |                           | Acelto   |

Endereço: Av. Brasil 4036, Sala 705 (Campus Expansão)  
 Bairro: Manguinhos CEP: 21.040-360  
 UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO  
 Telefone: (21)3882-9011 Fax: (21)2561-4815 E-mail: cepfocruz@ioc.fiocruz.br

Continuação do Parecer: 1.308.195

|   |   |                        |  |        |
|---|---|------------------------|--|--------|
| Outros  | pdf                                       | 11:04:26               |  | Acelto |
| Outros  | Termo de confidencialidade_ICC_1.pdf      | 10/08/2015<br>11:04:18 |  | Acelto |
| Declaração de Instituição e Infraestrutura                | Declaração de co-participação_PUC.pdf     | 10/08/2015<br>11:03:41 |  | Acelto |
| Declaração de Instituição e Infraestrutura                | Declaração de co-participação_Homoenc.pdf | 10/08/2015<br>11:03:31 |  | Acelto |
| TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência | TCLE_sangue_menstrual_v1.pdf              | 10/08/2015<br>11:03:06 |  | Acelto |
| TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência | TCLE_medula_v1.pdf                        | 10/08/2015<br>11:02:55 |  | Acelto |
| TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência | TCLE_lpoaspiração_2015_v1.pdf             | 10/08/2015<br>11:02:46 |  | Acelto |
| TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência | TCLE_leite_2015_v1.pdf                    | 10/08/2015<br>11:02:36 |  | Acelto |
| TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência | TCLE_dente_v1.pdf                         | 10/08/2015<br>11:02:26 |  | Acelto |
| TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência | TCLE_cordao_umbilical_2015_v1.pdf         | 10/08/2015<br>11:02:12 |  | Acelto |
| TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência | TCLE_bariátrica_2015_v1.pdf               | 10/08/2015<br>11:01:59 |  | Acelto |

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

Endereço: Av. Brasil 4036, Sala 705 (Campus Expansão)  
 Bairro: Manguinhos CEP: 21.040-360  
 UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO  
 Telefone: (21)3882-9011 Fax: (21)2561-4815 E-mail: cepfocruz@ioc.fiocruz.br

Continuação do Parecer: 1.308.195

RIO DE JANEIRO, 04 de Novembro de 2015

---

Assinado por:  
José Henrique da Silva Pilotto  
(Coordenador)

Endereço: Av. Brasil 4036, Sala 705 (Campus Expansão)  
Bairro: Manguinhos CEP: 21.040-360  
UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO  
Telefone: (21)3882-9011 Fax: (21)2561-4815 E-mail: cepfocruz@ioc.fiocruz.br

Página 05 de 05