CAMILA MARTINS BORGES

**Efeito da reprogramação por indução à pluripotência (iPS) na manutenção
do imprinting genômico celular**

São Paulo

2016

CAMILA MARTINS BORGES

**Efeito da reprogramação por indução à pluripotência (iPS) na manutenção do
imprinting genômico celular**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:
Cirurgia

Área de Concentração:
Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientador:
Dr^a. Fabiana Fernandes Bressan

São Paulo

2016

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.3416
FMVZ

Borges, Camila Martins
Efeito da reprogramação por indução à pluripotência (iPS) na manutenção do imprinting genômico celular / Camila Martins Borges. -- 2016.
72 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2016.

Programa de Pós-Graduação: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientador: Dr^a. Fabiana Fernandes Bressan.

1. Bovino. 2. Epigenética. 3. Imprinting. 4. iPS. 5. Reprogramação celular. 6. H19/IGF2. 7. OCT4. 8. SOX2. I. Título.

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Comissão de Ética no Uso de Animais

São Paulo, 01 de junho de 2016

CEUAx N 8077020516

Ilmo(a). Sr(a).

Responsável: Fabiana Fernandes Bressan

Área: Anatomia Dos Animais Domésticos E Silvestres

Equipe envolvida: Camila Martins Borges - **executor** (faculdade De Medicina Veterinária E Zootecnia); Fabiana Fernandes Bressan (orientador)

Título do projeto: "Efeito da reprogramação por indução à pluripotência (IPS) na manutenção do imprinting genômico celular".

Parecer Consubstanciado da CEUA FMVZ/USP

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, na reunião de 01/06/2016, **ANALISOU e APROVOU** o protocolo de estudo acima referenciado. A partir desta data, é dever do pesquisador:

1. Comunicar toda e qualquer alteração do protocolo.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do protocolo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.
4. **Relatórios parciais** de andamento deverão ser enviados **anualmente** à CEUA até a conclusão do protocolo.

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni

Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Roseli da Costa Gomes

Secretaria Executiva da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: BORGES, Camila Martins

Título: **Efeito da reprogramação por indução à pluripotência (iPS) na manutenção do imprinting genômico celular**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

AGRADECIMENTOS

À minha família,

Ao Prof. Flávio Vieira Meirelles e à Dra. Fabiana Fernandes Bressan pela orientação, suporte e incentivo,

Aos amigos Lucas Simões Machado e Marina Amaro de Lima pela colaboração e esforços diretos neste estudo,

Aos colegas de laboratório e de Universidade,

Aos professores Drs. Felipe Perecin, Daniele Martins e Natalia Gonçalves pelas valiosas correções na qualificação, à presente banca examinadora pela disponibilidade,

À Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA/USP), à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ/USP), ao programa de Pós-Graduação em Anatomia dos animais domésticos e silvestres, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo suporte financeiro (15/01407-2; 2013/08135-2).

RESUMO

BORGES, C. M. **Efeito da reprogramação por indução à pluripotência (iPS) na manutenção do imprinting genômico celular.** [Effect of induced pluripotency reprogramming on genomic imprinting maintenance]. 2016. 72 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Bioteχνologias reprodutivas como a produção *in vitro* de embriões e a transferência de núcleo apresentam grande potencial de aplicação na medicina veterinária seja para a correção de infertilidades, para o aumento na eficiência da produção animal ou mesmo para um melhor entendimento sobre os mecanismos envolvidos no desenvolvimento embrionário inicial. Porém, manipulações *in vitro* de gametas ou embriões levam a alterações na regulação epigenética, podendo causar altas taxas de anormalidades no desenvolvimento e no nascimento de indivíduos derivados. A geração de um modelo de indução da pluripotência *in vitro*, ou seja, a geração de células iPS (do inglês *induced pluripotent stem cells*) possibilitou estudar o processo de reprogramação *in vitro* de maneira robusta e precisa. Os genes *OCT4* e *SOX2* são fundamentais no processo de aquisição e manutenção da pluripotência celular, e recentemente foi reportado que a ação destes dois fatores exerce grande influência sobre a regulação de alguns genes *imprinted*, em especial, no locus *H19/IGF2*, sabidamente importantes para o desenvolvimento normal do embrião e de sua placenta. Este estudo propõe a geração de um modelo experimental *in vitro* onde os fatores em questão sejam estudados, juntos ou em combinação, quanto à sua influência na regulação do *imprinting* genômico. Para tal, três linhagens de fibroblastos fetais bovinos (bFF1, bFF2 e bFF3) foram transduzidas com vetores lentivirais contendo cDNAs de *OCT4* ou *SOX2* humanos. Os fibroblastos foram analisados através de citometria e as células positivas foram separadas e recuperadas (*sorted*). Os fibroblastos expressando *OCT4*, *SOX2*, ambos (*OCT4* + *SOX2*), nenhum (controle) juntamente com um controle recuperado (não *sorted*) não transgênico (total de cinco tratamentos) foram investigados quanto à expressão de genes relacionados à pluripotência e expressão de genes *imprinted*, bem como a manutenção dos padrões de metilação do DNA no locus *H19/IGF2*. Além disso, estas células foram submetidas à reprogramação *in vitro* e produção de células iPS. A indução à pluripotência foi realizada através da transdução dos fibroblastos com o vetor policistrônico contendo o cDNAs murino ou humano dos fatores de transcrição *OCT4*, *SOX2*, *c-MYC* e *KLF4* (OSMK, vetor STEMCCA). Os resultados da análise de fluorescência por citometria de fluxo foram, em média, de 40,4% para *OCT4*, 6,1%

para SOX2 e 0,63% para OCT4 + SOX2. A bFF1 foi a única linhagem a apresentar uma recuperação pós-sorting, o que possibilitou sua utilização para a indução da pluripotência. De maneira interessante, as células que não passaram pela citometria geraram colónias de células iPS, enquanto que os demais grupos não. A quantificação de transcritos por qRT-PCR mostrou que a expressão de OCT4 e de SOX2 estava aumentada nos respectivos grupos, a expressão do gene H19 mostrou-se aumentada no grupo controle que passou pelo procedimento de *sorting* e a expressão do gene *imprinted* IGF2R não variou entre os grupos. Já a análise preliminar da manutenção do padrão de metilação de DNA na DMR do locus *H19/IGF2* mostrou que o grupo controle *sorted* apresentou uma leve diferença no padrão de metilação quando comparada aos outros grupos. Neste estudo, portanto, o procedimento de separação e recuperação celular por citometria de fluxo celular, aliado ao elevado número de repiques celulares durante o cultivo prolongado pode ter levado a um efeito prejudicial sobre a eficiência de reprogramação *in vitro*.

Palavras-chave: Bovino. Epigenética. Imprinting. iPS. Reprogramação celular. H19/IGF2. OCT4. SOX2.

ABSTRACT

BORGES, C. M. **Effect of induced pluripotency reprogramming on genomic imprinting maintenance.** [Efeito da reprogramação por indução à pluripotência (iPS) na manutenção do imprinting genômico celular]. 2016. 72 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Reproductive biotechniques such as *in vitro* embryo production and somatic cell nuclear transfer may greatly contribute for fertility improvements, to enhance animal production or else to contribute to a better understanding of the underlying mechanism involved during initial embryonic development. However, *in vitro* manipulation of gametes or embryos may lead to possible disruptions on epigenetic regulation, causing high developmental abnormalities and decreased healthy calves born at term. The generation of induced pluripotency models (induced pluripotent stem cells, or iPS) made it possible to study the process of *in vitro* reprogramming in a more solid and precise manner. *OCT4* and *SOX2* are fundamental genes for the acquisition and maintenance process of cellular pluripotency. Recently, it has been reported that both factors may have a huge influence on the regulation of some imprinted genes, specially at locus *H19/IGF2*, known to be important for the normal development of embryo and placenta. Therefore, this study aimed to generate an *in vitro* experimental model where the above transcription factors will be studied together or separately regarding their influence on genomic imprinting regulation. For that, three bovine fetal fibroblasts cell lines (bFF1, bFF2 and bFF3) were transduced with lentiviral vectors containing human *OCT4* or *SOX2* cDNAs. The fibroblasts were analyzed through cell cytometry and positive cells were sorted. Fibroblasts expressing *OCT4*, *SOX2*, both (*OCT4+SOX2*), none (control) together with a non-sorted and non-transgenic control (five treatments) were investigated regarding pluripotency and imprinted gene expression, as well maintenance of DNA methylation patterns at *H19/IGF2* locus. Further, these cells were also submitted to *in vitro* induced reprogramming and production of iPS cell colonies. Induction into pluripotency was realized by transducing fibroblasts with polycistronic excisable vector containing the murine or human cDNA of *OCT4*, *SOX2*, c-MYC and *KLF4* transcription factors (OSMK, STEMCCA vector). The results of fluorescence analysis by flow cytometry were, on average, 40.4% for *OCT4*, 6.1% for *SOX2* and 0,63% for *OCT4+SOX2* groups. bFF1 was the only lineage presenting a post-sorting recovery that enabled its use for pluripotency induction. Interestingly, non-sorted cells generated biPS colonies whereas sorted cells (control non transgenic, *OCT4*, *SOX2* and *OCT4+SOX2* expressing cells) did not

generate biPS cells. The transcript quantification by qRT-PCR showed that OCT4 and SOX2 expression were increased in the respective groups, the expression of H19 gene was increased in the control sorted group and IGF2R expression was not different between groups. Preliminary results of imprinting pattern methylation at *H19/IGF2* locus showed that sorted group was slightly different from others. In this study, therefore, analysis and sorting procedure by flow cytometry, together with an extended period in culture may have lead to a detrimental effect on *in vitro* reprogramming efficiency.

Key words: Cattle. Epigenetics. Imprinting. iPS. Cellular reprogramming. H19/IGF2. OCT4. SOX2.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Controle epigenético do imprinting genômico no locus H19/IGF2	25
Figura 2 - Diagrama mostrando delineamento experimental	31
Figura 3 - Mapa do vetor lentiviral pLM-vexGFP-Oct4	32
Figura 4 - Mapa do vetor lentiviral pLM-mCitrine-Sox2.....	33
Figura 5 - Mapa dos vetores auxiliares para a construção lentiviral	33
Figura 6 - Esquema representando o vetor lentiviral comercial STEMCCA	34
Figura 7 - Mapas dos vetores auxiliares para produção lentiviral do vetor STEMCCA	34
Figura 8 - Análise realizada por citometria de fluxo na linhagem de fibroblasto fetal bovino 1 (bFF1)	37
Figura 9 - Esquema temporal do processo de reprogramação das linhagens bovinas submetidas à pluripotência	39
Figura 10 - Células 293FT após 48h de transfecção sob luz branca e sob microscopia de fluorescência	48
Figura 11 - Células iPS antes do primeiro repique derivadas de fibroblastos bovinos controle não sorted da R1	49
Figura 12 - Gráfico representando a expressão quantitativa do gene OCT4 nas linhagens bovinas estudadas, em unidades arbitrárias	51
Figura 13 - Gráfico representando a expressão quantitativa do gene SOX2 nas linhagens bovinas estudadas, em unidades arbitrárias	52
Figura 14 - Gráfico representando a expressão quantitativa do gene H19 nas linhagens bovinas estudadas, em unidades arbitrárias	53
Figura 15 - Gráfico representando a expressão quantitativa do gene IGF2R nas linhagens bovinas estudadas, em unidades arbitrárias	54
Figura 16 - Gráfico representando a expressão quantitativa dos genes OCT4, SOX2, H19 e IGF2R nas repetições estudadas, em unidades arbitrárias	55
Figura 17 - Análise da metilação nos alelos materno e paterno no locus H19/IGF2 no grupo experimental controle não sorted	57
Figura 18 - Análise da metilação nos alelos materno e paterno no locus H19/IGF2 no grupo experimental controle sorted	57
Figura 19 - Análise da metilação nos alelos materno e paterno no locus H19/IGF2 no grupo experimental OCT4+	58

Figura 20 - Análise da metilação nos alelos materno e paterno no locus H19/IGF2 no grupo experimental SOX2+ 58

Figura 21 - Análise da metilação nos alelos materno e paterno no locus H19/IGF2 no grupo experimental OCT4+SOX2 59

Quadro 1 - Sequencia de oligonucleotídeos iniciadores para a análise quantitativa dos transcritos..... 40

Quadro 2 - Sequencia de oligonucleotídeos iniciadores para a amplificação pré-sequenciamento..... 42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Porcentagens de células fluorescentes analisadas por citometria de fluxo em três linhagens de fibroblasto fetal bovino	48
Tabela 2 - Porcentagem de colônias formadas em cada grupo experimental, em três repetições (porcentagem e número de colônias).....	49
Tabela 3 - Taxa de eficiência da conversão por bissulfito.....	56
Tabela 4 - Análise da porcentagem da metilação na DMR do locus H19/IGF2 nos grupos estudados.....	59

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	HIPÓTESE	18
3	OBJETIVOS.....	19
3.1	Geral.....	19
3.2	Específicos.....	19
4	REVISÃO DE LITERATURA	21
5	MATERIAL E MÉTODOS.....	30
5.1	Delineamento experimental.....	30
5.2	Obtenção dos fibroblastos fetais bovinos	31
5.3	Descrição dos vetores contendo fatores relacionados à pluripotência	32
5.4	Transformação, clonagem bacteriana e purificação plasmidial	35
5.5	Produção de linhagens celulares bovinas com expressão exógena de OCT4 e SOX2.....	35
5.6	Análise de fluorescência e separação celular por citometria de fluxo.....	36
5.7	Indução à pluripotência (produção de células iPS).....	38
5.8	Análise da expressão gênica	39
5.8.1	Extração de RNA e síntese de cDNA	39
5.8.2	Amplificação dos transcritos por RT-qPCR	39
5.9	Análise da metilação alelo específica na DMR do locus H19/IGF2.....	41
5.9.1	Extração de DNA	41
5.9.2	Tratamento com bissulfito de sódio	41
5.9.3	Amplificação da DMR do H19 a partir do DNA tratado com bissulfito de sódio.....	42
5.9.4	Extração do DNA a partir do gel de agarose.....	43
5.9.5	Ligação e transformação	43
5.9.6	Miniprep e sequenciamento	44
5.9.7	Análise do padrão de metilação	44
7	RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
7.1	Produção de linhagens celulares bovinas com expressão exógena de OCT4 e SOX2.....	47
7.2	Indução à pluripotência (produção de células iPS).....	49

7.3	Análise quantitativa da expressão de genes de pluripotência e genes <i>imprinted</i>	50
7.4	Análise da metilação alelo específica na DMR do locus H19/IGF2	56
8	CONCLUSÕES	62
	REFERÊNCIAS	64

1 INTRODUÇÃO

Durante o desenvolvimento de mamíferos o genoma é reprogramado epigeneticamente em dois estágios fundamentais: durante a gametogênese e durante o início da embriogênese. A primeira reprogramação ocorre nas células primordiais germinativas (CPGs), onde marcas epigenéticas são apagadas. Novas marcas são estabelecidas em alguns genes durante momentos específicos do desenvolvimento tanto antes quanto depois da fertilização. Após a fertilização, uma segunda onda de reprogramação ocorre, incluindo a desmetilação global (com exceção dos genes *imprinted*) seguida de uma "de novo" metilação para permitir a totipotência e subsequente diferenciação celular específica e comprometimento de linhagem (RUVINSKY, 1999; REIK; DEAN; WALTER, 2001).

O estabelecimento e manutenção destas marcas determina o imprinting genômico, que é um tipo de marcação epigenética do genoma de um organismo diploide de acordo com sua respectiva origem parental. Nestes, apenas um dos alelos herdados (materno ou paterno) é expresso de forma específica para o tecido e estágio do desenvolvimento (PAULSEN; FERGUSON-SMITH, 2001; ARNEY, 2003; WALTER; PAULSEN, 2003).

Apesar de a utilização de tecnologias de reprodução assistida (TRAs) como por exemplo a fertilização *in vitro* (FIV) e a injeção intracitoplasmática de espermatozoide (ICSI, do inglês *intracytoplasmic sperm injection*) é cada vez mais frequente tanto na medicina humana quanto na veterinária, já é conhecido que manipulações *in vitro* de gametas e embriões no início do desenvolvimento de um organismo acarretam em alterações na regulação epigenética, o que pode levar a ocorrência de anormalidades no desenvolvimento e nascimento dos indivíduos derivados destas técnicas (BIRD, 2002; BORTVIN et al., 2003; SANTOS; DEAN, 2004; EILERTSEN et al., 2007). As alterações epigenéticas podem ser herdadas, mas também são ambientalmente modificáveis, e portanto possivelmente explicam as diferentes alterações fenotípicas vistas com maior frequência em indivíduos gerados por TRAs (URDINGUIO; SANCHEZ-MUT; ESTELLER, 2009).

Em especial, os genes *H19* e *IGF2*, situados no mesmo locus genômico (*H19/IGF2*) sofrem imprinting genômico e estão envolvidos na formação placentária e desenvolvimento fetal, e sua regulação adequada é essencial para o desenvolvimento de indivíduos gerados a partir de biotécnicas como por exemplo a reprogramação celular por transferência de núcleo ou clonagem. Assim como os genes *H19* e *IGF2*, o receptor do fator de crescimento semelhante à insulina – 2 (*IGF2R*, do inglês *Insulin-like growth factor 2 receptor*), e o

transcrito anti-senso não-codificante do *IGF2R* (*AIRN*) já foram relacionados com as anormalidades observadas em embriões ou animais produzidos por biotécnicas reprodutivas. Acredita-se que algumas das anormalidades observadas em animais produzidos por TNCS, incluindo a síndrome da cria gigante, podem estar associadas ao gene *IGF2R* (PERECIN et al., 2009; MEIRELLES et al., 2010).

Recentemente foi reportada a ligação dos fatores de pluripotência OCT e SOX na região de controle de imprinting (*imprinting control region*, ICR) do locus *H19/IGF2*, que contribuiu para a hipometilação em embriões murinos pós-compactação, relacionando portanto o status de metilação destes genes com os principais fatores de regulação de pluripotência (ZIMMERMAN; BODDY; SCHOENHERR, 2013).

Com a geração de um modelo de indução da pluripotência *in vitro*, ou seja, a geração de células iPS (*induced pluripotent stem cells*) que possuem características das células tronco embrionárias, incluindo uma alta taxa de replicação e a habilidade de formar uma grande variedade de tecidos proveniente de três camadas germinativas tanto *in vitro* quanto *in vivo* (TAKAHASHI; YAMANAKA, 2006; TAKAHASHI et al., 2007), é possível estudar o processo de reprogramação e aquisição de pluripotência de forma facilitada (*in vitro*).

Neste contexto, este trabalho propõe a investigação de fatores sabidamente envolvidos na indução e regulação da pluripotência na manutenção de padrões de imprinting e de expressão de genes importantes ao desenvolvimento no modelo bovino. Propomos a criação de um modelo experimental *in vitro* onde os fatores em questão sejam estudados, separados ou em combinação, quanto à sua influência na regulação do imprinting no locus *H19/IGF2*. Espera-se aumentar a eficiência nas técnicas de reprodução assistida obtendo maior sucesso na reprogramação celular, e auxiliando também, portanto, no aprimoramento da medicina regenerativa e translacional.

2 HIPÓTESE

A expressão de OCT4 e SOX2 exógenos em linhagens celulares bovinas é possível e leva à modificação do padrão de expressão gênica e imprinting no locus *H19/IGF2*. Além disso, a formação de colônias iPS bovinas é possível e mais eficiente quando a reprogramação é realizada em fibroblastos expressando fatores de pluripotência (OCT4 e/ou SOX2) exógenos.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Gerar um modelo experimental *in vitro* que possibilite o estudo da influência dos fatores de transcrição OCT4 e SOX2, assim como sua associação, na regulação do imprinting no locus *H19/IGF2* e na reprogramação *in vitro* de células bovinas.

3.2 Específicos

- ✓ Avaliar a integração dos genes repórteres associados a OCT4 e SOX2 e expressão de tais fatores exógenos relacionados à pluripotência no modelo bovino.
- ✓ Avaliar a eficiência de reprogramação *in vitro* à pluripotência em células expressando OCT4 e/ou SOX2 exógenos.
- ✓ Avaliar a expressão de genes relacionados à pluripotência e *imprinted* nas linhagens celulares obtidas.
- ✓ Avaliar a metilação da DMR no locus *H19/IGF2* nas linhagens celulares obtidas

4 REVISÃO DE LITERATURA

Desenvolvimento inicial e epigenética

Um organismo, seja ele humano ou animal, possui mais de 220 tipos celulares com morfologia e função distintas. A sequência do DNA de todas as células é a mesma, salvo exceções bastante específicas como recombinações genéticas em linfócitos ou gametas (TONEGAWA, 1983; GRELLON, 2016). Mecanismos epigenéticos, que são caracterizados por alterações da expressão gênica sem que ocorra modificação na sequência do DNA, vem sendo recentemente estudados e caracterizados. Hoje é conhecido que estes mecanismos facilitam a complexa padronização necessária para assegurar padrões apropriados à expressão gênica de cada linhagem celular e o desenvolvimento inicial normal (MANN; BARTOLOMEI, 2002; NAFEE et al., 2008; OHGANE; YAGI; SHIOTA, 2008).

Alguns dos mecanismos epigenéticos incluem a metilação do DNA, o imprinting, mudanças na conformação da cromatina e o silenciamento mediado por RNA (RODENHISER; MANN, 2006; MOSS; WALLRATH, 2007). Estas alterações epigenéticas correspondem a uma série de modificações moleculares químicas no DNA e na cromatina (RICHARDS, 2006; TALBERT; HENIKOFF, 2006) que são constantemente feitas e desfeitas durante toda a vida do indivíduo, visto que frequentemente os indivíduos entram em contato com agentes promotores desses fenômenos durante a vida, exceto para algumas marcações constitutivas que são herdadas geneticamente (JIRTLE; SKINNER, 2007; HOWELL et al., 2009).

O genoma de mamíferos é reprogramado epigeneticamente em dois estágios fundamentais do desenvolvimento: durante a gametogênese e durante o início da embriogênese. O primeiro evento ocorre nas células primordiais germinativas (CPGs), onde marcas epigenéticas são apagadas. Novas marcas são estabelecidas em alguns genes durante momentos específicos do desenvolvimento tanto antes quanto depois da fertilização. Após a fertilização, uma segunda onda de reprogramação ocorre, incluindo a desmetilação global (com exceção dos genes *imprinted*) seguida de uma "de novo" metilação para permitir a totipotência e subsequente diferenciação celular específica e comprometimento de linhagem (RUVINSKY, 1999; REIK; DEAN; WALTER, 2001).

O estabelecimento e manutenção destas marcas determina o imprinting genômico, que é um tipo de marcação epigenética do genoma de um organismo diploide de acordo com sua

respectiva origem parental, onde apenas um dos alelos herdados (materno ou paterno) é expresso de forma específica para o tecido e estágio do desenvolvimento (PAULSEN; FERGUSON-SMITH, 2001; ARNEY, 2003; WALTER; PAULSEN, 2003).

É conhecido que os mecanismos epigenéticos possuem importante papel em grande número de doenças humanas, incluindo síndromes complexas, doenças multifatoriais e câncer (WALTER; PAULSEN, 2003). O epigenoma, que pode ser definido como o conjunto de elementos funcionais específicos que regulam a expressão gênica em uma célula (ROMANOSKI et al., 2015) está particularmente susceptível à desregulação por fatores ambientais durante a gestação, desenvolvimento neonatal, puberdade e idade adulta (BOYCE; KOBOR, 2015; DESAI; JELLYMAN; ROSS, 2015). Evidências de estudos em animais indicam que a exposição a fatores ambientais como radiação e outros agentes químicos e físicos durante os períodos pré e pós-natal podem resultar numa programação epigenética alterada e, por consequência, em um elevado risco de desenvolvimento de doenças (JIRTLE; SKINNER, 2007). Em especial, os genes *H19* e *IGF2* sofrem imprinting genômico e estão envolvidos na formação placentária e desenvolvimento fetal, e sua regulação adequada é essencial para o desenvolvimento de indivíduos gerados a partir de biotécnicas como por exemplo a reprogramação celular por transferência de núcleo ou clonagem.

Técnicas de reprodução assistida (TRAs) e os genes *H19* e *IGF2*

As TRAs são bastante utilizadas atualmente tanto na medicina humana como na veterinária seja para a correção de infertilidades ou de aumento na eficiência da produção animal. As TRAs, porém, frequentemente demandam manipulações *in vitro* de gametas ou embriões no início do desenvolvimento, levando a uma potencial alteração da regulação epigenética e por vezes acarretando altas taxas de anormalidades no desenvolvimento e nascimento dos indivíduos derivados.

Apesar de comprovadamente ser capaz de reprogramar um núcleo diferenciado, a técnica de TNCS é pouco eficiente. Não raramente, o núcleo a ser reprogramado falha na expressão de genes relacionados ao desenvolvimento inicial, assim como falha no estabelecimento de um padrão típico das modificações de cromatina (BIRD, 2002; BORTVIN et al., 2003; SANTOS; DEAN, 2004; EILERTSEN et al., 2007).

Normalmente menos de 5% dos embriões desenvolvem em animais adultos, sendo a reprogramação epigenética incompleta do núcleo a causa mais provável do baixo sucesso da técnica (BOURC'HIS et al., 2001; DEAN et al., 2001; RIDEOUT; EGGAN; JAENISCH,

2001; SANTOS et al., 2003). Fenótipos indesejáveis decorrentes da reprogramação imprópria são, dentre outros, a alta taxa de perdas gestacionais, a ocorrência da síndrome da cria gigante, alterações hepáticas e alterações respiratórias entre outras (HILL et al., 1999; HEYMAN et al., 2002).

Dois exemplos importantes de genes *imprinted* relacionados ao desenvolvimento inicial são o *H19* (*non-protein coding gene*) e o *IGF2* (*Insulin-like growth factor 2*). O *H19* é silenciado no alelo paternal, permitindo assim a expressão paterna do gene *IGF2*. Por outro lado, é expresso a partir do alelo materno onde a expressão materna do *IGF2* é bloqueada. Como descrito anteriormente a metilação diferencial entre alelos paternos e maternos é estabelecida nos gametas, sendo que as ilhas de metilação no locus *H19/IGF2* são hipometiladas nos oócitos e hipermetiladas nos espermatozoides (ZIMMERMAN; BODDY; SCHOENHERR, 2013).

A regulação do gene *IGF2* também é feita pela expressão do gene também *imprinted* *IGF2R*, que foi o primeiro gene *imprinted* descoberto em camundongos (BARLOW et al., 1991) e é *imprinted* em bovinos. Este gene é *imprinted* paterno (expresso pelo alelo materno), e atua diminuindo a ação do gene *IGF2* através da degradação deste por lisossomos (LAU et al., 1994; LUDWIG et al., 1996; MURPHY; JIRTLE, 2003).

É reportado que a regulação desta expressão monoalélica no locus *imprinted H19/IGF2* é devida ao menos a dois mecanismos distintos que atuam na região de controle do imprinting (*imprinting control region* ou ICR): o silenciamento do promotor do *H19*, regulado pelo desenvolvimento, e o isolamento transcricional (bloqueio da atividade entre *enhancers* e promotores) dos promotores maternos do *IGF2*. Ambos os mecanismos são devidos a um elemento comum locado transcricionalmente antes (*upstream*) do promotor do *H19*, o CTCF (também conhecido como *11-zinc finger protein* ou *CCCTC-binding factor*). Em células somáticas a ICR materna tem a ligação do CTCF (*insulator*) em quatro locais ou sítios bloqueando a atividade do promotor proximal do *IGF2* (KAFFER; GRINBERG; PFEIFER, 2001; SZABÓ et al., 2004). Uma figura esquemática demonstrativa da regulação do imprinting do locus *H19/IGF2* foi delineada anteriormente pelo nosso grupo de pesquisa e é apresentada na figura 1.

Figura 1 - Controle epigenético do imprinting genômico no locus H19/IGF2

Fonte: (MARTUCCI et al., 2015).

Legenda: Mecanismos de ativação e inibição da transcrição dos genes imprinted *H19* e *IGF2*. Adaptada (reduzida) de MARTUCCI et al., 2015).

Diversas síndromes epigenéticas humanas podem ser associadas com os genes imprinted, incluindo as síndromes Beckwith-Wiedemann ou BWS (BROWN et al., 1996), Silver-Russel ou SRS (BARTHOLDI et al., 2009), Angelman (RUNTE et al., 2004) e a Prader-Willi (REED; LEFF, 1994). Em especial, a BWS e a SRS parecem ser bem relacionadas aos genes *H19* e *IGF2*.

Usualmente os pacientes acometidos com as síndromes decorrentes de distúrbios no locus *H19/IGF2* apresentam distúrbios de crescimento, assimetria corporal, retardo mental e aparecimento de tumores (AMOR; HALLIDAY, 2008). Uma condição comum em ruminantes derivados de TRAs é a síndrome da cria gigante, ou LOS (do inglês *large offspring Syndrome*) (YOUNG; SINCLAIR; WILMUT, 1998; CELEN; VERMEIDEN, 2001), com causas e fenótipos bastantes similares à síndrome BWS em humanos (CHEN et al., 2013).

De maneira interessante, os riscos para algumas das síndromes acima são elevados em indivíduos concebidas por TRA (MAHER; AFNAN; BARRATT, 2003), sugerindo que a exposição de gametas e/ou embriões ao ambiente *in vitro* pode causar alterações epigenéticas aos genes imprinted.

Reprogramação celular induzida (geração de células iPS) e os genes relacionados à pluripotência *OCT4* e *SOX2*

Com a geração de um modelo de indução da pluripotência *in vitro*, ou seja, a geração de células iPS (do inglês *induced pluripotent stem cells*) que possuem características das células tronco embrionárias, incluindo uma alta taxa de replicação e a habilidade de formar uma grande variedade de tecidos proveniente de três camadas germinativas tanto *in vitro* quanto *in vivo* (TAKAHASHI; YAMANAKA, 2006; TAKAHASHI et al., 2007), é possível estudar o processo de reprogramação *in vitro* e consequentemente a futura aplicação dos conhecimentos adquiridos na medicina regenerativa e translacional.

Uma rede interligada de genes regulatórios é responsável pelo desenvolvimento ou manutenção da pluripotência em células embrionárias, porém, os exatos componentes e suas funções ainda não são totalmente conhecidos. Três fatores de transcrição são conhecidos por serem críticos na manutenção da pluripotência de células-tronco embrionárias: OCT4, NANOG e SOX2. O OCT4 (Pou5f1) possui um papel altamente conservado na manutenção da pluripotência de populações celulares (NICHOLS et al., 1998; MORRISON; BRICKMAN, 2006), e seu nível de expressão pode determinar o destino das ESC quanto à diferenciação ou manutenção da pluripotência (NIWA; MIYAZAKI; SMITH, 2000).

Especificamente, o gene *OCT-4* codifica um fator de transcrição específico que se liga ao octâmero ATTTGCAT no DNA. É relatado em camundongos que a proteína OCT4 derivada da mãe é encontrada em oócitos em desenvolvimento e está ativa no zigoto. Zigotos que experimentalmente não apresentam a proteína não se desenvolvem para o estágio de duas células, período de ativação do genoma embrionário nesta espécie (PESCE; SCHÖLER, 2000, 2001).

O SOX2 forma um complexo com OCT4 e é necessário para cooperar com a ativação de genes alvos em células-tronco embrionárias (ESCs). Esses fatores compõem um circuito essencial para regulação da pluripotência de ESCs, no qual o OCT4 regula o SOX2, e o complexo OCT4-SOX2 ativa a expressão de OCT4 (AMBROSETTI; BASILICO; DAILEY, 1997; OKUMURA-NAKANISHI et al., 2005).

Os níveis de expressão, ou mais especificamente a estequiometria dos fatores SOX2 e OCT4 presente durante o processo de reprogramação também influenciam na eficiência e na qualidade das células pluripotentes produzidas (RIZZINO, 2013). Papapetrou e colaboradores, por exemplo, reportaram que um aumento de 3 vezes em relação aos níveis de SOX2, KLF4 e c-MYC aumentou de forma discreta a frequência de reprogramação, e o

contrário resultou em uma redução drástica na eficiência de reprogramação (PAPAPETROU et al., 2009).

Mais recentemente, Rizzino e Wuebben, em 2016, discutem de maneira mais objetiva qual seria a função e como é a relação de expressão dos genes *OCT4* e do *SOX2* durante a embriogênese e em células tronco pluripotentes. O início da expressão destes genes não depende um do outro, porém, ainda não se sabe o mecanismo iniciador da expressão dos genes *OCT4* e *SOX2* na embriogênese. Os autores postulam que, em células pluripotentes, ambos os fatores atuam de maneira conjunta a ativar sua expressão e a de outros genes, como por exemplo, *NANOG* e *FGF4*. Já a expressão elevada do *OCT4* leva à repressão dos promotores do mesmo e do *NANOG*, e quando há a expressão elevada do *SOX2*, esta leva à repressão do seu próprio promotor e também do *OCT4* e do *NANOG* (RIZZINO; WUEBBEN, 2016).

A atuação dos genes de pluripotência *OCT4* e *SOX2* sobre o imprinting dos genes *H19* e *IGF2*

É conhecido, portanto, que os genes *OCT4* e *SOX2* são fundamentais no processo de aquisição e manutenção da pluripotência celular (SUWINSKA; CIEMERYCH, 2011), porém, somente recentemente foi reportado que a ação destes dois fatores exerce grande influência sobre a regulação de alguns genes imprinted.

De maneira interessante, recentemente foi demonstrado que a ICR do locus *H19/IGF2* apresenta, além da região de ligação e regulação do CTCF, um par de sequências *motifs* para a ligação de SOX-OCT (ou OCT-SOX) localizados entre os sítios de ligação 2 e 3 do CTCF em humanos. Sequências *motifs* são sequências curtas e com padrões recorrentes de DNA que geralmente indicam locais de ligação de proteínas como nucleases ou fatores de transcrição (D'HAESELEER, 2006). Tais domínios funcionaram experimentalmente induzindo a desmetilação em células de carcinoma (células P19), revelando a possibilidade de serem elementos importantes na indução de desmetilação sítio-específica ou mesmo na ativação da transcrição gênica em células indiferenciadas (HORI et al., 2012).

Zimmerman e colaboradores, em 2013, reportaram que a ligação dos fatores de pluripotência OCT-SOX na ICR do locus *H19/IGF2* contribuiu para a hipometilação em embriões pós-compactação, relacionando portanto o status de metilação destes genes com os principais fatores de regulação de pluripotência (ZIMMERMAN; BODDY; SCHOENHERR, 2013). Utilizando um modelo murino com mutações nos *motifs* SOX-OCT, eles observaram que ICRs maternas mutantes adquiriram metilação parcial em tecidos somáticos, porém, com

pouco efeito na expressão dos genes imprinted *H19* e *Igf2*; e uma parte de oócitos maduros também apresentaram metilação parcial na ICR mutante, sugerindo que as *motifs* SOX-OCT provem de certa forma uma proteção contra a metilação durante a oogênese (ZIMMERMAN; BODDY; SCHOENHERR, 2013).

Habib et al., em 2014, através de um estudo com 57 pacientes portadores da Síndrome BWS demonstraram que alguns pacientes que apresentam ganho de metilação no locus *H19/IGF2* também apresentam mutações no sítio de ligação dos fatores OCT4/SOX2, evidenciando que as *motifs* SOX-OCT dentro da ICR *H19/IGF2* também participam da manutenção da hipometilação do alelo materno (ABI HABIB et al., 2014).

Desta maneira, neste projeto propomos a criação de um modelo experimental *in vitro* onde os fatores em questão sejam estudados, separados ou em combinação, quanto à sua influência na regulação do imprinting no locus *H19/IGF2*. Espera-se aumentar a eficiência nas técnicas de reprodução assistida obtendo maior sucesso na reprogramação celular, e auxiliando também, portanto, no aprimoramento da medicina regenerativa e translacional.

5 MATERIAL E MÉTODOS

A metodologia apresentada neste relatório foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (certificado nº 8077020516).

5.1 Delineamento experimental

O processo de transfecção lentiviral, já estabelecido previamente pelo grupo de pesquisa, foi usado para a geração de fibroblastos fetais bovinos expressando OCT4, SOX2 ou ambos. Para a análise da eficiência de geração destas linhagens, três linhagens já existentes no laboratório foram utilizadas (fibroblasto fetal bovino 1 ou bFF1, bFF2 e bFF3). Após a análise, separação celular por citometria de fluxo (processo denominado *sorting*), a linhagem bFF1 (5 grupos experimentais: controle não *sorted*, controle *sorted*, OCT4+ *sorted* ou OCT4+, SOX2+ *sorted* ou SOX2+ e OCT4+SOX2 *sorted* ou OCT4+SOX2, sendo *sorted* a denominação dada à linhagens submetidas à análise e separação celular por citometria de fluxo) foi submetida em triplicata à reprogramação induzida através da transdução lentiviral com fatores de pluripotência (OCT4, SOX2, KLF4 e C-Myc), esperando observar se e qual fator exógeno exerceria maior influência no processo de reprogramação e manutenção do padrão epigenético do locus imprinted *H19/IGF2*, conforme delineamento experimental abaixo (Figura 2).

Figura 2 - Diagrama mostrando delineamento experimental

Fonte: (BORGES C.M., 2016)

Legenda: Diagrama mostrando delineamento experimental com a produção das células expressando fatores exógenos e depois submetidas à pluripotência *in vitro*.

5.2 Obtenção dos fibroblastos fetais bovinos

Foram utilizadas linhagens de fibroblasto fetais *Bos indicus* x *Bos taurus* já estabelecidas no Laboratório de Morfofisiologia Molecular e Desenvolvimento (LMMD) da FZEA/USP. Resumidamente, as linhagens foram derivadas de três fetos (dois machos e uma fêmea) com aproximadamente 50 dias de idade gestacional. Após a remoção dos órgãos e da cabeça, o tecido foi lavado com tampão fosfato salino (*phosphate buffer saline*,

PBS), dividido em pedaços menores e incubado por 3h a 38,5°C em solução de collagenase IV (0,040g/mL, Sigma-Aldrich). Após incubação, o tecido digerido foi lavado e plaqueado em meio de cultivo completo IMDM como descrito anteriormente.

As linhagens foram descongeladas e cultivadas em meio de cultivo IMDM (Thermo Fisher Scientific) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Thermo Fisher Scientific) e 1% da combinação de antibióticos penicilina e estreptomicina (Thermo Fisher Scientific).

5.3 Descrição dos vetores contendo fatores relacionados à pluripotência

Para a produção das células com expressão exógena de OCT4, SOX2 e OCT4 e SOX2 em combinação foram utilizados os vetores pLM-vexGFP-Oct4 (Figura 3) e pLM-mCitrine-Sox2 (Figura 4) descritos por Papapetrou em 2009 (PAPAPETROU et al., 2009). O primeiro contém a sequência codificante da proteína fluorescente repórter vexGFP (excitação em 407nm e emissão em 535nm) e o segundo a sequência codificante da proteína fluorescente repórter mCitrine (excitação em 516nm e emissão em 529nm). Foram utilizados três plasmídeos auxiliares (pLP1, pLP2 e pLP/VSVG, Figura 5), que codificam as proteínas de replicação e estruturais para o empacotamento viral (ViraPower lentiviral expression system, Thermo Fisher Scientific).

Figura 3 - Mapa do vetor lentiviral pLM-vexGFP-Oct4

Fonte: Website Addgene (<https://www.addgene.org/22240/>)

Legenda: Mapa do vetor lentiviral pLM-vexGFP.

Figura 4 - Mapa do vetor lentiviral pLM-mCitrine-Sox2

Fonte: Website Addgene (<https://www.addgene.org/23242/>).

Legenda: Mapa do vetor lentiviral pLM-mCitrine-Sox2.

Figura 5 - Mapa dos vetores auxiliares para a construção lentiviral

Fonte: Disponível em:

https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/virapower_lentiviral_system_man.pdf.

Legenda: Esquemas representativos dos mapas dos vetores auxiliares pLP1, pLP2 e pLP3.

Para a indução à pluripotência, foi utilizado o vetor lentiviral policistrônico excisável STEMCCA (*Stem cell cassette*; Figura 6) contendo o cDNA de OCT4, SOX2, c-MYC e KLF4 murinos ou humanos – mSTEMCCA ou hSTEMCCA (SOMMER et al., 2009), segundo protocolo já validado no nosso laboratório (BRESSAN, 2013). Foram utilizados quatro plasmídeos auxiliares contendo as sequências TAT, REV, GAG/POL e VSVG (Figura 7).

Figura 6 - Esquema representando o vetor lentiviral comercial STEMCCA

Fonte: (MilliporeTM catálogo SCR518)

Legenda: Esquema representando construção do vetor policistrônico STEMCCA. Imagem obtida do catálogo Millipore referenciando a construção STEMCCA humana, sendo que a construção para o vetor com as sequencias murinos segue a mesma representação.

Figura 7 - Mapas dos vetores auxiliares para produção lentiviral do vetor STEMCCA

Fonte: (BORGES C.M., 2016)

Legenda: Esquemas dos vetores auxiliares para produção lentiviral do STEMCCA. A: VSVG. B: REV. C: TAT. D: GAG/POL (Hgpm2).

5.4 Transformação, clonagem bacteriana e purificação plasmidial

Para cada plasmídeo utilizado foram realizadas as etapas de transformação e clonagem bacteriana e purificação plasmidial por maxi-prep, como descrito a seguir.

Para a transformação bacteriana foram utilizados aproximadamente 1µg de DNA plasmidial em 100µL de bactérias quimicamente competentes DH5α. Foi realizado o protocolo de choque térmico que consistiu na incubação da bactéria com o DNA plasmidial em gelo por 15 min, incubação a 42°C por 45s, nova incubação em gelo por 5 min e cultivo a 37°C com agitação (225rpm) por 50 min. Em seguida foi realizada o cultivo e seleção clonal em placas de meio LB ágar com 100µg/ml do antibiótico de seleção ampicilina por aproximadamente 16h (*overnight*) em incubadora a 37°C.

Três colônias de bactérias foram selecionadas e cultivadas em um pré-inóculo de 2ml de meio LB com ampicilina por 8h e congeladas em -80°C com uma solução de glicerol a 35% para a obtenção de estoques plasmidiais em bactérias ou novamente cultivadas para a extração e purificação plasmidial. Para tal, um dos cultivos foi novamente incubado por aproximadamente 16h em 100ml de meio LB com ampicilina a 37°C em agitação de 225rpm, peletizadas e submetidas à extração do DNA plasmidial pelo kit MaxiPrep EndoFree (Qiagen) segundo recomendações do fabricante.

Os estoques plasmidiais purificados foram quantificados por Nanodrop e são mantidos a -20°C até o momento da utilização.

5.5 Produção de linhagens celulares bovinas com expressão exógena de OCT4 e SOX2

As partículas lentivirais de OCT4-vexGFP ou SOX2-mCitrine foram produzidas através da lipofecção de células 293FT (Thermo Fisher Scientific) com o reagente Lipofectamina 2000 (Thermo Fisher Scientific). Para tal, 5×10^6 células 293FT foram plaqueadas no dia anterior em placas de cultivo de 75cm², de modo que apresentasse 90% de confluência no momento de transfecção. Foram utilizados 5µg dos vetores pLM-vexGFP-Oct4 e pLM-mCitrine-Sox2, 1,2µg dos vetores PLP1 e PLP2 e 2,4µg do vetor PLP/VSVG.

O sobrenadante (meio de cultivo) foi recolhido e repostado após 48h e 72h após transdução, filtrado e utilizado para a transdução.

A transdução foi realizada nas três linhagens celulares bovinas. Três poços de uma placa de seis poços de cada linhagem receberam os seguintes tratamentos: 1mL de meio de cultivo (controle)/poço, 1 mL do sobrenadante da lipofecção do vetor pLM-vexGFP/poço, 1 mL do sobrenadante da lipofecção do vetor pLM-mCitrine-Sox2/poço ou 1 mL do sobrenadante da lipofecção do vetor pLM-vexGFP/poço + 1 mL do sobrenadante da lipofecção do vetor pLM-mCitrine-Sox2/poço, sendo estes sobrenadantes acrescidos de 8 ng/mL de polibreno (brometo de hexadimetrina, Sigma-Aldrich). No momento da transdução os cultivos apresentavam aproximadamente 50% de confluência celular em consequência do plaqueamento prévio no dia anterior de 10^5 células por poço em placa de 6 poços. O meio de cultivo foi renovado após a incubação de 12-16 horas.

5.6 Análise de fluorescência e separação celular por citometria de fluxo

Após 72h da transdução a expressão dos genes exógenos foi verificada através de citometria de fluxo e as células submetidas à separação celular (*sorting*) das células positivas (Figura 8, software BDFACSDiva e equipamento BD FACSAria II – laser de excitação 405nm e detecção de filtro 510/30 para a proteína vexGFP e laser de excitação 488nm e detecção de filtro 530/30 para a proteína mCitrine). As células recuperadas foram re-cultivadas, submetidas à indução à pluripotência e coletadas (grupo experimental pré indução à pluripotência) para criopreservação e análises subsequentes.

Figura 8 - Análise realizada por citometria de fluxo na linhagem de fibroblasto fetal bovino 1 (bFF1)

Fonte: (BORGES C.M., 2016).

Legenda: Exemplo da análise realizada por citometria de fluxo na linhagem de fibroblasto fetal bovino 1. A: gráfico (*dotplot*) do tamanho (FSC, eixo x) *versus* complexidade (SSC, eixo Y) da população celular; B: gráfico (*dotplot*) de um cultivo de fibroblastos fetais bovinos não transduzidos mostrando a análise da fluorescência vexGFP (eixo x) *versus* fluorescência mCitrine (eixo y); C: gráfico (*dotplot*) de um cultivo de fibroblastos fetais bovinos transduzidos com OCT4-vexGFP mostrando a análise da fluorescência vexGFP (eixo x) *versus* fluorescência mCitrine (eixo y); D: gráfico (*dotplot*) de um cultivo de fibroblastos fetais bovinos transduzidos com SOX2-mCitrine mostrando a análise da fluorescência vexGFP (eixo x) *versus* fluorescência mCitrine (eixo y); E: gráfico (*dotplot*) de um cultivo de fibroblastos fetais bovinos transduzidos com OCT4-vexGFP e SOX2-mCitrine mostrando a análise da fluorescência vexGFP (eixo x) *versus* fluorescência mCitrine (eixo y).

Em decorrência dos melhores resultados de fluorescência obtidos com a linhagem 1, a recuperação pós-sorting desta (em especial das células positivas para OCT4 e SOX2) foi eficaz, possibilitando sua utilização nos experimentos de indução à pluripotência subsequentes.

Células não transduzidas, expressando OCT4, SOX2 e a combinação após a purificação celular por citometria foram recultivadas para a indução à pluripotência, criopreservadas para estudos posteriores e congeladas após lavagem com PBS em freezer -80 para a extração de DNA e RNA.

5.7 Indução à pluripotência (produção de células iPS)

Linhagens celulares bovinas (bFF1) expressando OCT4 e/ou SOX2 exógenos foram submetidas à indução gênica da pluripotência em triplicata (R1 na passagem 6, R2 na passagem 10 e R3 na passagem 14). Partículas lentivirais contendo os fatores relacionados à pluripotência humanas ou murinas presentes no vetor policistrônico (hSMTEMCCA ou mSTEMCCA) foram produzidas através da lipofecção das células 293FT. Foram utilizados 12µg do vetor STEMCCA, 1,2µg dos vetores TAT, GAG/POL (ngpm2) e REV e 2,4µg do vetor VSVG (protocolo adaptado de Darrell N, Kotton e Gustavo Mostoslavsky, <http://www.bu.edu/dbin/stemcells/protocols.php>).

O sobrenadante (meio de cultivo) foi recuperado após 48h e 72h da transfecção, filtrado em filtros de seringa de 0,45µm e imediatamente utilizado. O cultivo celular foi previamente plaqueado na concentração de 2×10^4 por poço em placas de 6 poços e as células transduzidas com os lentivírus na presença de 8µg/ml de polibreno (Sigma) utilizando 1ml de sobrenadante viral por 12-16 horas (*overnight*). O procedimento foi repetido totalizando duas transduções, sendo considerado D0 o primeiro dia da infecção (Figura 9).

Após 5 ou 6 dias pós-transdução, as células foram transferidas para placas de cultivo contendo monocamadas de fibroblastos fetais de camundongo mitoticamente inativadas (MEFs). A inativação da mitose das MEFs foi realizada pela incubação com Mitomicina C (1µg/mL, Sigma-Aldrich) por três horas.

As células no período de reprogramação foram cultivadas em meio iPS composto por DMEM/F12 Knockout (Thermo Fisher Scientific), suplementado com 20% de substituto de soro knockout (*Knockout serum replacement*, KSR, Thermo Fisher Scientific), 1% glutamina (Thermo Fisher Scientific), 1:1000 B-mercaptoetanol (Thermo Fisher Scientific), 1% aminoácidos não essenciais (Thermo Fisher Scientific), 10mg/mL bFGF (Peprotech) e antibióticos (penicilina/estreptomicina, Thermo Fisher Scientific).

Figura 9 - Esquema temporal do processo de reprogramação das linhagens bovinas submetidas à pluripotência

Fonte: (BREISSAN, F.F., 2013).

Legenda: Esquema temporal do processo de reprogramação mostrando as etapas necessárias para o estabelecimento e manutenção de células iPS.

5.8 Análise da expressão gênica

Foram analisados em triplicata biológica os grupos fibroblasto controle não *sorted*, fibroblasto controle *sorted*, fibroblasto OCT4+, fibroblasto SOX2+ e fibroblasto OCT4+SOX2, além de quatro (n=4) linhagens de células iPS bovinas derivadas do grupo controle não *sorted*.

5.8.1 Extração de RNA e síntese de cDNA

O RNA foi extraído com o kit RNeasy mini kit (Qiagen) segundo recomendações do fabricante. A qualidade e quantidade do RNA foi analisada em espectrofotômetro Nanodrop 2000. O cDNA foi sintetizado com o kit comercial *High Capacity cDNA reverse transcription kit* (Thermo Fisher) segundo recomendações do fabricante.

5.8.2 Amplificação dos transcritos por RT-qPCR

Os grupos experimentais foram quantificados quanto aos transcritos dos genes *imprinted H19* e *IGF2R* e dos genes relacionados à pluripotência *OCT4* e *SOX2*, sendo todos

normalizados com dois genes endógenos constitutivos Beta actina e CCR4-NOT Transcription Complex Subunit 11 (ACTB e C2ORF29 ou CNOT11).

A quantificação do cDNA foi realizada utilizando a metodologia de PCR quantitativo (7500 Fast Real-Time PCR System, Life Technologies) usando um ensaio comercial (Power SYBR®Green PCR Master Mix, Life Technologies) em duplicata, onde foram adicionados 5 µL do cDNA das amostras em uma reação de volume final de 20µl. Os oligonucleotídeos iniciadores (oligos ou *primers*, Quadro 1) foram usados na concentração final de 200 nM e foram realizadas curvas-padrão para avaliar a eficiência de cada gene. A reação de qPCR constituiu por uma etapa de desnaturação de 95°C por 5 segundos, temperatura de anelamento de 60°C, por 40 ciclos.

A análise de expressão gênica foi analisada segundo Livak e Schmittgen, 2001 e comparada por ANOVA seguido do teste de Bonferroni, sendo que os grupos foram comparados ao controles não *sorted*. (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). Resultados significantes foram considerados a $P < 0,05$.

Quadro 1 - Sequencia de oligonucleotídeos iniciadores para a análise quantitativa dos transcritos

Nome	Sequência 5' -3'
ACTB_FWD	GCGGACAGGATGCAGAAA
ACTB_REV	ACGGAGTACTTGCGCTCAG
C2ORF29_FWD	ACTGAGCCTGACCATGCGATC
C2ORF29_REV	GGCTGGAGTGAGGCCAATATG
H19_FWD	AGTGGGAGGGGCATTGGACT
H19_REV	GACCATATCATATCCCTCTGTGC-
SOX2_FWD	ATGGGCTCGGTGGTGAAGT
SOX2_REV	TGGTAGTGCTGGGACATGTGA
OCT4_FWD	GCAAACGATCAAGCAGTGACTAC
OCT4_REV	GGCGCCAGAGGAGAGGATACG

Fonte: (BORGES C.M., 2016).

5.9 Análise da metilação alelo específica na DMR do locus H19/IGF2

5.9.1 Extração de DNA

O DNA de todas as amostras foi extraído com o kit comercial *DNeasy Blood & Tissue Kit* (Qiagen) segundo recomendações do fabricante. A qualidade e quantidade do DNA foi analisada em espectrofotômetro Nanodrop 2000.

5.9.2 Tratamento com bissulfito de sódio

O kit utilizado foi o EpiTect Bisulfite Kit (QIAGEN, #59104) de acordo com as recomendações do fabricante. Foram adicionados até 20 µL de amostra contendo de 1 ng a 2 µg de DNA genômico em 35 µL de *DNA Protect Buffer* e 85 µL de bissulfito, sendo adicionado o necessário de *RNase-free water* para completar 140 µL. Essa solução foi homogeneizada e submetida a uma conversão no termociclador (Eppendorf Cyclor) ao passar 5 minutos a 99° C, 25 minutos a 60° C, mais 5 minutos a 99° C, 85 minutos a 60° C retornando então a 99° C por 5 minutos, 175 minutos a 60° C e então resfriado a 20° C, temperatura na qual as soluções foram incubadas *overnight* (como detalha o fabricante em seu manual). Estas foram então transferidas para tubos de centrifugação de 1,5 mL, juntamente com 560 µL de Buffer BL, contendo 10µg/mL de *carrier* RNA. As amostras foram então transferidas para os *EpiTect spin columns* onde foram centrifugados a máxima velocidade permitida pela centrífuga (como descrito no protocolo), no caso 15.000g, por 1 minuto. Descartado o escoado, mais 500 µL de Buffer BD foram inseridos e incubados em temperatura ambiente por 15 minutos. Mais uma vez foi realizada centrifugação, como mencionado, desfazendo-se do escoado. 500 µL de Buffer BW foram usados para a lavagem das membranas, seguidos de mais uma centrifugação. Após o descarte do escoado, a lavagem anterior foi repetida mais uma vez. As colunas foram então postas em novos tubos de centrifugação para a secagem das membranas via a repetição da centrifugação descrita. Assim, as amostras foram incubadas em banho-seco a 56°C por 5 minutos com suas tampas abertas, seguidas pelo último passo, a eluição. Depois de inseridos 20 µL de Buffer EB nas

colunas e centrifugados como descrito anteriormente por 1 minuto, os mesmos 20 µL foram recuperados e centrifugados nas mesmas membranas mais uma vez para obter a extração ótima. Amostras foram guardadas a -20°C.

5.9.3 Amplificação da DMR do H19 a partir do DNA tratado com bissulfito de sódio

Foi realizada a amplificação dos fragmentos contendo a ICR ou *differentially methylated domain ou region* (DMD ou DMR), que é predominantemente metilada no alelo paterno de -3327 a -2675 pares de base de distância do exon 1. A amplificação de ambos os genes ocorreu conforme descrito a seguir com os primers descritos na quadro 2.

Quadro 2 - Sequencia de oligonucleotídeos iniciadores para a amplificação pré-sequenciamento

Oligo	Sequência 5' -3'
U-H19 F1	TATTTTAGATAGGGTTGAGAGGTTG
U-H19 R4	CCTTTAACATTTCAAACAACAAACT

Fonte: (BORGES C.M., 2016).

A reação de PCR continha 38,5 µL de H₂O ultrapura (Invitrogen, #10977), 5 µL de Buffer TPN 10x (Invitrogen), 1,5 µL de dNTPS (Invitrogen), 1,5 µL de MgCl₂, 1 µL de primer (um de cada, *forward* e *reverse*) e 0,5 µL de Platinum Taq (Invitrogen, #10966) para cada amostra, e então 1 µL de DNA era adicionado. Cada reação de PCR foi realizada em triplicata. Para o protocolo seguinte foi usado: 50 ciclos de 30 segundos a 94° C, 30 segundos a 53° C, 30 segundos a 72° C e um passo final de 7 minutos a 72° C.

Os produtos do PCR foram submetidos a eletroforese, corridas em um gel de 1,2% de agarose (50 mL de TAE 1x, 1,5 µL de brometo de etídeo mais 0,6 g de Agar LB, Invitrogen, #22700-025) por 20 minutos a 106 volts, acrescidas de 5 µL de corante xileno-cianol, juntamente com um *controle de peso molecular* de 1Kb e o master mix da reação desprovido de amostra como controle.

5.9.4 Extração do DNA a partir do gel de agarose

Foi utilizado o kit QIAquick Gel Extraction kit (Qiagen, #28706) para a extração e purificação dos fragmentos a serem sequenciados. As bandas foram cortadas sobre a luz UV (Figura 5) e pesadas. Em tubos de centrifugação de 2 mL foram adicionadas os cortes e o equivalente a três vezes o seu peso de Buffer QG e então incubados a 50° C no banho seco por 10 minutos até a completa dissolução. As amostras foram, então, transferidas para as colunas QIAquick e centrifugadas por 1 minuto a 17.900g. O escoado foi descartado em um descarte apropriado para substâncias contaminadas com brometo de iodo e 750 µL de Buffer PE foi inserido na coluna. Depois de repetir o passo de centrifugação mencionado anteriormente, foram trocados os tubos de coleção usados nas colunas por novos. Mais uma centrifugação, no entanto, de 2 minutos permitiu a secagem da membrana. Colunas foram postas em seus tubos de eluição, na qual foi usada 50 µL de Buffer EB subsequentemente centrifugada por 1 minuto. Amostras foram guardadas a 4° C.

5.9.5 Ligação e transformação

Através do uso do TOPO TA CLONING KIT (Invitrogen, #45-0030) a inserção dos fragmentos de PCR amplificados foram inseridos nos plasmídeos e em *E. Coli* quimicamente competentes para a subsequente extração. 3 µL de produto PCR, 1 µL de Solução Salina fornecida pelo kit, 1 µL de vetor TOPO e 1 µL de H₂O ultrapura foram misturados e incubados em temperatura ambiente por 30 minutos, durante os quais as placas de Agar LB (Invitrogen, #22700-025) foram removidas da geladeira e mantidas em temperatura ambiente também. Concluída a incubação, as amostras foram transferidas para o gelo e 3 µL da solução foi transferido para o tubo de bactérias competentes e homogeneizado com movimentos circulares sutis com a pipeta devido a sensibilidade e fragilidade das bactérias competentes. O tubo de bactérias competentes permaneceu no gelo por mais 5 minutos, seguido do choque térmico de 42 segundos a 42° C e imediatamente retornando ao gelo por mais 5 minutos. 250 µL de meio SOC foi adicionado antes da incubação no banho maria por 1 hora. Após a incubação, 150 µL da solução foi espalhada sobre o ágar até secar, dentro do fluxo laminar. As placas foram incubadas de 17 a 20 horas na estufa de uso exclusiva para bactérias a 37° C.

Tais placas foram feitas com 15g de Agar LB Broth Base (Invitrogen, #12780-052) em 750 mL de H₂O_d adicionadas de 500 µL de ampicilina e 700 µL de X-GAL permitindo a separação por cores branca/azul das colônias no dia seguinte.

A princípio, 16 colônias de cada amostra seriam escolhidas para sequenciamento, porém, em algumas amostras o número de colônias obtidas foi inferior e novas repetições serão realizadas posteriormente. As colônias selecionadas foram removidas da placa com o uso de ponteiros autoclavadas e cultivadas a 37° C em tubos cônicos de 15 mL por 17 a 20 horas em um *shaker* a 248 RPM.

5.9.6 Miniprep e sequenciamento

Para a miniprep, o kit utilizado foi o QIAprep Spin Miniprep kit (Qiagen, #27106) conforme descrito a seguir. O meio contendo a bactéria foi centrifugado por 2 minutos a 17.000g a seu sobrenadante descartado em um recipiente com água sanitária. Os pellets foram ressuspendidos em 250 µL de Buffer P1 e transferidos para tubos de centrifugação. 250 µL de Buffer P2 foi adicionado e misturado por inversão. O mesmo foi feito com 350 µL de Buffer N3. As amostras foram então centrifugadas por 10 minutos a 17.000g. Os sobrenadantes, desta vez transferidos para um QIAprep *spin columns* e centrifugados por 1 minuto na mesma velocidade anterior. Uma vez descartado o escoado, 500 µL de Buffer PB foi adicionado seguido de uma repetição do último passo de centrifugação; e este passo foi repetido mais uma vez com 750 µL de Buffer PE. Após essas etapas de lavagem, as colunas passaram novamente pela centrífuga, mas sem Buffer, permitindo a secagem das membranas. A eluição foi realizada com 50 µL de Buffer EB centrifugados por 1 minuto a 17.000g.

Amostras foram mensuradas e diluídas de acordo com sua concentração em H₂O_d ultrapura para completar 5 µL com a concentração de 1000 ng/µL, adicionados de 2 uL do primer M13, e enviadas ao sequenciamento.

5.9.7 Análise do padrão de metilação

A análise da expressão global está sendo realizada como descrito por Suzuki e colaboradores (SUZUKI et al., 2011). O polimorfismo de nucleotídeo único (*single nucleotide polymorphism*, SNP) no *locus* IGF2/H19 entre o *Bos indicus* e *Bos taurus* nos permite a análise alelo-específica da metilação do DNA após o sequenciamento, assim como a análise de expressão gênica alelo-específica. A guanina na sequência TTTATGTATTA indica um alelo proveniente de um *Bos indicus*, ou seja, alelo de origem materna. Se em seu lugar o nucleotídeo adenina estivesse presente, seria indicativo de um alelo de origem paterna.

RESULTADOS e DISCUSSÃO

7 RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.1 Produção de linhagens celulares bovinas com expressão exógena de OCT4 e SOX2

Estudos sobre reprogramação celular, diferenciação e proliferação revelaram que fatores de transcrição como OCT4, SOX2 e NANOG atuam juntos promovendo comprometimento celular ou pluripotência. Os fatores OCT4 e NANOG foram os primeiros identificados como essenciais para o desenvolvimento embrionário e para a manutenção da pluripotência de células-tronco. Relatou-se que a SOX2 dimeriza com OCT4, atuando sobre a regulação genética de células pluripotentes. (NICHOLS et al., 1998; MITSUI et al., 2003; BOYER et al., 2005; HAMMACHI et al., 2012; RIZZINO, 2013; RIZZINO; WUEBBEN, 2016).

Papapetrou e colaboradores, por exemplo, reportaram que um aumento de 3 vezes do OCT4 em relação aos níveis de SOX2, KLF4 e c-MYC aumentou a frequência de reprogramação, e o contrário resultou em uma redução drástica na eficiência de reprogramação (PAPAPETROU et al., 2009). Yamaguchi e colaboradores em 2011 reportaram que a diminuição de SOX2 aumenta a eficiência de geração de células parcialmente reprogramadas (YAMAGUCHI et al., 2011), mostrando que a expressão e a interação entre os fatores OCT4 e SOX2 precisam ser finamente regulados para a aquisição e manutenção da pluripotência *in vitro*.

Neste estudo descrevemos a geração de linhagens celulares bovinas expressando os fatores relacionados à pluripotência OCT4 e SOX2 exógenos. Estas linhagens celulares são importantes para um melhor entendimento de processos como a aquisição e manutenção da pluripotência *in vitro*. A separação de populações positivas para tais fatores permite que apenas as células que incorporaram os fatores sejam cultivadas, aumentando, em teoria, a eficiência de reprogramação.

A produção dos fatores foi realizada através de mecanismo lentiviral, e a produção lentiviral pode ser confirmada através da análise da fluorescência das células 293FT após a transfecção (Figura 10).

Figura 10 - Células 293FT após 48h de transfecção sob luz branca e sob microscopia de fluorescência

Fonte: (BORGES C.M., 2016).

Legenda: Células 293FT fotografadas após 48h de transfecção com a proteína fluorescente OCT4-vexGFP sob luz branca (A) e sob microscopia de fluorescência (B). 200x.

Os fibroblastos transduzidos com os vetores lentivirais OCT4-vexGFP, SOX2-mCitrine e ambos foram analisadas por citometria de fluxo e tiveram suas populações positivas separadas daquelas não transduzidas ou que não expressaram os fatores exógenos. As porcentagens de células positivas de cada linhagem e tratamento podem ser usadas como parâmetro da eficiência de transdução e são descritas na tabela 1. Pode ser observado que linhagens diferentes responderam de maneira diferente à integração e expressão dos fatores.

Tabela 1 - Porcentagens de células fluorescentes analisadas por citometria de fluxo em três linhagens de fibroblasto fetal bovino

	hOCT4 %	hSOX2 %	hOCT4+hSOX2%	Média %
bFF1	79,8	10,2	1,3	40,4
bFF2	22,7	4,2	0,4	6,1
bFF3	18,7	3,9	0,2	0,63

Em decorrência dos melhores resultados de fluorescência obtidos com a linhagem 1, a recuperação pós-sorting desta (em especial das células positivas para OCT4+SOX2) foi eficaz, possibilitando sua utilização nos experimentos de indução à pluripotência subsequentes. A porcentagem de pureza *pós-sorting* foi de 90% ou maior.

7.2 Indução à pluripotência (produção de células iPS)

Não foi observada formação de colônias iPS em nenhum grupo transduzido com o STEMCCA humano.

Quando os grupos foram transduzidos com o STEMCCA murino, houve formação de colônias somente no grupo controle não sorted em duas das três repetições. A porcentagem de colônias formadas (número de colônias formadas dividido pelo número de células transduzidas plaqueadas) está descrito na tabela 2.

Tabela 2 - Porcentagem de colônias formadas em cada grupo experimental, em três repetições (porcentagem e número de colônias).

	Controle não <i>sorted</i>	Controle <i>sorted</i>	OCT4+	SOX2+	OCT4+SOX2
R1	0,00035 (7)	0	0	0	0
R2	0,00005 (1)	0	0	0	0
R3	0	0	0	0	0

As colônias geradas mostraram morfologia típica com aproximadamente 15 a 20 dias pós transdução (Figura 11). As colônias obtidas foram primeiramente repicadas manualmente e enzimaticamente nos demais repiques.

Figura 11 - Células iPS antes do primeiro repique derivadas de fibroblastos bovinos controle não sorted da R1

Fonte: (BORGES C.M., 2016).

Legenda: Colônia de células iPS antes do primeiro repique derivadas de fibroblastos bovinos controle não sorted. 200x

Entre as repetições o número de passagens *in vitro* foi diferente uma vez que o mesmo cultivo de células bFF1 transduzidas com os fatores OCT4 e SOX2 foram submetidas à análise, *sorting* e indução à pluripotência em momentos independentes. Desta maneira, a R1 tem menor número de passagens *in vitro*, seguida da R3, e finalmente pela R3.

Pelos resultados obtidos (obtenção de colônias somente no grupo não *sorted*, e dentro deste grupo, mais colônias na repetição 1, menos na repetição 2 e nenhuma na repetição 3 podem ser inferidos dois possíveis efeitos principais: 1. Efeito do *sorting*, e 2. Efeito da passagens *in vitro*. Deve ser considerado ainda possíveis efeitos em decorrência da própria rotina laboratorial como a troca de lote de meio de cultivo ou suplementos.

7.3 Análise quantitativa da expressão de genes de pluripotência e genes *imprinted*

Os grupos experimentais das 3 repetições induzidas à pluripotência (R1, R2 e R3) foram avaliados quanto a expressão dos fatores de pluripotência OCT4 e SOX2 e genes *imprinted* H19 e IGF2R.

Quando analisada a expressão de OCT4, pode ser observado que células OCT4+ apresentam maior expressão de OCT4 como esperado (Figura 12). Células OCT4+SOX2 apresentam aumento porém sem diferença estatística, o que pode ser devido à alta variabilidade entre as repetições ou então devido a algum mecanismo regulatório entre OCT4 e SOX2. Células SOX2+ não apresentaram aumento de OCT4.

Figura 12 - Gráfico representando a expressão quantitativa do gene OCT4 nas linhagens bovinas estudadas, em unidades arbitrárias

Fonte: (BORGES C.M., 2016).

Legenda: Gráfico representando a expressão de OCT4 nas linhagens bovinas em unidades arbitrárias.

Quando analisada a expressão de SOX2, pode ser observado que as células SOX2+ apresentam maior expressão de SOX2 como esperado (Figura 13). Células OCT4+SOX2 apresentam aumento porém sem diferença estatística, o que pode ser devido à alta variabilidade entre as repetições ou então devido a algum mecanismo regulatório entre OCT4 e SOX2, como na análise da expressão do OCT4. De maneira interessante, células SOX2+ apresentaram um aumento de aproximadamente 10 vezes na expressão de OCT4 em relação ao controle, o que também não foi detectado na análise estatística.

Figura 13 - Gráfico representando a expressão quantitativa do gene SOX2 nas linhagens bovinas estudadas, em unidades arbitrárias

Fonte: (BORGES C.M., 2016).

Legenda: Gráfico representando a expressão de SOX2 nas linhagens bovinas em unidades arbitrárias.

Desta maneira, as análises dos genes OCT4 e SOX2 mostraram uma elevada expressão exógena de cada gene alvo. De maneira interessante, as células dupla positivas também apresentam maior expressão relativa dos genes, apesar de tal diferença não ser notada em testes estatísticos; e há aparente interação da expressão exógena do OCT4 na expressão endógena do SOX2.

Quando analisada a expressão do gene *imprinted* H19 (Figura 14), pode ser observado que células controle que passaram pelo processo de análise e separação celular por citometria de fluxo apresentam maior expressão de H19, o que não era esperado. Células OCT4+, SOX2+ e OCT4+SOX2 não apresentaram aumento no H19 em relação ao controle não *sorted*.

O aumento da expressão de H19 pelo grupo *sorted* não era esperado, e como as outras linhagens (OCT4, SOX2 e OCT4+SOX2) passaram pelo mesmo tratamento, há a possibilidade dos fatores estarem de alguma maneira protegendo o locus contra uma possível desregulação causada pelo procedimento. Esta possibilidade ainda deve ser melhor estudada com a análise de mais repetições e do padrão de metilação neste *locus* específico.

Figura 14 - Gráfico representando a expressão quantitativa do gene H19 nas linhagens bovinas estudadas, em unidades arbitrárias

Fonte: (BORGES C.M., 2016).

Legenda: Gráfico representando a expressão de *H19* nas linhagens bovinas em unidades arbitrárias.

Com a finalidade de analisar outro gene *imprinted*, em outro *locus*, foi estudada a expressão do gene IGF2R. Como demonstrado na figura 15, não houve diferença entre os grupos, porém, um aumento de aproximadamente 50% no grupo controle *sorted* em relação ao controle não *sorted* foi observado, também indicando um possível efeito do processo de análise e separação celular por citometria de fluxo na regulação de genes *imprinted*. Novamente, esta possibilidade ainda deve ser melhor estudada com a análise de mais repetições.

Figura 15 - Gráfico representando a expressão quantitativa do gene IGF2R nas linhagens bovinas estudadas, em unidades arbitrárias

Fonte: (BORGES C.M., 2016).

Legenda: Gráfico representando a expressão de *IGF2R* nas linhagens bovinas em unidades arbitrárias.

É também descrita aqui a análise de cada repetição, onde podemos observar que há um padrão de expressão de tais genes dentro de cada repetição, porém, as repetições são variáveis entre si (Figura 16).

Figura 16 - Gráfico representando a expressão quantitativa dos genes OCT4, SOX2, H19 e IGF2R nas repetições estudadas, em unidades arbitrárias

Fonte: (BORGES C.M., 2016).

Legenda: Gráfico representando a quantitativa dos genes *OCT4*, *SOX2*, *H19* e *IGF2R* nas repetições estudadas, em unidades arbitrárias.

A análise da expressão gênica nas repetições em separado mostra que, apesar do padrão ser bastante similar entre as amostras de maneira geral, o grupo controle não *sorted* da R1 apresenta um padrão de expressão diferente das outras duas repetições, sendo esta a mesma amostra que gerou em colônias iPS com maior eficiência. Pode-se notar que, em relação às R2 e R3, este grupo apresentou de maneira pronunciada maior expressão de OCT4 e menor expressão de H19, indicando uma possível regulação entre eles. A existência de populações celulares mais facilmente reprogramáveis é descrita na literatura (RODRÍGUEZ-ALVAREZ et al., 2013; PAN et al., 2015), e mais estudos precisam ser conduzidos a fim de revelar se tal pré-disposição pode ser relacionada à regulação entre genes de pluripotência e genes *imprinted*.

7.4 Análise da metilação alelo específica na DMR do locus *H19/IGF2*

A análise da metilação alelo específica na DMR do locus *H19/IGF2* foi realizada na repetição 3 até o momento. Foi analisada a taxa de conversão por bissulfito (número de citocinas não convertidas em relação ao número de citocinas passíveis de conversão) nas amostras utilizadas (Tabela 3), sendo estas consideradas apropriadas (maiores que 90%).

Tabela 3 - Taxa de eficiência da conversão por bissulfito

	Controle não <i>sorted</i>	Controle <i>sorted</i>	OCT4+	SOX2+	OCT4+SOX2
Taxa de conversão	98,03%	98,23%	95,09%	98,89%	98,32%

Com a contagem das ilhas metiladas e não metiladas foi possível calcular a porcentagem de metilação tanto total quanto específica da região do CTCF (a qual corresponde as colunas 3, 4 e 5 nos resultados). As imagens relativas das ilhas metiladas e não metiladas no locus *H19/IGF2* são mostradas nas figuras 17 a 21, e a análise da porcentagem da metilação na DMR do locus *H19/IGF2* nos grupos estudados está apresentada na tabela 4.

De maneira geral, o alelo materno (*indicus*) mostrou-se desmetilado e o alelo paterno (*taurus*) metilado. A análise das demais repetições deverá ser realizada para que uma conclusão adequada seja adicionada ao presente estudo.

Figura 17 - Análise da metilação nos alelos materno e paterno no locus H19/IGF2 no grupo experimental controle não sorted

Fonte: (BORGES C.M., 2016).

Legenda: Gráfico representando a metilação na DMR do locus *H19/IGF2*, sendo o azul representando ilhas CpG não metiladas e o vermelho ilhas metiladas no grupo experimental controle não *sorted*.

Figura 18 - Análise da metilação nos alelos materno e paterno no locus H19/IGF2 no grupo experimental controle sorted

Fonte: (BORGES C.M., 2016).

Legenda: Gráfico representando a metilação na DMR do locus *H19/IGF2*, sendo o azul representando ilhas CpG não metiladas e o vermelho ilhas metiladas no grupo experimental controle *sorted*.

Figura 19 - Análise da metilação nos alelos materno e paterno no locus H19/IGF2 no grupo experimental OCT4+

Fonte: (BORGES C.M., 2016).
Legenda: Gráfico representando a metilação na DMR do locus *H19/IGF2*, sendo o azul representando ilhas CpG não metiladas e o vermelho ilhas metiladas no grupo experimental controle não *sorted*.

Figura 20 - Análise da metilação nos alelos materno e paterno no locus H19/IGF2 no grupo experimental SOX2+

Fonte: (BORGES C.M., 2016).
Legenda: Gráfico representando a metilação na DMR do locus *H19/IGF2*, sendo o azul representando ilhas CpG não metiladas e o vermelho ilhas metiladas no grupo experimental SOX2.

Figura 21 - Análise da metilação nos alelos materno e paterno no locus H19/IGF2 no grupo experimental OCT4+SOX2

Fonte: (BORGES C.M., 2016).

Legenda: Gráfico representando a metilação na DMR do locus *H19/IGF2*, sendo o azul representando ilhas CpG não metiladas e o vermelho ilhas metiladas no grupo experimental OCT4+SOX2.

Tabela 4 - Análise da porcentagem da metilação na DMR do locus H19/IGF2 nos grupos estudados

	Controle não <i>sorted</i> (%DMR; %CTCF)	Controle <i>sorted</i> (%DMR; %CTCF)	OCT4+ (%DMR, %CTCF)	SOX2+ (%DMR, %CTCF)	OCT4+SOX2 (%DMR, %CTCF)
Alelo materno	21,42; 33,33	0; 0	21,24; 6,67	2,38; 5,55	5,95; 11,11
Alelo paterno	100; 100	92,85; 100	100; 100	96,42; 100	92,3; 100

Apesar de resultados ainda preliminares, observa-se que o padrão no grupo controle não *sorted* parece ser levemente diferente dos demais grupos que também passaram pelo sorting, sendo esta diferença marcada pela desmetilação total do alelo materno. Para inferir se a expressão dos fatores exógenos atuam de modo a proteger o locus *H19/IGF2* de possíveis interferências externas, como por exemplo, o *sorting* ou a reprogramação, a análise de um maior número de replicatas é necessário.

Uma vez que neste estudo não foram geradas células iPS a partir de fibroblastos dos grupos OCT4+, SOX2+ e OCT4+SOX2, não foi possível a análise da manutenção do padrão de imprinting após o processo de reprogramação celular *in vitro*. Tal estudo será de grande

importância para o melhor entendimento destes fatores de pluripotência no processo de aquisição e manutenção do padrão epigenético de células reprogramadas.

CONCLUSÕES

8 CONCLUSÕES

Neste estudo foi proposto a geração de um modelo experimental *in vitro* que possibilite o estudo da influência dos fatores de transcrição OCT4 e SOX2, assim como sua associação, na regulação do imprinting no locus *H19/IGF2* em células bovinas e na reprogramação *in vitro*.

Foram geradas linhagens celulares expressando genes repórteres associados aos fatores de pluripotência OCT4, SOX2 e ambos, e a eficiência de reprogramação *in vitro* à pluripotência em células expressando OCT4 e/ou SOX2 exógenos. Também foram avaliadas a expressão de genes relacionados à pluripotência (OCT4 e SOX2) e *imprinted* (H19 e IGF2R) nas linhagens celulares obtidas, assim como a metilação da DMR no locus *H19/IGF2* nestas linhagens, ainda que de maneira preliminar.

As hipóteses de que a expressão de OCT4 e SOX2 exógenos em linhagens celulares bovinas é possível e leva à modificação do padrão de expressão gênica e imprinting no locus *H19/IGF2*, assim como a possível formação de colônias iPS bovinas de maneira mais eficiente quando a reprogramação é realizada em fibroblastos expressando fatores de pluripotência (OCT4 e/ou SOX2) exógenos, não foram confirmadas no presente estudo.

A reprogramação celular à pluripotência e consequente formação de colônias de células iPS foi possível, porém somente no grupo não submetido à expressão exógena dos fatores e não submetido ao procedimento de análise e separação celular por citometria de fluxo.

Os resultados descritos aqui permitem concluir que a geração das células expressando fatores de pluripotência exógenos foi eficiente, como mostrado pela análise de expressão gênica nestes grupos. Houve interferência do processo de análise e sorting por citometria de fluxo na expressão do gene *imprinted* H19 em pelo menos um dos grupos experimentais, e não foi possível a análise da manutenção do padrão de *imprinting* após o processo de reprogramação celular *in vitro*, uma vez que não foram geradas colônias de células iPS nos grupos experimentais expressando os fatores exógenos. A continuação de tal estudo será de grande importância para o melhor entendimento destes fatores de pluripotência no processo de aquisição e manutenção do padrão epigenético de células reprogramadas, com o objetivo de aumentar a eficácia deste processo ou ainda conhecer os fatores envolvidos no mesmo.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- ABI HABIB, W.; AZZI, S.; BRIOUDE, F.; STEUNOU, V.; THIBAUD, N.; DAS NEVES, C.; LE JULE, M.; CHANTOT-BASTARAUD, S.; KEREN, B.; LYONNET, S.; MICHOT, C.; ROSSI, M.; PASQUIER, L.; GICQUEL, C.; ROSSIGNOL, S.; LE BOUC, Y.; NETCHINE, I. Extensive investigation of the IGF2/H19 imprinting control region reveals novel OCT4/SOX2 binding site defects associated with specific methylation patterns in Beckwith-Wiedemann syndrome. **Human Molecular Genetics**, v. 23, n. 21, p. 5763–73, nov. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24916376>>. Acesso em: 27 nov. 2014.
- AMBROSETTI, D. C.; BASILICO, C.; DAILEY, L. Synergistic activation of the fibroblast growth factor 4 enhancer by Sox2 and Oct-3 depends on protein-protein interactions facilitated by a specific spatial arrangement of factor binding sites. **Molecular and Cellular Biology**, v. 17, n. 11, p. 6321–9, nov. 1997. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=232483&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 27 nov. 2014.
- AMOR, D. J.; HALLIDAY, J. A review of known imprinting syndromes and their association with assisted reproduction technologies. **Human Reproduction, (Oxford, England)**, v. 23, n. 12, p. 2826–34, dez. 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18703582>>. Acesso em: 9 jan. 2015.
- ARNEY, K. L. H19 and Igf2--enhancing the confusion? **Trends in Genetics: TIG**, v. 19, n. 1, p. 17–23, jan. 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12493244>>. Acesso em: 27 nov. 2014.
- BARLOW, D. P.; STÖGER, R.; HERRMANN, B. G.; SAITO, K.; SCHWEIFER, N. The mouse insulin-like growth factor type-2 receptor is imprinted and closely linked to the Tme locus. **Nature**, v. 349, n. 6304, p. 84–7, jan. 1991. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1845916>>. Acesso em: 15 jun. 2015.
- BARTHOLDI, D.; KRAJEWSKA-WALASEK, M.; OUNAP, K.; GASPAR, H.; CHRZANOWSKA, K. H.; ILYANA, H.; KAYSERILI, H.; LURIE, I. W.; SCHINZEL, A.; BAUMER, A. Epigenetic mutations of the imprinted IGF2-H19 domain in Silver-Russell syndrome (SRS): results from a large cohort of patients with SRS and SRS-like phenotypes. **Journal of Medical Genetics**, v. 46, n. 3, p. 192–7, mar. 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19066168>>. Acesso em: 4 fev. 2015.
- BIRD, A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. **Genes & Development**, v. 16, n. 1, p. 6–21, 1 jan. 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11782440>>. Acesso em: 12 jul. 2014.
- BORTVIN, A.; EGGAN, K.; SKALETSKY, H.; AKUTSU, H.; BERRY, D. L.; YANAGIMACHI, R.; PAGE, D. C.; JAENISCH, R. Incomplete reactivation of Oct4-related genes in mouse embryos cloned from somatic nuclei. **Development, (Cambridge, England)**,

v. 130, n. 8, p. 1673–80, abr. 2003. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12620990>>. Acesso em: 27 nov. 2014.

BOURC'HIS, D.; LE BOURHIS, D.; PATIN, D.; NIVELEAU, A.; COMIZZOLI, P.; RENARD, J. P.; VIEGAS-PÉQUIGNOT, E. Delayed and incomplete reprogramming of chromosome methylation patterns in bovine cloned embryos. **Current Biology: CB**, v. 11, n. 19, p. 1542–6, 2 out. 2001. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11591324>>. Acesso em: 21 fev. 2014.

BOYCE, W. T.; KOBOR, M. S. Development and the epigenome: the “synapse” of gene-environment interplay. **Developmental Science**, v. 18, n. 1, p. 1–23, jan. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25546559>>. Acesso em: 30 maio. 2016.

BOYER, L. A.; LEE, T. I.; COLE, M. F.; JOHNSTONE, S. E.; LEVINE, S. S.; ZUCKER, J. P.; GUENTHER, M. G.; KUMAR, R. M.; MURRAY, H. L.; JENNER, R. G.; GIFFORD, D. K.; MELTON, D. A.; JAENISCH, R.; YOUNG, R. A. Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. **Cell**, v. 122, n. 6, p. 947–56, set. 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16153702>>. Acesso em: 21 jun. 2016.

BRESSAN, F. F. **Tese de doutorado:** Geração de células pluripotentes através da indução gênica e transferência de núcleo: modelo bovino de aquisição de pluripotência. 2013. Disponível em: <[file:///Users/fabianabressan/Downloads/DO3493264COR \(2\).pdf](file:///Users/fabianabressan/Downloads/DO3493264COR%20(2).pdf)>. Acesso em: 27 nov. 2014.

BROWN, K. W.; VILLAR, A. J.; BICKMORE, W.; CLAYTON-SMITH, J.; CATCHPOOLE, D.; MAHER, E. R.; REIK, W. Imprinting mutation in the Beckwith-Wiedemann syndrome leads to biallelic IGF2 expression through an H19-independent pathway. **Human Molecular Genetics**, v. 5, n. 12, p. 2027–32, dez. 1996. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8968759>>. Acesso em: 8 jan. 2015.

CEELEN, M.; VERMEIDEN, J. P. Health of human and livestock conceived by assisted reproduction. **Twin Research : the official journal of the International Society for Twin Studies**, v. 4, n. 5, p. 412–6, out. 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11869497>>. Acesso em: 17 set. 2014.

CHEN, Z.; ROBBINS, K. M.; WELLS, K. D.; RIVERA, R. M. Large offspring syndrome: a bovine model for the human loss-of-imprinting overgrowth syndrome Beckwith-Wiedemann. **Epigenetics: official journal of the DNA Methylation Society**, v. 8, n. 6, p. 591–601, jun. 2013. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3857339&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 9 jul. 2014.

D'HAESELEER, P. What are DNA sequence motifs? **Nature Biotechnology**, v. 24, n. 4, p. 423–5, abr. 2006. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nbt0406-423>>. Acesso em: 28 out. 2015.

DEAN, W.; SANTOS, F.; STOJKOVIC, M.; ZAKHARTCHENKO, V.; WALTER, J.;

WOLF, E.; REIK, W. Conservation of methylation reprogramming in mammalian development: aberrant reprogramming in cloned embryos. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 24, p. 13734–8, nov. 2001. Disponível em: <<http://www.pnas.org/content/98/24/13734>>. Acesso em: 21 fev. 2014.

DESAI, M.; JELLYMAN, J. K.; ROSS, M. G. Epigenomics, gestational programming and risk of metabolic syndrome. **International Journal of Obesity**, v. 39, n. 4, p. 633–41, abr. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25640766>>. Acesso em: 5 maio. 2016.

EILERTSEN, K. J.; POWER, R. A.; HARKINS, L. L.; MISICA, P. Targeting cellular memory to reprogram the epigenome, restore potential, and improve somatic cell nuclear transfer. **Animal Reproduction Science**, v. 98, n. 1–2, p. 129–46, mar. 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17166676>>. Acesso em: 27 nov. 2014.

GRELON, M. Meiotic recombination mechanisms. **Comptes rendus biologiques**, v. 339, n. 7–8, p. 247–251, maio 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27180110>>. Acesso em: 30 maio. 2016.

HAMMACHI, F.; MORRISON, G. M.; SHAROV, A. A.; LIVIGNI, A.; NARAYAN, S.; PAPAPETROU, E. P.; MALLEY, J. O.; KAJI, K.; KO, M. S. H.; PTASHNE, M.; BRICKMAN, J. M. Report Transcriptional Activation by Oct4 Is Sufficient for the Maintenance and Induction of Pluripotency. **Cell Reports**, v. 1, n. 2, p. 99–109, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2011.12.002>>.

HEYMAN, Y.; CHAVATTE-PALMER, P.; LEBOURHIS, D.; CAMOUS, S.; VIGNON, X.; RENARD, J. P. Frequency and occurrence of late-gestation losses from cattle cloned embryos. **Biology of Reproduction**, v. 66, n. 1, p. 6–13, jan. 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11751257>>. Acesso em: 17 set. 2014.

HILL, J. R.; ROUSSEL, A. J.; CIBELLI, J. B.; EDWARDS, J. F.; HOOPER, N. L.; MILLER, M. W.; THOMPSON, J. A.; LOONEY, C. R.; WESTHUSIN, M. E.; ROBL, J. M.; STICE, S. L. Clinical and pathologic features of cloned transgenic calves and fetuses (13 case studies). **Theriogenology**, v. 51, n. 8, p. 1451–65, jun. 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10729073>>. Acesso em: 27 nov. 2014.

HORI, N.; YAMANE, M.; KOUNO, K.; SATO, K. Induction of DNA demethylation depending on two sets of Sox2 and adjacent Oct3/4 binding sites (Sox-Oct motifs) within the mouse H19/insulin-like growth factor 2 (Igf2) imprinted control region. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 52, p. 44006–16, dez. 2012. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3527983&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 2 fev. 2016.

HOWELL, P. M.; LIU, S.; REN, S.; BEHLEN, C.; FODSTAD, O.; RIKER, A. I. Epigenetics in human melanoma. **Cancer Control: journal of the Moffitt Cancer Center**, v. 16, n. 3, p. 200–18, jul. 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19556960>>. Acesso em: 2 fev. 2016.

JIRTLE, R. L.; SKINNER, M. K. Environmental epigenomics and disease susceptibility. **Nature Reviews. Genetics**, v. 8, n. 4, p. 253–62, abr. 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17363974>>. Acesso em: 10 jul. 2014.

KAFFER, C. R.; GRINBERG, A.; PFEIFER, K. Regulatory mechanisms at the mouse Igf2/H19 locus. **Molecular and Cellular Biology**, v. 21, n. 23, p. 8189–96, dez. 2001. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=99983&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 2 fev. 2016.

LAU, M. M.; STEWART, C. E.; LIU, Z.; BHATT, H.; ROTWEIN, P.; STEWART, C. L. Loss of the imprinted IGF2/cation-independent mannose 6-phosphate receptor results in fetal overgrowth and perinatal lethality. **Genes & Development**, v. 8, n. 24, p. 2953–63, dez. 1994. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8001817>>. Acesso em: 15 jun. 2015.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods, (San Diego, Calif.)**, v. 25, n. 4, p. 402–8, dez. 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11846609>>. Acesso em: 9 jul. 2014.

LUDWIG, T.; EGGENSCHWILER, J.; FISHER, P.; D'ERCOLE, A. J.; DAVENPORT, M. L.; EFSTRATIADIS, A. Mouse mutants lacking the type 2 IGF receptor (IGF2R) are rescued from perinatal lethality in Igf2 and Igf1r null backgrounds. **Developmental Biology**, v. 177, n. 2, p. 517–35, 1 ago. 1996. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8806828>>. Acesso em: 15 jun. 2015.

MAHER, E. R.; AFNAN, M.; BARRATT, C. L. Epigenetic risks related to assisted reproductive technologies: epigenetics, imprinting, ART and icebergs? **Human Reproduction, (Oxford, England)**, v. 18, n. 12, p. 2508–11, dez. 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14645164>>. Acesso em: 17 dez. 2014.

MANN, M. R. W.; BARTOLOMEI, M. S. Epigenetic reprogramming in the mammalian embryo: struggle of the clones. **Genome Biology**, v. 3, n. 2, p. REVIEWS1003, jan. 2002. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=139014&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 4 fev. 2015.

MARTUCCI, M. F.; BRESSAN, F. F.; SANGALLI, J. R.; SILVEIRA, J. C.; MEIRELLES, F. V.; SMITH, L. C.; PERECIN, F. Impactos das biotécnicas reprodutivas no controle epigenético de genes imprinted. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 39, n. 2, p. 255–262, 2015. Disponível em: <[http://www.cbpa.org.br/pages/publicacoes/rbra/v39n2/pag255-262\(RB582\).pdf](http://www.cbpa.org.br/pages/publicacoes/rbra/v39n2/pag255-262(RB582).pdf)>. Acesso em: 30 maio. 2016.

MEIRELLES, F. V.; BIRGEL, E. H.; PERECIN, F.; BERTOLINI, M.; TRALDI, A. S.; PIMENTEL, J. R. V.; KOMNINOU, E. R.; SANGALLI, J. R.; NETO, P. F.; NUNES, M. T.; POGLIANI, F. C.; MEIRELLES, F. D. P.; KUBRUSLY, F. S.; VANNUCCHI, C. I.; SILVA, L. C. G. Delivery of cloned offspring: experience in Zebu cattle (*Bos indicus*). **Reproduction**,

Fertility, and Development, v. 22, n. 1, p. 88–97, jan. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20003849>>. Acesso em: 21 fev. 2014.

MITSUI, K.; TOKUZAWA, Y.; ITOH, H.; SEGAWA, K.; MURAKAMI, M.; TAKAHASHI, K.; MARUYAMA, M.; MAEDA, M.; YAMANAKA, S. The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. **Cell**, v. 113, n. 5, p. 631–42, maio 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12787504>>. Acesso em: 21 jun. 2016.

MORRISON, G. M.; BRICKMAN, J. M. Conserved roles for Oct4 homologues in maintaining multipotency during early vertebrate development. **Development, (Cambridge, England)**, v. 133, n. 10, p. 2011–22, maio 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16651543>>. Acesso em: 26 nov. 2014.

MOSS, T. J.; WALLRATH, L. L. Connections between epigenetic gene silencing and human disease. **Mutation Research**, v. 618, n. 1–2, p. 163–74, maio 2007. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1892579&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 2 fev. 2016.

MURPHY, S. K.; JIRTLE, R. L. Imprinting evolution and the price of silence. **BioEssays : News and Reviews in molecular, Cellular and Developmental Biology**, v. 25, n. 6, p. 577–88, jun. 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12766947>>. Acesso em: 15 jun. 2015.

NAFEE, T. M.; FARRELL, W. E.; CARROLL, W. D.; FRYER, A. A.; ISMAIL, K. M. K. Epigenetic control of fetal gene expression. **BJOG: an international journal of obstetrics and gynaecology**, v. 115, n. 2, p. 158–68, jan. 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17970798>>. Acesso em: 4 fev. 2015.

NICHOLS, J.; ZEVIK, B.; ANASTASSIADIS, K.; NIWA, H.; KLEWE-NEBENIUS, D.; CHAMBERS, I.; SCHÖLER, H.; SMITH, A. Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. **Cell**, v. 95, n. 3, p. 379–91, out. 1998. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9814708>>. Acesso em: 27 nov. 2014.

NIWA, H.; MIYAZAKI, J.; SMITH, A. G. Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. **Nature Genetics**, v. 24, n. 4, p. 372–6, abr. 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10742100>>. Acesso em: 28 out. 2014.

OHGANE, J.; YAGI, S.; SHIOTA, K. Epigenetics: the DNA methylation profile of tissue-dependent and differentially methylated regions in cells. **Placenta**, v. 29 Suppl A, p. S29–35, mar. 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18031808>>. Acesso em: 4 fev. 2015.

OKUMURA-NAKANISHI, S.; SAITO, M.; NIWA, H.; ISHIKAWA, F. Oct-3/4 and Sox2 regulate Oct-3/4 gene in embryonic stem cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 280,

n. 7, p. 5307–17, fev. 2005. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15557334>>. Acesso em: 28 out. 2014.

PAN, S.; CHEN, W.; LIU, X.; XIAO, J.; WANG, Y.; LIU, J.; DU, Y.; WANG, Y.; ZHANG, Y. Application of a Novel Population of Multipotent Stem Cells Derived from Skin Fibroblasts as Donor Cells in Bovine SCNT. **PLOS ONE**, v. 10, n. 1, p. e0114423, jan. 2015. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0114423>>. Acesso em: 14 nov. 2016.

PAPAPETROU, E. P.; TOMISHIMA, M. J.; CHAMBERS, S. M.; MICA, Y.; REED, E.; MENON, J.; TABAR, V.; MO, Q.; STUDER, L.; SADELAIN, M. Stoichiometric and temporal requirements of Oct4, Sox2, Klf4, and c-Myc expression for efficient human iPSC induction and differentiation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 31, p. 12759–64, ago. 2009. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2722286&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 27 nov. 2014.

PAULSEN, M.; FERGUSON-SMITH, A. C. DNA methylation in genomic imprinting, development, and disease. **The Journal of Pathology**, v. 195, n. 1, p. 97–110, set. 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11568896>>. Acesso em: 27 nov. 2014.

PERECIN, F.; MÉO, S. C.; YAMAZAKI, W.; FERREIRA, C. R.; MERIGHE, G. K. F.; MEIRELLES, F. V.; GARCIA, J. M. Imprinted gene expression in in vivo- and in vitro-produced bovine embryos and chorio-allantoic membranes. **Genetics and Molecular Research: GMR**, v. 8, n. 1, p. 76–85, jan. 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19283675>>. Acesso em: 15 jun. 2015.

PESCE, M.; SCHÖLER, H. R. Oct-4: control of totipotency and germline determination. **Molecular Reproduction and Development**, v. 55, n. 4, p. 452–7, abr. 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10694754>>. Acesso em: 12 mar. 2016.

PESCE, M.; SCHÖLER, H. R. Oct-4: gatekeeper in the beginnings of mammalian development. **Stem Cells (Dayton, Ohio)**, v. 19, n. 4, p. 271–8, jan. 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11463946>>. Acesso em: 25 abr. 2016.

REED, M. L.; LEFF, S. E. Maternal imprinting of human SNRPN, a gene deleted in Prader-Willi syndrome. **Nature Genetics**, v. 6, n. 2, p. 163–7, fev. 1994. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7512861>>. Acesso em: 4 fev. 2015.

REIK, W.; DEAN, W.; WALTER, J. Epigenetic reprogramming in mammalian development. **Science, (New York, N.Y.)**, v. 293, n. 5532, p. 1089–93, ago. 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11498579>>. Acesso em: 9 jul. 2014.

RICHARDS, E. J. Inherited epigenetic variation--revisiting soft inheritance. **Nature Reviews. Genetics**, v. 7, n. 5, p. 395–401, maio 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16534512>>. Acesso em: 15 jan. 2016.

RIDEOUT, W. M.; EGGAN, K.; JAENISCH, R. Nuclear cloning and epigenetic reprogramming of the genome. **Science, (New York, N.Y.)**, v. 293, n. 5532, p. 1093–8, ago. 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11498580>>. Acesso em: 26 nov. 2014.

RIZZINO, A. Concise review: The Sox2-Oct4 connection: critical players in a much larger interdependent network integrated at multiple levels. **Stem Cells, (Dayton, Ohio)**, v. 31, n. 6, p. 1033–9, jun. 2013. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3664101&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 25 nov. 2015.

RIZZINO, A.; WUEBBEN, E. L. Sox2/Oct4: A delicately balanced partnership in pluripotent stem cells and embryogenesis. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1859, n. 6, p. 780–91, mar. 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26992828>>. Acesso em: 2 maio. 2016.

RODENHISER, D.; MANN, M. Epigenetics and human disease: translating basic biology into clinical applications. **CMAJ: Canadian Medical Association journal = journal de l'Association medicale canadienne**, v. 174, n. 3, p. 341–8, jan. 2006. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1373719&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 2 fev. 2016.

RODRÍGUEZ-ALVAREZ, L.; MANRIQUEZ, J.; VELASQUEZ, A.; CASTRO, F. O. Constitutive expression of the embryonic stem cell marker OCT4 in bovine somatic donor cells influences blastocysts rate and quality after nucleus transfer. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal**, v. 49, n. 9, p. 657–667, 12 out. 2013. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s11626-013-9650-0>>. Acesso em: 14 nov. 2016.

ROMANOSKI, C. E.; GLASS, C. K.; STUNNENBERG, H. G.; WILSON, L.; ALMOUZNI, G. Epigenomics: Roadmap for regulation. **Nature**, v. 518, n. 7539, p. 314–6, 19 fev. 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/518314a>>. Acesso em: 13 nov. 2015.

RUNTE, M.; KROISEL, P. M.; GILLESSEN-KAESBACH, G.; VARON, R.; HORN, D.; COHEN, M. Y.; WAGSTAFF, J.; HORSTHEMKE, B.; BUITING, K. SNURF-SNRPN and UBE3A transcript levels in patients with Angelman syndrome. **Human Genetics**, v. 114, n. 6, p. 553–61, maio 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15014980>>. Acesso em: 4 fev. 2015.

RUVINSKY, A. Basics of gametic imprinting. **Journal of Animal Science**, v. 77, p. 228–37, jan. 1999. Supplement 2. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15526800>>. Acesso em: 4 fev. 2015.

SANTOS, F.; DEAN, W. Epigenetic reprogramming during early development in mammals. **Reproduction, (Cambridge, England)**, v. 127, n. 6, p. 643–51, jun. 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15175501>>. Acesso em: 27 ago. 2014.

SANTOS, F.; ZAKHARTCHENKO, V.; STOJKOVIC, M.; PETERS, A.; JENUWEIN, T.;

WOLF, E.; REIK, W.; DEAN, W. Epigenetic marking correlates with developmental potential in cloned bovine preimplantation embryos. **Current biology**: CB, v. 13, n. 13, p. 1116–21, jul. 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12842010>>. Acesso em: 9 jul. 2014.

SOMMER, C. A.; STADTFELD, M.; MURPHY, G. J.; HOCHEDLINGER, K.; KOTTON, D. N.; MOSTOSLAVSKY, G. Induced pluripotent stem cell generation using a single lentiviral stem cell cassette. **Stem Cells, (Dayton, Ohio)**, v. 27, n. 3, p. 543–9, mar. 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19096035>>. Acesso em: 7 nov. 2014.

SUWINSKA, A.; CIEMERYCH, M. A. Factors regulating pluripotency and differentiation in early mammalian embryos and embryo-derived stem cells. **Vitamins and Hormones**, v. 87, p. 1–37, jan. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22127235>>. Acesso em: 27 nov. 2014.

SUZUKI, J.; THERRIEN, J.; FILION, F.; LEFEBVRE, R.; GOFF, A. K.; PERECIN, F.; MEIRELLES, F. V.; SMITH, L. C. Loss of methylation at H19 DMD is associated with biallelic expression and reduced development in cattle derived by somatic cell nuclear transfer. **Biology of Reproduction**, v. 84, n. 5, p. 947–56, maio 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21248292>>. Acesso em: 19 dez. 2013.

SZABÓ, P. E.; TANG, S.-H. E.; SILVA, F. J.; TSARK, W. M. K.; MANN, J. R. Role of CTCF binding sites in the Igf2/H19 imprinting control region. **Molecular and Cellular Biology**, v. 24, n. 11, p. 4791–800, jun. 2004. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=416431&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 2 fev. 2016.

TAKAHASHI, K.; TANABE, K.; OHNUKI, M.; NARITA, M.; ICHISAKA, T.; TOMODA, K.; YAMANAKA, S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. **Cell**, v. 131, n. 5, p. 861–72, nov. 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18035408>>. Acesso em: 9 jul. 2014.

TAKAHASHI, K.; YAMANAKA, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. **Cell**, v. 126, n. 4, p. 663–76, ago. 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16904174>>. Acesso em: 9 jul. 2014.

TALBERT, P. B.; HENIKOFF, S. Spreading of silent chromatin: inaction at a distance. **Nature Reviews. Genetics**, v. 7, n. 10, p. 793–803, out. 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16983375>>. Acesso em: 26 jan. 2016.

TONEGAWA, S. Somatic generation of antibody diversity. **Nature**, v. 302, n. 5909, p. 575–581, abr. 1983. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/302575a0>>. Acesso em: 11 maio. 2016.

URDINGUIO, R. G.; SANCHEZ-MUT, J. V.; ESTELLER, M. Epigenetic mechanisms in neurological diseases: genes, syndromes, and therapies. **The Lancet Neurology**, v. 8, n. 11, p.

1056–1072, nov. 2009. Disponível em:

<<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1474442209702625>>. Acesso em: 14 nov. 2016.

WALTER, J.; PAULSEN, M. Imprinting and disease. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 14, n. 1, p. 101–10, fev. 2003. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12524013>>. Acesso em: 27 nov. 2014.

YAMAGUCHI, S.; HIRANO, K.; NAGATA, S.; TADA, T. Sox2 expression effects on direct reprogramming efficiency as determined by alternative somatic cell fate. **Stem Cell Research**, v. 6, n. 2, p. 177–86, mar. 2011. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21130722>>. Acesso em: 2 fev. 2016.

YOUNG, L. E.; SINCLAIR, K. D.; WILMUT, I. Large offspring syndrome in cattle and sheep. **Reviews of Reproduction**, v. 3, n. 3, p. 155–63, set. 1998. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9829550>>. Acesso em: 16 jul. 2014.

ZIMMERMAN, D. L.; BODDY, C. S.; SCHOENHERR, C. S. Oct4/Sox2 binding sites contribute to maintaining hypomethylation of the maternal igf2/h19 imprinting control region. **PloS One**, v. 8, n. 12, p. e81962, jan. 2013. Disponível em:

<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3855764&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 27 nov. 2014.