

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

DAIANA LEILA DREHMER



**CARACTERIZAÇÃO DE miRNAs ASSOCIADOS A POLISSOMOS
DURANTE A DIFERENCIAÇÃO CARDIOMIOGÊNICA DE CÉLULAS-
TRONCO EMBRIONÁRIAS HUMANAS**

CURITIBA

2017

DAIANA LEILA DREHMER

**CARACTERIZAÇÃO DE miRNAs ASSOCIADOS A POLISSOMOS
DURANTE A DIFERENCIAÇÃO CARDIOMIOGÊNICA DE CÉLULAS-
TRONCO EMBRIONÁRIAS HUMANAS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Biomedicina da Universidade Federal do Paraná como requisito à obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

Orientadores: Dr. Bruno Dallagiovanna Muñiz e Prof. Dra. Lia Nakao

CURITIBA

2017

RESUMO

Doenças cardiovasculares são a maior causa de morte no mundo todo e o tratamento atual é limitado e ineficaz em uma série de casos. A busca por novas terapias que possibilitem o reparo do tecido cardíaco segue ao lado da elucidação dos mecanismos de diferenciação, sobrevivência ou regeneração de cardiomiócitos. Células-tronco embrionárias (CTEs) são ferramentas muito úteis para o estudo desses mecanismos pela capacidade de se diferenciarem nos diversos tipos celulares do organismo. Sabendo que os níveis de RNA mensageiro (mRNA) não necessariamente correspondem aos níveis proteicos, vários esforços têm sido feitos para entender a regulação pós-transcricional de mRNAs. microRNAs, pequenos RNAs não codificantes, são descritos como importantes reguladores nesta etapa, porém ainda pouco se sabe sobre seu mecanismo de ação e função em nível traducional. Desse modo, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a associação a polissomos de miRNAs diferencialmente expressos ao longo da diferenciação cardiomiogênica de CTEs humanas, podendo assim melhor entender o seu mecanismo de ação. CTEs foram cultivadas e submetidas à diferenciação cardiomiogênica, e o perfil polissomal das células em diferentes tempos da diferenciação foi avaliado, bem como a expressão dos miRNAs-302, -371a, -133a e -503, em CTEs e progenitores cardíacos. A associação a polissomos destes miRNAs foi analisada por qRT-PCR, usando diferentes inibidores da tradução. Resultados mostram que ocorre uma redução na porção de ribossomos traducionalmente ativos ao longo da diferenciação. Também se observa que miRNAs exibem diferentes graus de associação a polissomos, sendo que os miRNAs -302, -371a e -133a parecem estar mais presentes na fração livre. miR-503 foi o único que mostrou uma associação mais forte a polissomos, sugerindo que este miRNA possa estar regulando a tradução de seus RNAs alvo. Como conclusão, pode-se dizer que foi possível isolar e identificar miRNAs associados à fração polissomal de RNAs. Mediante o tratamento com diferentes inibidores da tradução, foi determinado o grau de associação dos miRNAs a polissomos. Perspectivas para o trabalho incluem o sequenciamento de miRNAs associados a polissomos em progenitores mesodermiais, progenitores cardíacos e cardiomiócitos.

Palavras-chave: células-tronco embrionárias humanas, diferenciação cardiomiogênica, microRNAs.

ABSTRACT

Cardiovascular diseases are the leading cause of death worldwide and current treatments are limited and ineffective in several cases. The understanding of the mechanisms of cardiomyocyte differentiation, survival or regeneration is essential to develop novel therapies that allow the repair of the cardiac tissue. Embryonic stem cells (ESCs) are useful tools for the study of these mechanisms. Since messenger RNA (mRNA) levels do not necessarily correspond to protein levels, several efforts have been made to understand the post-transcriptional regulation of mRNAs. MicroRNAs – small non-coding RNAs – are described as important regulators at this stage, but little is known about their mechanism of action and function at the translational level. Thus, the present work aims to identify miRNAs associated with polysomes that are differentially expressed along the cardiomiogenic differentiation of human ESCs. hESCs were cultured and differentiated, and the polysomal profile of cells at different time points of the cardiomiogenic differentiation was evaluated, as well as expression of miRNAs -302, -371a, -133a and -503 in hESCs and cardiac progenitors. Polysome association of these miRNAs was analyzed by qRT-PCR, using several translation inhibitors. Results show a reduction in the fraction of translationally active ribosomes along the differentiation. It is also observed that miRNAs exhibit different degrees of association to polysomes, and that miRNAs -302, -371a and -133a appear to be more present in the fraction free of ribosomes. miR-503 was the only one that showed a stronger association to polysomes, suggesting that this miRNA may be acting by regulating translation of its targets. As a conclusion, it was possible to isolate and identify miRNAs associated to polysomes. After treating with different translation inhibitors, the degree of miRNAs association with polysomes was determined. Perspectives involve the sequencing of miRNAs associated with polysomes from mesodermal progenitors, cardiac progenitors and cardiomyocytes.

Keywords: human embryonic stem cells, cardiomiogenic differentiation, miRNAs.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1 – Via de processamento de miRNA..... | 11 |
| Figura 2 – Processo de adição de cauda poli-A, síntese de DNA complementar e PCR em tempo real (qRT-PCR) de miRNAs..... | 23 |
| Figura 3 – Exemplo do perfil de absorvância (filtro 254 nm) gerado pelo equipamento ISCO..... | 26 |
| Figura 4 – Eletroferograma obtido com o kit <i>Agilent RNA 6000 Nano</i> , no equipamento Agilent 2100 Bioanalyzer, a partir de amostra de RNA de CTEs da linhagem h32.5..... | 28 |
| Figura 5 – Análise do cDNA proveniente das extrações, utilizando o equipamento Agilent 2100 Bioanalyzer..... | 28 |
| Figura 6 – Diagrama esquemático da diferenciação cardiomiogênica de hCTEs..... | 31 |
| Figura 7 – Análise por citometria de fluxo representativa de uma diferenciação..... | 31 |
| Figura 8 – Painel de fotos das células..... | 32 |
| Figura 9 – Células em D15..... | 32 |
| Figura 10 – Imagens representativas do perfil polissomal de células h32.5 em diferentes tempos de diferenciação cardiomiogênica (D0, D9 e D15)..... | 33 |
| Figura 11 – Quantificação das áreas dos gráficos correspondentes ao RNA monossomal e polissomal..... | 34 |
| Figura 12 – Comparação do perfil polissomal após os tratamentos..... | 35 |
| Figura 13 – Comparação do perfil polissomal em D0 (CTEs) e em D9 (progenitores cardíacos), após tratamento com cicloheximida, puromicina e EDTA..... | 36 |
| Figura 14 – Comparação da expressão dos miRNAs em D0 e D9, após tratamento com cicloheximida..... | 37 |

Figura 15 – Comparação da expressão de miR-302 e miR-371a em D0 e D9, após tratamento com cicloheximida, puromicina ou EDTA..... 38

Figura 16 – Comparação da expressão de miR-133a e miR-503 em D0 e D9, após tratamento com cicloheximida, puromicina ou EDTA..... 38

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1 – miRNAs envolvidos no processo de autorrenovação e pluripotência de células-tronco..... | 12 |
| Tabela 2 – miRNAs envolvidos no processo de diferenciação cardíaca..... | 13 |
| Tabela 3 – Breve descrição dos protocolos testados para a extração de RNA polissomal e RNA total de CTEs..... | 27 |
| Tabela 4 – Valores de Cq resultantes da qPCR feita com RNAs de CTEs não diferenciadas e purificados com diferentes protocolos de extração..... | 29 |

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 9 |
| 1.1 miRNAs e diferenciação cardiomiogênica..... | 10 |
| 1.2 Células-tronco | 15 |
| 2. JUSTIFICATIVA | 17 |
| 3. OBJETIVOS | 18 |
| 3.1 Objetivo geral | 18 |
| 3.2 Objetivos específicos | 18 |
| 4. METODOLOGIA..... | 19 |
| 4.1 Cultivo de CTEs | 19 |
| 4.2 Diferenciação cardiomiogênica de CTEs | 19 |
| 4.3 Citometria de fluxo | 20 |
| 4.4 Microscopia de fluorescência | 20 |
| 4.5 Perfil polissomal das CTEs | 21 |
| 4.5.1 Lise celular..... | 21 |
| 4.5.2 Separação dos polissomos por gradiente de sacarose | 21 |
| 4.6 Extração de RNA | 22 |
| 4.7 Retro-transcrição e PCR quantitativa | 22 |
| 4.7.1 Adição de cauda poli-A..... | 22 |
| 4.7.2 Síntese do DNA complementar | 22 |
| 4.7.3 PCR quantitativa (qPCR) | 23 |
| 4.7.4 Normalização da qPCR | 23 |
| 4.7.5 Análise da qPCR..... | 24 |
| 5. RESULTADOS | 25 |
| 5.1 Desenho experimental..... | 25 |
| 5.2 Padronização da extração de RNA | 26 |
| 5.3 Normalização dos níveis de expressão de miRNA em qPCR | 29 |

| | |
|---|----|
| 5.4 CTEs são eficientemente diferenciadas a cardiomiócitos | 30 |
| 5.5 O processo de diferenciação cardiomiogênica resulta na redução da atividade de tradução das células | 33 |
| 5.6 Perfil polissomal em resposta ao tratamento com cicloheximida, puromicina e EDTA..... | 34 |
| 5.7 Estudo da associação de miRNAs a polissomos | 36 |
| 5.8 Análise in silico dos alvos preditos para os miRNAs | 39 |
| 6. DISCUSSÃO | 40 |
| 7. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS | 44 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 45 |

1. INTRODUÇÃO

Doenças cardiovasculares – patologias do coração e sistema vascular – são a maior causa de morte no mundo todo (COSSELMAN, NAVAS-ACIEN e KAUFMAN, 2015) – cerca de 30% do total de mortes (Global Burden of Disease, 2013). Estas doenças são o resultado de interações complexas entre susceptibilidade genética e ambiente (KATHIRESAN e SRIVASTAVA, 2012), tendo normalmente como causa primária a disfunção endotelial seguida de inflamação na parede do vaso, o que leva à obstrução do fluxo sanguíneo e necrose (DIMMELER, 2011). Como exemplo, no infarto do miocárdio, aproximadamente 1×10^9 cardiomiócitos entram em processo de morte celular (LAFLAMME e MURRY, 2005). Como cardiomiócitos têm baixa capacidade proliferativa (ALI *et al.*, 2014), o tratamento atual é limitado e ineficaz em uma série de casos por não promover eficientemente o reparo da função cardíaca (CLAYTON e NASH, 2015), demonstrando a importância e urgência do desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas. Neste contexto, o entendimento de vias de sinalização e mecanismos que promovem diferenciação, sobrevivência ou regeneração de cardiomiócitos pode resultar em importantes aplicações clínicas (LIU *et al.*, 2015).

Recentemente, pequenos RNAs não codificantes denominados microRNAs (miRNAs) foram descritos como importantes reguladores da expressão gênica por formarem complexos de silenciamento e se ligarem a certas regiões do RNA mensageiro, degradando-o ou bloqueando sua tradução (HE e HANNON, 2004; HA e KIM, 2014). miRNAs estão sendo cada vez mais associados a inúmeros processos fisiológicos e patológicos (LING, FABBRI e CALIN, 2013). Diversos miRNAs também já foram citados como importantes durante a cardiomiogênese, e alguns deles, como miR-199a e -590, também têm demonstrado aumentar a proliferação de cardiomiócitos e estimular regeneração cardíaca após indução de infarto em modelos animais (GLASS e SINGLA, 2011; EULALIO *et al.*, 2012; BAKER e VAN ROOJI, 2013).

1.1 miRNAs e diferenciação cardiomiogênica

miRNAs são sequências curtas de RNAs, com cerca de 22 nucleotídeos, que não codificam para uma proteína específica, mas desempenham um papel importante como reguladores negativos da expressão gênica (HE e HANNON, 2004; HA e KIM, 2014). Essa função depende de uma família de proteínas chamada Argonauta, que formam o complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC) (GREVE, JUDSON e BLELLOCH, 2013). No entanto, regulação positiva da expressão gênica por miRNAs e proteínas Argonauta também já foi reportado (VASUDEVAN e STEITZ, 2007; VASUDEVAN, 2012). Sugere-se que o número de RNAs não codificantes, dentre os quais miRNAs, é muito maior que o de RNAs codificantes, visto que cerca de 75% do genoma humano é transcrito, porém apenas 3% para gerar mRNA (LING, FABBRI e CALIN, 2013). De fato, algumas predições computacionais estimam a presença de mais de 2 mil possíveis miRNAs em humanos, e cada miRNA pode se ligar a centenas de diferentes mRNAs (FRIEDLÄNDER *et al.*, 2014), tornando-os atrativos para pesquisa básica, identificação de biomarcadores e aplicações terapêuticas (LING, FABBRI e CALIN, 2013; SZABÓ *et al.*, 2014).

No núcleo, o primeiro passo para a maturação do miRNA é dado pela enzima RNA polimerase II ao transcrever uma longa fita de miRNA primário (pri-miRNA) a partir de um determinado gene. O pri-miRNA resultante é longo, poliadenilado, podendo conter de uma a seis regiões precursoras (pre-miRNAs) que irão formar miRNAs distintos após uma série de etapas. No núcleo, o complexo enzimático Drosha, uma endonuclease RNase tipo III associada a DGCR8 e cofatores adicionais, irá clivar o pri-miRNA e liberar pre-miRNAs que serão exportados para o citoplasma pelo complexo exportina-5/Ran-GTP. No citoplasma, o pre-miRNA é clivado por outra enzima RNase tipo III, chamada Dicer. Como resultado, forma-se um RNA de dupla fita com aproximadamente 22 nucleotídeos. As duas fitas são então separadas, porém, apenas uma delas irá potencialmente atuar como um miRNA funcional, devido a sua maior estabilidade, enquanto a outra geralmente é degradada. A fita de miRNA madura pode ser incorporada ao conjunto enzimático denominado RISC. O complexo miRNA-RISC se liga ao mRNA alvo de maneira sequência-específica, induzindo sua clivagem; esse processo é conhecido como silenciamento gênico e acarreta

em depleção dos níveis proteicos. O fato de miRNAs se anelarem imperfeitamente nos seus mRNAs alvo faz com que eles possam regular centenas de transcritos (OLIVEIRA-CARVALHO *et al.*, 2012; LÜNINGSSCHRÖR *et al.*, 2013; CHA *et al.*, 2015) (**Fig. 1**).

Outra atividade de miRNAs é por meio de repressão traducional, onde o complexo miRNA-RISC impossibilita a ligação dos ribossomos no mRNA, inibindo a síntese proteica. Desta forma, miRNAs podem agir promovendo um término prematuro da tradução (**Fig. 1**). Muitos miRNAs foram encontrados associados a polissomos (PILLAI *et al.*, 2005), isto é, vários ribossomos nos quais mRNAs que são eficientemente traduzidos se associam durante o processo de elongação. mRNAs pouco traduzidos encontram-se associados a poucos ou até mesmo um único ribossomo (SUNNERHAGEN, 2007).

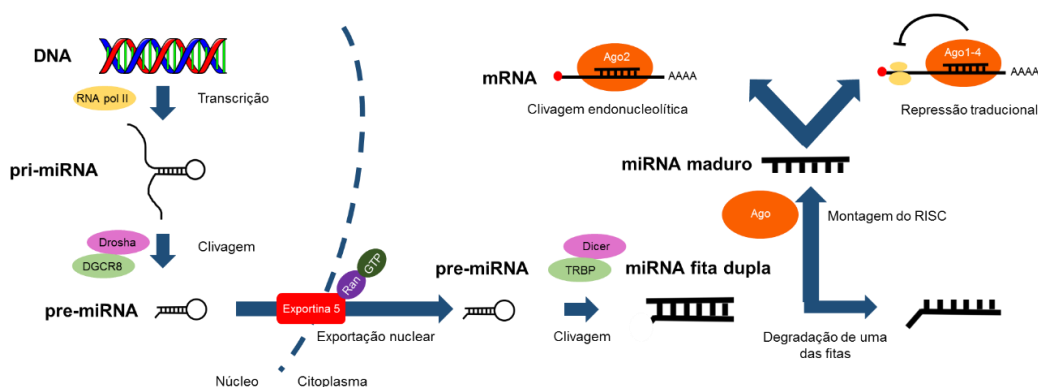


Figura 1 – Via de processamento de miRNA. A maturação de miRNA inclui a produção do seu transcrito primário (pri-miRNA) pela RNA polimerase II ou III e clivagem do pri-miRNA pelo complexo Droscha-DGCR8 no núcleo. O precursor resultante, o pre-miRNA, é exportado do núcleo pelo complexo exportina-5/Ran-GTP. No citoplasma, o pre-miRNA é clivado por outra enzima RNase tipo III, chamada Dicer. Como resultado, forma-se um RNA de dupla fita com cerca de 22 nucleotídeos. As duas fitas são separadas, mas apenas uma delas é estável para se associar às proteínas Argonauta no complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC). Nesse complexo, o miRNA orienta o RISC para silenciar mRNAs alvo através da clivagem, repressão traducional ou deadenilação (Adaptado de Ha e Kim, 2014).

O conhecimento do mecanismo de ação de miRNAs pode ajudar no melhor entendimento da sua função (JIN e XIAO, 2015; YAO, 2016), e uma maneira de determinar este mecanismo é analisando miRNAs associados a polissomos. Como polissomos possuem alto peso molecular, podem ser separados de RNA livre de ribossomos por centrifugação em gradientes de

densidade. A hipótese do trabalho é de que miRNAs a eles associados possivelmente ajam bloqueando a tradução (GU e KAY, 2010).

Muitos miRNAs são conhecidos como importantes reguladores do processo de autorrenovação bem como de diferenciação de células-tronco embrionárias (CTEs). Alguns já foram descritos como determinantes da diferenciação cardíaca, como o miR-1 e -133, que promovem a especificação mesodermal suprimindo outras linhagens (IZARRA *et al.*, 2014). Outro exemplo é a família let-7 de miRNAs, onde alguns membros, como let-7g, são necessários para a maturação de cardiomiócitos, estando envolvidos em processos que regulam tamanho celular, comprimento dos sarcômeros, força de contração e metabolismo celular (KUPPUSAMY *et al.*, 2015). Alguns miRNAs são agrupados em *cluster*, devido ao seu controle transcricional e organização genômica, assim sendo regulados de modo similar. Uma lista de alguns miRNAs descritos nos processos de autorrenovação e diferenciação cardiomiogênica de CTEs pode ser encontrada na **Tabela 1** e **Tabela 2**, respectivamente.

Tabela 1 – miRNAs envolvidos no processo de autorrenovação e pluripotência de células-tronco.

| miRNA | Função | Alvos conhecidos | Referências |
|--------------------------|--|--|---------------------------------|
| <i>let-7</i> | Inibe autorrenovação e promove diferenciação | cMyc, RAS, HMGA2 | BÜSSING, SLACK e GROßHANS, 2008 |
| <i>miR-17-92 cluster</i> | Regulação de processos como ciclo celular, proliferação e apoptose | E2F1, E2F2, E2F3, TGFBR2, Smad2, Smad4, p21, BIM, CTGF | MOGILYANSKY e RIGOUTSOS, 2013 |
| <i>miR-34</i> | Identificados como barreiras chave no processo de reprogramação celular; restringem o potencial de comprometimento das células | GATA2 | CHOI <i>et al.</i> , 2017 |
| <i>miR-145</i> | Inibição de marcadores de pluripotência de células-tronco | SOX2, OCT4, KLF4 e ABCG2 | KARATAS <i>et al.</i> , 2016 |
| <i>miR-195</i> | Regulação do ciclo celular em CTEs | Wee1 | MATHIEU e RUOHOLA-BAKER, 2013 |

| | | | |
|----------------------------|---|--|--|
| <i>miR-290-295 cluster</i> | Manutenção da pluripotência, regulação do ciclo celular em CTEs, inibe autofagia em células de melanoma | Rbl2, Wee1, Fbxl5, vários genes relacionados à autofagia | LICHNER <i>et al.</i> , 2011; CHEN, LIERSCH e DETMAR, 2012 |
| <i>miR-302-367 cluster</i> | Autorrenovação de CTEs humanas por regulação do ciclo celular e apoptose | Oct4, ciclina D2, BNIP3L/Nix, NR2F2 | HU <i>et al.</i> , 2013; ZHANG <i>et al.</i> , 2015 |
| <i>miR-371-373 cluster</i> | Homólogo ao miR-290-295 cluster, manutenção da pluripotência em CTEs humanas, controle do ciclo celular | Mbd2-Myc, CD44 | WU <i>et al.</i> , 2014; LANGROUDI <i>et al.</i> , 2015 |

Tabela 2 – miRNAs envolvidos no processo de diferenciação cardíaca.

| miRNA | Função | Alvos conhecidos | Referências |
|--|---|---------------------------------------|---|
| <i>let-7</i> | Maturação de cardiomiócitos, regulam tamanho celular, comprimento dos sarcômeros, força de contração e metabolismo celular | PI3K/AKT, EZH2, TRIM71 | KUPPUSAMY <i>et al.</i> , 2015 |
| <i>miR-1</i> | Proliferação e diferenciação de cardiomiócitos, modulação do crescimento do coração em desenvolvimento, inibição de apoptose em coração após infarto, angiogênese | HDAC4, FZD7, FRS2, Hand2, PTEN/AKT | GLASS e SINGLA, 2011; IANCU <i>et al.</i> , 2015 |
| <i>miR-15</i> | Proliferação celular em coração neonatal de ratos | Chek1 e outros genes do ciclo celular | PORRELLO, 2013 |
| <i>miR-19b</i> (<i>miR-17-92 cluster</i>) | Desenvolvimento cardíaco, proliferação e apoptose em linhagem P19 | Atrogin-1, MuRF-1, Wnt1 | SONG <i>et al.</i> , 2014; LIU <i>et al.</i> , 2015 |
| <i>miR-20a</i> (<i>miR-17-92 cluster</i>) | Desenvolvimento cardíaco, proliferação e apoptose em linhagem P19 | Smoothened | AI <i>et al.</i> , 2016 |
| <i>miR-99a/let-7c</i> | Controle da cardiomiogênese alterando fatores epigenéticos | Smarca5; Ezh2 | COPPOLA <i>et al.</i> , 2014 |
| <i>miR-124</i> | Transdiferenciação de células-tronco mesenquimais em cardiomiócitos | STAT3 | CAI <i>et al.</i> , 2012 |

| | | | |
|----------------------------|---|---|---|
| <i>miR-133</i> | Inibição da diferenciação cardíaca de células-tronco | SRF (serum response factor) | LIU <i>et al.</i> , 2008; ZHANG <i>et al.</i> , 2012 |
| <i>miR-133a</i> | Diferenciação cardíaca, melhora da capacidade protetiva de células progenitoras cardíacas após infarto do miocárdio | EGFR, Bmf e Bim (proteínas pró-apoptóticas) | LEE <i>et al.</i> , 2013; IZARRA <i>et al.</i> , 2014 |
| <i>miR-138</i> | Modulação do padrão cardíaco durante o desenvolvimento embrionário | Raldh2 (síntese de ácido retinoico), Cspg2 | MORTON <i>et al.</i> , 2008 |
| <i>miR-199</i> | Reentrada no ciclo celular e citocinese em cardiomiócitos adultos <i>in vitro</i> | Homer1, Hopx | EULALIO <i>et al.</i> , 2012; PORRELLO, 2013 |
| <i>miR-208a</i> | Desenvolvimento do sistema de condução cardíaco | Hop, GATA4, conexina 40 | PORRELLO, 2013 |
| <i>miR-218</i> | Modulação de Wnt em células-tronco cardíacas, promovendo proliferação e inibindo diferenciação | sFRP2 (regulador negativo de Wnt) | WANG <i>et al.</i> , 2016 |
| <i>miR-222</i> | Hipertrofia e proliferação <i>in vitro</i> de cardiomiócitos | p27, HIPK1, HMBOX1 | LIU <i>et al.</i> , 2015 |
| <i>miR-223</i> | Regula metabolismo glicolítico em cardiomiócitos | Glut4, NFIA | LU, BUCHAN e COOK, 2010 |
| <i>miR-322-503 cluster</i> | Comprometimento com a diferenciação cardíaca | Celf1 - RNA binding protein | SHEN <i>et al.</i> , 2016 |
| <i>miR-499</i> | Diferenciação cardíaca | FZD8, TGFB1, FZD4 | WILSON <i>et al.</i> , 2010; KOCHGAROV <i>et al.</i> , 2015 |
| <i>miR-590</i> | Reentrada no ciclo celular e citocinese em cardiomiócitos adultos <i>in vitro</i> | Homer1, Hopx | EULALIO <i>et al.</i> , 2012; PORRELLO, 2013 |
| <i>miR-708</i> | Diferenciação de células progenitoras cardíacas em ratos | PPAR α , N-Ras, Mtss1 | DENG <i>et al.</i> , 2016 |

No entanto, o mecanismo de ação de diversos miRNAs ainda não é conhecido, e muitos outros ainda não foram descritos (FRIEDLÄNDER *et al.*, 2014). Para o estudo de miRNAs envolvidos na diferenciação cardíaca, células-

tronco são ferramentas extremamente úteis para mimetizar o desenvolvimento embrionário e amplamente utilizadas para tal.

1.2 Células-tronco

Células-tronco são células caracterizadas por sua capacidade de autorrenovação prolongada e de diferenciação em inúmeras linhagens celulares. Estas propriedades as tornam atrativas para uma série de aplicações clínicas e farmacológicas (FERNANDES, DIOGO e CABRAL, 2013). Células-tronco podem ser derivadas de embrião, mais especificamente da massa interna do blastocisto, constituindo as chamadas CTEs, e de feto ou adulto, sendo estas duas últimas chamadas de células-tronco adultas ou somáticas. Células adultas podem ainda ser reprogramadas geneticamente para apresentar um comportamento similar ao de CTEs, constituindo as células-tronco pluripotente induzidas (SHERMAN, 1975; WAGERS e WEISSMAN, 2004; TAKAHASHI e YAMANAKA, 2006).

Células-tronco de diferentes origens apresentam suas próprias características e todas têm vantagens e desvantagens para uso em pesquisa e terapia (REED *et al.*, 2013). De fato, terapia com células-tronco tem sido uma grande promessa para o tratamento de uma série de doenças, e o maior entendimento dessas células também tem mudado o modo como doenças são vistas, principalmente pela obtenção de tipos celulares que são difíceis de isolar do organismo (SANDERS, 2012). Um bom exemplo é a obtenção de neurônios de pacientes com esquizofrenia a partir do processo de reprogramação somática, permitindo o melhor estudo desse distúrbio.

CTEs, por serem pluripotentes, apresentam um enorme potencial de diferenciação e são usadas em diferentes laboratórios para a obtenção de diversos tipos celulares, incluindo cardiomiócitos, visando tanto a melhor compreensão da sua biologia básica como o uso em medicina regenerativa (PAWANI e BHARTIYA, 2013). A linhagem de CTEs humanas (h32.5) aqui utilizada possui a sequência codificante de GFP (*green fluorescent protein*) introduzida no locus do gene NKX2-5, como descrito por Elliott *et al.* (2011). NKX2-5 é um fator de transcrição altamente conservado entre as espécies de vertebrados e um dos mais antigos marcadores conhecidos de desenvolvimento

cardíaco (SCHWARTZ e OLSON, 1999). O uso desta estratégia facilita a avaliação da diferenciação cardiomiogênica de CTEs, bem como a sua quantificação.

2. JUSTIFICATIVA

Células-tronco embrionárias têm sido amplamente utilizadas no estudo do processo de cardiomiogênese, permitindo o entendimento das vias que promovem diferenciação, sobrevivência ou regeneração de cardiomiócitos, e visando aplicações clínicas (LIU *et al.*, 2015). Recentemente, pequenos RNAs não codificantes chamados miRNAs foram descritos como importantes reguladores da expressão gênica e demonstraram ter um papel importante na diferenciação cardiomiogênica (IZARRA *et al.*, 2014), porém pouco se sabe sobre seu mecanismo de ação e função. Além disso, muitos miRNAs ainda não foram descritos e esse conhecimento é essencial, visto que eles também podem ser alvos terapêuticos no caso de doenças cardiovasculares (DIMMELER, 2011). Atualmente, muitos esforços têm sido feitos para encontrar miRNAs específicos em CTEs, assim sugerindo o papel destes miRNAs em células-tronco e nos eventos iniciais da diferenciação (LICHNER *et al.*, 2011).

Um modo de estudar o mecanismo de ação de miRNAs é analisando a sua associação a polissomos: miRNAs associados a eles possivelmente agem regulando a tradução (GU e KAY, 2010). Assim, identificar miRNAs diferencialmente expressos em pontos distintos da diferenciação cardiomiogênica, seja livres no citoplasma ou associados a polissomos, permite avançar na compreensão dos mecanismos de ação deste miRNAs e, conseqüentemente, de mecanismos moleculares que regulam o processo de cardiomiogênese.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a expressão e a associação a polissomos de miRNAs ao longo da diferenciação cardiomiogênica da linhagem h32.5 de CTEs humanas.

3.2 Objetivos específicos

- Diferenciar CTEs em cardiomiócitos e avaliar essas células no dia inicial (D0 - células indiferenciadas), 1º (D1 - corpos embrióides), 4º (D4 - mesoderme), 9º (D9 - progenitores cardíacos) e 15º (D15 - cardiomiócitos) dia do protocolo de diferenciação;
- Avaliar o perfil polissomal das células nos tempos da diferenciação mencionados acima;
- Confirmar a extração de miRNAs nas frações livre, monossomal e polissomal e avaliar sua expressão durante a diferenciação cardiomiogênica por qRT-PCR;
- Confirmar a associação a polissomos por qRT-PCR de alguns miRNAs selecionados, usando inibidores da tradução.

4. METODOLOGIA

4.1 Cultivo de CTEs

A linhagem de células-tronco embrionárias h32.5 foi cultivada sobre uma camada de fibroblastos embrionários murinos irradiados (iMEF – *irradiated murine embryonic fibroblast*) para manter o estado indiferenciado. Este co-cultivo foi mantido na forma de monocamada em placa aderente utilizando-se meio hES composto por *Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12* (DMEM F12) suplementado com 20% de *KnockOut™ Serum Replacement* (Gibco™ KSR), 0,1 mM de aminoácidos não essenciais, 0,1 mM de β-mercaptoetanol, 100 µg/mL de estreptomicina, 100 U/mL de penicilina, 2 mM de L-glutamina e 10 ng/mL de bFGF.

4.2 Diferenciação cardiomiogênica de CTEs

As células h32.5 foram submetidas à diferenciação cardíaca de acordo com protocolo já padronizado no laboratório. Inicialmente, 700.000 células foram plaqueadas por poço sobre uma camada de matrigel (*Growth Factor Reduced BD® Matrigel Matrix*) e mantidas com meio hES até confluência de 90%. Ao atingir esta confluência, elas foram incubadas com colagenase I (1 mg/mL) e tripsina-EDTA (0,05% p/v – 0,02% p/v) para desprendimento, com posterior remoção e inativação da tripsina. Raspagem mecânica foi feita para o desprendimento completo da monocamada e o meio contendo as células foi coletado e centrifugado (230 x g por 5 min). As células precipitadas foram então ressuspendidas em meio de formação de corpos embrióides (CEs) (StemPro34 Gibco® suplementado com 100 µg/mL de estreptomicina, 100 U/mL de penicilina, 2 mM de L-glutamina, 150 µg/mL de transferrina, 50 µg/mL de ácido ascórbico, 0,09 µL/mL de monotioglicerol e 1 ng/mL BMP4). A suspensão de células foi plaqueada em placa de 6 poços não aderente (*Ultralow Attachment Corning®*) e incubada em estufa com 5% de CO₂, 5% de O₂ (hipóxia) a 37 °C por 24 horas para o processo de agregação que ocorre do dia inicial ao primeiro dia (D0 – D1). No dia seguinte (D1), os CEs já formados foram decantados em tubo de fundo redondo de 12 mL por 40 min a 37 °C. O sobrenadante foi gentilmente retirado e os CEs foram ressuspendidos em meio base enriquecido com BMP4

(10 ng/mL), Activina A (6 ng/mL) e bFGF (5 ng/mL) e incubados para indução das células da linha primitiva e formação do mesoderma em estufa com 5% de CO₂, 5% de O₂ (hipóxia) a 37 °C. No dia D4, CEs foram novamente decantados em tubo de fundo redondo por 20 min a 37 °C, o sobrenadante foi retirado e os CEs foram ressuspensos em meio base enriquecido com VEGF (10 µg/mL) e XAV 939 (10 µM) para indução à progenitores cardíacos e inibição da via canônica de Wnt. A partir do quarto dia após a etapa anterior (D8 em diante), os CEs foram ressuspensos em meio base enriquecido com VEGF (10 µg/mL), onde foram mantidos com troca de meio de cultura a cada 72 h para formação de cardiomiócitos pulsantes (D15).

4.3 Citometria de fluxo

As células submetidas à diferenciação foram analisadas por citometria de fluxo (FACS Calibur, BD Biosciences) utilizando marcação para CD56 (NCAM), troponina-T cardíaca (cTnT) e expressão de NKX2-5-GFP na população. Alíquotas de 150 µL contendo CEs em diferenciação nos dias D3 e D4 foram coletadas, centrifugadas 300 x g por 5 min e incubadas com tripsina-EDTA (0,05% p/v – 0,02% p/v) por 5 min para dissociação. As células foram incubadas com o anticorpo anti-CD56 marcado com PE-A (2:50) em PBS/BSA 0,5% por 20 min, lavadas e ressuspensas em PBS/BSA 0,5%. Em D9, após a dissociação, as células foram ressuspensas em PBS 1X para avaliação da expressão de GFP. Em D15, os CEs foram coletados, centrifugados e incubados com tripsina por 20 min para dissociação. As células foram fixadas com paraformaldeído 4% por 20 min e permeabilizadas com Triton 0,5% por 20 min. Foram então incubadas com o anticorpo primário anti-troponina T (1:100) por 30 min e com o fluoróforo Alexa Fluor 633 (1:1000) por 30 min.

4.4 Microscopia de fluorescência

As células diferenciadas foram visualizadas no microscópio óptico de fluorescência (Leica DMI6000B), sem fixação, e a aquisição de imagens foi realizada utilizando-se o software LAS AF.

4.5 Perfil polissomal das CTEs

O perfil de sedimentação de polissomos foi obtido através de centrifugação de extratos celulares em gradientes de sacarose, como descrito por Spangenberg *et al.* (2013).

4.5.1 Lise celular

Tratamento com cicloheximida: Células foram coletadas e incubadas com cicloheximida (0,1 mg/mL) por 10 min a 37 °C. Em seguida, as mesmas foram dissociadas com tripsina-EDTA por 5 min, lavadas com PBS 1X/cicloheximida (0,1 mg/mL) e ressuspendidas em tampão de lise contendo tampão polissomal (Tris-HCl 15 mM pH 7,4, MgCl₂ 15 mM, NaCl 0,3 M), cicloheximida 0,1 mg/mL, RNase Out 40U/μL (Invitrogen), Triton X-100 1% e DNase 24 U/ml (ThermoFischer), com incubação por 10 min a 4 °C.

Tratamento com puromicina: Células foram dissociadas com tripsina-EDTA por 5 min, lavadas com PBS 1X e ressuspendidas em tampão de lise contendo tampão polissomal, puromicina 2 mg/mL, RNase Out 40U/μL, Triton X-100 1% e DNase 24 U/mL, com incubação por 10 min a 4 °C seguida de 20 min a 37 °C.

Tratamento com EDTA: Células foram dissociadas com tripsina-EDTA por 5 min, lavadas com PBS 1X e ressuspendidas em tampão de lise contendo tampão polissomal, EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) 100 mM, RNase Out 40U/μL, Triton X-100 1% e DNase 24 U/mL, com incubação por 30 min a 4 °C.

Os extratos celulares foram então centrifugados a 12000 x g por 10 min a 4° C e o sobrenadante foi utilizado em seguida.

4.5.2 Separação dos polissomos por gradiente de sacarose

Foram utilizados gradientes de sacarose 10%-50% feitos com o equipamento Gradient Master (BioComp Instruments Inc.). Os lisados celulares provenientes de diferentes tempos do protocolo de diferenciação cardíaca (D0, D4, D9 e D15) foram submetidos à ultracentrifugação (39000 rpm por 2 h a 4 °C) no gradiente de sacarose 10%-50% para separação das frações ribossomais. Após a

centrifugação dos gradientes, 500 µL de cada fração foram coletados utilizando o equipamento ISCO Gradient Former. Este equipamento destina-se à coleta e quantificação de frações de gradientes de densidade e fornece um perfil de absorbância contínuo (filtro 254 nm) à medida que as frações são coletadas. As frações correspondentes aos RNAs livres, monossomais e associados aos polissomos foram submetidas à extração de RNA total. As amostras foram quantificadas no aparelho NanoDrop ND-1000 e armazenadas a -80°C.

4.6 Extração de RNA

Ao material proveniente das frações adicionou-se o mesmo volume de TRIzol® e em seguida clorofórmio (200 uL de clorofórmio para cada mL de TRIzol®). A fase aquosa foi separada por centrifugação a 4.800 x *g* por 15 min a 4 °C. Após a coleta da fase aquosa, foi adicionado etanol absoluto (2,5 vezes o volume da fase aquosa) e acetato de sódio 3 M (10% da fase aquosa). As amostras foram incubadas por 16 h e centrifugadas a 4,800 x *g* por 30 min a 4 °C. O pellet de RNA foi lavado com etanol 80%, e o material foi incubado a 65°C para completa eliminação do etanol, sendo então ressuspendido em água ultra pura.

4.7 Retro-transcrição e PCR quantitativa

4.7.1 Adição de cauda poli-A

Para a reação de adição de cauda poli-A na porção 3' de cada molécula de miRNA maduro, 20-1000 ng de RNA total foi incubado com os reagentes do kit *High Specificity miRNA 1st-Strand cDNA Synthesis* (Agilent Technologies), de acordo com as instruções do fabricante.

4.7.2 Síntese do DNA complementar

Após a reação de adição de cauda poli-A, o RNA poliadenilado foi usado como molde para a síntese do DNA complementar (cDNA), utilizando os reagentes do kit *miRNA High Specificity miRNA 1st-Strand cDNA Synthesis* (Agilent Technologies), de acordo com as instruções do fabricante. O processo de síntese de cDNA a partir de miRNAs é esquematizado na **Figura 2**.

4.7.3 PCR quantitativa (qPCR)

A análise quantitativa das amostras de cDNA através da reação de qPCR foi realizada utilizando o equipamento LightCycler® 96 (ROCHE). As amplificações foram conduzidas em um volume final de reação de 10 µL. Foi utilizada a mistura master mix *SYBR Green* (Applied Biosystems), oligonucleotídeo *forward* (F), que corresponde ao próprio miRNA (sequências na **Tabela 3**, obtidas no banco de dados miRBase; foram escolhidos quatro miRNAs dentre todos os listados na **Tabela 1** e na **Tabela 2**), oligonucleotídeo *reverse* (R) (componente do kit *1st-Strand cDNA Synthesis*) e água (**Fig. 2**). As condições de PCR incluíram uma etapa inicial de desnaturação a 95°C por 2 min, seguida por 55 ciclos de 95°C por 15 s, 60°C por 30 s e 72°C por 30 s para extensão. Os dados foram adquiridos no software LC96 (ROCHE) e as análises feitas no software GraphPad Prism 5.

4.7.4 Normalização da qPCR

O spike-in cel-miR-39-3p de *C. elegans* foi escolhido para normalização da qPCR (VIGNERON *et al.*, 2016). A cada 1000 ng de RNA total usado na adição de cauda poli A, foram utilizados 3.2×10^8 cópias do spike-in. A sequência do primer *forward* do spike-in é TCACCGGGTGTAATCAGCTTG. Para testes, foi também utilizado o U6snRNA, cuja sequência do primer *forward* é CTCGCTTCGGCAGCACATATACT.

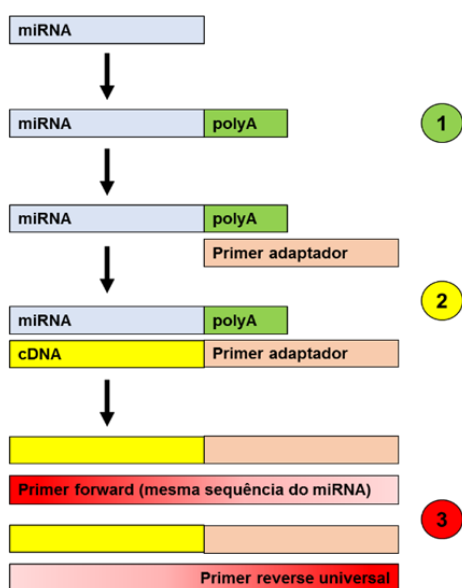


Figura 2 – Processo de adição de cauda poli-A (1), síntese de DNA complementar (2) e PCR em tempo real (qRT-PCR) (3) de miRNAs. Adaptado de Roberge *et al.* (2013).

Quadro 1 – Sequências de miRNAs que foram utilizados na qPCR.

| <i>miRNA</i> | <i>Sequência (5'-3')</i> |
|------------------------|--------------------------|
| hsa-miR-133a-5p | AGCTGGTAAAATGGAACCAAAT |
| hsa-miR-302-5p | ACTTAAACGTGGATGTACTTGCT |
| hsa-miR-371a-5p | ACTCAAACGTGGGGGCACT |
| hsa-miR-503-5p | TAGCAGCGGGAACAGTTCTGCAG |

4.7.5 Análise da qPCR

Para análise da expressão gênica por qPCR foi utilizado o método delta-delta Cq ($\Delta\Delta Cq$). O valor de Cq de cada amostra foi normalizado utilizando a média geométrica dos valores de Cq do gene de referência, o spike-in cel-miR-39-3p. Após determinação do ΔCq da amostra, a amostra normalizadora foi escolhida de acordo com o experimento. Para o cálculo do $\Delta\Delta Cq$, utilizou-se a fórmula: [$\Delta Cq(\text{amostra}) - \Delta Cq(\text{amostra normalizadora})$]. Uma vez determinado o valor de $\Delta\Delta Cq$, foi aplicada a fórmula $2^{-\Delta\Delta Cq}$, que resulta no valor da expressão gênica relativa, ou *fold change*.

5. RESULTADOS

5.1 Desenho experimental

O objetivo do trabalho consistiu em avaliar a associação de alguns miRNAs a polissomos, durante a diferenciação cardiomiogênica de uma linhagem de hCTEs. No entanto, nossa primeira dúvida foi se a extração destes miRNAs seria possível, visto o tamanho e a abundância dos mesmos no *pool* de RNA obtido da fração polissomal. Quatro miRNAs foram escolhidos para terem sua expressão analisada por qPCR – dois miRNAs expressos em CTEs e dois expressos em progenitores cardíacos. Uma série de padronizações foi realizada e, após ser confirmada a obtenção dos miRNAs, a associação a polissomos destes miRNAs foi avaliada usando a técnica de *polysome profiling*, fazendo uso de diferentes inibidores da tradução. Estes inibidores foram cicloheximida, puromicina e EDTA. Cicloheximida é um inibidor da etapa de alongação do processo de tradução, estabilizando os polissomos por se ligar no sítio E dos ribossomos, imobilizando-os. Puromicina, por outro lado, age como um análogo de tRNA, liberando a cadeia peptídica nascente no sítio P do ribossomo, assim dissociando-o (LIU e QIAN, 2016). Por fim, EDTA é um composto orgânico que age como quelante, formando complexos muito estáveis com diversos íons metálicos, como magnésio e cálcio; magnésio é um íon essencial na estabilização de polissomos, por exemplo. Desse modo, na presença de EDTA, os polissomos são desfeitos, bem como outros complexos multiproteicos também dependentes de íons metálicos (BALZER e MOSS, 2007). Consequentemente, RNAs da fração polissomal passam a ser encontrados na fração livre e/ou monossomal, e por este motivo optou-se pela extração dos RNAs não apenas da fração associada a polissomos, mas também das frações livre e associada a monossomos (**Fig. 3**).

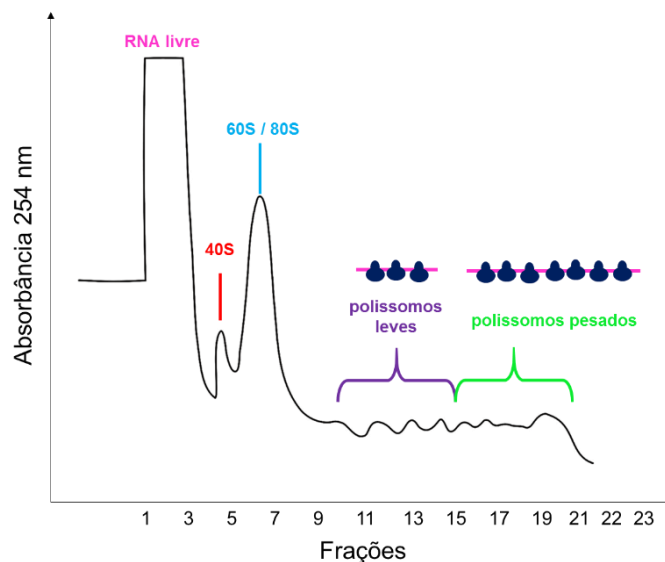


Figura 3 – Exemplo do perfil de absorvância (filtro 254 nm) gerado pelo equipamento ISCO. Este gráfico foi gerado após tratamento de CTEs (D0 da diferenciação) com cicloheximida, com destaque para as frações de RNA que foram extraídas – RNA livre, monossomal (40S, 60S e 80s), associado a polissomos leves e associado a polissomos pesados.

Sendo assim, o projeto consistiu na diferenciação cardiomiogênica de CTEs da linhagem h32.5 e extração de RNA associado a polissomos em D0 (CTEs) e D9 (progenitores cardíacos). As células foram tratadas com cicloheximida, puromicina ou EDTA, e as quatro frações (livre, monossomal, polissomos leves e polissomos pesados) foram extraídas, submetidas à adição de cauda poli A, síntese de cDNA e qPCR para posterior análise.

5.2 Padronização da extração de RNA

Inicialmente, cinco diferentes protocolos de extração de RNA foram testados nas CTEs indiferenciadas (D0) (**Tabela 4**), três deles referentes à extração de RNA polissomal e dois de RNA total. O objetivo do teste era garantir que miRNAs estivessem sendo efetivamente extraídos nas frações polissomais; a fração total foi o controle positivo. Após a extração, foi realizada a dosagem de RNA no aparelho NanoDrop ND-100; a pureza das amostras também foi avaliada. O protocolo 3 foi eliminado devido à baixa pureza, bem como por apresentar o menor rendimento na extração. As amostras provenientes dos protocolos 1, 2, 4 e 5 foram submetidas à adição de cauda poli-(A) (usando 1 µg de RNA para cada

amostra), síntese de cDNA e qPCR para avaliar a expressão dos 4 miRNAs listados.

Tabela 3 – Breve descrição dos protocolos testados para a extração de RNA polissomal e RNA total de CTEs.

| Protocolo | RNA | Extração |
|-----------|------------|---|
| 1 | Polissomal | Uso do kit Direct-zol RNA MiniPrep (catalog no. R2050). Foram seguidas as instruções do fabricante (Zymo Research) |
| 2 | Polissomal | Adição de TRIzol (mesmo volume da amostra), clorofórmio (200 µL para cada mL de TRIzol), centrifugação, separação da fase aquosa, adição de EtOH 100% (2,5 x o volume da fase aquosa) e NaAc 3M (10% do volume da fase aquosa), precipitação por 16 h a -20 °C, centrifugação, lavagem com EtOH 80%, secagem e adição de água livre de RNases |
| 3 | Polissomal | Adição de TRIzol (mesmo volume da amostra), clorofórmio (200 µL para cada mL de TRIzol), centrifugação, separação da fase aquosa, adição de isopropanol (500 µL para cada mL de TRIzol), centrifugação, lavagem com EtOH 75% (1 mL para cada mL de TRIzol), secagem e adição de água livre de RNases |
| 4 | Total | Uso do kit miRCURY RNA Isolation. Foram seguidas as instruções do fabricante (QIAGEN) |
| 5 | Total | Adição de TRIzol (mesmo volume da amostra), clorofórmio (200 µL para cada mL de TRIzol), centrifugação, separação da fase aquosa, adição de EtOH 100% (2,5 x o volume da fase aquosa) e NaAc 3M (10% do volume da fase aquosa), precipitação por 16 h a -20 °C, centrifugação, lavagem com EtOH 80%, secagem e adição de água livre de RNases |

Foi feita a análise do RNA extraído através do kit *Agilent RNA 6000 Nano*, mostrando a presença de 3 picos definidos, como esperado (um proveniente do marcador e dois picos ribossomais) (**Fig. 4**). A análise do cDNA proveniente das extrações também foi feita, utilizando o kit *Agilent High Sensitivity DNA* (Agilent Technologies), com a leitura do chip sendo feita no equipamento Agilent 2100 Bioanalyzer (**Fig. 5**). É possível observar a banda correspondente ao cDNA de miRNAs com cauda poli A. Na **Tabela 5** são encontrados os valores de Cq (*quantification cycle*) provenientes da qPCR feita com o RNA extraído de acordo com os protocolos 1, 2, 4 e 5. Observa-se que os miRNAs foram extraídos e

amplificados com sucesso, incluindo nas frações polissomais. Para os posteriores experimentos, foi então escolhido o protocolo 2 de extração, por ter apresentado bons resultados e ser mais prático ao trabalhar com várias amostras.

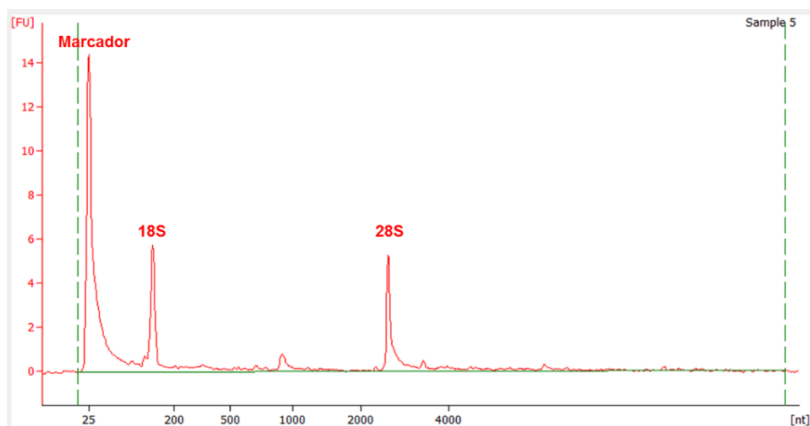


Figura 4 – Eletroferograma obtido com o kit *Agilent RNA 6000 Nano*, no equipamento *Agilent 2100 Bioanalyzer*, a partir de amostra de RNA de CTEs da linhagem h32.5. O RNA foi extraído usando o protocolo 2. Observa-se no gráfico o padrão esperado (um pico proveniente do marcador e dois picos ribossomais).

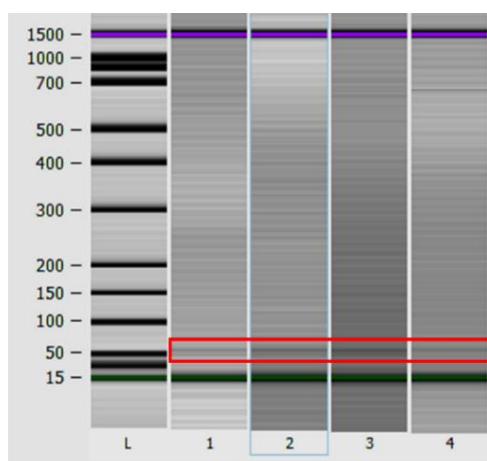


Figura 5 – Análise do cDNA proveniente das extrações, utilizando o equipamento *Agilent 2100 Bioanalyzer*. Observa-se que miRNAs com cauda poli (A) foram convertidos a cDNA com sucesso, por meio do kit *miRNA 1st-Strand cDNA Synthesis* (*Agilent Technologies*) (caixa vermelha). L- ladder; amostra 1- protocolo 5; amostra 2- protocolo 4; amostra 3- protocolo 1; amostra 4- protocolo 2.

Tabela 4 – Valores de Cq resultantes da qPCR feita com RNAs de CTEs não diferenciadas e purificados com diferentes protocolos de extração.

| | Protocolo 1 | Protocolo 2 | Protocolo 4 | Protocolo 5 |
|-----------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| miR-302 | 32.46 | 30.79 | 28.93 | 30.98 |
| | 32.54 | 31.97 | 30.25 | 33.40 |
| miR-133a | 47.54 | 49.36 | 46.01 | 47.22 |
| | - | 44.12 | 46.14 | 46.67 |
| miR-371 | 34.47 | 33.03 | 34.01 | 33.97 |
| | 33.96 | 32.84 | 33.60 | 33.80 |
| miR-503 | 35.35 | 35.12 | 35.37 | 35.18 |
| | 35.64 | 35.26 | 35.42 | 35.06 |

5.3 Normalização dos níveis de expressão de miRNA em qPCR

Muito se discute sobre a normalização de qPCR para miRNAs, visto que não se conhece um miRNA constitutivo como GAPDH ou β -actina, no caso de mRNA (PELTIER e LATHAM, 2008; MESTDAGH *et al.*, 2009). Neste trabalho, foi utilizado o spike-in cel-miR-39-3p (QIAGEN) como normalizador, sendo que a sua adição foi realizada antes da síntese da cauda poli (A). Alguns testes foram realizados usando U6snRNA; no entanto, com o tratamento com puromicina e EDTA, a expressão dos RNAs celulares também é alterada nas diferentes frações (livre, monossomal e polissomal). Por este motivo, o spike-in foi considerado a melhor opção.

Foram testadas diferentes concentrações de spike-in ($1,6 \times 10^7$, 8×10^7 , $1,6 \times 10^8$, $3,2 \times 10^8$ e $6,4 \times 10^8$ cópias do spike para cada 1000 ng de RNA) e de primers para detecção na qPCR (2, 3,75, 5 e 8 μ M de primer *forward* e *reverse*). Também foram testadas diferentes concentrações de RNA total no momento da adição da cauda poli (A), a fim de garantir a detecção do spike independentemente da quantidade de RNA utilizada. Estas concentrações variaram de 20 a 1000 ng. Após todos os testes, observou-se que as melhores condições foram $3,2 \times 10^8$ cópias do spike-in para cada 1000 ng de RNA, utilizando 3,75 μ M de primer para a qPCR.

No momento da qPCR é utilizado um primer *reverse* universal, proveniente do kit *High Specificity miRNA 1st-Strand cDNA Synthesis*. No entanto, o primer normalmente acaba antes dos demais reagentes do kit,

limitando as reações de qPCR. Por isso, alguns experimentos no trabalho também incluíram testes com uma outra sequência não comercial de primer adaptador, na RT-PCR, e primer *reverse*, na qPCR. As sequências (5'-3') destes primers foram CTCTCAAGGATCTTACCGCTTTTTTTTTTTTTTTTTTNN, para o primer adaptador, e CTCTCAAGGATCTTACCGC, para o primer *reverse*. Diferentes temperaturas e tempos foram testados, tanto para síntese de cDNA como para a PCR quantitativa; no entanto, a amplificação não se mostrou eficiente em nenhuma condição testada, o que sugere que no momento de adição de cauda poli A, também é adicionada uma outra sequência que se anela especificamente ao primer adaptador do kit.

5.4 CTEs são eficientemente diferenciadas a cardiomiócitos

Para a diferenciação cardiomiogênica de CTEs, normalmente são moduladas as vias Wnt, BMP, FGF, TGF β e outras, mimetizando o desenvolvimento embrionário do coração (LOH *et al.*, 2016). Diferentes protocolos são encontrados a fim de promover a diferenciação cardiomiogênica de CTEs, e a diferenciação aqui realizada se caracteriza pela formação de estágios intermediários em dias específicos. Entre os componentes do meio de cultivo celular estão fatores indutores (descritos na seção 4.2) que direcionam a diferenciação destes intermediários, regulando vias de transdução de sinal específicas. Desse modo, em D0 as células estão indiferenciadas (CTEs), em D1 ocorre a formação de corpos embrióides, em D4 há a presença de uma população mesodermal, em D9 progenitores cardíacos e em D15 cardiomiócitos imaturos (**Fig. 6**).

Em toda diferenciação realizada, as células são avaliadas por citometria de fluxo em D3/D4, D9 e D15. O comprometimento de células embrionárias humanas pluripotentes para linhagem mesodérmica é representado pela expressão de CD56 (NCAM) (EVSEENKO *et al.*, 2010). A expressão de CD56 em pelo menos 40% da população em D4 indica que o protocolo de diferenciação está funcionando e é um requisito para podermos prosseguir com o experimento.

Como já mencionado, a linhagem h32.5 possui a sequência codificante de GFP introduzida ao locus do gene NKX2-5 (ELLIOTT *et al.*, 2011). Sendo assim, como a partir de D9 os progenitores cardíacos começam a expressar

NKX2-5, a presença de GFP se torna muito útil para avaliar a eficiência da diferenciação. Em D9, espera-se que cerca de 50% das células estejam expressando NKX2-5-GFP. Neste ponto, alguns CEs em diferenciação já começam a pulsar. Finalmente, em D15, grande parte dos cardiomiócitos derivados de CTEs são pulsantes e foi feita nova citometria para verificar a expressão de troponina T cardíaca (cTnT), um marcador de cardiomiócitos. A população apresenta entre 50-80% de células cTnT⁺, e entre 50-80% de células NKX2-5-GFP⁺, representando uma boa eficiência de diferenciação (acima de 50%). Uma análise representativa da citometria é representada na **Figura 7**.

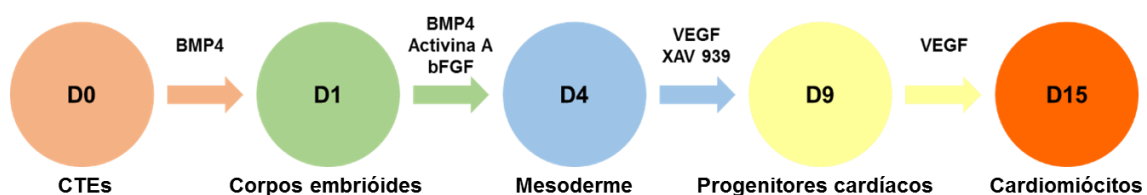


Figura 6 – Diagrama esquemático da diferenciação cardiomiogênica de hCTEs. Os fatores sobre as setas são adicionados ao longo da diferenciação. D0 = dia 0; D1 = dia 1; D4 = dia 4; D9 = dia 9; D15 = dia 15.

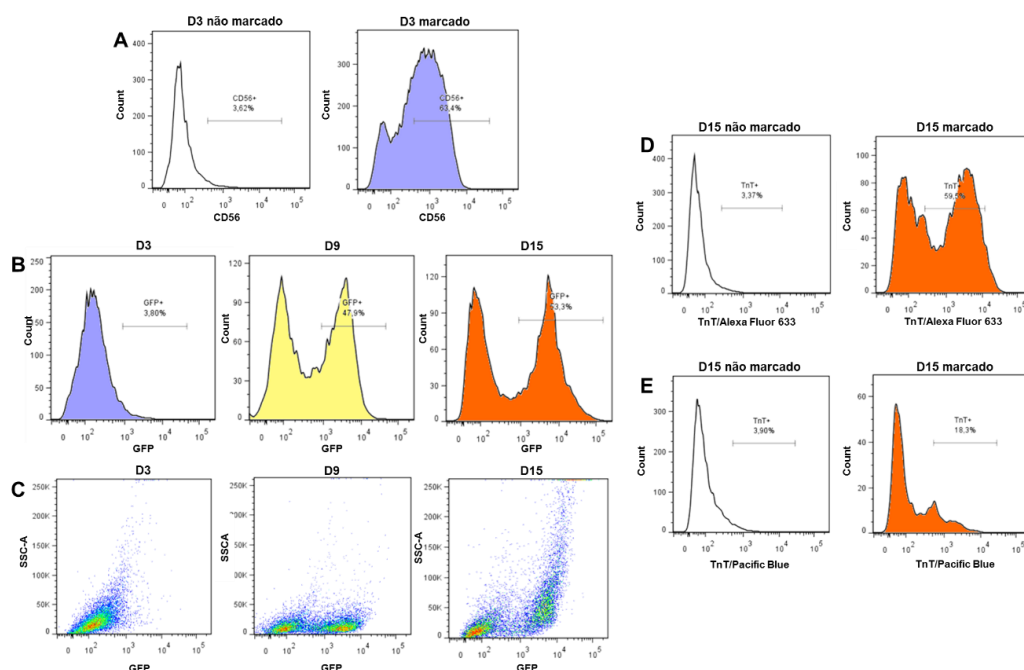


Figura 7 – Análise por citometria de fluxo representativa de uma diferenciação. **A)** Em D3, 63,4% das células já expressavam CD56. **B)** e **C)** representam a expressão de NKX2-5-GFP em D3, D9 e D15, demonstrada em histograma e *dot-plot*, respectivamente. A existência de duas populações, uma expressando NKX2-5-GFP e outra não, se torna evidente a partir de D9. **D)** e **E)** mostram a expressão de TnT em D15, usando dois anticorpos secundários diferentes. Observa-se que o fluoróforo Alexa Fluor 633 (**D)** é melhor que Pacific Blue (**E)** para esta análise.

A morfologia das células muda no decorrer da diferenciação, com os CEs se tornando maiores e pulsantes. Na **Figura 8**, são demonstradas fotos representativas das células em diferentes momentos da diferenciação cardiomiogênica, bem como das células h32.5 indiferenciadas, em co-cultivo com MEFs. As células em D15 são também observadas em microscópio de fluorescência para análise da expressão de NKX2-5-GFP (**Fig. 9**). Ao lado da **Figura 9**, encontra-se um vídeo dos cardiomiócitos contraindo (o vídeo requer conexão com a internet para ser visualizado).

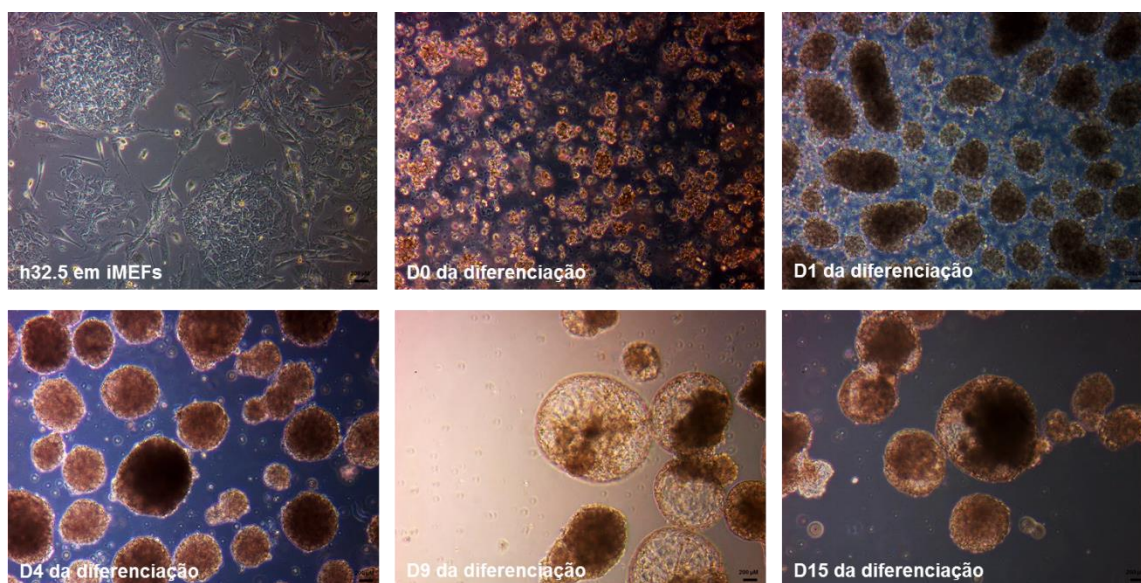


Figura 8 – Painel de fotos das células. São mostradas as células h32.5 em co-cultivo com MEFs (para crescimento), e durante a diferenciação cardiomiogênica (em D0, D1, D4, D9 e D15). A barra de escala representa 200 µm.

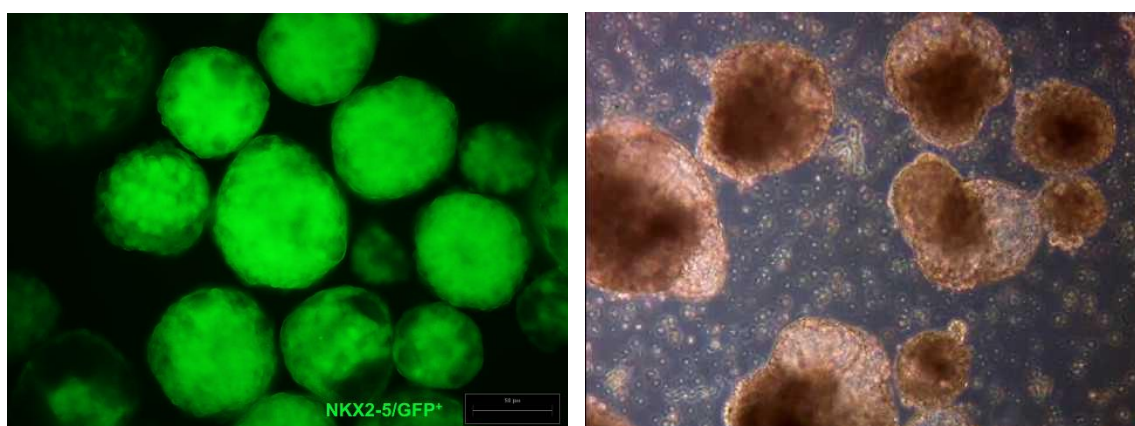


Figura 9 – Células em D15. À esquerda, células expressando NKX2-5-GFP foram visualizadas em microscópio de fluorescência. Ao lado, vídeo de CEs pulsando (o vídeo requer conexão com a internet para ser visualizado).

5.5 O processo de diferenciação cardiomiogênica resulta na redução da atividade de tradução das células

O perfil polissomal obtido pode ser usado para o diagnóstico de alguns aspectos do estado traducional da célula. O carregamento de mRNA nos ribossomos, representado pela quantidade de polissomos, é um modo de avaliar esta atividade traducional (SUNNERHAGEN, 2007). Como mostrado na **Figura 10**, há uma aparente redução na porção de ribossomos traducionalmente ativos ao longo da diferenciação. De fato, após a quantificação das áreas correspondentes ao RNA monossomal e polissomal utilizando o programa ImageJ, observa-se que a razão RNA polissomal/monossomal diminui durante a diferenciação (**Fig. 11**), o que sugere uma redução global da atividade de tradução das células. Tal processo já foi descrito durante a diferenciação de monócitos para macrófagos e diferenciação neural de CTEs, por exemplo (MIYATA *et al.*, 2008; YOU, PARK e KIM, 2015).

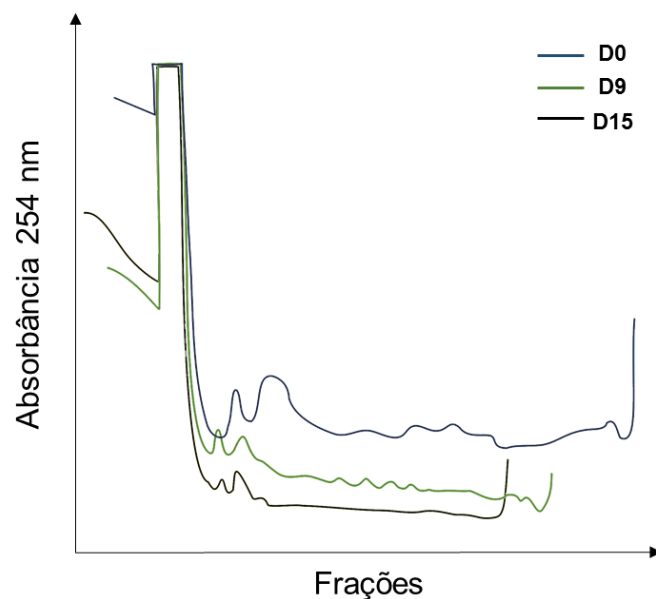


Figura 10 – Imagens representativas do perfil polissomal das células h32.5 em diferentes tempos de diferenciação cardiomiogênica (D0, D9 e D15).

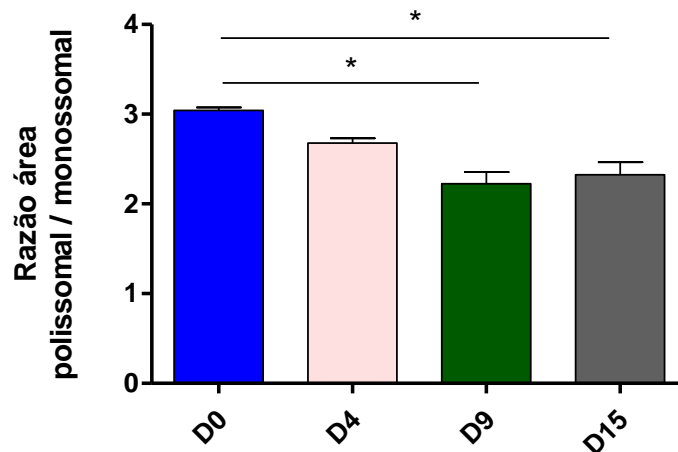


Figura 11 – Quantificação das áreas dos gráficos correspondentes ao RNA monossomal e polissomal. Os gráficos foram de, no mínimo, três diferenciações independentes. No gráfico, é demonstrada a razão da área polissomal/monossomal. Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão. O teste estatístico usado foi ANOVA de uma via seguido de teste de Tukey. *Significativamente diferente do controle ao nível de $p < 0,05$.

5.6 Perfil polissomal em resposta ao tratamento com cicloheximida, puromicina e EDTA

Como mencionado anteriormente, a análise do perfil polissomal associado ao uso de diferentes inibidores da tradução foi feita com o objetivo de entender melhor o mecanismo de ação dos miRNAs, visto que miRNAs associados a polissomos possivelmente agem bloqueando a tradução. Desse modo, o uso de cicloheximida imobiliza os ribossomos com RNAs, enquanto puromicina, por agir como um análogo de tRNA e liberar a cadeia peptídica nascente, promove a sua dissociação. Assim, se um miRNA for encontrado associado a polissomos após incubação com cicloheximida, esta associação deve ser desfeita após tratamento com puromicina, e ele deixa então de ser encontrado na fração polissomal. Caso contrário, isto pode ser um indicativo de que o miRNA está associado a outros complexos densos, como grânulos de estresse e de processamento (P bodies), que pelo gradiente de sacarose foram extraídos junto à fração polissomal. Por esse motivo, foi também analisado o perfil polissomal em resposta a EDTA, um composto orgânico que sequestra diversos íons metálicos, como magnésio e cálcio, íons estes importantes não apenas para a estabilização de polissomos, mas também de grânulos.

De fato, é notável a diferença do perfil polissomal comparando os três tratamentos, tanto em D0 como em D9 (**Fig. 12**). Células tratadas com

puromicina e EDTA apresentam um claro decréscimo da fração polissomal e aumento das frações livre. No caso do EDTA, há um pico monossomal bem evidente e maior do que o encontrado com cicloheximida. Observa-se então que os três tratamentos foram eficientes e apresentaram a resposta esperada.

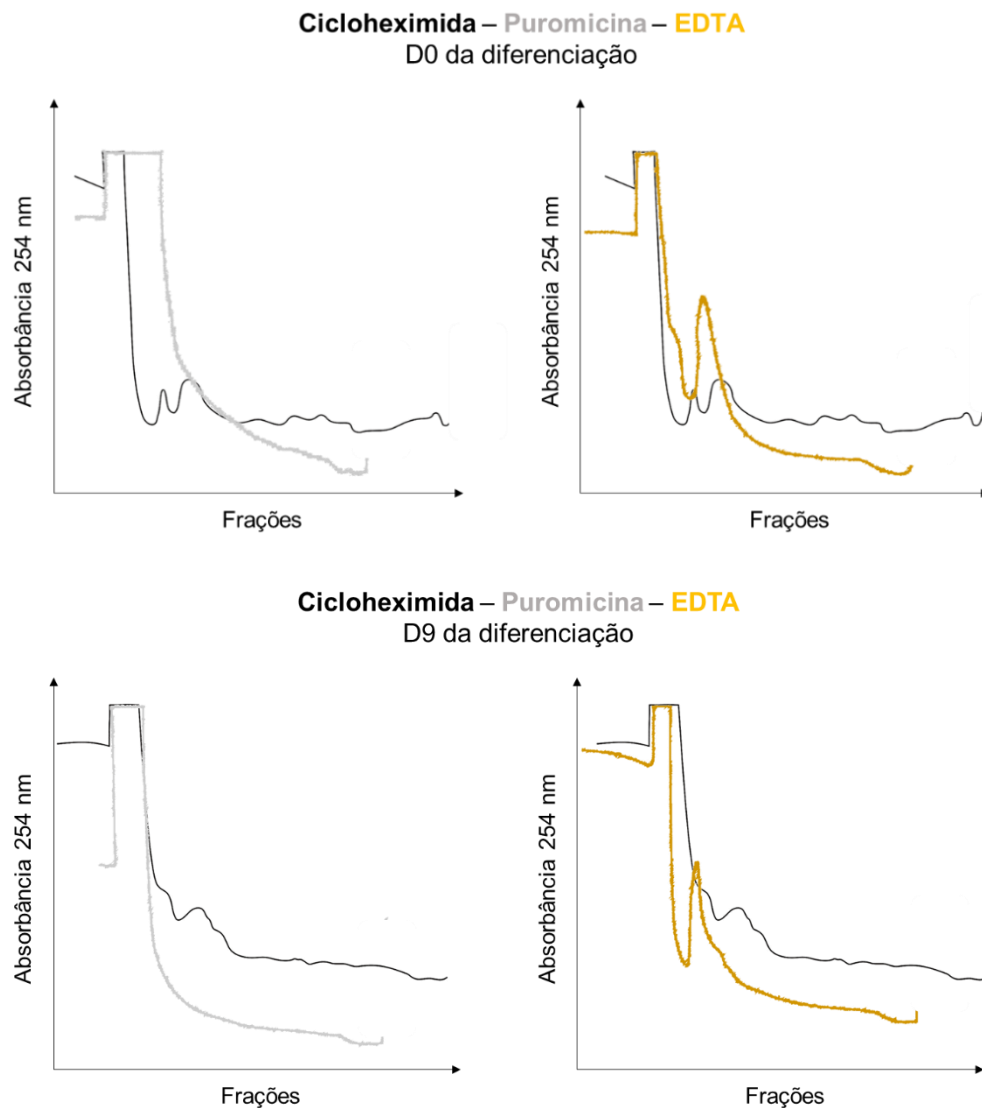


Figura 12 – Comparação do perfil polissomal após os tratamentos. É mostrado o perfil polissomal em D0 (cima) e D9 (baixo). Os gráficos da esquerda são uma sobreposição do perfil polissomal com cicloheximida (linha preta) e com puromicina (linha cinza), enquanto os da direita representam uma sobreposição do perfil polissomal com cicloheximida e EDTA (linha amarela).

Novamente, podem se observar diferenças no perfil polissomal com a diferenciação cardiomiogênica (**Fig. 13**).

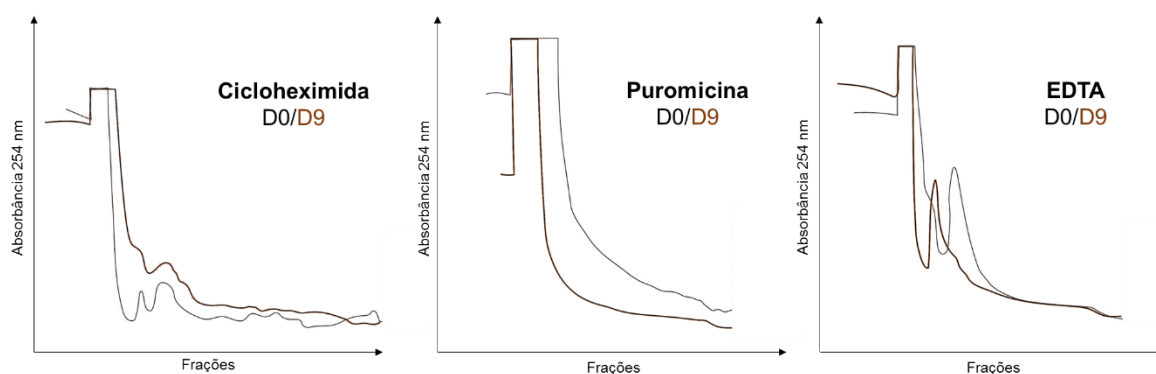


Figura 13 – Comparação do perfil polissomal em D0 (CTEs) e em D9 (progenitores cardíacos), após tratamento com cicloheximida, puromicina e EDTA (da esquerda para direita, respectivamente).

5.7 Estudo da associação de miRNAs a polissomos

Após o levantamento de diferentes estudos com miRNAs e cardiomiogênese já descritos na literatura, foram escolhidos quatro miRNAs para serem analisados por qPCR no presente trabalho, dentre todos os listados nas **Tabelas 1 e 2**. Dois destes miRNAs são encontrados predominantemente em CTEs (miR-302 e -371a), e dois encontram-se mais expressos em progenitores cardíacos (miR-133a e -503). Estes miRNAs também já foram descritos em outros contextos, tornando-os bastante interessantes para análise.

Foi feita a reação de qRT-PCR com as frações livre, monossomal, associada a polissomos leves e associada a polissomos pesados das células em D0 e em D9 da diferenciação, após tratamento com cicloheximida, puromicina ou EDTA. Este experimento foi feito em duplicata (duas diferenciações), totalizando 48 amostras. No entanto, os resultados aqui demonstrados correspondem a apenas uma repetição (as outras 24 amostras estão armazenadas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, e serão processadas quando um novo kit com o primer *reverse* para a qPCR chegar). Foram analisados os quatro miRNAs previamente descritos, e a expressão destes foi normalizada com o spike-in cel-miR-39-3p.

Levando em consideração a variedade de amostras e condições, foi gerada uma grande quantidade de dados que podem ser analisados de várias formas. Primeiramente, foi observada a expressão dos miRNAs nos dois tempos da diferenciação, após tratamento com cicloheximida, como mostra a **Figura 14**.

Nesta análise, foi normalizado para 1 a expressão de cada fração em D0 no gráfico do miR-133a e -371, e de cada fração de D9 para miR-302 e -371a, a fim de facilitar a visualização do *fold change*. Como esperado, miR-302 e -371a são mais expressos em D0, e miR-133a e -503 em D9. miR-302 e -371 apresentaram o maior aumento na expressão na fração monossomal. Embora tenha apresentado uma alta expressão em todas as frações, o miR-133a teve o maior aumento da expressão na fração livre, enquanto miR-503 mostrou-se aumentado nas frações polissomais, quando comparado D0 e D9.

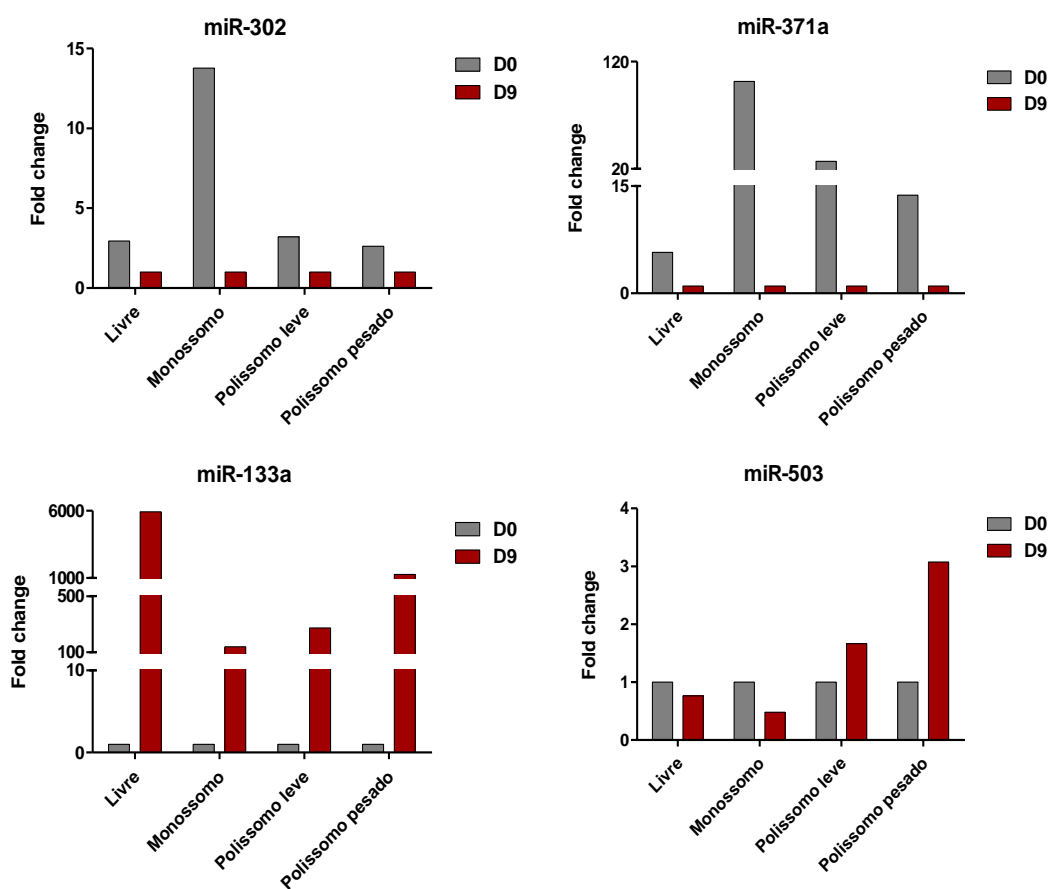


Figura 14 – Comparação da expressão dos miRNAs em D0 e D9, após tratamento com cicloheximida. Para miR-302 e -371a, foi normalizado para 1 a expressão de cada fração (livre, monossomal, polissomal) em D9. Para miR-133a e -371, foi normalizado para 1 a expressão de cada fração (livre, monossomal, polissomal) em D0. As diferentes normalizações foram feitas a fim de facilitar a visualização do *fold change*.

Também foi comparada a expressão dos miRNAs entre as frações de RNA livre, monossomal, associado a polissomos leves e associado a polissomos pesados. Nas **Figura 15** e **16**, estão representados estes dados para D0 e D9,

respectivamente (**Fig. 15** – miRNAs mais expressos em D0; **Fig. 16** – miRNAs mais expressos em D9). As frações livres foram normalizadas para 1, e nas demais frações observa-se o aumento ou diminuição da expressão, quando comparada à fração livre. Em D0, observa-se que miR-302 e -371a estão mais expressos na fração livre e monossomal, com tratamento com cicloheximida, e que o miR-371a também mostra certa associação a polissomos, que é desfeita com puromicina.

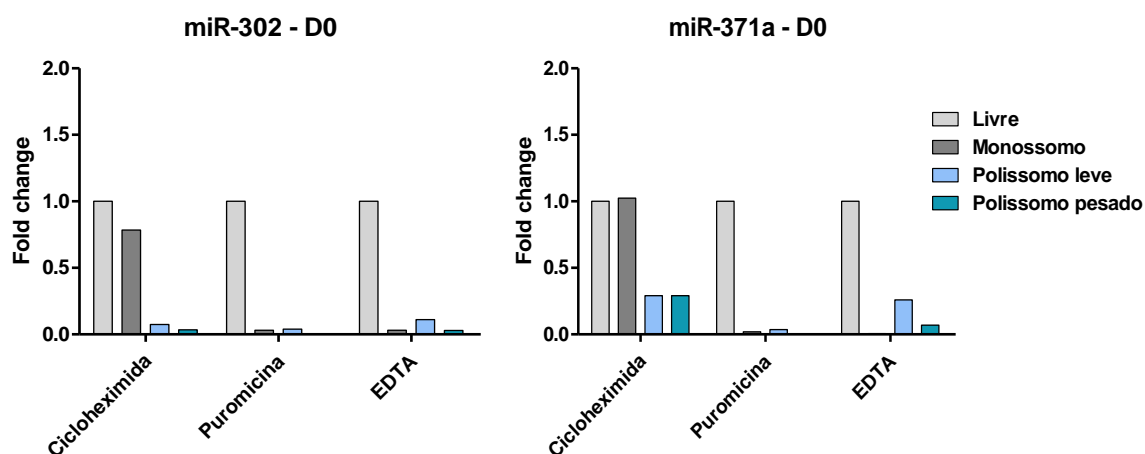


Figura 15 – Comparação da expressão de miR-302 e miR-371a em D0 e D9, após tratamento com cicloheximida, puromicina ou EDTA. As frações livres foram normalizadas para 1, e nas demais frações observa-se o aumento ou diminuição da expressão, quando comparada à fração livre.

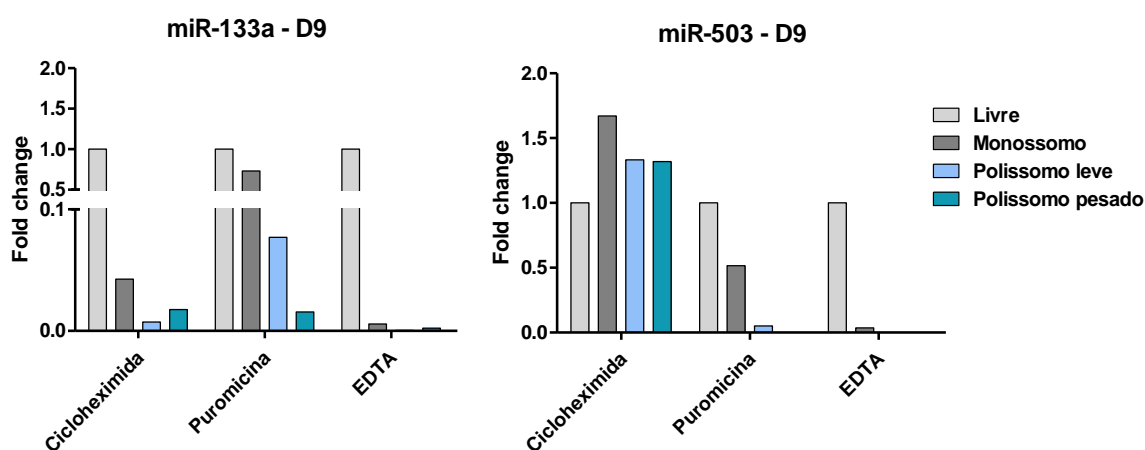


Figura 16 – Comparação da expressão de miR-133a e miR-503 em D0 e D9, após tratamento com cicloheximida, puromicina ou EDTA. As frações livres foram normalizadas para 1, e nas demais frações observa-se o aumento ou diminuição da expressão, quando comparada à fração livre.

Como já observado na **Figura 14**, miR-133a está mais expresso na fração livre. No entanto, ele ainda mostra certa associação a polissomos, que não é desfeita após o tratamento com puromicina, mas sim com EDTA. Esse resultado sugere que ele também possa estar associado a outros complexos proteicos de alto peso molecular. O miR-503, por outro lado, está aumentado nas frações polissomais, após tratamento com cicloheximida, e a sua associação a polissomos é deslocada, após o tratamento com puromicina.

Após a finalização das qPCRs, os dados serão analisados estatisticamente para avaliar as diferenças significativas.

5.8 Análise *in silico* dos alvos preditos para os miRNAs

Os alvos preditos dos quatro miRNAs foram avaliados utilizando o banco de dados DIANA-microT-CDS (*DIANA-tools*). Por meio dele, foi observada a presença de 1137 possíveis alvos para miR-302; 1038 alvos para miR-371a; 613 para miR-133a; e 564 para miR-503. A expressão de cada um desses alvos foi analisada com dados de RNA seq de células em D0 e D9 da diferenciação cardiomiogênica das células h32.5, dados estes previamente obtidos no laboratório (ainda não publicados). Entre todos mRNAs diferencialmente expressos em D0 e D9, 295 eram possíveis alvos do miR-302; 289 do miR-371a; 178 do miR-133a; e 155 do miR-503. Esses alvos codificam para proteínas envolvidas em diferentes processos celulares, incluindo ciclo celular, apoptose, metabolismo, transporte de íons, movimento intracelular, inúmeras vias de sinalização e outros. Vários mRNAs encontrados são alvos preditos de mais de um miRNA, como é, por exemplo, o caso de TET2, NOS1, CELF2, FGF18 e inúmeros outros. Estes resultados mostram que pode estar ocorrendo uma regulação bastante complexa envolvendo os quatro miRNAs. Quando se imagina a regulação que ocorre na célula, englobando todos os miRNAs expressos, a complexidade é ainda maior, e merece maiores investigações.

6. DISCUSSÃO

Doenças cardiovasculares são a maior causa de morte no mundo todo e o tratamento atual é limitado e ineficaz em uma série de casos (COSSELMAN, NAVAS-ACIEN e KAUFMAN, 2015; CLAYTON e NASH, 2015). A busca por novas terapias que possibilitem o reparo do tecido cardíaco segue ao lado da elucidação dos mecanismos de diferenciação, sobrevivência ou regeneração de cardiomiócitos (LIU *et al.*, 2015), e CTEs são ferramentas muito úteis para o estudo desses mecanismos. Sabendo que os níveis de mRNA não necessariamente correspondem aos níveis proteicos (KOUSSOUNADIS *et al.*, 2015), vários esforços têm sido feitos para entender a regulação pós-transcricional de mRNAs. microRNAs, pequenos RNAs não codificantes, são descritos como importantes reguladores nesta etapa (HA e KIM, 2014), porém ainda pouco se sabe sobre seu mecanismo de ação e função. Desse modo, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a associação a polissomos de miRNAs ao longo da diferenciação cardiomiogênica de CTEs, podendo assim melhor entender o seu mecanismo de ação e consequentemente sua função.

A diferenciação cardiomiogênica de CTEs foi realizada utilizando um protocolo já padronizado no laboratório, que consistiu na adição de fatores indutores ao meio de cultivo. Esses fatores atuam em sua maioria como morfógenos, que interagem com seus receptores e então ativam vias de sinalização específicas, direcionando a diferenciação cardíaca. A eficiência da diferenciação foi satisfatória, sendo que no dia 15 do protocolo mais de 50% das células foram marcadas tanto para TnT como para NKX2-5-GFP. As células provenientes de diferentes tempos da diferenciação foram então lisadas, o extrato celular foi aplicado em um gradiente de sacarose 10-50% e, após ultracentrifugação deste gradiente, as frações de RNA livre, monossomal e polissomal foram extraídas. A análise do perfil polissomal também foi realizada.

O perfil polissomal pode ser usado para avaliar diversos aspectos do estado traducional da célula, sendo que a quantidade de polissomos reflete o nível geral da atividade de tradução (SUNNERHAGEN, 2007). Foi observada uma redução na porção de ribossomos traducionalmente ativos ao longo da diferenciação, o que pode então indicar uma redução global da tradução das células. Sabe-se que células que estão continuamente se dividindo tendem a sintetizar mais proteínas do que células que não se dividem; no entanto, CTEs

apresentam, no geral, uma redução na eficiência traducional em comparação com outras células (BUSZCZAK, SIGNER e MORRISON, 2014). Por este motivo, alguns trabalhos demonstram aumento do processo de tradução ao longo da diferenciação de CTEs, como é o caso de Sampath e colaboradores (2008), que reportaram um aumento no conteúdo polissomal durante a diferenciação de CTEs murinas para corpos embrióides (corpos embrióides equivalem ao dia 1 do protocolo de diferenciação aqui utilizado, porém estas células não foram avaliadas quanto ao perfil polissomal). No entanto, não há dados na literatura avaliando mudanças no conteúdo polissomal durante a diferenciação para cardiomiócitos, células que apresentam baixa capacidade proliferativa.

No presente trabalho, quatro miRNAs foram selecionados para terem sua expressão e associação a polissomos avaliadas ao longo da diferenciação. Estes miRNAs foram miR-302, -371a, -133a e -503. O *cluster* miR-302-367 é descrito como altamente e especificamente expresso em células-tronco pluripotentes, tendo sua expressão diminuída ao longo da diferenciação. Esse *cluster* dirige a autorrenovação de CTEs por regular vias de apoptose e ciclo celular (ZHANG *et al.*, 2015); também já foi descrito por aumentar a eficiência de reprogramação somática, tendo como alvo o fator de transcrição NR2F2 (HU *et al.*, 2013). Já o *cluster* miR-371-373 é bem descrito em certos tipos de tumores, sendo até considerado um biomarcador promissor para estes casos (DIECKMANN *et al.*, 2017). Há poucos estudos com CTEs com esse *cluster*, no entanto, o seu *cluster* homólogo em murinos (miR-290-295) é bastante estudado, estando expresso em altos níveis em CTEs, regulando sua autorrenovação e comprometimento da diferenciação (KASPI *et al.*, 2013). Além disso, o *cluster* miR-290-295 tem como alvo diversos genes que regulam a autofagia (CHEN, LIERSCH e DETMAR, 2012), processo este que se mostra importante para a diferenciação de progenitores cardíacos (ZHANG *et al.*, 2012).

miR-133a e -503, por outro lado, começam a ser mais expressos durante a diferenciação cardiomiogênica de CTEs. O primeiro é muito descrito na literatura por dirigir o desenvolvimento cardíaco, silenciando outras linhagens de células, como a de músculo liso vascular e fibroblastos (LIU *et al.*, 2008; MURAOKA *et al.*, 2014). Mais recentemente, este miRNA vem sendo associado à melhora da função cardíaca em modelos de infarto *in vivo* (IZARRA *et al.*,

2014). Por fim, o *cluster* miR-322-503 é expresso nos primeiros progenitores cardíacos e dirige a especificação cardíaca inibindo a especificação em linhagens neurais, por ter como alvo o fator de ligação a RNA Celf1 (SHEN *et al.*, 2016). Após a realização de qRT-PCR, observou-se que os quatro miRNAs tiveram a expressão esperada ao longo da diferenciação, com miR-302 e -371a mais expressos em CTEs, ou seja, em D0, e miR-133a e -503 mais expressos em progenitores cardíacos, ou seja, em D9. O aumento da expressão do miR-503 não foi tão grande, sugerindo que sua expressão talvez seja melhor detectada em dias anteriores da diferenciação, como D6 ou D7, apesar do tempo de meia-vida de um miRNA ser de, em média, 5 dias (GANTIER *et al.*, 2011).

Quando avaliada a associação destes miRNAs a polissomos, observou-se que os miRNAs -302 e -371a estão mais representados nas frações livre e monossomal, embora o miR-371a também demonstre certa associação a polissomos, associação esta que foi desfeita após o tratamento com puromicina. O miR-133a também se mostrou mais abundante na fração livre, além de apresentar uma pequena associação a polissomos, a qual não foi desfeita após o tratamento com puromicina, mas sim com EDTA. Esse resultado sugere que este miRNA também possa estar presente em grânulos, como os de estresse e processamento, ou em outros complexos multiproteicos de alto peso molecular. De fato, o complexo miRNA-RISC já foi encontrado associado em ambos tipos de grânulos de RNA (BIGGAR e STOREY, 2015). Por fim, o miR-503 foi o único que mostrou uma associação mais forte a polissomos, confirmada após o tratamento com puromicina, sugerindo que este miRNA possa estar regulando a tradução de seus RNAs alvo, enquanto os outros miRNAs podem atuar degradando ou diminuindo a estabilidade de seus RNAs alvo. Sabe-se que miRNAs exibem diferentes graus de associação a polissomos, sendo que a maioria apresenta uma associação baixa/média (MOLOTSKI e SOEN, 2012), o que foi de fato observado.

Por fim, utilizando um banco de dados com possíveis alvos dos quatro miRNAs, bem como de dados de RNA-seq com mRNAs diferencialmente expressos em D0 e D9, pode-se ter uma ideia de quão complexa é a regulação por miRNAs. Como exemplo, o miR-503 mostrou ter vários alvos da família FGF (fator de crescimento de fibroblastos), dentre eles FGF2, FGF7, FGF18 e o receptor FGFR1. Destes, FGF7 e FGF18 estão mais expressos em D9 quando

comparados com D0. De fato, FGF1 e FGFR1 são altamente expressos em CTEs, o último também sendo necessário para o comprometimento com a diferenciação hematopoiética (COUTU e GALIPEAU, 2011); enquanto FGF7 e FGF18 estão envolvidos com diferenciação osteogênica de CTEs e diferenciação de componentes mesenquimais de múltiplos órgãos, respectivamente (JEON *et al.*, 2013; ORNITZ e ITOH, 2015). O fato das células em D9 (progenitores cardíacos) estarem recebendo estímulos para a diferenciação cardiomiogênica, porém ainda apresentarem certa potência (presença de progenitores mesodermis), pode ser um indicativo de como este miRNA está agindo, suprimindo o comprometimento hematopoiético e osteogênico, por exemplo. Por outro lado, os membros FGF10 e FGF16, que são importantes para diferenciação (CHAN *et al.*, 2010) e proliferação de cardiomiócitos (HOTTA *et al.*, 2008), respectivamente, estão mais expressos em D9, mas não estão sendo regulados por este miRNA.

Também vale a pena ressaltar que miRNAs expressos tanto em D0 como D9 tiveram como alvo NOS1, por exemplo. Isso pode ser explicado porque nem CTEs nem progenitores cardíacos expressam esta proteína; ela é específica do sistema nervoso (FREUDENBERG, ALTHOFF e REIF, 2015). Esse padrão foi observado diversas vezes para proteínas expressas em tecidos derivados da endoderme ou ectoderme.

Todos os miRNAs apresentaram como alvos canais de íons, como de sódio, cálcio e potássio. Sabe-se que o potencial de membrana desempenha um papel fundamental em todos os tipos celulares, porém em cardiomiócitos é imprescindível que os canais iônicos funcionem como um sistema elétrico-biológico integrado, propagando o impulso de modo rápido e organizado, o que resulta então na contração celular (ZHANG e SHAW, 2013). Proteínas de junções do tipo *gap*, como conexinas, também foram encontradas como alvos dos miRNAs, desse modo sugerindo que a expressão de todas estas proteínas é bastante regulada.

Estes são apenas alguns exemplos de possíveis alvos dos quatro miRNAs; a lista é enorme e merece ser melhor investigada. Como os alvos são apenas predições bioinformáticas, ainda é necessária confirmação experimental. No entanto, não há dúvidas de que a regulação pós-transcricional por miRNAs é extremamente relevante nos mais diversos processos celulares.

7. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Como conclusões, pode-se afirmar que os protocolos de diferenciação cardiomiogênica de CTEs, *polysome profiling* e extração e análise da expressão de miRNAs têm sido eficientes. Além disso, avaliando o perfil polissomal das células ao longo da diferenciação, nota-se uma redução na porção de ribossomos tradicionalmente ativos, o que pode indicar uma redução global da atividade de tradução das células.

Mediante o tratamento com diferentes inibidores da tradução conseguimos determinar o grau de associação dos miRNAs a polissomos. Através da análise dos experimentos de qPCR, os miRNAs -302, -371a e -133a parecem estar mais presentes na fração livre. O miR-503 foi o único que mostrou uma associação mais forte a polissomos, sugerindo que este miRNA possa estar agindo regulando a tradução de seus RNAs alvo.

Perspectivas para o trabalho incluem o sequenciamento de miRNAs associados a polissomos ao longo da diferenciação. Com os dados resultantes do sequenciamento, uma série de análises poderá ser feita. miRNAs diferencialmente expressos poderão ser analisados com maior profundidade, usando miRNAs miméticos ou antimiRs, por exemplo, que aumentam ou diminuem a concentração de miRNAs na célula.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AI, F.; ZHANG, Y.; PENG, B. miR-20a regulates proliferation, differentiation and apoptosis in P19 cell model of cardiac differentiation by targeting Smoothed. **Biol Open**, v. 5, n. 9, p. 1260-1265, 2016.

ALI, S. R.; HIPPENMEYER, S.; SAADAT, L. V.; LUO, L.; WEISSMAN, I. L.; ARDEHALI, R. Existing cardiomyocytes generate cardiomyocytes at a low rate after birth in mice. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 111, n. 24, p. 8850–8855, 2014.

BAKER, A. H.; VAN ROOIJ, E. miRNA overexpression induces cardiomyocyte proliferation in vivo. **Mol Ther**, v. 21, n. 3, p. 497-498, 2013.

BALZER, E.; MOSS, E. G. Localization of the developmental timing regulator Lin28 to mRNP complexes, P-bodies and stress granules. **RNA Biol.**, v. 4, n. 1, p. 16-25, 2007.

BIGGAR, K.K.; STOREY, K. B. Insight into post-transcriptional gene regulation: stress-responsive microRNAs and their role in the environmental stress survival of tolerant animals. **J Exp Biol**. v. 218, n. 9, p. 1281-1289, 2015.

BÜSSING, I.; SLACK, F. J.; GROSSHANS, H. let-7 microRNAs in development, stem cells and cancer. **Trends Mol Med**, v. 14, n. 9, p. 400-409, 2008.

BUSZCZAK, M.; SIGNER, R. A. J.; MORRISON, S. J. Cellular differences in protein synthesis regulate tissue homeostasis. **Cell**. v. 159, n. 2, p. 242–251, 2014.

CAI, B.; LI, J.; WANG, J.; LUO, X.; AI, J.; LIU, Y.; WANG, N.; LIANG, H.; ZHANG, M.; CHEN, N.; WANG, G.; XING, S.; ZHOU, X.; YANG, B.; WANG, X.; LU, Y. microRNA-124 regulates cardiomyocyte differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells via targeting STAT3 signaling. **Stem Cells**, v. 30, n.8, p. 1746-1755, 2012.

CHAN, S. S. K.; LI, H. J.; HSUEH, Y. C.; LEE, D. S.; CHEN, J. H.; HWANG, S. M.; CHEN, C. Y.; SHIH, E.; HSIEH, P. C. H. Fibroblast Growth Factor-10 Promotes Cardiomyocyte Differentiation from Embryonic and Induced Pluripotent Stem Cells. **PLoS One**. v. 5, n. 12, e14414, 2010.

CHEN, Y.; LIERSCH, R.; DETMAR, M. The miR-290-295 cluster suppresses autophagic cell death of melanoma cells. **Sci Rep**, v. 2, 808, 2012.

CHOI, Y. J.; LIN, C. P.; RISSO, D.; CHEN, S.; KIM, T. A.; TAN, M. H.; LI, J. B.; WU, Y.; CHEN, C.; XUAN, Z.; MACFARLAN, T.; PENG, W.; LLOYD, K. C.; KIM, S. Y.; SPEED, T. P.; HE, L. Deficiency of microRNA miR-34a expands cell fate potential in pluripotent stem cells. **Science**. v. 355, n. 6325, pii:eaag1927, 2017.

CLAYTON, R. H.; NASH, M. P. Analysis of Cardiac Fibrillation Using Phase Mapping. **Cardiac Electrophysiology Clinics**, v. 7, p. 49-58, 2015.

COPPOLA, A.; ROMITO, A.; BOREL, C.; GEHRIG, C.; GAGNEBIN, M.; FALCONNET, E.; IZZO, A.; ALTUCCI, L.; BANFI, S.; ANTONARAKIS, S. E.; MINCHIOTTI, G.; COBELLIS, G. Cardiomyogenesis is controlled by the miR-99a/let-7c cluster and epigenetic modifications. **Stem Cell Res**, v. 12, n. 2, p. 323-337, 2014.

COSSELMAN, K. E.; NAVAS-ACIEN, A.; KAUFMAN, J. D. Environmental factors in cardiovascular disease. **Nat Rev Cardiol**, v. 12, n. 11, p. 627-642, 2015.

COUTU, D. L.; GALIPEAU, J. Roles of FGF signaling in stem cell self-renewal, senescence and aging. **Aging**, v. 3, n. 10, p. 920-933, 2011.

DENG, S.; ZHAO, Q.; ZHOU, X.; ZHANG, L.; BAO, L.; ZHEN, L.; ZHANG, Y.; FAN, H.; LIU, Z.; YU, Z. Neonatal Heart-Enriched miR-708 Promotes Differentiation of Cardiac Progenitor Cells in Rats. **Int J Mol Sci**, v. 17, n. 6, E875, 2016.

DIECKMANN, K. P.; RADTKE, A.; SPIEKERMANN, M.; BALKS, T.; MATTHIES, C.; BECKER, P.; RUF, C.; OING, C.; OECHSLE, K.; BOKEMEYER, C.; HAMMEL, J.; MELCHIOR, S.; WOSNIOK, W.; BELGE, G. Serum Levels of MicroRNA miR-371a-3p: A Sensitive and Specific New Biomarker for Germ Cell Tumours. **Eur Urol**, v. 71, n. 2, p. 213-220, 2017.

DIMMELER, S. Cardiovascular disease review series. **EMBO Mol Med**, v. 3, n. 12, p. 697, 2011.

ELLIOTT, D. A.; BRAAM, S. R.; KOUTSIS, K.; NG, E. S.; JENNY, R.; LAGERQVIST, E. L.; BIBEN, C.; HATZISTAVROU, T.; HIRST, C. E.; YU, Q. C.; SKELTON, R. J.; WARD-VAN OOSTWAARD, D.; LIM, S. M.; KHAMMY, O.; LI, X.; HAWES, S. M.; DAVIS, R. P.; GOULBURN, A. L.; PASSIER, R.; PRALL, O. W.; HAYNES, J. M.; POUTON, C. W.; KAYE, D. M.; MUMMERY, C. L.; ELEFANTY, A. G.; STANLEY, E. G. NKX2-5(eGFP/w) hESCs for isolation of human cardiac progenitors and cardiomyocytes. **Nat Methods**, v. 8, n. 12, p. 1037-1040, 2011.

EULALIO, A.; MANO, M.; DAL FERRO, M.; ZENTILIN, L.; SINAGRA, G.; ZACCHIGNA, S.; GIACCA, M. Functional screening identifies miRNAs inducing cardiac regeneration. **Nature**, v. 492, n. 7429, p. 376-381, 2012.

EVSEENKO, D.; ZHU, Y.; SCHENKE-LAYLAND, K.; KUO, J.; LATOUR, B.; GE, S.; SCHOLLES, J.; DRAVID, G.; LI, X.; MACLELLAN, W. R.; CROOKS, G. M. Mapping the first stages of mesoderm commitment during differentiation of human embryonic stem cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 107, n. 31, p. 13742-13747, 2010.

FERNANDES, T. G.; DIOGO, M. M.; CABRAL, J. M. S. **Stem Cell Bioprocessing: For Cellular Therapy, Diagnostics and Drug Development**. 1 ed, Netherlands: Springer Netherlands, 2013.

FREUDENBERG, F.; ALTTOA, A.; REIF, A. Neuronal nitric oxide synthase (NOS1) and its adaptor, NOS1AP, as a genetic risk factors for psychiatric disorders. **Genes Brain Behav.** v. 14, n. 1, p. 46-63, 2015.

FRIEDLÄNDER, M. R.; LIZANO, E.; HOUBEN, A. J. S.; BEZDAN, D.; BÁÑEZ-CORONEL, M.; KUDLA, G.; MATEUHUERTAS, E.; KAGERBAUER, B.; GONZÁLEZ, J.; CHEN, K. C.; LEPROUST, E. M.; MARTÍ, E.; ESTIVILL, X. Evidence for the biogenesis of more than 1,000 novel human microRNAs. **Genome Biology**, v. 15, R57, 2014.

GANTIER, M. P.; MCCOY, C. E.; RUSINOVA, I.; SAULEP, D.; WANG, D.; XU, D.; IRVING, A. T.; BEHLKE, M. A.; HERTZOG, P. J.; MACKAY, F.; WILLIAMS, B. R. G. Analysis of microRNA turnover in mammalian cells following Dicer1 ablation. **Nucleic Acids Res.** v. 39, n. 13, p. 5692–5703, 2011.

GBD 2013. Mortality and Causes of Death Collaborators. Global, regional, and national age–sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990– 2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study. **Lancet**, v. 385, p. 117-171, 2013.

GLASS, C.; SINGLA, D. K. MicroRNA-1 transfected embryonic stem cells enhance cardiac myocyte differentiation and inhibit apoptosis by modulating the PTEN/Akt pathway in the infarcted heart. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 301, n. 5, H2038-2049, 2011.

GREVE, T. S.; JUDSON, R. L.; BLELLOCH, R. microRNA control of mouse and human pluripotent stem cell behavior. **Annu Rev Cell Dev Biol**, v. 29, p. 213–239, 2013.

GU, S.; KAY, M. A. How do miRNAs mediate translational repression? **Silence**, v. 1, n. 1, p. 11, 2010.

HA, M.; KIM, V. N. Regulation of microRNA biogenesis. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 15, p. 509–524, 2014.

HE, L.; HANNON, G. J. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. **Nat Rev Genet**, v. 5, n. 7, p. 522-531, 2004.

HOTTA, Y.; SASAKI, S.; KONISHI, M.; KINOSHITA, H.; KUWAHARA, K.; NAKAO, K.; ITOH, N. Fgf16 is required for cardiomyocyte proliferation in the mouse embryonic heart. **Dev Dyn.** v. 237, n. 10, p. 2947-2954, 2008.

HU, S.; WILSON, K. D.; GHOSH, Z.; HAN, L.; WANG, Y.; LAN, F.; RANSOHOFF, K. J.; WU, J. C. MicroRNA-302 Increases Reprogramming Efficiency via Repression of NR2F2. **Stem Cells.** v. 31, n. 2, p. 259–268, 2013.

IANCU, C. B.; IANCU, D.; RENȚEA, I.; HOSTIUC, S.; DERMENGIU, D.; RUSU, M. C. Molecular signatures of cardiac stem cells. **Rom J Morphol Embryol**, v. 56, n. 4, p. 1255-1262, 2015.

IZARRA, A.; MOSCOSO, I.; CAÑÓN, S.; CARREIRO, C.; FONDEVILA, D.; MARTÍN-CABALLERO, J.; BLANCA, V.; VALIENTE, I.; DÍEZ-JUAN, A.; BERNAD, A. miRNA-1 and miRNA-133a are involved in early commitment of pluripotent stem cells and demonstrate antagonistic roles in the regulation of cardiac differentiation. **J Tissue Eng Regen Med**, 2014.

IZARRA, A.; MOSCOSO, I.; LEVENT, E.; CAÑÓN, S.; CERRADA, I.; DÍEZ-JUAN, A.; BLANCA, V.; NÚÑEZ-GIL, I. J.; VALIENTE, I.; RUÍZ-SAURI, A.; SEPÚLVEDA, P.; TIBURCY, M.; ZIMMERMANN, W. H.; BERNAD, A. miR-133a enhances the protective capacity of cardiac progenitors cells after myocardial infarction. **Stem Cell Reports**. v. 3, n. 6, p. 1029-1042, 2014.

JEON, Y. M.; KOOK, S. H.; RHO, S. J.; LIM, S. S.; CHOI, K. C.; KIM, H. S.; KIM, J. G.; LEE, J. C. Fibroblast growth factor-7 facilitates osteogenic differentiation of embryonic stem cells through the activation of ERK/Runx2 signaling. **Mol Cell Biochem**. v. 382, n. 1-2, p. 37-45, 2013.

JIN, H. Y.; XIAO, C. MicroRNA Mechanisms of Action: What have We Learned from Mice? **Front Genet**. v. 6, p. 328, 2015.

KARATAS, O. F.; SUER, I.; YUCETURK, B.; YILMAZ, M.; HAJIYEV, Y.; CREIGHTON, C. J.; ITTMANN, M.; OZEN, M. The role of miR-145 in stem cell characteristics of human laryngeal squamous cell carcinoma Hep-2 cells. **Tumour Biol**, v. 37, n. 3, p. 4183-4192, 2016.

KASPI, H.; CHAPNIK, E.; LEVY, M.; BECK, G.; HORNSTEIN, E.; SOEN, Y. Brief report: miR-290-295 regulate embryonic stem cell differentiation propensities by repressing Pax6. **Stem Cells**. v. 31, n. 10, p. 2266-2272, 2013.

KATHIRESAN, S.; SRIVASTAVA, D. Genetics of Human Cardiovascular Disease. **Cell**. v. 148, n. 6, p. 1242-1257, 2012.

KOCHEGAROV, A.; ARMS, A.; HANNA, M. C.; LEMANSKI, L. F. Micro Rna-499C Induces the Differentiation of Mouse Embryonic Stem Cells (mESCs) into Cardiomyocytes. **International Archives of Medicine**, v. 8, p. 1755-7682, 2015.

KOUSSOUNADIS, A.; LANGDON, S. P.; UM, I. H.; HARRISON, D. J.; SMITH, V. A. Relationship between differentially expressed mRNA and mRNA-protein correlations in a xenograft model system. **Sci Rep**. v. 5, 10775, 2015.

KUPPUSAMY, K. T.; JONES, D. C.; SPERBER, H.; MADAN, A.; FISCHER, K. A.; RODRIGUEZ, M. L.; PABON, L.; ZHU, W. Z.; TULLOCH, N. L.; YANG, X.; SNIADOCKI, N. J.; LAFLAMME, M. A.; RUZZO, W. L.; MURRY, C. E.; RUOHOLA-BAKER, H. Let-7 family of microRNA is required for maturation and adult-like metabolism in stem cell-derived cardiomyocytes. **Proc Natl Acad Sci U S A**. v. 112, n. 21, E2785-94, 2015.

LAFLAMME, M. A.; MURRY, C. E. Regenerating the heart. **Nat Biotechnol**, v. 23, n. 7, p. 845-856, 2005.

LANGROUDI, L.; JAMSHIDI-ADEGANI, F.; SHAFIEE, A.; RAD, S. M.; KERAMATI, F.; AZADMANESH, K.; AREFIAN, E.; SOLEIMANI, M. MiR-371-373 cluster acts as a tumor-suppressor-miR and promotes cell cycle arrest in unrestricted somatic stem cells. **Tumour Biol.**, v. 36, n. 10, p. 7765-7774, 2015.

LEE, S. Y.; HAM, O.; CHA, M. J.; SONG, B. W.; CHOI, E.; KIM, I. K.; CHANG, W.; LIM, S.; LEE, C. Y.; PARK, J. H.; LEE, J.; BAE, Y.; SEO, H. H.; CHOI, E.; JANG, Y.; HWANG, K. C. The promotion of cardiogenic differentiation of hMSCs by targeting epidermal growth factor receptor using microRNA-133a. **Biomaterials**, v. 34, n. 1, p. 92-99, 2013.

LICHNER, Z.; PÁLL, E.; KEREKES, A.; PÁLLINGER, E.; MARAGHECHI, P.; BOSZE, Z.; GÓCZA, E. The miR-290-295 cluster promotes pluripotency maintenance by regulating cell cycle phase distribution in mouse embryonic stem cells. **Differentiation**, v. 81, n. 1, p. 11-24, 2011.

LING, H.; FABBRI, M.; CALLIN, G. A. MicroRNAs and other non-coding RNAs as targets for anticancer drug development **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 12, p. 847–865, 2013.

LIU, B.; QIAN, S. B. Characterizing inactive ribosomes in translational profiling. **Translation (Austin)**, v. 4, n. 1, e1138018, 2016.

LIU, N.; BEZPROZVANNAYA, S.; WILLIAMS, A. H.; QI, X.; RICHARDSON, J. A.; BASSEL-DUBY, R.; OLSON, E. N. microRNA-133a regulates cardiomyocyte proliferation and suppresses smooth muscle gene expression in the heart. **Genes Dev**, v. 22, n. 23, p. 3242-3254, 2008.

LIU, X.; YANG, L.; WANG, H.; XU, G.; ZHU, S.; LI, M.; HU, X.; ZHU, J.; ZHU, C.; XU, J.; HAN, S.; YU, Z. Effects of miR-19b knockdown on the cardiac differentiation of P19 mouse embryonic carcinoma cells. **Mol Med Rep**, v. 11, n. 4, p. 2504-2512, 2015.

LIU, X.; XIAO, J.; ZHU, H.; WEI, X.; PLATT, C.; DAMILANO, F.; XIAO, C.; BEZZERIDES, V.; BOSTRÖM, P.; CHE, L.; ZHANG, C.; SPIEGELMAN, B. M.; ROSENZWEIG, A. miR-222 is necessary for exercise-induced cardiac growth and protects against pathological cardiac remodeling. **Cell Metab**, v. 21, n. 4, p. 584-595, 2015.

LOH, K. M.; CHEN, A.; KOH, P. W.; DENG, T. Z.; SINHA, R.; TSAI, J. M.; BARKAL, A. A.; SHEN, K. Y.; JAIN, R.; MORGANTI, R. M.; SHYH-CHANG, N.; FERNHOFF, N. B.; GEORGE, B. M.; WERNIG, G.; SALOMON, R. E.; CHEN, Z.; VOGEL, H.; EPSTEIN, J. A.; KUNDAJE, A.; TALBOT, W. S.; BEACHY, P. A.; ANG, L. T.; WEISSMAN, I. L. Mapping the Pairwise Choices Leading from Pluripotency to Human Bone, Heart, and Other Mesoderm Cell Types. **Cell**, v. 166, n. 2, p. 451-467, 2016.

LU, H.; BUCHAN, R. J.; COOK, S. A. MicroRNA-223 regulates Glut4 expression and cardiomyocyte glucose metabolism. **Cardiovasc Res**, v. 86, n. 3, p. 410-420, 2010.

LÜNINGSSCHRÖR, P.; HAUSER, S.; KALTSCHMIDT, B.; KALTSCHMIDT, C. MicroRNAs in pluripotency, reprogramming and cell fate induction. **Biochim Biophys Acta**, v. 1833, n. 8, p. 1894-1903, 2013.

MATHIEU, J.; RUOHOLA-BAKER, H. Regulation of Stem Cell Populations by microRNAs. **Adv Exp Med Biol**, v. 786, p. 329–351, 2013.

MESTDAGH, P.; VAN VLIERBERGHE, P.; DE WEER, A.; MUTH, D.; WESTERMANN, F.; SPELEMAN, F.; VANDESOMPELE, J. A novel and universal method for microRNA RT-qPCR data normalization. **Genome Biol.**, v. 10, R64, 2009.

MIYATA, M.; RAVEN, J. F.; BALTZIS, D.; KOROMILAS, A. E.; SABE, H. IRES-mediated translational control of AMAP1 expression during differentiation of monocyte U937 cells. **Cell Cycle**, v. 7, n. 20, p. 3273-3281, 2008.

MOGILYANSKY, E.; RIGOUTSOS, I. The miR-17/92 cluster: a comprehensive update on its genomics, genetics, functions and increasingly important and numerous roles in health and disease. **Cell Death Differ**, v. 20, n. 12, p. 1603-1614, 2013.

MOLOTSKI, N.; SOEN, Y. Differential association of microRNAs with polysomes reflects distinct strengths of interactions with their mRNA targets. **RNA**, v. 18, p. 1612–1623, 2012.

MORTON, S. U.; SCHERZ, P. J.; CORDES, K. R.; IVEY, K. N.; STAINIER, D. Y.; SRIVASTAVA, D. microRNA-138 modulates cardiac patterning during embryonic development. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 105, n. 46, p. 17830-17835, 2008.

MURAOKA, N.; YAMAKAWA, H.; MIYAMOTO, K.; SADAHIRO, T.; UMEI, T.; ISOMI, M.; NAKASHIMA, H.; AKIYAMA, M.; WADA, R.; INAGAWA, K.; NISHIYAMA, T.; KANEDA, R.; FUKUDA, T.; TAKEDA, S.; TOHYAMA, S.; HASHIMOTO, H.; KAWAMURA, Y.; GOSHIMA, N.; AEBA, R.; YAMAGISHI, H.; FUKUDA, K.; IEDA, M. MiR-133 promotes cardiac reprogramming by directly repressing Snai1 and silencing fibroblast signatures. **EMBO J**, v. 33, n. 14, p. 1565-1581, 2014.

OLIVEIRA-CARVALHO, V.; CARVALHO, V. O.; SILVA, M. M.; GUIMARÃES, G. V.; BOCCHI, E. A. MicroRNAs: Um Novo Paradigma no Tratamento e Diagnóstico da Insuficiência Cardíaca? **Arq Bras Cardiol**, v. 98, n. 4, p. 362-370, 2012.

ORNITZ, D. M.; ITOH, N. The Fibroblast Growth Factor signaling pathway. **Wiley Interdiscip Rev Dev Biol**, v. 4, n. 3, p. 215–266, 2015.

PAWANI, H.; BHARTIYA, D. Pluripotent stem cells for cardiac regeneration: overview of recent advances & emerging trends. **Indian J Med Res**, v. 137, n. 2, p. 270-282, 2013.

PELTIER, H. J.; LATHAM, G. J. Normalization of microRNA expression levels in quantitative RT-PCR assays: identification of suitable reference RNA targets in normal and cancerous human solid tissues. **RNA**, v. 14, n. 5, p. 844-52, 2008.

PILLAI, R. S.; BHATTACHARYYA, S. N.; ARTUS, C. G.; ZOLLER, T.; COUGOT, N.; BASYUK, E.; BERTRAND, E.; FILIPOWICZ, W. Inhibition of translational initiation by Let-7 MicroRNA in human cells. **Science**, v. 309, p. 1573–1576, 2005.

PORRELLO, E. R. microRNAs in cardiac development and regeneration. **Clin Sci (Lond)**, v. 25, n. 4, p. 151-166, 2013.

REED, D. M.; FOLDES, B.; HARDING, S. E.; MITCHELL, A. A. Stem cell-derived endothelial cells for cardiovascular disease: a therapeutic perspective. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 75, p. 897-906, 2013.

ROBERGE, L.; ALVES, A. C. O.; REBELATTO, C. L. K.; DALLAGIOVANNA, B.; SHIGUNOV, P. Inhibition of Hedgehog signaling pathway affects the expression of miR-20a and miR-31. **J. Biotech. Biodivers.**, v. 4, n. 4, p. 322-332, 2013.

SAMPATH, P.; PRITCHARD, D. K.; PABON, L.; REINECKE, H.; SCHWARTZ, S. M.; MORRIS, D. R.; MURRY, C. E. A hierarchical network controls protein translation during murine embryonic stem cell self-renewal and differentiation. **Cell Stem Cell**. v. 2, n. 5, p. 448-460, 2008.

SANDERS, L. Meeting notes: Stem cell implants for Parkinson's show promise in monkeys. **Science News**, v. 182, p. 15-17, 2012.

SCHWARTZ, R. J.; OLSON, E. N. Building the heart piece by piece: modularity of cis-elements regulating Nkx2-5 transcription. **Development**. v. 126, n. 19, p. 4187-4192, 1999.

SHEN, X.; SOIBAM, B.; BENHAM, A.; XU, X.; CHOPRA, M.; PENG, X.; YU, W.; BAO, W.; LIANG, R.; AZARES, A.; LIU, P.; GUNARATNE, P. H.; MERCOLA, M.; COONEY, A. J.; SCHWARTZ, R. J.; LIU, Y. miR-322/- 503 cluster is expressed in the earliest cardiac progenitor cells and drives cardiomyocyte specification. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 113, n. 34, p. 9551-9556, 2016.

SHERMAN, M. I. The culture of cells derived from mouse blastocysts. **Cell**, v. 5, n. 4, p. 343- 349, 1975.

SONG, D. W.; RYU, J. Y.; KIM, J. O.; KWON, E. J.; KIM, D. H. The miR-19a/b family positively regulates cardiomyocyte hypertrophy by targeting atrogin-1 and MuRF-1. **Biochem J**, v. 457, n. 1, p. 151-62, 2014.

SPANGENBERG, L.; SHIGUNOV, P.; ABUD, A. P.; COFRÉ, A. R.; STIMAMIGLIO, M. A.; KULIGOVSKI, C.; ZYCH, J.; SCHITTINI, A. V.; COSTA, A. D.; REBELATTO, C. K.; BROFMAN, P. R.; GOLDENBERG, S.; CORREA, A.; NAYA, H.; DALLAGIOVANNA, B. Polysome profiling shows extensive

posttranscriptional regulation during human adipocyte stem cell differentiation into adipocytes. **Stem Cell Res**, v. 11, n. 2, p. 902-912, 2013.

SUNNERHAGEN, P. Cytoplasmatic post-transcriptional regulation and intracellular signalling. **Mol Genet Genomics**, v. 277, n. 4, p. 341-355, 2007.

SZABÓ, D. R.; LUCONI, M.; SZABÓ, P. M.; TÓTH, M.; SZÜCS, N.; HORÁNYI, J.; NAGY, Z.; MANNELLI, M.; PATÓCS, A.; RÁCZ, K.; IGAZ, P. Analysis of circulating microRNAs in adrenocortical tumors. **Lab Invest**, v. 94, n. 3, p. 331-9, 2014.

TAKAHASHI, K.; YAMANAKA, S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. **Cell**, v. 126, p. 663-676, 2006.

YAO, S. MicroRNA biogenesis and their functions in regulating stem cell potency and differentiation. **Biological Procedures Online**, v. 18, p. 8, 2016.

YOU, K. T.; PARK, J.; KIM, V. N. Role of the Small Subunit Processome in the Maintenance of Pluripotent Stem Cells. **Genes Dev.**, v. 29, n. 19, p. 2004–2009, 2015.

VASUDEVAN, S. Posttranscriptional upregulation by microRNAs. **Wiley Interdiscip Rev RNA**, v. 3, n. 3, p. 311-330, 2012.

VASUDEVAN, S.; STEITZ, J. A. AU-rich-element-mediated upregulation of translation by FXR1 and Argonaute 2. **Cell**, v. 128, n. 6, p. 1105–1118, 2007.

VIGNERON, N.; MERYET-FIGUIÈRE, M.; GUTTIN, A.; ISSARTEL, J. P.; LAMBERT, B.; BRIAND, M.; LOUIS, M. H.; VERNON, M.; LEBAILLY, P.; LECLUSE, Y.; JOLY, F.; KRIEGER, S.; LHEUREUX, S.; CLARISSE, B.; LECONTE, A.; GAUDUCHON, P.; POULAIN, L.; DENOYELLE, C. Towards a new standardized method for circulating miRNAs profiling in clinical studies: Interest of the exogenous normalization to improve miRNA signature accuracy. **Mol. Oncol.**, v. 10, n. 7, p. 981-992, 2016.

WAGERS, A. J.; WEISSMAN, I. L. Plasticity of adult stem cells. **Cell**, v. 116, n. 5, p. 639-648, 2004.

WANG, Y.; LIU, J.; CUI, J.; SUN, M.; DU, W.; CHEN, T.; MING, X.; ZHANG, L.; TIAN, J.; LI, J.; YIN, L.; LIU, F.; PU, Z.; LV, B.; HOU, J.; YU, B. MiR218 Modulates Wnt Signaling in Mouse Cardiac Stem Cells by Promoting Proliferation and Inhibiting Differentiation through a Positive Feedback Loop. **Sci Rep**, v. 6, p. 20968, 2016.

WILSON, K. D.; HU, S.; VENKATASUBRAHMANYAM, S.; FU, J. D.; SUN, N.; ABILEZ, O. J.; BAUGH, J. J.; JIA, F.; GHOSH, Z.; LI, R. A.; BUTTE, A. J.; WU, J. C. Dynamic microRNA expression programs during cardiac differentiation of human embryonic stem cells: role for miR-499. **Circ Cardiovasc Genet**, v. 3, n. 5, p. 426-435, 2010.

WU, S.; AKSOY, M.; SHI, J.; HOUBAVIY, H. B. Evolution of the miR-290-295/miR-371-373 cluster family seed repertoire. **PLoS One**, v. 9, n. 9, e108519, 2014.

ZHANG, D.; LI, X.; CHEN, C.; LI, Y.; ZHAO, L.; JING, Y.; LIU, W.; WANG, X.; ZHANG, Y.; XIA, H.; CHANG, Y.; GAO, X.; YAN, J.; YING, H. Attenuation of p38-mediated miR-1/133 expression facilitates myoblast proliferation during the early stage of muscle regeneration. **PLoS One**, v. 7, n. 7, e41478, 2012.

ZHANG, J.; LIU, J.; HUANG, Y.; CHANG, J. Y.; LIU, L.; MCKEEHAN, W. L.; MARTIN, J. F.; WANG, F. FRS2 α -mediated FGF signals suppress premature differentiation of cardiac stem cells through regulating autophagy activity. **Circ Res**. v. 110, n. 4, e29-39, 2012.

ZHANG, S. S.; SHAW, R. M. Multilayered Regulation of Cardiac Ion Channels. **Biochim Biophys Acta**. v. 1833, n. 4, p. 876–885, 2013.

ZHANG, Z.; HONG, Y.; XIANG, D.; ZHU, P.; WU, E.; LI, W.; MOSENSON, J.; WU, W. S. MicroRNA-302/367 cluster governs hESC self-renewal by dually regulating cell cycle and apoptosis pathways. **Stem Cell Reports**, v. 4, n. 4, p. 645-657, 2015.