



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
INSTITUTO DE BIOLOGIA**

**VIVIANE DE SOUZA ROSA**

**Análise da expressão e função de Coup-TFI e Coup-TFII durante  
o início do desenvolvimento embrionário de camundongo.**

**CAMPINAS**

**2019**

**VIVIANE DE SOUZA ROSA**

**“Análise da expressão e função de Coup-TFI e Coup-TFII durante o início do desenvolvimento embrionário de camundongo”**

*Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do Título de Doutora em Biologia Celular e Estrutural, na área de Biologia Tecidual.*

ESTE ARQUIVO DIGITAL CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA PELA ALUNA VIVIANE DE SOUZA ROSA E ORIENTADA PELO PROF. HENRIQUE MARQUES BARBOSA DE SOUZA.

Orientador: HENRIQUE MARQUES BARBOSA DE SOUZA

**CAMPINAS**

**2019**

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca do Instituto de Biologia  
Ana Maria Rabetti - CRB 8/2471

R71a Rosa, Viviane de Souza, 1988-  
Análise da expressão e função de Coup-TFI e Coup-TFII durante o início do desenvolvimento embrionário de camundongo. / Viviane de Souza Rosa. – Campinas, SP : [s.n.], 2019.

Orientador: Henrique Marques Barbosa de Souza.  
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Células-tronco embrionárias. 2. Desenvolvimento embrionário. I. Marques-Souza, Henrique, 1977-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Analysis of the expression and function of Coup-TFI and Coup-TFII during early embryonic mouse development.

**Palavras-chave em inglês:**

Embryonic stem cell

Embryonic development

**Área de concentração:** Biologia Tecidual

**Titulação:** Doutora em Biologia Celular e Estrutural

**Banca examinadora:**

Henrique Marques Barbosa de Souza [Orientador]

Marilene Hohmuth Lopes

Talita Miguel Marin

Lucia Elvira Alvares

Aline Mara dos Santos

**Data de defesa:** 10-06-2019

**Programa de Pós-Graduação:** Biologia Celular e Estrutural

**Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)**

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0002-0502-6731>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/6541066785458515>

Campinas, 10 de junho de 2019.

### **COMISSÃO EXAMINADORA**

Dr. Henrique Marques Barbosa de Souza (Orientador)

Dr(a). Marilene Hohmuth Lopes

Dr(a). Talita Miguel Marin

Dr(a). Lucia Elvira Alvares

Dr.(a). Aline Mara dos Santos

*Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa, que se encontra no processo de vida acadêmica do aluno.*

## **Agradecimentos**

Agradeço primeiramente a Deus pela oportunidade de poder fazer o que amo e de sempre iluminar meu caminho.

Aos meus pais pelo amor, dedicação, ensinamentos e acima de tudo por sempre apoiarem minhas escolhas e acreditarem que sou capaz. Ao meu irmão Fabrício, pelo apoio e força, de sempre e a Mirtes, ex-prima e amiga pela ajuda essencial que possibilitou minha chegada até aqui.

Aos tantos amigos que de alguma forma contribuíram para que eu não enlouquecesse durante essa trajetória, Yanna, Jéssica, Paula, Michele, Thiago, Beto, Déia, Belleza e Lucas e aos que mesmo por um curto período de tempo compartilharam um espaço em casa, Ivana, Luanda, Silvânia, Mauro e Isabela, meu muito obrigada pelas conversas, risos, lágrimas e principalmente pela infinita paciência.

As meninas da sala de pós-graduação, Bianca, Paula, Lucimara, Marina, Fernanda, Carol, Renata, Valquiria e Ângela obrigada pela companhia e gordices, quase que diárias e por tornarem os dias no DHE tão divertidos e únicos.

Ao pessoal do Large, Diego, Cyro, Mika, Thaísa e Amanda. Principalmente as meninas com quem compartilhei esses últimos anos, inúmeros experimentos, mas nem tantos resultados assim. Muito obrigada, foi de grande aprendizagem tudo que passamos.

Ao meu orientador Henrique Marques, pela oportunidade de estar aqui. Obrigada pelos ensinamentos, apoio nos momentos em que nada funciona e comemorações quando algo dá certo. Aprendi e cresci muito durante esses seis anos. Muito obrigada por tudo.

Ao professor Sílvio pela amizade e ajuda com o texto. Ao Prof. Paulo Joazeiro, que me orientou durante a Iniciação Científica, agradeço pelos conselhos, histórias e exemplo na conduta profissional. Deixo aqui registrado meu respeito e admiração que tenho pelo Sr.

A professora Magdalena Zernicka-Goetz, por me receber por duas vezes em seu laboratório na Universidade de Cambridge e por todo suporte e apoio. Agradeço também a Marta Shahbazi com quem tive o imenso prazer e posso dizer sorte de trabalhar durante esse período. Muito obrigada por todo o ensinamento, paciência e por me fazer acreditar novamente na pesquisa científica.

A todos os docentes do Departamento de Bioquímica e Biologia Tecidual, por terem disponibilizado espaços para o desenvolvimento desse trabalho e pela ótima convivência nos últimos 10 anos.

À Lilian Panagio, ex secretária do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural, pelas informações, atenção e suporte a mim prestados.

Ao INFABIC, nas pessoas da Mariana e do Vitor e ao LIB (Laboratório de Imagens Biológicas), coordenado pelo Murilo pela disponibilidade e principalmente pela ajuda na aquisição das imagens.

À Universidade Estadual de Campinas e ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural por terem disponibilizado espaço e oportunidades para meu crescimento profissional.

Ao Fundo de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Extensão (FAEPEX – número de solicitação 2345/19) pela concessão do Auxílio Ponte o qual foi de fundamental importância durante a finalização deste trabalho.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior Brasil (CAPES) – PDSE/CAPES 88881.132023, do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) – processo de número 141437/2018-9 e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) – processo 2012/09602-0.

## Resumo

Durante o desenvolvimento embrionário de camundongos, até o momento da implantação o embrião é composto por dois folhetos extraembrionários, a endoderme primitiva e a trofotoderma e um folheto embrionário, o epiblasto. Após o processo de implantação, ocorre a gastrulação, a qual é responsável pela formação e posicionamento dos três folhetos germinativos: mesoderme, endoderme e ectoderme, os quais irão originar o embrião em si, entre os estágios E6.5 – E7.5. Esses eventos são finamente regulados por interações entre vias de sinalizações e fatores de transcrição. Coup-TFI e Coup-TFII (*Chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor I e II*), são receptores nucleares que apresentam importantes funções durante o desenvolvimento embrionário, sendo descritos por atuarem na transição entre a pluripotência e aquisição de destinos celulares. Neste trabalho, buscamos avaliar por ensaios de perda de função *in vivo* utilizando siRNA e *in vitro* através de nocaute gênico de Coup-TFII, se os Coup-TFs participam na formação da endoderme primitiva, um dos folhetos extraembrionários, além de analisar qual a função de COUP-TFII durante a formação dos três folhetos germinativos por meio da diferenciação de células-tronco embrionárias em corpos embrióides. Nossos resultados sugerem que ambos Coup-TFs participam em conjunto da rede de regulação gênica para a correta especificação da endoderme primitiva, atuando como reguladores negativos, tanto de fatores de pluripotência, quanto de fatores importantes para a especificação da endoderme primitiva. Ao passo que COUP-TFI atua bloqueando a pluripotência para que as células possam seguir destinos de endoderme primitiva, COUP-TFII atua no controle do nível de expressão de genes expressos neste folheto extraembrionário. Adicionalmente, durante a especificação dos três folhetos germinativos, a qual nós analisamos por meio da diferenciação de células-tronco embrionárias, detectamos um padrão de co-expressão de COUP-TFII com marcadores de ectoderme e mesoderme. Esse padrão de co-localização, juntamente com as análises de nocaute gênico sugerem que COUP-TFII está atuando como regulador negativo, tanto de destinos mesodérmicos quanto neuroectodérmicos. Por fim, demonstramos que tanto Coup-TFI como Coup-TFII estão possivelmente sendo regulados pela sinalização FGF, uma importante via de sinalização que controla a formação da endoderme primitiva e a gastrulação. Nossos dados em conjunto adicionam dois novos fatores na rede de regulação que controla a formação da endoderme primitiva, além de demonstramos a participação de Coup-TFII durante a formação dos três folhetos germinativos, eventos essenciais para a formação do embrião.

## Abstract

During the mouse embryonic development, prior to implantation, the embryo is formed by two extraembryonic tissues: the primitive endoderm and the trophectoderm and one embryonic tissue, the epiblast. After implantation, gastrulation takes place, a process responsible for the formation and positioning of the three germ layers: mesoderm, endoderm and ectoderm, which will compose the whole embryo, between the stages E6.5 - E7.5. These events are accurately regulated by interactions between signalling pathways and transcription factors. Coup-TFI and Coup-TFII (*Chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor I and II*), are transcription factors that play key role during embryonic development. Both have been reported to participate in the transition from pluripotency to cell fate specification. In this study, we sought to analyse through loss of function essays *in vitro* by siRNA essays and *in vivo*, by using a Coup-TFII knockout embryonic stem cells, whether Coup-TFs participate in the formation of the primitive endoderm, an extraembryonic layer. Besides that, we analysed the function of Coup-TFII during the formation of the three embryonic germ layers by differentiating embryonic stem cells into embryoid bodies. Our results showed that both COUP-TFs participate together in the gene regulatory network for the correct specification of the primitive endoderm, acting as negative regulators of both, pluripotency factors and important factors for the primitive endoderm specification. While Coup-TFI acts by blocking pluripotency, allowing that cells to follow primitive endoderm fates, COUP-TFII acts to control the expression level of genes expressed in this extraembryonic endoderm. In addition, during germ layer specification in embryoid bodies, we detected a COUP-TFII co-expression pattern with ectoderm and mesoderm markers. This co-localization pattern, together with gene knockout analyses demonstrated that COUP-TFII regulates negatively mesodermal and neuroectodermal specific markers. Finally, we demonstrated that Coup-TFI and Coup-TFII are being regulated by FGF signalling, an important signalling pathway that controls the endoderm primitive segregation and gastrulation. Our results together add two new factors in the regulation network that controls the formation of the primitive endoderm. We also provide evidence that Coup-TFII is participating during the formation of the three germ layers, important event for the formation of the embryo.

## Lista de abreviaturas e siglas

**BMP:** Proteína morfogenética óssea, do inglês *Bone morphogenetic protein*

**BSA:** Albumina sérica bovina

**cDNA:** molécula de DNA complementar, do inglês *Complementary DNA*

**CE:** Corpos Embrióides

**Coup-TFI:** *Chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor I*

**Coup-TFII:** *Chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor II*

**CTE:** Células-Tronco Embrionárias

**DAPI:** *4',6-diamidino-2-phenylindole*

**DBD:** domínio de ligação ao DNA, do inglês *DNA binding domain*

**DEPC:** dietilpirocarbonato

**DMEM:** Dulbeco's Modified Eagle Medium

**EDTA:** ácido etilendiamino tetra-acético, do inglês *Ethylenediamine tetraacetic acid*

**EP:** Endoderme Primitiva

**FGF/ERK:** Fator de Crescimento Fibroblástico/quinase reguladora do sinal extracelular do inglês *Fibroblast growth factor/Extracellular-signal-Regulated Kinases*

**FGF:** Fator de Crescimento Fibroblástico, do inglês *Fibroblast growth factor*

**Foxa2:** do inglês *forkhead box protein A2*, também conhecido como *Hepatocyte nuclear factor 3-beta* (HNF-3 $\beta$ ).

**GAPDH:** Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

**Gata4 e 6:** fator 4 e 6 de ligação ao GATA, do inglês *GATA-binding factor 4 and 6*

**GMEM:** Glasgow Modified Eagle's Medium

**GSK3:** glicogênio sintase quinase 3, do inglês *Glycogen syntase kinase 3*

**Hnf4 $\alpha$ :** Fator nuclear de hepatócito alfa 4, do inglês *Hepatocyte Nuclear Factor 4 Alpha*

**INFABIC:** Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Fotônica Aplicada à Biologia Celular

**JAK/ STAT3:** janus quinase/ transdutor e ativador de transcrição 3, do inglês *janus kinase/Signal transducers and activators of transcription*

**LBD:** domínio de ligação ao ligante, do inglês *ligand-binding domain*

**LIF:** fator inibidor de leukemia, do inglês *Leukemia inhibitory factor*

**MAPK:** proteína-quinases ativadas por mitógenos, do inglês *mitogen-activated protein kinases*

**MCI:** massa Celular Interna

**MEFs:** fibroblastos embrionários de camundongo, do inglês *mouse embryonic fibroblast*

**miRNA:** microRNA

**mm:** milímetros

**Oct4:** do inglês *octamer-binding transcription factor 4*, também conhecido como POU5F1.

**Pax6:** gene membro da família Pax, do inglês *Paired box protein Pax-6*

**PBS:** tampão fosfato salino (do inglês, phosphate buffered saline)

**Pdgfra:** receptor do factor de crescimento derivado de plaquetas, do inglês platelet-derived growth factor receptor alpha

**PFA:** paraformaldeído

**pH:** Potencial hidrogeniônico

**PI3K/AKT:** fosfatidilinositol 3-quinases/serina-treonina quinase, do inglês *Phosphatidylinositol-3-OH Kinase/ Protein kinase B*

**qPCR:** Reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa quantitativa, do inglês *Reverse transcription polymerase chain reaction*

**RNA:** Ácido ribonucleico, do inglês *Ribonucleic acid*

**RPMI:** do inglês, *Roswell Park Memorial Institute*, local onde foi desenvolvido o meio RPMI, utilizado para cultivar diversos tipos celulares.

**SFB:** Soro Fetal Bovino

**siRNA:** RNA interferentes, do inglês *small interfering RNA*

**Sox1:** gene membro da família sox (SRY-related HMG-box 1)

**Sox17:** gene membro da família sox (SRY-related HMG-box 17)

**TGF-β:** Fatores de crescimento e transformação β, do inglês *Transforming Growth Factor-β*

**Wnt:** importante via de sinalização, da combinação dos nomes em inglês dos genes Wg e Int

**μl:** microlitros

**μm:** micrômetros

**XEN:** células da endoderme extraembrionária

## Sumário

<b>1 Introdução</b> .....	14
<b>1.1 Revisão Bibliográfica</b> .....	16
1.1.1 Estágios iniciais do desenvolvimento embrionário de camundongo.....	16
1.1.2 Função da sinalização FGF no início do desenvolvimento embrionário .....	18
1.1.3 Controle da pluripotência em células-tronco embrionárias de camundongo .....	22
1.1.4 Métodos de estudo do desenvolvimento embrionário <i>in vitro</i> .....	25
1.1.5 Função de Coup-TFI e Coup-TFII durante o desenvolvimento embrionário .....	27
<b>2 Objetivos Gerais</b> .....	30
<b>3 Capítulos</b> .....	31
<b>CAPÍTULO 1</b> .....	32
<b>Função de Coup-TFI e Coup-TFII na endoderme extraembrionária de camundongo <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>.</b> .....	32
<b>1.1 Objetivos específicos referente ao Capítulo 1</b> .....	32
<b>1.2 Materiais e métodos</b> .....	33
1.2.1 Cultivo das CTE E14TG2a .....	33
1.2.2 Cultivo das células da endoderme extraembrionária.....	34
1.2.3 Conversão de células-tronco embrionária (CTE) para células da endoderme extraembrionária (XEN).....	34
1.2.4 Ensaios de siRNA em embriões .....	35
1.2.5 Imunofluorescência .....	35
1.2.6 Extração de RNA e síntese de cDNA.....	36
1.2.7 Real Time PCR.....	37
1.2.8 Análises de imagens .....	38
1.2.9 Análises estatísticas.....	38
<b>1.3 Resultados</b> .....	39
1.3.1 Coup-TFII é preferencialmente expresso em células-tronco da endoderme extraembrionária.....	39
1.3.2 Ativação de Coup-TFI e Coup-TFII durante a conversão de Células-Tronco Embrionária em Células da Endoderme Extra Embrionária .....	41
1.3.3 Coup-TFI e Coup-TFII atuam como reguladores negativos de marcadores da endoderme extraembrionária.....	43
1.3.4 Coup-TFI e Coup-TFII são expressos durante os estágios de pré-implantação <i>in vivo</i> .....	46
1.3.5 Coup-TFI e Coup-TFII atuam como reguladores negativos de marcadores da endoderme extraembrionária e pluripotência .....	50

<b>1.4 Discussão</b> .....	53
1.4.1 Coup-TFI e Coup-TFII participam da conversão de células-tronco embrionárias para células da endoderme extraembrionária .....	53
1.4.2 Coup-TFI e Coup-TFII participam do controle da segregação da endoderme primitiva in vivo .....	55
1.4.3 Rede de regulação gênica controlando a segregação da endoderme primitiva in vivo .....	59
1.5 Conclusões referente ao Capítulo 1 .....	63
<b>CAPÍTULO 2</b> .....	65
Participação de Coup-TFII durante a diferenciação dos folhetos germinativos. ....	65
<b>2.1 Objetivos Específicos</b> .....	65
<b>2.2 Materiais e métodos</b> .....	66
2.2.1 Cultivo das CTE E14TG2a .....	66
2.2.2 Diferenciação das CTE E14TG2a - Método Hanging Drop .....	66
2.2.3 Imunofluorescência .....	67
2.2.4 Análises de imagens .....	68
2.2.5 Extração de RNA e síntese de cDNA .....	69
2.2.6 Real Time PCR .....	69
2.2.7 Análises estatísticas .....	70
<b>2.3 Resultados</b> .....	71
2.3.1 Coup-TFII colocaliza com marcadores de especificação celular durante a diferenciação de células-tronco embrionárias .....	71
2.3.2 Coup-TFII atua na regulação de marcadores de folhetos embrionários durante a diferenciação de células-tronco embrionárias .....	75
<b>2.4 Discussão</b> .....	85
<b>2.5 Conclusões referente ao Capítulo 2</b> .....	92
<b>CAPÍTULO 3</b> .....	94
Coup-TFI e Coup-TFII são regulados pela sinalização FGF. ....	94
<b>3.1 Objetivos Específicos:</b> .....	94
<b>3.2 Materiais e métodos</b> .....	95
3.2.1 Cultivo das CTE E14TG2a .....	95
3.2.2 Diferenciação das CTE E14TG2a - Método Hanging Drop .....	95
3.2.3 Imunofluorescência .....	95
3.2.4 Análises de imagens .....	95
3.2.5 Tratamento de embriões com PD .....	96
3.2.6 Extração de RNA e síntese de cDNA .....	96

3.2.7 Real Time PCR.....	96
3.2.8 Análises estatísticas.....	97
<b>3.3 Resultados.....</b>	<b>97</b>
<b>3.4 Discussão.....</b>	<b>105</b>
<b>3.5 Conclusões referente ao Capítulo 3.....</b>	<b>110</b>
<b>4. Conclusões gerais.....</b>	<b>111</b>
<b>5. Considerações Finais.....</b>	<b>113</b>
<b>6. Referências Bibliográficas.....</b>	<b>114</b>
<b>7. Anexos.....</b>	<b>121</b>
<b>Declaração de que a dissertação ou tese não infringe os dispositivos da lei nº 9610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.....</b>	<b>121</b>
<b>Documento referente a Bioética e/ou Biossegurança.....</b>	<b>122</b>

## 1 Introdução

O desenvolvimento inicial de um organismo requer complexas interações entre vias de sinalizações e fatores de transcrição, as quais são responsáveis por coordenar a especificação regionalizada e migração celular de precursores de linhagens celulares em espaços e momentos específicos. Durante os primeiros dias do desenvolvimento de camundongo, o embrião passa por diversas alterações morfogenéticas, originando uma estrutura composta por dois folhetos extraembrionários, a trofotoderma e a endoderme primitiva. Estes dois tecidos extraembrionários circundam o epiblasto, responsável por originar o embrião *in situ*. Posteriormente à segregação destes folhetos, ocorre o processo de implantação no útero, em torno do E4.75 - E5.5. A implantação é acompanhada por profundas mudanças, tanto no compartimento embrionário, quanto no extraembrionário, permitindo assim o início do próximo evento do desenvolvimento, conhecido como gastrulação (Tam e Loebel 2007; Shahbazi e Zernicka-Goetz, 2018).

A gastrulação, por sua vez, é responsável por originar os três folhetos germinativos que compõem o embrião: endoderme, mesoderme e ectoderme. A endoderme originará o epitélio de revestimento do trato digestivo e órgãos como pulmão, fígado e pâncreas. A mesoderme é responsável por formar o coração, músculos, tecido ósseo e cartilaginoso e tecido conjuntivo. A ectoderme é responsável por originar o sistema nervoso, epiderme e anexos cutâneos. Concomitante à formação dos três folhetos germinativos ocorre a padronização de eixos corporais no embrião, como o eixo ântero-posterior, onde é necessária a participação das células dos compartimentos extraembrionários (Tam e Loebel 2007; Shahbazi e Zernicka-Goetz, 2018).

Uma vez que esses eventos ocorrem enquanto o embrião se desenvolve dentro do corpo da mãe, torna-se difícil acessar os detalhes que regem as aquisições de destinos celulares e os movimentos morfogenéticos. Entretanto, nos últimos anos a criação de técnicas que permitem que o embrião se desenvolva *in vitro* durante o início do desenvolvimento, aliado com o desenvolvimento de técnicas de microscopia e de controle da expressão gênica, tem nos proporcionado o entendimento de como as linhagens celulares são especificadas e a desvendar como uma única célula é capaz de originar um organismo complexo. Além disso, o uso das células-tronco embrionárias (CTE), como um sistema modelo para o estudo da Biologia do Desenvolvimento tornou possível o estudo de eventos chaves que regulam a aquisição inicial de destinos celulares durante o desenvolvimento de embriões (Murry e Keller, 2008).

No presente trabalho avaliamos a participação de COUP-TFI e COUP-TFII (*Chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor I and II*) durante a segregação da endoderme primitiva *in vivo* e *in vitro* e de COUP-TFII durante a formação dos três folhetos germinativos *in vitro*. Nos questionamos qual seria a função desses fatores em ambos contextos, pois trabalhos demonstram que tanto *Coup-TFI* quanto *Coup-TFII* são expressos por células da endoderme primitiva no E3.5. Além do mais, ambos já foram descritos participando de circuitos regulatórios que controlam a transição entre a pluripotência e a aquisição de destinos celulares (Fujikura et al., 2002; Rosa e Brivanlou, 2011).

Os receptores nucleares COUP-TFI e COUP-TFII apresentam um padrão de expressão distinto em tecidos originados dos três folhetos germinativos. Enquanto COUP-TFI é altamente expresso no sistema nervoso, COUP-TFII é expresso no átrio e no mesênquima de órgãos em desenvolvimento (Qiu et al., 1994; Pereira et al., 1995; Pereira et al., 2000; Lin et al., 2011). Além disso, ambos já foram descritos por modular a expressão de fatores específicos da endoderme extraembrionária (Edgar e Murray 2001; Fujikura et al., 2002).

Apesar de amplamente caracterizados durante estágios tardios do desenvolvimento embrionário, a função de ambos Coup-TFs em estágios mais iniciais do desenvolvimento é pouco explorada. Diante disso, buscamos demonstrar em que momentos do desenvolvimento esses fatores são ativados e como esses participam da rede de regulação que coordena a formação de um folheto extraembrionário, a endoderme primitiva. Aliado a isso, o fato de Coup-TFII apresentar um padrão de expressão muito amplo entre derivados dos três folhetos germinativos nos levou a questionar se esse teria alguma participação durante o início da gastrulação.

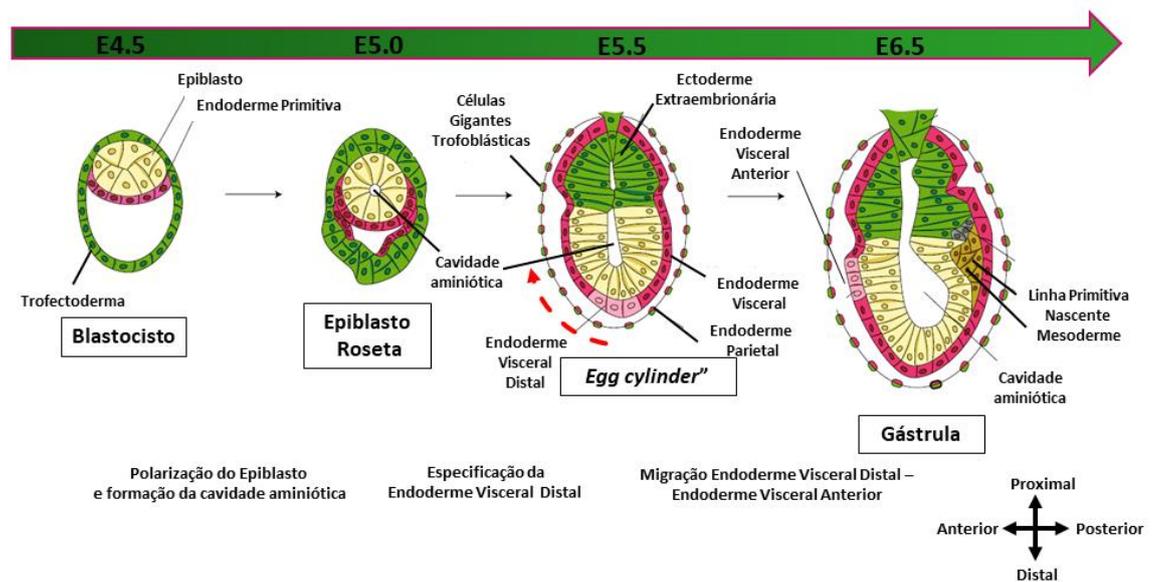
Nosso trabalho demonstrou a participação de COUP-TFI e COUP-TFII no complexo circuito que regula a formação e manutenção da endoderme primitiva, sendo que COUP-TFI parece ser mais essencial no início desse processo, enquanto COUP-TFII desempenha funções relacionadas a manutenção dessas células. Além disso COUP-TFII participa da regulação que controla a aquisição de destinos mesodérmicos e ectodérmicos durante a gastrulação. Por último, demonstramos que métodos que bloqueiam a via de sinalização FGF, essencial durante esses dois momentos do desenvolvimento, decrescem a expressão de Coup-TFI e Coup-TFII. Esses resultados em conjunto somam indícios da participação de ambos Coup-TFs durante o início do desenvolvimento embrionário.

## 1.1 Revisão Bibliográfica

### 1.1.1 Estágios iniciais do desenvolvimento embrionário de camundongo

Durante os primeiros dias do desenvolvimento embrionário de camundongos, duas divisões celulares assimétricas posicionam células mais externa e mais internamente no embrião em formação. Células posicionadas periféricamente originarão o trofotoderma, enquanto as células internas irão originar a massa celular interna no estágio E3.5. O próximo estágio (E4.5) é marcado pela segregação das células da massa celular interna em epiblasto e endoderme primitiva. Nesse estágio o embrião é denominado de blastocisto. Enquanto o epiblasto irá originar o embrião em si, a endoderme primitiva irá formar os anexos extraembrionários em conjunto com o trofotoderma, tais como saco vitelínico e placenta, respectivamente (Rossant e Tam, 2009; Morris et al., 2010; Stephenson et al., 2012; Bedzhov et al., 2014).

Logo após a completa definição dos três folhetos embrionários (epiblasto, endoderme primitiva e trofotoderma) no estágio E4.5, tem início o processo de implantação no útero entre E4.75 – E5.0, o qual é acompanhado por uma intensa modificação desse blastocisto. Ao passo que as células do epiblasto se organizam em uma estrutura epitelial que envolve a cavidade amniótica (Bedzhov e Zernicka-Goetz, 2014), no compartimento extraembrionário, o trofotoderma origina adjacente ao epiblasto a ectoderme extraembrionária (Figura 1). Uma vez formada, a ectoderme extraembrionária fornece tanto células necessárias à formação da placenta, quanto células que originarão as células trofoblásticas gigantes, indispensáveis ao processo de implantação (Latos e Hemberger, 2016; Shahbazi e Zernicka-Goetz, 2018). Paralelamente, a endoderme primitiva passa por um processo de diferenciação e origina duas populações celulares distintas: a endoderme parietal, que se alinha com as células trofoblásticas gigantes recobrando o embrião externamente e a endoderme visceral, a qual recobre o epiblasto e a ectoderme extraembrionária (Figura 1) (Latos e Hemberger, 2016).



**Figura 1: Resumo dos principais eventos durante o início do desenvolvimento embrionário de camundongo:** No E4.5 o embrião é composto pelo Epiblasto, Endoderme Primitiva e Trofotoderma, denominado de blastocisto. As células do Epiblasto se polarizam e ocorre um processo de lumenogênese, formando a cavidade amniótica no E5.0. Por volta do E5.5, algumas células da Endoderme Visceral se especificam gerando a Endoderme Visceral Distal, as quais migram anteriormente (seta vermelha), originando a Endoderme Visceral Anterior, responsável por induzir a formação da linha primitiva no lado oposto do embrião (posterior), iniciando assim, o processo de gastrulação no E6.5. Adaptada de Shahbazi e Zernicka-Goetz, 2018.

Apesar de não participarem da formação do embrião em si, os folhetos extraembrionários são de extrema importância para a implantação e formação da cavidade amniótica. Além disso, emitem sinais moleculares que controlam a padronização do eixo ântero-posterior e consequente formação da linha primitiva durante a gastrulação (Tam e Loebel, 2007; Latos e Hemberger, 2016).

Um dos primeiros eventos que ocorre no embrião e é controlado pelas células dos folhetos extraembrionários é a formação da cavidade amniótica. Esse processo é caracterizado pela polarização das células do epiblasto, as quais adquirem uma conformação epitelial característica de roseta e consequente formação de um lúmen, a cavidade amniótica (E5.0 – E5.5) (Bedzhov e Zernicka-Goetz, 2014). Para que ocorra a polarização celular em domínio ápical/basal e o processo de lumenogênese é necessária a interação de receptores  $\beta 1$ -INTEGRINA, presentes nas membranas dessas células com componentes da matriz extracelular adjacente, composta principalmente por LAMININA. Nesse estágio do desenvolvimento a LAMININA é secretada por células da trofotoderma e endoderme primitiva, os dois folhetos extraembrionários (Tam e Loebel, 2007; Li et al., 2003; Bedzhov e Zernicka-Goetz, 2014).

Além disso, os folhetos extraembrionários também são essenciais para a padronização do eixo ântero-posterior do embrião e consequente início da gastrulação (Tam e

Loebel, 2007; Shahbazi e Zernicka-Goetz, 2018). Aproximadamente no E5.5, na porção distal, algumas células da Endoderme Visceral se diferenciam e formam a Endoderme Visceral Distal. Uma vez formadas, essas células migram no sentido anterior, caracterizando assim, a região anterior do embrião. A partir desse momento essas células são então denominadas Endoderme Visceral Anterior (Figura 1) (Srinivas, 2006; Rivera-Perez et al., 2003; Shahbazi e Zernicka-Goetz, 2018). As células que compõem a Endoderme Visceral Anterior são responsáveis por secretarem antagonistas de WNT e NODAL, criando assim, um gradiente de expressão ântero-posterior dessas sinalizações. Esse gradiente de expressão é responsável por desencadear a especificação da linha primitiva na parte posterior do Epiblasto ao redor do E6.5, caracterizada pela expressão localizada de BRACHYURYT e WNT3 nessa região (Rivera-Pérez e Magnuson, 2005; Tam et al., 2006; Tam e Loebel, 2007).

Num próximo momento, as células da região posterior do epiblasto passam por uma transição epitélio-mesênquima, migram através da linha primitiva e originam a mesoderme e a endoderme definitiva. Já as células que não migraram se diferenciam em derivados ectodérmicos, se posicionando no lado anterior do embrião. Esse processo é conhecido como gastrulação e é responsável por originar os três folhetos que irão compor o embrião em si: endoderme, mesoderme e ectoderme (Tam et al., 2006; Tam e Loebel, 2007).

Os movimentos morfogenéticos descritos acima, os quais caracterizam os eventos iniciais do desenvolvimento embrionário, são controlados pela ativação e inibição de vias de sinalização como BMP, WNT, FGF e membros da família TGF- $\beta$ , como ACTIVINA/NODAL. Essas vias são ativadas em momentos e em regiões específicas, as quais ativam ou inibem a expressão de fatores de transcrição, criando assim as redes de regulações gênicas que controlam a formação de um organismo (Hogan, 1996; Tam e Behringer, 1997; Schier e Shen, 2000; Yamaguchi, 2001; Rivera-Pérez e Hadjantonakis, 2015).

Dentre as diversas vias de sinalização que regem o desenvolvimento embrionário, a via de sinalização FGF tem grande destaque durante as primeiras aquisições de destinos celulares, uma vez que coordena a segregação dos folhetos extraembrionários, além de ser essencial durante os movimentos morfogenéticos durante a gastrulação (Tam e Loebel, 2007; Yamanaka et al., 2010).

### **1.1.2 Função da sinalização FGF no início do desenvolvimento embrionário**

A sinalização FGF (do inglês *Fibroblast Growth Factor*) é constituída por 18 ligantes que interagem com 4 diferentes receptores (FGFr1, FGFr2, FGFr3 e FGFr4) os quais

são expressos em diferentes estágios do desenvolvimento embrionário, organogênese e também no organismo adulto, onde participam do controle de diferentes processos biológicos. A interação dos ligantes de FGF com seus receptores é regulada por proteoglicanos, como Heparan Sulfato, o qual atua como cofator responsável por regular a afinidade e especificidade dessa interação ligante-receptor (Ornitz e Itoh, 2015; Brewer et al., 2016).

Durante os estágios iniciais do desenvolvimento a sinalização FGF é responsável por coordenar a segregação de células da massa celular interna em epiblasto e endoderme primitiva, processo que ocorre entre os E3.5 e E4.5 (Morris et al., 2013; Yamanaka et al., 2010). Além do mais, também é essencial na aquisição de destinos celulares do embrião durante a gastrulação que se inicia no E6.5 (Ciruna e Rossant, 2001; Tam e Loebel, 2007).

No estágio E3.5 NANOG marcador do epiblasto pluripotente e GATA6, característico da endoderme primitiva, ainda são co-expressos nas células da massa celular interna, mas esse padrão de expressão se torna mutualmente exclusivo uma vez que as células se comprometem com destinos específicos, sendo NANOG expresso nas células do epiblasto e GATA6, nas células da endoderme primitiva (Chazaud et al., 2006; Guo et al., 2010). Estudos mostram que essa expressão diferencial entre Nanog e Gata6 é controlada pela correlação inversa de expressão de FGF4 em células que originarão o epiblasto, enquanto as células que darão origem a endoderme primitiva expressam o receptor de FGF2 (FGFr2). O fato de células que irão originar a endoderme primitiva apresentarem uma maior quantidade de FGFr2, faz com que essas células sejam mais responsivas à sinalização FGF, quando comparadas com as células que originarão o epiblasto, fazendo com que essas células migrem e formem a endoderme primitiva. (Nichols et al., 2009; Guo et al., 2010, Lanner e Rossant, 2010).

A importância da sinalização FGF durante a formação da endoderme primitiva é comprovada por ensaios de nocaute gênico, onde embriões nocaute para *Fgf4*, expressam inicialmente GATA6, SOX17 e PDGFR $\alpha$ , identificados como marcadores iniciais deste folheto, porém a expressão desses fatores não é mantida. Com a perda da expressão desses fatores, as células da massa celular interna que iriam migrar para formar a endoderme primitiva passam a expressar marcadores do epiblasto, como NANOG, bloqueando assim a formação da endoderme primitiva (Morris, et al., 2010; Kang et al., 2012; Krawchuk et al., 2013). Resultados similares foram encontrados na ausência dos receptores de FGF1 e FGF2 (FGFr1 e FGFr2, respectivamente), em que os pesquisadores relatam que nos embriões nocaute para ambos os receptores as células da massa celular interna não migram para originar a endoderme primitiva, e assim como no nocaute para *Fgf4*, as células mantêm a expressão de NANOG (Molotkov et al., 2017).

A ausência de genes chaves nesse processo também tem sido descrita por perturbar a formação da endoderme primitiva. Entretanto como esse é um processo altamente regulado por diversos fatores que são co-expressos, ocorre uma redundância de função, sendo difícil identificar funções específicas de genes individuais. Adicionalmente, como outros fatores podem compensar a função do gene deletado, muitas vezes o nocaute de fatores individuais causa letalidade ou defeitos severos somente em estágios mais tardios, como pós gastrulação (Kuo et al., 1997; Futaki et al., 2004; Shimoda et al., 2007; Niakan et al., 2010)

Um dos exemplos é GATA6, considerado um dos primeiros fatores característicos de endoderme primitiva a ser ativado. É inicialmente expresso no E2.5, sendo que sua ausência é letal no E6.5 devido a defeitos na endoderme visceral. Além disso os embriões nocaute para *Gata6* não expressam Sox17, Gata4, Pdgfra e Hnf4 $\alpha$ , importantes marcadores de endoderme primitiva e endoderme visceral, enquanto as células do Epiblasto mantêm a expressão de Oct4 e Sox2 (Morrisey et al., 1998; Schrode et al., 2014). Por outro lado, a ausência de *Gata4* causa letalidade em embriões entre o E8.5 e E10.5 com diversos problemas de má formações, incluindo cardíacas, porém esses embriões mantêm a expressão de Gata6, Hnf4 $\alpha$  e Hnf3 $\beta$  (Foxa2) (Kuo et al., 1997).

De forma similar ao observado para Gata4, a ausência de SOX17 também não bloqueia a formação de endoderme primitiva, mas sim causa defeitos tardios na endoderme definitiva e não na extraembrionária. Os autores ainda relatam que a ausência de fenótipo na endoderme extraembrionária, folheto onde esse gene está altamente expresso no período pré-gastrulação, provavelmente está associada à compensação por outros fatores os quais atuam nesse processo, como Sox7 e Gata6 (Kanai-azuma et al., 2002; Shimoda et al., 2007).

Além de ser essencial para a formação de folhetos extraembrionários, a sinalização FGF é indispensável durante a gastrulação (Ciruna e Rossant, 2001; Tam e Loebel, 2007). O crucial papel de FGF durante a formação dos três folhetos embrionários é evidenciado pelos fenótipos causados na ausência de FGF8 e receptor de FGF1 (FGFr1). O nocaute de *Fgfr1* causa falha na transição epitélio mesênquima, evento necessário para que as células migrem através da linha primitiva originando mesoderme e endoderme. Essa falha é decorrente da não ativação de Snail e da manutenção da expressão de E-caderina. Os autores também relatam um decréscimo na expressão de Tbx6 e Brachyury-T, dois fatores importantes para a especificação inicial da mesoderme (Sun, et al., 1999; Ciruna e Rossant, 2001; Tam e Loebel, 2007).

Consistente com esses resultados, na ausência de FGF8 também há uma falha na migração das células através da linha primitiva, entretanto, nesse caso a transição epitélio mesênquima ocorre normalmente e as células que irão formar a mesoderme e endoderme

iniciam o processo de migração, porém essa migração não é completa. Essa falha na migração causa uma dispersão dessas células pelo embrião e acarreta na não formação de mesoderme e endoderme. Diferentemente do observado para o nocaute de *Fgfr1* em que a expressão de *BrachyuryT* diminui, nesse trabalho o nocaute de *Fgf8* faz com que o domínio de expressão de *Brachyury T* seja alterado (Sun et al., 1999; Tam e Loebel, 2007).

Além de experimentos de perda de função, a descoberta de inibidores e ativadores descritos por modular a via de sinalização FGF tem propiciado a descoberta de interações dessa via com fatores chaves tanto durante a segregação da endoderme primitiva, quanto durante a gastrulação (Nichols et al., 2009; Yamanaka et al., 2010; Oki et al., 2010; Morris et al., 2013).

Yamanaka et al., (2010) demonstrou que por modular a sinalização FGF, através da inibição de MEK/ERK resulta em bloqueio da formação de endoderme primitiva, caracterizado pela ausência de células GATA6 positivas, enquanto as células da massa celular interna mantém a expressão de NANOG. O efeito oposto foi observado com a adição de FGF4, onde as células da massa celular interna passaram a expressar GATA6 enquanto a expressão de NANOG diminuiu. Resultados similares foram observados por Morris et al. (2013), no qual a inibição de FGFR utilizando PD173074, um específico inibidor de FGFR, resultou em embriões no estágio E4.5 sem a formação de endoderme primitiva, caracterizados pela ausência de células expressando SOX17. Esse mesmo fenótipo é observado em camundongos nocautes para *Fgf4* como relatado anteriormente (Molotkov et al., 2017).

Proteoglicanos, como heparan sulfato, podem atuar como co-receptores para ligantes FGF ou na estabilização e montagem do complexo ligante-receptor FGF/FGFR (Lanner e Rossant, 2010). Com isso, além da utilização de inibidores que bloqueiam a cascata de regulação da via de sinalização FGF, métodos que perturbam o complexo ligante-receptor, tem sido amplamente utilizados para analisar a função dessa via de sinalização durante o desenvolvimento e diferenciação de células-tronco embrionárias (CTE) (Lanner et al., 2010; Oki et al., 2010).

Durante a diferenciação de CTE, Lanner et al. (2010) mostraram que o tratamento dessas células com 20mM de  $\text{NaClO}_3^-$ , o qual reduz a sulfatação de proteoglicanos, impedindo a correta ligação ligante-receptor, bloqueia a diferenciação de CTE, mantendo o estado pluripotente dessas células. Além disso, embriões cultivados do estágio E2.5 ao E4.5 com a mesma concentração de  $\text{NaClO}_3^-$ , resulta na completa ausência de células da endoderme primitiva expressando GATA6 e um maior número de células expressando NANOG (Lanner et al., 2010). Tais resultados são similares aos descritos com nocautes de *Fgf4* e com o uso de inibidores de MEK/ERK e receptor de FGF.

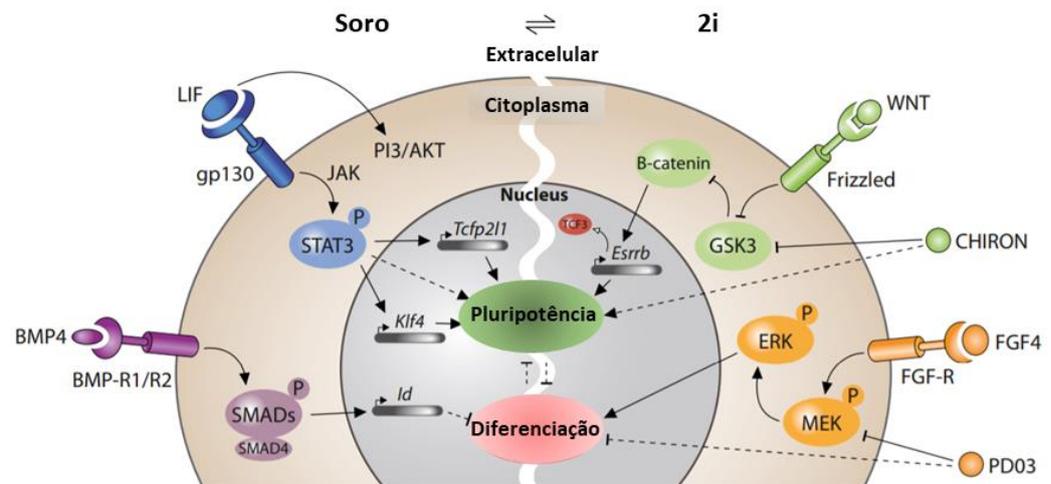
Além de interferir na formação da endoderme primitiva, a utilização do  $\text{NaClO}_3^-$  e PD173074, um específico inibidor de FGFR, também demonstra efeitos durante a gastrulação. Embriões no estágio E6.2 tratados com  $\text{NaClO}_3^-$  e PD173074 apresentam os mesmos defeitos observados durante a gastrulação de embriões nocautes para *Fgf8* e *Fgfr1*. A adição desse reagente levou à falha na transição epitélio-mesênquima, diminuição na expressão de *Snail*, queda de marcadores mesodérmicos, como *Tbx6* e alteração na localização da expressão de *BrachyuryT* e *Foxa2* (Oki et al., 2010),

Dessa forma, esses dados em conjunto demonstram que a utilização desses químicos, os quais podem inibir a via de sinalização FGF, seja impedindo a ligação ligante-receptor, ou mesmo bloqueando a cascata de ativação da via, nos fornecem resultados muito similares com os obtidos nos nocautes de *Fgf* e *Fgfr*, comprovando que a utilização desses métodos podem atuar como uma alternativa ao nocaute gênico.

### **1.1.3 Controle da pluripotência em células-tronco embrionárias de camundongo**

Pluripotência é definida como a capacidade de uma única célula em originar todos os tipos celulares presentes no organismo adulto. Essa propriedade pode ser obtida através do cultivo de células-tronco embrionárias (CTE) *in vitro*, as quais são originadas da massa celular interna de embriões no E3.5. As CTE foram primeiramente derivadas na década de 80 e desde então representam uma das mais valiosas fontes de estudos relacionadas às aquisições de destinos celulares (Evans e Kaufman, 1981; Martin, 1981).

Entretanto, a capacidade das CTE em manter a pluripotência *in vitro* requer a adição contínua de fatores extrínsecos, os quais ativam vias de sinalização capazes tanto de ativar fatores de transcrição que mantêm a pluripotência dessas células, quanto ativar fatores que bloqueiam a diferenciação celular. As principais moléculas sinalizadoras descritas por atuarem nesse complexo processo são: o Fator inibidor de leucemia (LIF, do inglês *Leukemia inhibitory factor*), Proteína morfogenética óssea (BMP, do inglês *Bone morphogenic protein*), Wnt e fatores de transcrição como Oct3/4, Nanog e Sox2, os quais mantêm a pluripotência através da repressão de programas de diferenciação (Boyer et al., 2005; Wobus e Boheler, 2005; He et al., 2009).



**Figura 2: Padrões de sinalização e a manutenção da pluripotência:** Na condição mantida com soro, BMP4 atua ativando genes inibidores da diferenciação (*Id*), enquanto LIF, através de JAK ativa Stat3, ativando *Tcfp2l1* and *Klf4*, dois fatores de transcrição importantes para manter a pluripotência. Em condições onde se utilizam 2i: CHIRON inibe GSK3, o qual bloqueia  $\beta$ -catenina, com isso a via de sinalização WNT se mantém ativa. PD03 inibe MEK/ERK, inibindo a sinalização FGF. Setas indicam ativação, enquanto barras mostram o efeito inibitório. Linhas tracejadas indicam efeito indireto, enquanto linhas inteiras indicam interações diretas. Adaptado de (Hackett e Surani, 2014).

O LIF é uma glicoproteína solúvel da família das interleucinas 6 (IL-6) da classe das citocinas. A sinalização de LIF é iniciada através da dimerização do receptor LIFR $\beta$  com a glicoproteína transdutora de sinal gp130, os quais são responsáveis pela ativação de duas vias que atuam na regulação da auto renovação em CTE: sinalização JAK-STAT (do inglês *janus kinase - Signal transducers and activators of transcription*) e PI3K/AKT (do inglês *Phosphatidylinositol-3-OH Kinase/ Protein kinase B*) (Burdon et al., 2002; Niwa et al., 2009; Hackett e Surani, 2014).

A ativação de JAK leva a ativação de STAT3, que é translocada para o núcleo, onde controla a transcrição de genes alvos que regulam a auto-renovação, como *Tfcp2l1* e *Klf4* que por sua vez ativa *Sox2*. A segunda via é através da ativação de PI3K/AKT a qual, preferencialmente, ativa *Tbx3* que leva a estimulação de *Nanog* (Niwa et al., 2009; Saunders et al., 2013; Hackett e Surani, 2014).

Adicionalmente, BMP4, um dos principais componentes presentes no soro utilizado no preparo de meios de cultura, atua em conjunto com LIF na manutenção da pluripotência. Esse fator atua através da ativação de padrões SMAD os quais ativam genes Inibidores da diferenciação (*Id*), bloqueando a aquisição de destinos celulares (Hackett e Surani, 2014).

Tradicionalmente as CTE eram mantidas em cultura com meio suplementado com Soro e LIF. Entretanto, ao mesmo tempo que essas condições mantinham o estado pluripotente dessas células, também era observado um certo grau de heterogeneidade e até mesmo alguns

índices de diferenciação. Com isso, recentemente tem se utilizado a inibição combinada de GSK3 (do inglês *Glycogen syntase kinase 3*) e de FGF/ERK (do inglês *Fibroblast growth factor/Extracellular-signal-Regulated Kinases*) para aumentar a eficiência no controle da pluripotência (Hackett e Surani, 2014).

Esse sistema utilizando a adição de inibidores de GSK3 e FGF/ERK é conhecido como 2i, ou seja, dois inibidores. Quando CTE são cultivadas em meio básico contendo LIF e 2i, as células são mantidas em um estado homogêneo de pluripotência, no qual o nível de Nanog se torna homogêneo entre as CTE, o que não é encontrado por exemplo, em condições de cultura na ausência desses fatores (Wray et al., 2010; Hackett e Surani, 2014).

Funcionalmente, GSK3 atua como um regulador negativo da sinalização WNT, por fosforilar  $\beta$ -catenina e direcioná-la à degradação. A inibição de GSK3 leva ao acúmulo de  $\beta$ -catenina no núcleo e consequente ativação da via WNT, o que resulta na expressão de fatores de transcrição tais como Oct3/4, Nanog e Rex1, essenciais na manutenção do estado pluripotente das CTE (Sato et al., 2004; Wobus e Boheler, 2005; Kirby et al., 2012). Por outro lado, o bloqueio da sinalização FGF/ERK, responsáveis por conduzir as CTE a entrar em um estado de transição entre a pluripotência e diferenciação, tanto para destinos neurais quanto mesodérmicos, retém a expressão de marcadores de pluripotência Oct4, Nanog e Rex1 (Kunath et al., 2007; Wray et al., 2010).

Esses sinais extracelulares conduzem, através de vias de sinalização, a ativação de fatores de transcrição responsáveis por controlar a pluripotência das CTE. OCT4, SOX2 e NANOG são definidos como fatores chaves no controle da pluripotência, atuando através de uma rede de regulação gênica onde, além de influenciarem suas próprias transcrições através de *feedback* positivo e negativo, também controlam a ativação de um conjunto de genes alvos relacionados ao controle da pluripotência tanto *in vivo* quanto *in vitro* (He et al., 2009; Hackett e Surani, 2014). Os mecanismos descritos acima estão ilustrados na Figura 2.

Além das CTE, linhagens de células-tronco originadas de tecidos extraembrionários também têm sido estabelecidas. As células da endoderme extraembrionária (XEN) são derivadas da Endoderme Primitiva, enquanto células-tronco da trofotoderme são originadas do Trofotoderma do embrião e mantidas em cultura com a adição de FGF no meio (Tanaka et al., 1998; Niakan et al., 2013). Esses avanços na obtenção e manutenção em cultura de células-tronco que compõem o embrião em si, juntamente com as que formam os folhetos extraembrionários, têm possibilitado grandes avanços na obtenção de métodos de estudos que mimetizam o desenvolvimento embrionário.

### 1.1.4 Métodos de estudo do desenvolvimento embrionário *in vitro*

Uma vez que as CTE possuem a capacidade de originar todos os tipos celulares que compõem o organismo adulto, essas células se tornam uma valiosa ferramenta de estudo para entender os mecanismos da especificação celular. Um dos métodos mais utilizados para induzir a diferenciação das CTE é através da formação de corpos embrioides (CE), os quais são agregados celulares (Kurosawa, 2007; Bratt-Leal e Carpenedo, 2009).

Nestes agregados, CTE dão origem a uma variedade de tipos celulares especializados oriundos dos três folhetos germinativos: endoderme, mesoderme e ectoderme, recapitulando estágios iniciais do desenvolvimento embrionário, com uma relação temporal de expressão gênica muito similar com o observado *in vivo* (Leahy et al., 1999; Itskovitz-Eldor et al., 2000; Bratt-Leal e Carpenedo, 2009). CE com três dias de desenvolvimento são considerados equivalentes a embriões de camundongos no período de pré-gastrulação, que compreende entre os estágios E4.5 – 6.5. Enquanto a análise de CE entre 3 e 5 dias de diferenciação se assemelha a embriões no período de gastrulação, o que corresponde aos estágios E6.5 – 7.5 *in vivo* (Leahy et al., 1999; Sajini et al., 2012; Brickman e Serup, 2017).

Entretanto, ainda há uma grande divergência quanto ao fato de CE recapitularem eventos do desenvolvimento embrionário. Apesar de possuírem uma capacidade intrínseca de originar células dos três folhetos germinativos em uma relação temporal semelhante com embriões, alguns autores afirmam que CE não apresentam nenhum padrão organizacional que controle a diferenciação como um todo e sim uma distribuição espacial desorganizada de marcadores dos folhetos. Isso se deve principalmente a ausência de folhetos extraembrionários e ao maior número de células de CE comparado com embriões em estágios análogos (Pekkanen-Mattila et al., 2010; Sajini et al., 2012).

Por outro lado, outros trabalhos demonstram que agregados de CTE conseguem recapitular alguns aspectos da organização espacial do desenvolvimento embrionário. Estudos desenvolvidos por Berge e colaboradores (2008) demonstraram em CE uma polarização ântero-posterior e a formação de uma região semelhante a linha primitiva. Nessa região as células passam por uma transição epitélio-mesenquimal, caracterizada pela expressão de Snail e fibronectina e se diferenciam em progenitores de mesoderme, expressando BRACHYURY-T e de endoderme, expressando FOXA2, sendo que essa polarização é dependente da ativação local da sinalização WNT. Adicionalmente, marcadores de neuroectoderme, PAX6 e SOX1 se localizam em pólos opostos a localização da via WNT e marcadores de mesoendoderme,

comprovando que CE apresentam um nível organizacional consistente com o processo observado *in vivo*, como descrito em Tam e Behringer, (1997) e Yamaguchi, (2001).

De modo semelhante Marikawa et al., (2009) através da formação de agregados originados de células-tronco de carcinoma embrionário, relatam a expressão localizada de padrões espaciais distintos de expressão gênica, característicos da formação de mesoderme, com expressão localizada de *BrachyuryT* e *Wnt3a* no 6º dia de diferenciação celular. Adicionalmente, essas expressões coincidiram com uma morfologia alongada apresentada pelos CE, semelhante ao que ocorre no embrião normal durante a formação do eixo ântero-posterior e consequente gastrulação (Marikawa et al., 2009).

Resultados similares foram obtidos por Van den Brink et al., (2014), onde os autores cultivaram CE com aproximadamente 300 CTE por dois dias em meio N2B27 seguido por tratamento com ativadores de vias de sinalização as quais induzem a diferenciação de mesoderme: WNT e ACTIVINA/NODAL. Essas condições específicas de cultura culminaram na formação de CE altamente organizados, com características muito semelhantes à observada em embriões no período de gastrulação, sendo assim denominados gastrulóides. Além da morfologia alongada, os CE apresentaram expressão polarizada de marcadores de mesoendoderme, tais como BRACHYURY-T, TBX6, SOX17 e neuroectoderme, como SOX1, semelhante a encontrada em embriões durante o desenvolvimento.

Recentemente, um trabalho demonstrou que a co-cultura de CTE com células do trofotoderma embebidas em matriz gel, a qual é uma fonte de matriz extracelular para esse sistema, resultou em estruturas que se auto-organizaram com uma morfologia muito semelhante ao embrião, em aproximadamente 22% dos casos. Nesses agregados, chamados de “*ETs embryos*”, as células presentes no compartimento originado de CTE, foram capazes de se organizarem e formar um lúmen, se assemelhando a cavidade amniótica com 72 horas. Além disso, apresentaram a expressão regionalizada de BRACHYURY-T que foi inicialmente detectada após 90 horas de diferenciação (Harrison et al., 2017).

No entanto, quando os pesquisadores adicionaram nesse sistema uma terceira linhagem de células-tronco, as células da endoderme extraembrionária (XEN), essas estruturas agora denominadas de “*ETX embryo*” apresentaram um avanço no desenvolvimento com a formação de uma camada externa de células semelhante a Endoderme Visceral Distal observada *in vivo*. Essa camada de células além de expressar marcadores que caracterizam o lado anterior do embrião, também propiciou que os eventos morfogênicos associados a gastrulação nesse sistema ocorressem de forma mais organizada do que o observado nos embriões formados apenas por CTE e células do Trofotoderma, (*ETs embryos*) (SOZEN et al., 2018).

Esses trabalhos demonstram fortes evidências de que tanto as CTE, quanto as de endoderme primitiva e trofotoderma, apresentam intrinsecamente a capacidade de se auto organizarem e recapitular etapas que ocorrem durante o desenvolvimento. Resultados do nosso grupo de pesquisa demonstrou que a expressão de COUP-TFII, um fator de transcrição importante para o desenvolvimento embrionário, apresenta expressão espacialmente localizada em CE nos primeiros dias de diferenciação e que essa expressão pode estar relacionada com a aquisição de destinos celulares (Rosa, VS 2013).

### **1.1.5 Função de Coup-TFI e Coup-TFII durante o desenvolvimento embrionário**

Os receptores nucleares Coup-TFI e Coup-TFII, também conhecidos como Nr2f1 e Nr2f2, são chamados de receptores nucleares órfãos, por não possuírem um ligante específico identificado (Pereira et al., 1995). Ambos apresentam um padrão de expressão distinto em tecidos originados dos três folhetos germinativos: COUP-TFI é altamente expresso no sistema nervoso, enquanto COUP-TFII é expresso no átrio e no mesênquima de órgãos em desenvolvimento (Qiu et al., 1994; Pereira et al., 1995; Pereira et al., 2000; Lin et al., 2011). A função desses fatores de transcrição está relacionada tanto com a repressão (Tsai e Tsai 1997; Pereira et al., 2000), quanto com a ativação gênica (Power e Cereghini, 1996; Rosa e Brivanlou, 2011).

*In vivo*, o início de suas expressões é controverso. Alguns trabalhos relatam que ambos são inicialmente detectados no estágio E7.5, pós-gastrulação, apresentando pico de expressão entre os estágios E10 e E13, com declínio antes do nascimento (Qiu et al., 1997; Tsai e Tsai, 1997). No entanto, há autores que relatam a expressão de Coup-TFI e Coup-TFII em células da Endoderme Primitiva nos estágios E3.5 – E4.5 (Murry e Edgar, 2001). Nesse mesmo trabalho, Murry e Edgar, 2001, reportaram que *Coup-TFI* e *Coup-TFII* regulam positivamente a expressão de LAMININA. Nos estágios iniciais do desenvolvimento, a LAMININA é secretada por células da Endoderme Primitiva, sendo essencial para o processo de lumenogênese do epiblasto, o qual resulta na formação da cavidade amniótica (Bedzhov e Zernicka-Goetz 2014).

Entretanto, apesar de Coup-TFI e Coup-TFII estarem expressos no E3.5, na superfície da massa celular interna, em células que supostamente seriam Endoderme Primitiva, a ausência de *Coup-TFI* não é suficiente para interferir na distribuição de células que afetaria a formação da endoderme primitiva (Meilhac et al. 2009). Porém, não há relatos de que a ausência de Coup-TFII ou de ambos, poderia afetar a segregação da massa celular interna em endoderme

primitiva e epiblasto. Ou ainda, se a ausência dos Coup-TFs poderia afetar a organização das células do epiblasto em um lúmen, uma vez que este processo é dependente da expressão de LAMININA.

A inativação de *Coup-TFII* leva a letalidade embrionária no 10º dia de desenvolvimento devido a defeitos no átrio e no desenvolvimento vascular, apresentando também retardo no crescimento, hemorragias e edemas, indicando sua importante participação na angiogênese durante o desenvolvimento (Pereira et al., 1999; Boudot et al., 2011). Camundongos heterozigotos para *Coup-TFII* apresentam defeitos em derivados mesodérmicos, incluindo tecido muscular, adiposo e trato reprodutivo (Takamoto et al., 2005; Li et al., 2009; Xie et al., 2011). Por outro lado, embriões nocaute para *Coup-TFI* morrem no período perinatal e apresentam defeitos na neurogênese, como aumento de morte de precursores neuronais, defeitos nas projeções de nervos e arborizações de axônios (Qiu et al., 1997).

Apesar da ausência dos Coup-TFs causarem danos severos apenas em estágios mais tardios do desenvolvimento ou mesmo no pós parto, ambos já foram descritos por se relacionarem com genes chaves que controlam a formação da endoderme primitiva (Murry e Edgar, 2001; Fujikura et al., 2002; Zhuang e Gudas 2008).

Um dos exemplos dessa relação é através da superexpressão de *Gata6* utilizada para converter CTE para células da endoderme extraembrionária, processo análogo a formação da Endoderme Primitiva que ocorre *in vivo*. Durante essa conversão os autores relatam um aumento na expressão tanto de *Coup-TFI* quanto de *Coup-TFII* induzidas por GATA6. Entretanto, quando realizaram a superexpressão de *Coup-TFI*, para testar se esse fator tinha a mesma habilidade que *Gata6*, os autores relatam um aumento na expressão de genes associados a endoderme extraembrionária e repressão de marcadores de pluripotência. Porém, somente a superexpressão de *Coup-TFI* não foi suficiente para a formação de células da endoderme extraembrionária a partir de CTE (Fujikura et al., 2002).

Zhuang e Gudas, (2008) relataram resultados semelhantes utilizando tratamento com ácido retinóico. A sinalização do ácido retinóico atua induzindo a expressão dos Coup-TFs e também pode ser utilizado para induzir a diferenciação endodérmica. Assim, esses autores demonstraram que durante a diferenciação com ácido retinóico, CTE superexpressando *Coup-TFI* apresentam um aumento na expressão de genes associados a endoderme extraembrionária, tais como *Gata6*, *Gata4*, *Laminina B1*, *Laminina C1* e *Sox17*, comparada com a diferenciação de CTE selvagens e induzidas a diferenciar com ácido retinóico. Com isso, os autores concluem que COUP-TFI auxilia na conversão de CTE para células da endoderme extraembrionária, aumentando a eficiência deste processo.

De modo similar, COUP-TFII também foi descrito por participar da rede de regulação gênica que controla a diferenciação para células da endoderme extraembrionária induzidas por ácido retinóico. Nesse caso, os autores relatam que durante a diferenciação de Endoderme Parietal o silenciamento gênico de *Gata4* acarreta em um pequeno aumento de *Coup-TFII*, enquanto o silenciamento de *Gata6* e *Sox7* decrescem a expressão de *Coup-TFII*, mas não são suficientes para inibir a expressão desse fator (Futaki et al., 2004).

No que diz respeito a função de COUP-TFII durante a diferenciação de CTE humanas em CE, *Coup-TFII* é primeiramente detectado no 4º dia de diferenciação e é responsável pela ativação de *Pax6*, fator de transcrição importante para especificação de ectoderme neural (Rosa e Brivanlou, 2011). Entretanto, o nocaute de *Coup-TFII* nessas células não altera a expressão de *Brachyury-T*, expresso em células de origem mesodérmicas e *Sox1*, expresso em estádios mais tardios da diferenciação neural de CTE humanas (Rosa e Brivanlou, 2011).

Além de atuar na determinação de destinos celulares, COUP-TFII também se relaciona com o fator de transcrição Oct4 e o miRNA miR-302, em um circuito complexo que regula a pluripotência de CTE humanas. No estado indiferenciado, OCT4 regula positivamente o miR-302 e este por sua vez, reprime a expressão de *Coup-TFII*. Por outro lado, durante a diferenciação, COUP-TFII inibe diretamente *Oct4*, desencadeando um ciclo de feedback positivo para a sua própria expressão. Estes dados em conjunto evidenciam o papel de COUP-TFII na ativação de genes durante estágios iniciais de especificação celular em CTE humanas, além de atuar no balanço entre o estado indiferenciado e a diferenciação celular (Rosa e Brivanlou, 2011; Hu et al., 2012).

Xie et al., (2011) analisando a participação de COUP-TFII na especificação de linhagem e diferenciação celular de células mesenquimais multipotentes, relataram que COUP-TFII controla a plasticidade dos precursores mesenquimais promovendo a adipogênese e condrogênese, enquanto inibe a miogênese e a osteogênese. Adicionalmente, durante a osteogênese através da diferenciação de células mesenquimais C3H10T1/2 Lee et al. (2016) relatou que a expressão de *Coup-TFII* é regulada por FGF2. A inibição do receptor de FGF e MEK1/2 diminuiu a expressão de *Coup-TFII*, enquanto que o tratamento com FGF2 induziu um aumento no nível de *Coup-TFII*, a nível de expressão gênica e protéica, reprimindo assim, a diferenciação osteogênica.

Uma vez que COUP-TFI e COUP-TFII apresentam entre si uma grande similaridade entre as sequências dos domínios de ligação ao DNA (DBD) e dos domínios de ligação ao ligante (LBD) (Wang et al., 1991; Tsai e Tsai, 1997; Boudot et al., 2011), é possível

que tenham um papel redundante em diferentes contextos. Essa hipótese é corroborada por dois trabalhos, um deles descreve a participação de Coup-TFI e Coup-TFII durante o desenvolvimento de olho. Os resultados deste trabalho demonstram que o nocaute individual desses genes não resulta em nenhuma alteração durante esse processo. Porém, em camundongos nocauteados para os dois fatores de transcrição, células progenitoras da vesícula óptica dorso-distal não se diferenciam corretamente, comprometendo o desenvolvimento de identidades próximo-ventrais, formação da haste óptica e do talo óptico (Tang et al., 2010).

Outro trabalho demonstrou que os Coup-TFs apresentam a capacidade de compensar a função um ao outro no útero durante a gestação. Camundongos fêmeas nocautes para *Coup-TFII* apresentam problemas durante o processo de implantação e decidualização do embrião devido a redução na produção de progesterona. Os autores deste trabalho demonstraram que a superexpressão de COUP-TFI nesses camundongos resultou em sítios de implantação normais, quando comparados com os embriões do grupo controle, comprovando que a presença de COUP-TFI pode suprir a ausência de COUP-TFII (Wu et al., 2010).

Apesar de embriões nocautes para *Coup-TFI* e *Coup-TFII* morrerem no pós parto e estágio E10, respectivamente, não há trabalhos que detalhem a participação de ambos em estágios mais iniciais do desenvolvimento, particularmente *in vivo*. Uma vez que trabalhos mostram suas expressões no período pré-implantação e que podem estar relacionados tanto com o controle de genes chaves desses estágios, como com a segregação dos três folhetos germinativos durante a gastrulação, o objetivo deste trabalho foi avaliar a participação, principalmente de COUP-TFII nesses estágios do desenvolvimento.

## 2 Objetivos Gerais

Tendo em vista que ambos Coup-TFs foram descritos em células da endoderme primitiva e também participam de diversos processos de aquisição de destinos celulares, buscamos avaliar neste trabalho, a participação de COUP-TFI e COUP-TFII no contexto do início do desenvolvimento embrionário de camundongos. Nossos objetivos consistem na análise de função de Coup-TFI e Coup-TFII durante a segregação da endoderme primitiva, *in vivo* e *in vitro*, e na análise de Coup-TFII durante a segregação dos folhetos embrionários, *in vitro*. Adicionalmente, avaliamos o possível controle da regulação desses fatores pela via de

sinalização FGF, descrita como essencial tanto durante a formação da endoderme primitiva, como durante a gastrulação.

### **3 Capítulos**

Esta tese está dividida em três capítulos, os quais foram separados de acordo com o momento do desenvolvimento embrionário que estamos focando.

Capítulo 1: Função de Coup-TFI e Coup-TFII na endoderme extraembrionária de camundongo *in vivo* e *in vitro*.

Capítulo 2: Função de Coup-TFII na aquisição de destinos celulares.

Capítulo 3: Controle da expressão de Coup-TFI e Coup-TFII pela sinalização FGF.

# ***CAPÍTULO 1***

---

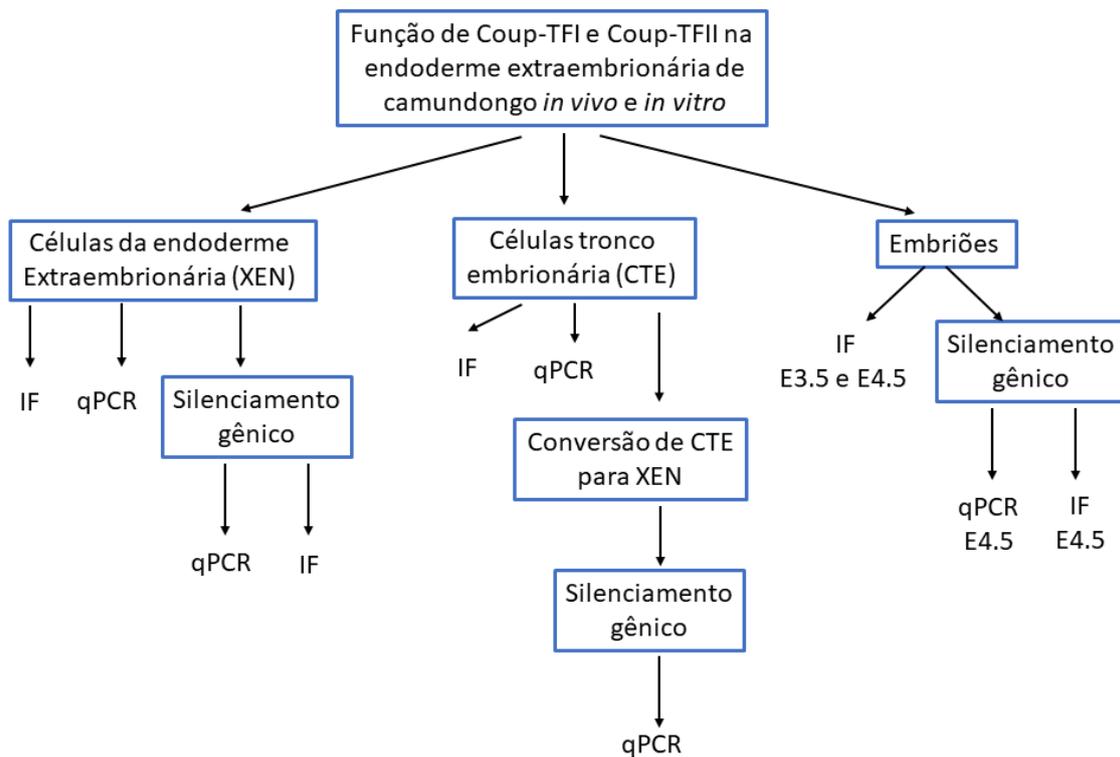
## **Função de Coup-TFI e Coup-TFII na endoderme extraembrionária de camundongo *in vivo* e *in vitro*.**

Neste capítulo buscamos avaliar a participação de Coup-TFI e Coup-TFII durante a segregação de endoderme primitiva *in vivo* por meio de experimentos de silenciamento gênico em embriões. Também analisamos qual a função desses fatores nas células-tronco originadas da endoderme primitiva, conhecidas como XEN (células-tronco da endoderme extraembrionária) já estabelecidas no laboratório. Além disso, analisamos a função de ambos Coup-TFs durante um processo de conversão de células-tronco embrionárias para células da endoderme extraembrionária, processo que recapitula a formação da endoderme primitiva *in vitro*.

Os experimentos realizados nessa parte do trabalho foram desenvolvidos no laboratório da Profa. Magdalena Zernicka-Goetz, na Universidade de Cambridge, durante a realização do doutorado sanduíche por um período de 6 meses.

### **1.1 Objetivos específicos referente ao Capítulo 1**

- Avaliação da expressão de Coup-TFI e Coup-TFII em células-tronco embrionária e células da endoderme extraembrionária por qPCR e imunofluorescência.
- Análise da função de Coup-TFII em células da endoderme extraembrionária por meio de ensaios de silenciamento gênico com siRNAs.
- Avaliação da expressão de Coup-TFI e Coup-TFII durante a conversão de células-tronco embrionária para células da endoderme extraembrionária por meio de qPCR.
- Análise da função de Coup-TFI, Coup-TFII e Coup-TFI/Coup-TFII durante a conversão de CTE para células da endoderme extraembrionária por meio de ensaios de silenciamento gênico com siRNAs.
- Avaliação da expressão de COUP-TFI e COUP-TFII nos estágios E3.5 e E4.5 do desenvolvimento de camundongos por meio de imunofluorescência.
- Análise de função de Coup-TFI, Coup-TFII no estágio E4.5 por meio de ensaios de silenciamento gênico com siRNAs.



Esquema ilustrativo dos objetivos, modelos de estudo e métodos utilizados. A descrição detalhada dos métodos se encontra no ítem 1.2.

## 1.2 Materiais e métodos

### 1.2.1 Cultivo das CTE E14TG2a

A linhagem de células E14TG2a são mantidas indiferenciadas em cultivo com meio Glasgow Modified Eagle's Medium (GMEM) (Sigma, USA), com 1000 U/mL de fator inibidor de leucemia (LIF) (ESGRO-LIF; ChemiconMillipore), 1 $\mu$ m de PD0325901, 3 $\mu$ m de CHIR99021, 0.1 mM de  $\beta$ -mercaptoetanol, 1% v/v de aminoácidos não essenciais (MEM NEAA), 50 U/mL de penicilina, 50  $\mu$ g/mL de streptomicina, 2 de mM L-glutamina, e 15% v/v de soro fetal bovino (FBS), em incubadora de CO<sub>2</sub> 5%, à 37 °C. As subculturas das CTE são feitas a cada dois dias, quando as células em cultura apresentam-se com 80 a 90% de confluência. As garrafas de cultura utilizadas para o cultivo das CTE são previamente tratadas com 0,1% m/v de gelatina.

### 1.2.2 Cultivo das células da endoderme extraembrionária

As células da endoderme extraembrionária (XEN) são mantidas em meio RPMI 1640, suplementado com 0.1 mM de  $\beta$ -mercaptoetanol, 1% v/v de aminoácidos não essenciais (MEM NEAA), 50 U/mL de penicilina, 50  $\mu$ g/mL de streptomicina, 2 de mM L-glutamina, e 15% v/v de soro fetal bovino (SFB), em incubadora de CO<sub>2</sub> 5%, à 37 °C. As subculturas das XEN são feitas a cada dois dias ou quando as células em cultura apresentam-se com 80 a 90% de confluência. As garrafas ou placas de cultura utilizadas para o cultivo das XEN são previamente tratadas com 0,1% m/v de gelatina.

Para o ensaio de siRNA, utilizamos o reagente Lipofectamine RNAi MAX-siRNA mix. Para silenciamento de Coup-TFI foi utilizado o siRNA s65630 (Thermo Fisher Scientific) e para Coup-TFII, Nr2f2MSS235955 (Thermo Fisher Scientific). Como controle foi utilizado AllStars negative control siRNAs (1027280, Qiagen). Todos os siRNA foram utilizados na concentração final de 10nM.

### 1.2.3 Conversão de células-tronco embrionária (CTE) para células da endoderme extraembrionária (XEN)

A conversão foi realizada seguindo o protocolo descrito por Niakan et al., 2013, em que utilizamos ácido retinóico (1 $\mu$ M) e Activina A (10ng/ml). No primeiro dia, as CTE foram plaqueadas em placas de 6 poços (48.000 células) em meio RPMI (descrito acima). No segundo dia é adicionado meio RPMI com ácido retinóico e activina A. No terceiro dia é adicionado meio fresco RPMI e no quarto dia as células são passadas para um novo poço contendo uma camada de MEF (mouse embryonic fibroblast) em meio RPMI. No sétimo dia ou quando estiverem confluentes, as células são passadas para um novo poço, sem MEFs. As células foram cultivadas por um período de 12 a 15 dias, até ser observada a morfologia característica de células da endoderme extraembrionária. Para padronização da expressão de *Coup-TFI* e *Coup-TFII* durante a conversão, coletamos as células nos dias 2, 4, 7, 10, 12 e 15. O dia 2 foi considerado como controle do processo de conversão.

Para análise da expressão gênica por qPCR nós coletamos nos dias 2, 4, 7, 10, 12 e 15. O dia 2 foi considerado como controle da conversão, pois foi o dia que iniciamos o tratamento com ácido retinóico e activina A.

Para o ensaio de siRNA durante a conversão de CTE para células XEN, utilizamos Lipofectamine RNAi MAX-siRNA mix. Todos os siRNA foram utilizados na concentração final de 5pmol. Como controle do siRNA, AllStars negative control siRNAs (1027280, Qiagen) foi utilizado.

#### **1.2.4 Ensaios de siRNA em embriões**

Todos os experimentos com embriões foram realizados no laboratório da Prof. Magdalena Zernicka-Goetz na Universidade de Cambridge e os experimentos foram regulamentados pela emenda da lei de animais, Art 1986 de Procedimentos Científicos de 2012 após revisão ética pelo Comitê de Ética e Bem Estar Animal da Universidade de Cambridge (AWERB).

Para silenciamento de Coup-TFI foi utilizado o siRNA s65630 (Thermo Fisher Scientific) e para Coup-TFII, Nr2f2MSS235955 (Thermo Fisher Scientific). Como controle foi utilizado AllStars negative control siRNAs (1027280, Qiagen) e LifeAct-eGFP (300 ng/ $\mu$ l). Os siRNAs foram injetados utilizando o microinjetor Eppendorf Femtojet.

Os embriões foram coletados no estágio de 2 células (E1.5) em meio M2 e separados aleatoriamente entre os grupos controle e que iriam receber o siRNA. Os siRNA foram injetados nos 2 blastômeros, na concentração de 500 nm. Os embriões foram então cultivados em gotas em placas de petri com meio KSOM (MR-020P-5F, Millipore) e cobertas com óleo mineral para cultivo de embriões em incubadora a 37°C até o estágio E4.5, onde realizamos as análises de qPCR ou imunofluorescência.

#### **1.2.5 Imunofluorescência**

As amostras foram fixadas com PFA4% por 15 minutos a temperatura ambiente. Após etapa de fixação, as amostras são lavadas em PBS 0,1M, pH 7,4 permeabilizadas com PBS contendo 0,3% de Triton X-100 e 0,1M de glicina por 30 minutos a temperatura ambiente. As amostras foram incubadas com anticorpo primário (tabela 1) overnight a 4°C, lavadas três vezes com PBS + 0,1% de Triton, seguida da incubação do anticorpo secundário (tabela 1) por 2 horas a temperatura ambiente. Os anticorpos primários e secundários foram diluídos em solução contendo 1% BSA e 0,1% Tween. As amostras foram incubadas em DAPI, na diluição de 1:1000.

As imagens foram obtidas com microscópio confocal SP5 (Leica Microsystems) ou microscópio confocal SP8 (Leica Microsystems) objetiva de 40 ou 63X.

**Tabela 1: Anticorpos primários (A) e secundários (B) utilizados nos experimentos de imunofluorescência.**

**A**

Anticorpo Primário	Fabricante	Diluição
Mouse anti-Coup-TFII	Ab41859	1:100
Rabbit anti-Nanog	(8822 Cell Signaling)	1:100
Rabbit anti-Coup-TFI	Ab181137 Abcam	1:100
Goat anti-Gata6	AF1700 R&D Systems	1:200
Goat anti-Sox17		1:200
Rabbit anti-Nanog	ab80892 Abcam	1:200
Mouse anti-Oct3/4	sc-5279 Santa Cruz	1:200
Rabbit anti-Laminina	L9393 Sigma	1:400
Goat anti-OTX2	AF1979 R&D Systems	1:200

**B**

Anticorpo Secundário	Diluição
Alexa Fluor® 488 Goat Anti-Rabbit (Invitrogen A-11008)	1:500
Alexa Fluor® 488 Donkey Anti-Goat (Invitrogen A-11055)	1:500
Alexa Fluor® 647 Donkey Anti-Rabbit (Invitrogen A-11078)	1:500
Alexa Fluor® 555 Donkey Anti-Mouse (Invitrogen A-10037)	1:500
Alexa Fluor® 555 Donkey Anti-Rabbit (Invitrogen A-1)	1:500
Alexa Fluor® 488 Goat Anti-Rabbit (Invitrogen A-11008)	1:500
Alexa Fluor® 568 Donkey Anti-Goat (Invitrogen A-11057)	1:500

### 1.2.6 Extração de RNA e síntese de cDNA

O RNA total das amostras foi extraído utilizando-se o reagente Trizol (Invitrogen) seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante. As amostras foram maceradas em eppendorfs contendo 1mL de Trizol e incubados por 5 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, adicionou-se 200 µL de clorofórmio a cada amostra, agitou por 15 segundos e incubou novamente por 3 minutos à temperatura ambiente. Na sequência, o material foi centrifugado a

14000xG por 15 minutos a -4 °C. Após a centrifugação, a fase aquosa foi removida, adicionou-se 500 µL de isopropanol e incubou por 10 minutos à temperatura ambiente. O material foi centrifugado a 14000xG por 10 minutos a -4 °C para formação do pellet na parede do tubo. Após essa etapa, o sobrenadante foi removido, e adicionou-se álcool etílico 70% a -4 °C e o material foi então novamente centrifugado a 7000xG por 5 minutos a -4 °C. Finalmente, o sobrenadante foi retirado e o pellet permaneceu durante 15 minutos exposto para secar. Em seguida, o material foi ressuscitado em 20 µL de água DEPC (Dietilpirocarbonato).

A avaliação da integridade das amostras de RNA total obtidas foi feita por meio da eletroforese em gel de agarose a 1% e a concentração e pureza do RNA foi analisada utilizando o espectrofotômetro Nanodrop ND-1000 UV-Vis (Nanodrop Technologies), a partir da absorbância a 260 nm, e razões 280/260 nm e 260/230 nm, respectivamente.

Para as análises de expressão gênica em células XENc e conversão de CTE para XENc, 1µg de RNA foi utilizado para a síntese de cDNA utilizando, primers randômicos (C1181, Promega), dNTPs (N0447S, New England BioLabs), inibidor de RNase (M0314L, New England BioLabs) e M-MuLV transcriptase reversa (M0253L, New England BioLabs).

Para as análises com embrião, foi utilizado o kit Arcturus PicoPure RNA isolation Kit (Qiagen, Cat n° 12204-01).

### 1.2.7 Real Time PCR

Os primers utilizados foram desenhados com o auxílio da ferramenta Primer Blast do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) com base no banco de dados do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) ou retirados do banco de dados: <https://pga.mgh.harvard.edu/primerbank/> e confeccionados comercialmente.

O gene de referência utilizado como controle endógeno foi o Gapdh. Os resultados foram normalizados usando os valores de Ct (*threshold cycle*) desse gene de referência. Para quantificar a expressão gênica relativa, foi utilizado o modelo matemático  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

As reações de PCR foram realizadas utilizando Power SYBR Green PCR Master Mix (4368708, ThermoFisher Scientific) no equipamento Step One Plus Real-Time PCR machiner (Applied Biosystems). O seguinte programa foi utilizado: 10 min a 95°C seguidos por 40 ciclos de 15 segundos a 95°C (denaturação) e 1 min a 60°C (anelamento e extensão), seguindo de uma etapa final para a construção da curva de *melting* de 72 °C por 20 s, 60 °C por 1min e 95 °C por 15 s. Os primers utilizados estão listados na tabela 2.

**Tabela 2: Primers utilizados nos experimentos de qPCR.**

Gene	<i>Foward</i>	<i>Reverse</i>
<b>Coup-TFI</b>	GCGGTTTCAGCGAGGAAGAAT	CATGCACTGGCTGCCATAAC
<b>Coup-TFII</b>	GCGCAGACGGCATGTATGATA	GGGTTGCCCTGGTACTGAAG
<b>Gapdh</b>	ACTGGCATGGCCTTCCGTGTTT	ATTGAGAGCAATGCCAGCCCCG
<b>Gata4</b>	ATGGGCACAGCAGCTCCATGTC	TGCATAGCCTTGTGGGGACAGC
<b>Gata6</b>	TTGCTCCGGTAACAGCAGTGGC	TCTCGGGGTTGGCGTTTTCTCC
<b>Sox17</b>	GACTGCGGAGTGAACCTCTC	GTCGGCAACCGTCAAATGTC
<b>LamininaB1</b>	GAAGGGCCCCTCTCCTCTC	CCCATAGGGCTAGGACACCA
<b>LamininaC1</b>	ACATGCCAGCGAGTGTGTAA	AGTCACAAGGAAGGCACTCG
<b>Oct4</b>	TGCAAATCGGAGACCCTGGTGC	ATCTTTTGCCCTTCTGGCGCCG
<b>Nanog</b>	TCTTCCTGGTCCCCACAGTTT	GCAAGAATAGTTCTCGGGATGAA

### 1.2.8 Análises de imagens

Todas as análises de quantificação de imunofluorescência e reconstrução em 3D foram realizadas utilizando ImageJ (Fiji).

Para a quantificação de fluorescência utilizamos o canal com Dapi para delimitar núcleo, aplicamos essa delimitação nos canais de interesse e medimos a intensidade da fluorescência, utilizando a função *mean gray value* do Image J.

Para a quantificação de fluorescências em embriões, selecionamos um plano central representativo para cada embrião e realizamos o mesmo procedimento descrito acima. Para as quantificações da expressão de COUP-TFI e COUP-TFII em células da endoderme primitiva, epiblasto e trofectoderma, foi realizada normalização com a quantificação do Dapi.

### 1.2.9 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa GraphPad Prism. Os dados foram analisados utilizando Student's test, para dois grupos, ou ANOVA test para múltiplos grupos, com múltiplas comparações e pós teste de Tukey. A significância estatística foi definida como  $P < 0,05$ . Os dados estão apresentados como média  $\pm$  erro-padrão da média (SEM $\pm$ ).

### 1.2.10 Análises de dados de sequenciamento

Os gráficos demonstrados na figura suplementar 1 foram realizadas acessando dados de sequenciamento de *single cell* de embriões publicados em Pijuan-Sala et al., 2019.

Os autores disponibilizaram os dados obtidos nesse trabalho em um aplicativo, o qual acessamos por meio do endereço: <https://marionilab.cruk.cam.ac.uk/MouseGastrulation2018/>.

Analizamos a expressão de Coup-TFI e Coup-TFII nos E6.5, E7.0 e E8.0. No campo “Projection Type” selecionamos a opção UMAP e no campo “Plot Colour” selecionamos a opção Cell type.

## 1.3 Resultados

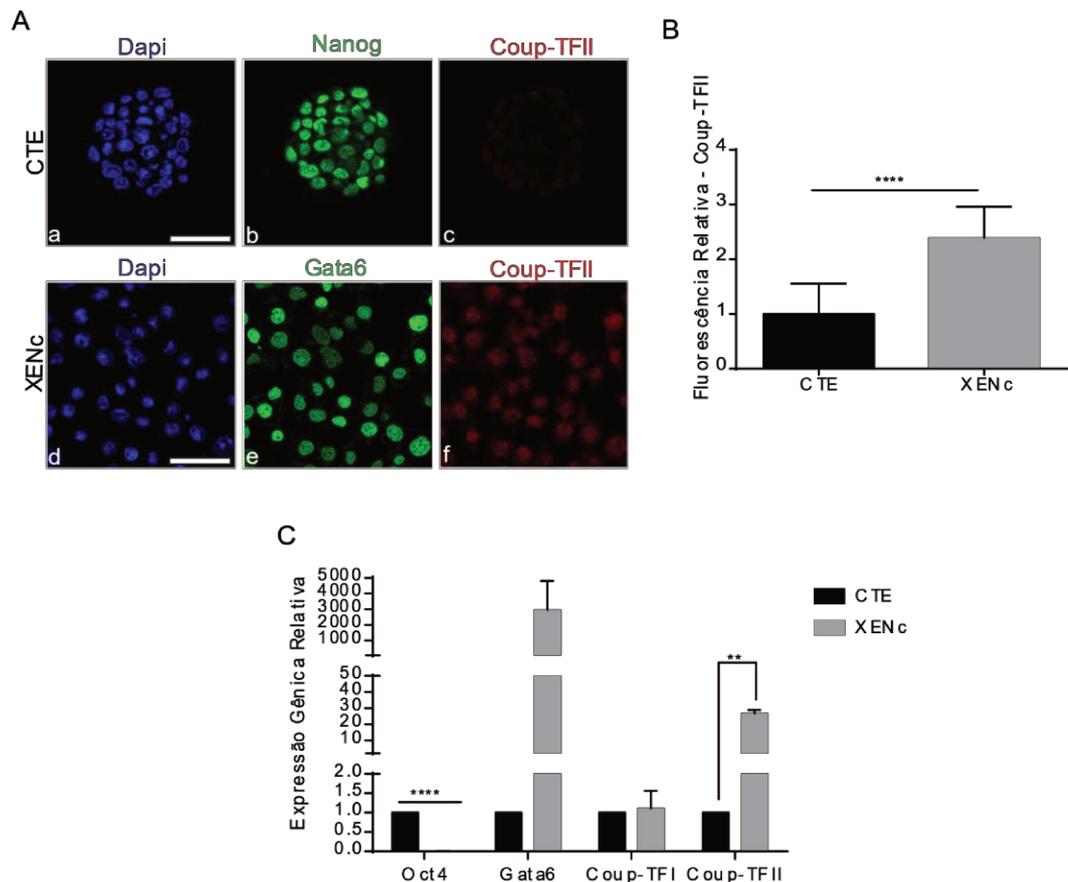
### 1.3.1 Coup-TFII é preferencialmente expresso em células-tronco da endoderme extraembrionária

As células XEN (Células-tronco da endoderme extra-embrionária) vem sendo utilizadas para entender os mecanismos de desenvolvimento da endoderme primitiva. A expressão de *Coup-TFI* e *Coup-TFII* foi observada em células da endoderme primitiva em embriões no E3.5 (Murray e Edgar, 2001). Para investigar se esses fatores de transcrição apresentam alguma função nas células XEN, as quais são originadas da endoderme primitiva, ou mesmo na especificação da endoderme primitiva *in vivo*, iniciamos nossas análises por comparar a expressão de Coup-TFI e Coup-TFII entre CTE e células XEN já estabelecidas em nosso laboratório, por meio de qPCR e imunofluorescência (Figura 1).

Para demonstrar o estado pluripotente das CTE, utilizamos NANOG (Figura 1A b) e GATA6 como um marcador de células XEN (Figura 1A e). No estado indiferenciado destas células, COUP-TFII não foi detectado em CTE (Figura 1A c), enquanto foi detectado em células XEN (Figura 1A f). O gráfico da figura 1B demonstra a quantificação da intensidade de fluorescência de COUP-TFII entre CTE e XEN apresentada em 1A, onde podemos notar que COUP-TFII apresenta maior expressão em XEN comparado com CTE.

Quando realizamos análise de expressão gênica relativa de *Coup-TFI* e *Coup-TFII* em CTE e células XEN não observamos diferença em relação a expressão de *Coup-TFI* entre CTE e células XEN, porém *Coup-TFII* é mais expresso nas células XEN em relação as CTE (Figura 1C). *Oct4* e *Gata6* foram utilizados como marcadores de CTE e células XEN, respectivamente.

As mesmas análises de imunofluorescência foram realizadas para Coup-TFI entre CTE e células XEN, porém não foi possível detectar marcação com as condições e reagentes utilizados (dados não mostrados).



**Figura 1: Análise da expressão diferencial de Coup-TFI e Coup-TFII em células-tronco embrionária (CTE) e células da endoderme extraembrionárias (XENc).** A: Imunofluorescência de COUP-TFII, NANOG e GATA6 em CTE e células XEN. B: Quantificação da intensidade de fluorescência de Coup-TFII referente as imagens demonstradas em A, nas linhagens de CTE e XENc. C: Expressão gênica relativa de *Oct4*, *Gata6*, *Coup-TFI* e *Coup-TFII* entre CTE e XENc. Significância  $p < 0,01$  (\*\*),  $p < 0,0001$  (\*\*\*\*). N=3. Test T. Média  $\pm$  SEM. Barras 50 $\mu$ m.

### 1.3.2 Ativação de Coup-TFI e Coup-TFII durante a conversão de Células-Tronco Embrionária em Células da Endoderme Extra Embrionária

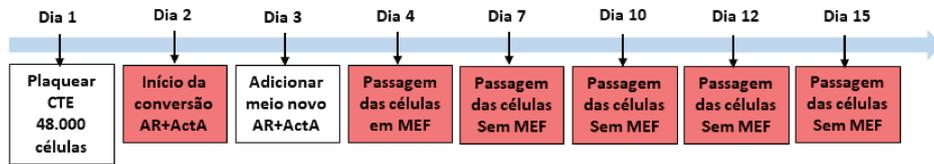
Além de linhagens de células XEN estabelecidas em laboratórios por meio da derivação direto de embriões no E4.5, protocolos estão sendo estabelecidos para converter CTE em células XEN *in vitro*, como a superexpressão de *Gata6* ou através da utilização combinada de ácido retinóico e Activina A (Niakan et al., 2013). Uma vez que *Coup-TFI* e *Coup-TFII* foram descritos por serem ativados durante essa conversão (Fujikura et al., 2002), nós inicialmente analisamos o momento de ativação desses fatores durante a conversão.

Com base no protocolo descrito por Niakan et al., 2013, induzimos a conversão de CTE para células XEN e analisamos o perfil de expressão gênica durante 15 dias. O desenho experimental está ilustrado na Figura 2A.

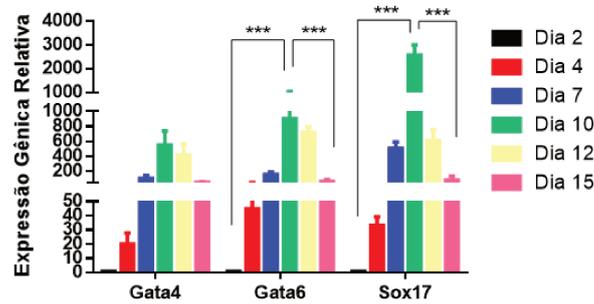
Na Figura 2B podemos observar que a expressão de marcadores de células XEN, *Gata4*, *Gata6* e *Sox17*, foi inicialmente detectada no 4° dia, apresentaram um pico no 10° dia e tendem a decair no 12° dia, porém ainda são altamente expressos nas células terminalmente convertidas, 15° dia. Por outro lado, a expressão de marcadores de pluripotência, *Oct4* e *Nanog*, diminuíram logo no início do processo, demonstrando a eficiência da conversão de CTE para células XEN (Figura 2C).

*Coup-TFII* é inicialmente detectado no 4° dia, se mantendo sem grandes variações até o 12° dia, diminuindo no 15° dia, porém em níveis maiores do que observado no início da conversão (dia 2). Por outro lado, a expressão de *Coup-TFI* apresenta um aumento significativo no 4° dia e a partir do 7° dia tende a diminuir, atingindo níveis muito baixos no 15° dia, ou seja, com as células XEN completamente convertidas (Figura 2D).

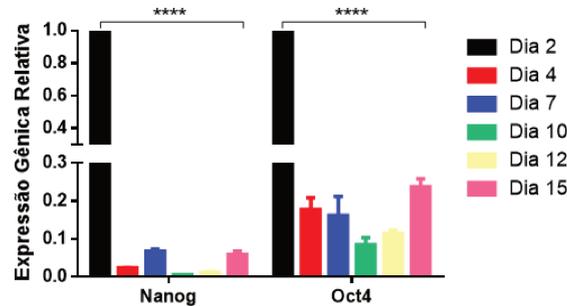
A



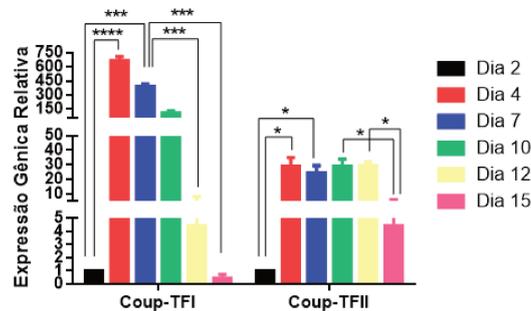
B



C



D

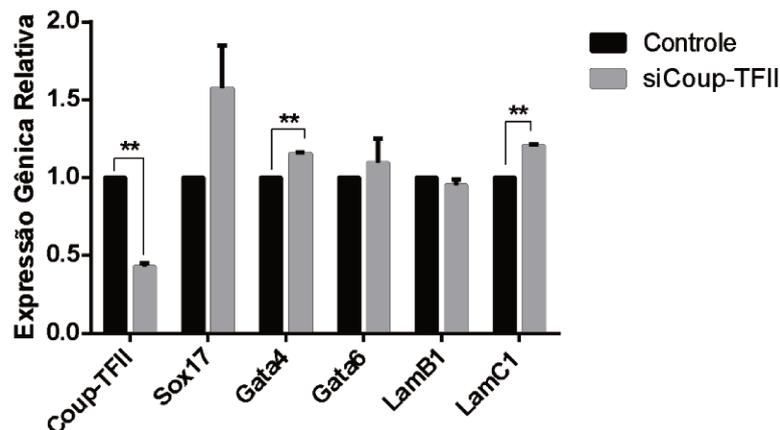


**Figura 2:** Análise da expressão gênica relativa de marcadores de endoderme extraembrionária, pluripotência, *Coup-TFI* e *Coup-TFII* durante o processo de conversão de CTE para células XEN. A: Esquema do protocolo utilizado e dias analisados. B: Expressão gênica relativa de marcadores de células XEN *Gata4*, *Gata6*, *Sox17*. C: Expressão gênica relativa de marcadores de pluripotência, *Oct4* e *Nanog*. D: Expressão relativa de *Coup-TFI* e *Coup-TFII*. Significância  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*),  $p < 0,001$  (\*\*\*),  $p < 0,0001$  (\*\*\*\*). ANOVA. Média  $\pm$  SEM. N=2.

### 1.3.3 Coup-TFI e Coup-TFII atuam como reguladores negativos de marcadores da endoderme extraembrionária

A fim de analisar se a expressão de Coup-TFII poderia influenciar na expressão de marcadores de células XEN, realizamos ensaios de silenciamento gênico com siRNA para Coup-TFII em linhagens de células XEN já estabelecidas e analisamos a expressão de *Gata4*, *Gata6*, *Sox17*, *Laminina B1* e *Laminina C1*. Para esse ensaio as células foram mantidas por 48 horas na presença dos siRNA.

A expressão de *Coup-TFII* diminuiu em torno de 60% no grupo onde utilizamos siRNA para Coup-TFII (siCoup-TFII) (Figura 3). De forma geral, os marcadores utilizados para caracterizar as células XEN apresentaram um aumento com a redução de *Coup-TFII*, porém, os que demonstraram diferenças significativas foram *Gata4* e *Laminina C1*. *Laminina B1* e *Gata6* não apresentaram alterações com o silenciamento de *Coup-TFII* (Figura 3).



**Figura 3:** Análise do efeito do silenciamento gênico de *Coup-TFII* em células da endoderme extraembrionária (XEN). A: Expressão gênica relativa de *Coup-TFII*, *Sox17*, *Gata4*, *Gata6*, *LamininaB1* e *LamininaC1* nas células XEN no grupo controle e com o silenciamento de *Coup-TFII*. N=2. Test T. Média  $\pm$  SEM. Significância  $p < 0,01$  (\*\*).

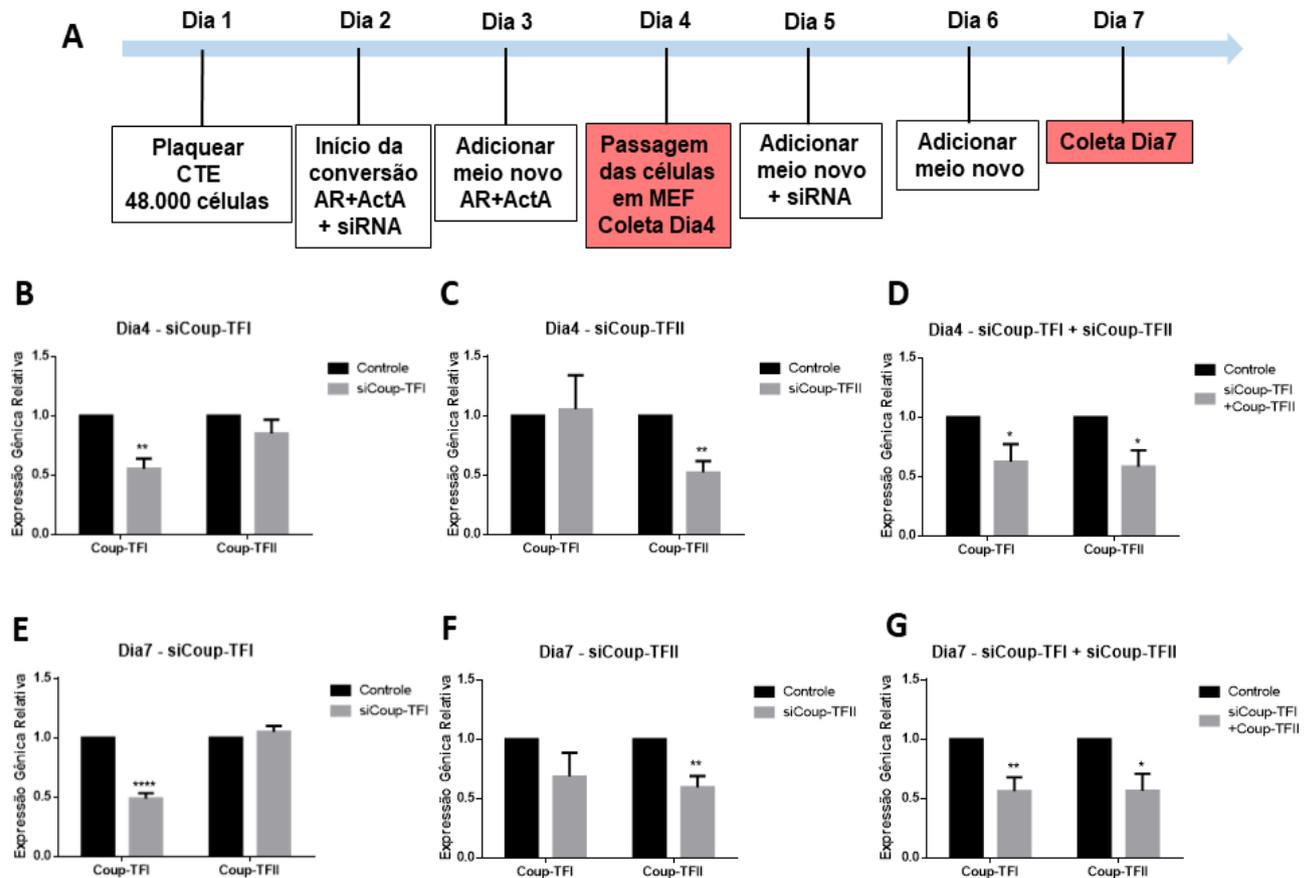
Uma vez que detectamos a expressão de ambos *Coup-TFs* durante o processo de conversão de CTE para células XEN, buscamos analisar se o silenciamento individual ou combinado de *Coup-TFI* e *Coup-TFII* poderia alterar a expressão de marcadores de pluripotência ou de endoderme extraembrionária, influenciando assim na progressão desse processo. A Figura 4A ilustra o desenho experimental utilizado e nas Figuras 4B-G os gráficos de qPCR mostrando a eficiência de silenciamento no 4º e 7º dias de análise.

Como esperado, a expressão dos genes alvos foram especificamente reduzidas nas respectivas condições de silenciamento em ambos os dias analisados (Figura 4). A expressão de *Coup-TFI* foi significativamente reduzido somente quando realizado o silenciamento para *Coup-TFI* (siCoup-TFI), individual (Figura 4B e E) ou combinado com *Coup-TFII* (Figura 4D e G) no 4° e 7° dia de conversão. A expressão de *Coup-TFII* foi significativamente reduzida somente quando realizado o seu silenciamento (siCoup-TFII), individual (Figura 4C e F) ou combinado com *Coup-TFI* (Figura 4D e G). É importante destacar que o silenciamento para *Coup-TFII* no 7° dia de conversão causou um pequeno decréscimo na expressão de *Coup-TFI*, entretanto não foi significativa (Figura 4F).

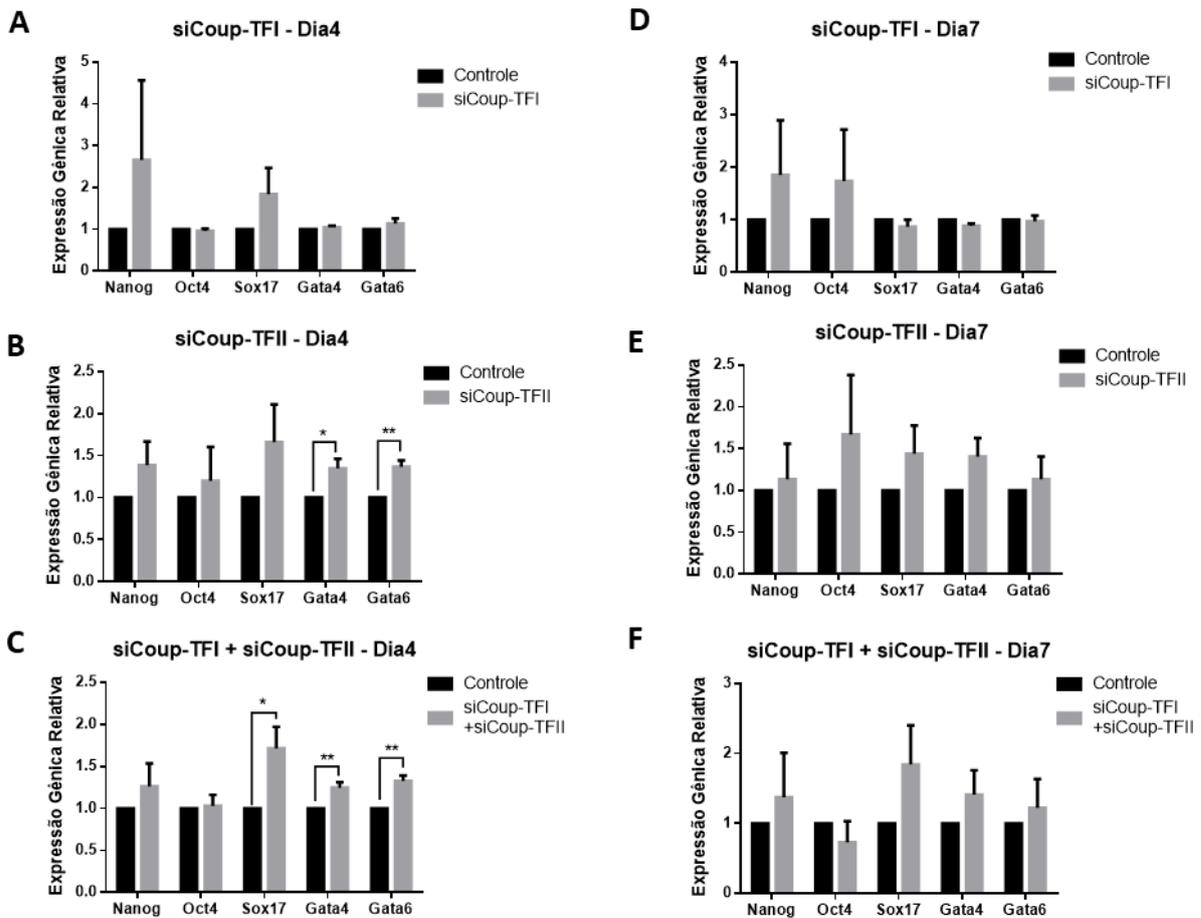
A análise dos marcadores de pluripotência, *Oct4* e *Nanog* mostrou que a expressão de *Oct4* manteve-se inalterada e *Nanog* apresentou um aumento, nos grupos em que silenciámos *Coup-TFI* (siCoup-TFI) e ambos *Coup-TFs* (siCoup-TFI + siCoup-TFII) (Figuras 5A e C), enquanto no grupo com silenciamento de *Coup-TFII*, ambos marcadores apresentam um discreto aumento em relação ao controle no 4° dia (Figura 5B). No 7° dia de conversão, ambos marcadores de pluripotência aumentaram, principalmente com o silenciamento de *Coup-TFI* (comparar Figura 5D com 5E e F), com exceção de *Oct4* que apresentou um decréscimo com o duplo silenciamento (Figura 5F). Entretanto, apesar de observarmos essas variações em decorrência do silenciamento de *Coup-TFI* e *Coup-TFII* como há uma grande variação entre as replicatas biológicas, esse aumento não foi significativo.

Quando analisamos os marcadores de células XEN: *Gata 4*, *Gata6* e *Sox17*, todos apresentaram um aumento na expressão nos grupos onde realizamos silenciamento de *Coup-TFII* e de ambos *Coup-TFs* (siCoup-TFI + siCoup-TFII), porém não se alteraram com o silenciamento de *Coup-TFI* (siCoup-TFI). Esse padrão foi observado tanto no 4° dia de conversão (Figura 5A - C) quanto no 7° dia (Figuras 5D - F).

A pequena alteração nos marcadores de pluripotência e de endoderme extraembrionária que observamos em nossos resultados pode ser devido a eficiência de aproximadamente 50% que tivemos com o silenciamento gênico de *Coup-TFI* e *Coup-TFII*.



**Figura 4: Análise da eficiência do silenciamento gênico de *Coup-TFI* e *Coup-TFII* durante a conversão de CTE para células XEN.** A: Esquema ilustrativo do protocolo utilizado na conversão de CTE para células XEN com o silenciamento de *Coup-TFI*, *Coup-TFII* e ambos. Dias evidenciados em vermelho representam os dias de análise (4 e 7). B – D: Expressão gênica relativa de *Coup-TFI* e *Coup-TFII* no 4° dia de conversão nos grupos siCoup-TFI, siCoup-TFII e siCoup-TFI e II relativos ao grupo controle, respectivamente. E – G: Expressão gênica relativa de *Coup-TFI* e *Coup-TFII* no 7° dia de conversão nos grupos siCoup-TFI, siCoup-TFII e siCoup-TFI e II relativos ao grupo controle, respectivamente. N= 3. Significância  $p < 0,05$  (\*),  $< 0,001$  (\*\*),  $< 0,0001$  (\*\*\*\*). Test T. Média  $\pm$  SEM.



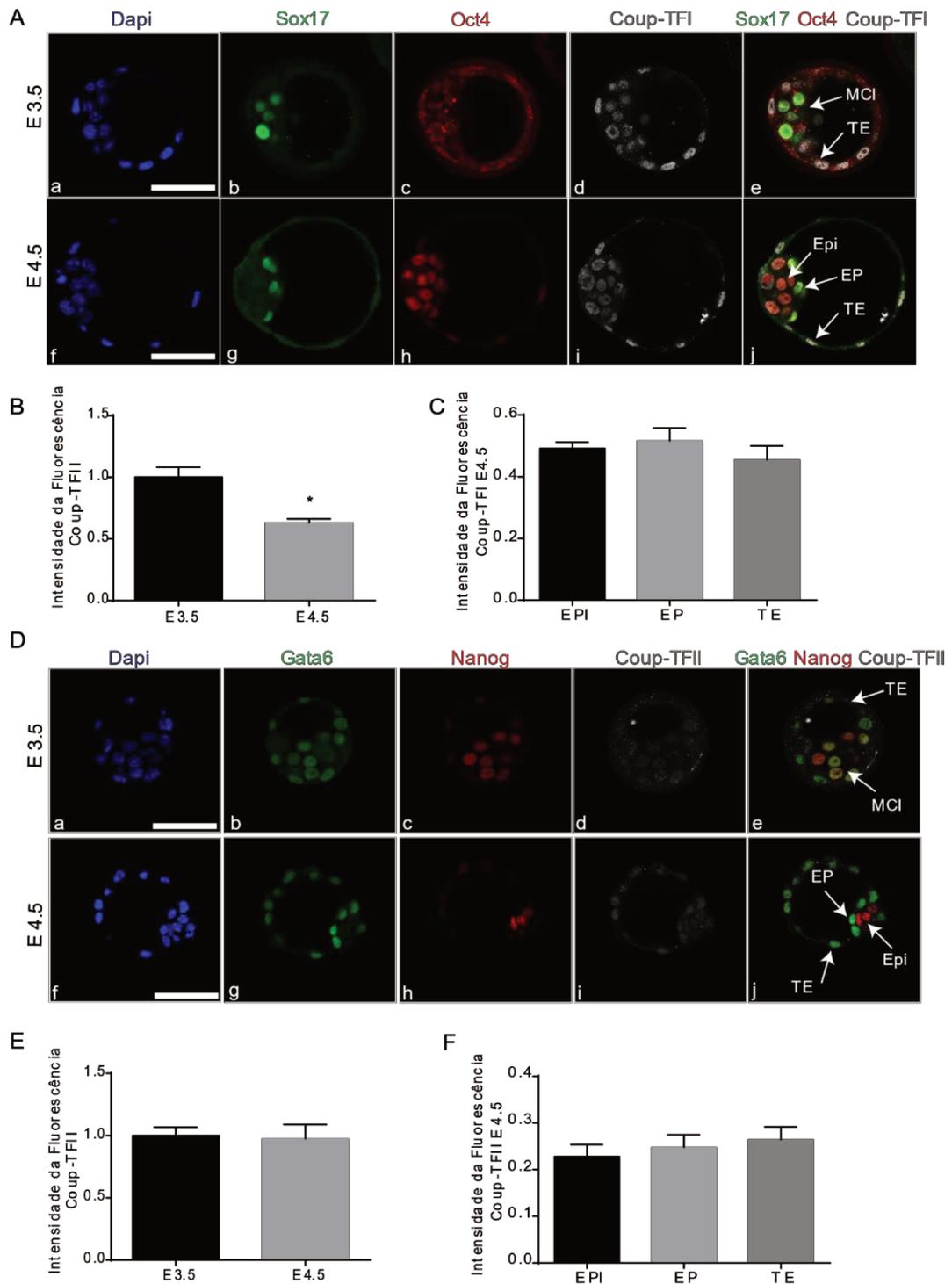
**Figura 5: Análise do efeito do silenciamento gênico de *Coup-TFI* e *Coup-TFII* durante a conversão de CTE para células XEN.** A - C: Expressão gênica relativa de marcadores de pluripotência, *Oct4* e *Nanog* e de XEN, *Gata4*, *Gata6* e *Sox17* nos grupos siCoup-TFI, siCoup-TFII e siCoup-TFI/Coup-TFII relativos ao grupo controle no 4º dia de conversão, respectivamente. D - F: Expressão gênica relativa de marcadores de pluripotência, *Oct4* e *Nanog* e de XEN, *Gata4*, *Gata6* e *Sox17* nos grupos siCoup-TFI, siCoup-TFII e siCoup-TFI/Coup-TFII relativos ao grupo controle no 7º dia de conversão, respectivamente. N=3. . Significância  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,005$  (\*\*). Test T. Média  $\pm$  SEM.

### 1.3.4 Coup-TFI e Coup-TFII são expressos durante os estágios de pré-implantação in vivo

Visando analisar se a expressão de Coup-TFII em células da endoderme extraembrionária *in vitro*, descrita neste trabalho, estaria ocorrendo *in vivo* analisamos em que compartimento embrionário ambos Coup-TFs estão expressos nos estágios E3.5 e E4.5 através de imunofluorescência.

Durante o desenvolvimento embrionário de camundongo, no E3.5 as células da massa celular interna (MCI) co-expressam os marcadores SOX17 e OCT4 (Figura 6A b, c e e). Após a segregação dessas células em epiblasto e endoderme primitiva, processo que se completa no E4.5 é possível observar que as células OCT4 positivas, agora se posicionam internamente, caracterizando o epiblasto (Epi) (Figura 6A g e j). Por outro lado, células expressando SOX17 se localizam periféricamente, na endoderme primitiva (EP) recém formada (Figura 6A g e j).

Ao analisarmos a expressão de COUP-TFI nesse contexto, observamos que no E3.5, antes da formação da endoderme primitiva, COUP-TFI está expresso em células da massa celular interna (MCI) e em células da trofotoderma (TE) (Figura 6A-d e e). No E4.5, após a formação da endoderme primitiva (EP), também detectamos expressão de COUP-TFI nessas células (Figura 6A i e j).



**Figura 6: Análise da localização celular por imunofluorescência de COUP-TFI e COUP-TFII em embriões nos estágios 3.5 e 4.5.** A: Localização de COUP-TFI em embriões nos estágios 3.5 e 4.5. SOX17 evidenciando células da EP e OCT4, células do epiblasto (Epi). B: Quantificação da intensidade de fluorescência relativa de COUP-TFI nos E3.5 e E4.5. C: Quantificação de intensidade de fluorescência de COUP-TFI entre os diferentes compartimentos embrionários: Epiblasto (Epi); Endoderme Primitiva (EP) e Trofotoderma (TE). D: Localização de COUP-TFII em embriões nos estágios 3.5 e 4.5. GATA6 evidenciando células da EP e NANOG, células do epiblasto (Epi). E: Quantificação da intensidade de fluorescência relativa de COUP-TFII nos E3.5 e E4.5. F: Quantificação de intensidade de fluorescência de COUP-TFII entre os diferentes compartimentos embrionários: Epiblasto (Epi); Endoderme Primitiva (EP) e Trofotoderma (TE). Barras 50 $\mu$ m. Significância  $p < 0,05$  (\*). Média  $\pm$  SEM. N=8 embriões analisados por condição.

Como a expressão de COUP-TFI foi detectada em células do compartimento embrionário (epiblasto) e dos compartimentos extraembrionários (endoderme primitiva e trofotoderma) no E4.5, nós quantificamos a intensidade de fluorescência de COUP-TFI nessas células, a fim de analisar se Coup-TFI está diferencialmente expresso nas células desses tecidos. Os resultados mostram que a localização de COUP-TFI não se encontra diferencialmente expressa entre as células desses diferentes compartimentos (Figura 6C). Também realizamos uma comparação da expressão de COUP-TFI entre os E3.5 e E4.5 e observamos uma redução de COUP-TFI no E4.5, comparado com E3.5 (Figura 6B).

O mesmo tipo de análise foi realizado para COUP-TFII: evidenciando o evento de segregação da massa celular interna em epiblasto e endoderme primitiva, os marcadores GATA6 e NANOG estão co-localizados nas células da massa celular interna no E3.5 (Figura 6D e). Após a formação da endoderme primitiva, E4.5, a expressão de NANOG se restringe às células do epiblasto (Epi) (Figura 6D j), enquanto GATA6 se localiza periféricamente, demarcando a endoderme primitiva (EP) (Figura 6D j).

Quando analisamos a expressão de COUP-TFII nesse contexto, observamos um padrão de expressão similar ao descrito para Coup-TFI. No E3.5 COUP-TFII se encontra em células da massa celular interna (MCI) e da trofotoderma (TE) (Figura 6D a-e). Enquanto no E4.5, pós segregação da endoderme primitiva (EP), também detectamos a expressão de Coup-TFII nessas células, além de também estar presente nas células da trofotoderma (TE) e do epiblasto (Epi) (Figura 6D f-j).

Assim como para COUP-TFI, o padrão de distribuição da expressão de COUP-TFII também foi observado em células do compartimento embrionário e extraembrionário. Nossas análises demonstram que também não há diferença na expressão de COUP-TFII entre células da massa celular interna (MCI), trofotoderma (TE) e endoderme primitiva (EP) no E4.5 (Figura 6F). Porém, diferentemente de COUP-TFI, que está mais expresso no E3.5, não observamos diferença na expressão de COUP-TFII entre o E3.5 e E4.5 (Figura 6E).

### 1.3.5 Coup-TFI e Coup-TFII atuam como reguladores negativos de marcadores da endoderme extraembrionária e pluripotência

Após detectarmos a expressão de COUP-TFI e COUP-TFII nos estágios de pré implantação, buscamos analisar a possível função desses fatores durante a segregação das células da endoderme primitiva. Realizamos então ensaios funcionais de silenciamento gênico para *Coup-TFI* e *Coup-TFII*, onde injetamos siRNA nos dois blastômeros do estágio de duas células (E1.5) e cultivamos esses embriões *in vitro* até o E4.5, estágio em que as células do epiblasto e da endoderme primitiva já se encontram segregadas. As análises de expressão gênica foram realizadas por qPCR no ensaio com Coup-TFI e qPCR e imunofluorescência no ensaio com Coup-TFII.

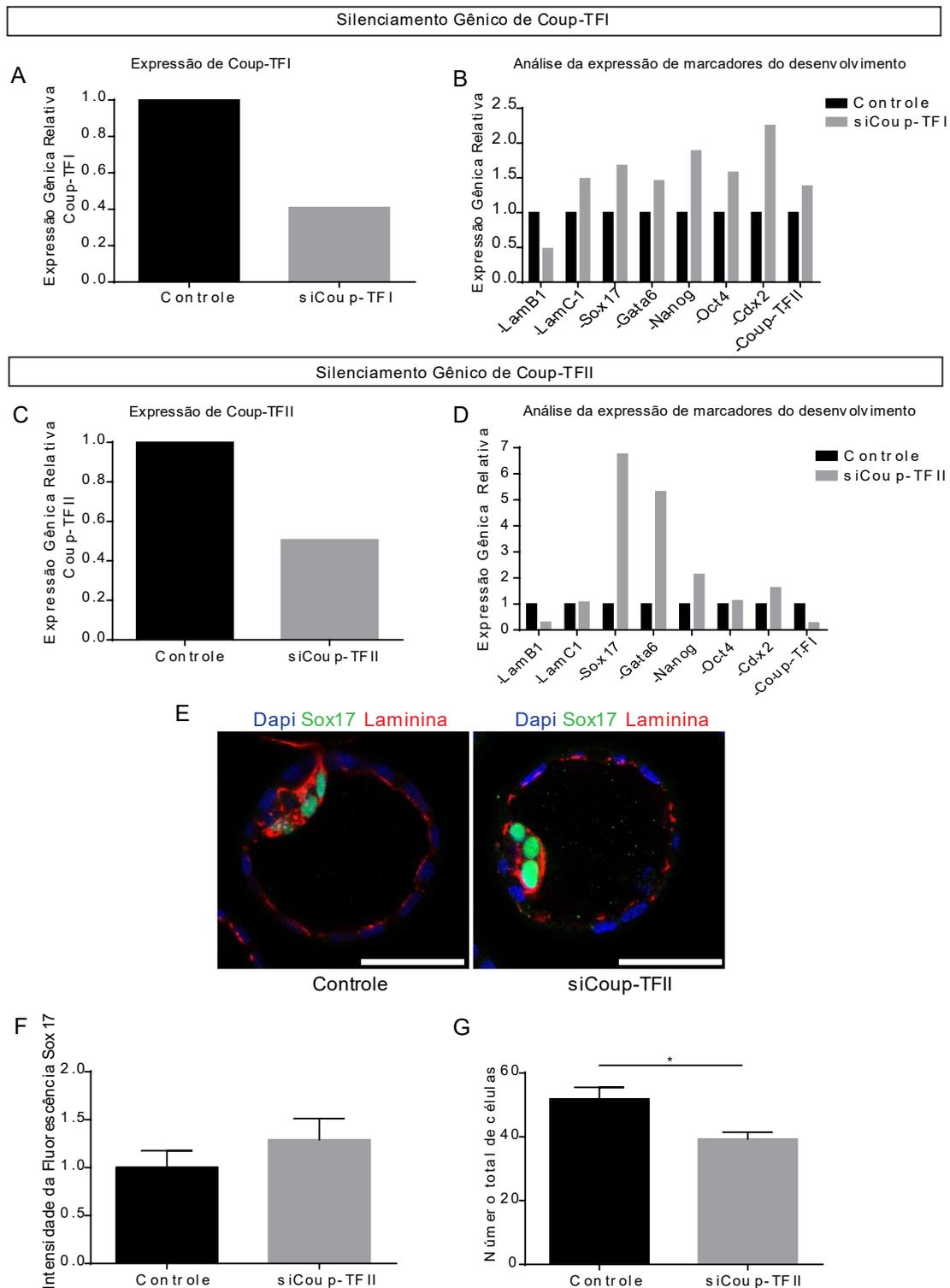
O silenciamento de *Coup-TFI* resultou em uma diminuição de sua expressão em torno de 60% em relação ao grupo controle (Figura 7A). A análise dos marcadores dos diferentes compartimentos celulares mostrou que os marcadores de endoderme primitiva, *Sox17* e *Gata6*, apresentaram um discreto aumento em relação ao grupo controle. Esse mesmo padrão observado para os genes expressos no epiblasto *Oct4* e *Nanog*, e para *Cdx2*, expresso em células do trofotoderma (Figura 7B). A análise das Lamininas, expressas nesses estágios do desenvolvimento, mostrou que a expressão de *Laminina B1* diminuiu, enquanto que a expressão de *Laminina C1* teve um pequeno aumento resultante do silenciamento de *Coup-TFI* (Figura 7B). O silenciamento de *Coup-TFI* resultou em um discreto aumento da expressão de *Coup-TFII* (Figura 7B). Não foi possível analisar se essas diferenças de expressão entre os grupos controle e tratados com siRNA foram estatisticamente significativas, uma vez que somente conseguimos realizar esse experimento uma vez e, devido ao limitado número de embriões, optamos por fazer somente análise da expressão gênica.

O silenciamento de *Coup-TFII* (siCoup-TFII) resultou em uma diminuição de sua expressão em torno de 50% em relação ao grupo controle (Figura 7C). A análise de marcadores de endoderme primitiva (*Sox17* e *Gata6*) mostrou que ambos aumentaram em decorrência da redução de Coup-TFII (Figura 7D). Em relação a genes expressos no epiblasto, *Oct4* e *Nanog*, observamos um aumento na expressão de *Nanog*, porém não de *Oct4* (Figura 7D). *Cdx2*, expresso em células do trofotoderma, assim como no silenciamento para *Coup-TFI* também aumentou na ausência de Coup-TFII (Figura 7D). No que diz respeito às lamininas, observamos que *Laminina B1* reduziu com o silenciamento de *Coup-TFII*, porém *Laminina C1* não teve

alteração (Figura 7D). Ao contrário do observado quando silenciemos *Coup-TFI* o que causou um aumento de *Coup-TFII*, o silenciamento de *Coup-TFII* resultou no decréscimo da expressão de *Coup-TFI* (Figura 7D).

A análise morfológica dos embriões silenciados para *Coup-TFII* sugeriu uma redução no tamanho dos embriões, quando comparados com os do grupo controle (Figura 7E). Para confirmar esta observação, realizamos a contagem total de células dos embriões, onde os embriões do grupo siCoup-TFII apresentam um número menor de células em relação aos embriões controle (Figura 7G).

Apesar de notarmos uma diminuição na expressão de LAMININA nas imagens analisadas (Figura 7E), os embriões se desenvolveram normalmente até o E4.5, como demonstrado pela segregação de endoderme primitiva na maioria dos embriões analisados (n=10), evidenciado pela expressão localizada de SOX17 (Figura 7E). Outra análise realizada foi a quantificação da intensidade de fluorescência de SOX17 nas células da endoderme primitiva, que demonstra um discreto aumento nos embriões do grupo siCoup-TFII em relação aos embriões do grupo controle, porém não significativo (Figura 7F).



**Figura 7: Análise do silenciamento gênico de *Coup-TFI* e *Coup-TFII* em embriões no estágio E4.5.** A: Expressão gênica relativa de *Coup-TFI* em embriões do grupo controle e que receberam siRNA (siCoup-TFI). B: Expressão gênica relativa de marcadores do desenvolvimento entre embriões controle e siCoup-TFI. C: Expressão gênica relativa de *Coup-TFII* em embriões do grupo controle e que receberam siRNA (siCoup-TFII). D: Expressão gênica relativa de marcadores do desenvolvimento entre embriões controle e siCoup-TFII. E: Imunofluorescência de embriões E4.5 controle e siCoup-TFII, SOX17 em verde, LAMININA em vermelho e Dapi evidenciando núcleo. F: Quantificação da intensidade relativa de fluorescência de SOX17 entre embriões controle e siCoup-TFII. G: Número de células totais entre embriões controle e siCoup-TFII. Significância  $p < 0,05$  (\*). N=1. Test T. Média  $\pm$  SEM. Barras: 50µm.

## 1.4 Discussão

### 1.4.1 Coup-TFI e Coup-TFII participam da conversão de células-tronco embrionárias para células da endoderme extraembrionária

A possibilidade de se recapitular *in vitro* as interações gênicas que ocorrem durante o desenvolvimento com o uso das CTEs, juntamente com técnicas de perda e ganho de função, tem trazido grandes avanços em pesquisas no campo da biologia do desenvolvimento.

Nesse trabalho buscamos mapear a expressão de Coup-TFI e Coup-TFII em CTE e células XEN, além de analisar qual o padrão de ativação desses fatores durante a conversão de CTE para células XEN, processo análogo a formação da endoderme primitiva *in vivo* e no qual ambos Coup-TFs já foram descritos serem ativados (Fujikura et al., 2002).

Uma vez que as células XEN são originadas da endoderme primitiva e *Coup-TFI* e *Coup-TFII* já foram descritos por estarem expressos nessas células *in vivo* (Murray e Edgar 2001), esperávamos que ambos fossem mais expressos nas células originadas da endoderme primitiva em relação as CTE. Nossos dados mostraram que *Coup-TFII* apresentou essa expressão diferencial, enquanto *Coup-TFI* não foi detectado em CTE e células XEN.

Entretanto, durante a conversão de CTE para células XEN, ambos Coup-TFs são ativados no início da conversão, principalmente *Coup-TFI* (Figura 2). Enquanto *Coup-TFII* mantém o mesmo nível de expressão até o 12° dia e decai no 15° dia, *Coup-TFI* apresenta um declínio progressivo da expressão após o 7° dia, chegando a níveis indetectáveis no 15° dia. Portanto, enquanto *Coup-TFII* é expresso em todos os estágios analisados, do estado indiferenciado às células convertidas em XEN, *Coup-TFI* parece ser necessário somente durante o início da conversão de CTE para XEN, sendo indetectável tanto no estado indiferenciado (CTE) quanto nas células já convertidas (XEN).

Uma vez que ambos são ativados durante a conversão de CTE para células XEN e trabalhos relatam que a superexpressão desses fatores resulta no aumento de marcadores de endoderme extraembrionária (Murray and Edgar, 2001; Fujikura et al., 2002; Zhuang & Gudas, 2008), nos perguntamos se a ausência deles alteraria o curso desse processo.

Nossa hipótese era de que os Coup-TFs estariam atuando na ativação de marcadores de endoderme extraembrionária. Porém, nossos resultados mostraram o oposto: principalmente *Coup-TFII* possivelmente regula negativamente a expressão desses genes, bem como dos genes expressos no epiblasto pluripotente, *Nanog* e *Oct4*, os quais já foram demonstrados serem

reprimidos por COUP-TFI (Fujikura et al., 2002, Zhuang e Gudas, 2008) e COUP-TFII (Rosa e Brivanlou, 2011; Hu et al., 2013). Adicionalmente vimos um perfil diferente em relação ao silenciamento de *Coup-TFI* e *Coup-TFII*: enquanto o silenciamento de *Coup-TFI* não está influenciando a expressão de genes expressos na endoderme extraembrionária e sim, de marcadores da pluripotência, o silenciamento de *Coup-TFII* demonstra maiores alterações nos genes característicos de endoderme extraembrionária.

Esses resultados demonstrando a regulação negativa principalmente de COUP-TFII em marcadores de endoderme extraembrionária durante a conversão de CTE para células XEN (Figura 4) são consistentes com os obtidos através do silenciamento de *Coup-TFII* em linhagem de células XEN já estabelecidas (Figura 3). O fato de não observarmos efeito do silenciamento de *Coup-TFI* pode estar relacionado ao fato desse gene já apresentar uma baixa expressão nessas células, como demonstrado pela caracterização da expressão em células XEN e durante a conversão de CTE para XEN (Figuras 1 e 2).

A ação repressiva de COUP-TFI e COUP-TFII que demonstramos sobre os marcadores de endoderme extraembrionária e pluripotência condiz com diversos trabalhos que também demonstram a ação negativa desses dois fatores. Por exemplo, durante o desenvolvimento de olho, COUP-TFI e COUP-TFII reprimem a expressão de *Pax6* para a correta especificação da retina (Tang et al., 2010), enquanto na reprogramação de CTE humanas, COUP-TFII é descrito por aumentar a eficiência desse processo por reprimir *Oct4* (Hu et al., 2012). COUP-TFI também atua na repressão de *Oct4* e *Nanog*, durante a diferenciação de endoderme extraembrionária (Zhuang e Gudas, 2008).

Se, por um lado, esse padrão de regulação que observamos em relação a *Coup-TFI* e *Coup-TFII* pode estar relacionado a um mecanismo de regulação negativa, o qual é importante para controlar os níveis de expressão dos marcadores de endoderme extraembrionária como *Gata6*, *Gata4* e *Sox17*. Por outro lado, esse aumento observado, principalmente em relação aos marcadores de endoderme extraembrionária com o silenciamento de *Coup-TFII*, também pode ser indireto. Podemos sugerir que o aumento que observamos pode ser em decorrência de um mecanismo de compensação gênica, já que a conversão de CTE para células XEN é controlado por diversos fatores de transcrição os quais estão co-expressos e relações similares já terem sido descritas em relação a *Sox7* e *Sox17* e *Gata4* e *Gata6* (Kuo et al., 1997; Shimoda et al., 2007).

### 1.4.2 Coup-TFI e Coup-TFII participam do controle da segregação da endoderme primitiva in vivo

Precusores da endoderme primitiva e epiblasto são identificados na massa celular interna do embrião no E3.5 onde, nesse estágio, apesar das células co-expressarem marcadores de pluripotência e de endoderme, essas começam a ativar programas transcricionais diferentes. A ativação diferencial de programas transcricionais, fazem com que células que expressam mais GATA6 e SOX17 migrem para formar a endoderme primitiva no E4.5 e as células expressando NANOG fiquem internamente, constituindo o epiblasto (Chazaud et al., 2006; Guo et al., 2010; Morris et al., 2010).

Uma vez que Murray e Edgar, (2001) relataram a expressão de *Coup-TFI* e *Coup-TFII* em células da endoderme primitiva, buscamos mapear a expressão de ambos Coup-TFs em embriões nos estágio E3.5 e E4.5. O fato desses fatores estarem expressos nesses estágios poderia estar relacionado tanto com a segregação da massa celular interna em endoderme primitiva e epiblasto, que se completa no E4.5, quanto com o controle da expressão de Laminina. As Lamininas fazem parte da lâmina basal das células do epiblasto, a qual é essencial para correta formação de um lúmen nesse compartimento e consequente formação da cavidade amniótica (E4.5 – E5.5) (Bedzhov e Zernicka-Goetz, 2014).

Já foi demonstrado que COUP-TFI não é necessário para o correto posicionamento de células que originarão a endoderme primitiva (Meilhac et al., 2009). Entretanto não há estudos demonstrando os possíveis fenótipos na ausência de Coup-TFII e na ausência de ambos Coup-TFs, uma vez que há trabalhos que relatam que ambos apresentam redundância de função (Tang et al., 2010; Wu et al., 2010). Aliado a isso, o fato de Coup-TFII ser ativado pela sinalização FGF, essencial para a formação da endoderme primitiva (Yamanaka et al., 2010; Morris et al., 2013), durante a diferenciação de células mesenquimais (LEE et al., 2016), nos fez questionar se esses fatores poderiam apresentar alguma função em conjunto nesses estágios do desenvolvimento.

Analisando dados públicos de transcriptomas, observamos que a expressão de *Coup-TFI* e *Coup-TFII* é maior antes da segregação de endoderme primitiva (E3.5), enquanto que após a segregação em endoderme primitiva e epiblasto (E4.5) a expressão de ambos é baixa tanto no epiblasto quanto na endoderme primitiva (Figura 15C, apresentada no Capítulo 2). Esses dados corroboram nossas análises obtidas através da quantificação da intensidade de

fluorescência onde COUP-TFI aparenta ser mais expresso no E3.5, comparado com o E4.5, porém não observamos essa variação em relação a COUP-TFII. Aliado a esses dados, demonstramos neste trabalho que ambos *Coup-TFs* são ativados durante a conversão de CTE para células XEN, o que em conjunto poderia ser um indício de que esses fatores são importantes para a segregação da endoderme primitiva.

Apesar de Murray e Edgar (2001) relatarem a expressão de ambos *Coup-TFs* especificamente em células da endoderme primitiva, nossas análises demonstraram que, no estágio E4.5, onde o embrião já está dividido em endoderme primitiva, epiblasto e trofotoderma, COUP-TFI e COUP-TFII são detectados nas células desses três compartimentos de forma homogênea. Vale ressaltar que, no trabalho de Murray e Edgar, esta expressão específica dos *Coup-TFs* na endoderme primitiva é demonstrada através de uma hibridização *in situ* para o gene *Coup-TFI* no estágio E3.5, estágio em que ainda não houve a segregação da endoderme primitiva e as células embrionárias comporiam a massa celular interna. Portanto, é possível que a marcação detectada para *Coup-TFI* nos blastocistos E3.5 seja a mesma que reportamos aqui para a massa celular interna (E3.5) (Figura 6).

Visto que ambos *Coup-TFs* estão expressos no E3.5 nas células da massa celular interna e ambos já foram relatados por regularem negativamente a pluripotência (Zhuang e Gudas, 2008; Rosa e Brivanlou, 2011) e também terem sido descritos regulando a ativação de marcadores de endoderme extraembrionária (Murray e Edgar, 2001; Fujikura et al., 2002), esperávamos que com o silenciamento gênico de ambos ocorresse um aumento da pluripotência e decréscimo dos genes que controlam a segregação e manutenção da endoderme extraembrionária.

No que diz respeito aos genes expressos no epiblasto pluripotente, nossos resultados condizem com os já descritos na literatura. O silenciamento de ambos *Coup-TFs*, mas principalmente o de *Coup-TFI* causou um aumento na expressão de *Oct4* e *Nanog*, somando evidências da ação negativa que esses fatores têm no controle da pluripotência.

Entretanto, em relação aos marcadores de endoderme extraembrionária, nossos resultados contrastam os dados já publicados por Zhuang e Gudas, (2008) e Murray e Edgar (2001). Como estes trabalhos demonstram que a superexpressão de Coup-TFI e Coup-TFII aumenta a expressão de marcadores de endoderme extraembrionária, esperávamos que a expressão desses marcadores diminuiria com o silenciamento de ambos Coup-TFs, comprovando assim uma relação de regulação positiva. Porém, o que observamos foi o oposto:

principalmente quando silenciemos *Coup-TFII* a expressão dos marcadores de endoderme extraembrionária tende a aumentar (Figura 7). Esse efeito pode ser em decorrência de uma ação negativa de COUP-TFII sobre a expressão dos marcadores de endoderme extraembrionária ou devido a algum mecanismo de compensação gênica, como já demonstrado por *Gata4*, *Gata6*, *Sox7* e *Sox17* nesse contexto (Kuo et al., 1997; Shimoda et al., 2007). Desse modo, Coup-TFII pode integrar esta rede de regulação gênica pró-endodérmica que possui esta capacidade de se auto-regular em decorrência da redução de um de seus fatores.

Um dos principais pontos da nossa pergunta era analisar a relação de COUP-TFI e COUP-TFII com as lamininas B1 e C1. *Laminina B1* e *C1* são as principais lamininas expressas em estágios iniciais do desenvolvimento (Murray e Edgar, 2001; Zhuang e Gudas, 2008; Boroviak et al., 2015). Além disso, ambos Coup-TFs já foram descritos regulando positivamente a expressão das mesmas (Murray e Edgar, 2001, Zhuang e Gudas, 2008). Nossa hipótese era de que na ausência de Coup-TFI e Coup-TFII a redução de laminina poderia causar falhas na formação da cavidade amniótica, uma vez que tanto as células do epiblasto quanto as do compartimento extraembrionário são dependentes de laminina para a correta polarização ápico-basal, formação de uma estrutura epitelial e consequente lumenogênese (Bedzhov e Zernicka-Goetz, 2014).

Nossos resultados da análise de expressão gênica demonstraram um padrão semelhante na regulação das lamininas com o silenciamento de *Coup-TFI* e *Coup-TFII*: redução na expressão de *laminina B1*, enquanto *laminina C1* não apresentou nenhuma alteração, comparado com o grupo controle. Porém, apesar de termos detectado essa redução na expressão gênica de *laminina B1*, os embriões silenciados para *Coup-TFI* e *Coup-TFII* não apresentaram nenhuma diferença morfológica no epiblasto em decorrência dessa redução até o estágio analisado.

Vale notar que o E5.5 poderia ser um estágio mais apropriado para se observar possíveis alterações morfológicas na formação da cavidade amniótica decorrentes da alteração na expressão de laminina no silenciamento dos *Coup-TFs*, por ser o estágio em que o lúmen já está formado (Bedzhov & Zernicka-Goetz, 2014). Entretanto, para realizar este experimento o tratamento com siRNA teria que ser iniciado em estágios mais tardios, como E2.5 ou E3.5. Com isso, seria necessário utilizar uma outra alternativa à usada neste trabalho, como por exemplo eletroporação. Além disso, o cultivo de embriões *in vitro* após o E4.5 apresenta uma baixa eficiência, pois é quando se inicia o processo de implantação *in vivo*.

O trofotoderma é um folheto extraembrionário formado entre os estágios E2.5 - E3.0 e caracterizado pela expressão de *Cdx2* (Rossant & Tam, 2009; Bedzhov et al., 2014a). Apesar de não ter relatos sobre a função de ambos COUP-TFs no trofotoderma, nossos resultados demonstram que ambos estão expressos nessas células e que na ausência de *Coup-TFI* e *Coup-TFII* a expressão de *Cdx2* aumenta. Aliado a isso, a superexpressão de *Coup-TFI* em CTE ativa a expressão de *Hand-1*, um marcador de trofotoderma que não é ativado por exemplo quando se superexpressa fatores específicos de endoderme primitiva como *Gata4* e *Gata6*. Esses resultados demonstram que apesar de não essencial para a migração das células para formar a trofotoderma, COUP-TFI atua na regulação da formação desse compartimento extraembrionário (Fujikura et al. 2002).

Embora não tenhamos detectado alterações na formação da trofotoderma e da endoderme primitiva em decorrência do silenciamento de *Coup-TFI* e *Coup-TFII*, as análises morfológicas que realizamos em embriões demonstraram uma redução no número de células nos embriões com silenciamento de *Coup-TFII* em relação ao grupo controle. Esses dados corroboram resultados já publicados onde os pesquisadores demonstraram que embriões nocaute para *Coup-TFII* morrem no estágio E10 e apresentam um tamanho reduzido em relação aos animais selvagens (Pereira et al., 1999).

Nossa hipótese seria de que, assim como relatado durante o desenvolvimento de olho e durante o processo de implantação no útero (Tang et al., 2010; Wu et al., 2010), ambos Coup-TFs poderiam estar atuando em um processo compensatório, onde na ausência de um, o outro iria compensar essa perda e por isso não veríamos uma alteração morfológica.

Com isso esperávamos ver uma alteração na segregação das células da massa celular interna na ausência dos dois genes, uma vez que já foi demonstrado que o nocaute individual de cada um deles causa letalidade somente em estágios mais tardios do desenvolvimento (Pereira et al., 1999). Tentamos realizar o duplo silenciamento em embriões, porém o decréscimo na expressão de *Coup-TFI* e *Coup-TFII* foi bem menor do que os já observados em experimentos anteriores (dados não mostrados) e por isso não realizamos as análises nesses embriões. Entretanto, apesar de não conseguirmos realizar o duplo silenciamento *in vivo*, mesmo quando realizamos o silenciamento combinado de *Coup-TFI* e *Coup-TFII* durante a conversão de CTE para células XEN, não observamos diferenças significativas em relação ao silenciamento individual, na expressão de genes que supostamente ambos estariam controlando.

Não há relatos na literatura de que ambos Coup-TFs estejam regulando diretamente a expressão um do outro. Porém observamos um discreto aumento de *Coup-TFII* com o silenciamento de *Coup-TFI* e, com o silenciamento de *Coup-TFII*, *Coup-TFI* apresentou uma pequena redução. Esse padrão foi observado quando silenciarmos *Coup-TFII* durante a conversão de CTE para células XEN no 7º dia, onde também notamos uma pequena diminuição na expressão de *Coup-TFI*, porém não significativa. Portanto esses dados em conjunto, sugerem que a participação dos Coup-TFs no contexto de formação da endoderme primitiva pode ser direta ou indireta, através do controle mútuo de suas expressões.

É importante ressaltar que como não tivemos a possibilidade de realizar estes experimentos de silenciamento gênico *in vivo* em réplicas biológicas, nossas conclusões se limitam a uma única observação e devem ser consideradas com a devida cautela.

### **1.4.3 Rede de regulação gênica controlando a segregação da endoderme primitiva *in vivo***

A formação da endoderme primitiva é um processo altamente regulado por diversos fatores, como GATA6, GATA4, SOX17, PDGFR $\alpha$  e SOX7, sendo que o fato desses fatores estarem coexpressos e muitas vezes apresentando redundância de função (Kuo et al., 1997; Futaki et al., 2004; Shimoda et al., 2007; Tam e Loebel 2007) pode dificultar a análise funcional de fatores individuais nesse contexto. Porém, é de extrema importância desvendar a rede de regulação gênica que controla a especificação da endoderme extraembrionária, uma vez que essas células são essenciais para a implantação e para o desenvolvimento do embrião em si (Tam e Loebel, 2007; Shahbazi & Zernicka-Goetz, 2018).

Resultados de diversos trabalhos com ensaios de perda de função *in vivo* comprovam que há uma hierarquia no controle das expressões dos fatores envolvidos na especificação e manutenção da endoderme primitiva: enquanto o nocaute de *Gata6* leva a letalidade de embriões no E6.5 interferindo na expressão de *Sox17*, *Gata4* e *Pdgfra* (Morrisey et al., 1998; Schrode et al., 2014), o nocaute de *Gata4* não altera a expressão de *Gata6*, *Hnf4 $\alpha$*  e *Hnf3 $\beta$*  (*Foxa2*) e causa letalidade de embriões somente no E10.5 (Kuo et al., 1997). O mesmo foi observado para *Sox17*, onde embriões nocautes para esse fator não apresentam defeitos na endoderme extraembrionária, provavelmente em decorrência da compensação por outros fatores, como *Sox7* (Kanai-azuma et al., 2002; Shimoda et al., 2007), demonstrando que *Gata6*

é essencial para a manutenção da expressão de outros componentes desse circuito de regulação gênica.

Desta forma, como não observamos uma alteração drástica na expressão de *Gata6* ou mesmo de outros fatores envolvidos nesse processo com o silenciamento de *Coup-TFI*, *Coup-TFII* ou mesmo quando silenciemos ambos, podemos sugerir que no contexto de formação da endoderme primitiva, desencadeada principalmente pela ativação de GATA6, ambos Coup-TFs estão *downstream* a GATA6 e atuam em conjunto no balanço para que ocorra a correta segregação da endoderme primitiva no estágio E4.5. Nesse cenário, ambos demonstraram uma relação de regulação negativa. COUP-TFI atua regulando negativamente os genes específicos de pluripotência, para que as células que irão originar a endoderme primitiva possam seguir a correta especificação celular. Ao passo que COUP-TFII influencia nos genes específicos da endoderme primitiva, atuando no controle de níveis de expressão desses genes, garantindo assim a correta especificação da endoderme primitiva, como ilustrado na esquema representativo da Figura 8.

Essa hipótese é corroborada pelos nossos dados apresentados durante a conversão de CTE para células XEN, onde Coup-TFI é mais expresso no início do processo de conversão, influenciando na expressão de *Oct4* e *Nanog*. Além disso, aparentemente é mais expresso no E3.5 do que no E4.5, de acordo nossos dados de quantificação de imunofluorescência e das nossas observações analisando dados de sequenciamento já publicados (Boroviak et al., 2015). Por outro lado, apesar de *Coup-TFII* ser ativado no início da conversão, apresenta níveis de expressão relativa bem menores em relação a *Coup-TFI* e, diferentemente de *Coup-TFI*, se mantém constante até o final desse processo. Adicionalmente, também é detectado em células XEN terminalmente diferenciadas, sendo que sua ausência influencia principalmente na expressão de *Gata6*, *Gata4* e *Sox17*.

Apesar de Coup-TFI, e não Coup-TFII, ser descrito como um marcador inicial de endoderme extraembrionária (Murry e Edgar, 2001; Shimoda et al., 2007), nossos resultados demonstram que, tanto *in vivo* quanto *in vitro*, a alteração de Coup-TFII influencia na manutenção da expressão dos marcadores de endoderme extraembrionária, enquanto Coup-TFI parece alterar a expressão de marcadores de pluripotência. Aliado a isso, Murray e Edgar (2001) e Shimoda et al., (2007) afirmam que apesar de *Coup-TFI* ser expresso nas células da endoderme primitiva, esse fator não está expresso em estágios mais tardios, nas células da endoderme visceral e parietal, duas populações celulares originadas da endoderme primitiva (Tam e Loebel 2007). Além do mais, quando analisamos dados de sequenciamento nos estágios

E6.5, E7.0 e E8.0, Coup-TFI não é expresso em células da endoderme extraembrionária, nem endoderme visceral e parietal, indicando que não é essencial para estágios tardios ou manutenção da endoderme extraembrionária, ao contrário de Coup-TFII (Figura Suplementar 1).

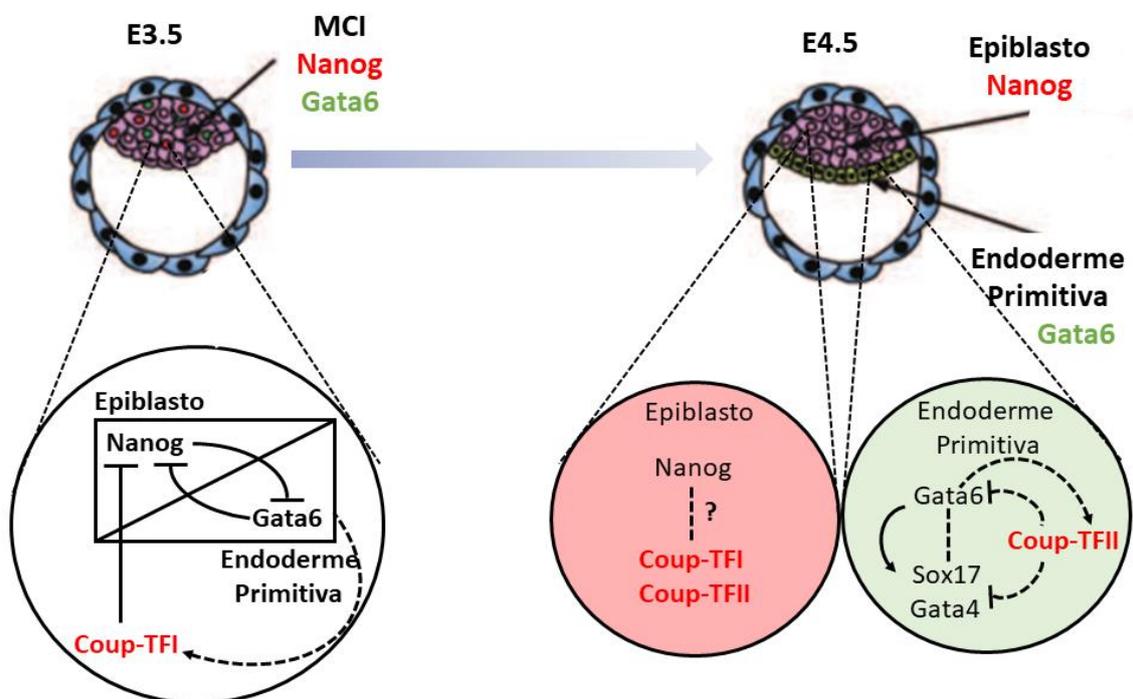
Um outro indício que confirma nossa hipótese é que apesar de a superexpressão de *Coup-TFI* reduzir a expressão de marcadores de pluripotência e aumentar a expressão de marcadores de endoderme extraembrionária, a morfologia dessas células era diferente da observada em células XEN, mostrando que a ativação individual de COUP-TFI não é suficiente para originar essas células, ao contrário de GATA4 e GATA6 (Fujikura et al., 2002). Esta observação corrobora nossa hipótese que COUP-TFI estaria atuando principalmente no início da segregação da endoderme primitiva, controlando a regulação negativa da pluripotência e provavelmente ambos Coup-TFs atuam *downstream* a Gata4 e Gata6 (Fujikura et al., 2002).

Não podemos descartar ainda a possibilidade de os Coup-TFs estarem atuando no contexto de formação da endoderme primitiva de forma indireta, através do controle mútuo de suas expressões. Apesar de Zhuang e Gudas (2008) não relatarem alteração na expressão de *Coup-TFII* em células superexpressando *Coup-TFI*, nossos resultados com embriões revelaram um efeito negativo de COUP-TFI sobre a expressão de *Coup-TFII* e um efeito positivo de COUP-TFII sobre a expressão de *Coup-TFI*. Nesse contexto em que ambos Coup-TFs estariam controlando a segregação da endoderme primitiva indiretamente, podemos sugerir que o aumento mais evidente que observamos na expressão de *Gata6* e *Sox17* com o silenciamento de *Coup-TFII* é porque além de COUP-TFII inibir diretamente a expressão desses genes, também ativa Coup-TFI, que também é um repressor desses marcadores. Por outro lado, COUP-TFI reprime diretamente *Gata6* e *Sox17*, mas ao mesmo tempo ativa a expressão desses marcadores indiretamente, reprimindo a ação de um repressor, Coup-TFII.

Além do mais, a formação da endoderme primitiva é um processo complexo, regulado por diversos fatores que estão co-expressos e que muitas vezes apresentam funções similares entre si e, na ausência de algum fator, essa redundância na expressão pode desencadear um aumento na expressão de outros fatores para substituir o gene ausente. Os aumentos que observamos de marcadores de endoderme extraembrionária na ausência de Coup-TFI e Coup-TFII podem não estar diretamente ligados ao fato desses fatores funcionarem como reguladores negativos durante a especificação da endoderme primitiva, mas sim ser decorrente da ativação de um mecanismo de compensação para que mesmo na ausência destes, o processo

de formação da endoderme primitiva possa ocorrer, assim como descrito anteriormente para a conversão de CTE para células XEN.

Para esclarecer se essas alterações que observamos em decorrência do silenciamento de *Coup-TFI* e *Coup-TFII* estão sendo causadas porque ambos funcionam como reguladores negativos ou se o que está ocorrendo é um mecanismo de compensação gênica/funcional, seria necessário experimentos combinados de perda e ganho de função, nocautes combinados de mais de um desses genes, além de realizar de ensaios de ChiP-seq para determinar as regiões regulatórias controladas diretamente por COUP-TFI e COUP-TFII.

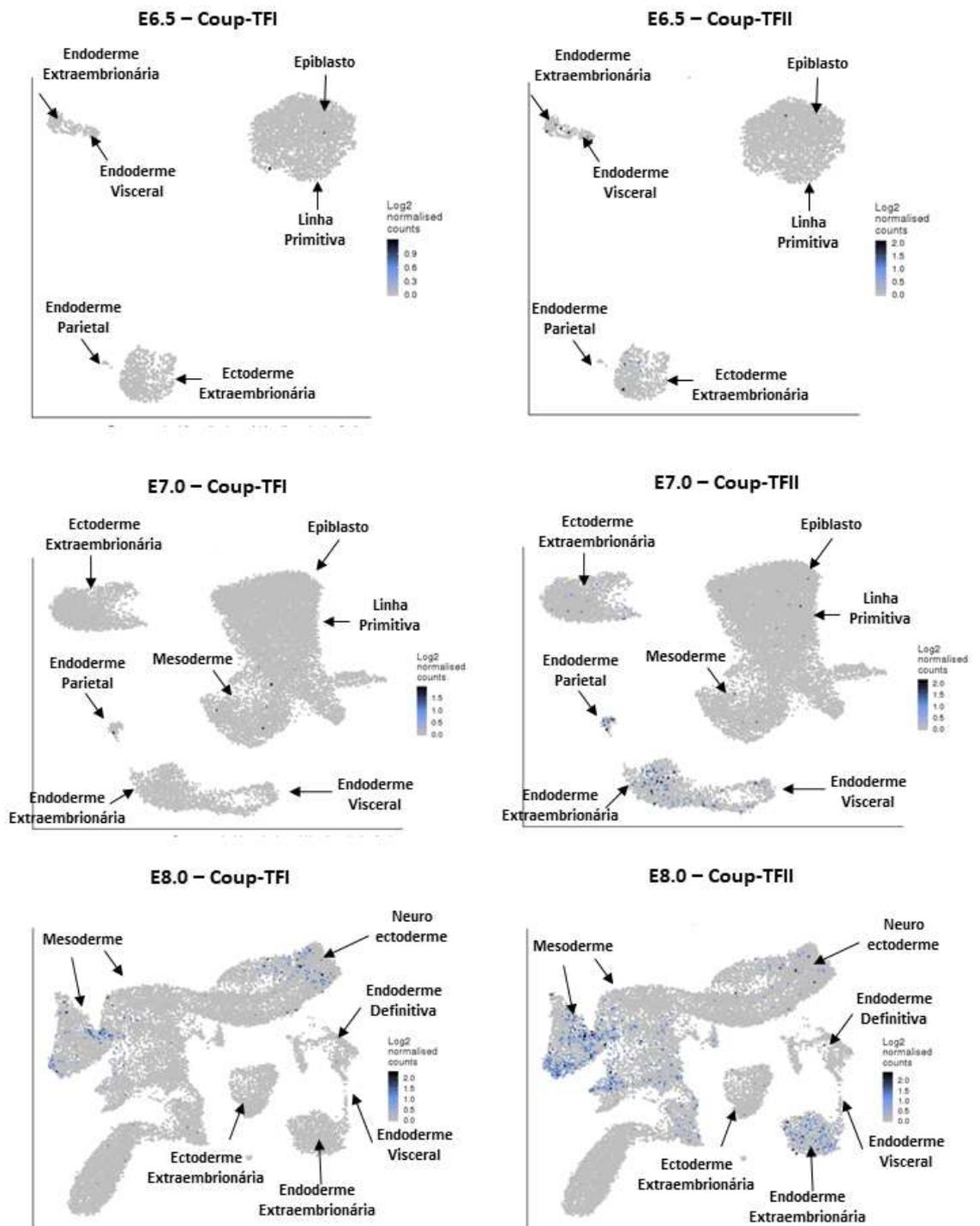


**Figura 8: Representação esquemática ilustrativa do envolvimento hipotético de COUP-TFI e COUP-TFII na formação na endoderme primitiva.** No E3.5 algumas células ainda co-expressam NANOG e GATA6, sendo que esses se auto-reprimem. As células que expressam mais NANOG originam o epiblasto, enquanto células que expressam GATA6 migram e formam uma camada de células na periferia do epiblasto, chamada de endoderme primitiva. Nesse contexto Coup-TFI que pode ter sua expressão influenciada por GATA6, atua na repressão de Nanog auxiliando na segregação da endoderme primitiva. No próximo estágio, E4.5, nas células pertencentes a endoderme primitiva, Coup-TFII, que também pode ser regulado por GATA6, atua de forma repressiva para manter os níveis corretos de expressão de fatores específicos desse folheto, como Gata6, Gata4 e Sox17. Não há indícios de que Coup-TFI e Coup-TFII atuem nesse estágio nas células do epiblasto. Linhas tracejadas indicam possíveis relações. Adaptada de Kang et al., 2013 e Brickman e Serup, 2017.

### 1.5 Conclusões referente ao Capítulo 1

1) Os padrões de expressão de Coup-TFI e Coup-TFII durante a conversão de células-tronco embrionárias para células da endoderme extraembrionária, juntamente com o silenciamento gênico durante esse processo, sugerem que Coup-TFI é mais expresso no início da conversão e atua como regulador negativo de genes que mantêm a pluripotência. Por outro lado, Coup-TFII mantém sua expressão até o final da conversão, interferindo na expressão dos marcadores de endoderme extraembrionária.

2) A caracterização da expressão dos Coup-TFs *in vitro* nos E3.5 e E4.5 de camundongo demonstrou que ambos estão expressos nesses estágios em células da massa celular interna, trofotoderma, epiblasto e endoderme primitiva (E4.5), participando da formação da endoderme primitiva. De forma semelhante ao observado *in vitro*, Coup-TFI parece estar influenciando o bloqueio da pluripotência para que as células possam adquirir destinos de endoderme primitiva enquanto Coup-TFII atua no controle/manutenção dos níveis de expressão dos genes expressos na endoderme primitiva, como Gata4, Gata6 e Sox17.



**Figura Suplementar 1: Análise da expressão de Coup-TFI e Coup-TFII através de dados de *single cell sequencing* em estágios pós implantação de camundongo.** No E6.5 Coup-TFI não é detectado em nenhum dos compartimentos analisados e Coup-TFII está presente em células da endoderme e ectoderme extraembrionária. No E7.5 a expressão de Coup-TFI é observada em algumas células da mesoderme, enquanto Coup-TFII é altamente expresso em células da endoderme parietal, extraembrionária e visceral, e continua sendo detectado na ectoderme extraembrionária. No E8.0, Coup-TFI está presente em poucas células da mesoderme e da neuroectoderme e Coup-TFII, está expresso principalmente na mesoderme e endoderme extraembrionária, mas também é detectado em algumas células da neuroectoderme. Pijuan-Sala et al., 2019.

## ***CAPÍTULO 2***

---

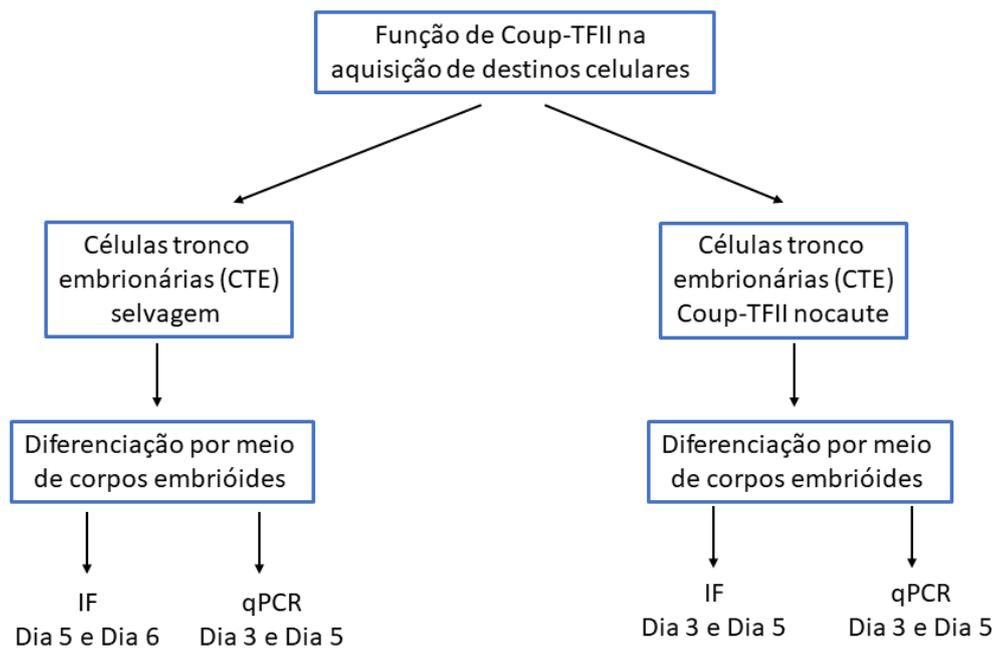
### **Participação de Coup-TFII durante a diferenciação dos folhetos germinativos.**

Resultados prévios do nosso laboratório mostraram que a expressão de COUP-TFII encontra-se hemisfericamente localizada em corpos embrióides (CE) entre os dias 4 e 7 da diferenciação (Rosa VS, 2013). Uma vez que marcadores dos folhetos germinativos endoderme, mesoderme e ectoderme foram descritos apresentando uma expressão espacialmente localizada nesses dias de diferenciação em CE (Berge et al., 2008; Marikawa et al., 2012; Brink et al., 2014), semelhante à que observamos para COUP-TFII, buscamos aprofundar nossas análises a fim de investigar se Coup-TFII estaria influenciando a expressão desses marcadores.

Neste capítulo, inicialmente mapeamos a expressão de COUP-TFII juntamente com marcadores do desenvolvimento em estágios iniciais da diferenciação celular utilizando o modelo de corpos embrióides e posteriormente realizamos ensaio de nocaute gênico, a fim de avaliar a função de *Coup-TFII* no controle da expressão desses marcadores.

#### **2.1 Objetivos Específicos**

- Mapear a expressão de COUP-TFII com marcadores dos folhetos germinativos: endoderme (FOXA2), mesoderme (BRACHYURY-T) e ectoderme (PAX6), durante a diferenciação de células-tronco embrionárias por meio de corpos embrióides através de imunofluorescência.
- Estudar o efeito da perda da função de Coup-TFII sobre a expressão dos marcadores dos folhetos germinativos durante a diferenciação de células-tronco embrionárias em corpos embrióides.



Esquema ilustrativo dos objetivos, modelos de estudo e métodos utilizados. A descrição detalhada dos métodos se encontra no ítem 2.2.

## 2.2 Materiais e métodos

### 2.2.1 Cultivo das CTE E14TG2a

A linhagem de células E14TG2a são mantidas indiferenciadas em cultivo com meio Glasgow Modified Eagle's Medium (GMEM) (Sigma, USA), com 1000 U/mL de fator inibidor de leucemia (LIF) (ESGRO-LIF; ChemiconMillipore), 1µm de PD0325901, 3µm de CHIR99021, 0.1 mM de β-mercaptoetanol, 1% v/v de aminoácidos não essenciais (MEM NEAA), 50 U/mL de penicilina, 50 µg/mL de streptomicina, 2 de mM L-glutamina, e 15% v/v de soro fetal bovino (FBS), em incubadora de CO<sub>2</sub> 5%, à 37 °C. As subculturas das CTE são feitas a cada dois dias, quando as células em cultura apresentam-se com 80 a 90% de confluência. As garrafas de cultura utilizadas para o cultivo das CTE são previamente tratadas com 0,1% m/v de gelatina.

### 2.2.2 Diferenciação das CTE E14TG2a - Método Hanging Drop

A indução da diferenciação das CTE e formação dos CE é realizada através do método *Hanging Drop* (gotas suspensas). As células são retiradas do GMEM com LIF e 2i e

ressuspendidas em DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) suplementado com 0,1mM de  $\beta$ -mercaptoetanol, 1% v/v de aminoácidos não essenciais (MEM NEAA GIBCO), 50 U/mL de penicilina, 50 ug/mL de streptomomicina (GIBCO), 2 mM L-glutamina (GIBCO), 20% v/v de soro fetal bovino (FBS - GIBCO), sem adição de LIF.

A diferenciação é feita com uma suspensão contendo cerca de 1000 células, depositadas em gotas de 20  $\mu$ L de meio na superfície interna da tampa de uma placa de Petri plástica de 100mm, totalizando cerca de 60 gotas por tampa. A base da placa de Petri é preenchida com 10 mL de água miliQ estéril, para evitar alterações no volume do meio das gotas, e a tampa é cuidadosamente invertida de modo a tampar novamente a placa de Petri, como ilustrado abaixo. Desta forma, as placas contendo as “gotas penduradas” são então incubadas por dois dias em incubadora de CO<sub>2</sub> 5%, à 37 °C. Neste período, a força gravitacional mantém as CTE em contato, e sua capacidade de aderência resulta na formação de agregados esféricos denominados CE. No terceiro dia, os CE são transferidos das gotas para uma placa de Petri de 10mm (não aderente) onde são mantidos em suspensão em meio de diferenciação.

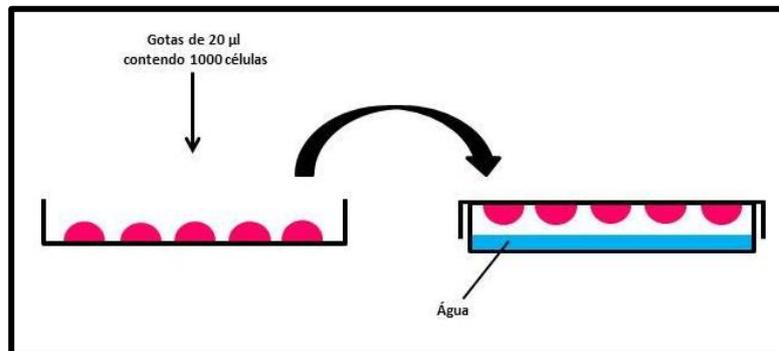


Ilustração do método *Hanging Drop* (gotas suspensas).

### 2.2.3 Imunofluorescência

Os CE são fixadas com PFA4% por 15 minutos a temperatura ambiente. Após etapa de fixação, as amostras são lavadas em PBS 0,1M, pH 7,4 permeabilizadas com PBS contendo 0,3% de Triton X-100 e 0,1M de glicina por 30 minutos a temperatura ambiente. As amostras são incubadas com anticorpo primário (tabela 1) overnight a 4°C, lavadas três vezes com PBS + 0,1% de Triton, seguida da incubação do anticorpo secundário (tabela 1) por 2 horas a temperatura ambiente. Os anticorpos primários e secundários são diluídos em solução contendo 1% BSA e 0,1% Tween. As amostras são incubadas em DAPI, na diluição de 1:1000.

As imagens relacionadas a análise da co-localização de Coup-TFII com marcadores do desenvolvimento (Figuras 1 e 2) foram obtidas com o microscópio confocal LSM780 – NLO INFABiC-UNICAMP, objetiva de 40 e 63X. E as imagens relacionadas a análise de perda de função de Coup-TFII (Figuras 4 e 5) foram obtidas com microscópio confocal SP8 (Leica Microsystems) no LnBIO, com objetiva de 40X.

**Tabela 1: Anticorpos primários (A) e secundários (B) utilizados nos experimentos de imunofluorescência.**

**A**

Anticorpo Secundário	Diluição
Alexa Fluor® 488 Goat Anti-Rabbit (Invitrogen A-11008)	1:500
Alexa Fluor® 488 Donkey Anti-Goat (Invitrogen A-11055)	1:500
Alexa Fluor® 647 Donkey Anti-Rabbit (Invitrogen A-11078)	1:500
Alexa Fluor® 555 Donkey Anti-Mouse (Invitrogen A-10037)	1:500
Alexa Fluor® 555 Donkey Anti-Rabbit (Invitrogen A-1)	1:500
Alexa Fluor® 488 Goat Anti-Rabbit (Invitrogen A-11008)	1:500
Alexa Fluor® 568 Donkey Anti-Goat (Invitrogen A-11057)	1:500

**B**

Anticorpo Primário	Fabricante	Diluição
Rabbit anti-Coup-TFII	ab64849 Abcam	1:100
Mouse anti-Coup-TFII	Ab41859	1:100
Rabbit anti-Foxa2	(NBP1-95426)	1:150
Goat anti-Brachyury-T	SC17743	1:100
Mouse anti-Pax6	(MAB353)	1:50

## 2.2.4 Análises de imagens

Todas as análises de quantificação de imunofluorescência e reconstrução em 3D foram realizadas utilizando o programa ImageJ (Fiji).

Para a análise de co-localização, selecionamos um plano central representativo do CE, utilizamos o canal com Dapi para delimitar núcleo de cada célula e quantificamos a intensidade de fluorescência de COUP-TFII, FOXA2, BRAC1 e PAX6, utilizando a função *mean gray value* do ImageJ. Com esses valores plotamos os gráficos de Coup-TFII versus Foxa2, Brac1 e Pax6. Para cada análise de dupla marcação, analisamos em torno de 8 CE

originados de 2 experimentos independentes correspondendo a aproximadamente 1500 células analisadas.

Para a quantificação de fluorescência demonstradas nas análise de imunofluorescência de CE selvagem e *Coup-TFII* nocaute utilizamos o canal com Dapi para delimitar núcleo, aplicamos essa delimitação nos canais de interesse e medimos a intensidade da fluorescência.

### 2.2.5 Extração de RNA e síntese de cDNA

A extração de RNA foi realizada seguindo o mesmo protocolo descrito no Materiais e Métodos do capítulo 1, ítem 1.2.6.

A síntese de cDNA foi realizada a partir de 1µg de RNA com o kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems).

### 2.2.6 Real Time PCR

Os primers utilizados foram desenhados com o auxílio da ferramenta Primer Blast do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) com base no banco de dados do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) ou retirados do banco de dados: <https://pga.mgh.harvard.edu/primerbank/> e confeccionados comercialmente.

O gene de referência utilizado como controle endógeno foi o Gapdh. Os resultados foram normalizados usando os valores de Ct (*threshold cycle*) desse gene de referência. Para quantificar a expressão gênica relativa, foi utilizado o modelo matemático 2- $\Delta\Delta$ Ct (Livak e Schmittgen, 2001). A amostra normalizadora para as análises tanto de análise de expressão gênica durante a diferenciação, quanto para a análise de expressão gênica entre células selvagem (WT) e *Coup-TFII* nocaute (KO) foram as células indiferenciadas selvagem.

As reações de qPCR foram realizadas utilizando Power SYBR Green PCR Master Mix (4368708, ThermoFisher Scientific) no equipamento Step One Plus Real-Time PCR machiner (Applied Biosystems). O seguinte programa foi utilizado: 10 min a 95°C seguidos por 40 ciclos de 15 segundos a 95°C (denaturação) e 1 min a 60°C (anelamento e extensão), seguindo de uma etapa final para a construção da curva de *melting* de 72 °C por 20 s, 60 °C por 1min e 95 °C por 15 s. Os primers utilizados estão listados na tabela 2.

**Tabela 2: Primers utilizados nos experimentos de qPCR.**

Gene	<i>Foward</i>	<i>Reverse</i>
<b>Coup-TFI</b>	GCGGTTTCAGCGAGGAAGAAT	CATGCACTGGCTGCCATAAC
<b>Coup-TFII</b>	GCGCAGACGGCATGTATGATA	GGGTTGCCCTGGTACTGAAG
<b>Gapdh</b>	ACTGGCATGGCCTTCCGTGTTC	ATTGAGAGCAATGCCAGCCCCG
<b>Gata6</b>	TTGCTCCGGTAACAGCAGTGGC	TCTCGGGGTGGCGTTTTCTCC
<b>Sox17</b>	GACTGCGGAGTGAACCTCTC	GTCGGCAACCGTCAAATGTC
<b>LamininaB1</b>	GAAGGGCCCCTCTCCTCTC	CCCATAGGGCTAGGACACCA
<b>LamininaC1</b>	ACATGCCAGCGAGTGTGTAA	AGTCACAAGGAAGGCACTCG
<b>Hnf4a</b>	CAGCAATGGACAGATGTGTGA	TGGTGATGGCTGTGGAGTC
<b>Cxcr4</b>	TGGAACCGATCAGTGTGAGT	GGGCAGGAAGATCCTATTGA
<b>Pdgfra</b>	AAGACCTGGGCAAGAGGAAC	GAACCTGTCTCGATGGCACT
<b>Oct4</b>	TGCAAATCGGAGACCCTGGTGC	ATCTTTTGCCCTTCTGGCGCCG
<b>Nanog</b>	TCTTCCTGGTCCCCACAGTTT	GCAAGAATAGTTCTCGGGATGAA
<b>BrachyuryT</b>	ACCCAGACTCGCCCAATTTT	ACATGATCTGTCCCCCTCCA
<b>Foxa2</b>	GGACCCCAAGACATACCGAC	ATCTTGTTGGGGCTCTGCTG
<b>Sox1</b>	CCCATGCACCGCTACGACAT	CCGTAGCCCGAAGGCCGA
<b>Nestin</b>	GGAGAAGCAGGGTCTACAG	AGCCACTTCCAGACTAAGG
<b>Pax6</b>	GCGCAGACGGCATGTATGATA	GGGTTGCCCTGGTACTGAAG

### 2.2.7 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa GraphPad Prism. Os dados foram analisados utilizando Student's test, para dois grupos, ou ANOVA test para múltiplos grupos, com múltiplas comparações e pós teste de Tukey. A significância estatística foi definida como  $P < 0,05$ . Os dados estão apresentados como média  $\pm$  erro-padrão da média (SEM $\pm$ ).

### 2.2.8 Análise de dados de sequenciamento

Os gráficos demonstrados na figura 15 foram realizados acessando dados de sequenciamento de embriões nos estágios de pré implantação E2.5 – E5.5 publicados em Boroviak et al., 2015. Analisamos a expressão de Coup-TFI, Coup-TFII, Sox17, Foxa2, Gata6, Cxcr4, Hnf4a e Pdgfra. Os gráficos foram gerados utilizando o programa GraphPad Prism.

Os gráficos demonstrados nas figuras 16 e 17 foram realizadas acessando dados de sequenciamento de *single cell* de embriões entre os E6.5 e E8.0, publicados em Pijuan-Sala et al., 2019. Os autores disponibilizaram os dados obtidos nesse trabalho em um aplicativo, o qual

acessamos por meio do endereço:  
<https://marionilab.cruk.cam.ac.uk/MouseGastrulation2018/>.

Analisamos a expressão de Coup-TFI, Coup-TFII, Sox17, Foxa2, Gata6, Cxcr4, Hnf4 $\alpha$  e Pdgfra nos E6.5 (Figura 16) e E7.5 (Figura 17). Para obter os gráficos mostrados nestas figuras, no campo “Projection Type” selecionamos a opção UMAP e no campo “Plot Colour” selecionamos a opção Cell type.

## 2.3 Resultados

### 2.3.1 Coup-TFII colocaliza com marcadores de especificação celular durante a diferenciação de células-tronco embrionárias

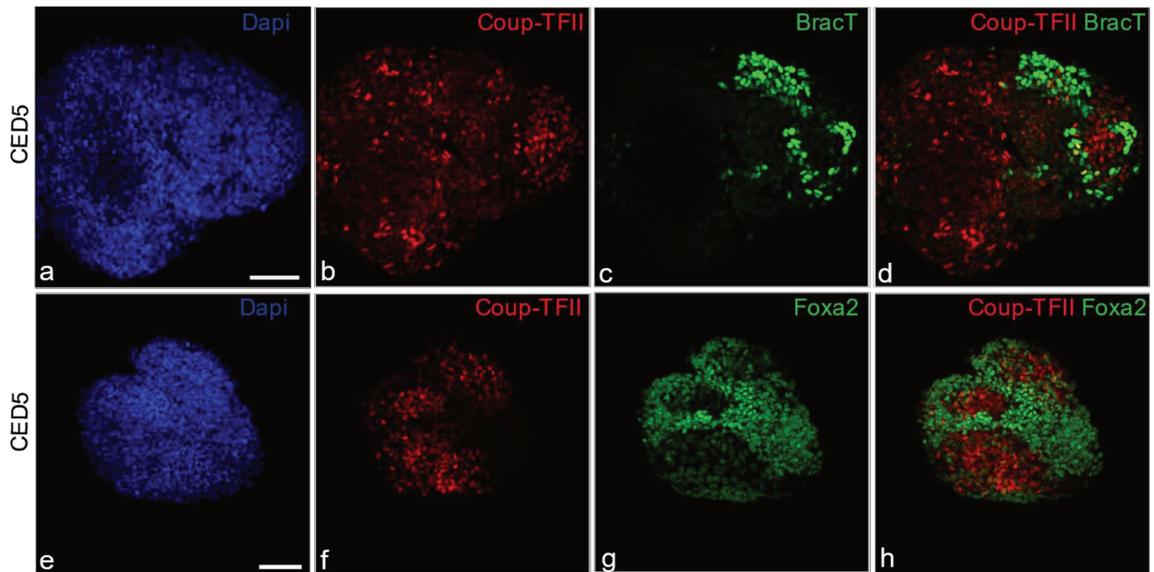
Nesta parte do trabalho, avaliamos se a expressão espacialmente localizada de Coup-TFII no início da diferenciação poderia estar relacionada com marcadores dos folhetos germinativos endoderme, mesoderme e ectoderme. Para isso, analisamos por meio de imunofluorescência dupla a relação espaço-temporal das células marcadas para COUP-TFII e para BRACHYURY-T (mesoderme), PAX6 (ectoderme) e FOXA2 (endoderme), os quais são fatores chaves durante a gastrulação, nos dias 5 e 6 de diferenciação.

No 5<sup>o</sup> dia de diferenciação BRACHYURY-T está preferencialmente localizado em um dos hemisférios dos CE apresentando co-localização com COUP-TFII (Figura 9A – d). Entretanto, quando quantificamos a intensidade de fluorescência destes dois fatores a nível de células individuais, notamos que os eventos em que observamos marcações para ambos os fatores ocorrem em núcleos com intensidade de fluorescência muito reduzidas quando comparada à intensidade de fluorescência dos núcleos marcados para um ou outro fator (Figura 9B).

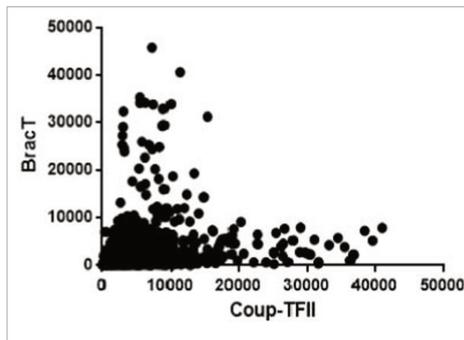
Ao observarmos a marcação das células para FOXA2 e COUP-TFII, notamos um padrão muito mais evidente de localização excludente entre os dois fatores (Figura 9A – h). Ao realizarmos a análise de quantificação da intensidade de fluorescência deste dois fatores, notamos que, assim como observamos para BRACHYURY-T e COUP-TFII, a co-localização

de FOXA2 e COUP-TFII só é observada em núcleos com intensidade de fluorescência muito reduzidas, enquanto que as maiores intensidades de marcação são observadas nos núcleos com marcação mutuamente exclusiva entre FOXA2 e COUP-TFII (Figura 9C).

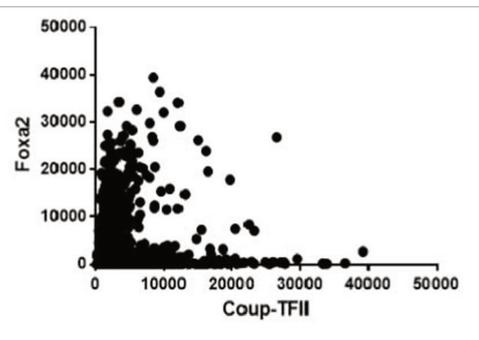
A



B



C



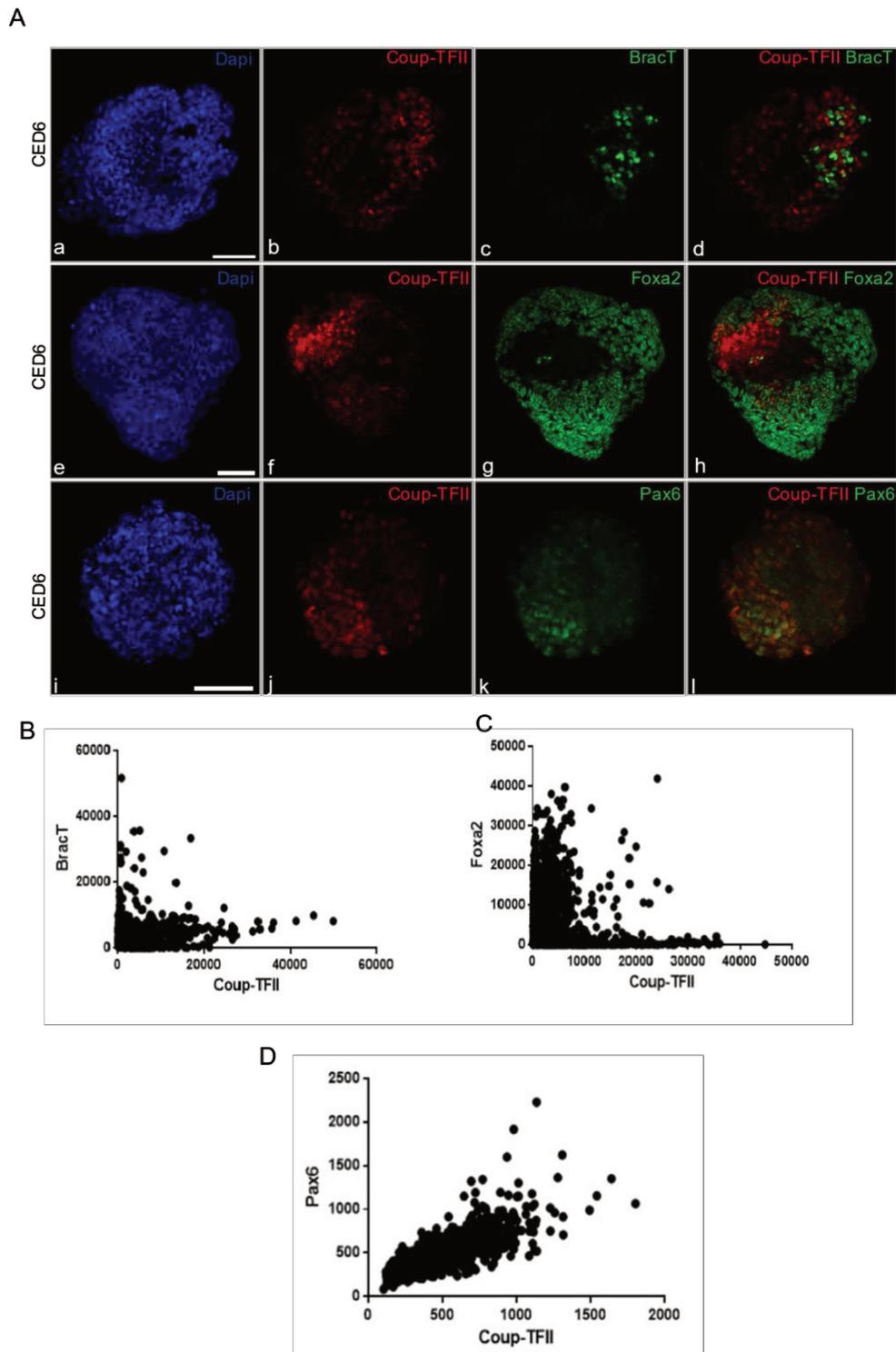
**Figura 9: Distribuição espacial da expressão de BRACHYURY-T, FOXA2 e COUP-TFII em CE com 5 dias de diferenciação.** A: Imunofluorescência de COUP-TFII e BRACHYURY-T (a-d) e COUP-TFII e FOXA2 (e-h). B: Representação gráfica demonstrando a co-localização de Coup-TFII e BRACHYURY-T em células individuais. C: Representação gráfica demonstrando a co-localização de COUP-TFII e BRACHYURY-T em células individuais. Em azul, DAPI, evidenciando núcleos, Vermelho, Coup-TFII e verde, Foxa2. Barras: 50µm. N=2 experimentos independentes.

No 6º dia de diferenciação, além dos fatores BRACHYURY-T e FOXA2, expressos no dia 5, também foi possível fazer esta análise de colocalização com COUP-TFII para PAX6, marcador de especificação ectodérmica cuja marcação só é detectada após o 5º dia de diferenciação. BRACHYURY-T, por outro lado, é detectado com intensidade reduzida no 6º dia de diferenciação quando comparado com as marcações que obtivemos no 5º dia (Compare

Figura 9B com Figura 10B). Mesmo assim foi possível realizar esta análise comparativa para os três fatores no 6º dia de diferenciação.

Tanto BRACHYURY-T quanto FOXA2 continuam mutuamente exclusivos com COUP-TFII, mantendo o padrão de co-localização somente em células com intensidade muito reduzida para ambos os fatores, em cada comparação (Figura 10 B e C). Uma diferença entre os dois dias é um aumento da quantidade de células positivas para FOXA2 no dia 6, comparada com o dia 5 (Compare Figura 9A-g e C com Figura 10A-g e C). Além disso, a quantidade de células duplamente marcadas (com baixa intensidade) para FOXA2 e COUP-TFII parece ser maior no dia 6 quando comparado ao dia 5 (Compare Figura 9C com Figura 10C).

Ao contrário do observado para os dois outros fatores, células intensamente marcadas para PAX6 estão inteiramente contidas na população de células intensamente marcadas para COUP-TFII (Figura 10A j-l). Esta co-localização completa entre os dois fatores pode ser visualizado também pelo gráfico que mostra que esta co-localização entre PAX6 e COUP-TFII ocorrem em todos os níveis de marcação observados (Figura 10D).

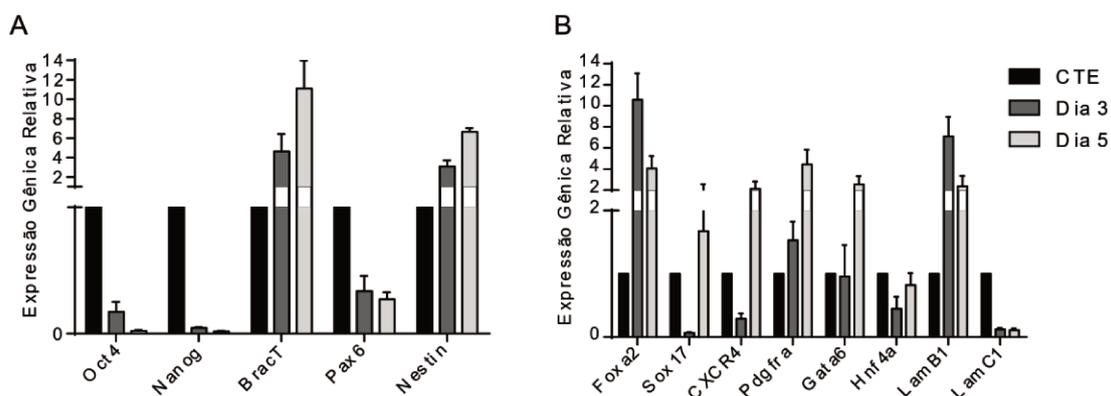


**Figura 10: Distribuição espacial da expressão de BRACHYURY-T, FOXA2, PAX6 e COUP-TFII em CE com 6 dias de diferenciação.** A: Imunofluorescência de COUP-TFII e BRACHYURY-T (a-d); COUP-TFII e FOXA2 (e-h) e COUP-TFII E PAX6 (i-l). Em azul, DAPI, evidenciando núcleos, Vermelho, Coup-TFII e verde, Foxa-2. Barras: 50 $\mu$ m. B: Representação gráfica demonstrando a co-localização de COUP-TFII e BRACHYURY-T em células individuais. C: Representação gráfica demonstrando a co-localização de COUP-TFII e BRACHYURY-T em células individuais. D: Representação gráfica demonstrando a co-localização de COUP-TFII e BRACHYURY-T em células individuais.

### 2.3.2 Coup-TFII atua na regulação de marcadores de folhetos embrionários durante a diferenciação de células-tronco embrionárias

Para analisar se as correlações entre as marcações de COUP-TFII e dos marcadores de especificação celular refletiriam um cenário de regulação de expressão gênica geramos uma linhagem de CTE nocaute para *Coup-TFII* através da tecnologia de CRISPR-Cas9 (Araújo, 2017). A caracterização dessas células está descrita em (Matsuguma, 2019).

Nesta análise, inicialmente projetamos um cenário contendo os principais eventos de transição de estados e destinos celulares marcando o início do desenvolvimento embrionário, modelado aqui pelo início da diferenciação de CE à partir de CTE. O estado de pluripotência foi marcado pelos níveis de expressão gênica dos fatores Oct4 e Nanog, que estão fortemente expressos em células pluripotentes e perdem a expressão progressivamente com o processo de diferenciação das CTE nos diferentes destinos celulares. O destino mesodérmico foi marcado pela expressão de Brachyury-T. O destino ectodérmico foi marcado pela expressão de Pax6, como anteriormente, e adicionamos à análise o gene Nestin, um marcador de neuroectoderme mais tardio. Por fim, o destino endodérmico, foi marcado pela expressão de Foxa2, Sox17, Gata6, Cxcr4, Pdgfra, Hnf4 $\alpha$ , Laminina B1 e C1. Todas as análises foram realizadas em células indiferenciadas (CTE) e em células com 3 (Dia3) e 5 (Dia5) dias de diferenciação (Figura 11A e B).

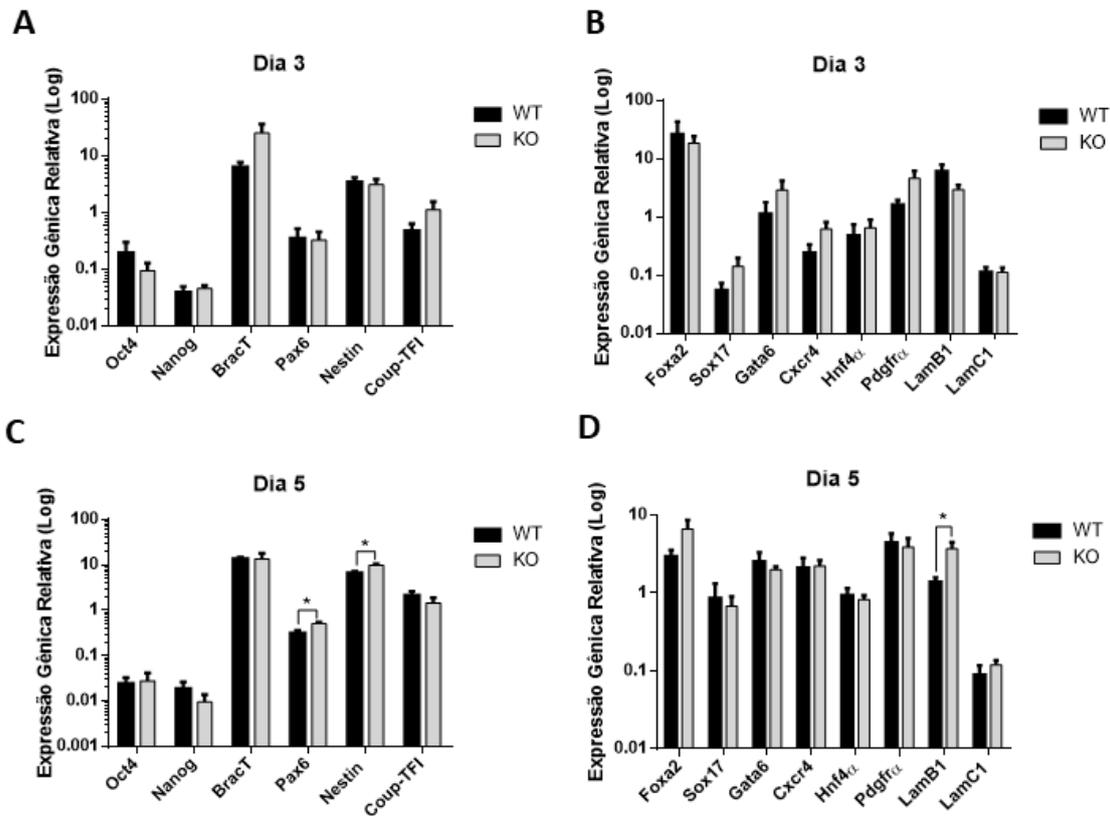


**Figura 11:** Padrão de expressão gênica relativa de marcadores de pluripotência (*Oct4* e *Nanog*); mesoderme (*Brachyury-T*); ectoderme (*Pax6* e *Nestin*); endoderme (*Foxa2*, *Sox17*, *Cxcr4*, *Pdgfra*, *Gata6*, *Hnf4 $\alpha$* , *LamB1* e *LamC1*) durante os dias 3 e 5 da diferenciação de CTE utilizando corpos embriões. N=3. Média  $\pm$  SEM.

Durante a diferenciação de CTE em CE, a expressão de *Oct4* e *Nanog*, máximas em CTE, decaí enquanto a expressão de *Brachyury-T* e *Nestin* aumentam nos dias 3 e 5 (Figura 11A). A expressão de *Pax6*, por sua vez, decaí com o início da diferenciação (Figura 11A). Com o início da diferenciação, observamos também um aumento da expressão de *Foxa2*, com um pico no dia 3 e uma redução no dia 5, padrão semelhante ao observado para *LamB1*. Os genes *Sox17*, *CXCR4* e *Hnf4a* apresentam uma redução no 3º dia e um discreto aumento da expressão no 5º dia quando comparado ao 3º, porém é muito pouco expresso (Figura 11B). *Pdgfra* aumenta progressivamente com a diferenciação enquanto a expressão de *Gata6* permanece inalterada no 3º dia e aumenta no 5º dia. Por fim, *LamC1* apresenta uma redução da expressão durante a diferenciação, quando comparada com o seu nível de expressão em CTE (Figura 11B).

Analisando o processo de diferenciação de células nocauteadas para *Coup-TFII* (KO), observamos que a perda de função de COUP-TFII afetou muito pouco a expressão dos genes envolvidos neste processo (Figura 12). Quando analisamos os genes marcadores de pluripotência, *Oct4* e *Nanog*, observamos que apesar de *Oct4* apresentar uma queda de expressão no 3º dia de diferenciação, no 5º dia não houve alteração, enquanto *Nanog* não foi afetado pela perda de função de *Coup-TFII* em nenhum dos dias analisados (Figura 12A e B). *Brachyury-T*, marcador de mesoderme teve um aumento no dia 3, porém dia 5 não se alterou (Figura 12A e B). Ambos os marcadores de ectoderme, *Pax6* e *Nestin* apresentaram um aumento significativo da expressão somente no dia 5, enquanto no dia 3 não tiveram alteração (Figura 12A e B), *Coup-TFI*, por sua vez, teve um aumento no dia 3, enquanto no dia 5 demonstrou uma queda com o nocaute de *Coup-TFII*, porém essas alterações não foram significativas (Figura 12A e B).

No que diz respeito aos marcadores de endoderme, *Cxcr4*, *Gata6*, *Sox17* e *Pdgfra*, todos aumentaram no 3º dia de diferenciação, com exceção de *Hnf4a*, porém no 5º dia não observamos alteração na expressão desses marcadores em relação ao controle (Figura 12B e D). Por outro lado, *Foxa2* teve um pequeno decréscimo no 3º dia e no 5º dia de diferenciação, um aumento (Figura 12B e D). Entretanto essas alterações não foram estatisticamente significativas. *LamB1* diminuiu no 3º dia e demonstrou um aumento no 5º dia, enquanto *LamC1* não teve alteração em nenhum dos dias analisados (Figura 12D).



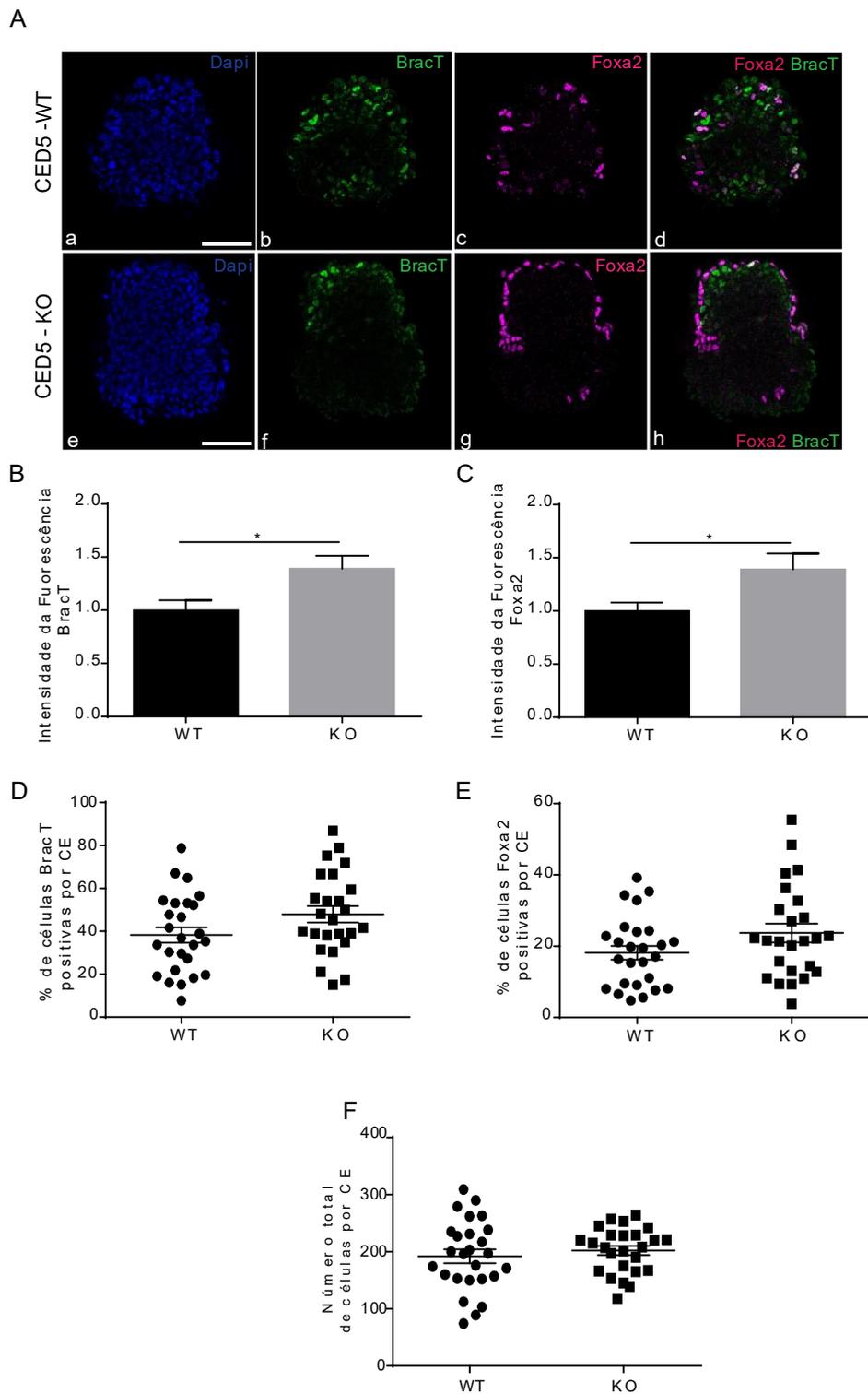
**Figura 12: Análise do nocaute gênico de *Coup-TFII* durante o início da diferenciação de CTE.** Expressão gênica relativa de marcadores de pluripotência (*Oct4* e *Nanog*), mesoderme (*Brac1*), ectoderme (*Pax6* e *Nestin*) e *Coup-TFII* no 3<sup>o</sup> e 5<sup>o</sup> dias de diferenciação, respectivamente (A e C). Expressão gênica relativa de marcadores de endoderme (*Foxa2*, *Sox17*, *Gata6*, *Cxcr4*, *Hnf4 $\alpha$* , *Pdgfra*, *Lamb1* e *LamC1*) (B e D) no 3<sup>o</sup> e 5<sup>o</sup> dias de diferenciação entre grupo selvagem (WT) e *Coup-TFII* nocaute (KO). N=3 experimentos independentes. Significância  $p < 0,05$  (\*). TestT. Média  $\pm$  SEM.

Buscamos analisar se essas alterações também seriam observadas a nível de proteína, para isso realizamos ensaios de imunofluorescência com BRACHYURY-T e FOXA2. A Figura 13 A ilustra imagens representativas de CE com 5 dias de diferenciação do grupo controle (WT) (a – d) e do grupo *Coup-TFII* nocaute (KO) (e – h). Não observamos diferenças visíveis na expressão de BRACHYURY-T (b e f) e FOXA2 (c e g) entre os dois grupos. Porém realizamos análise semiquantitativas da expressão desses marcadores através da quantificação da intensidade de fluorescência de um plano representativo de CEs e também analisamos se houve alguma alteração no número de células expressando esses dois fatores.

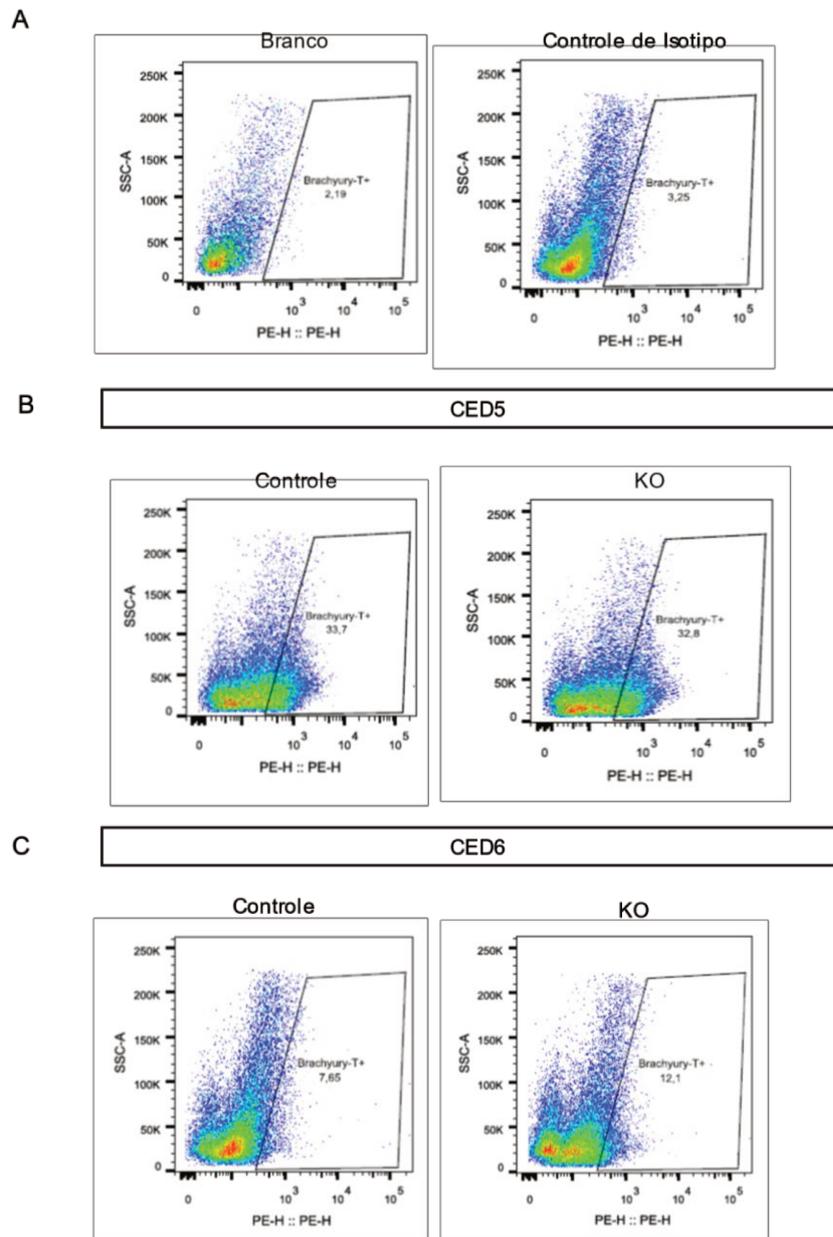
A figura 13 B e C mostra o gráfico com a intensidade relativa de fluorescência de BRACHYURY-T e FOXA2, respectivamente, demonstrando que houve um aumento na intensidade de fluorescência de ambos no grupo *Coup-TFII* nocaute (KO), comparado com o controle (WT), assim como visto por qPCR.

Analisamos também se houve alguma alteração no número de células expressando esses dois fatores. Para isso realizamos a contagem de células BRACHYURY-T e FOXA2 positivas, porém não observamos alterações entre a porcentagem de células positivas de BRACHYURY-T e FOXA2 entre o grupo KO e o grupo controle (Figura 13 D e E, respectivamente) e também não observamos alteração no número total de células por CE (Figura 13F).

Como a quantificação de imunofluorescência é considerada um método semiquantitativo, realizamos ensaio de citometria de fluxo para BRACHYURY-T em CE com 5 e 6 dias de diferenciação (Figura 14). Os resultados demonstram que, no 5º dia, a porcentagem de células positivas para BRACHYURY-T é praticamente o mesmo entre o grupo KO (32,8%) e o grupo controle (33,7%), ao passo que, no 6º dia de diferenciação, o nocaute de *Coup-TFII* resultou em um aumento de 60% das células positivas para BRACHYURY-T, com 12,1% de células do CE positivas para BRACHYURY-T no grupo KO comparado com 7,65% de células positivas para Bract no grupo controle (Figura 14C).



**Figura 13: Imunofluorescência de BRACHYURY-T e FOXA2 em CE controle (WT) e *Coup-TFII* nocaute (KO) com 5 dias de diferenciação.** A: (a – d) CED5 grupo controle; (e – h) CED5 grupo *Coup-TFII* nocaute. Em azul, DAPI, evidenciando núcleos, verde, BrachyuryT e magenta, Foxa2. Barras: 50µm. B e C: Quantificação da intensidade de fluorescência de BRACHYURYT e FOXA2 nos grupos controle e KO, respectivamente. D e E: Quantificação da porcentagem de células BRACHYURYT e FOXA2 positivas por CE, respectivamente. F: Número total de células por CE. Significância  $p < 0,05$  (\*). Test T. Média  $\pm$  SEM .N=3 experimentos independentes, 26 amostras analisadas por grupo.



**Figura 14: Análise por citometria de fluxo da expressão de BRACHYURYT em CE controle (WT) e *Coup-TFII* nocaute (KO) com 5 e 6 dias de diferenciação.** A: Controle negativo e Controle de Isotipo. B: Expressão de BRACHYURYT nos grupos controle e KO no 5º dia de diferenciação. C: Expressão de BRACHYURYT nos grupos controle e KO no 6º dia de diferenciação. N=1.

Uma vez que verificamos a alteração de marcadores de endoderme na ausência de *Coup-TFII* nos questionamos se essas alterações seriam relacionadas à endoderme extraembrionária ou endoderme embrionária (definitiva), a qual compõem o embrião em si. Como não conseguimos realizar ensaios de dupla ou tripla marcação com marcadores específicos de endoderme extraembrionária ou embrionária (definitiva) para identificar as subpopulações de endoderme e analisar em que subpopulações *Coup-TFII* estava expresso,

recorremos ao uso de dados de RNAseq já publicados. Analisamos a expressão de Coup-TFII quanto a expressão de marcadores que estamos focando neste trabalho, tanto no período de pré implantação, quanto no pós implantação e início da gastrulação (Figuras 15, 16 e 17).

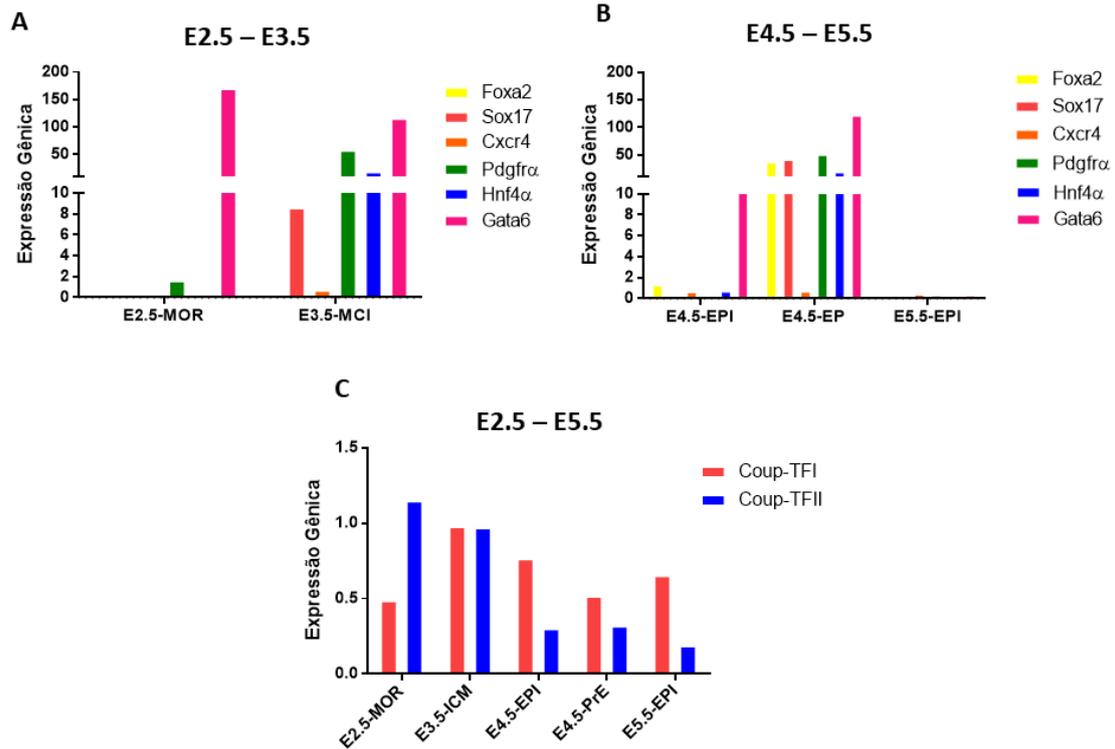
Analisamos dados de RNAseq em células da massa celular interna (E3.5), Epiblasto e de Endoderme Extraembrionária em embriões no E4.5 (Boroviak et al., 2015) e dados de *single cell sequencing* de embriões durante a gastrulação, E6.5 e E7.5 (Pijuan-Sala et al., 2019) a fim de verificar se os marcadores de endoderme que estamos analisando neste trabalho são específicos de endoderme extra ou embrionária e verificar se estavam co-expressos com *Coup-TFII*, no E6.5.

O gráfico da Figura 15A mostra que *Gata6*, *Sox17*, *Pdgfra*, *Hnf4a* já são expressos na massa celular interna (E3.5), enquanto que *Foxa2* e *Cxcr4* não são detectados nesse estágio. No E4.5, *Foxa2*, *Cxcr4*, *Hnf4a* e *Gata6* são expressos no Epiblasto, porém principalmente os 3 primeiros, com uma expressão muito baixa, enquanto na endoderme primitiva (EP) no E4.5 todos os marcadores são altamente expressos, com exceção de *Cxcr4* (Figura 15B). No E5.5 no Epiblasto não é detectada a expressão de nenhum desses marcadores. Durante estes estágios, que se referem à período de pré-implantação, a expressão de *Coup-TFII* foi detectada principalmente na mórula (E2.5) e MCI (E3.5), enquanto *Coup-TFI* na MCI (E3.5) mas em níveis baixos (Figura 15C).

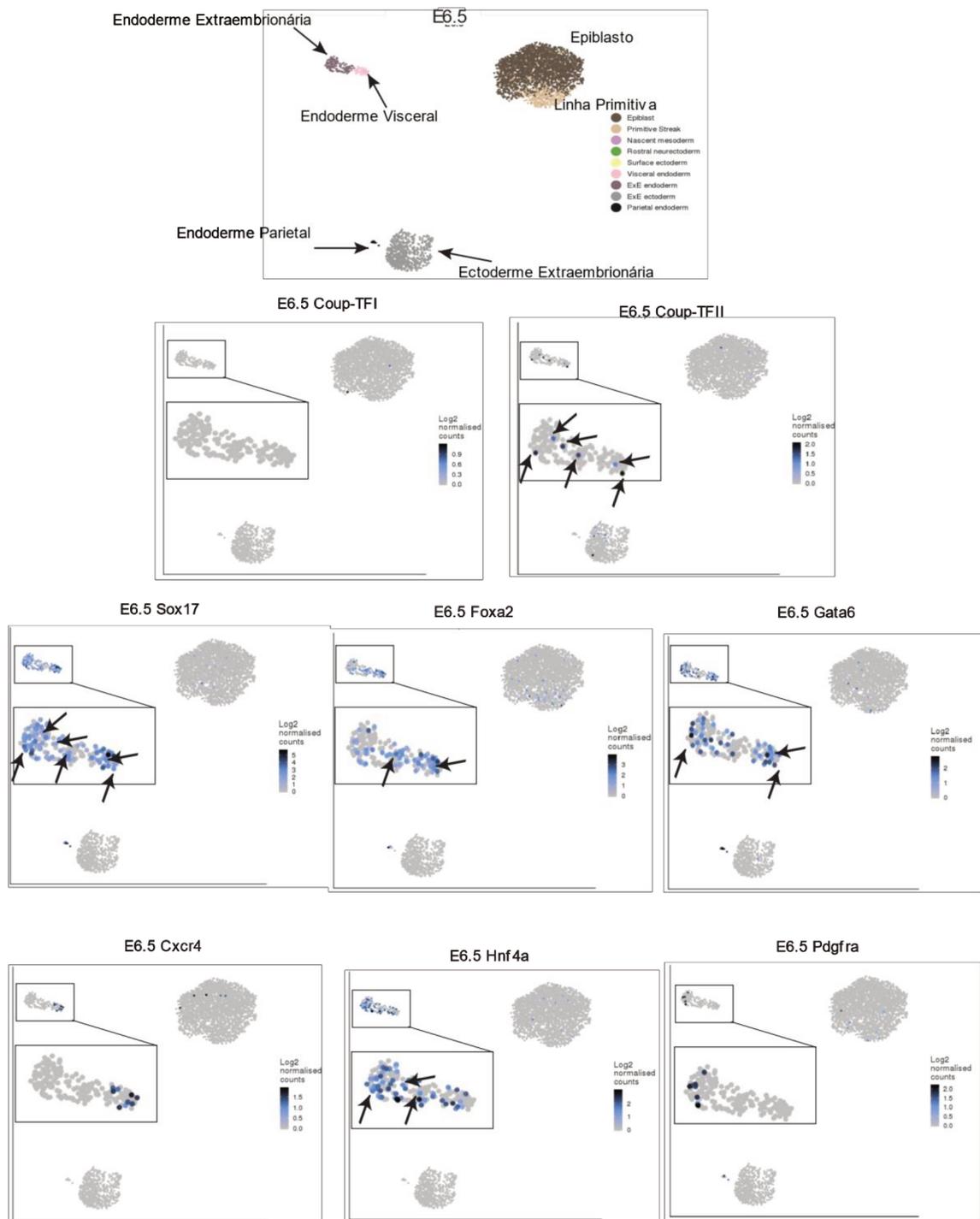
No estágio E6.5, *Coup-TFII* é detectado em algumas células da endoderme extraembrionária, enquanto *Coup-TFI* está expresso nesse estágio. Os marcadores *Sox17*, *Foxa2*, *Gata6*, *Cxcr4*, *Hnf4a* e *Pdgfra* estão majoritariamente em células da endoderme extraembrionária. *Foxa2* é também expeso em células da linha primitiva enquanto *Cxcr4* é detectado em altos níveis em algumas células do epiblasto. Neste estágio, detectamos a colocalização de *Coup-TFII* com *Sox17*, *Gata6*, *Hnf4a* e *Foxa2* nas células da endoderme extraembrionária, porém não com *Cxcr4* e *Pdgfra* (Figura 16).

No estágio E7.5, *Coup-TFII* é detectado principalmente em células da endoderme extraembrionária e algumas células da mesoderme, porém não em células da endoderme embrionária (definitiva), enquanto *Coup-TFI* é detectado em poucas células da neuroectoderme. *Sox17* e *Foxa2* foram detectados em ambas endoderme definitiva e extraembrionária, assim como *Gata6* que além disso, também está presente em células da mesoderme. *Cxcr4* é expeso na endoderme embrionária e mesoderme, porém não na endoderme extraembrionária, enquanto *Pdgfra* está presente na endoderme extraembrionária e

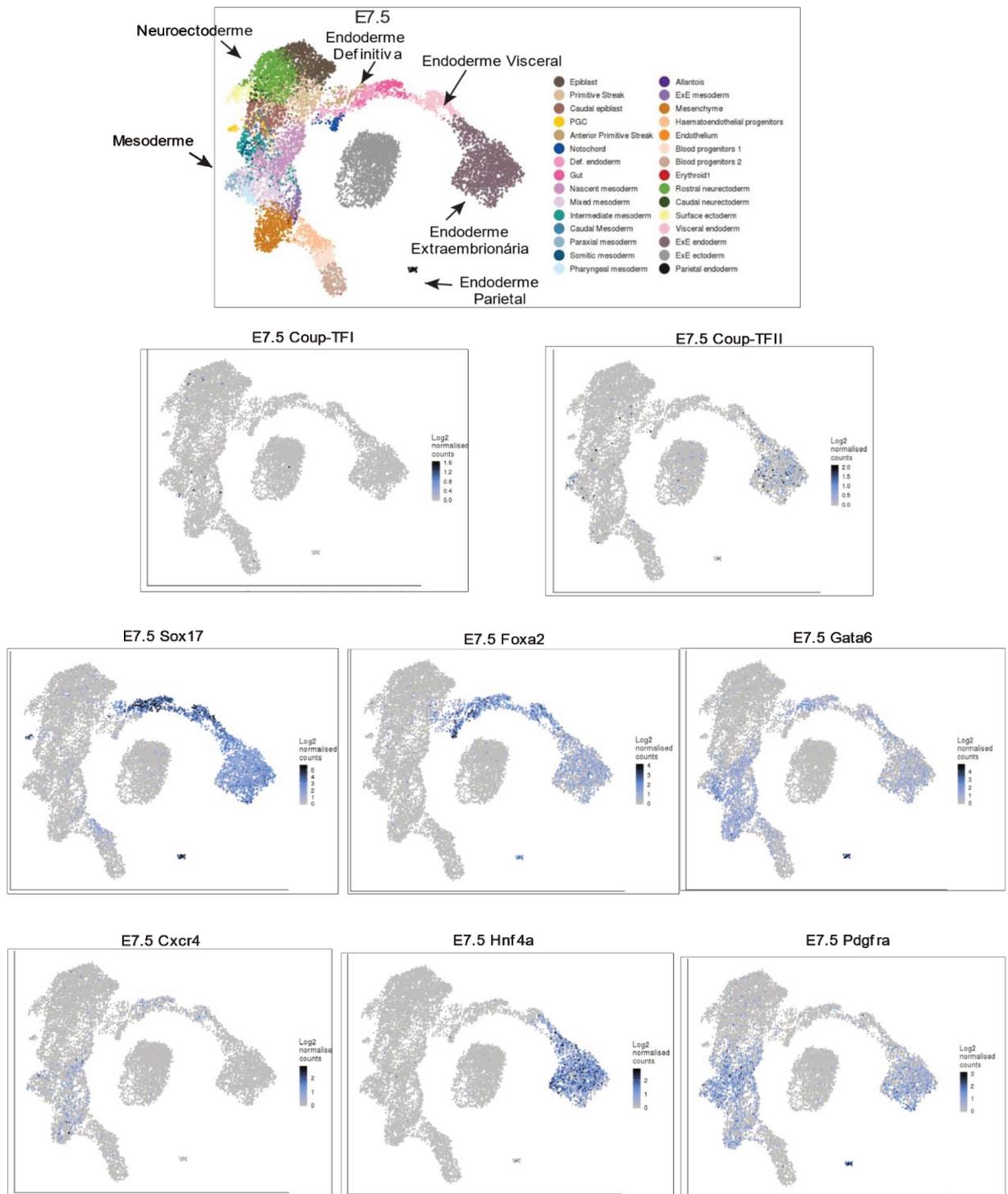
mesoderme e *Hnf4 $\alpha$*  somente na endoderme extraembrionária (Figura 17). Para nossas descrições, estamos considerando endoderme extraembrionária o conjunto de endoderme visceral, parietal e extraembrionária.



**Figura 15: Análise de dados de sequenciamento de embriões de camundongo nos estágios de pré implantação.** A: Expressão de marcadores de endoderme *Foxa2*, *Sox17*, *Cxcr4*, *Pdgfra*, *Hnf4 $\alpha$*  e *Gata6* na mórula (E2.5); Massa Celular Interna – MCI (E3.5). B: Epiblasto – Epi (E4.5); Endoderme Primitiva – EP (E4.5) e Epiblasto (E5.5). C: Expressão de *Coup-TF1* e *Coup-TFII* nos E2.5 a E5.5. Dados retirados de (Boroviak et al., 2015).



**Figura 16: Análise de dados de sequenciamento (*single cell*) de embriões de camundongo no E6.5.** Expressão de *Coup-TF1*, *Coup-TFII*, *Sox17*, *Foxa2*, *Gata6*, *Cxcr4*, *Hnf4a* e *Pdgfra* em células da endoderme definitiva, endoderme extraembrionária, epiblasto e linha primitiva. Detalhes e setas: co expressão de *Coup-TFII* com *Sox17*, *Foxa2*, *Gata6* e *Hnf4a*. Dados retirados de (Pijuan-Sala et al., 2019).



**Figura 17:** Análise de dados de sequenciamento (*single cell*) de embriões de camundongo no E7.5. Expressão de *Coup-TFI*, *Coup-TFII*, *Sox17*, *Foxa2*, *Gata6*, *Cxcr4*, *Hnf4a* e *Pdgfra* em células da endoderme definitiva, endoderme extraembrionária e mesoderme. Pijuan-Sala et al., 2019.

## 2.4 Discussão

A diferenciação de células-tronco embrionária (CTE) por meio de corpos embrioides (CE) foi um dos primeiros modelos para o estudo em estruturas 3D o qual demonstra o potencial dessas células de se auto organizarem e mimetizar a embriogênese *in vitro* (Doetschman et al., 1985). Ainda há discordâncias sobre a relação da capacidade intrínseca que essas estruturas possuem de recapitular padrões espaciais de expressão semelhante ao observado no embrião em desenvolvimento (Sajini et al., 2012). Entretanto, o perfil de expressão gênica nos CE foi demonstrado ter grande similaridade em relação temporal com o desenvolvimento embrionário (Leahy et al., 1999).

Analisando a relação temporal de expressão gênica junto com as alterações morfológicas que ocorrem nos CE, alguns trabalhos traçam um paralelo entre o dia de desenvolvimento *in vivo* com o dia de diferenciação em CE. Alguns autores descrevem, por exemplo, que a formação da endoderme primitiva que ocorre *in vivo* no E4.5 é observada em CE por volta do dia 2 e 3 de diferenciação, enquanto a partir do 5° dia se inicia a expressão de marcadores e alterações morfológicas características da gastrulação que inicia *in vivo* no E6.5 (Brickman e Serup, 2017).

Nossos resultados demonstram que, após o início da diferenciação, a expressão de *Oct4* e *Nanog*, expressos no epiblasto pluripotente, diminuem bruscamente, enquanto que a expressão de marcadores de mesoderme e neuroectoderme, como *BrachyuryT* e *Nestin*, respectivamente, aumentam nos dias 3 e 5 de diferenciação. O mesmo padrão de expressão temporal foi observado para a maioria dos genes marcadores globais de endoderme, porém é importante destacar que marcadores que são observados exclusivamente na endoderme embrionária (definitiva) e mesoderme, como *Cxcr4* (Anderson et al., 2017), são mais expressos no 5° dia de diferenciação. Enquanto genes importantes tanto para a formação e manutenção de endoderme extraembrionária quanto para especificação da endoderme definitiva, como *Pdgfra*, *Foxa2*, *Gata6* e *LamB1*, são expressos também no 3° dia de diferenciação (Figura 11).

Dados do nosso grupo de pesquisa demonstraram que a expressão de COUP-TFII durante a diferenciação de CE se inicia por volta do 3° dia de diferenciação (Rosa, 2013). Esse período de diferenciação em CE é descrito como o momento em que estaria ocorrendo a formação da endoderme primitiva *in vitro* (Brickman & Serup, 2017) e na qual Coup-TFII já foi descrito estar presente durante o desenvolvimento embrionário (Murray & Edgar, 2001). Além disso, no primeiro capítulo desta tese, descrevemos a participação de Coup-TFII como

integrante da rede de regulação gênica que controla a especificação da endoderme extraembrionária.

Interessantemente, quando analisamos a distribuição espacial de células expressando COUP-TFII em CE, nós observamos um padrão de expressão hemisférico desse fator entre o 5° e 7° dias da diferenciação de CE (Rosa, 2013). Em embriões, este período corresponderia ao início do processo de gastrulação (Brickman & Serup, 2017). Aliado a isso, os resultados obtidos nesse trabalho também demonstram uma expressão hemisféricamente localizada de BRACHYURY-T e PAX6, sendo que essas expressões estão parcialmente e completamente co-localizadas com COUP-TFII, respectivamente; enquanto que a expressão de FOXA2 se encontra quase que completamente excludente com Coup-TFII (Figura 9 e 10).

A localização espacial desses marcadores do desenvolvimento em CE já foi relatada anteriormente. Em 2008, Berge e colaboradores mostraram que BRACHYURY-T, FOXA2 e PAX6 apresentaram um padrão de localização espacial em CE muito semelhante ao observado durante o início do desenvolvimento embrionário. Neste trabalho, CE exibiram uma polarização anteroposterior e a formação de uma região semelhante à linha primitiva. Nessa região, as células passam por uma transição epitélio-mesênquima, caracterizada pela expressão de SNAIL e se diferenciam em progenitores de mesoderme, expressando BRACHYURY-T, e de endoderme, expressando FOXA-2, sendo essa polarização dependente da ativação local da sinalização WNT. Adicionalmente, marcadores de neuroectoderme, PAX6 e SOX1, se localizam em polos opostos à localização da via WNT e marcadores de mesoendoderme, comprovando que CE apresentam um nível organizacional consistente com o processo observado *in vivo*, como descrito em Tam e Behringer (1997) e (Yamaguchi (2001).

Uma vez que a observação desse padrão de expressão localizada de BRACHYURY-T, FOXA2 e PAX6 em CE coincide com o que observamos para Coup-TFII, nos perguntamos se esse fator poderia estar influenciando na segregação dos folhetos germinativos, principalmente mesodérmicos e ectodérmicos. Apesar de embriões de camundongo nocaute para *Coup-TFII* não apresentarem problemas durante a gastrulação e morrerem apenas no E10 (Pereira et al., 1999), trabalhos recentes desenvolvidos com CTE humanas mostraram que COUP-TFII e OCT4 participam de um complexo circuito que regula a transição entre a pluripotência e a aquisição de destinos celulares (Rosa e Brivanlou, 2011). Em conjunto, esses dados nos levou a questionar se os danos observados no E10, quando o desenvolvimento cessa nos camundongos *Coup-TFII* nocaute, poderiam ser causados por

alguma desregulação nos níveis de fatores importantes para o início da especificação desses folhetos, decorrente da ausência de *Coup-TFII*.

No 3º dia de diferenciação, nossas análises de diferenciação com células *Coup-TFII* nocaute demonstraram um padrão de aumento na expressão dos marcadores *Sox17*, *Gata6*, *Cxcr4*, *Pdgfra* e *Coup-TFI*, marcadores gerais de endoderme e *BrachyuryT*, marcador de mesoderme (Figura 12). Com exceção de *Cxcr4* e *BrachyuryT*, todos os outros marcadores estão presentes na endoderme extraembrionária, o que corrobora nossa hipótese de que COUP-TFII atua na regulação dos níveis de expressão de importantes fatores presentes na endoderme extraembrionária, regulando-os negativamente.

O aumento que detectamos de *Cxcr4* pode ser justificado pelo fato de COUP-TFII atuar bloqueando a sua expressão nas células da endoderme extraembrionária e na ausência de *Coup-TFII*, *Cxcr4* passa a ser expresso também nessas células, levando a um aumento na sua expressão gênica. Pois, apesar de *Cxcr4* ser observado em algumas células da endoderme visceral (endoderme extraembrionária) no E6.5, não observamos co-localização com *Coup-TFII*. Além disso, em estágios mais tardios (E7.5), esse marcador está expresso especificamente na endoderme definitiva (embrionária), porém *Coup-TFII* não está presente nesse folheto, como demonstrado por dados de *single cell sequencing* (Figura 17).

No que diz respeito à pluripotência, COUP-TFII foi descrito como um repressor da expressão de marcadores de pluripotência, como *Oct4* em CTE humanas (Rosa e Brivanlou, 2011), nesse caso esperaríamos observar um aumento na expressão de *Oct4* na ausência de *Coup-TFII*. Porém, no 3º dia de diferenciação, *Oct4* decaiu, enquanto *Nanog* não se alterou. Provavelmente essa pequena redução na expressão de *Oct4* é decorrente da ação repressiva de SOX17, COUP-TFI, GATA6 e PDGFR $\alpha$  na pluripotência, já descrito anteriormente (Fujikura et al., 2002; Niakan et al., 2010) e que nesse momento estão aumentados devido a ausência de *Coup-TFII*. Portanto, esta ação negativa de COUP-TFII descrita em células humanas pode estar sendo neutralizada em células murinas por sua ação negativa sobre esses repressores de pluripotência. Se esta hipótese estiver correta, COUP-TFII atuaria diretamente reprimindo *Oct4* e indiretamente ativando-o, por sua ação negativa sobre repressores de *Oct4*.

Nossos resultados em conjunto nos levam a concluir que no 3º dia de diferenciação de CTE por meio de CE, COUP-TFII está atuando principalmente em células que adquirem destinos de endoderme extraembrionária. Esses resultados corroboram aos descritos no primeiro capítulo, onde mostramos que COUP-TFI e COUP-TFII atuam em conjunto na especificação da endoderme extraembrionária. Se por um lado COUP-TFII controla os níveis

de expressão dos marcadores desse folheto, COUP-TFI e os outros marcadores de endoderme extraembrionária, GATA6, SOX17, PDGFR $\alpha$ , HNF4 $\alpha$ , os quais aumentaram em decorrência da ausência de *Coup-TFII*, regulam negativamente a expressão de *Oct4*, como ilustrado na Figura 18.

No contexto de especificação de ectoderme, um dos folhetos embrionários, a participação de COUP-TFII na transição entre a pluripotência e a diferenciação para esse folheto já é conhecida. Em CE originados de CTE humanas COUP-TFII está localizado ao redor de estruturas conhecidas como rosetas neurais, caracterizadas pela co-localização com o marcador neural PAX6. O nocaute de *Coup-TFII* nessas células reduz a expressão de *Pax6*, sugerindo que COUP-TFII atua diretamente na ativação de *Pax6* (Rosa e Brivanlou, 2010). Vale notar que, neste trabalho, o nocaute de *Coup-TFII* não afetou a expressão de *Sox1*, marcador neural expresso em estádios mais tardios da diferenciação neural de CTE humanas. Entretanto, durante o desenvolvimento de olho, em camundongos no E11.5, os autores relatam uma relação de regulação negativa tanto de COUP-TFII quanto de COUP-TFI em relação a *Pax6* (Tang et al., 2010).

Para analisar como seria a relação entre Coup-TFII e os marcadores do desenvolvimento no contexto de diferenciação de CTE murinas, verificamos a expressão não só de marcadores de ectoderme, mas também de mesoderme e endoderme no 5º dia de diferenciação em CE originados de células *Coup-TFII* nocautes. Esse dia foi o escolhido pois em relação ao perfil de expressão gênica é descrito como sendo similar ao período de gastrulação que ocorre no embrião (Brickman e Serup, 2017). Além disso, observamos algumas células expressando *Coup-TFII* em dados de sequenciamento no E7.5 nos compartimentos mesodérmicos e neuroectodérmicos (Figura 17).

Nossos resultados mostram um padrão de regulação da neuroectoderme por COUP-TFII semelhante ao observado por Tang et al., (2010), em que tanto *Pax6*, importante para o início da especificação ectodérmica quanto *Nestin*, um marcador mais tardio de neuroectoderme, aumentaram no 5º dia de diferenciação em células nocauteadas para *Coup-TFII*, somando evidências da regulação negativa de neuroectoderme por parte de COUP-TFII, como ilustrado na Figura 18.

Embora o nocaute de *Coup-TFII* não tenha alterado a expressão de *Brachyury-T* na diferenciação de CTE humanas (Rosa e Brivanlou, 2010), o fato de termos demonstrado uma co-expressão parcial de BRACHYURY-T e COUP-TFII no 5º e 6º dia de diferenciação pode

ser um indício de que esses fatores estariam interagindo e influenciando na aquisição de destinos mesodérmicos em CTE de camundongo. Apesar de não termos detectado alteração a nível de expressão gênica em *Brachyury-T* no 5° dia de diferenciação, quando quantificamos a intensidade de fluorescência entre CE selvagem e *Coup-TFII* nocaute, observamos um discreto aumento na expressão de BRACHYURY-T no 5° dia. Esse aumento foi potencializado no 6° dia de diferenciação, em que confirmamos um aumento de células BRACHYURY-T positivas por citometria de fluxo, demonstrando que COUP-TFII possivelmente está atuando como um regulador negativo durante a especificação mesodérmica.

Por outro lado, o fato de termos demonstrado no primeiro capítulo desta tese que Coup-TFII está atuando nas células da endoderme extraembrionária nos fez inferir que as alterações que observamos na expressão de Pax6 e BrachyuryT com o nocaute de *Coup-TFII* durante a diferenciação de CTE, seria porque Coup-TFII pode estar impedindo a ativação desses dois genes nas células da endoderme extraembrionária. Portanto, na ausência de Coup-TFII, o aumento que observamos a nível de expressão gênica de *Pax6* e *BrachyuryT* pode estar relacionado ao fato desses dois marcadores passarem a ser expressos por células da endoderme extraembrionária e não que Coup-TFII estaria regulando negativamente a formação de ectoderme e mesoderme.

Em relação a especificação de endoderme embrionária, apesar de detectarmos algumas poucas células co-expressando COUP-TFII e FOXA2 no 5° dia de diferenciação e o nocaute de *Coup-TFII* induzir um aumento na expressão de Foxa2 tanto a nível de regulação gênica, como de proteína, nós concluimos que esse aumento é decorrente da ação negativa de COUP-TFII em células da endoderme extraembrionária. Pois, apesar de *Foxa2* estar expresso tanto em células da endoderme embrionária (definitiva), quanto em células da endoderme extraembrionária, *Coup-TFII* somente está presente nas extraembrionárias (Figura 17, dados de *single cell sequencing*).

De modo semelhante ao observado com o silenciamento de *Coup-TFII* em embriões, a diferenciação de CTE na ausência desse fator acarreta no decréscimo de *Laminina B1* em dias iniciais da diferenciação, dia 3, porém em estágios mais avançados, dia 5, a expressão de *Laminina B1* tendem a aumentar na ausência de *Coup-TFII*.

Esses resultados observados no 3° dia de diferenciação confirmam que COUP-TFII atua na regulação da ativação da expressão de *Laminina*, como mostrado por Murray e Edgar (2001), onde a superexpressão tanto de Coup-TFI quanto de Coup-TFII levaram a um aumento

dessas *Lamininas*. A diferença na expressão de *Laminina B1* que observamos entre os dias 3 e 5 pode ser justificada pelo fato de vários outros genes atuarem em conjunto na regulação de sua expressão (Futaki et al., 2004; Niakan et al., 2010). Se por um lado, a queda de *Coup-TFII* causou seu decréscimo no dia 3, o aumento de *Coup-TFI*, *Sox17*, *Gata6*, *Pdgfra* nesse mesmo dia podem justificar o aumento na expressão de *Laminina B1* que observamos no 5º dia de diferenciação, uma vez que a superexpressão desses fatores já foram demonstrada por aumentar a expressão de *Laminina B1* (Murray e Edgar 2001; Fujikura et al., 2002; Niakan et al., 2010). A representação da possível regulação da laminina no contexto de diferenciação de CTE está ilustrada na Figura 18.

Nossos dados *in vitro* obtidos por meio da diferenciação de CE adicionam um novo participante na rede de regulação gênica que controla a especificação da endoderme extraembrionária, corroborando os resultados já mostrados no primeiro Capítulo. *Coup-TFII* interage com *Gata6*, *Sox17*, *Pdgfra*, *Hnf4α*, *Lamininas* e *Coup-TFI* para manter os corretos níveis de expressão dos mesmos, assegurando a correta especificação e manutenção da endoderme extraembrionária. Possivelmente a ausência de fenótipo *in vivo* relacionada a endoderme extraembrionária na ausência de *Coup-TFII* pode ser justificada pelo fato desse ambiente ser regulado por diversos fatores que apresentam redundância de função entre si (Kuo et al., 1997; Futaki et al., 2004; Shimoda et al., 2007). Além disso, demonstramos que *COUP-TFII* também atua no controle da especificação de neuroectoderme e mesoderme, tecidos especificados durante a gastrulação, atuando como regulador negativo.

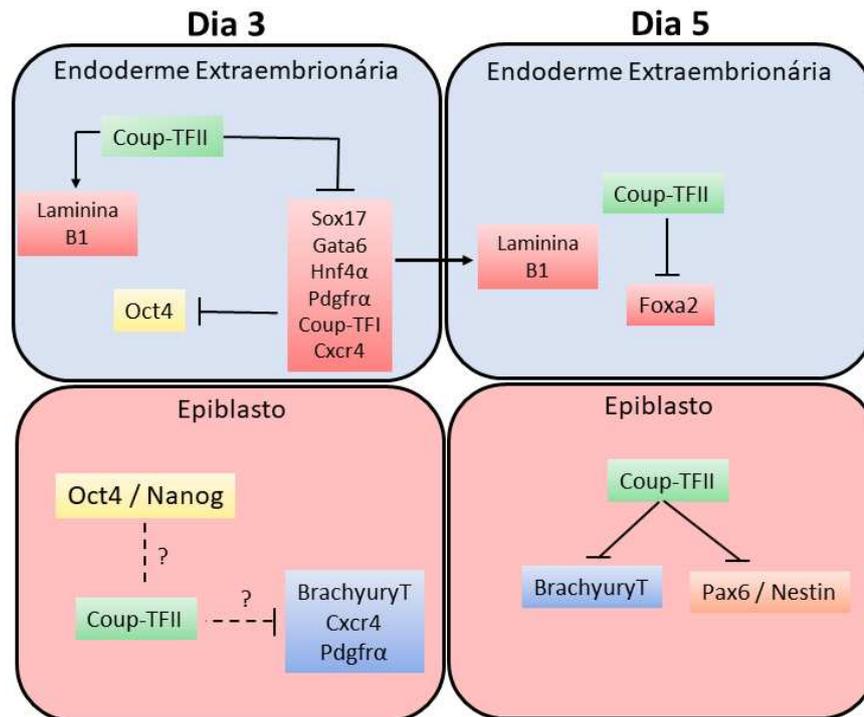
É importante destacar que apesar de estarmos discutindo a formação de endoderme extraembrionária, a diferenciação de CTE sem nenhuma indução não é o modelo mais indicado para se estudar a diferenciação para tecidos extraembrionários. As CTE são definidas como pluripotentes, ou seja, possuem a capacidade de originar as linhagens embrionárias, mas não as extraembrionárias. Apesar de alguns trabalhos demonstrarem a formação de uma estrutura semelhante a endoderme primitiva em CE ou mesmo a expressão de marcadores de endoderme extraembrionária durante a diferenciação de CTE (Abe et al., 1996; Shimoda et al., 2007; Brickman & Serup, 2017), quando reintroduzidas em blastocistos, essas células raramente contribuem para tecidos extraembrionários (Canham et al., 2010). O que podemos demonstrar com nossos resultados, uma vez que detectamos baixa expressão de *Hnf4α*, um marcador específico de endoderme extraembrionária (Anderson et al., 2017). Porém como nós observamos um aumento na expressão de *Foxa2* com o nocaute de *Coup-TFII*, decidimos aprofundar nossas análises com dados de *single cell sequencing*. Adicionalmente, adicionamos

novos genes específicos de endoderme extraembrionária e embrionária nas nossas análises, para verificar se a alteração que estávamos detectando era realmente em células da endoderme embrionária.

Outro ponto que é importante destacar é a relação de expressão gênica entre CE e embrião. Notamos que a expressão gênica de *Brachyury-T* se inicia no 3º dia de diferenciação em CE, enquanto *in vivo* esse gene é inicialmente detectado no E6.5. Como citado anteriormente, alguns trabalhos consideram que até o 3º dia de diferenciação de CTE seria correspondente ao que ocorre *in vivo* no período pré-implantação. Já entre o 5º e 7º dia de diferenciação de CTE, acessaríamos os marcadores expressos entre os estágios E6.5 – E8.0 *in vivo*, ou seja, durante a gastrulação (Leahy et al., 1999; Berge et al., 2008; Brickman & Serup, 2017). Essa diferença na expressão temporal que observamos na expressão de *Brachyury-T* pode ser uma diferença entre o modelo de embrião *in vivo* e de CE, podendo ou não refletir na função do gene.

Porém, caso esteja ocorrendo uma especificação mesodérmica prematura, podemos sugerir que a expressão que observamos de *Pdgfra* e *Cxcr4* no 3º dia e que assim como *Brachyury-T* sofreram um aumento com a ausência de *Coup-TFII* também pode ser em decorrência da regulação negativa demonstrada por COUP-TFII sobre a mesoderme. Pois, ambos esses fatores já foram demonstrados por caracterizar populações específicas de mesoderme (Nelson et al., 2008; Sakurai et al., 2012).

Apesar de termos demonstrado a participação de Coup-TFII na rede de regulação que controla tanto a formação de endoderme extraembrionária, quanto a segregação de mesoderme e ectoderme, o modelo de CE é composto por diferentes tipos celulares que transitam por diferentes estados ao longo do tempo. Portanto, para determinarmos a natureza de cada regulação descrita neste trabalho seria necessário realizar estas análises em nível de células únicas ao longo do tempo, além de induzir diferenciações específicas para cada um dos folhetos embrionários e extraembrionários analisados neste trabalho, na ausência de Coup-TFII.



**Figura 18: Esquema ilustrativo demonstrando as redes de regulação gênica que ocorrem nos dias 3 e 5 de diferenciação de células-tronco embrionária.** No 3º dia de diferenciação, nas células pertencentes a endoderme extraembrionária COUP-TFII estaria atuando na ativação de *Laminina B1*, enquanto atua reprimindo a expressão de marcadores de endoderme extraembrionária *Sox17*, *Gata6*, *Pdgfra*, *Hnf4α*, *Cxcr4* e *Coup-TFI*, e esses, por sua vez inibem a expressão de *Oct4*. Ao passo que no epiblasto, COUP-TFII poderia estar atuando na repressão de *BrachyuryT*, *Cxcr4* e *Pdgfra*. No 5º dia de diferenciação, nas células pertencentes a endoderme extraembrionária COUP-TFII atua regulando negativamente a expressão de *Foxa2*, enquanto no epiblasto COUP-TFII também atua na regulação negativa de *BrachyuryT*, *Pax6* e *Nestin*. Linhas pontilhadas indicam possíveis relações. Quadrados vermelhos definem marcadores globais de endoderme; azul, marcadores de mesoderme e verde, de ectoderme.

## 2.5 Conclusões referente ao Capítulo 2

1) Através de ensaios de imunofluorescência dupla e ensaios de nocaute gênico, demonstramos que a total co-localização observada de COUP-TFII com PAX6 e parcial com BRACHYURY-T está relacionada a um mecanismo de regulação negativa por parte de COUP-TFII tanto durante a especificação de neuroectoderme, quanto de mesoderme.

2) Além disso, nossos resultados sugerem que, apesar de durante a diferenciação de CTE por meio de CE algumas células co-expressarem COUP-TFII e FOXA2 e o nocaute de *Coup-TFII* resultar em um aumento na expressão de marcadores descritos como endodérmicos, essas alterações possivelmente são relacionadas a função de COUP-TFII na endoderme extraembrionária e não na endoderme embrionária (definitiva).

3) Por fim, os resultados demonstrados em relação a expressão de *laminina B1* na ausência de *Coup-TFII* no início da diferenciação de células-tronco embrionárias somam indícios de que COUP-TFII atua positivamente na expressão desse fator, importante durante o início do desenvolvimento embrionário.

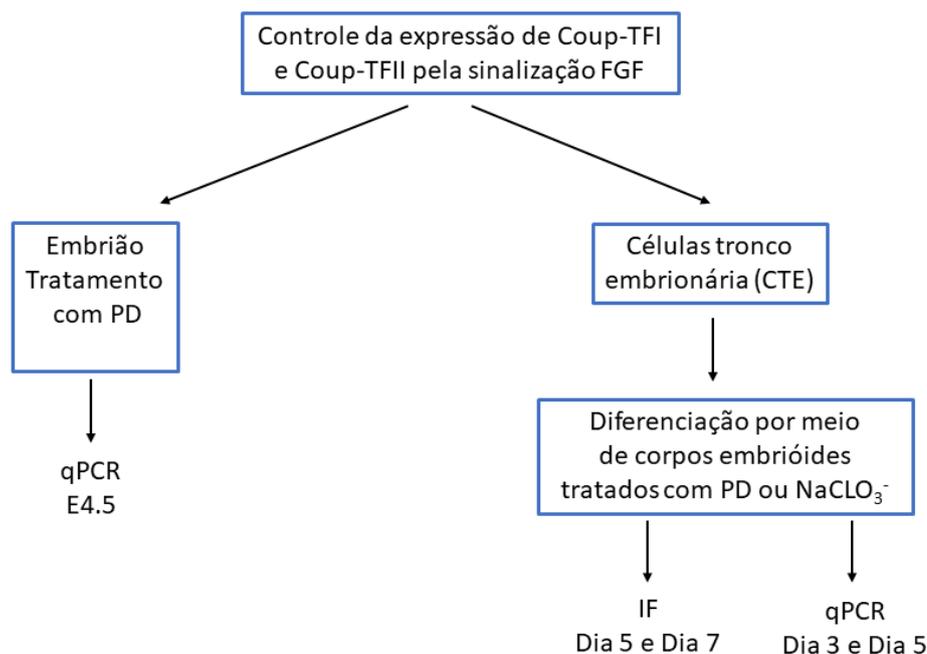
## ***CAPÍTULO 3***

### **Coup-TFI e Coup-TFII são regulados pela sinalização FGF.**

Nesse capítulo buscamos avaliar se Coup-TFI e Coup-TFII estariam sendo regulados pela sinalização FGF, importante nos dois momentos do desenvolvimento que estamos focando nesse trabalho: formação da endoderme primitiva e gastrulação (Morris et al., 2013 e Ciruna e Rossant, 2001, respectivamente). Para inibir a via de sinalização FGF utilizamos dois inibidores já descritos na literatura: PD0325901, o qual é um inibidor de Mek/Erk (Hamiton e Brickman, 2014) e o  $\text{NaClO}_3^-$ , também descrito por desestabilizar a sinalização FGF (Lanner et al., 2010, Oki et al., 2010).

### **3.1 Objetivos Específicos:**

- Análise da possível regulação Coup-TFI e Coup-TFII pela sinalização FGF *in vivo* durante a formação da endoderme primitiva através de qPCR.
- Análise da possível regulação Coup-TFI e Coup-TFII pela sinalização FGF durante a diferenciação de células tronco-embrionárias por meio de corpos embriões tratados com PD ou  $\text{NaClO}_3^-$  através de qPCR e imunofluorescência.



Esquema ilustrativo dos objetivos, modelos de estudos e métodos utilizados. A descrição detalhada dos métodos se encontra no item 3.2.

## 3.2 Materiais e métodos

### 3.2.1 Cultivo das CTE E14TG2a

A linhagem de células E14TG2a são mantidas indiferenciadas em cultivo com meio Glasgow Modified Eagle's Medium (GMEM) (Sigma, USA), com 1000 U/mL de fator inibidor de leucemia (LIF) (ESGRO-LIF; ChemiconMillipore), 1µm de PD0325901, 3µm de CHIR99021, 0.1 mM de β-mercaptoetanol, 1% v/v de aminoácidos não essenciais (MEM NEAA), 50 U/mL de penicilina, 50 µg/mL de streptomicina, 2 de mM L-glutamina, e 15% v/v de soro fetal bovino (FBS), em incubadora de CO<sub>2</sub> 5%, à 37 °C. As subculturas das CTE são feitas a cada dois dias, quando as células em cultura apresentam-se com 80 a 90% de confluência. As garrafas de cultura utilizadas para o cultivo das CTE são previamente tratadas com 0,1% m/v de gelatina.

### 3.2.2 Diferenciação das CTE E14TG2a - Método Hanging Drop

A indução da diferenciação das CTE e formação dos CE é realizada através do método *Hanging Drop* (gotas suspensas). As células são retiradas do GMEM com LIF e ressuspendidas em DMEM (Dulbeco's Modified Eagle Medium) suplementado com 0,1mM de β-mercaptoetanol, 1% v/v de aminoácidos não essenciais (MEM NEAA GIBCO), 50 U/mL de penicilina, 50 µg/mL de streptomicina (GIBCO), 2 mM L-glutamina (GIBCO), 20% v/v de soro fetal bovino (FBS - GIBCO), sem adição de LIF. Para os CE gerados com NaClO<sub>3</sub><sup>-</sup> utilizamos a concentração de 20mM e no tratamento com PD, a concentração foi de 1µM. Ambos foram adicionados no meio desde o primeiro dia de diferenciação.

### 3.2.3 Imunofluorescência

O protocolo e os anticorpos utilizados estão descritos no Capítulo 2, ítem 2.2.3.

### 3.2.4 Análises de imagens

Todas as análises de quantificação de imunofluorescência e reconstrução em 3D foram realizadas utilizando ImageJ (Fiji).

Para a quantificação de fluorescência de COUP-TFI, COUP-TFII, BRACHYURYT e FOXA2 selecionamos um plano central, utilizamos o canal com Dapi para delimitar núcleo, aplicamos essa delimitação nos canais de interesse e medimos a intensidade da fluorescência, utilizando a função *mean gray value*.

### **3.2.5 Tratamento de embriões com PD**

Os experimentos com embriões foram realizados no laboratório da Prof. Magdalena Zernicka-Goetz na Universidade de Cambridge e os experimentos foram regulamentados pela emenda da lei de animais, Art 1986 de Procedimentos Científicos de 2012 após revisão ética pelo Comitê de Ética e Bem Estar Animal da Universidade de Cambridge (AWERB).

Os embriões foram coletados no estágio de 8 células (E2.5) em meio M2 e separados aleatoriamente entre os grupos controle e que iriam ser mantidos em PD0325901 na concentração de 1 $\mu$ M. Os embriões foram então mantidos em gotas em placas de petri com meio KSOM (MR-020P-5F, Millipore) e cobertas com óleo mineral para cultivo de embriões em incubadora a 37°C até o estágio E4.5, onde realizamos as análises de qPCR.

### **3.2.6 Extração de RNA e síntese de cDNA**

Para as análises com embrião, foi utilizado o kit Arcturus PicoPure RNA isolation Kit (Qiagen, Cat n° 12204-01).

Para as análises com corpos embrióides o protocolo de extração de DNA e síntese de cDNA estão descritos no Capítulo 2, ítem 1.2.6.

A síntese de cDNA foi realizada a partir de 1 $\mu$ g de RNA com o kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems).

### **3.2.7 Real Time PCR**

O protocolo e as sequências de primers utilizados está descrito no Capítulo 2, ítem 2.2.6.

### 3.2.8 Análises estatísticas

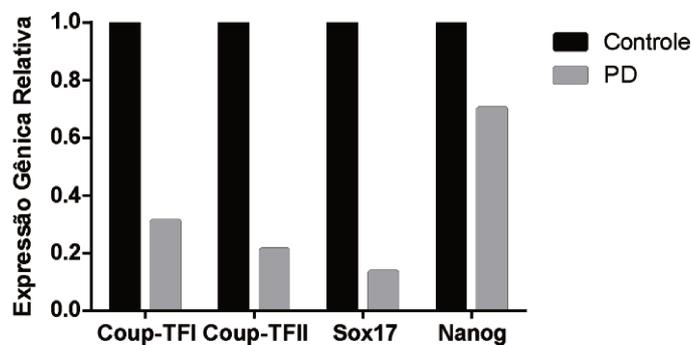
As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa GraphPad Prism. Os dados foram analisados utilizando Student's test, para dois grupos, ou ANOVA test para múltiplos grupos, com múltiplas comparações e pós teste de Tukey. A significância estatística foi definida como  $P < 0,05$ . Os dados estão apresentados como média  $\pm$  erro-padrão da média (SEM $\pm$ ).

### 3.3 Resultados

Buscamos avaliar se no contexto de formação da endoderme primitiva em embriões e se durante a diferenciação de CE nos três folhetos germinativos (endoderme, mesoderme e ectoderme) o bloqueio da sinalização FGF poderia alterar a expressão de Coup-TFI e Coup-TFII.

Para testar essa hipótese, coletamos embriões no estágio de 8 células (E2.5) e cultivamos até o estágio E4.5 na presença do inibidor Mek/Erk - PD0325901 (PD), descrito como um bloqueador da sinalização FGF na concentração de 1 $\mu$ M (Hamiton e Brickman, 2014).

Como esperado, o tratamento com PD resultou em uma diminuição da expressão de *Sox17*, específico de endoderme primitiva nesse estágio (Yamanaka et al., 2010). A expressão de *Nanog* apresentou uma pequena diminuição e a expressão de *Coup-TFI* e *Coup-TFII* decaiu em torno de 70 e 80%, respectivamente (Figura 19).



**Figura 19:** Expressão gênica relativa de Coup-TFI, Coup-TFII, Sox17 e Nanog em embriões E4.5 do grupo controle e tratados com PD. N= 1.

Para testar se a via de sinalização FGF poderia influenciar na expressão de Coup-TFI e Coup-TFII durante a diferenciação de CTE, geramos CEs com meio acrescido de PD 1 $\mu$ M ou NaClO<sub>3</sub><sup>-</sup> (20mM), também descrito por modular a sinalização FGF (Lanner et al., 2010, Oki et al., 2010). Utilizamos essa concentração de NaClO<sub>3</sub><sup>-</sup> com base em dados da literatura (Lanner et al., 2010). Além disso, observamos que as concentrações de 20 e 30 mM de NaClO<sub>3</sub><sup>-</sup> demonstraram resultados semelhantes em relação a expressão de genes que são controlados por FGF, além de CE cultivados com NaClO<sub>3</sub><sup>-</sup> 30mM apresentarem mais morte celular em estágios iniciais da diferenciação, comparado com CE gerados com 20mM (dados não mostrados).

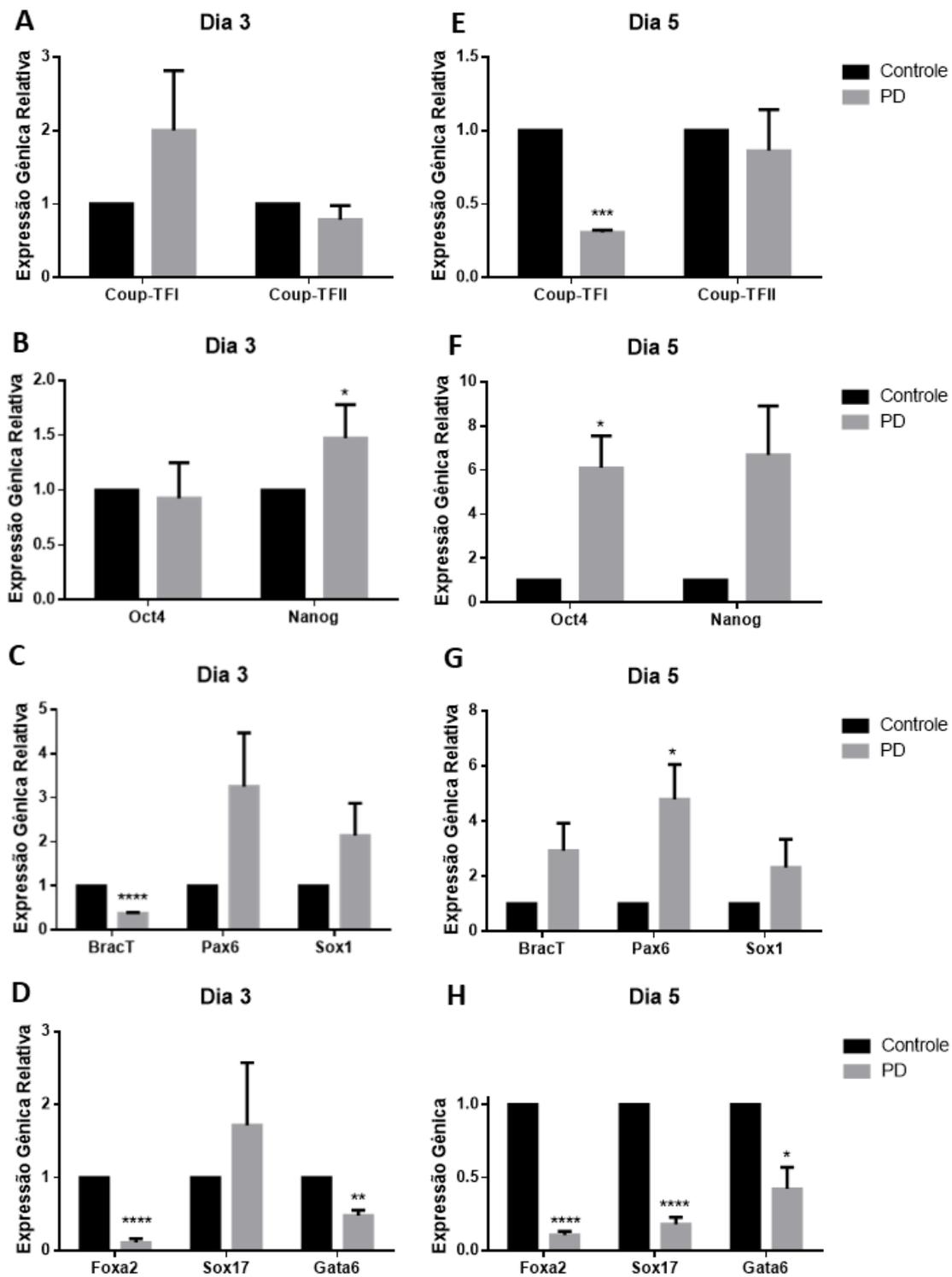
Analisamos então o nível de expressão gênica de *Coup-TFI* e *Coup-TFII*, além de marcadores já descritos por serem influenciados por essa sinalização durante o desenvolvimento: *Oct4* e *Nanog*, marcadores de pluripotência; *BrachyuryT*, mesoderme; *Pax6* e *Sox1*, expresso na ectoderme e *Foxa2*, *Sox17* e *Gata6*, marcadores de endoderme em CE tratados com PD (Figura 20) e com NaClO<sub>3</sub><sup>-</sup> (Figura 21).

A expressão de *Coup-TFI* teve um aumento no 3° dia de diferenciação e no 5° dia apresentou uma queda, no tratamento com PD (Figura 20A e E). Por outro lado, a expressão de *Coup-TFII* apresentou uma pequena diminuição em ambos os dias, porém não é significativo (Figura 20A e E).

Em relação aos genes de pluripotência, o tratamento com PD não afetou a expressão de *Oct4* no 3° dia, porém aumentou a expressão de *Nanog* no 3° dia e de ambos os genes no 5° dia de diferenciação (Figura 20B e F).

A expressão de *BrachyuryT* apresentou uma queda no 3° dia de diferenciação (Figura 20C), comparada com o grupo controle, mas um aumento desta expressão no 5° dia de diferenciação (Figura 20G). *Pax6* e *Sox1* aumentaram em ambos os dias analisados, com o tratamento com PD (Figura 20C e G).

No que diz respeito aos marcadores de endoderme, *Gata6* e *Foxa2*, o efeito do tratamento com PD foi negativo em ambos os dias analisados, enquanto que a expressão de *Sox17* não foi alterada no 3° dia e sofreu uma redução no 5° dia de diferenciação (Figura 20 D e H).



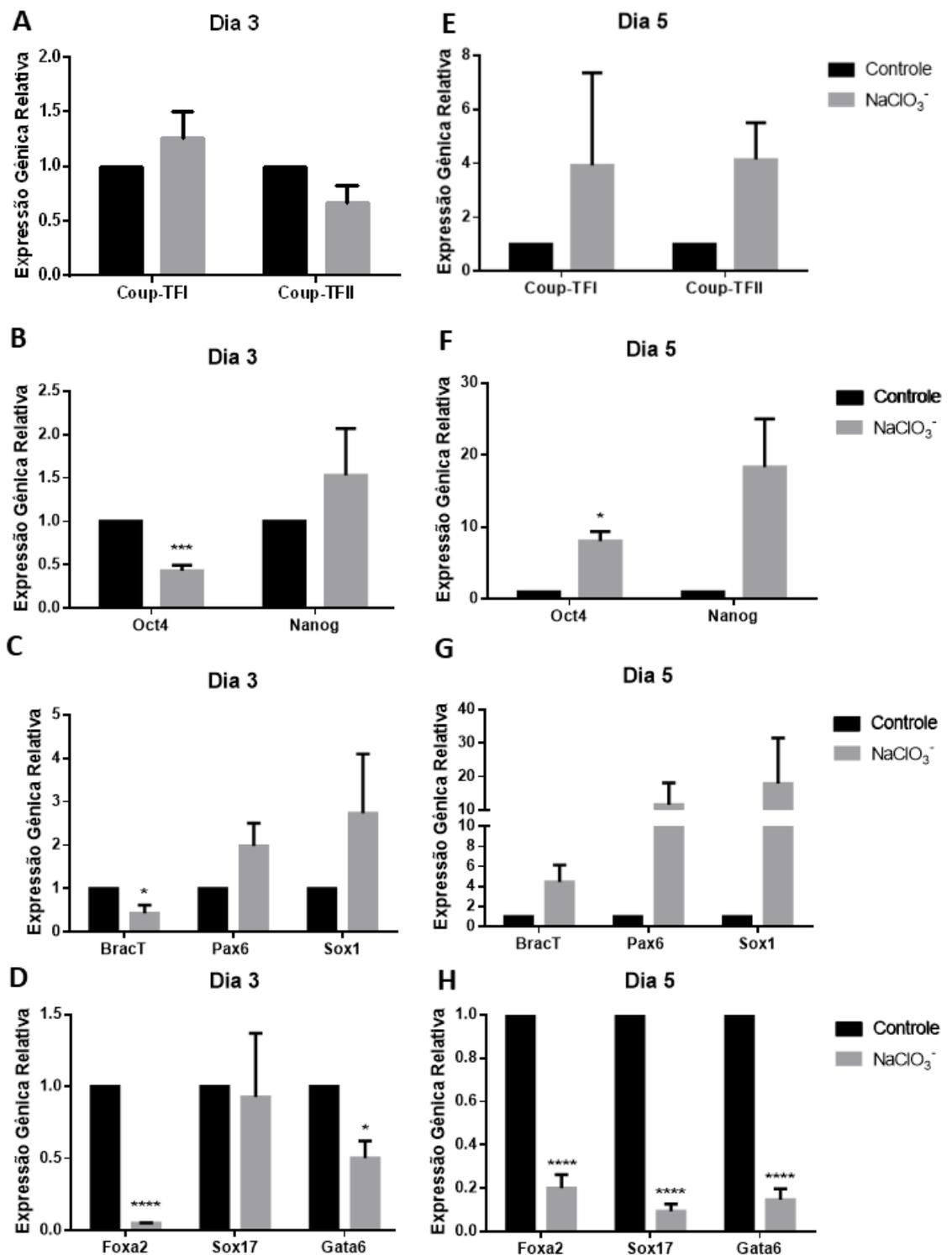
**Figura 20: Análise da expressão gênica relativa de corpos embriões com 3 e 5 dias de diferenciação nos grupos Controle e tratados com PD.** A e E: expressão de *Coup-TFI* e *Coup-TFII* nos dias 3 e 5 de diferenciação. C e G: expressão de *Brachyury-T*, *Pax6* e *Sox1* nos dias 3 e 5 de diferenciação. D e H: expressão de *Foxa2*, *Sox17* e *Gata6* nos dias 3 e 5 de diferenciação. N=3 experimentos independentes. Significância  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*),  $p < 0,001$  (\*\*\*),  $p < 0,0001$  (\*\*\*\*). Test T. Média  $\pm$  SEM.

Os resultados observados em CEs gerados com  $\text{NaClO}_3^-$  (Figura 21) foram semelhantes ao observado com PD. *Coup-TFI* apresentou um aumento em ambos os dias analisados (Figura 21A e E), ao passo que *Coup-TFII* teve uma queda no 3º dia de diferenciação, e no 5º dia, apresentou um aumento (Figura 21A e E). Porém essas alterações não foram significativas.

O tratamento com  $\text{NaClO}_3^-$  reduziu a expressão de *Oct4* e aumentou a expressão de *Nanog* no 3º dia, enquanto no 5º dia de diferenciação, tanto *Oct4* quanto apresentaram um aumento (Figura 21B e F).

A expressão de *BrachyuryT* demonstrou o mesmo padrão observado em CEs gerados com PD: apresentou uma redução da expressão no 3º dia (Figura 21C) mas um aumento no 5º dia de diferenciação (Figura 21G). Assim como no tratamento com PD, CEs gerados com  $\text{NaClO}_3^-$  também resulta na ativação da expressão de *Pax6* e *Sox1* em ambos dias analisados (Figura 21C e G), porém em níveis mais elevados.

Os marcadores endodérmicos, *Gata6* e *Foxa2*, assim como demonstrado para o tratamento com PD, diminuíram em ambos os dias analisados (Figura 21D e H), enquanto que a expressão de *Sox17* não foi alterada no 3º dia e sofreu uma redução no 5º dia de diferenciação (Figura 21D e H).



**Figura 21: Análise da expressão gênica relativa de corpos embriões com 3 e 5 dias de diferenciação nos grupos Controle e tratados com NaClO<sub>3</sub><sup>-</sup>.** A e E: expressão de *Coup-TFI* e *Coup-TFII* nos dias 3 e 5 de diferenciação. C e G: expressão de *Brachyury-T*, *Pax6* e *Sox1* nos dias 3 e 5 de diferenciação. D e H: expressão de *Foxa2*, *Sox17* e *Gata6* nos dias 3 e 5 de diferenciação. N=3 experimentos independentes. Significância p < 0,05 (\*), p<0,01 (\*\*), p< 0,001 (\*\*\*), p< 0,0001 (\*\*\*\*). Test T. Média ± SEM.

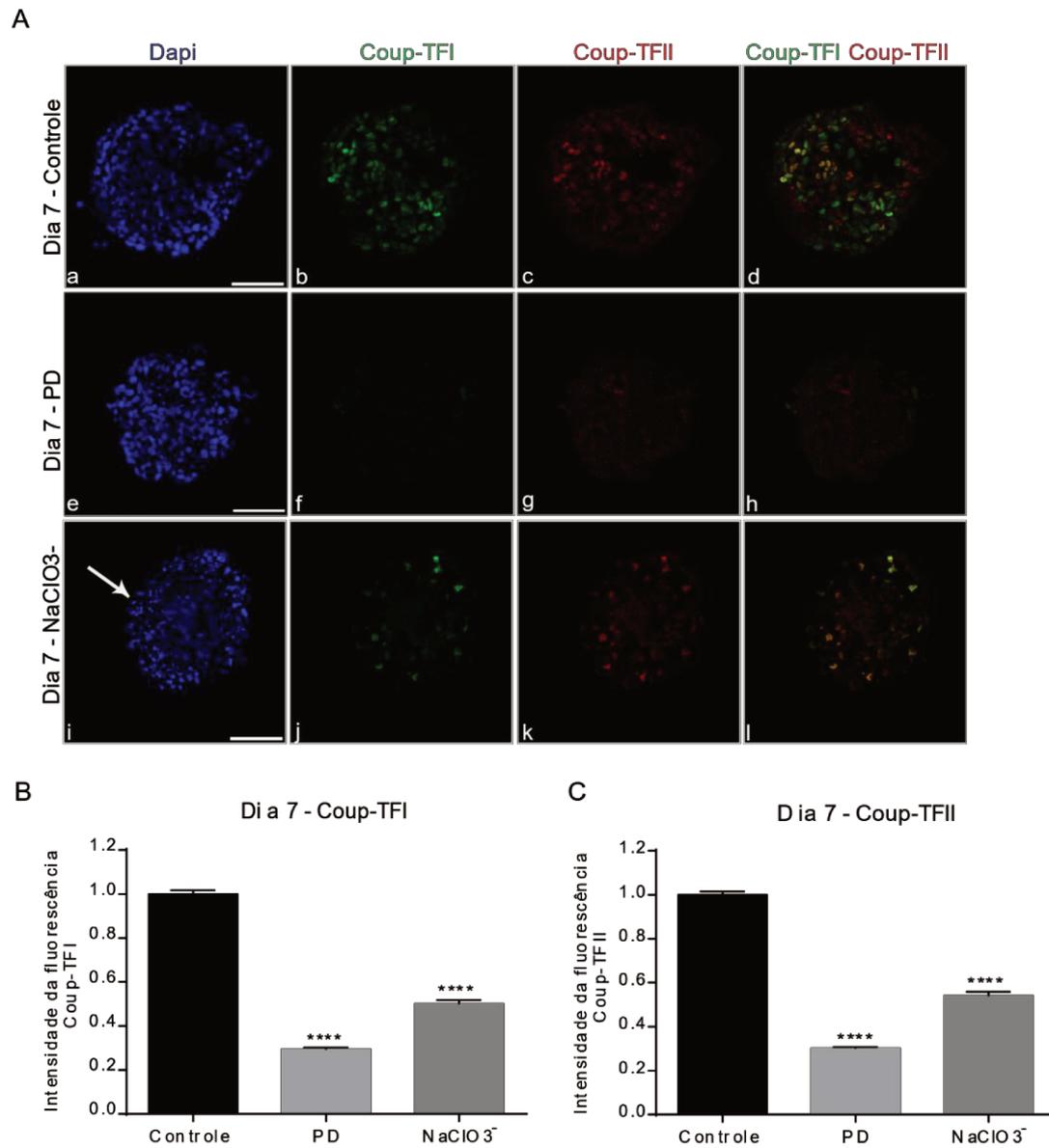
Analisamos também se houve alguma alteração a nível de proteína na expressão de COUP-TFI e COUP-TFII e de BRACHYURY-T e FOXA2 através de imunofluorescência. Para essa análise selecionamos o dia 7 de diferenciação de CE para analisar a expressão de COUP-TFI e COUP-TFII por ser um dia onde a expressão de ambos se encontra completamente nuclear, facilitando assim as análises de quantificação da intensidade de fluorescência (Figura 22) e o 5º dia para analisar a expressão de BRACHYURY-T e FOXA2 (Figura 23).

A Figura 22 evidencia CE com 7 dias do grupo controle (a – d), tratados com PD (e – h) e tratados com  $\text{NaClO}_3^-$  (i – l). A redução do conteúdo protéico de COUP-TFI e COUP-TFII é evidente, principalmente no grupo tratado com PD (Figura 22A f e g) quando comparamos com o controle (Figura 22A b e c). Essa redução também foi observada no grupo com  $\text{NaClO}_3^-$  (Figura 22A j e k), porém nesse grupo os CE apresentaram uma alta taxa de morte celular, como pode ser observado pelos fragmentos de núcleo (Figura 22A i, seta), o que não observamos nos CE tratados com PD e controle (Figura 22A e e a).

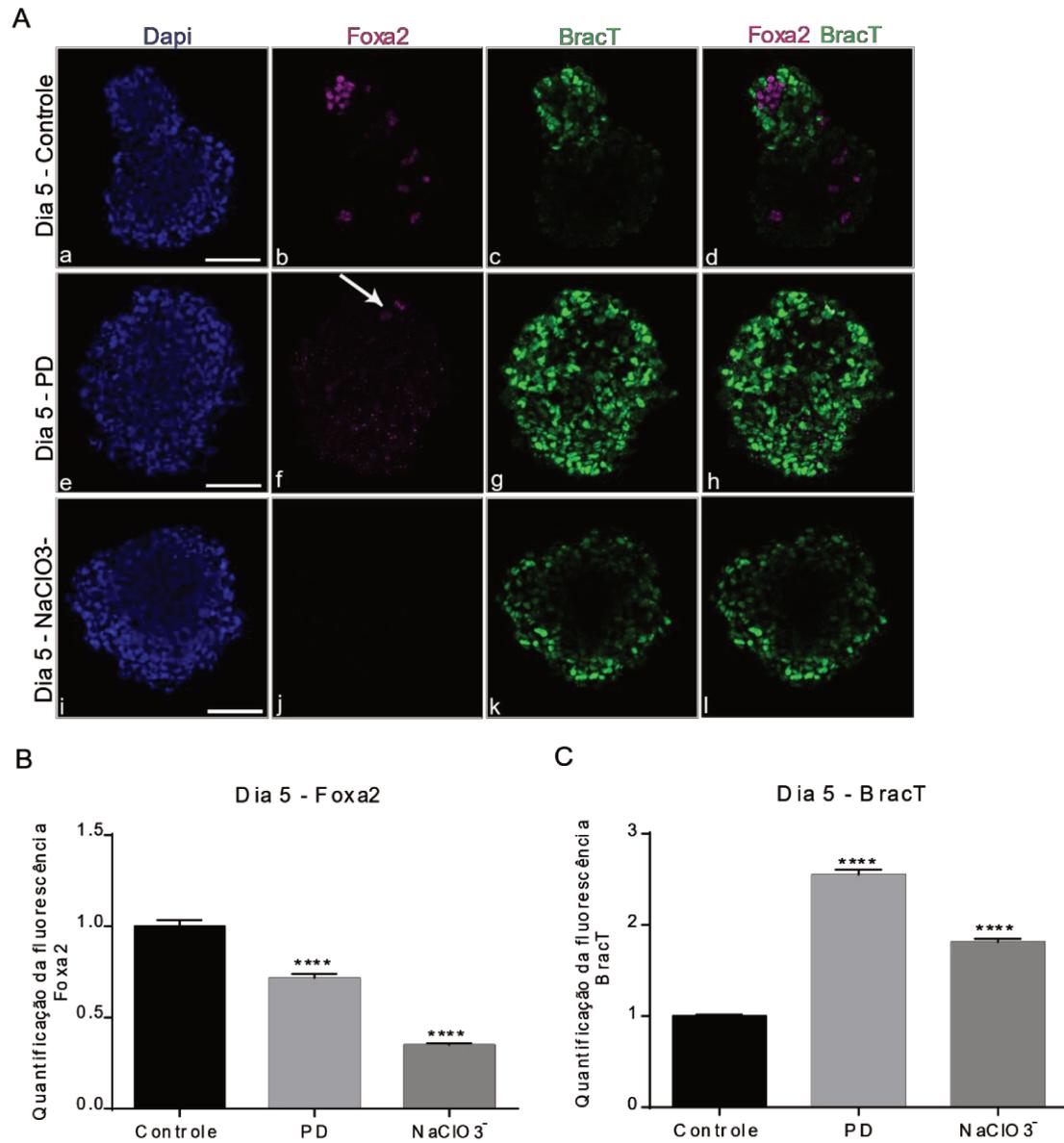
Os gráficos da Figura 22B e C representam a quantificação da intensidade de fluorescência de COUP-TFI e COUP-TFII nos dois tratamentos em relação ao grupo controle, onde fica claro uma redução maior na expressão de ambos COUP-TFs em CE tratados com PD do que com  $\text{NaClO}_3^-$ .

Assim como observado por qPCR em tempo real, observamos uma redução da marcação para FOXA2 no 5º dia de diferenciação em ambos tratamentos (Figura 23A f e j) em relação ao grupo controle (Figura 23A b). Porém, em CE tratados com PD observamos algumas poucas células expressando FOXA2, ao contrário de CE tratados com  $\text{NaClO}_3^-$  (Figura 23A f, seta). Em relação a BRACHYURY-T, observamos um efeito contrário, sendo aumentada tanto em CE tratados com  $\text{NaClO}_3^-$  quanto com PD (Figura 23A h e l) em relação ao controle (Figura 23A c). Não detectamos um grande aumento de morte celular no grupo com  $\text{NaClO}_3^-$ , como observamos no 7º dia (Figura 22A i).

Quantificação da intensidade de fluorescência de FOXA2 e BRACHYURY-T nos dois tratamentos em relação ao grupo controle demonstram uma redução da marcação de FOXA2 e aumento de BRACHYURY-T em CE tratados com PD e  $\text{NaClO}_3^-$  (Figura 23 B e C).



**Figura 22: Imunofluorescência representativa de CE com 7 dias de diferenciação identificando a expressão de COUP-TFI e COUP-TFII.** A: CE do grupo controle (a – d), grupo tratado com PD (e – h) e grupo tratado com NaClO<sub>3</sub><sup>-</sup> (i – l). Barras: 50µm. B e C: Quantificação da intensidade de fluorescência de COUP-TFI e COUP-TFII nos grupos controle e tratados com PD e NaClO<sub>3</sub><sup>-</sup>, respectivamente. N=2 experimentos independentes. Significância p< 0,0001 (\*\*\*\*). ANOVA. Média ± SEM.



**Figura 23: Imunofluorescência representativa de CE com 5 dias de diferenciação identificando a expressão de FOXA2 e BRACHYURYT.** A: CE do grupo controle (a – d), grupo tratado com PD (e – h) e grupo tratado com NaClO<sub>3</sub><sup>-</sup> (i – l). Barras: 50µm. B e C: Quantificação da intensidade de fluorescência de FOXA2 e BRACHYURYT nos grupos controle e tratados com PD e NaClO<sub>3</sub><sup>-</sup>, respectivamente. N=2 experimentos independentes. Significância  $p < 0,0001$  (\*\*\*\*). ANOVA. Média  $\pm$  SEM.

### 3.4 Discussão

No início do desenvolvimento embrionário a sinalização FGF é responsável por coordenar a segregação de células da massa celular interna em epiblasto e endoderme primitiva (Morris et al., 2013; Yamanaka et al., 2010). Além disso, também é importante na aquisição de destinos celulares do embrião durante a gastrulação (Ciruna & Rossant, 2001; Tam & Loebel, 2007).

A ausência da sinalização FGF durante a segregação das células da massa celular interna em epiblasto e endoderme primitiva, demonstra que apesar de ocorrer a ativação inicial de GATA6, SOX17 e PDGFR $\alpha$  nas células da massa celular interna no E3.5, essa expressão não é mantida, bloqueando assim a formação da endoderme primitiva (Yamanaka et al., 2010; Krawchuk et al., 2013; Molotkov et al., 2017).

Já durante a gastrulação embriões nocaute para *Fgf8* e receptor de *Fgf1* apresentam sérios problemas em decorrência da não ativação de SNAIL, responsável por reprimir E-CADERINA, uma proteína de junção intercelular. A repressão de E-CADERINA permite que as células passem por uma transição epitélio-mesênquima, migrem através da linha primitiva e originem mesoderme e endoderme (Tam e Loebel, 2007). Como na ausência de FGF8, não há expressão de SNAIL e não ocorre a repressão de E-caderina, a migração das células que originam esses dois folhetos é comprometida, resultando em uma desorganização dos domínios de expressão de marcadores como BrachyuryT (Yamaguchi et al., 1994; Sun et al., 1999; Oki et al., 2010).

A inibição de MEK/ERK através da utilização de PD0325901 tem sido utilizada para demonstrar a ação da sinalização FGF durante a migração das células da massa celular interna para formar a endoderme primitiva e também durante o início da gastrulação (Yamanaka et al., 2010; Oki et al., 2010). Além do PD0325901, o clorato de sódio (NaClO $_3^-$ ), também é descrito por modular a sinalização FGF durante o desenvolvimento *in vivo* e durante a diferenciação de CTE (Oki et al., 2010; Lanner et al., 2010). O NaClO $_3^-$  atua na redução da sulfatação de proteoglicanos, o que pode bloquear a sinalização FGF de duas formas. Uma delas é impedindo a ligação do ligante FGF com o seu respectivo receptor. A outra forma é não mantendo a estabilidade do complexo ligante-receptor, impedindo assim a ativação da sinalização FGF (Ornitz & Itoh, 2015; Brewer et al., 2016).

Nossos resultados obtidos com a utilização tanto de PD0325901 quanto do  $\text{NaClO}_3^-$  demonstrou um padrão de expressão gênica de fatores que estão sendo direta ou indiretamente controlados pela sinalização FGF, muito similar com o já descrito anteriormente, tanto por meio de nocaute gênico, quanto com a utilização de bloqueadores dessa via (Sun et al., 1999; Lanner et al., 2010; Oki et al., 2010; Yamanaka et al., 2010; Krawchuk et al., 2013; Molotkov et al., 2017).

Os marcadores *Foxa2*, *Sox17* e *Gata6* expressos tanto na endoderme extraembrionária como embrionária (definitiva) tiveram uma queda em suas expressões, sendo que a redução desses 3 fatores foi maior em estágios mais tardios da diferenciação, principalmente para *Sox17*. Esses dados confirmam que a sinalização FGF é essencial para a manutenção da expressão desses marcadores, assim como já descrito anteriormente (Yamanaka et al., 2010; Kang et al., 2012).

Apesar de observarmos uma queda na expressão de *BrachyuryT* com o bloqueio da sinalização FGF no 3° dia de diferenciação, no 5° dia observamos um efeito oposto, onde *BrachyuryT* tende a aumentar tanto em nível de expressão gênica quanto em nível protéico. Portanto, apesar do bloqueio de FGF afetar a ativação inicial de *BrachyuryT*, como descrito anteriormente (Sun, et al., 1999; Ciruna e Rossant, 2001; Lanner et al., 2010), a sinalização de FGF parece ter um efeito negativo sobre a expressão de *BrachyuryT* em dias mais tardios da diferenciação. Outra possibilidade seria de que algum mecanismo de compensação desta ativação está sendo induzido mediante o bloqueio da sinalização FGF.

No que diz respeito à aquisição de destinos neuroectodérmicos, a participação de FGF é divergente. Alguns trabalhos demonstram que FGF atua como regulador negativo neural (Sasaki et al., 2010; Jaroonwitchawan et al., 2016), enquanto outros trabalhos demonstram que é necessário uma pequena ativação de FGF para o início da aquisição de destinos neurais (Stavridis et al., 2007). Nossos resultados demonstram o aumento na expressão de *Pax6* e *Sox1*, reafirmando que FGF está atuando como regulador negativo nesse contexto, assim como descritos por Willems e Leyns (2008) e Zheng et al., (2010) após tratamentos de CTE com inibidores da sinalização FGF.

A ausência da sinalização FGF é principalmente descrita por bloquear a diferenciação endodérmica e manter a expressão de genes expressos no epiblasto pluripotente, como *Oct4* e *Nanog* (Kang et al., 2012; Molotkov et al., 2017; Lanner et al., 2010). De forma

similar demonstramos em nosso trabalho que a expressão de *Oct4* e *Nanog* está se mantendo alta, principalmente em estágios mais tardios da diferenciação.

Os dados apresentados no primeiro e segundo capítulos desta tese sugerem a participação de COUP-TFII nestes dois momentos do desenvolvimento que estamos focando e que são controlados pela sinalização FGF. Além do mais, recentemente a expressão de COUP-TFII foi demonstrada ser induzida por FGF2 no contexto de diferenciação de células mesenquimais (Lee et al. 2016).

O bloqueio da sinalização FGF demonstrou um decréscimo na expressão de Coup-TFI e Coup-TFII, tanto no modelo *in vivo* no E4.5 (Figura 19), quanto *in vitro* por meio da diferenciação de CTE (Figura 22). O padrão que observamos na expressão de Coup-TFI e Coup-TFII foi similar ao descrito para o bloqueio da sinalização FGF em marcadores de endoderme extraembrionária (Yamanaka et al., 2010, Kang et al., 2012, Molotkov et al., 2017). Apesar de não influenciar a ativação inicial de *Coup-TFI* e *Coup-TFII*, como observado no 3º dia de diferenciação em relação a níveis de expressão gênica, no 5º dia notamos um pequeno decréscimo em ambos e no 7º dia a redução de ambos a nível protéico é bem evidente (Figuras 20 e 22). Esses resultados demonstram que assim como FGF atua na regulação da manutenção da expressão de genes expressos na endoderme extraembrionária, FGF também pode estar controlando a expressão de Coup-TFI e Coup-TFII.

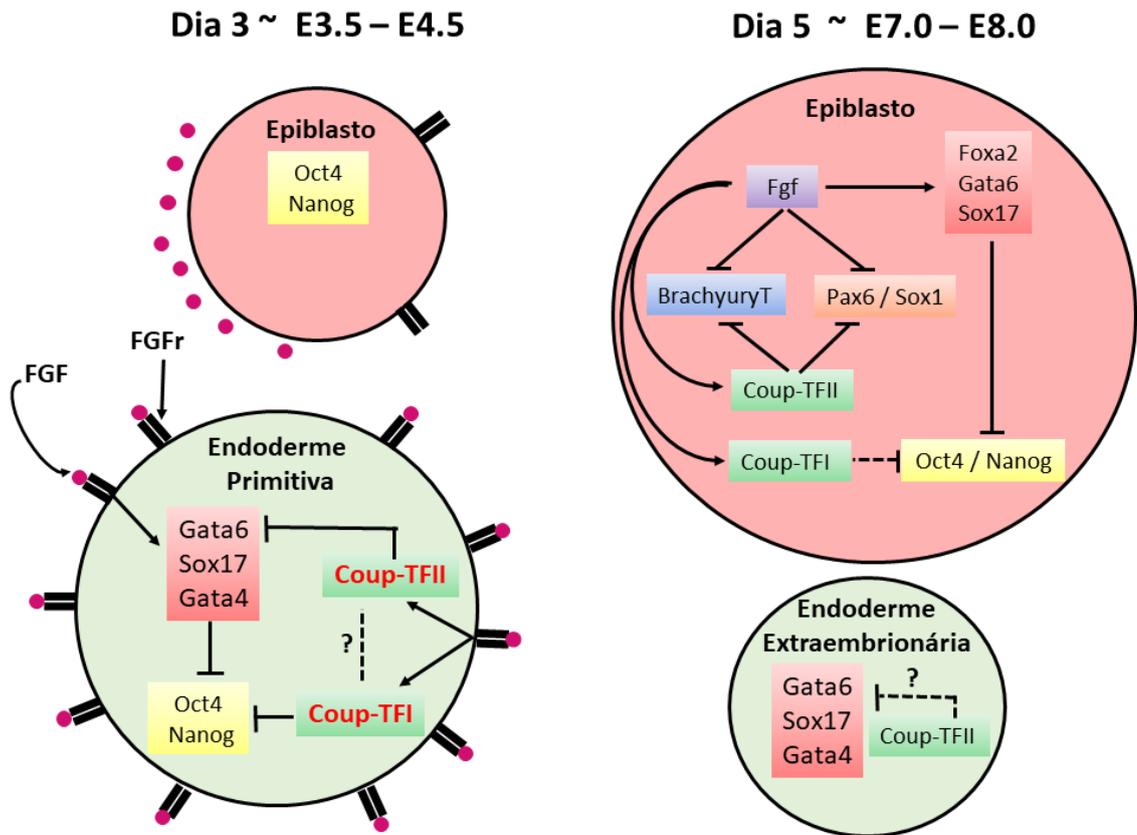
Desta forma, nossos dados sugerem que a utilização de PD e  $\text{NaClO}_3^-$  está influenciando a sinalização FGF, comprovada pela similaridade dos nossos resultados com os já descritos na literatura. O bloqueio dessa sinalização durante a diferenciação de CTE inibe a formação de endoderme embrionária (definitiva) e extraembrionária, inclusive diminuindo a expressão de Coup-TFI e Coup-TFII *in vivo* e *in vitro*, ao passo que favorece a formação de mesoderme e ectoderme.

O fato de *Coup-TFI* e *Coup-TFII* serem regulados por FGF no início do desenvolvimento apoia os resultados demonstrados neste trabalho, onde a ativação de ambos Coup-TFs parece estar envolvida na correta especificação e manutenção da endoderme primitiva, a qual é controlada por FGF (Yamanaka et al., 2010; Morris et al., 2013). Nossos resultados nos levam a sugerir que entre os E3.5 e E4.5, nas células que já estão comprometidas a se segregarem para formar a endoderme primitiva, Coup-TFI atuaria em conjunto com *Gata4*, *Gata6* e *Sox17* no bloqueio de *Oct4* e *Nanog* para que essas células sigam o destino de endoderme primitiva. Paralelamente, Coup-TFII controlaria os níveis de expressão de *Gata4*,

Gata6 e Sox17, atuando como regulador negativo. Demonstramos também que apesar da sinalização FGF não ser importante para a ativação inicial de *Coup-TFI* e *Coup-TFII*, esse é essencial para a manutenção da expressão de ambos, assim como também descritos para Gata4, Gata6 e Sox17 (Yamanaka et al., 2010; Kang et al., 2012; Morris et al., 2013)

Além do mais, nossos resultados que descrevem tanto o aumento de mesoderme como de neuroectoderme na ausência de *Coup-TFII*, demonstrados no segundo capítulo desta tese, estão de acordo com o observado por meio do bloqueio da sinalização FGF, que demonstra o mesmo padrão de aumento de ambos, mesoderme (BrachyuryT) e ectoderme (Pax6 e Sox1). Sendo assim, no cenário de formação dos três folhetos germinativos que ocorre *in vivo* entre E6.5 - E8.0, a sinalização FGF estaria bloqueando a diferenciação tardia de mesoderme (BrachyuryT) e ectoderme (Pax6 e Sox1), enquanto induz a especificação de endoderme (Foxa2, Gata6 e Sox17), os quais por sua vez inibem a pluripotência (Oct4 e Nanog). Paralelamente, FGF também ativa *Coup-TFI* e *Coup-TFII*. Enquanto COUP-TFI atua no bloqueio da pluripotência, COUP-TFII também atua regulando negativamente *BrachyuryT*, *Pax6* e *Sox1*. Essas possíveis relações de regulação gênica que discutimos de acordo com os dados obtidos neste trabalho, juntamente com dados já publicados, estão ilustrados na Figura 24.

Entretanto não podemos inferir que o aumento de BrachyuryT e Pax6 observados tanto com nocaute de *Coup-TFII* quanto com o bloqueio de FGF é em decorrência da ação de FGF sob a expressão de *Coup-TFII*. Os resultados observados com o bloqueio da sinalização FGF na expressão de BrachyuryT e Pax6 foram muito mais drásticos, comparados com os demonstrados pelo nocaute de *Coup-TFII*. Para analisar se a redução de BrachyuryT e Pax6 pela sinalização FGF não é dependente de COUP-TFII, poderíamos, por exemplo, induzir a expressão de FGF, com a adição de FGF4 nas células nocautes para *Coup-TFII*. Com isso, analisaríamos se FGF na ausência de *Coup-TFII* poderia inibir Pax6 e BrachyuryT. Um outro teste seria superexpressar *Coup-TFII* em CTE tratadas com inibidores de FGF, nesse caso analisaríamos se o aumento de Coup-TFII é suficiente para inibir BrachyuryT e Pax6 na ausência de FGF.



**Figura 24:** Esquema ilustrativo demonstrando a ação da sinalização FGF na expressão de Coup-TFI e Coup-TFII durante a segregação da endoderme primitiva E3.5 – E4.5 e gastrulação E6.5 – E8.0. As células que vão originar a endoderme primitiva são caracterizadas pela expressão de Gata4, Gata6 e Sox17, além de grande quantidade de recetores Fgf (FGFR). Essa maior quantidade de FGFR presente nessas células, comparado com as células do epiblasto, é responsável pela manutenção da expressão de Gata4, Gata6, Sox17, Coup-TFI e Coup-TFII. Nesse contexto, Coup-TFI atuaria em conjunto com Gata4, Gata6 e Sox17 bloqueando a expressão de Oct4 e Nanog nas células da endoderme primitiva. Enquanto nas células do epiblasto, Oct4 e Nanog se mantêm a níveis elevados. Por outro lado, Coup-TFII atua na regulação negativa de Gata4, Gata6 e Sox17 nas células da endoderme primitiva. No cenário da gastrulação, dia 5 da diferenciação de CTE, o qual corresponde ao E6.5 – E8.0 do desenvolvimento, a sinalização Fgf atua na regulação positiva de Coup-TFI, Coup-TFII, além dos genes expressos na endoderme (Foxa2, Gata6 e Sox17) e regula negativamente a expressão de BracT, Pax6 e Sox1. Foxa2, Gata6 e Sox17 atuam juntamente com Coup-TFI no bloqueio da expressão de Oct4 e Nanog, marcadores de pluripotência, enquanto Coup-TFII também atua bloqueando a expressão de BracT e Pax6. Linhas pontilhadas indicam possíveis relações. Imagem adaptada de Kang et al., 2013.

### 3.5 Conclusões referente ao Capítulo 3

- 1) Nossos dados sugerem que a expressão de Coup-TFI e Coup-TFII é regulada pela sinalização FGF durante a segregação da endoderme primitiva *in vivo* e em estágios mais tardios da diferenciação *in vitro*.
- 2) No que diz respeito a expressão de marcadores do desenvolvimento, demonstramos que o bloqueio da sinalização FGF causa uma redução na diferenciação de endoderme, enquanto potencializa a diferenciação de mesoderme e ectoderme.

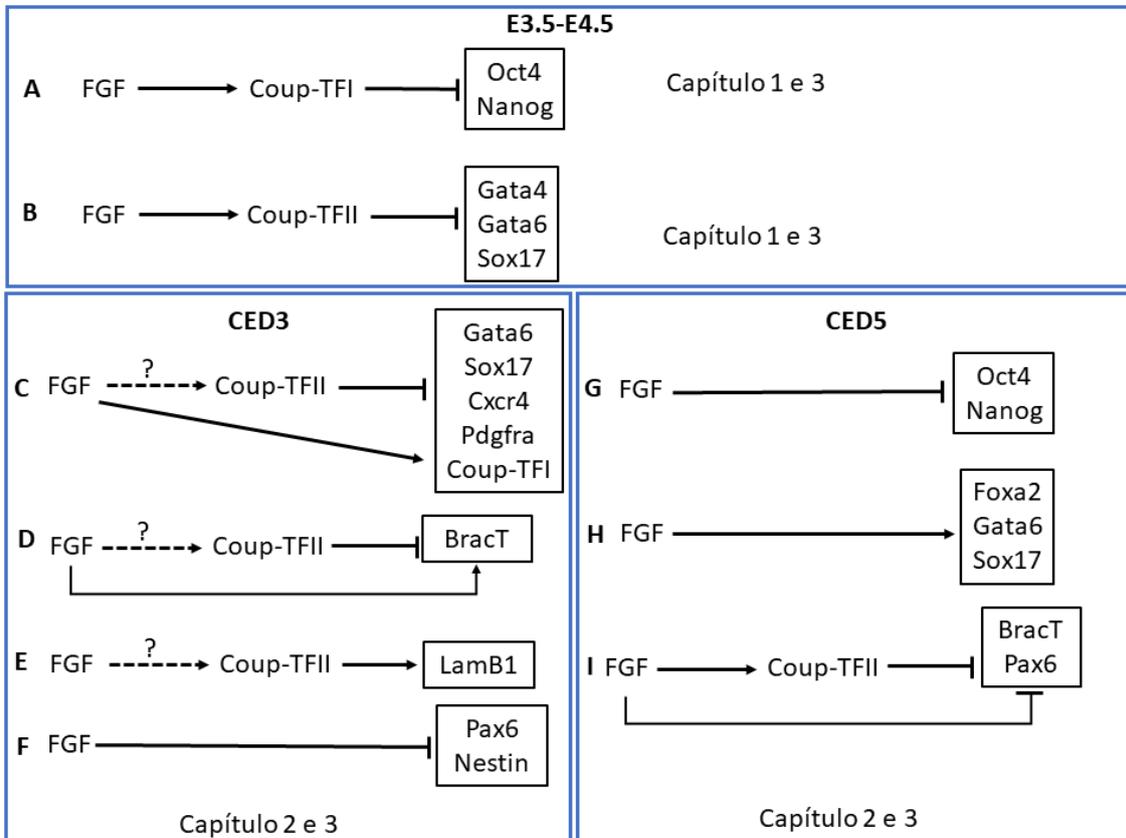
#### 4. Conclusões gerais

Em resumo os resultados apresentados neste trabalho adicionam dois novos participantes na rede de regulação que controla a formação da endoderme primitiva e a gastrulação, como descrito detalhadamente na Figura 6 do Capítulo 3.

O esquema da Figura 25 recapitula as principais interações gênicas que demonstramos no nosso trabalho. Vimos que no E4.5 do desenvolvimento de camundongos a sinalização FGF regula positivamente a expressão de Coup-TFI e Coup-TFII (A e B). Coup-TFI atua inibindo a expressão de Oct4 e Nanog (A), ao passo que Coup-TFII atua regulando os níveis de expressão de Gata4, Gata6 e Sox17(B). Esses resultados foram demonstrados nos Capítulos 1 e 3 e sugerem a participação de ambos Coup-TFs durante a formação da endoderme primitiva.

Utilizando o modelo de diferenciação de CTE por meio de CE, demonstramos que no 3° dia de diferenciação, a sinalização FGF não parece ter efeito na expressão de Coup-TFII (C, D e E), demonstrado no capítulo 3. Por outro lado, nesse mesmo dia, a sinalização FGF atua regulando positivamente a expressão de Gata6, Foxa2 (C) e BrachyuryT (D) e negativamente a expressão de Pax6 e Sox1 (F). Ainda no 3° dia de diferenciação observamos que Coup-TFII regula negativamente Gata6, Sox17, Cxcr4, Pdgfra, Coup-TFI (C), BrachyuryT (D) e regula positivamente a expressão de LamB1 (E). Esses resultados foram demonstrados nos capítulos 2 e 3 e sugerem que Coup-TFI, Coup-TFII e FGF estão relacionados com a formação da endoderme primitiva *in vitro* e com o início da especificação da mesoderme, ectoderme e endoderme.

Já no 5° dia de diferenciação, a sinalização FGF regula positivamente a expressão de Coup-TFII (I). Assim como FGF, Coup-TFII atua na inibição da expressão de BrachyuryT e Pax6 (I). Além disso, a sinalização FGF inibe a expressão de Oct4 e Nanog (G), enquanto mantém a expressão de Gata6, Sox17 e Foxa2 (H). Esses resultados foram demonstrados nos capítulos 2 e 3 e sugerem que tanto Coup-TFII quanto FGF atuam como reguladores negativos da especificação de mesoderme e ectoderme.



**Figura 25:** Esquema ilustrativo demonstrando as principais relações entre vias de sinalizações e fatores obtidas nesse trabalho *in vivo*, nos E3.5 – E4.5 e *in vitro*, nos dias 3 e 5 de diferenciação de CTE.

## 5. Considerações Finais

Os resultados obtidos neste trabalho adicionam novas informações na literatura que auxiliam no completo entendimento de umas das principais etapas do início do desenvolvimento embrionário. A formação do blastocisto, composto pela endoderme primitiva, trofotoderma e epiblasto é essencial para o processo de implantação do embrião no útero materno. O completo entendimento das etapas que levam a formação do embrião nos permitirá compreender as possíveis falhas que ocorrem nesses estágios iniciais, um período crítico do desenvolvimento, onde um grande número de erros ocorrem durante a implantação.

Além disso, o estudo de genes que participam do processo de gastrulação, essencial para a formação do embrião, nos levam a identificar qual a possível causa de má formações que ocorrem no início da especificação celular.

Aliado a isso, o estudo do desenvolvimento por meio da diferenciação com CE, apesar de ter algumas limitações, comparado com o modelo *in vivo*, demonstram como essas estruturas podem ser utilizadas como um modelo alternativo ao uso de animais em laboratório, principalmente em relação a análise de interações gênicas.

## 6. Referências Bibliográficas

- ABE K NIWA H IWASE K TAKIGUCHI M MORI ABÉ S ABE K YAMAMURA. Endoderm-Specific Gene Expression in Embryonic Stem Cells Differentiated to Embryoid Bodies. v. 34, n. 229, p. 27–34, 1996.
- ANDERSON, K. G. V. et al. Insulin fine-tunes self-renewal pathways governing naive pluripotency and extra-embryonic endoderm. **Nature Cell Biology**, 2017.
- BEDZHOV, I. et al. Developmental plasticity, cell fate specification and morphogenesis in the early mouse embryo. **Biological Sciences**, 2014.
- BEDZHOV, I.; ZERNICKA-GOETZ, M. Self-organizing properties of mouse pluripotent cells initiate morphogenesis upon implantation. **Cell**, 2014.
- BERGE, D. et al. Wnt Signaling Mediates Self-Organization and Axis Formation in Embryoid Bodies. **Stem Cell**, v. 3, n. 5, p. 508–518, 2008.
- BOROVIAK, T. et al. Lineage-Specific Profiling Delineates the Emergence and Progression of Naive Pluripotency in Mammalian Embryogenesis Resource Lineage-Specific Profiling Delineates the Emergence and Progression of Naive Pluripotency in Mammalian Embryogenesis. p. 366–382, 2015.
- BOUDOT, A.; LE DILY, F.; PAKDEL, F. Involvement of COUP-TFs in cancer progression. **Cancers**, v. 3, n. 1, p. 700–715, 2011.
- BOYER, L. A. et al. Core Transcriptional Regulatory Circuitry in Human Embryonic Stem Cells. v. 122, n. 1, p. 947–956, 2005.
- BRATT-LEAL A CARPENEDO R MCDEVITT T. Engineering the Embryoid Body Microenvironment to Direct Embryonic Stem Cell Differentiation. **Biotechnol Prog**, v. 25, p. 43–51, 2009.
- BREWER, J. R.; MAZOT, P.; SORIANO, P. Genetic insights into the mechanisms of Fgf signaling. p. 751–771, 2016.
- BRICKMAN, J. M.; SERUP, P. Properties of embryoid bodies. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology**, 2017.
- BRIGID LM HOGAN. Bone Morphogenetic Proteins in development. **Current Opinion in Genetics & Development**, v. 6, p. 432–438, 1996.
- BRINK, S. C. VAN DEN et al. Symmetry breaking , germ layer specification and axial organisation in aggregates of mouse embryonic stem cells. p. 4231–4242, 2014.
- BURDON, T. et al. Signalling , cell cycle and pluripotency in embryonic stem cells. v. 12, n. 9, p. 432–438, 2002.

- CANHAM, M. A. et al. Functional Heterogeneity of Embryonic Stem Cells Revealed through Translational Amplification of an Early Endodermal Transcript. v. 8, n. 5, 2010.
- CHAZAUD, C. et al. Early Lineage Segregation between Epiblast and Primitive Endoderm in Mouse Blastocysts through the Grb2-MAPK Pathway. **Developmental Cell**, 2006.
- CIRUNA, B.; ROSSANT, J. FGF Signaling Regulates Mesoderm Cell Fate Specification and Morphogenetic Movement at the Primitive Streak. **Developmental Cell**, 2001.
- DOETSCHMAN, T. C.; EISTETTER, H.; KATZ, M. The in vitro development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium. p. 27–45, 1985.
- FUJIKURA, J. et al. Differentiation of embryonic stem cells is induced by GATA factors. **Genes and Development**, 2002.
- FUTAKI, S. et al. Sox7 Plays Crucial Roles in Parietal Endoderm Differentiation in F9 Embryonal Carcinoma Cells through Regulating Gata-4 and Gata-6 Expression. v. 24, n. 23, p. 10492–10503, 2004.
- GUO, G. et al. Resolution of Cell Fate Decisions Revealed by Single-Cell Gene Expression Analysis from Zygote to Blastocyst. **Developmental Cell**, 2010.
- HACKETT, J. A.; AZIM SURANI, M. Regulatory principles of pluripotency: From the ground state upCell Stem Cell. **Cell Press**, , 2014.
- HARRISON, S. E. et al. Assembly of embryonic and extraembryonic stem cells to mimic embryogenesis in vitro. **Science**, 2017.
- HE, S, NAKADA D, MORRISON S.J. Mechanisms of Stem cell self renewal. **Cell. Dev. Biology** 2009.
- HU, S. et al. MicroRNA-302 increases reprogramming efficiency via repression of NR2F2. **Stem Cells**, v. 31, n. 2, p. 259–268, 2013.
- 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.
- JAROONWITCHAWAN, T.; MUANGCHAN, P.; NOISA, P. Inhibition of FGF signaling accelerates neural crest cell differentiation of human pluripotent stem cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 2016.
- KANG, M. et al. FGF4 is required for lineage restriction and salt-and-pepper distribution of primitive endoderm factors but not their initial expression in the mouse. **Development**, 2012.
- KIRBY, L. A. et al. Promotes Pluripotency in Mouse Embryonic Stem Cells. v. 7, n. 6, 2012.
- KRAWCHUK, D. et al. FGF4 is a limiting factor controlling the proportions of primitive

- endoderm and epiblast in the ICM of the mouse blastocyst. **Developmental Biology**, 2013.
- KUNATH, T. et al. FGF stimulation of the Erk1 / 2 signalling cascade triggers transition of pluripotent embryonic stem cells from self-renewal to lineage commitment. v. 2902, p. 2895–2902, 2007.
- KUROSAWA, H. Methods for inducing embryoid body formation: in vitro differentiation system of embryonic stem cells. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 103, n. 5, p. 389–398, 2007.
- LANNER, F. et al. Heparan sulfation-dependent fibroblast growth factor signaling maintains embryonic stem cells primed for differentiation in a heterogeneous state. **Stem Cells**, v. 28, n. 2, p. 191–200, fev. 2010.
- LANNER, F.; ROSSANT, J. The role of FGF/Erk signaling in pluripotent cells. **Development**, v. 137, n. 20, p. 3351–3360, 2010.
- LATOS, P. A.; HEMBERGER, M. From the stem of the placental tree : trophoblast stem cells and their progeny. v. 2, p. 3650–3660, 2016.
- LEAHY, A. M. Y. et al. Use of Developmental Marker Genes to Define Temporal and Spatial Patterns of Differentiation During Embryoid Body Formation. v. 81, n. July 1998, p. 67–81, 1999.
- LEE-HO WANG, NANCY H. ING, SOPHIA Y. TSAI, BERT W. O'MALLEY, AND M.-J. T. **The COUP-TFs compose a family of functionally related transcription factors.** [s.l.: s.n.].
- LEE, M. N. et al. FGF2 stimulates COUP-TFII expression via the MEK1/2 pathway to inhibit osteoblast differentiation in C3H10T1/2 cells. **PLoS ONE**, 2016.
- LI, L. et al. The Nuclear Orphan Receptor COUP-TFII Plays an Essential Role in Adipogenesis, Glucose Homeostasis, and Energy Metabolism. **Cell Metabolism**, v. 9, n. 1, p. 77–87, 7 jan. 2009.
- LIN, F.-J. et al. Coup d'Etat: an orphan takes control. **Endocrine reviews**, v. 32, n. 3, p. 404–21, jun. 2011.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402–408, 2001.
- MARIKAWA, Y. et al. Aggregated P19 mouse embryonal carcinoma cells as a simple in vitro model to study the molecular regulations of mesoderm formation and axial elongation morphogenesis. **Genesis**, v. 47, n. 2, p. 93–106, 2009.
- MARTIN, G. R. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. **Developmental Biology** : v. 78, n. 12, p. 7634–7638, 1981.

- MEILHAC, S. M. et al. Active cell movements coupled to positional induction are involved in lineage segregation in the mouse blastocyst. **Developmental Biology**, 2009.
- MOLOTKOV, A. et al. Distinct Requirements for FGFR1 and FGFR2 in Primitive Endoderm Development and Exit from Pluripotency. **Developmental Cell**, 2017.
- MORRIS, S. A. et al. Origin and formation of the first two distinct cell types of the inner cell mass in the mouse embryo. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 2010.
- MORRIS, S. A. et al. The differential response to Fgf signalling in cells internalized at different times influences lineage segregation in preimplantation mouse embryos. **Open Biology**, 2013.
- MURRAY, P.; EDGAR, D. Regulation of laminin and COUP-TF expression in extraembryonic endodermal cells. 2001.
- MURRY, C. E.; KELLER, G. Differentiation of Embryonic Stem Cells to Clinically Relevant Populations: Lessons from Embryonic Development. **Cell**, v. 132, n. 4, p. 661–680, 2008.
- NELSON, T. J. et al. CXCR4 + /FLK-1 + Biomarkers Select a Cardiopoietic Lineage from Embryonic Stem Cells . **Stem Cells**, v. 26, n. 6, p. 1464–1473, 28 jun. 2008.
- NIAKAN, K. K. et al. Sox17 promotes differentiation in mouse embryonic stem cells by directly regulating extraembryonic gene expression and indirectly antagonizing self-renewal. **Genes and Development**, 2010.
- NIAKAN, K. K. et al. Derivation of extraembryonic endoderm stem (XEN) cells from mouse embryos and embryonic stem cells. **Nature Protocols**, 2013.
- NIWA, H. et al. LETTERS A parallel circuit of LIF signalling pathways maintains pluripotency of mouse ES cells. **Nature**, v. 460, n. 7251, p. 118–122, 2009.
- OKI, S.; KITAJIMA, K.; MENO, C. Dissecting the role of Fgf signaling during gastrulation and left-right axis formation in mouse embryos using chemical inhibitors. **Developmental Dynamics**, 2010.
- ORNITZ, D. M.; ITOH, N. signaling pathway. v. 4, n. June, 2015.
- PEKKANEN-MATTILA, M. et al. Spatial and temporal expression pattern of germ layer markers during human embryonic stem cell differentiation in embryoid bodies. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 133, n. 5, p. 595–606, 2010.
- PEREIRA, F. A. et al. Chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor (COUP-TF): Expression during mouse embryogenesis. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 53, n. 1–6, p. 503–508, 1995.
- PEREIRA, F. A. et al. The orphan nuclear receptor COUP-TFII is required for angiogenesis and heart development. **Genes and Development**, v. 13, n. 8, p. 1037–1049, 1999.
- PEREIRA, F. A.; TSAI, M. J.; TSAI, S. Y. COUP-TF orphan nuclear receptors in development

and differentiation Cellular and Molecular. **Life Sciences**. 2000.

PIJUAN-SALA B GRIFFITHS J GUIBENTIF C HISCOCK T JAWAID W CALERO-NIETO F MULAS C IBARRA-SORIA X TYSER R HO D REIK. A single-cell molecular map of mouse gastrulation and early organogenesis. **Nature**, v. vol: 566 (, p. pp: 490-495, 2019.

QIU, Y. et al. Null mutation of mCOUP-TFI results in defects in morphogenesis of the glossopharyngeal ganglion, axonal projection, and arborization. **Genes and Development**, v. 11, n. 15, p. 1925–1937, 1997.

QIU Y COONEY A KURATANI S DEMAYO F TSAI S TSAI M. Spatiotemporal expression patterns of chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factors in the developing mouse central nervous system : Evidence for a role in segmental patterning of the diencephalon. v. 91, n. May, p. 4451–4455, 1994.

RIVERA-PE, J. A.; MAGER, J.; MAGNUSON, T. Dynamic morphogenetic events characterize the mouse visceral endoderm. v. 261, p. 470–487, 2003.

RIVERA-PÉREZ, J. A.; HADJANTONAKIS, A. K. The dynamics of morphogenesis in the early mouse embryo. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, 2015.

RIVERA-PÉREZ, J. A.; MAGNUSON, T. Primitive streak formation in mice is preceded by localized activation of Brachyury and Wnt3. **Developmental Biology**, 2005.

ROSA, A.; BRIVANLOU, A. H. the transcription factors OCT4 and NR2F2 differentiation. **The EMBO Journal**, v. 30, n. 2, p. 237–248, 2010.

ROSA, V. DE S. Caracterização da expressão de Coup-TFII durante o início da diferenciação de células-tronco embrionárias. **Dissertação de Mestrado Em Biologia Celular E Tecidual), Instituto de Biologia (Universidade Estadual de Campinas), Campinas**. 2013.

ROSSANT, J.; TAM, P. P. L. Blastocyst lineage formation, early embryonic asymmetries and axis patterning in the mouse. **Development**, v. 136, n. 5, p. 701–713, 2009.

SAJINI, A. A. et al. Loss of Oct4 expression during the development of murine embryoid bodies. v. 371, p. 170–179, 2012.

SASAKI, N. et al. Chemical inhibition of sulfation accelerates neural differentiation of mouse embryonic stem cells and human induced pluripotent stem cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 2010.

SATO, N. et al. Maintenance of pluripotency in human and mouse embryonic stem cells through activation of Wnt signaling by a pharmacological GSK-3-specific inhibitor. v. 10, n. 1, p. 55–63, 2004.

SATOSHI TANAKA,\* TILO KUNATH, A.-K. H.; ANDRAS NAGY, J. R. Promotion of

- Trophoblast Stem Cell Proliferation by FGF4. **SCIENCE**, v. 282, p. 2072–2076, 1998.
- SAUNDERS A FAIOLA F WANG J. Pursuing Self-Renewal and Pluripotency with the Stem Cell Factor Nanog. v. 31, p. 1227–1236, 2013.
- SCHIER, A. F.; SHEN, M. M. Nodal signalling in vertebrate development. **Nature**, v. 403, n. 6768, p. 385–389, 2000.
- SCHRODE, N. et al. GATA6 levels modulate primitive endoderm cell fate choice and timing in the mouse blastocyst. **Developmental Cell**. 2014.
- SHIMODA, M. et al. Sox17 plays a substantial role in late-stage differentiation of the extraembryonic endoderm in vitro. **Journal of Cell Science**. 2007.
- SOZEN, B. et al. Self-assembly of embryonic and two extra-embryonic stem cell types into gastrulating embryo-like structures. **Nature Cell Biology**, v. 20, n. 8, p. 979–989, 1 ago. 2018.
- SRINIVAS, S. The anterior visceral endoderm - Turning heads. **Genesis**, 2006.
- STAVRIDIS, M. P. et al. A discrete period of FGF-induced Erk1/2 signalling is required for vertebrate neural specification. **Development**, 2007.
- STEPHENSON, R. O.; ROSSANT, J.; TAM, P. P. L. Intercellular interactions, position, and polarity in establishing blastocyst cell lineages and embryonic axes. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, 2012.
- SUN, X. et al. Targeted disruption of Fgf8 causes failure of cell migration in the gastrulating mouse embryo. **Genes and Development**, 1999.
- TAKAMOTO N KURIHARA I LEE K DEMAYO F TSAI M TSAI. Haploinsufficiency of COUP-TFII in Female Reproduction. v. 19, n. 9, p. 2299–2308, 2005.
- TAM, P. P. L.; BEHRINGER, R. R. Mouse gastrulation : the formation of a mammalian body plan. v. 68, p. 3–25, 1997.
- TAM, P. P. L.; LOEBEL, D. A. F. Gene function in mouse embryogenesis: Get set for gastrulation. **Nature Reviews Genetics**, 2007.
- TAM, P. P.; LOEBEL, D. A.; TANAKA, S. S. Building the mouse gastrula: signals, asymmetry and lineages *Current Opinion in Genetics and Development*, 2006.
- TANG, K. et al. COUP-TFs regulate eye development by controlling factors essential for optic vesicle morphogenesis. **Development**, 2010.
- TSAI, S TSAI, M. Chick Ovalbumin Upstream Promoter-Transcription. **Endocrine Reviews**, v. 18, n. 2, p. 13–15, 1997.
- V, M. Y. T. D. F. T. A. Aggregated P19 mouse embryonal carcinoma cells as a simple in vitro model to study the molecular regulations of mesoderm formation and axial elongation morphogenesis. v. 47, n. 2, p. 93–106, 2012.

- WILLEMS, E.; LEYNS, L. Patterning of mouse embryonic stem cell-derived pan-mesoderm by Activin A/Nodal and Bmp4 signaling requires fibroblast growth factor activity. **Differentiation**, v. 76, n. 7, p. 745–759, 2008.
- WOBUS, A. M.; BOHELER, K. R. Embryonic Stem Cells : Prospects for Developmental Biology and Cell Therapy. p. 635–678, 2005.
- WRAY J KALKAN T SMITH A. The ground state of pluripotency. **Biochemical Society Transactions**, v. 38, n. January, p. 1027–1032, 2010.
- WU, S.-P. et al. Generation of ES Cells for Conditional Expression of Nuclear Receptors and Coregulators in Vivo . **Molecular Endocrinology**, 2010.
- XIE, X. et al. Nuclear receptor chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor II (COUP-TFII) modulates mesenchymal cell commitment and differentiation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 36, p. 14843–14848, 2011.
- YAMAGUCHI, T. P. Heads or tails : Wnts and anterior – posterior patterning. p. 713–724, 2001.
- YAMANAKA, Y.; LANNER, F.; ROSSANT, J. FGF signal-dependent segregation of primitive endoderm and epiblast in the mouse blastocyst. **Development**, 2010.
- ZHENG, Z. et al. A requirement for FGF signalling in the formation of primitive streak-like intermediates from primitive ectoderm in culture. **PLoS ONE**, v. 5, n. 9, p. 1–13, 2010.
- ZHUANG, Y.; GUDAS, L. J. Overexpression of COUP-TF1 in murine embryonic stem cells reduces retinoic acid-associated growth arrest and increases extraembryonic endoderm gene expression. **Differentiation**, 2008.

## 7. Anexos

**Declaração de que a dissertação ou tese não infringe os dispositivos da lei nº 9610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.**

### Declaração

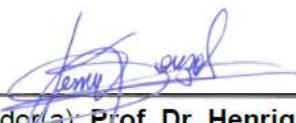
As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada **Análise da expressão e função de Coup-TFI e Coup-TFII durante o início do desenvolvimento embrionário de camundongo**, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 09 de Julho de 2019.

Assinatura : \_\_\_\_\_ 

Nome do(a) autor(a): **Viviane de Souza Rosa**

RG n.º 585906002

Assinatura : \_\_\_\_\_ 

Nome do(a) orientador(a): **Prof. Dr. Henrique Marques Barbosa de Souza**

RG n.º 2.153.826-4

**Documento referente a Bioética e/ou Biossegurança.**

COORDENADORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
INSTITUTO DE BIOLOGIA  
Universidade Estadual de Campinas  
Caixa Postal 6109. 13083-970, Campinas, SP, Brasil  
Fone (19) 3521-6378. email: cpgib@unicamp.br

**DECLARAÇÃO**

Em observância ao §5º do Artigo 1º da Informação CCPG-UNICAMP/001/15, referente a Bioética e Biossegurança, declaro que o conteúdo de minha Tese de Doutorado, intitulada "*Análise da expressão e função de Coup-TFI e Coup-TFII durante o início do desenvolvimento embrionário de camundongo*", desenvolvida no Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural do Instituto de Biologia da Unicamp, não versa sobre pesquisa envolvendo seres humanos, animais ou temas afetos a Biossegurança.

Assinatura: \_\_\_\_\_  
Nome do(a) aluno(a): Viviane de Souza Rosa

Assinatura: \_\_\_\_\_  
Nome do(a) orientador(a): Prof. Dr. Henrique Marques Barbosa de Souza

Data: 26/06/2018