



UNIVERSIDADE DO ALGARVE

*Estudo do papel de CITED2 na diferenciação das células estaminais
embrionárias*

Vanessa Cristina Sousa Afonso

Tese para obtenção de Grau Mestre em
Biologia Molecular e Microbiana

Trabalho efetuado sob a orientação de:
Prof. Dr. José Eduardo Bragança

2015



UNIVERSIDADE DO ALGARVE

*Estudo do papel de CITED2 na diferenciação das células estaminais
embrionárias*

Vanessa Cristina Sousa Afonso

Tese para obtenção do Grau de Mestre em
Biologia Molecular e Microbiana

Trabalho efetuado sob a orientação de:
Prof. Dr. José Eduardo Bragança

2015

Estudo do papel de CITED2 na diferenciação das células estaminais embrionárias

Declaração de autoria de trabalho

Declaro ser a autora deste trabalho, que é original e inédito. Autores e trabalhos consultados estão devidamente citados no texto e constam da listagem de referências incluída.

Vanessa Cristina Sousa Afonso

Copyright© Vanessa Cristina Sousa Afonso

A Universidade do Algarve tem o direito perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicitar este trabalho através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, de o divulgar através de reportórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Dedicatória e Agradecimentos

A realização desta tese de mestrado contou com importantes apoios e incentivos que contribuíram para que esta tese se tornasse numa realidade e aos quais estarei eternamente grata.

Ao meu orientador Professor Doutor José Bragança, por me dar esta oportunidade de participar num grupo de investigação excelente e contribuindo para o enriquecimento do meu saber, bem como, pela sua disponibilidade, atenção e opiniões ao longo da escrita.

À Eduarda Guerreiro por me ter ensinado tudo o que sei sobre a parte prática necessária à realização desta tese, pelo apoio, incentivo e muita paciência... e principalmente pelos bons momentos das sextas-feiras.

À Gisela, Rita, Ana e João pelo apoio, companhia, ajuda nos momentos de aflição e pelo bom humor constante.

A todos os meus amigos, especialmente, à Vilma Duarte pelo apoio, companheirismo, cumplicidade, amizade, força e por estar sempre presente em todos os momentos, principalmente, nas longas noites de escrita...

Ao meu namorado, pelo incentivo, compreensão e encorajamento, durante todo este período da tese.

Por último, à minha família, em particular, a minha mãe pelo apoio e ajuda incondicional. A eles dedico este meu trabalho.

Resumo

Cited2 é um modelador transcricional essencial para o desenvolvimento normal cardíaco. A manutenção, diferenciação e proliferação celular ocorrem e são controladas por uma rede complexa de vias de sinalização. No trabalho aqui apresentado pretende-se esclarecer de que forma a proteína Cited2 está envolvida na diferenciação de células estaminais embrionárias de ratinho em células cardíacas. O principal objetivo deste projeto consistiu em testar se Cited2 promove a diferenciação cardíaca por participar na expressão de moléculas de sinalização e se este meio é capaz de resgatar os defeitos de diferenciação das células estaminais embrionárias com deleção de Cited2. Para testar esta hipótese diferenciou-se células C2^{fl/fl}[Cre]B, com e sem *knockout* de Cited2, durante as primeiras 48 horas, em meio condicionado de E14T/flag-CITED2 e efetuou-se contagens de focos contráteis. Analisou-se a expressão transcricional de genes relacionados com a diferenciação cardíaca em E14T/flag-CITED2. De acordo com os resultados obtidos neste estudo, a expressão e secreção de diversos fatores para o meio condicionado preparado a partir de ESC E14T/flag-CITED2 demonstra que, nas primeiras 48 horas de diferenciação, há a compensação da falta ou depleção Cited2 e observou-se que a sobre expressão de CITED2 nas células E14/T levou a um aumento de expressão transcricional de Wnt5a, Wnt11, Fgf10 e Dkk1.

Termos chave: CITED2, *knockout*, Wnt5a, Wnt11, Fgf10 e Dkk1.

Abstrat

Cited2 is a transcriptional modulator essential for normal cardiac development. The maintenance, differentiation and cell proliferation occur and are controlled by a complex network of signaling pathways. The work presented here is intended to clarify how Cited2 is involved in differentiation of mouse embryonic stem cells into cardiac cells. The main objective of this project was to test whether Cited2 promotes signaling cascades important for cardiac differentiation and to verify whether this culture medium is able to rescue the differentiation defects of embryonic stem cells with Cited2 deletion. To test the hypothesis $C2^{fl/fl}$ [Cre]B cells were differentiated, with and without a Cited2 depletion, during the first 48 hours, in conditioned medium from E14T/flag-CITED2 ESC and contractile foci were counted. We also analyzed the transcriptional expression of genes associated with cardiac differentiation in E14T/flag-CITED2. According to the results of this study, the expression of various secreted factors was increased in cells overexpressing CITED2. Thus, within the first 48 hours of differentiation, there is compensation of Cited2 depletion by conditioned medium of cells overexpressing CITED2 and we observed that the overexpression of CITED2 in E14/T cells led to an increase in the transcriptional expression of Wnt5a, Wnt11, FGF10 and Dkk1.

Keywords: CITED2, *knockout*, Wnt5a, Wnt11, Fgf10 e Dkk1.

Índice

Resumo	ii
Abstrat	iii
Índice	iv
Índice de figuras	vi
Índice de tabelas	viii
Lista de abreviaturas e significados	ix
1. Introdução	1
1.1. <i>Células estaminais</i>	2
1.1.1. <i>Células estaminais embrionárias</i>	2
1.1.2. <i>Células estaminais adultas</i>	3
1.2. <i>Pluripotência</i>	4
1.2.1. <i>Genes envolvidos na pluripotência</i>	4
1.3. <i>Diferenciação</i>	6
1.3.1. <i>Diferenciação in vitro</i>	7
1.3.2. <i>Diferenciação Cardíaca</i>	9
1.3.3. <i>Progenitores Cardíacos</i>	13
1.4. <i>Família dos fatores de CITED</i>	14
1.4.1. <i>Cited2</i>	14
1.4.2. <i>Consequências do knockout de Cited2</i>	15
1.5. <i>Papel do Cited2 nas células estaminais embrionárias</i>	16
2. Objetivo	18
3. Materiais e métodos	19
3.1. <i>Cultura de células</i>	19
3.1.1. <i>Linhas celulares</i>	19
3.1.2. <i>Vetores plasmidícos</i>	20
3.1.3. <i>Transfecção</i>	21
3.2. <i>Meio condicionado</i>	22
3.3. <i>Diferenciação de células estaminais embrionárias</i>	22
3.3.1. <i>Embryoid bodies</i>	23
3.4. <i>Análise de expressão transcricional</i>	24
3.4.1. <i>Extração de RNA</i>	27
3.4.2. <i>Limpeza de RNA contaminado com fenol</i>	27

3.4.3.	<i>Síntese de DNA complementar</i>	28
3.4.4.	<i>RT-qPCR</i>	28
3.5.	<i>Análise Estatística</i>	31
4.	Resultados	32
4.1.	<i>O meio condicionado de células que sobre expressam CITED2 reverte defeitos de diferenciação cardíaca causados pela falta de Cited2</i>	32
4.2.	<i>As células E14/T sobre expressando flag-CITED2 expressam mais transcritos de Fgf10, Dkk1, Wnt5a e Wnt11</i>	35
4.3.	<i>As células C2^{fl/fl} [Cre]B diferenciadas em meio condicionado com sobre expressão de CITED2 apresentam uma expressão transcricional não correspondente à hipótese testada.</i> 37	
5.	Discussão	40
6.	Conclusões	43
7.	Perspetivas Futuras	44
8.	Bibliografia	45

Índice de figuras

Figura 1.1- Origem das células estaminais embrionárias, que derivam da massa celular interna do blastocisto de mamíferos (Adaptado de Donovan, e Gearhart, 2001).....	3
Figura 1.2- Modelo da regulação genética da pluripotência em ESC.	6
Figura 1.3- Linhagens pluripotentes do embrião de ratinho.....	7
Figura 1.4 - Sinais para a formação de músculo cardíaco durante a embriogénese e a diferenciação das ESC.	10
Figura 1.5- Subdomínio dentro do SHF. O SHF é caracterizado pela expressão de Nkx2.5 e Islet1 (Isl1) mostrado ao dia embrionário 8 (E8.0).....	11
Figura 1.6- Vias de sinalização da programação de células cardíacas durante a embriogénese.	12
Figura 1.7 - Modelo do coração de sinais induzidos na mesoderme primitiva de pintos.	13
Figura 3.1 - Esquema exemplificativo do knockout de um gene por recombinação, através da recombinase Cre em locais LoxP individuais. Os locais homólogos LoxP flanqueiam o gene de interesse, no nosso caso, o gene Cited2, que será excisado. (Adaptado de Norman e MacInnes, 2002).....	20
Figura 3.2- Escala de tempo do crescimento dos EB.	23
Figura 3.3- Esquema exemplificativo do método de formação de EB utilizando a técnica de HD, para posterior recolha dos mesmos ao dia 2 e 3 de diferenciação (adaptado de Lee e Han, 2010).	24
Figura 3.4 - Princípio da técnica de RT-qPCR utilizando o SYBRGreen.....	25
Figura 3.5 Gráficos de amplificação com a curva exponencial de um produto de PCR detetado, em que o valor de CT corresponde ao valor onde a curva se sobrepõem ao limiar, chamado de threshold line (Adaptado de Real-Time PCR Applications Guide, 2006).	26
Figura 4.1 – Gráficos do número de colónias a contrair (%) e do número de focos de contração/EB com focos de contração aos dias 8,9 e 10 de diferenciação. .	34
Figura 4.2 - Gráfico da expressão relativa de ESC E14T/flag-Cited2 e E14T/Controlo. Expressão relativa de Bmp4, Wnt3, Wnt3a, Wnt5a, Wnt5b, Wnt11, Dkk1, Cer1, Fgf8, Fgf10, Nodal e Cited2 normalizados com Gapdh e determinados por RT-qPCR em células indiferenciadas (D0). ESC E14/T transfetadas com	

um plasmídeo que expressa de forma constitutiva os vetores flag-CITED2 e controlo. Os resultados são apresentados com a média \pm erro padrão da média de quatro replicados biológicos independentes. Legenda: **Ctrl**, refere-se às células controlo que não sobre expressa nenhuma proteína; **FC2**, refere-se às células que sobre expressa a proteína CITED2. * $p < 0.05$ ** $p < 0.003$ 36

Figura 4.3 - Gráfico da expressão dos EB ao dia dois (D2) de diferenciação. Expressão relativa de Bmp4, Cer1, Cited2, Dkk1, Fgf8, Fgf10, Nodal, Wnt3, Wnt3a, Wnt5a, Wnt5b e Wnt11 normalizados com Gapdh e determinados por RT-qPCR em ESC C2^{fl/fl}[Cre]B diferenciadas em meio condicionado flag-CITED2 e controlo e na ausência ou presença de 4HT. Os resultados são apresentados com a média \pm erro padrão da média de três replicados biológicos independentes. Legenda: **Ctrl**, refere-se ao meio condicionado controlo que não sobre expressa nenhuma proteína; **FC2**, refere-se ao meio condicionado que sobre expressa a proteína CITED2. * $p < 0.05$ ** $p < 0.005$, relativamente ao meio Ctrl+EtOH. 38

Figura 4.4 - Gráfico da expressão dos EB ao dia 3 (D3) de diferenciação. Expressão relativa de Bmp4, Cer1, Cited2, Dkk1, Fgf8, Fgf10, Nodal, Wnt3, Wnt3a, Wnt5a, Wnt5b e Wnt11 normalizados com Gapdh e determinados por RT-qPCR em ESC C2^{fl/fl}[Cre]B diferenciadas em meio condicionado flag-CITED2 e controlo e na ausência ou presença de 4HT. Os resultados são apresentados com a média \pm erro padrão da média de três replicados biológicos independentes. Legenda: **Ctrl**, refere-se ao meio condicionado controlo que não sobre expressa nenhuma proteína; **FC2**, refere-se ao meio condicionado que sobre expressa a proteína CITED2. * $p < 0.05$, relativamente ao meio Ctrl+EtOH. 39

Índice de tabelas

Tabela 3.1 Lista dos primers específicos de cada gene de interesse e temperatura de annealing para RT-qPCR. *Temperatura de annealing.	30
---	----

Lista de abreviaturas e significados

	Lista de abreviaturas	Significados
<i>BMP</i>	Bone Morphogenetic Proteins	Proteínas morfogénicas do osso
<i>cDNA</i>	Complementary DNA	DNA complementar
<i>CBP</i>	cAMP-response-element binding protein	Monofosfato ciclico de adenosine (cAMP) elemento de ligação a uma proteína
<i>Cdx2</i>	Caudal-type homeobox transcription factor 2	Fator de transcrição de genes homeóticos tipo caudal
<i>Cer1</i>	Cerberus1	
<i>CHI</i>	First cysteine-histidine-rich	Primeira região rica em cisteína-histidina
<i>CITED2</i>	CBP/p300-interacting transactivator with ED-rich tail 2	Transativador de interação CBP/p300 com cauda rica em ED 2
<i>CMC</i>	Cardiogenic Mesoderm Cells	Células cardíacas da mesoderme
<i>CNCCs</i>	Cardiac Neural Crest Cells	Células da crista neural cardíaca
<i>CPC</i>	Cardiac Progenitor Cells	Progenitores cardíacos celulares
<i>CR2</i>	Conserved region 2	Região conservada 2
<i>C_T</i>	Cycle Threshold	Definido como o número de ciclos necessários para o sinal de fluorescência para o atravessar limiar
<i>Dkk1</i>	Dickkopf1	

	Lista de abreviaturas	Significados
<i>DNA</i>	Desoxyribonucleic acid	Ácido desoxirribonucleico
<i>EB</i>	Embryoid bodies	Corpos embrionários
<i>ESC</i>	Embryonic stem cell	Células estaminais embrionárias
<i>FBS</i>	Fetal Bovine Serum	Sérum fetal bovino
<i>FGF</i>	Fibroblast growth factors	Fatores de crescimento de fibroblastos
<i>FHF</i>	First heart fields	Primero campo cardíaco
<i>GMEM</i>	Glasgow Modified Eagle Medium	
<i>HCN4</i>	Ion channel hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel 4	Canal iônico cíclico fechado de nucleótidos ativado por hiperpolarização
<i>HD</i>	Hanging drop	Gotas suspensas
<i>hESC</i>	human Embryonic Stem Cells	ESC humanas
<i>ICM</i>	Inner Cell Mass	Massa celular interna ou botão embrionário
<i>IGF</i>	Insulin Growth Factor	Fator de crescimento insulínico
<i>Isl1</i>	Islet-1 transcription factor	Fator de transcrição Isler 1
<i>LIF</i>	Leukemia inhibitory factor	Fator inibitório da leucemia
<i>Mef2c</i>	Myocyte enhancer factor 2C	Fator do potenciador de miócitos 2C
<i>mESC</i>	mouse ESC	ESC de ratinho
<i>Nkx2.5</i>	Nk2transcription factor related, locus 5	Fator de transcrição Kx2 relacionado como locus 5

Lista de abreviaturas**Significados**

<i>Oct4</i>	Octamer-binding transcription factor 4	Octâmero de ligação de fator de transcrição4
<i>PCR</i>	Polymerase Chain Reaction	Reação em cadeia da polimerase
<i>PE</i>	Proepicardium	Células do pró epicárdio
<i>PVDF</i>	Polyvinylidene fluoride	Fluoreto de polivinilideno
<i>RNA</i>	Ribonucleic acid	Ácido ribonucleico
<i>Rpm</i>	Revolutions per minute	Rotações por minuto
<i>RT-qPCR</i>	Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction	PCR quantitativo de transcrição reversa em tempo real
<i>SHF</i>	second heart fields	Segundo campo cardíaco
<i>Tbx5</i>	T-box transcription factor 5	Fator de transcrição T-box 5
<i>4HT</i>	4-hidroxi-Tamoxifen	Tamoxifeno

Lista de Significados

<i>Annealing</i>	Desnaturação do DNA
<i>Baseline</i>	Linha que é considerada uma base para a medição.
<i>Eppendorfs</i>	Tubos de centrifugação
<i>in vitro</i>	Expressão latina que designa todos os processos biológicos que têm lugar fora dos sistemas vivos, no ambiente controlado e fechado de um laboratório.
<i>in vivo</i>	Refere-se ao experimento feito dentro ou no tecido vivo de um organismo vivo
<i>Knockout</i>	Inativação; Técnica genética que consiste em bloquear a expressão de um gene específico num organismo.
<i>Melting curve</i>	Avaliação das características de dissociação do DNA de cadeia dupla durante o aquecimento
<i>Pellet</i>	Partículas pequenas tipicamente criadas através da compressão de um material original
<i>Primer (forward e reverse)</i>	Iniciadores; segmentos de ácidos nucleicos, com 1 a 60 nucleótidos de sequência complementar do DNA.

1. Introdução

Os miócitos cardíacos são produzidos durante a vida fetal, inicialmente originados de progenitores cardíacos. No coração adulto de mamíferos estes continuam a ser renovados através da sua auto duplicação e por diferenciação de células estaminais cardíacas (Bhattacharya *et al.*, 2006; Kajstura *et al.*, 2010). No entanto, a capacidade de renovação de miócitos em mamíferos adultos, especificamente em seres humanos, é controverso. Existem relatos contraditórios sobre a capacidade regenerativa do coração adulto humano (Bergmann *et al.*, 2009; Mollova *et al.*, 2013).

Historicamente, a renovação de cardiomiócitos em seres humanos tem sido difícil de estabelecer.

A maioria dos casos de cardiomiopatia (grupo de doenças do músculo cardíaco de etiologia variada) no estágio de insuficiência cardíaca apresentam perda de cardiomiócitos adultos, levando a falência cardíaca e à morte do paciente.

Em corações humanos adultos a regeneração de cardiomiócitos não é suficiente para compensar a perda dos mesmos, sendo por isso o transplante cardíaco o único método eficaz para repor os cardiomiócitos perdidos, no entanto é um processo complexo e pouco rotineiro.

Na última década, vários estudos demonstraram que o transplante de cardiomiócitos isolados (cardiomioplastia) pode oferecer uma abordagem alternativa para o tratamento de doenças cardiovasculares, no entanto, existem fortes limitações, uma delas sendo o número escasso de células recolhidas do doador (Sachinidis *et al.*, 2003; Senyo *et al.*, 2014).

Para contornar estas limitações as células estaminais embrionárias são consideradas como uma possível fonte de cardiomiócitos para tratamento de doenças cardiovasculares, dado o seu potencial cardiomiogénico (Sachinidis *et al.*, 2003; Nishiyama *et al.*, 2007; Senyo *et al.*, 2014).

1.1. Células estaminais

As células estaminais, conhecidas pela capacidade de se autorrenovar e originarem linhagens celulares mais diferenciadas, contribuem para as funções de reparação e homeostasia de um organismo (Donovan e Gearhart, 2001; Verfaillie, 2002).

O potencial de diferenciação das células estaminais varia de acordo com o estágio de desenvolvimento onde são isoladas. Células totipotentes são isoladas do zigoto e possuem a capacidade de dar origem a todas as células de um organismo incluindo os tecidos extraembrionários. Por sua vez, as células estaminais embrionárias isoladas do botão embrionário ou massa celular interna (ICM para *Inner Cell Mass* em Inglês) do blastocisto, um estágio de desenvolvimento mais tardio, são pluripotentes e podem diferenciar em qualquer linhagem do organismo. (Donovan e Gearhart, 2001; Rippon e Bishop, 2004). As células estaminais multipotentes, já comprometidas a uma determinada linhagem, possuem a capacidade de se diferenciarem apenas nos diferentes tipos de células do tecido a partir das quais foram isoladas, são células estaminais adultas (Weissman, 2000).

1.1.1. Células estaminais embrionárias

As células estaminais embrionárias (ESC para *Embryonic Stem Cells* em Inglês) (Figura 1.1) são caracterizadas por três pontos importantes, pelo seu potencial de autorrenovação ou seja a capacidade das células replicarem e manterem-se num estado de indiferenciação durante um prolongado número de passagens (2) pluripotência, após estimulação adequada, estas células possuem a capacidade de diferenciar em células das três camadas germinativas, mesmo depois de mantidas em cultura por um longo período de tempo e (3) quando introduzidas num blastocisto, podem contribuir ao desenvolvimento do embrião (Chambers *et al.*, 2003; Rippon e Bishop, 2004; Choi *et al.*, 2005; Yu e Thomson, 2006).

Durante o decorrer do normal desenvolvimento, a implantação do blastocisto resulta na diferenciação das três camadas germinativas primárias que irão mais tarde originar os órgãos do embrião em desenvolvimento (Beddington e Robertson, 1999). As ESC conservam a capacidade de diferenciação nas três camadas germinativas, a propriedade de pluripotência, o que faz das ESC um modelo único de estudo *in vitro* da

embriogénese precoce. O centro da rede regulatória que mantém este estado consiste num conjunto de fatores de transcrição, entre os quais Oct4 (*Octamer-binding transcription factor 4* em Inglês) parece desempenhar um papel fundamental (Nichols *et al.*, 1998). Oct4 ocupa muitos locais regulatórios no genoma das ESC conjuntamente com os fatores Sox2, Nanog e o co-ativador p300 (Chen *et al.*, 2008). Na embriogénese, Oct4, Sox2 e Nanog, são essenciais para a manutenção do estado de pluripotência, tanto em ESC de ratinhos (mESC para mouse *Embryonic Stem Cells* em Inglês) como em humanas (hESC para *human Embryonic Stem Cells* em Inglês) (Loh *et al.*, 2006; Göke *et al.*, 2011).

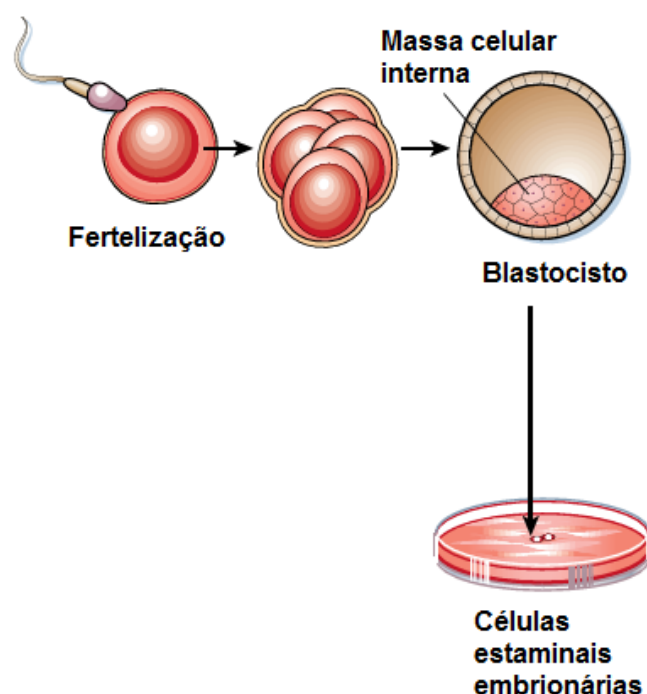


Figura 1.1- Origem das células estaminais embrionárias, que derivam da massa celular interna do blastocisto de mamíferos (Adaptado de Donovan, e Gearhart, 2001).

1.1.2. Células estaminais adultas

As células estaminais adultas estão presentes em tecidos já desenvolvidos e são características de cada tecido a partir do qual são isoladas, tal como, medula óssea, fígado, músculo e pele. Devido à sua especificidade, estas células encontram-se em nichos próprios por todo o corpo e servem a manutenção, crescimento e reparação dos tecidos (Rippon e Bishop, 2004; Biswas e Hutchins, 2007).

Em teoria, estas células podem ser recolhidas e transplantadas de volta para o mesmo indivíduo para a reparação de tecidos, contornando assim a necessidade de imunossupressão apresentando por isso um enorme potencial, onde através das mesmas é possível produzir qualquer tipo de célula, tecido ou órgão do corpo humano (Rippon e Bishop, 2004).

1.2. Pluripotência

Para além da capacidade de dar origem aos diferentes tipos de células necessários para o correto desenvolvimento e funcionamento do organismo, as linhas celulares embrionárias pluripotentes possuem ainda marcadores específicos e fatores de transcrição específicos de células estaminais pluripotentes, tais como, Oct4 (Nichols *et al.*, 1998; Donovan e Gearhart, 2006), Nanog (Chambers *et al.*, 2003; Mitsui *et al.*, 2003), Sox2 (Mitsui *et al.*, 2003) e moléculas de sinalização extracelulares, tais como LIF (*Leukemia inhibitory factor* em Inglês) (Smith *et al.*, 1988; Williams *et al.*, 1988) e as proteínas morfogénicas do osso (BMP para *Bone Morphogenetic Proteins* em Inglês) (Ying *et al.*, 2003), têm um papel crítico no estabelecimento e/ou manutenção da pluripotência neste tipo de células.

1.2.1. Genes envolvidos na pluripotência

Nanog

Nanog é uma *homeobox* que codifica fatores de transcrição com funções essenciais de manutenção da pluripotência em células da ICM e na sua derivação para ESC (Mitsui *et al.*, 2003).

Nanog aparece inicialmente em células internas da mórula e do blastocisto, na fase de pré implantação, não sendo detetável no momento da implantação. No blastocisto a expressão de Nanog é confinada à ICM. A expressão do mesmo reaparece no epiblasto proximal ao dia embrionário 6 (E6) e permanece restrito ao epiblasto enquanto desenvolvimento prossegue. A expressão deste gene em ratinhos é regulada negativamente após o dia embrionário 8 (E8) (Chambers *et al.*, 2003; Mitsui *et al.*, 2003; Hart *et al.*, 2004).

A sobre expressão de Nanog é capaz de manter a pluripotência e a autorrenovação, características das ESC, na ausência de LIF, um fator de crescimento

adicionado no meio de cultura das ESC para impedir a diferenciação (Chambers *et al.*, 2003; Mitsui *et al.*, 2003).

Oct4 e Sox2

Oct4 e Sox2 são fatores de transcrição, Oct4 pertence a família de fatores de transcrição com domínio proteico POU, e Sox2 à família de genes *SOX* (Kamachi *et al.*, 2000), essenciais para o desenvolvimento e manutenção da pluripotência em ESC, ambos estão presentes em células precoces do embrião e em células germinativas de mamíferos (Nichols *et al.*, 1998; Shöler *et al.*, 1990).

Para manter as ESC indiferenciadas, Oct4 e Sox2 interagem entre si e com vários outros fatores de transcrição tais como, Stat3 e FoxD3 que regulam a expressão de múltiplos genes alvo (Niwa *et al.*, 2000 e 2001; Mitsui *et al.*, 2003).

Oct4 é altamente expresso em ESC humanas e de ratinho e a sua expressão diminui quando estas células diferenciam e perdem pluripotência, originando a trofoectoderme, ao passo que a sobre expressão de Oct4 resulta na diferenciação em endoderme e mesoderme primitivas (Yeom *et al.*, 1996; Niwa, 2001).

Equilíbrio entre Oct4 e Nanog

Como descrito nas secções anteriores, *Oct4*, *Sox2* e *Nanog* são genes/proteínas importantes para a manutenção das células estaminais, estes fatores interagem entre si para regular a expressão genética. De fato o fator-chave neste processo é o equilíbrio que existe entre estas proteínas.

Foi demonstrado que a ação de Nanog requer a presença contínua de Oct4, implicando que este pode determinar a expressão de Oct4. Este efeito é suscetível de ser indireto, no entanto, já que a expressão Oct4 não é visivelmente aumentada em sobreexpressão de Nanog. Contudo, o aumento da expressão de Oct4 faz com que as ESC diferenciem, enquanto o aumento de Nanog impede a diferenciação. Portanto, Nanog pode atuar para limitar o potencial de diferenciação – indução de Oct4 (Chambers *et al.*, 2003) (Figura 1.2).

A via de sinalização das Wnt está também envolvida na manutenção da pluripotência. Quando ativada, esta via mantém o fenótipo indiferenciado em mESC e hESC. A sinalização Wnt é ativada por via endógena em ESC e é regulada negativamente sob diferenciação (Sato *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2013). A ativação da

sinalização de Wnt podem também regular positivamente a expressão de STAT3 (Hao *et al.*, 2006).

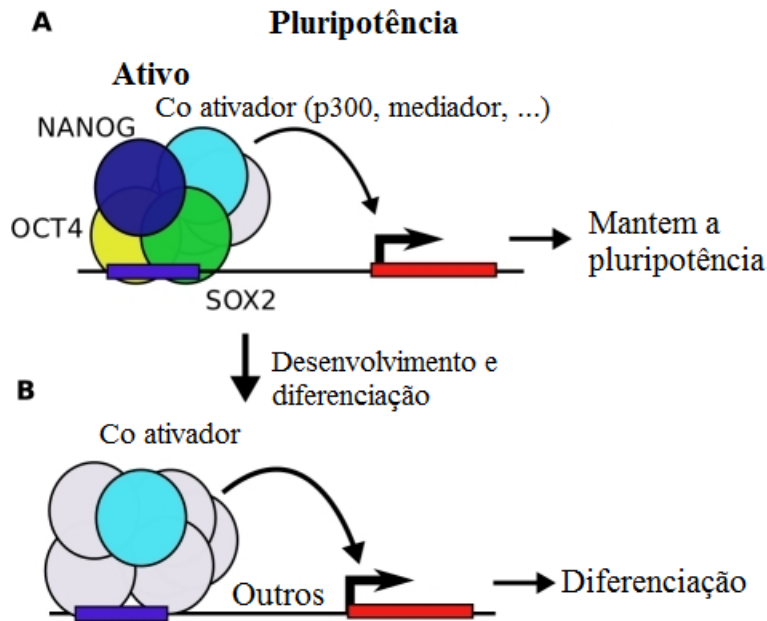


Figura 1.2- Modelo da regulação genética da pluripotência em ESC.

(A) Os *enhancers* estão unidos por Oct4, Sox2 e Nanog, todos juntos, com p300 em ESC. Estes *enhancers* mantêm a pluripotência por ativação da expressão de genes em ESC.

(B) Após a diferenciação da célula, os mesmos os *enhancers* são unidos por p300 em tecidos de desenvolvimento, juntamente com outros fatores de transcrição. O gene alvo é expresso (Adaptado de Göke *et al.*, 2011).

1.3. Diferenciação

A diferenciação celular é definida como uma aquisição de especialização, ocorrendo em diversos passos em simultâneo e regulada temporalmente por diversos processos, que se iniciam pelo compromisso e determinação do destino celular.

Como mencionado anteriormente, as ESC são células pluripotentes que podem diferenciar em três tipos celulares, ectoderme, endoderme e mesoderme (Chambers *et al.*, 2003; Rippon e Bishop, 2004; Choi *et al.*, 2005; Yu e Thomson, 2006).

A diferenciação das ESC é acompanhada de uma regulação negativa de diversos fatores de transcrição e moléculas de sinalização que mantêm o fenótipo de pluripotência, tais como Oct4 e Nanog, e a regulação positiva dos fatores de transcrição envolvidos na diferenciação (Gu *et al.*, 2005).

Por exemplo, a expressão do fator de transcrição Gata6 origina em ESC a diferenciação em endoderme primitiva (Fujikura *et al.*, 2002), tal como a expressão do fator de transcrição Cdx2 (para *caudal-type homeobox transcription factor 2* em Inglês) induz a diferenciação das ESC em trofoectoderme (Niwa *et al.*, 2005) (Figura 1.3).

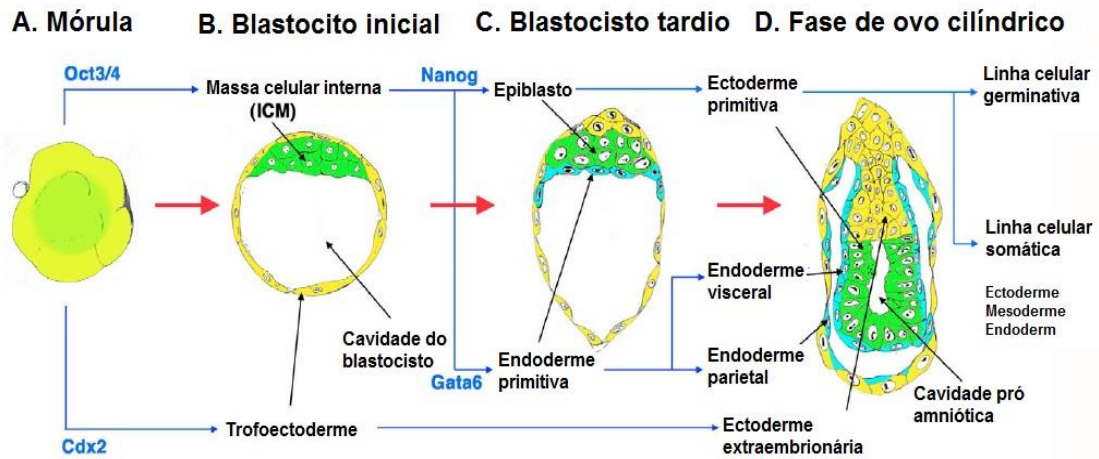


Figura 1.3- Linhagens pluripotentes do embrião de ratinho.

(A) As células estaminais pluripotentes (verde) encontram-se na mórula como células internas, que em seguida (B) formam a ICM do blastocisto.
 (C) Depois de originar a endoderme primitiva na superfície da ICM, as células estaminais pluripotentes formam o epiblasto e começam a proliferar rapidamente após implantação.
 (D) Formam então a ectoderme primitiva, que irá originar a linhagem de celular germinativa e a linhagem celular somática do embrião. Certos fatores de transcrição chave (azul) são necessários para a diferenciação das várias linhagens embrionárias (Adaptado de Niwa, 2007).

1.3.1. Diferenciação in vitro

Quando cultivadas *in vitro* nas condições apropriadas, as ESC diferenciam em células especializadas, tais como, células cardíacas, miogénicas, neurais, hematopoiéticas, epiteliais, vasculares do músculo liso, endodérmicas, adipogénicas e condrogénicas (Czyz e Wobus, 2001; Boheler *et al.*, 2002; Choi *et al.*, 2005; Fauzi *et al.*, 2015; Suchorska *et al.*, 2015; Yan *et al.*, 2015). Conhecendo quais os padrões de desenvolvimento que regulam a expressão genética é possível analisar os processos de desenvolvimento a nível celular *in vitro* e por conseguinte as ESC têm sido utilizadas como modelo experimental para analisar eventos de diferenciação precoce e complementar com estudos *in vivo* (Czyz e Wobus, 2001).

Para promover uma diferenciação eficiente e reprodutível em ESC em células de interesse *in vitro*, é comum a vários grupos de investigação, a remoção do estímulo necessário para a auto-renovação e manutenção da pluripotência das ESC, como por exemplo, remoção do LIF das condições de cultura.

Uma das estratégias para induzir diferenciação das ESC *in vitro* é a elaboração de corpos embrionários (EB para *embryoid bodies* em Inglês). Os EB são originados a partir de ESC em suspensão que se vão agregar formando esferas tridimensionais, que se assemelham a embriões precoces pós-implantação e que diferenciam naturalmente nas três camadas germinativas, endoderme, ectoderme e mesoderme. (Czyz e Wobus, 2001; Rippon e Bishop, 2004; Choi *et al.*, 2005).

A estrutura tridimensional da célula resultante facilita as interações multicelulares, devido ao contato célula a célula e podem ser estabelecidas por junções gap (Desbaillets *et al.*, 2000).

Após a agregação, a camada externa dos EB é distinguida como endoderme primitiva extra embrionária que se diferencia em endoderme visceral (Doetschman *et al.*, 1985).

A matrix extra celular, que é secretada a partir da camada de endoderme primitiva, em seguida, forma uma espessa membrana basal, que separa a endoderme primitiva da massa interna dos EB. Ao longo do interior da membrana basal, é formada a camada da ectoderme primitiva e ocorre cavitação no interior dos EB. Esta série de processos é considerado um modelo *in vitro*, que recapitula o desenvolvimento inicial embrionário desde o estágio de blastocisto até ao estágio de ovo cilíndrico (Coucouvanis, 1995).

Durante a maturação dos EB, que ocorre normalmente entre o dia 2 e 6, as ESC sofrem enormes alterações morfológicas (Doetschman *et al.*, 1985) e adquirem diversos marcadores típicos de células diferenciadas (Itskovitz-Eldor *et al.*, 2000). Entre os marcadores específicos das três camadas germinativas, encontram-se o GATA4 (*GATA binding protein 4* em Inglês) e α -fetoprotein como marcadores da endoderme inicialmente expressos no início da fase de pós implantação e são mantidas na endoderme visceral e parietal do saco vitelino durante a gastrulação (Choi *et al.*, 2005). Os genes *Brachyury* e *BMP4* são expressos na mesoderme precoce e os genes *Pax6* e *Mash1* na neuroectoderme, (Czyz e Wobus, 2001). A *Desmina* também é expressa na região mesodermal, especialmente nas fibras musculares, e a *Nestina* na área de neuroectodermal. (Choi *et al.*, 2005).

A técnica mais utilizada para formar EB é a de gotas suspensas (HD para *hanging drop* em Inglês). Esta técnica de diferenciação de EB por HD foi referida como favorecendo preferencialmente linhagens celulares mesodérmicas (Takahashi *et al.*, 2007).

No entanto os métodos de suspensão e agregação celular para gerar EB são tecnicamente complexos e demorados.

1.3.2. Diferenciação Cardíaca

Os mecanismos envolvidos no desenvolvimento do coração (cardiogénese) são conservados entre vertebrados. A identificação de fatores de crescimento, de transcrição, cascatas de sinalização são capazes de induzir a cardiogénese são cruciais para o desenvolvimento *in vitro* de cardiomiócitos de ESC (Sachinidis *et al.*, 2003).

Para ocorrer formação do coração é necessário que as células mesodérmicas assumam o destino de se tornarem cardiomiogénicas e que migrem para as regiões ântero-lateral do embrião durante a gastrulação. Este processo é regulado por citocinas, tais como proteínas BMPs nomeadamente BMP2 e BMP4 e fatores de crescimento de fibroblastos (FGFs), que desempenham um papel essencial na indução de fatores de transcrição cardíaca e diferenciação em cardiomiócitos nos vertebrados (Figura 1.4) (Schultheiss *et al.*, 1997; Schlange *et al.*, 2000; Kami *et al.*, 2008).

A mesoderme cardíaca expressa marcadores específicos, tais como, *Brachyury* e *Flk1* e são ainda especificados para células progenitoras cardíacas precoces por *Mesp1* (Bondué *et al.*, 2008; Chan *et al.*, 2013; Saga *et al.*, 1999; Ishitobi *et al.*, 2011). É a partir da mesoderme cardíaca que derivam duas populações celulares que vão originar o primeiro campo cardíaco, FHF (para *first heart fields* em Inglês), e o segundo, SHF (para *second heart fields* em Inglês), que mais tarde vão contribuir para a formação dos átrios, ventrículos e tronco pulmonar. Estas duas populações vão continuar a diferenciar até atingirem o estado de maturação de cardiomiócitos primordiais.

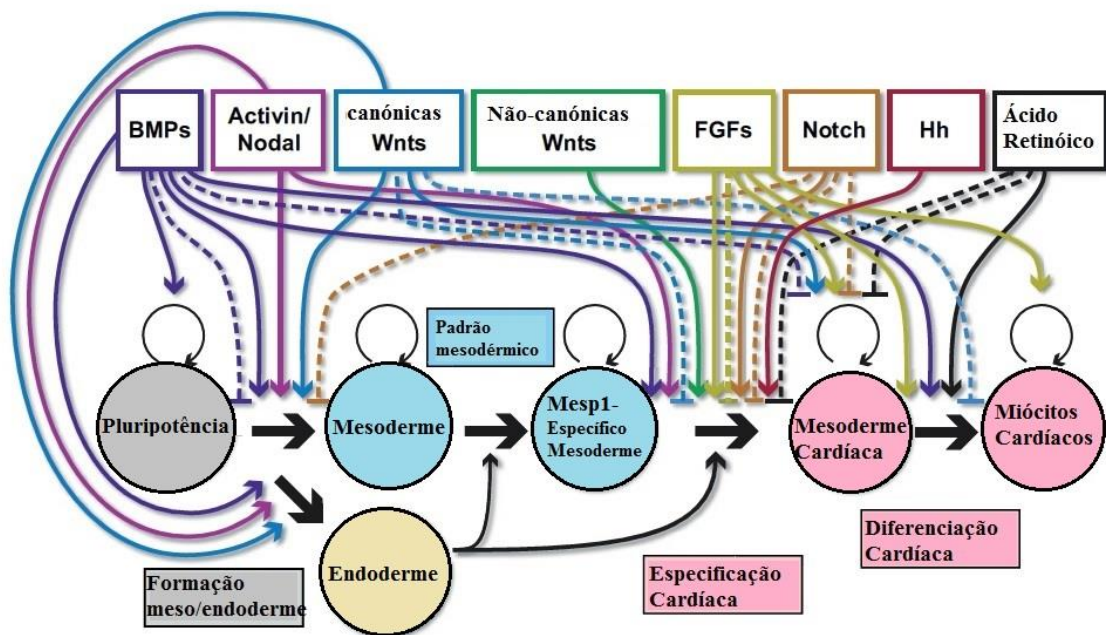


Figura 1.4 - Sinais para a formação de músculo cardíaco durante a embriogênese e a diferenciação das ESC.

Linhas contínuas e tracejadas indicam sinais positivos e negativos, respectivamente, nas fases de desenvolvimento indicadas. **Setas circulares** indicam auto-renovação. (Adaptado de Nosedá *et al.*, 2011).

Esta etapa de desenvolvimento cardíaco é caracterizada por reguladores transcricionais do FHF e SHF que expressam os fatores de transcrição *Isl1* (*Islet-1 transcription factor* em Inglês), *Nkx2.5* (*Nk2 transcription factor related, locus 5* em Inglês), *Tbx5* (*T-box transcription factor 5* em Inglês), *Gata4* e *Mef2c* (*Myocyte enhancer factor 2C* em Inglês), contudo o fator *Tbx5* está predominantemente presente em células do FHF e a expressão de *Isl1* é uma característica dos progenitores SHF (Figura 1.5) (Cai *et al.*, 2003; Moretti *et al.*, 2006; Vincent e Buckingham, 2010; Laugwitz *et al.*, 2005; Brade *et al.*, 2013).

A expressão mesodermal de FGF foi demonstrada ser crucial para o desenvolvimento do SHF, nomeadamente *Fgf8* e *Fgf10*, em que a deleção de um alelo destes genes demonstrou prejudicar o alinhamento do trato pulmonar, septação e orientação do coração (Frank *et al.*, 2002; Ilagan *et al.*, 2006; Marguerie *et al.*, 2006; Park *et al.*, 2006). Ao nível célula *Fgf8* regula a expressão de genes marcadores de SHF, *Isl1*

e *Mef2c* (Park *et al.*, 2006), levando a proliferação da população progenitor SHF. FGF10 é também expressa na SHF (Kelly, 2012; Brade *et al.*, 2013).

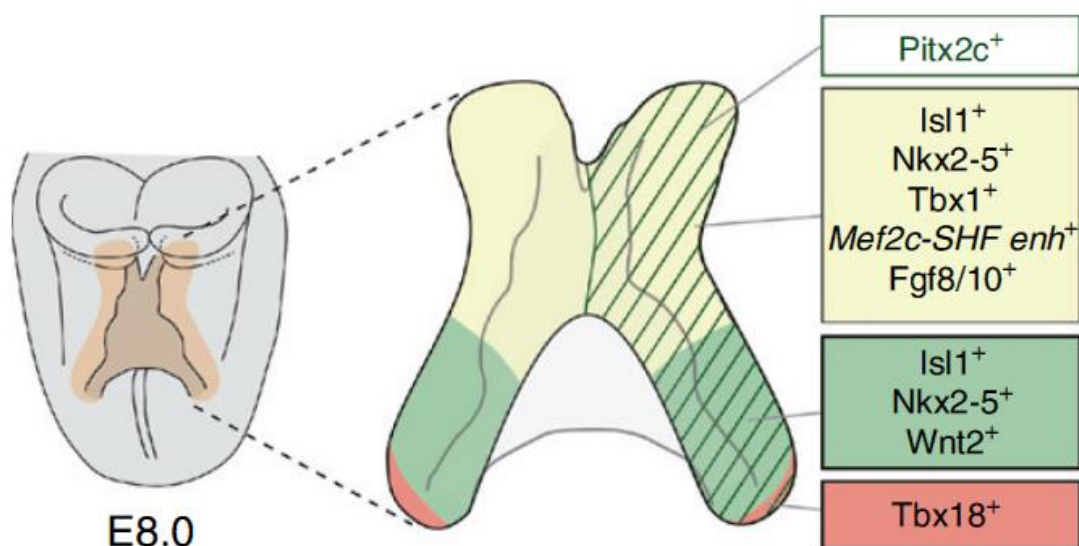


Figura 1.5- Subdomínio dentro do SHF. O SHF é caracterizado pela expressão de Nkx2.5 e Islet1 (Isl1) mostrado ao dia embrionário 8 (E8.0).

A parte anterior do SHF (amarelo) é composto por células que expressam Tbx1, Fgf8 ou Fgf10 e ativa o enhancer de Mef2c-SHF, enquanto Wnt2 é expresso em adição a Nkx2.5 e Isl1 no SHF posterior (verde). Na maior parte do lado posterior e lateral do SHF reside um domínio que se caracteriza pela expressão de Tbx18 mas não de Nkx2.5 (vermelho). Pitx2c é expresso apenas no lado esquerdo da SHF (riscas diagonais) (Adaptado de Vincent e Buckingham, 2010).

Um marcador específico de FHF foi recentemente identificado, o HCN4 - Canal iônico cíclico fechado de nucleótidos ativado por hiperpolarização (em Inglês, *ion channel hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel 4*), que é um marcador do sistema de transporte que aparenta ser específico de células que predominantemente se diferenciam em cardiomiócitos arteriais e ventriculares (Liang *et al.*, 2013; Spater *et al.*, 2013).

As proteínas da família Wnt estão também implicadas no desenvolvimento embrionário e cardiomiogênese (Figura 1.6), os sinais inibitórios mediados por estas, segregadas pelo tubo neural e ricas em cisteínas e glicoproteínas, suprimem a cardiomiogênese na mesoderme adjacente (Sachinidis *et al.*, 2003; Kami *et al.*, 2008).

A expansão e diferenciação de células progenitoras cardíacas positivas Nkx2-5 e Isl1 também dependem da sinalização da via canônica das Wnt (Lian *et al.*, 2012). Nos vertebrados a Wnt1/3a, ativa a via canônica de sinalização da Wnt/ β -catenina que leva à

estabilização da β -catenina, inibindo a diferenciação em cardiomiócitos e a Wnt11 promove a diferenciação cardíaca através da via não canônica em *Xenopus* e linhas celulares embrionárias de ratinho (Kami *et al.*, 2008).

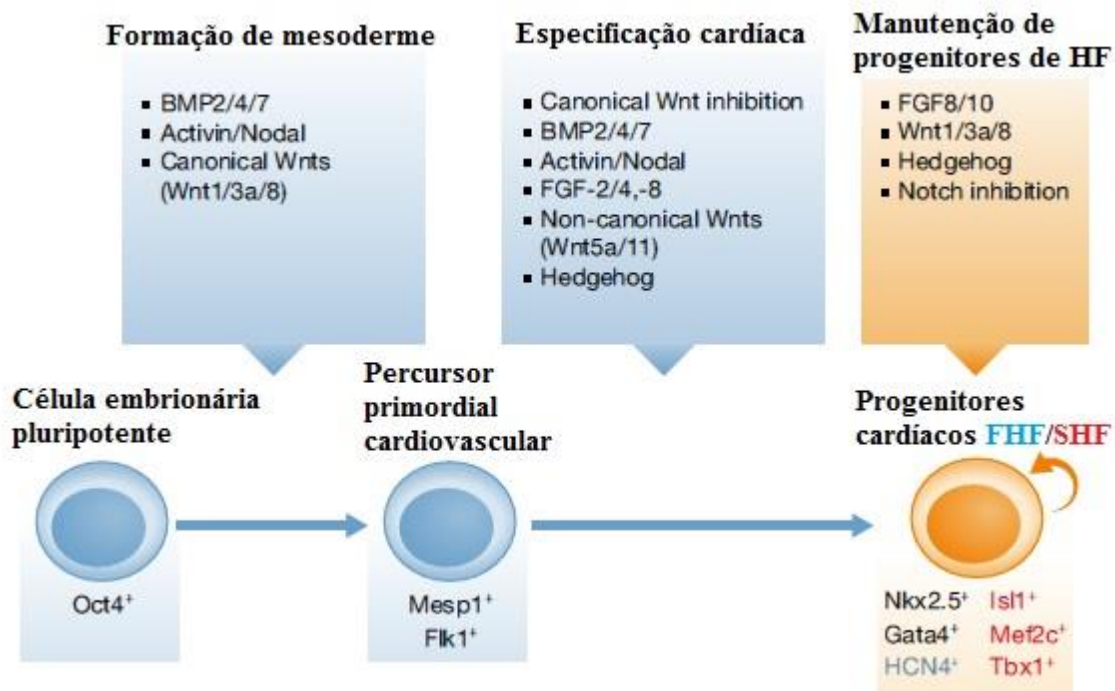


Figura 1.6- Vias de sinalização da programação de células cardíacas durante a embriogênese.

Esquema representativos das vias de sinalização e / ou moduladores da diferenciação cardíaca das fases de formação da mesoderme, especificação cardíaca e manutenção de progenitores do HF (campo cardíaco, em Inglês *heart field*).

Legenda: **Seta circular**, indicação de autorrenovação; **FHF**, primeiro campo cardíaco (genes marcados a azul); **SHF**, segundo campo cardíaco (genes marcados a vermelho) (Adaptado de Sahara *et al.*, 2015)

Existem evidências de que *Crescent*, um antagonista que inibe a Wnt8, e Dickkopf1 (*Dkk1*), também um antagonista das Wnt3a, Wnt8, Wnt2b e Wnt5a, promovem a cardiogênese (Kazanskaya *et al.*, 2000; Marvin *et al.*, 2001). Foi também demonstrado que a sinalização de BMP2 na mesoderme de embriões de galinha é essencial para a rápida ativação da sinalização de Nodal e os seus genes-alvo *Pitx2* e *Nkx3.2* (Piedra e Ros, 2002; Schlange *et al.*, 2002) (Fig. 1.7). A sinalização de Notch, IGF (fator de crescimento insulínico em Inglês *Insulin Growth Factor*), Hedgehog e Hippo surgiram recentemente como reguladores importantes na vasculogênese cardíaca

As células progenitoras do PE compreendem o epicárdio e diferenciam-se em fibroblastos intersticiais incorporados no miocárdio, células musculares lisas vasculares, células endoteliais dos vasos coronários e alguns miócitos, principalmente no septo atrioventricular. Adicionalmente, a interação do epicárdio com o miocárdio subjacente é crucial para o crescimento e maturação da câmara e crescimento muscular ventricular (Zhou *et al.*, 2008; Manner *et al.*, 2001; Schlueter e Brand, 2012; Thomas *et al.*, 2013).

Os progenitores CNCCs originam-se no tubo neural dorsal e contribuem para dar origem às células do músculo liso distal do tronco pulmonar e ao septo aórtico pulmonar, bem como o sistema nervoso autônomo do coração. O desenvolvimento da válvula cardíaca e formação de septos do coração é também criticamente dependente do desenvolvimento adequado do CNC (Hildreth *et al.*, 2008; Thomas *et al.*, 2013).

1.4. Família dos fatores de CITED

A família dos moduladores da transcrição CITED engloba quatro genes identificados, no entanto, apenas três desses genes estão presentes em mamíferos, CITED1, 2 e 4 (Yahata *et al.*, 2002). Todos os membros que constituem esta família apresentam um domínio conservado de ligação aos co-ativadores transcricionais p300 e CBP, chamado CR2 (*conserved region 2* em Inglês) e localizado na parte C-terminal das proteínas (Yahata *et al.*, 2000 e 2002). As proteínas CITED são essencialmente nucleares e têm entre 22 a 27 kDa de proteína nuclear e são moduladores transcricionais, que atuam aumentando ou diminuindo a transcrição genética (Yuan e Giordano, 2002).

1.4.1. Cited2

Cited2 é um co-ativador dos fatores de transcrição da família AP-2 (TFAP2), interagindo com o domínio de dimerização de TFAP2 (Bragança *et al.*, 2003) e formando um complexo proteico com as acetiltransferases e co-ativadores da transcrição, CBP (*cAMP-response-element binding protein* em Inglês) e p300. Os fatores p300/CBP, CITED2 e TFAP2A formam um complexo proteico implicado na formação do tubo neural e para o desenvolvimento normal cardíaco e hematopoético, desempenhando também um papel fundamental no controlo do crescimento celular (Bamforth *et al.*, 2001; Bragança *et al.*, 2003; Kranc *et al.*, 2003).

Cited2 liga-se diretamente e com elevada afinidade ao CH1 - primeira região

rica em cisteína-histidina (*first cysteine-histidine-rich* em Inglês) de p300 e CBP, atuando como modelador positivo de transcrição (interagindo com TFAP2 por exemplo) ou um regulador negativo de fatores, como o fator induzível por hipoxia (HIF)-1 α através da sua ligação competitiva com HIF-1 α a CBP/p300 (Bhattacharya *et al.*, 1999; Bamforth *et al.*, 2001 e 2004; Freedman *et al.*, 2003; Chou *et al.*, 2006; Qu *et al.*, 2007).

Em seres humanos, o gene CITED2 localiza-se na região 6q23, que está associada com diabetes neonatal *mellitus* e com resistência à insulina em adultos. Em diversos estudos, foi também demonstrado que os defeitos congênitos cardíacos estão relacionados com variações/mutações ou metilações anormais do gene CITED2 (Temple *et al.*, 1996; Bamforth *et al.*, 2001 e 2004; Xu *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2014).

A criação do eixo esquerda-direita é um processo fundamental da embriogênese dos vertebrados e a incapacidade de desenvolver essa assimetria leva a uma morfogênese incorreta de diversos órgãos internos que, constituem a causa de várias malformações cardíacas comuns. O modulador transcricional Cited2 é necessário para o estabelecimento normal do eixo esquerda-direita e para o desenvolvimento embrionário. Embriões com ausência do gene *cited2* (*Cited2* *-/-*) morrem durante a gestação com anomalias profundas de desenvolvimento, incluindo malformações cardíacas, exencefalias e agenesia adrenal (Bamforth *et al.*, 2001 e 2004).

Paradoxalmente, no laboratório e em outros estudos publicados, têm sido demonstrado que a expressão de *Cited2* promove a auto-renovação em ESC de ratinho (Chen *et al.*, 2012; Kranc *et al.*, 2015; Pritsker *et al.*, 2006), e os níveis sustentados de alta expressão de CITED2 em ESC indiferenciadas prejudica a sua diferenciação.

1.4.2. Consequências do knockout de *Cited2*

A invalidação da função do gene que codifica *Cited2* é letal para o embrião, causando defeitos no desenvolvimento do coração e do tubo neural, tais como, estreitamento anormal da artéria pulmonar e defeitos do septo ventricular, que são também defeitos cardíacos congênitos humanos comuns. Estas anomalias são, em parte, consequência da falta de modulação da atividade de transcrição do HIF-1 α na ausência de *Cited2*, sendo por isso o *Cited2* um gene regulador indispensável durante o desenvolvimento pré-natal (Yin *et al.*, 2002).

Cited2 é induzido por múltiplos fatores de crescimento e citoquinas que

transformam ontogeneticamente as células. Foi demonstrado em embriões de ratinho que na ausência de *Cited2* a proliferação de fibroblastos cessa prematuramente e que está associado a uma redução na fração de crescimento, morfologia celular senescente e aumento da expressão de inibidores de proliferação celular, nomeadamente, p16^{INK4a}, p19^{Arf} e p15^{INK4b}. Foi igualmente revelado que fibroblastos *Cited2* *-/-* tinham reduzida expressão dos genes do grupo *polycomb* *Bmi1* e *Mel18*, que funcionam como repressores da expressão dos genes INK4a/ARF e Hox (Kranc *et al.*, 2003).

1.5. Papel do *Cited2* nas células estaminais embrionárias

Em mESC, a perda acentuada da expressão de *Cited2* prejudica a capacidade de autorrenovação, proliferação, sobrevivência e desencadeia a diferenciação espontânea das mesmas, mas uma pequena população de ESC *Cited2* *-/-* com aparentes características de células indiferenciadas adaptam-se à perda de *Cited2*. Curiosamente, as ESC com *knockout* em *Cited2* demonstraram uma diminuição da diferenciação, incluindo o compromisso cardíaco, devido a um silenciamento tardio dos genes envolvidos na pluripotência e auto-renovação das ESC, tais como, Oct4, Klf4, Sox2 e c-Myc (Li *et al.*, 2012; Kranc *et al.*, 2015).

Em estudos recentes no laboratório foi demonstrado que *Cited2* também tem um papel importante nas ESC de ratinho por participar na regulação dos fatores responsáveis pela pluripotência destas células, tal como Nanog, Klf4 e Tbx3. O *knockout* de *Cited2* nas ESC leva estas células a perder a capacidade de proliferação e de ficarem indiferenciadas e a um aumento da apoptose (Kranc *et al.*, 2015). Por outro lado resultados obtidos no laboratório indicaram que o *knockout* de *Cited2* também provoca defeitos de diferenciação das ESC em linhagens de células cardíacas, sendo o papel de *Cited2* crítico nas primeiras 48 horas dessa diferenciação. Por outro lado, a sobre expressão de *Cited2* nas ESC indiferenciadas promove a diferenciação cardíaca (Pacheco-Leyva – manuscrito em preparação).

Vários estudos mostram a importância de diferentes fatores na diferenciação cardíaca. As deleções de, *Bmp4* (Jiao *et al.*, 2003; Klaus, *et al.*, 2007), *Wnt3* (Ueno *et al.*, 2007), *Wnt3a* (Palpant *et al.*, 2007), *Wnt5a* (Pandur *et al.*, 2002; Palpant *et al.*, 2007), *Wnt11* (Palpant *et al.*, 2007; Ueno *et al.*, 2007), *Dkk1* (Foley e Mercola, 2005;

Palpant *et al.*, 2007), *Cer1* (Cai *et al.*, 2013), *FGF8* (Frank *et al.*, 2002; Ilagan *et al.*, 2006) *FGF10* (Marguerie *et al.*, 2006) e *Nodal* (Schier, 2003; Nosedá *et al.*, 2011) resultaram em anomalias na diferenciação cardíaca de ESC, tendo-se verificado o mesmo tipo de alterações com a deleção de *Cited2* (Bamforth *et al.*, 2001 e 2004; Bragança *et al.*, 2003; Kranc *et al.*, 2003; Sahara *et al.*, 2015).

2. Objetivo

A manutenção, diferenciação e proliferação celular ocorrem e são controladas por uma rede complexa de vias de sinalização. No trabalho aqui apresentado pretende-se esclarecer de que forma a proteína CITED2 está envolvida nas cascatas de sinalização importantes para a diferenciação de células estaminais embrionárias de ratinho em células cardíacas.

Com base em estudos anteriores realizados no laboratório, formulou-se a hipótese que Cited2 controla a expressão de fatores ou proteínas que são secretados para o meio de cultura e que promovem a diferenciação cardíaca.

O principal objetivo deste projeto consistiu em testar esta hipótese, verificando se o meio de cultura de células estaminais embrionárias de ratinho E14/T sobre expressando Cited2, promove a diferenciação cardíaca destas células e se é capaz de resgatar os defeitos de diferenciação das células estaminais embrionárias com deleção de Cited2.

3. Materiais e métodos

Por forma a compreender as vias envolvidas, sobre expressou-se CITED2 em células estaminais E14/T. Com a sobre expressão desta proteína, recolheu-se o meio de cultura rico em fatores secretados – Meio condicionado. Este meio foi posteriormente utilizado para iniciar a diferenciação das ESC C2^{fl/fl}[Cre]B através da elaboração de EB, durante as primeiras 48 horas e na presença ou ausência de 4HT. Sendo assim possível determinar a significância dos fatores secretados em relação aos defeitos cardíacos observados em células com a deleção de Cited2.

Os EB foram analisados visualmente, por dois observadores diferentes, através das contagens de focos contráteis e molecularmente através da técnica de RT-qPCR.

3.1. Cultura de células

3.1.1. Linhas celulares

Para este estudo foram utilizadas as linhas celulares E14/T (Nichols *et al.*, 1990) e ESC C2^{fl/fl}[Cre]B (Kranc *et al.*, 2015).

Ambas as linhagens foram cultivadas sob uma camada de 0.1% de gelatina (Sigma) com meio Glasgow Modified Eagle Medium (GMEM, Pan Biotech) suplementado com 4mM de L-Glutamina (200mM GIBCO®, Invitrogen™), 1% Penicilina/Streptomicina (GIBCO®, Invitrogen™), 1X Aminoácidos não essenciais (100X GIBCO®, Invitrogen™), 1mM Piruvato de Sódio (100mM GIBCO®, Invitrogen™), 0.05mM β-mercaptoetanol (GIBCO®, Invitrogen™) e 10% (v/v) de Soro Fetal Bovino (FBS) (Sigma) a 37°C com 5% CO₂. Foi também adicionado 1000U/ml de LIF (ESGRO mLIF Meddium Supplement, Millipore) que impede a diferenciação destas células e as mantém pluripotentes.

As culturas foram monitorizadas utilizando um microscópio invertido.

As células E14/T são uma linha de ESC de ratinho que derivam de uma estirpe 129/Ola consanguínea isolada em 1985 pelo Dr. Martin Hooper, as E14T/Tg2a (Hooper *et al.*, 1987), que expressam de forma constitutiva o poliovírus T grande a partir de uma cassete de expressão de cDNA integrada, que em ESC permite a replicação extracromossômica de vetores de DNA transfetados que contêm a origem de replicação do poliovírus (Gassmann *et al.*, 1995; Aubert *et al.*, 2002). Estas células foram utilizadas para transfectar com os vetores pPyCAGIP-FLAG-CITED2 e pPyCAGIP.

As ESC C2^{fl/fl}[Cre]B de ratinho (Kranc *et al.*, 2015), foram usadas para a diferenciação em EB. Estas células têm o gene *Cited2* flanqueado por dois sítios *LoxP* e expressam uma recombinase Cre quimérica (Figura 3.1). Esta enzima é ativada por suplementação de 1µM de 4-hidroxi-Tamoxifen (4HT) no meio de cultura, e assim excisar o gene *Cited2* levando ao seu *knockout*. O início da diferenciação (48 horas) das ESC C2^{fl/fl}[Cre]B será feita na presença ou na ausência de 4HT.

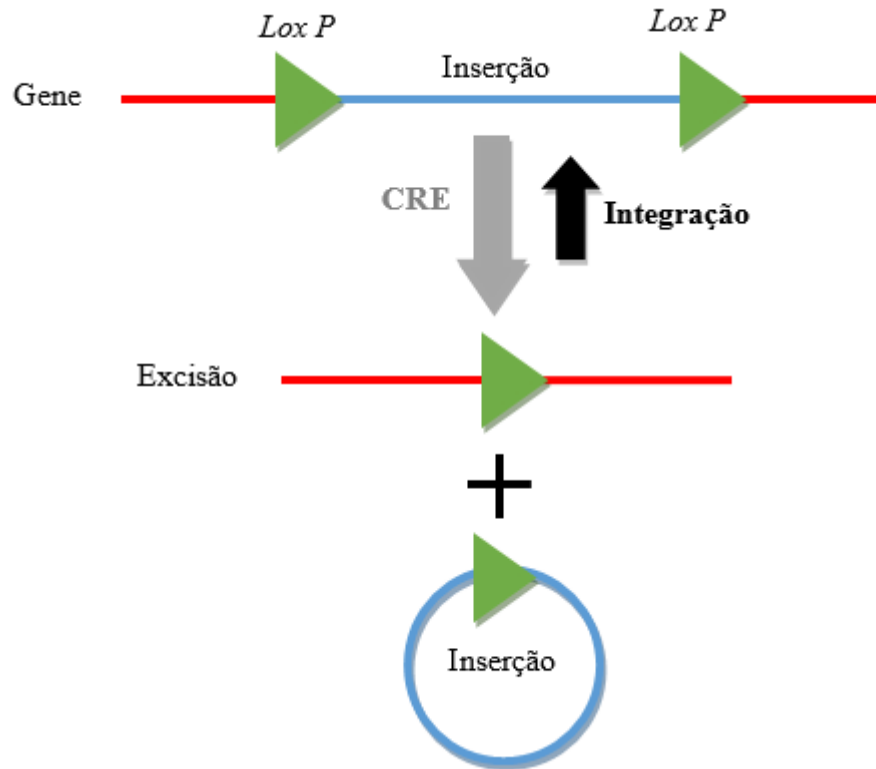


Figura 3.1 — Esquema exemplificativo do *knockout* de um gene por recombinação, através da recombinase Cre em locais *LoxP* individuais. Os locais homólogos *LoxP* flanqueiam o gene de interesse, no nosso caso, o gene *Cited2*, que será excisado. (Adaptado de Norman e MacInnes, 2002).

3.1.2. Vetores plasmidícos

Para induzir a sobre expressão da proteína CITED2 a linha celular E14T foi transfetada com o vetor pPyCAGIP-FLAG-CITED2. Este plasmídeo é um vetor epissomal que permite a expressão da proteína CITED2 humana com um “tag” FLAG na parte N-terminal. Estas células, que chamaremos E14T/flag-CITED2, expressam de forma estável e constitutiva a proteína FLAG-CITED2 (Chen *et al.*, 2012).

Numa segunda transfeção, obteve-se as células, que passam a ser denominadas E14T/Controlo, contêm o vetor pPyCAGIP, um vetor controlo (vazio), que não sobre expressa a proteína de interesse. O vetor pPyCAGIP também é uma construção episomal que expressa um gene que confere resistência à puromicina, permitindo assim a seleção das células transfetadas ao fazer um tratamento com este antibiótico que elimina as células que não incorporaram ou que perderam o vetor (Chambers *et al.*, 2003).

Uma vez transfetadas as células, tornou-se assim possível preparar os meios condicionados.

3.1.3. Transfeção

A transfeção é um processo de introdução de DNA em células eucarióticas, por meio de métodos físicos, químicos ou lípidos (Groskreutz e Schenborn, 1997).

Para a transfeção das células E14T utilizou-se o método de lipofecção, que consiste na utilização de lípidos que podem formar lipossomas num meio aquoso. Estes lipossomas contêm o material de transfeção, ou seja, plasmídeos, que se podem fundir com a membrana celular, permitindo que o DNA plasmídico atravessasse para o citoplasma e posteriormente para o núcleo. Pode ocorrer que o plasmídeo nunca chegue ao núcleo e por conseguinte não seja transcrito, é necessário por isso fazer uma seleção das células que contem o plasmídeo excluído as demais (Dalby *et al.*, 2004).

Com a transfeção introduziu-se os vetores, pPyCAGIP-FLAG-CITED2 e pPyCAGIP nas células E14/T. Estas foram plaqueadas 55×10^4 cel/mL numa placa P60 revestida com 0.1% de gelatina. Mantiveram-se as células a 37°C, 5% CO₂ por 24h. Transfetaram-se as células com 3µg de vetor e com Lipofectamine® 2000 (Invitrogen, Life technologies™), 3,2 µl por µg de vetor. Após 5 horas adicionou-se meio GMEM+sup+10% FBS, para inativação da lipofetamina. Passadas 24 horas da transfeção, renovou-se o meio e adicionou-se um antibiótico, Puromicina (Sigma), para fazer uma seleção das células transfetadas.

3.2. Meio condicionado

O meio condicionado é um meio rico em fatores secretados pelas ESC quando estas são mantidas em condições de cultura, tais como, fatores de crescimento e citocinas. Estes fatores são secretados sob a forma de secretomas, microvesículas ou exossomas (Kim e Choi, 2013).

Para obtenção de meio condicionado, plaqueou-se 100×10^4 células/mL das linhas celulares E14T-CAGIP-FLAG- CITED2 e E14T-CAGIP. As células foram mantidas em cultura em meio GMEM+sup+10%FBS por 24 horas. Passado este período, substituiu-se o meio de cultura por GMEM+sup+10%FBS sem LIF, mantendo estas condições por mais 24 horas. Em seguida, o meio das células E14T-CAGIP-FLAG-Cited2 e E14T- CAGIP foi recolhido, filtrado, com filtro de $0.20 \mu\text{m}$ e armazenado a 4°C .

3.3. Diferenciação de células estaminais embrionárias

As ESC possuem a capacidade de se diferenciarem em vários tipos de células quando mantidas em cultura, aplicando os estímulos adequados. O método utilizado para induzir a diferenciação de culturas *in vitro* foi a técnica de HD que irá originar a formação de estruturas esféricas em suspensão, os EB. Utilizou-se esta técnica devido à semelhança dos EB com o tecido embrionário pós-implantação *in vivo* (Rippon *et al.*, 2004; Choi *et al.*, 2005; Yu e Thomson, 2006).

Esta técnica consiste na formação de agregados celulares em gotas suspensas de $20 \mu\text{l}$ com 1000 células em cada gota. Enquanto estão em suspensão as células agregam e formam os EB que se vão diferenciar em células especializadas (Rippon *et al.*, 2004).

É recorrendo a este método que foi possível a diferenciação eficiente das ESC $\text{C2}^{\text{fl/fl}}[\text{Cre}]\text{B}$ em cardiomiócitos com capacidade de contração, formando focos de contração nas culturas celulares. Estes cardiomiócitos expressam marcadores específicos, incluindo proteínas estruturais, recetores e fatores de transcrição cardíacos.

3.3.1. *Embryoid bodies*

O meio condicionado elaborado a partir das células E14T/flag-CITED2 e E14T/Controlo foram usados na diferenciação das ESC C2^{fl/fl}[Cre]B de ratinho. Esta diferenciação foi efetuada na ausência e presença de *knockout* do gene Cited2, adicionando EtOH ou 4HT, respetivamente.

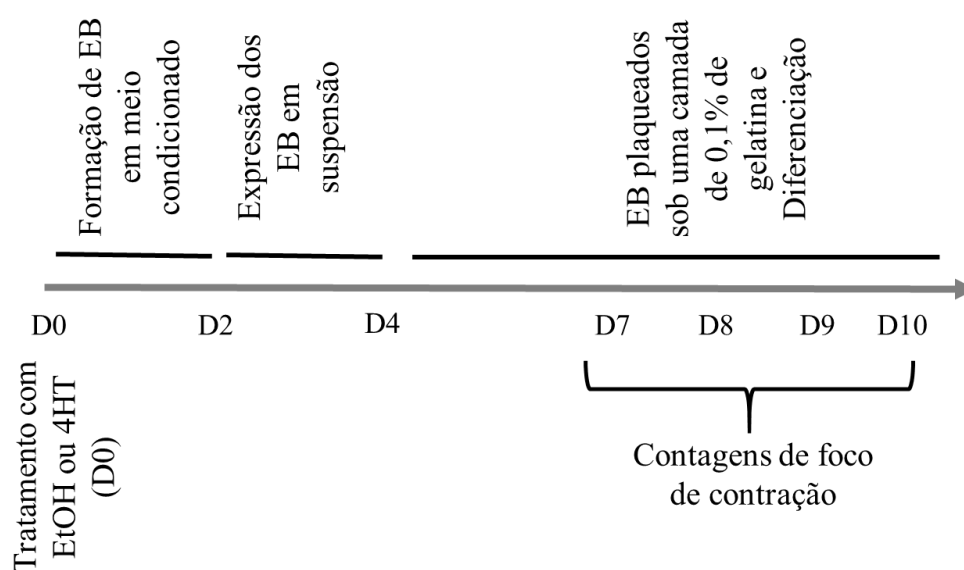


Figura 3.2- Escala de tempo do crescimento dos EB.

Ao dia 0 (D0) são elaborados as HD, ao dia 2 (D2) vira-se a placa e adiciona-me meio GMEM+sup+20%FBS, no dia 4 (D4) coloca-se os EB numa placa com 0.1% de gelatina para que estes adiram e se diferenciem. As contagens dos EB e focos contráteis foram efetuadas aos dias 7,8,9 e 10 (Adaptado de Pacheco-Leyva *et al.* – manuscrito em preparação).

Ambos os meios condicionados foram suplementados com mais FBS, totalizando 20% do mesmo, adicionou-se 1 μ M de 4HT ou EtOH a 100% e 5x10⁴ células/mL de C2^{fl/fl}[Cre]B. Procedeu-se de seguida à elaboração de EB, adicionando 20 μ L sob a forma de gota numa placa de Petri, a qual no fim foi invertida e colocada na estufa a 37°C, 5% CO₂. Após 48h as placas foram colocadas na posição correta e adicionou-se meio GMEM+sup+20% FBS, onde os EB permaneceram a crescer em suspensão por mais 48horas. Findo as 48horas os EB foram transferidos para uma placa revestida com 0.1% gelatina para aderirem, facilitando a sua monotorização.

Para averiguarmos o efeito dos meios condicionados na diferenciação cardíaca procedemos às contagens das zonas de batimentos (focos contráteis) em cada EB aos

dias 7, 8, 9 e 10 após o início da diferenciação (Figura 3.2).

Para além da monitorização dos efeitos dos meios condicionados na diferenciação das células ESC em cardiomiócitos, esta foi complementada por análise de expressão de genes associados a este processo, em que os EB foram recolhidos para análise ao dia 2 e 3 de diferenciação (Figura 3.3).

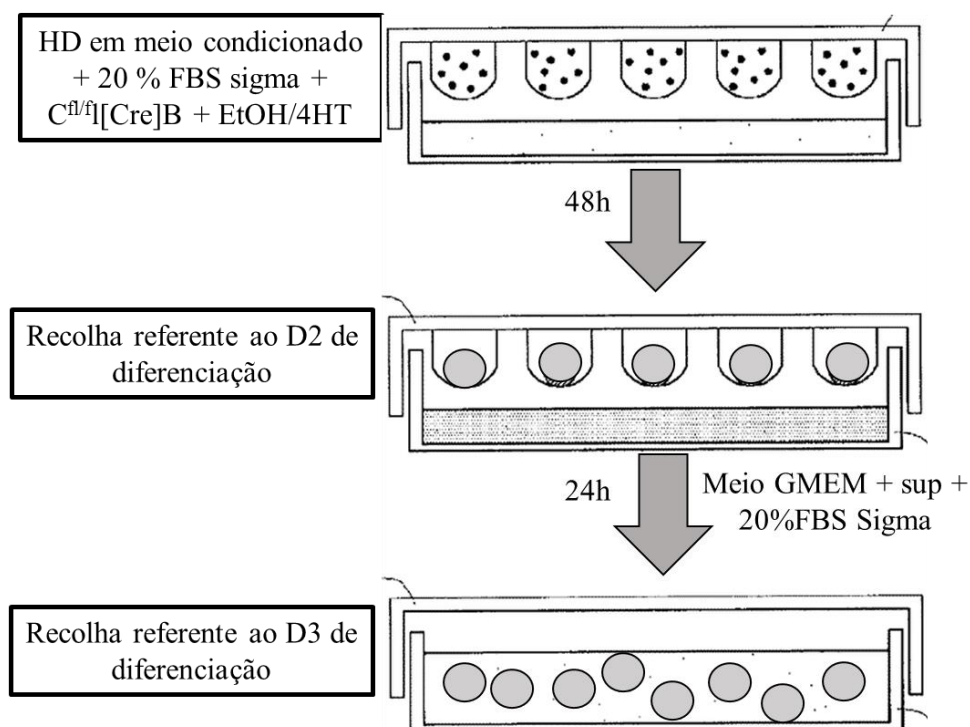


Figura 3.3- Esquema exemplificativo do método de formação de EB utilizando a técnica de HD, para posterior recolha dos mesmos ao dia 2 e 3 de diferenciação (adaptado de Lee e Han, 2010).

3.4. *Análise de expressão transcricional*

No decorrer da diferenciação cardíaca, há uma série de cascatas de sinalização que estão ativas. De entre os vários genes descritos nestes processos, selecionou-se alguns dos mais relevantes para este estudo e procedeu-se à análise dos mesmos, recorrendo ao PCR quantitativo de transcrição reversa em tempo real (RT-qPCR para *Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction* em Inglês). Com esta técnica foi possível avaliar as alterações a nível da expressão dos genes ao longo do processo de diferenciação cardíaca.

Esta análise foi efetuada às amostras das células E14T-CAGIP e E14T-CAGIP-FLAG-Cited2, a partir das quais se prepararam os meios condicionados, e aos EB nos dias 2 e 3 de diferenciação, com o intuito de identificar que forma os marcadores cardíacos envolvidos na via do CITED2 estavam a ser expressos entre as diferentes condições experimentais.

O RT-qPCR é uma técnica que permite a amplificação e monitorização, para deteção e medição, em tempo real, de produtos gerados durante cada ciclo de PCR através da acumulação dos mesmos, tudo isto numa única etapa. Para possibilitar esta deteção é necessário a introdução de um corante fluorescente que liga ao DNA, SYBRGreen, um aparelho para monitorizar a amplificação em tempo real e um software apropriado para a análise quantitativa. (Heid *et al.*, 1996; Saunders, 2004; Bustin e Mueller, 2005).

O SYBRGreen intercala nas cadeias duplas de DNA amplificado (Figura 3.) durante os ciclo de PCR, a quantidade de cadeias duplas produzidas a cada ciclo irá aumentar exponencialmente, e por isso mais SYBRGreen se irá ligar e emitir fluorescência, a 520 nm. (Velden *et al.*, 2003; Bustin e Mueller, 2005). Para avaliar a especificidade dos produtos de PCR pode ser executada uma análise com base na *melting curve*. Para esta análise a temperatura é aumentada lentamente desde 40 a 95°C com monitorização contínua da fluorescência. A fluorescência será elevada a baixas temperaturas, quanto todo o DNA é cadeia dupla, mas vai diminuir drasticamente em torno da temperatura de fusão dos produtos de DNA. Os produtos de PCR de diferentes comprimentos ou sequências ira derreter a diferentes temperaturas e será observado como picos distintos ao surgir o primeiro negativo derivado da fluorescência vs temperatura e se apenas um produto de PCR específico for formado, apenas um único pico é visível. (Velden *et al.*, 2003).

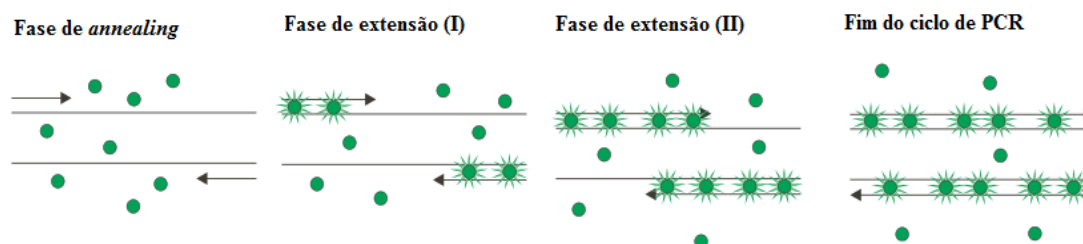


Figura 3.4 - Princípio da técnica de RT-qPCR utilizando o SYBRGreen.

A fluorescência é aumentada com a ligação do fluoróforo ao DNA de cadeia dupla. Durante a fase de extensão mais SYBRGreen se irá ligar ao produto de PCR, resultando num aumento da

fluorescência. Conseqüentemente, durante cada ciclo de PCR mais sinal fluorescente será detetado (Adaptado de Velden *et al.*, 2003).

Durante os 15 primeiros ciclos de PCR, uma fluorescência específica irá determinar um patamar, o *baseline*, este limiar corresponde á detecção do primeiro produto de amplificação do PCR e é usado para calcular o limiar do ciclo (C_T), ou ponto de passagem de cada amostra, ou seja, o ciclo de PCR em que a fluorescência excede a linha do limiar (Figura 3.4). O valor do C_T é diretamente proporcional à quantidade de seqüência alvo presente na amostra, sendo possível, com a elaboração de uma curva padrão para o valor do C_T (Figura 3.5), calcular a quantidade de seqüência numa amostra (Heid *et al.*, 1996; Velden *et al.*, 2003; Bustin e Mueller, 2005)

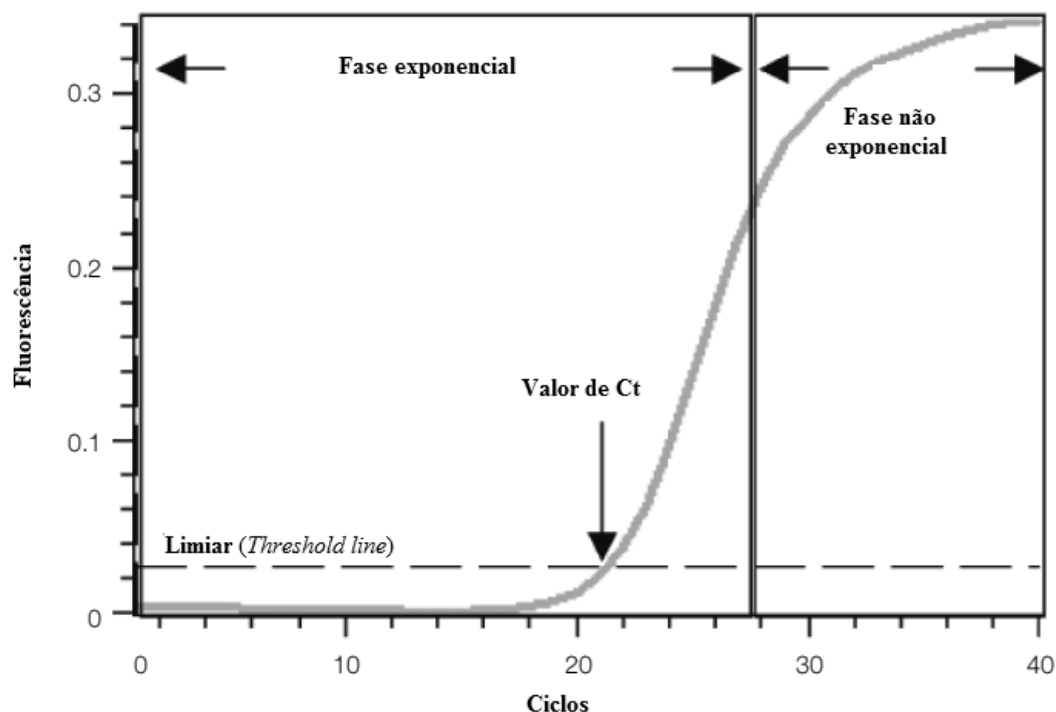


Figura 3.5 Gráficos de amplificação com a curva exponencial de um produto de PCR detetado, em que o valor de C_T corresponde ao valor onde a curva se sobrepõem ao limiar, chamado de *threshold line* (Adaptado de Real-Time PCR Applications Guide, 2006).

Ao contrário de outros métodos de PCR, este não exige o tratamento das amostras após amplificação, aumentando o rendimento dos ensaios e é também uma técnica altamente precisa em comparação com a análise de tamanho em géis. Outra vantagem é a pouca variação entre ensaios, o que contribui para resultados confiáveis e reprodutíveis. Tratando-se de uma técnica baseada em fluorescência contém a capacidade quantitativa em ensaios de PCR, em vez de um ensaio qualitativo (Heid *et*

al., 1996; Saunders, 2004; Bustin e Mueller, 2005).

A preparação das amostras para análise dos níveis de transcrição dos diferentes genes, nas diferentes condições experimentais inclui a extração de RNA total seguido da síntese de DNA complementar.

3.4.1. Extração de RNA

Para a extração de RNA total tripsinizou-se as células em cultura para que estas se destacassem da placa. Em seguida a tripsina foi inativada com a adição de meio de cultura (GMEM + SUP+10% FBS) e a suspensão celular foi transferida para um *falcon*. Centrifugou-se as amostras a 800 rpm durante 4 minutos. Descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se os *pellets* em PBS 1X. A suspensão foi transferida para *eppendorfs* e centrifugada. Removeu-se o sobrenadante e as amostras foram conservadas a -80°C até posterior utilização.

A cada amostra adicionou-se 1mL de TRI REAGENT (SIGMA) ressuspendendo o *pellet*. Incubou-se à temperatura ambiente por 5 minutos seguido da adição de 0,2 volumes de clorofórmio. Agitou-se vigorosamente por inversão, seguindo de nova incubação a temperatura ambiente durante 5 minutos. Centrifugou-se a 15000 rpm, durante 10 minutos a 4°C. Recolheu-se a fase aquosa para um novo tubo e adicionou-se 0,5 volumes de isopropanol gelado (-20°C), agitou-se vigorosamente por inversão e incubou-se a -20°C. Terminada a incubação, centrifugou-se as amostras a 15000 rpm durante 15 minutos a 4°C. Descartou-se o sobrenadante e procedeu-se a dois passos de lavagem com EtOH a 70% gelado (-20°C). Secou-se o pellet, ressuspendeu-se na quantidade apropriada de água miliQ e procedeu-se à quantificação das amostras utilizando o Nanodrop 2000c spectrophotometer (Thermo Scientific).

3.4.2. Limpeza de RNA contaminado com fenol

Durante a extração de RNA utilizou-se o reagente TRI, composto por uma mistura de tiocianato de guanidina e fenol. Quando necessário as amostras contaminadas com fenol foram limpas.

Procedeu-se à limpeza adicionando 1 volume de clorofórmio, agitando por inversão cerca de 5 minutos, seguida de centrifugação a 10.000g durante 4 minutos a 4°C. Recolheu-se a fase aquosa para um novo *eppendorf*, descartando a fase orgânica. A

este novo *eppendorf* adicionou-se 3 volumes de EtOH 70% a -20°C, 1/10 volumes de 3M NA-Acetato a pH 4.8 e colocou-se a -20°C para incubar durante a noite. Centrifugou-se novamente a 10.000g durante 45 minutos a 4°C. Descartou-se o sobrenadante e adicionou-se 1mL de EtOH 70% para lavar o *pellet*, centrifugou-se a 10.000g por 20 minutos, descartou-se o sobrenadante e secou-se o *pellet*. Por fim dissolveu-se o RNA no volume apropriado de água miliQ e quantificou-se no Nanodrop 2000c spectrophotometer (Thermo Scientific).

3.4.3. Síntese de DNA complementar

Para síntese de cDNA utilizou-se o kit e o protocolo experimental *Maxima First Strand cDNA Synthesis for RT-qPCR* da Thermo Scientific no termociclador C1000™ Thernal Cyclor (Bio-Rad). Para esta reação adicionou-se 4µl de 5X Reaction Mix, 2µl de Maxima Enzyme Mix, 1µg de RNA e perpez-se o volume, num total de 20µl, com água nuclease-free. Seguidamente, incubou-se a reação no termociclador a 25°C durante 10 minutos, seguido de 15 minutos a 50°C e terminou-se a reação a 85°C durante 5 minutos. Finda a síntese de cDNA, as amostras foram diluídas de 1:5 e armazenadas a -20°C, para posteriormente serem utilizadas para o RT-qPCR.

3.4.4. RT-qPCR

No RT-qPCR o corante fluorescente utilizado foi o SsoFast™ EvaGreen® Supermix (Bio-rad) (2x), que é composto por um *buffer* de reação a 2x com dNTPs, polímerase Sso7d-fusion, MgCl₂, corante EvaGreen e estabilizadores.

O *mix* reacional foi preparado adicionando SsoFast™ EvaGreen® Supermix 1x, 0.2µM de *primer forward* e *reverse* para os respetivos genes de interesse e perfazer o volume final com água miliQ, nas quantidades calculadas consoante o número de amostras analisadas por set experimental.

Adicionou-se 19 µL de *mix* aos poços da placa de PCR da Thermo Scientific e 1µL de cDNA, previamente diluído. A reação de PCR decorreu no C1000™ Thernal Cyclor (Bio-Rad) associada a CFX96™ Real-Time System (Bio-Rad) utilizando o programa CFX Manager™ Software (Bio-Rad). O programa de amplificação iniciou-se com 5 minutos a 95°C, correspondendo a fase de desnaturação, seguido de 1 segundo a

95°C e 35 segundos a 65°C durante 39 ciclos, correspondente à fase de *annealing* dos *primers* e extensão. Seguidamente, manteve-se a temperatura a 68°C durante 5 segundos e por último, 5 minutos a 95°C, passo de extensão final. A reação terminou a 37°C durante 30 minutos.

A lista de *primers* utilizados para RT-qPCR encontra-se abaixo na Tabela 3.1. Os níveis de expressão foram normalizados com *Gapdh*.

Tabela 3.1 Lista dos *primers* específicos de cada gene de interesse e temperatura de *annealing* para RT-qPCR. *Temperatura de *annealing*.

Gene	Forward 5'-3'	Reverse 5'-3'	°C*
BMP 4	TTCCTGGTAACCGAATGCTGA	CCTGAATCTCGGCGACTTTTT	65
Cer 1	CTCTGGGGAAGGCAGACCTAT	CCACAAACAGATCCGGCTT	65
CITED2	CGCATCATCACCAGCAGCAG	CGCTCGTGGCATTTCATGTTG	65
Dkk1	CTGAAGATGAGGAGTGCGGCTC	GGCTGTGGTCAGAGGGCATG	65
FGF 8	CCAGCCCCAAACTACCCCGAGGAG	CGCGCAGACCCAGCCCAGGAT	65
FGF 10	CAGCGGGACCAAGAATGAAG	TGACGGCAACAACCTCCGATTT	65
GAPDH	TCCCACTCTTCCACCTTCGATGC	GGGTCTGGGATGGAAATTGTGAGG	65
Nodal	TGGCGTACATGTTGAGCCTCT	TGAAAGTCCAGTTCTGTCCGG	65
Wnt 3	ACCTGGAGAAGGCTGGAAGT	CTTGTCCTTGAGGAAGTCGC	65
Wnt 3a	TGGCTCCTCTCGGATACCTC	AAAGCTACTCCAGCGGAGGC	65
Wnt 5a	CAAATAGGCAGCCGAGAGAC	TCTAGCGTCCACGAACTCCT	65
Wnt 5b	AGATAGGTAGCCGAGAGACTGC	GGTAGCCGTACTCCACGTTG	65
Wnt 11	GCTCCATCCGCACCTGTT	CGCTCCACCACTCTGTCC	65

3.5. Análise Estatística

As análises estatísticas dos resultados foram realizadas utilizando o programa Microsoft Excel 2013.

A significância estatística foi determinada através do teste *t student* de duas caudas, assumindo variância desigual. Valores de $p < 0.05$ foram considerados estatisticamente significativos.

4. Resultados

4.1. O meio condicionado de células que sobre expressam CITED2 reverte defeitos de diferenciação cardíaca causados pela falta de Cited2

Como mencionado anteriormente, vários fatores secretados e moduladores de vias de sinalização que têm um papel chave na cardiogénese a partir de ESC, tais como, *Bmp4*, *Wnt3*, *Wnt3a*, *Wnt5a*, *Wnt11*, *Dkk1*, *Cer1*, *FGF8*, *FGF10* e *Nodal*, em que a deleção de um destes genes resultam em anomalias na diferenciação cardíaca de ESC, tendo-se verificado o mesmo tipo de alterações com a deleção de *Cited2* (Frank *et al.*, 2002; Pandur *et al.*, 2002; Jiao *et al.*, 2003; Schier, 2003; Foley e Mercola, 2005; Ilagan *et al.*, 2006; Marguerie *et al.*, 2006; Klaus, *et al.*, 2007; Palpant *et al.*, 2007; Ueno *et al.*, 2007; Nosedá *et al.*, 2011; Cai *et al.*, 2013).

Por outro lado, no laboratório foi demonstrado que a sobre expressão transitória de CITED2 nas ESC indiferenciadas promove a cardiogénese e aumenta o número de cardiomiócitos maduros 10 dias após o início da diferenciação (Pacheco-Leyva – manuscrito em preparação). Para averiguar se moléculas secretadas pelas células sobre expressando CITED2 podem reverter os defeitos de diferenciação observados nas células com expressão de *Cited2* depletada, procedeu-se à diferenciação de células ESC $C2^{fl/fl}[Cre]B$ durante 48 horas, em meio condicionado proveniente de células E14/T expressando um vetor controlo (meio Ctr) ou um vetor expressando flag-CITED2 (meio FC2). As células $C2^{fl/fl}[Cre]B$ foram simultaneamente tratadas com 4-hidroxi-tamoxifen (4HT) para estabelecer o *knockout* de *Cited2* ou etanol como controlo (EtOH). Após 48 horas em gotas em suspensão as células foram diferenciadas em meio de diferenciação normal (não condicionado) e sem tratamento com 4HT ou Etanol. Para a contagem de EB e focos de contração foram elaborados cinco replicados das quatro condições experimentais.

Nas condições controlo (Ctr) utilizadas para diferenciação das ESC $C2^{fl/fl}[Cre]B$, tal como já tinha sido observado por outros membros do laboratório, o *knockout* de *Cited2* provoca defeitos de diferenciação das ESC em linhagens de células

cardíacas, sendo o papel de Cited2 crítico nas primeiras 48 horas dessa diferenciação. De facto, a depleção de Cited2 por tratamento com 4HT nas células diferenciadas em meio Ctr levou a uma diminuição do número de EB com batimentos (Figura 4.1A) e do número de foci contrateis por colónia (Figura 4.1B) aos dias 8, 9 e 10 após o início da diferenciação. Também se observou que o meio condicionado (FC2) não promoveu um aumento da diferenciação cardíaca das células tratadas com etanol (Figura 4.1A). No entanto estas diferenças não foram significativa, com valores de $p > 0.05$.

Relativamente às células tratadas com 4HT em meio que sobre expressa flag-Cited2 houve um aumento da percentagem (%) EB com focos contráteis (Figura 4.1A) bem como de focos de contração (Figura 4.1B) em comparação com as células tratadas 4HT e cultivadas em meio Ctr no início da diferenciação, este aumento atingiu valores significativos comparativamente com os das células tratadas com etanol onde Cited2 não foi depletado.

De acordo com o que foi dito acima, o meio condicionado de células que sobre expressam CITED2 reverte defeitos de diferenciação cardíaca, causados pelo *knockout* de Cited2 nas primeiras 48 horas, comprovando que o seu papel é crítico logo no início da diferenciação.

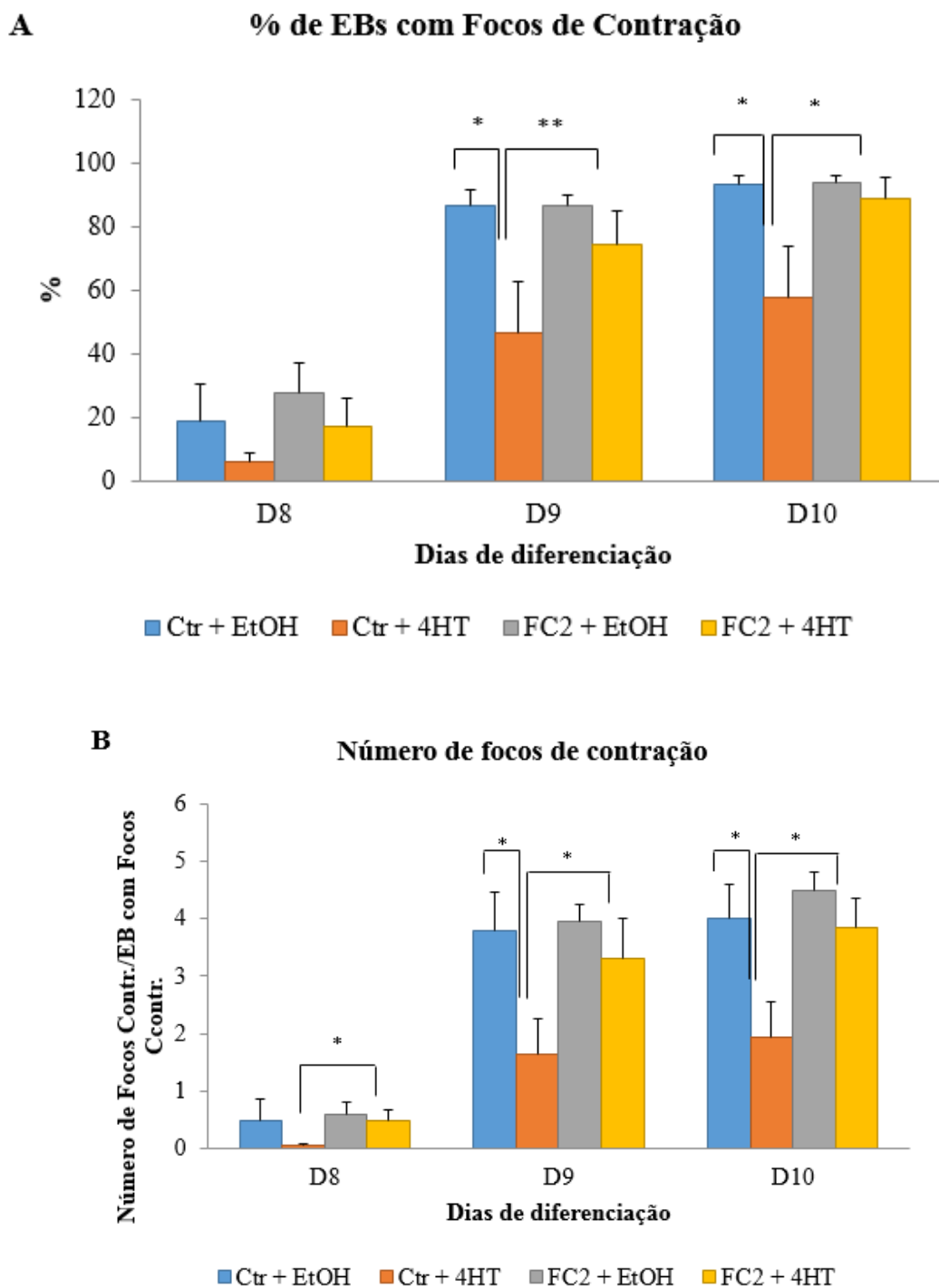


Figura 4.1 – Gráficos do número de colónias a contrair (%) e do número de focos de contração/EB com focos de contração aos dias 8,9 e 10 de diferenciação.

(A) Gráfico do número de colónias a contrair (%).

(B) Gráfico do número de focos de contração/EB com focos de contração. Legenda: **Ctrl**, refere-se ao meio condicionado controlo que não sobre expressa nenhuma proteína; **FC2**, refere-se ao meio condicionado que sobre expressa a proteína CITED2. Os resultados são apresentados com a média \pm erro padrão da média de cinco replicados biológicos independentes avaliados por dois observadores independentes. * $p < 0.05$ ** $p < 0.02$.

4.2. As células E14/T sobre expressando flag-CITED2 expressam mais transcritos de *Fgf10*, *Dkk1*, *Wnt5a* e *Wnt11*

Tendo-se observado a recuperação das células *knockout* para *Cited2* aquando da diferenciação em meio FC2, quando comparadas com as células tratadas com etanol e diferenciadas em meio Ctr, estes resultados vieram reforçar a hipótese que a sobre expressão de flag-CITED2 em E14/T pode induzir a expressão de fatores que são posteriormente secretados para o meio de cultura.

Em seguida, procedeu-se à análise da expressão genética, em células E14T/flag-CITED2 indiferenciadas, dos genes, *Bmp4*, *Wnt3*, *Wnt3a*, *Wnt5a*, *Wnt5b*, *Wnt11*, *Dkk1*, *Cer1*, *FGF8*, *FGF10*, *Nodal*, e *Cited2*, que foram descritos como estando provavelmente sob influência de *Cited2* e envolvidos na formação e diferenciação cardíaca, como já descrito anteriormente.

A expressão transcricional dos genes *Bmp4*, *Cer1*, *Fgf8*, *Nodal*, *Wnt3*, *Wnt3a* e *Wnt5b*, não foi alterada de forma significativa em ESC E14T/flag-CITED2 comparando com as células controlo (Figura 4.2). Por outro lado, é de notar que os níveis de transcrição de *Dkk1*, *Fgf10*, *Wnt5a* e *Wnt11* em ESC que sobre expressam flag-CITED2 aumentaram significativamente em comparação com a expressão nas células controlo. Relativamente à expressão de *Cited2* é observado um aumento significativo nas células transfetadas com o vetor de expressão flag-CITED2, comprovando a existência da transfeção (Figura 4.2).

Em suma, de acordo com os transcritos identificados, as células E14T/flag-CITED2 expressam de forma aumentada, os fatores de transcrição *Fgf10*, *Dkk1*, *Wnt5a* e *Wnt11* que, entre outros, aparentam promover a diferenciação.

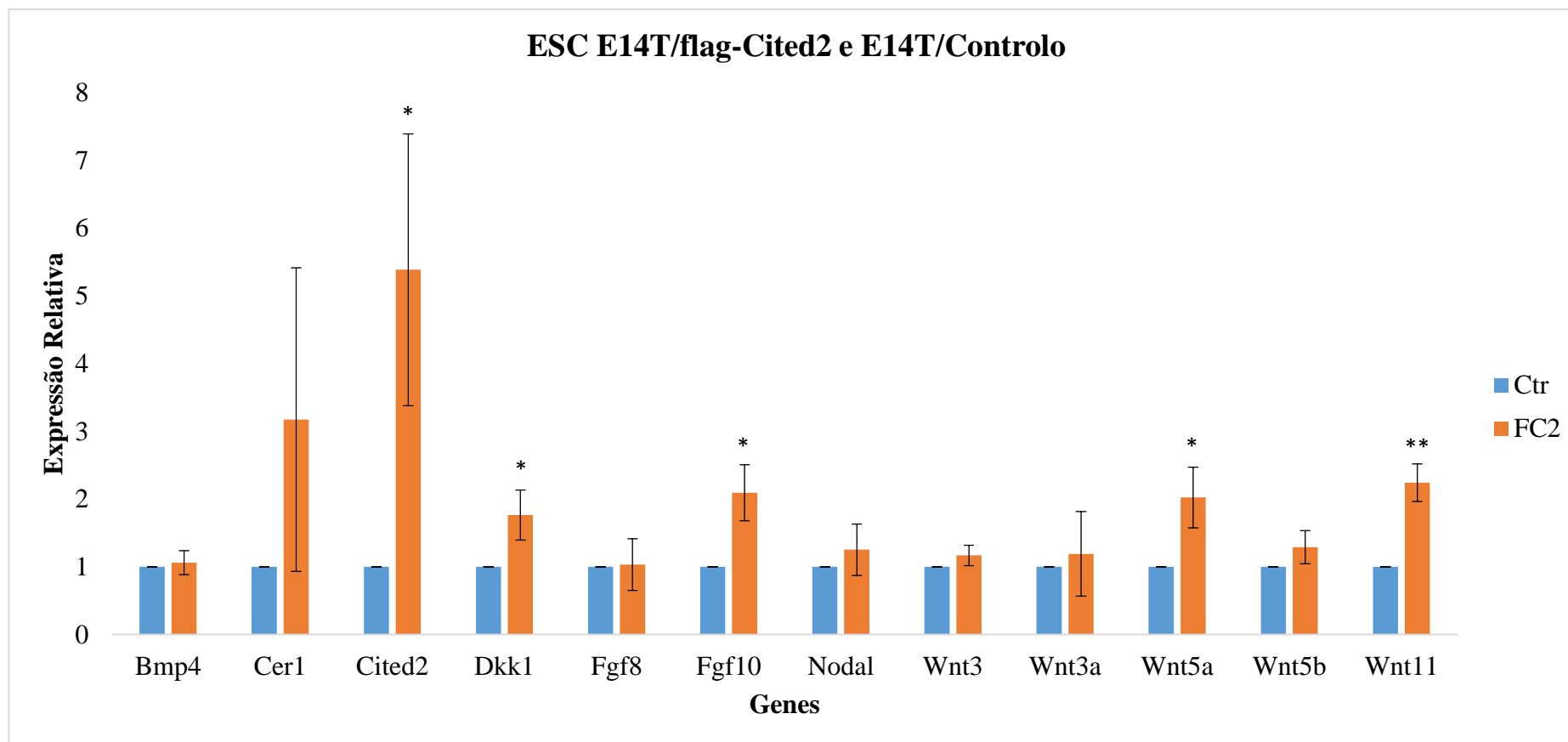


Figura 4.2 - Gráfico da expressão relativa de ESC E14T/flag-Cited2 e E14T/Controlo. Expressão relativa de *Bmp4*, *Wnt3*, *Wnt3a*, *Wnt5a*, *Wnt5b*, *Wnt11*, *Dkk1*, *Cer1*, *Fgf8*, *Fgf10*, *Nodal* e *Cited2* normalizados com *Gapdh* e determinados por RT-qPCR em células indiferenciadas (D0). ESC E14/T transfetadas com um plasmídeo que expressa de forma constitutiva os vetores flag-CITED2 e controlo. Os resultados são apresentados com a média \pm erro padrão da média de quatro replicados biológicos independentes. Legenda: **Ctrl**, refere-se às células controlo que não sobre expressa nenhuma proteína; **FC2**, refere-se às células que sobre expressa a proteína CITED2. * $p < 0.05$ ** $p < 0.003$

4.3. As células $C2^{fl/fl}$ [Cre]B diferenciadas em meio condicionado com sobre expressão de *CITED2* apresentam uma expressão transcricional não correspondente à hipótese testada

Como mostrado na secção anterior, a transfeção com flag-CITED2 leva a alterações na expressão de genes nas células E14/T. Tomando em consideração os efeitos que, fatores secretados por estas células tiveram na diferenciação, procedeu-se á análise de expressão transcricional dos genes *Bmp4*, *Wnt3*, *Wnt3a*, *Wnt5a*, *Wnt5b*, *Wnt11*, *Dkk1*, *Cer1*, *FGF8*, *FGF10*, *Nodal*, e *Cited2* em células $C2^{fl/fl}$ [Cre]B diferenciadas, uma vez que, como já referido, foram previamente descritos como estando provavelmente sob influência de *Cited2* e envolvidos na formação e diferenciação cardíaca (Sahara *et al.*, 2015).

Para análise de expressão de genes foi realizada a técnica de RT-qPCR em três replicados para as células $C2^{fl/fl}$ [Cre]B, cultivadas nos meios condicionados, flag-Cited2 e controlo, em condições de com e sem *knockout*, nas primeiras 48 horas e os EB foram recolhidos para análise ao D2 e D3 de diferenciação.

De acordo com os resultados obtidos (Figuras 4.3 e 4.4), não houve *knockout* de *Cited2* nas células $C2^{fl/fl}$ [Cre]B, por isso a expressão destes genes não é relevante para o que queríamos demonstrar.

Ao D2 (Figura 4.3) e ao D3 (Figura 4.4) de diferenciação, a expressão transcricional dos genes analisados, apresentarem algumas diferenças significativas, no entanto, estas diferenças provavelmente deve-se a variações existentes nas próprias células.

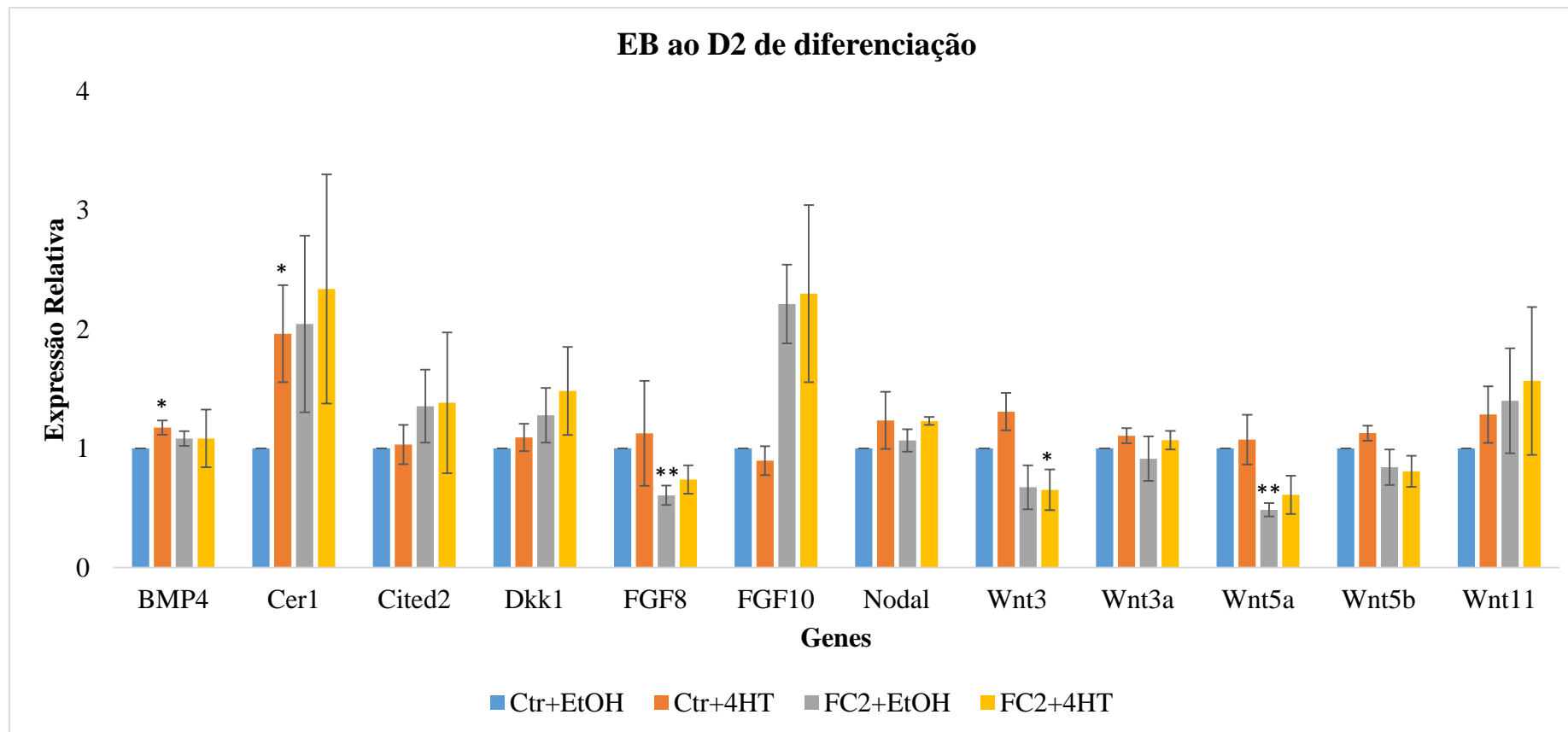


Figura 4.3 - Gráfico da expressão dos EB ao dia dois (D2) de diferenciação. Expressão relativa de *Bmp4*, *Cer1*, *Cited2*, *Dkk1*, *Fgf8*, *Fgf10*, *Nodal*, *Wnt3*, *Wnt3a*, *Wnt5a*, *Wnt5b* e *Wnt11* normalizados com *Gapdh* e determinados por RT-qPCR em ESC C2^{fl/fl}[Cre]B diferenciadas em meio condicionado flag-CITED2 e controle e na ausência ou presença de 4HT. Os resultados são apresentados com a média ± erro padrão da média de três replicados biológicos independentes. Legenda: **Ctr**, refere-se ao meio condicionado controle que não sobre expressa nenhuma proteína; **FC2**, refere-se ao meio condicionado que sobre expressa a proteína CITED2. * $p < 0.05$ ** $p < 0.005$, relativamente ao meio Ctr+EtOH.

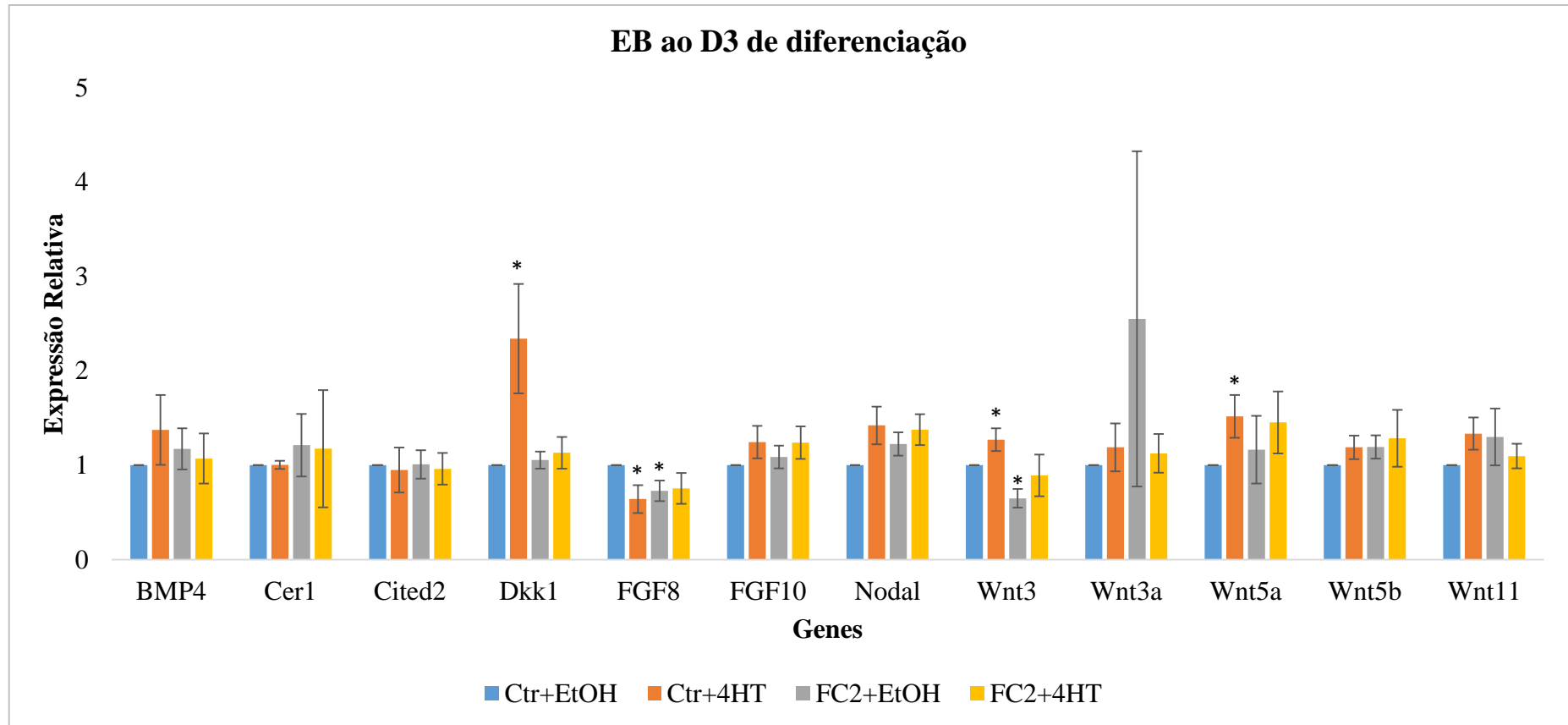


Figura 4.4 - Gráfico da expressão dos EB ao dia 3 (D3) de diferenciação. Expressão relativa de *Bmp4*, *Cer1*, *Cited2*, *Dkk1*, *Fgf8*, *Fgf10*, *Nodal*, *Wnt3*, *Wnt3a*, *Wnt5a*, *Wnt5b* e *Wnt11* normalizados com *Gapdh* e determinados por RT-qPCR em ESC C2^{fl/fl}[Cre]B diferenciadas em meio condicionado flag-CITED2 e controlo e na ausência ou presença de 4HT. Os resultados são apresentados com a média ± erro padrão da média de três replicados biológicos independentes. Legenda: **Ctr**, refere-se ao meio condicionado controlo que não sobre expressa nenhuma proteína; **FC2**, refere-se ao meio condicionado que sobre expressa a proteína CITED2. * $p < 0.05$, relativamente ao meio Ctr+EtOH.

5. Discussão

Cited2 é um modelador transcricional essencial para o desenvolvimento normal cardíaco. O *knockout* deste gene em embriões de ratinho causa a morte do embrião durante a gestação, decorrente de anomalias graves, nomeadamente, malformações cardíacas derivadas de um estabelecimento anormal do eixo esquerda-direita (Bamforth *et al.*, 2001 e 2004; Bragança *et al.*, 2003; Kranc *et al.*, 2003).

Estudos desenvolvidos anteriormente no laboratório demonstraram que a depleção de Cited2 ao dia 0 e dia 2 de diferenciação perturba significativamente os eventos subsequentes na formação de células cardíacas. Por forma a complementar os trabalhos já desenvolvidos pelo grupo, avaliaram-se os efeitos que, fatores a jusante do Cited2 das vias onde esta proteína está envolvida teriam como forma de compensar o seu *knockout* em células estaminais.

De acordo com os resultados obtidos neste estudo, a expressão e secreção de diversos fatores para o meio condicionado preparado a partir de ESC que sobre expressam CITED2 demonstra que, nas primeiras 48 horas de diferenciação, há a compensação da depleção Cited2 e a diferenciação cardíaca prossegue de forma semelhante às condições controlo (Figura 4.2).

A sobre expressão de Cited2 nas células E14/T foi complementada com a análise da expressão transcricional, através da técnica de RT-qPCR, para os genes *Bmp4* (Jiao *et al.*, 2003; Klaus, *et al.*, 2007), *Wnt3* (Ueno *et al.*, 2007), *Wnt3a* (Palpant *et al.*, 2007), *Wnt5a* (Pandur *et al.*, 2002; Palpant *et al.*, 2007), *Wnt5b*, *Wnt11* (Palpant *et al.*, 2007; Ueno *et al.*, 2007), *Dkk1* (Foley e Mercola, 2005; Palpant *et al.*, 2007), *Cer1* (Cai *et al.*, 2013), *FGF8* (Frank *et al.*, 2002; Ilagan *et al.*, 2006) *FGF10* (Marguerie *et al.*, 2006) e *Nodal* (Schier, 2003; Nosedá *et al.*, 2011) uma vez que são genes envolvidos na formação de mesoderme e diferenciação cardíaca e consequentemente indicadores de diferenciação (Sahara *et al.*, 2015). De entre os genes analisados, observou-se que a sobre expressão de Cited2 nas células E14/T levou a um aumento de expressão transcricional de *Wnt5a*, *Wnt11*, *Fgf10* e *Dkk1*.

No entanto, é de ter em consideração que podem existir outros fatores cuja expressão possa ter sido também afetada e que não foram aqui analisados.

Relativamente aos genes com expressão aumentada, *Wnt11* e *Wnt5a* estes pertencem a vias não canónica da Wnt que estão associadas à diferenciação cardíaca. Foi demonstrado que *Wnt5a* em combinação com o *Dkk1*, um inibidor da via canónica das Wnt, inibem a via canónica de *Wnt3a*, promovendo assim a cardiogénese (Kazanskaya *et al.*, 2000; Marvin *et al.*, 2001; Kami *et al.*, 2008; Nosedá *et al.*, 2011; Lian *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2013). Referente ao *Wnt11*, foi demonstrado que desempenha um papel importante na organização de cardiomiócitos essencial ao desenvolvimento do miocárdio ventricular (Nagy *et al.*, 2010).

O gene *Fgf10* pertence ao grupo de genes que codificam para proteínas de fatores de crescimento de fibroblastos e que são essenciais na indução de fatores de transcrição cardíaca e diferenciação de cardiomiócitos em vertebrados (Schultheiss *et al.*, 1997; Schlange *et al.*, 2000, Kami *et al.*, 2008). Este gene, juntamente com *Fgf8*, é expresso na parte anterior de SHF e são importantes para a proliferação celular e desenvolvimento do tronco pulmonar (Kelly *et al.*, 2001; Cai *et al.*, 2003; Watanabe *et al.*, 2010).

Como mencionado em diversos estudos, o *knockout* de *Cited2* em embriões de ratinho provoca, a morte do embrião durante a gestação, decorrente de defeitos cardíacos (Bamforth *et al.*, 2001 e 2004; Bragança *et al.*, 2003; Kranc *et al.*, 2003). De forma semelhante, ratinhos com deleção de *Fgf10* e *Wnt5a*, exibem igualmente defeitos cardíacos, tais como, anomalias na septação ventricular e no tronco pulmonar (Marguerie *et al.*, 2006; Nagy *et al.*, 2010; Watanabe *et al.*, 2010).

Neste estudo, a expressão transcricional de *Nodal* não é significativa nas E14T/flag-CITED2 indiferenciadas em comparação com as células controlo, no entanto, de acordo com a literatura, este gene é importante para o estabelecimento do eixo esquerda-direita (Bamforth *et al.*, 2004). Ratinhos com *knockout* de *Cited2* apresentam expressão de *Nodal* no nó primitivo, mas não na placa lateral esquerda da mesoderme, onde este é necessário para o estabelecimento correto do eixo esquerda-direita e desenvolvimento cardiovascular (Bamforth *et al.*, 2004). Uma hipótese para não terem sido observadas diferenças significativas na expressão de *Nodal* neste estudo, ao contrário do descrito noutros estudos, poderá dever-se ao facto de que a análise é realizada em células indiferenciadas (D0) e os dados existentes são referentes a embriões ao dia 8.5 (Bamforth *et al.*, 2004).

Em relação às células $C2^{fl/fl}[Cre]B$, tal como nas células E14T/flag-CITED2, os resultados da diferenciação cardíaca foram complementados por análise dos transcritos dos

genes *Bmp4*, *Wnt3*, *Wnt3a*, *Wnt5a*, *Wnt5b*, *Wnt11*, *Dkk1*, *Cer1*, *FGF8*, *FGF10* e *Nodal*. No entanto, as expressões transcricionais existentes na sua grande maioria não são significativas de um ponto de vista estatístico e, aparentemente, a expressão de *Cited2* indica que não houve *knockout* do gene, por isso a expressão destes genes em células $C2^{fl/fl}[Cre]B$ diferenciadas não é relevante para o que queríamos demonstrar.

No laboratório já foi efetuado uma cinética da expressão de *Cited2* aos dias 0, 2, 3, 5 e 12 de diferenciação em ESC $C2^{fl/fl}[Cre]B$ com e sem adição de 4HT no dia zero (D0) de diferenciação, durante 48 horas, onde foi concluído que os dias com menor expressão de *Cited2* são o D2 e D3 de diferenciação (Pacheco-Leyva *et al.* – manuscrito em preparação), podendo ser essa uma a razão do *knockout* destas mesmas células em meios condicionados aparentar ter níveis baixos de expressão e sem variações significativas do ponto de vista estatístico.

Este estudo foi realizado em ESC de ratinho devido à sua analogia com *Cited2* em humanos. *Cited2* apresenta funções conservadas entre mamíferos placentários, com 95% de identidade entre humanos e ratinhos, possui três regiões conservadas entre membros da família *Cited*, bem como uma junção rica em serina-glicina (SRJ para *Serine-glycine Rich Junction* em Inglês) característica do *Cited2* e foi demonstrado que é possível substituir em ratinhos a sequência que codifica *Cited2*, por uma sequência de *Cited2* humana, o que não originou anomalias morfológicas nos ratinhos (Shioda, *et al.*, 1996; Bhattacharya *et al.*, 1999; Chen, *et al.*, 2012).

6. Conclusões

Através dos dados recolhidos das contagens de focos contrateis podemos concluir que, existem fatores secretados no meio condicionado elaborado a partir de células que sobre expressam flag-CITED2, as E14T/flag-CITED2, que promovem a diferenciação cardíaca, e que este meio é capaz de reverter os defeitos de diferenciação causados pelo *knockout* de Cited2.

Relativamente à análise quantitativa de transcritos, referente às ESC E14T/flag-CITED2, os resultados suportam a noção de que Cited2 está envolvido na diferenciação cardíaca de ESC, induzindo a sua especificação nas células indiferenciadas por mediação da expressão de genes de transcrição cardíaca e fatores secretados, como Dkk1, Fgf10, Wnt5a e Wnt11.

No que respeita às células C2^{fl/fl}[Cre]B diferenciadas, os dados obtidos indicam que não houve *knockout* de Cited2, e por conseguinte a expressão destes genes não é relevante para o que se pretendia demonstrar, não sendo possível retirar conclusões.

7. Perspetivas Futuras

Para seguir a linha de investigação inicial, era interessante observar-se os efeitos de diferenciação mantendo o meio de células que sobre expressam flag-CITED2 até aos dias 5 e 12 de diferenciação em ESC C2^{fl/fl}[Cre]B com *knockout* de Cited2, em vez das primeiras 48 horas, uma vez que já foi identificado através de uma cinética da expressão de Cited2 em ESC C2^{fl/fl}[Cre]B, com e sem adição de 4HT ao D0, durante 48 horas, que os dias com maior expressão eram os D5 e D12. Novamente analisando posteriormente a expressão transcricional de *Bmp4*, *Wnt3*, *Wnt3a*, *Wnt5a*, *Wnt5b*, *Wnt11*, *Dkk1*, *Cer1*, *FGF8*, *FGF10* e *Nodal*.

Uma outra vertente que se poderia investigar seria demonstrar que os fatores identificados neste estudo, *Dkk1*, *Fgf10*, *Wnt5a* e *Wnt11*, estão a promover a diferenciação cardíaca, relativamente a outros, que possam estar presentes no meio condicionado de E14T/flag-CITED2, que podem igualmente contribuir para promover a diferenciação cardíaca e que não foram identificados. Para isso poderia, por exemplo, elaborar um meio de cultura em que esses fatores (*Fgf10*, *Wnt5a*, *Wnt11*, *Dkk1*) fossem os únicos presentes no meio utilizado para diferenciar ESC C2^{fl/fl}[Cre]B, com *knockout* de Cited2, ou até, se possível, utilizar o meio condicionado elaborado de E14T/flag-CITED2 na diferenciação de ESC C2^{fl/fl}[Cre]B, com ou sem *knockout*, e adicionar inibidores dos recetores para os genes de interesse (*Fgf10*, *Wnt5a*, *Wnt11*, *Dkk1*) ou então anticorpos para cada gene e observar as alterações na diferenciação, identificando qual, o quais os fatores, *Fgf10*, *Wnt5a*, *Wnt11* ou *Dkk1* estão a promover a diferenciação cardíaca revertendo os defeitos de diferenciação causados pelo *knockout* de Cited2.

Também é possível seguir uma abordagem em larga escala e identificar os fatores secretaados para o meio condicionado elaborado de células E14T/flag-CITED2, utilizando técnicas de Proteómica, como por exemplo, elaborar um gel SDS-PAGE 2D para separar as proteínas, seguido de análise por espectrometria de massa, permitindo assim a identificação das proteínas/fatores presentes no meio condicionado de células que sobre expressam flag-CITED2.

8. Bibliografia

- Aubert, J., Dunstan, H., Chambers, I. and Smith, A. "Functional gene screening in embryonic stem cells implicates Wnt antagonism in neural differentiation." *Nat. Biotechnol.* 20 (2002): 1240-1245.
- Bamforth, S.D., Bragança, J., Eloranta, J.J., Murdoch, J.N., Marques, F.I., Kranc, K.R., Farza, H., Henderson, D.J., Hurst, H.C., and Bhattacharya, S. "Cardiac malformations, adrenal agenesis, neural crest defects and exencephaly in mice lacking Cited2, a new Tcf2 co-activator." *Nat. Genet.* 29 (2001): 469-474.
- Bamforth, S.D., Bragança, J., Farthing, C.R., Schneider, J.E., Broadbent, C., Michell, A.C., Clarke, K., Neubauer, S., Norris, D., Brow, N.A., Anderson, R.H. and Bhattacharya, S. "Cited 2 controls left-right patterning and heart development." *Nat. Genet.* 36 (2004): 1189-1196.
- Beddington, R.S. and Robertson, E.J. "Axis development and early asymmetry in mammals." *Cell* 96 (1999): 195-209.
- Bergmann, O., Bhardwaj, R., Bernard, S., Zdunek, S., Barnabe-Heider, F., Walsh, S. and Frisen, J. "Evidence for cardiomyocyte renewal in humans." *Science* 324 (2009): 98-102.
- Bhattacharya, S., Macdonald, S.T. and Farthing, C.R. "Molecular mechanisms controlling the coupled development of myocardium and coronary vasculature." *Clin. Sci. (Lond)* 111 (2006): 35-46.
- Bhattacharya, S., Michels, C.L., Leung, M.K., Arany, Z.P., Kung, A.L. and Livingston, D.M. "Functional role of p35srj, a novel p300/CBP binding protein, during transactivation by HIF-1." *Genes Dev.* 13 (1999): 64-75.
- Bio-Rad Laboratories, Inc. *Real-Time PCR Applications Guide*. 2006.
- Biswas, A. and Hutchins, R. "Embryonic Stem Cells. Stem Cells and Development." *Stem Cells and Develop.* 16 (2007): 213-221.
- Boheler, K.R., Czyz, J., Tweedie, D., Yang, H-T., Anisimov, S.V. and Wobus, A.M. "Differentiation of Pluripotent Embryonic Stem Cells Into Cardiomyocytes." *Circ. Res.* 91 (2002): 189-201.
- Bondue, A., Lapouge, G., Paulissen, C., Semeraro, C., Lacovino, M., Kyba, M. and Blanpain, C. "Mesp1 Acts as a Aaster Regulator of Multipotent Cardiovascular Progenitor Specification." *Cell Stem Cell* 3 (2008): 69-84.
- Brade, T., Pane, L.S., Moretti, A., Chien, K.R. and Laugwitz, K.L. "Embryonic Heart Progenitors and Cardiogenesis." *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 3 (2013): a013847.
- Bragança, J., Eloranta, J.J., Bamforth, S.D., Ibbitt, J.C., Hurst, H.C. and Bhattacharya, S. "Physical and Functional Interactions among AP-2 Transcription Factors, p300/CREB-binding Protein, and CITED2." *The Journal of Biological Chemistry* 278 (2003): 16021-16029.
- Buckingham, M., Meilhac, S. and Zaffran, S. "Building the mammalian heart from two sources of myocardial cells." *Nat. Rev. Genet.* 6 (2005): 826-35.

- Bustin, S.A. and Mueller, R. "Real-time reverse transcription PCR (qRT-PCR) and its potential use in clinical diagnosis." *Clinical Science* 109 (2005): 365-379.
- Cai, C-L., Liang, X., Shi, Y., Chu, P-H., Pfaff, S.L., Chen, J. and Evans, S. "Isl1 identifies a cardiac progenitor population that proliferates prior to differentiation and contributes a majority of cells to the heart." *Dev. Cell* 5 (2003): 877-889.
- Cai, W., Albin, S., Wei, K., Willems, E., Guzzo, R.M., Tsuda, M., Giordani, L., Spiering, S., Kurian, L., Yeo, G.W., Puri, P.L. and Mercola, M. "Coordinate Nodal and BMP inhibition directs Baf60c-dependent cardiomyocyte commitment." *Genes Dev.* 27 (2013): 2332-2344.
- Chambers, I., Colby, D., Robertson, M., Nichols, J., Lee, S., Tweedie, S. and Smith, A. "Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells." *Cell* 113 (2003): 643-655.
- Chan, S. S-K., Shi, X., Toyama, A., Arpke, R.W., Dandapat, A., Lacovino, M., Kang, J., Le, G., Hagen, H.R., Garry, D.J. and Kyba, M. "Mesp1 Patterns Mesoderm into Cardiac, Hematopoietic, or Skeletal Myogenic Progenitors in a Context-Dependent Manner." *Cell Stem Cell* 12 (2013): 587-601.
- Chen, C., Bentham, J., Cosgrove, C., Bragança, J., Cuenda, A., Bamforth, S.D., Schneider, J.E., Watkins, H., Keavney, B., Davies, B. and Bhattacharya, S. "Functional Significance of SRJ Domain Mutations in CITED2." *PLoS ONE* 7 (2012): e46256.
- Chen, X., Xu, H., Yuan, P., Fang, F., Huss, M., Vinsensius, B.V., Wong, E., Yuriy, L.O., Zhang, W., Jiang, J., Loh, Y-H., Yeo, H.C., Yeo, Z.X., Narang, V., Govindarajan, K.R., Leong, B., Shahab, A., Ruan, Y., Bourque, G., Sung, W-K., Clarke, N.D., Wei, C.L. and Ng, H-H. "Integration of External Signaling Pathways with the Core Transcriptional Network in Embryonic Stem Cells." *Cell* 133 (2008): 1106-1117.
- Choi, D., Lee, H-J., Jee, S., Jin, S., Koo, S.K., Paik, S.S., Jung, S.C., Hwang, S-Y., Lee, K.S. and Oh, B. "In Vitro Differentiation of Mouse Embryonic Stem Cells: Enrichment of Endodermal Cells in the Embryoid Body." *Stem Cell* 23 (2005): 817-827.
- Chou, Y.T., Wang, H., Chen, Y., Danielpour, D., Yang, Y.C. "Cited2 modulates TGF-beta-mediated upregulation of MMP6." *Oncogene* 25 (2006): 5547-5560.
- Coucouvanis, E. and Martin, G.R. "Signals for Death and Survival: A Two-Step Mechanism for Cavitation in the Vertebrate Embryo." *Cell.* 83 (1995): 279-287.
- Czyz, J. and Wobus, A.M. "Embryonic stem cell differentiation: The role of extracellular factors." *Differentiation* 68 (2001): 167-174.
- Dalby, B., Cates, S., Harris, A., Ohki, E.C., Tilkins, M.L., Price, P.L. and Ciccarone, V.C. "Advanced transfection with Lipofectamine 2000 reagent: primary neurons, siRNA and high-throughput applications." *Methods* 33 (2004): 95-103.
- Desbaillets, I., Ziegler, U., Groscurth, P., Gassmann, M. "Embryoid bodies: An in vitro model of mouse embryogenesis." *Exp. Physiol.* 85 (2000): 645-651.
- Doetschman, T.C., Eistetter, H., Katz, M., Schmidt, W. and Kemler, R. "The in vitro development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium." *J. Embryol. exp. Morph.* 87 (1985): 27-45.

- Donovan, P.J. and Gearhart, J. "The end of the beginning for pluripotent stem cells." *Nature* 414 (2001): 92-97.
- Fauzi, I., Panoskaltis, N. and Mantalaris. "In Vitro Differentiation of Embryonic Stem Cells into Hematopoietic Lineage: Towards Erythroid Progenitor's Production." *Methods in Mol. Biol.*, 2015: 1-18.
- Foley, A.C. and Mercola, M. "Heart induction by Wnt antagonists depends on the homeodomain transcription factor Hex." *Genes Dev.* 19 (2005): 387-396.
- Frank, D.U., Fotheringham, L.K., Brewer, J.A., Muglia, L.J., Tristani-Firouzi, M., Capecchi, M.R. and Moon A.M. "An Fgf8 mouse mutant phenocopies human 22q11 deletion syndrome." *Develop.* 129 (2002): 4591-4603.
- Freedman, S.J., Sun, Z-Y.J., Kung, A.L., France, D.S, Wagner, G. and Eck, M.J. "Structural basis for negative regulation of hypoxia-inducible factor-1a by CITED2." *Nat. Struct. Mol.* 10 (2003): 504-512.
- Fujikura, J., Yamato, E., Yonemura, S., Hosoda, K., Masui, S., Nakao, K., Miyazaki, J. and Niwa, H. "Differentiation of embryonic stem cells is induced by GATA factors." *Genes Dev.* 16 (2002): 784-789.
- Gassmann, M., Donoho, G., and Berg, P. "Maintenance of an extrachromosomal plasmid vector in mouse embryonic stem cells." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92 (1995): 1292-1296.
- Göke, J., Jung, M., Behrens, S., Chavez, L., O'Keeffe, S., Timmermann, B., Lehrach, H., Adjaye, J. and Vingron, M. "Combinatorial Binding in Human and Mouse Embryonic Stem Cells Identifies Conserved Enhancers Active in Early Embryonic Development." *PLoS Comput. Biol.* 7 (2011): e1002304.
- Groskreutz, D. and Schenborn, E.T. *Reporter Systems*. Editado por R.S. Tuan. Vol. 63. New Jersey: Humana Press, 1997.
- Gu, P., LeMenuet, D., Chung, A. C-K., Mancini, M., Wheeler, D.A. and Cooney, J. "Orphan Nuclear Receptor GCNF Is Required for the Repression of Pluripotency Genes during Retinoic Acid-Induced Embryonic Stem Cell Differentiation." *Mol. and Cell. Biol.* 25 (2005): 8507-8519.
- Hao, J., Li, T.G., Qi, X., Zhao, D.F. and Zhao, G.Q. "WNT/beta-catenin pathway up-regulates Stat3 and converges on LIF to prevent differentiation of mouse embryonic stem cells." *Dev. Biol.* 290 (2006): 81-91.
- Hart, A.H., Hartley, L., Ibrahim, M. and Robb, L. "Identification, Cloning and Expression Analysis of the Pluripotency Promoting Nanog Genes in Mouse and Human." *Developmental Dynamics* 230 (2004): 187-198.
- Heid, C.A., Stevens, J., Livak, K.J., Williams, P.M. "Real time quantitative PCR." *Genomes Res.* 10 (1996): 986-994.
- Hildreth, V., Webb, S., Brandshaw, L., Brown, N.A., Anderson, R.H. and Henderson, D.J. "Cells migrating from the neural crest contribute to the innervation of the venous pole of the heart." *J. Anat.* 212 (2008): 1-11.
- Hooper, M., Hardy, K., Handyside, A., Hunter, S. and Monk, M. "HPRT-deficient (Lesch-Nyhan) mouse embryos derived from germline colonization by cultured cells." *Nature* 326 (1987): 292-295.

- Ilagan, R., Abu-Issa, R., Brown, D., Yang, Y.P., Jiao, K., Schwartz, R.J., Klingensmith, J. and Meyers, E.N. "Fgf8 is required for anterior heart field development." *Develop.* 133 (2006): 2435-2445.
- Ishitobi, H., Wakamatsu, A., Liu, F., Azami, T., Hamada, M., Matsumoto, K., "Molecular basis for Flk1 expression in hemato-cardiovascular progenitors in the mouse." *Develop.* 138 (2011): 5357-5368.
- Itskovitz-Eldor, J., Schuldiner, M., Karsenti, D., Eden, A., Yanuka, O., Amit, M., Soreq, H., Benvenisty, N. "Differentiation of human embryonic stem cells into embryoid bodies comprising the three embryonic germ layers." *Mol. Med.* 6 (2000): 88-95.
- Jiao, K., Kulesa, H., Tompkins, K., Zhou, Y., Batts, L., Baldwin, H.S. and Hogan, B.L. "An essential role of Bmp4 in the atrioventricular septation of the mouse." *Genes Dev.* 17 (2003): 2362-2367.
- Kajstura, J., Leri, A., Finato, N., Di Loreto, C., Beltrami, C.A. and Anversa, P. "Myocyte proliferation in end-stage cardiac failure in human." *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95 (1998): 8801-8805.
- Kajstura, J., Urbanek, K., Perl, S., Hosoda, T., Zheng, H., Ogórek, B. and Anversa, P. "Cardiomyogenesis in the adult human heart." *Circ. Res.* 107 (2010): 305-315.
- Kamachi, Y., Uchikawa, M. and Kondoh, H. "Pairing SOX off: with partners in the regulation of embryonic development." *Trends Genet.* 16 (2000): 182-187.
- Kami, D., Shiojima, I., Makino, H., Matsumoto, K., Takahashi, Y., Ishii, R., Naito, A.T., Toyoda, M., Saito, H., Watanabe, M., Komuro, I. and Umezawa, A. "Gremlin Enhances the Determined Path to Cardiomyogenesis." *PLoS ONE* 3 (2008): e2407.
- Kazanskaya, O., Glinka, A. and Niehrs, C. "The role of *Xenopus dickkopf1* in prechordal plate specification and neural patterning." *Develop.* 127 (2000): 4981-4992.
- Kelly, R.G. "The second heart field." *Curr. Top. Dev. Biol.* 100 (2012): 33-65.
- Kelly, R.G., Brown, N.A. and Buckingham, M.E. "The arterial pole of mouse heart forms from fgf10-expressing cells in pharyngeal mesoderm." *Dev. Cell* 1 (2001): 435-440.
- Kim, H.O. and Choi, S. "Mesenchymal stem cell-derived secretome and microvesicles as a cell-free therapeutics for neurodegenerative disorders." *Tissue Engineering and Regenerative Medicine* 10 (2013): 93-101.
- Klaus, A., Saga, Y., Taketo, M.M., Tzahor, E. and Birchmeier, W. "Distinct roles of Wnt/beta-catenin and Bmp signaling during early cardiogenesis." *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104 (2007): 18531-18536.
- Kranc, K.R., Bamforth, S.D., Bragança, J., Norbury, C., Lohuize, M. van and Bhattacharya, S. "Transcriptional Coactivator Cited2 Induces Bmi1 and Mel18 and Controls Fibroblast Proliferation via Ink4a/ARF." *Mol. Cell. Biol.* 23 (2003): 7658-7666.
- Kranc, K.R., Oliveira, D.V., Armesilla-Diaz, A., Pacheco-Leyva, I., Matias, C.A., Escapa, A.L., Subramani, C., Wheadon, H., Trindade, M., Nichols, J., Kaji, K., Enver, T. and Bragança, J. "Acute loss of Cited2 impairs Nanog expression and decreases self-renewal of mouse embryonic stem cells." *Stem Cells* 33 (2015): 699-712.
- Laugwitz, K-L. "Postnatal isl1+ cardioblasts enter fully differentiated cardiomyocyte lineages." *Nature* 433 (2005): 647-653.

- Lee, M.Y. and Han, J.H. "Cell Culture Dish For The Embryoid Body Formation From Embryonic Stem Cells." *Industry Foundation of Chonnam National University*, 2010.
- Li, Q., Ramirez-Bergeron, D.L., Dunwoodie, S.L. and Yang, Y-C. "Cited2 controls pluripotency and cardiomyocyte differentiation of murine embryonic stem cells through Oct4." *J. Biol. Chem.* 287 (2012): 29088-29100.
- Lian, X., Hsiao, C., Wilson, G., Zhu, K., Hazeltine, L.B., Azarin, S.M., Raval, K.K., Zhang, J., Kamp, T.J. and Palecek, S.P. "Robust cardiomyocyte differentiation from human pluripotent stem cells via temporal modulation of canonical Wnt signaling." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109 (2012): e1848-e1857.
- Liang, X., Wang, G., Lin, L., Lowe, J., Zhang, Q., Bu, L., Chen, Y., Chen, J., Sun, Y. and Evans, S.M. "HCN4 dynamically marks the first heart field and conduction system precursors." *Circ. Res.* 133 (2013): 399-407.
- Lim, J.W. and Bodnar, A. "Proteome analysis of conditioned medium from mouse embryonic fibroblast feeder layers which support the growth of human embryonic stem cells." *Proteomics* 2 (2002): 1187-1203.
- Liu, W., Selever, J., Wang, D., Lu, M-F., Moses, K.A., Schwartz, R.J. and Martin, J.F. "Bmp4 signaling is required for outflow-tract septation and branchial-arch artery remodeling." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101 (2004): 4489-4494.
- Liu, Y., Wang, F., Wu, F., Tan, S., Wen, Q., Wang, J., Zhu, X., Wang, X., Li, C., Ma, X. and Pan H. "Variations of CITED2 Are Associated with Congenital Heart Disease (CHD) in Chinese Population." *PLoS ONE* 9 (2014): e98157.
- Loh, Y-H., Wu, Q., Chew, J-L., Vega, V.B., Zhang, W., Chen, X., Bourque, G., George, J., Leong, B., Liu, J., Wong, K-Y., Sung, K.W., Lee, C.W.H., Zhao, X-D., Chiu, K-P., Lipovich, L., Kuznetsov, V.A., Robson, P., Stanton, L.W., Wei, C-L., Ruan, Y., Lim, B. and Ng, H-H. "The Oct4 and Nanog transcription network regulates pluripotency in mouse embryonic stem cells." *Nat. Genet.* 38 (2006): 431-440.
- Manner, J., Perez-Pomares, J.M., Macias, D. and Munoz-Chapuli, R. "The origin, formation and developmental significance of the epicardium: a review." *Cells Tissues Organs* 169 (2001): 89-103.
- Marguerie, A., Bajolle, F., Zaffran, S., Brown, N.A., Dickson, C., Buckingham, M.E. and Kelly, R.G. "Congenital heart defects in Fgfr2-IIIb and Fgf10 mutant mice." *Cardiovasc. Res.* 71 (2006): 50-60.
- Marvin, M.J., Di Rocco, G., Gardiner, A., Bush, S.M. and Lassar, A.B. "Inhibition of Wnt activity induces heart formation from posterior mesoderm." *Genes & Develop.* 15 (2001): 316-327.
- Mitsui, K., Tokuzawa, Y., Itoh, H., Segawa, K., Murakami, M., Takahashi, K., Maruyama, M., Maeda, M. and Yamanaka, S. "The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells." *Cell* 113 (2003): 631-642.
- Mollova, M., Bersell, K., Walsh, S., Savla, J., Das, L.T., Park, S.-Y. and Kühn, B. "Cardiomyocytes proliferation contributes to heart growth in young humans." *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110 (2013): 1446-1451.
- Moretti, A., Caron, L., Nakano, A., Lam, J.T., Bernshausen, A., Chen, Y., Qyang, Y., Bu, L., Sasaki, M., Martin-Puig, S., Sun, Y., Evans, S.M., Laugwitz, K.L. and Chien, K.R.

- “Multipotent Embryonic Isl1+ Progenitor Cells Lead to Cardiac, Smooth Muscle, and Endothelial Cell Diversification.” *Cell* 127 (2006): 1151.
- Nagy, I.I., Railo, A., Rapila, R., Hast, T., Sormunen, R., Tavi, P., Räsänen, J. and Vainio, S.J. “Wnt-11 signalling controls ventricular myocardium development by patternig N-cadherin and beta-catenin expression.” *Cardiovasc. Res.* 85 (2010): 100-109.
- Nichols, J., Evans, E.P. and Smith, A.G. “Establishment of germ-line competent embryonic stem (ES) cells using differentiation inhibiting activity.” *Develop.* 110 (1990): 1341-1348.
- Nichols, J., Zevnik, B., Anastassiadis, K., Niwa, H., Klewe-Nebenius, D., Chambers, I., Schöler, H. and Smith, A. “Formation of Pluripotent Stem Cells in the Mammalian Embryo Depends on the POU Transcription Factor Oct4.” *Cell* 95 (1998): 379-391.
- Nishiyama N, Miyoshi S, Hida N, Uyama T, Okamoto K, Ikegami Y, Miyado K, Segawa K, Terai M, Sakamoto M, Ogawa S and Umezawa A. “The significant cardiomyogenic potential of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells in vitro.” *Stem Cells* 25 (2007): 2017-2024.
- Niwa, H. “How is pluripotency determined and maintained?” *Develop.* 134 (2007): 635-646.
- Niwa, H. “Molecular mechanism to maintain stem cell renewal of ES cells.” *Cell Struct. Funct.* 26 (2001): 137-148.
- Niwa, H., Miyazaki, J. and Smith, A.G. “Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells.” *Nat. Genet.* 24 (2000): 372-376.
- Niwa, H., Toyooka, Y., Shimosato, D., Strumpf, D., Takahashi, K., Yagi, R. and Rossant, J. “Interaction between Oct3/4 and Cdx2 determines trophectoderm differentiation.” *Cell* 123 (2005): 917-929.
- Norman, A. and MacInnes, M. “Genetic engineering of embryonic stem cells via site-directed DNA recombination.” *Reviews in Undergraduate Research* 1 (2002): 29-37.
- Nosedá, M., Peterkin, T., Simões, F.C., Patient, R. and Schneider, M.D. “Cardiopoietic Factors-Extracellular Signals for Cardiac Lineage Commitment.” *Circ. Res.* 108 (2011): 129-152.
- Palpant, N.J., Yasuda, S., MacDougald, O. and Metzger, J.M. “Non-canonical Wnt signaling enhances differentiation of Sca1⁺/c-kit⁺ adipose-derived murine stromal vascular cells into spontaneously beating cardiac myocytes.” *J. Mol. Cell. Cardiol.* 43 (2007): 362-370.
- Pandur, P., Läsche, M., Eisenberg, L.M. and Kühl, M. “Wnt-11 activation of a non-canonical Wnt signalling pathway is required for cardiogenesis.” *Nature* 418 (2002): 636-641.
- Park, E.J., Ogden, L.A., Talbot, A., Evans, S., Cai, C.L., Black, B.L., Frank, D.U. and Moon, A.M. “Required, tissue-specific roles for Fgf8 in outflow tract formation and remodeling.” *Develop.* 133 (2006): 2419-2433.
- Piedra, M.E. and Ros, M.A. “BMP signaling positively regulates Nodal expression during left right specification in the chick embryo.” *Develop.* 129 (2002): 3431-3440.
- Pritsker, M., Ford, N.R., Jenq, H.T. and Lemischka, I.R. “Genomewide gain-of-function genetic screen identifies functionally active gene in mouse embryonic stem cells.” *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103 (2006): 6946-6951.

- Qu, X., Lam, E., Doughman, Y.Q., Chen, Y., Chou, Y.T., Lam, M., Turakhia, M., Dunwoodie, S.L., Watanabe, M., Xu, B., Duncan, S.A. and Yang, Y.C. "Cited2, a coactivator of HNF4a, is essential for liver development." *EMBO J.* 26 (2007): 4445-4456.
- Rippon, H. J. and Bishop, A. E. "Embryonic stem cells." *Cell proliferation* 37 (2004): 23-34.
- Sachinidis, A., Fleischmann, B.K., Kolossov, E., Wartenberg, M., Sauer, H. and Hescheler, J. "Cardiac specific differentiation of mouse embryonic stem cells." *Cardiovascular Research* 58 (2003): 278-291.
- Saga, Y., Miyagawa-Tomita, S., Takagi, A., Kitajima, S., Miyazaki, J., Inoue, T. "Mesp1 is expressed in the heart precursor cells and required for the formation of a single heart tube." *Develop.* 126 (1999): 3437-3447.
- Sahara, M., Santoro, F. and Chien, K.R. "Programming and reprogramming a human heart cell." *The EMBO Journal* 34 (2015): 710-738.
- Sato, N., Meijer, L., Skaltsounis, L., Greengard, P. and Brivanlou, A.H. "Maintenance of pluripotency in human and mouse embryonic stem cells through activation of Wnt signaling by pharmacological GSK-3-specific inhibitor." *Nat. Med.* 10 (2004): 55-63.
- Saunders, N.A. "Real-time PCR." *Methods Mol. Biol.* 266 (2004): 191-211.
- Schier, A.F. "Nodal signaling in vertebrate development." *Annu Rev. Cell. Dev. Biol.* 19 (2003): 589-621.
- Schlange, T., Andrée, B., Arnold, H. and Brand, T. "BMP2 is required for early heart development during a distinct time period." *Mechanisms of Develop.* 91 (2000): 259-270.
- Schlange, T., Arnold, H.H. and Brand, T. "BMP2 is a positive regulator of Nodal signaling during left-right axis formation in the chicken embryo." *Develop.* 129 (2002): 3421-3429.
- Schlueter, J. and Brand, T. "Epicardial progenitor cells in cardiac development and regeneration." *Cardiovasc. Transl. Res.* 5 (2012): 641-653.
- Schultheiss, T.M., Burch, J.B.E. and Lassar, A.B. "A role for bone morphogenetic proteins in the induction of cardiac myogenesis." *Genes & Develop.* 11 (1997): 451-462.
- Senyo, S.E., Lee, R.T. and Kühn, B. "Cardiac regeneration based on mechanisms of cardiomyocyte proliferation and differentiation." *Stem Cell Research* 13 (2014): 532-541.
- Shioda, T., Fenner, M.H. and Isselbacher, K.J. "MSG1 and its related protein MRG1 share a transcription activating domain." *Gene* 204 (1997): 235-241.
- Shioda, T., Fenner, M.H. and Isselbacher, K.J. "msg1, a novel melanocyte-specific gene, encodes a nuclear protein and is associated with pigmentation." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93 (1996): 12298-12303.
- Shöler, H.R., Dressler, G.R., Balling, R., Rohdewohld, H. and Gruss, P. "Oct4: a germline-specific transcription factor mapping to the mouse t-complex." *The EMBO Journal* 9 (1990): 2185-2195.

- Smith, A.G., Heath, J.K., Donaldson, D.D., Wong, G.G., Moreau, J., Stahl, M. and Rogers, D. "Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides." *Nature* 336 (1988): 688-690.
- Spater, D., Abramczuk, M.K., Buac, K., Zangi, L., Stachel, M.W., Clarke, J., Sahara, M., Ludwig, A. and Chien, K.R. "A HCN4⁺ cardiomyogenic progenitor derived from the first heart field and human pluripotent stem cells." *Nat. Cell Biol.* 15 (2013): 1098-1106.
- Suchorska, W.M., Lach, M.S., Richter, M., Kaczmarczyk, J. and Trazeciak, T. "Bioimaging: An Useful Tool To Monitor Differentiation of Human Embryonic Stem Cells into Chondrocytes." *Annals of Biomedical Engineering*, 2015: 1-15.
- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K. and Yamanaka, S. "Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors." *Cell* 131 (2007): 861-872.
- Temple, I.K., Gardner, R.J., Robinson, D.O., Kibirige, M.S., Ferguson, A.W., Baum, J.D., Barber, J.C., James, R.S. and Shield, J.P. "Further evidence for an imprinted gene for neonatal diabetes localised to chromosome 6q22-q23." *Hum. Mol. Genet.* 5 (1996): 1117-1121.
- Thomas, B.L.S.P., Moretti, A., Chien, K.R. and Lauwitz, K-L. "Embryonic heart progenitors and cardiogenesis." *Cold Spring Harb Prespect Med.* 3 (2013): 1-13.
- Ueno, S., Weidinger, G., Osugi, T., Kohn, A.D., Golob, J.L., Pabon, L., Reinecke, H., Moon, R.T. and Murry, C.E. "Biphasic role for Wnt/beta-catenin signaling in cardiac specification in zebrafish and embryonic stem cells." *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104 (2007): 9685-9690.
- Verfaillie, C.M. "Adult stem cells: assessing the case for pluripotency." *Trends cell Biol.* 12 (2002): 502-508.
- Vincent, S.D. and Buckingham, M.E. *How To Make A Heart: The Origin and Regulation of Cardiac Progenitor Cells*. Vol. 90, cap. 1 em *Organogenesis in Development*, de Peter Koopman, 2-30. USA: Elsevier, 2010.
- Watanabe, Y., Miyagawa-Tomita, S., Vincent, S.D., Kelly, R.G., Moon, A.M. and Buckingham, M.E. "Role of mesodermal FGF8 and FGF10 overlaps in the development of the arterial pole of the heart and pharyngeal arch arteries." *Circ. Res.* 106 (2010): 495-503.
- Weissman, I.L. "Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution." *Cell* 100 (2000): 157-168.
- Williams, R.L., Hilton, D.J., Pease, S., Willson, T.A., Stewart, C.L., Gearing, D.P., Wagner, E.F., Metcalf, D., Nicola, N.A. and Gough, N.M. "Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells." *Nature* 336 (1988): 684-687.
- Xie, L., Hoffmann, A.D., Burnicka-Turek, O., Friedland-Little, J.M., Zhang, K. and Moskowitz, I.P. "Tbx5-hedgehog molecular networks are essential in the second heart field for atrial septation." *Dev. Cell.* 23 (2012): 280-291.
- Xu, M., Wu, X., Li, Y., Yang, X., Hu, J., Zheng, M. and Tian, J. "CITED2 Mutation and methylation in children with congenital heart disease." *J. Biomed. Sci.* 21 (2014): 7.

- Yahata, T., Takedatsu, H., Dunwoodie, S., Bragança, J., Swingler T., Withington S., Hur, J., Coser, K., Bhattacharya S. and Shioda, T. "Cloning of mouse Cited4, a member of the Cited family p300/CBP-binding transcriptional co-activator: induced expression in mammary epithelial cells." *Genomics* 80 (2002): 601-613.
- Yahata, T., de Caestecker M.P., Lechleider, R.J., Andriole, S., Roberts, A.B., Isselbacher, K.J. and Shioda, T. "The MSG1 non-DNA-binding transactivator binds to the p300/CBP coactivators, enhancing their functional link to the Smad transcription factors." *J. Biol. Chem.* 275 (2000): 8825-8834.
- Yan, Y., Martin, L., Bosco, D.B., Bundy, J., Nowakowski, R.S., Sang, Q-X.A. and Li, Y. "Differential Effects of Acellular Embryonic Matrices on Pluripotent Stem Cell Expansion and Neural Differentiation." *Biomaterials*, 2015.
- Yeom, Y.I., Fuhrmann, G., Ovitt, C.E., Brehm, A., Ohbo, K., Gross, M., Hubner, K. and Scholer, H.R. "Germline regulatory element of Oct-4 specific for the totipotent cycle of embryonal cells." *Develop.* 122 (1996): 881-894.
- Yin, Z., Haynie, J., Yang, X., Han, B., Kiatchoosakun, S., Restivo, J., Yuan, S., Prabhakar, N.R., Herrup, K., Conlon, R.A., Hoit, B.D., Watanabe, M. and Yang, Y. "The essential role of Cited2, a negative regulator for HIF-1a, in heart development and neurulation." *PNAS* 99 (2002): 10488-10494.
- Ying, Q.L., Nichols, J., Chambers, I. and Smith, A. "BMP induction of Id proteins suppresses differentiation and sustains embryonic stem cell self-renewal in collaboration with STAT3." *Cell* 115 (2003): 281-292.
- Yu, J. and Thomson, J.A. "Embryonic Stem Cells. In: Regenerative Medicine." *Department of Health and Human Services*, 2006.
- Yuan, L.W. and Giordano, A. "Acetyltransferase machinery conserved in p300/CBP-family proteins." *Oncogene* 21 (2002): 2253-2260.
- Zhang, X., Peterson, K.A., Liu, X.S., McMahon, A.P. and Ohba, S. "Gene regulatory networks mediating canonical Wnt signal directed control of pluripotency and differentiation in embryo stem cells." *Stem Cells* 31 (2013): 2667-2679.
- Zhou, B., Ma, Q., Rajagopal, S., Wu, S.M., Domian, I., Rivera-Faliciano, J., Jiang, D., von Gise, A., Ikeda, S., Chien, K.R. and Pu, W.T. "Epicardial progenitors contribute to the cardiomyocyte lineage in the developing heart." *Nature* 454 (2008): 109-113.