RAFAEL VILAR SAMPAIO

**Modificações epigenéticas da cromatina e sua relação com a reprogramação
nuclear de bovinos**

PIRASSUNUNGA

2015

RAFAEL VILAR SAMPAIO

**Modificações epigenéticas da cromatina e sua relação com a reprogramação
nuclear de bovinos**

Tese 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 Doutor em Ciências

Departamento:
Cirurgia

Área de concentração:
Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientador:
Prof. Dr. Flávio Vieira Meirelles

Co-orientador:
Prof. Dr. William Allan King

Pirassununga

2015

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.3112
FMVZ

Sampaio, Rafael Vilar
Modificações epigenéticas da cromatina e sua relação com a reprogramação nuclear de
bovinos / Rafael Vilar Sampaio. -- 2015.
114 f. :il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia. Departamento de Cirurgia, Pirassununga, 2015.

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

Orientador: Prof. Dr. Flávio Vieira Meirelles.

Co-orientador: Prof. Dr. William Allan King

1. Reprogramação nuclear. 2. Epigenética. 3. Bovinos. 4. Transferência nuclear de células
somáticas (TNCS). 5. Células tronco pluripotentes induzidas (iPS). I. Título.

ERRATA

SAMPAIO, R. V. **Modificações epigenéticas da cromatina e sua relação com a reprogramação nuclear de bovinos**. 2015. 113 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2015.

Página	Parágrafo	Onde se lê	Leia-se
Ficha catalográfica	3º parágrafo	114 f.	113 f.
RESUMO	1º parágrafo	114 f	113 f.
ABSTRACT	1º parágrafo	114 f	113 f.

PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Modificações epigenéticas da cromatina e sua relação com a reprogramação nuclear de bovinos", protocolado sob o nº9076280114, utilizando amostras de tecido adiposo da região caudal de 3 (três) bovinos, sob a responsabilidade Prof. Dr. Prof. Dr. Flávio Vieira Meirelles, foi aprovado "ad referendum" e está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

São Paulo, 3 de fevereiro de 2015.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, nº87
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
São Paulo/SP – Brasil
05508-270

Fone: + 55 11 3091-7671/7676/0904
Fax: +55 11 3032-2224
E-mail: ceuvet@usp.br
<http://www.fmvz.usp.br>

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: SAMPAIO, Rafael Vilar

Título: Modificações epigenéticas da cromatina e sua relação com a reprogramação nuclear de bovinos

Tese 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 Doutor em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof.Dr.:_____

Instituição:_____ Julgamento:_____

Prof. Dr.:_____

Instituição:_____ Julgamento:_____

Prof. Dr.:_____

Instituição:_____ Julgamento:_____

Prof. Dr.:_____

Instituição:_____ Julgamento:_____

Prof. Dr.:_____

Instituição:_____ Julgamento:_____

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais, que dedicaram suas vidas para que eu tivesse educação.
A eles dedico este trabalho como forma de gratidão por todo apoio
incondicional.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus.

À minha querida família, que sofreu/sofre com a distância durante esses quatro anos, todas as vezes que tive que voltar em busca dos meus objetivos. Ao meu pai, **Weba** (Velho Weba), por todas as conversas e conselhos, me passou o dom da curiosidade. À minha querida mãe, D. **Lene**, pela criação e todos os ensinamentos, exemplo de ser humano. À minha irmã **Rafaella** (Lela), por todo seu amor, à minha irmã **Raíssa**, por levar alegria onde vai e à minha irmã **Milena**, exemplo de coragem.

À minha companheira, **Carol**; meu esteio, minha paz e meu ponto de equilíbrio. Muito obrigado pelo amor, companheirismo e dedicação. Só tenho a agradecer a você. Agradeço à sua família, que já considero como minha. Ao **Jucélio**, à **Paula**, à vó **Elzira** e à **Liliquinha**.

Aos meus irmãos paulistas. Ao **Juliano** (Manfreda), que me adotou como irmão desde o primeiro dia em SP, sempre disposto a ajudar, com um coração maior que o mundo. Obrigado pelas eternas discussões sobre epigenética e sobre a vida. Ao **Rodrigo** (Barretinho), sempre disposto a tudo, do trabalho à festa. Obrigado por todo o companheirismo. Sentirei falta dos cafés aos domingos e por fazerem a minha vida mais fácil.

Ao prof. **Flávio Meirelles**, pela oportunidade e pela confiança em meu trabalho.

Ao prof. **Allan King**, por ter me acolhido tão bem em seu laboratório.

Ao prof. **Lawrence Smith**, por toda solicitude em discutir e ajudar.

Ao meu casal preferido, **Fernanda** (Fer) e **Marquinhos** e claro à **Gragra**. Obrigado por todos os finais de semanas cheios de conversas, e as calorias extras do Nhoque.

À **Lilian**, por todo o apoio e por sempre acreditar em seus meninos. Sem seu incentivo esse projeto não teria saído.

À **Fabiana**, por toda a paciência em ensinar e a disposição em ajudar quando sempre precisei. Esse trabalho também é seu.

Ao **Felipe** Perecin, por toda ajuda e explicações nos momentos de desespero.

Ao **Ildercílio**, por toda ajuda e paciência nas análises infinitas e ao **Dr. Rodrigo Panepucci**, por abrir as portas de seu laboratório.

Ao **Léo**, por sempre dar um jeitinho de nos ajudar e nunca nos deixar na mão, mesmo nos dias frios e com chuva. Por sua amizade também!

Ao **Juliano** (Tchê), pela amizade e pelas discussões sobre ciência pelos corredores do laboratório. À **Lele** e à **Holly**.

À **Maite**, por toda ajuda neste trabalho e amizade.

A todos os meus AMIGOS e companheiros de trabalho do LMMD, **Ramon, Pedrinho, Laís (à Lola), Gabi, Paulinho, Gabriel, Mateus, Heidge, Aline, Naira, Aninha, Vanessa, Celina Atanásio, Natália, Mari, Pedro, Curió, Nina, Yonara, Camila, Pamela, Léo, Fer, Hugo, Carol, aos Thiagos, Públio, Tati não só por toda o suporte, mas também por todos os churrascos.**

Aos meus amigos do Laboratório de FIV, **Thiago** (Player), **Moysés, Nathália, André** (Mohamed), **Daví, Marcela**, Profª. **Simone** (mãe) e ao Prof. **Ohashi**.

Aos meus irmãos **Luiggi, Jean, Willy, Marlon, Nikolas**. Obrigado pela amizade de uma vida inteira.

À FAPESP (processo nº 2013/07160-3) por todo suporte para a execução deste trabalho.

À Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, ao Hemocentro de Ribeirão Preto, o CNPq e à CAPES.

EPÍGRAFE

“Seu trabalho vai preencher uma parte grande da sua vida, e a única maneira de ficar realmente satisfeito é fazer o que você acredita ser um ótimo trabalho. E a única maneira de fazer um excelente trabalho é amar o que você faz.”

Steve Jobs

*“Oh, I get by with a little help from my friends
I get high with a little help from my friends
Gonna try with a little help from my friends”*

John Lennon / Paul McCartney

RESUMO

SAMPAIO, R. V. **Modificações epigenéticas da cromatina e sua relação com a reprogramação nuclear de bovinos.** [Epigenetic modifications of chromatin and their relation with the nuclear reprogramming of bovine]. 2015. 114 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

A reprogramação nuclear de uma célula somática a um estado embrionário tem diversas aplicações, como pesquisas básicas na biologia do desenvolvimento, terapia celular, melhoramento genético em animais de produção e conservação de espécies. As principais técnicas utilizadas para a reprogramação nuclear são a transferência nuclear de células somáticas (TNCS) e a geração de células tronco pluripotente induzidas (iPS). Muitos trabalhos têm mostrado uma baixa eficiência no processo de reprogramação nuclear nas duas técnicas, além disso, modificações epigenéticas tem sido apontada como a principal barreira para uma reprogramação nuclear eficiente. Por esse motivo, medidas como a utilização de células menos diferenciadas e/ou alteração do perfil epigenético das células somáticas podem aumentar a eficiência destas técnicas. Por isso, o objetivo deste trabalho foi investigar a influência de marcas epigenéticas em células bovinas utilizadas na reprogramação nuclear mediada por TNCS ou superexpressão de genes relacionados a pluripotência (iPS). Para isso, utilizamos 3 abordagens. Primeiro, analisamos marcações epigenéticas relacionadas ao desenvolvimento embrionário e pluripotência (H3K9me2, H3K9me3, H3K9ac, 5mC e 5hmC) em diferentes tipos celulares, analisamos a expressão gênica de genes responsáveis por essas marcações em células de diferentes tecidos (ex. células tronco mesenquimais (MSC) e fibroblastos) e as utilizamos como doadoras de núcleo na TNCS. Na segunda e a terceira abordagem, utilizamos células com menores níveis de H3K9me2 para a geração de iPS e na TNCS, respectivamente. Além disso, por se mostrar eficiente na TNCS, analisamos o efeito da sincronização do ciclo celular por privação de soro fetal bovino (SFB) na geração de células iPS. Com o intuito de diminuir os níveis de H3K9me2, as células foram tratadas com UNC0638, um inibidor específico das metiltransferases de histona *G9a/GLP*. Nossos resultados do primeiro experimento mostraram que as MSC podem ser utilizadas como doadoras de núcleo na TNCS, no entanto, mesmo com algumas diferenças na expressão gênica em relação aos fibroblastos, a produção de blastocistos não foi diferente entre as duas células. No segundo experimento, as células privadas de SFB geraram mais colônias que as células controle, enquanto que as células tratadas não apresentaram diferença. Por último, as

células tratadas com o UNC0638 apresentaram um menor nível de metilação no DNA em zigotos em relação às células controle. Os resultados encontrados neste trabalho podem contribuir para o melhor entendimento dos mecanismos epigenéticos envolvidos na reprogramação nuclear de bovinos.

Palavras-chave: Reprogramação nuclear. Epigenética. Bovinos. Transferência nuclear de células somáticas (TNCS). Células tronco pluripotentes induzidas (iPS).

ABSTRACT

SAMPAIO, R. V. **Epigenetic modifications of chromatin and their relation with the nuclear reprogramming of bovine.** [Modificações epigenéticas da cromatina e sua relação com a reprogramação nuclear de bovinos]. 2015. 114 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Nuclear reprogramming of somatic cells to embryonic state has several applications, such as basic research on developmental biology, cell therapy, genetic improvement in livestock animals and preservation of endangered species. The principal techniques utilized to achieve nuclear reprogramming are Somatic Cell Nuclear Transfer (SCNT) and induced pluripotency. Several works has reported low efficiency rates of nuclear reprogramming when these techniques are used to reprogram somatic cells. Moreover, epigenetic modifications acquired during development act as epigenetic barrier to the complete reprogramming process. For this reason, strategies such as use of less differentiated cells and/or modification of epigenetic profile of somatic cells might increase the efficiency these techniques. The objective of this work was investigate the influence of epigenetic marks in bovine cells utilized on nuclear reprogramming experiments mediated by SCNT or induced pluripotency. To investigate it, we used three approaches. First, we analyzed the epigenetic marks related to the embryonic development and pluripotency (e.g H3K9me2, H3K9me3, H3K9ac, 5mC and 5hmC), gene expression of genes involved in these epigenetic marks in different tissues (i.e. mesenchymal stem cells (MSC) and fibroblasts) and their use as nuclear donor cells on SCNT procedure. Regarding the second and the third approach, we utilized cells with reduced levels of H3K9me2 to generate iPS cells and cloned embryos, respectively. Furthermore, since serum starvation has been demonstrated increase SCNT developmental rates, we assessed the effect of cell cycle synchronization mediated by serum starvation on nuclear reprogramming using iPS cells. Aiming decrease the levels of H3K9me2, cells were treated with UNC0638, a chemical probe that works as a specific inhibitor of the histone methyltransferases G9a and its counterpart GLP. Our results showed that MSC are suitable to be used as nuclear donors on SCNT procedures, however, in spite of differences on gene expression comparing with fibroblasts, the embryonic developmental rates were not improved. On the second experiment, cells privated of fetal calf serum produced more iPS cells colonies than control cells, whereas cells treated with UNC did not show differences when compared with untreated cells. Lastly, UNC treated donor cells treated produced cloned zygotes with lower levels of

DNA methylation compared to zygotes derivated from untreated cells. The results presented here will contribute to the better understanding of the epigenetic mechanisms involved on bovine nuclear reprogramming.

Key-words: Nuclear reprogramming. Epigenetic. Bovines. somatic cell nuclear transfer. induced pluripotent stem cells.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Processo de oxidação da 5mC para 5hmC.....	27
Figura 2 -	Distribuição da 5hmC nos diferentes tipos celulares.....	28
Figura 3 -	Dinâmica do processo de metilação no desenvolvimento embrionário e em clones.	30
Figura 4 -	Desenho esquemático ilustrando os experimentos realizados no capítulo 3	40
Figura 5 -	Fotomicrografia das células isoladas	47
Figura 6 -	Expressão relativa de DNMT3, relacionado à metilação do DNA.....	48
Figura 7 -	Expressão relativa de KDM3A, relacionado à desmetilação de histonas.....	48
Figura 8 -	Desenho esquemático ilustrando os experimentos realizados no capítulo 4	55
Figura 9 -	Desenho esquemático ilustrando a divisão dos grupos de acordo com o período de tratamento.	55
Figura 10 -	Núcleo de células marcadas com anticorpo anti-H3K9me2.....	63
Figura 11 -	Expressão relativa de DNMT1, relacionado à metilação do DNA.....	64
Figura 12 -	Expressão relativa de KDM4C, relacionado à desmetilação de histonas trimetiladas.	64
Figura 13 -	Imagem ilustrativa dos níveis de H3K9me2 nos diferentes grupos de tratamento	65
Figura 14 -	Níveis de 5mC analisados por High Content Screening.....	66
Figura 15 -	Estruturas formadas 21 dias após a transdução.	67
Figura 16 -	Quantificação das estruturas formadas após 21 dias de cultivo.	67
Figura 17 -	Detecção da atividade de fosfatase alcalina em colônias na nona passagem (P9).	68
Figura 18 -	Desenho esquemático ilustrando os experimentos realizados no capítulo 5.	74
Figura 19 -	Imagens ilustrativas mostrando a diferenças entre intensidade de fluorescência dos diferentes grupos analisados.	78
Figura 20-	Intensidade relativa dos zigotos referentes aos níveis de metilação (5mC) e hidroxilação do DNA (5hmC).	79
Figura 21 -	Intensidade relativa dos zigotos referentes aos níveis de metilação (5mC).	80
Figura 22 -	Imagens ilustrativas mostrando os níveis de 5hmC e 5mC em blastocistos de diferentes origens.....	81
Figura 23 -	Razão entre os níveis de 5hmC e 5mC dos diferentes grupos de embriões	82
Quadro 1–	Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores usados nos experimentos de PCR em tempo Real (q-PCR)	43
Quadro 2 -	Divisão dos grupos de acordo com o tratamento	56

Quadro 3 - Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores usados nos experimentos de PCR em tempo Real (q-PCR).....	59
--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Resultados das TNCS com diferentes doadores de núcleo, células tronco mesenquimais (MSC) e Fibroblastos	49
Tabela 2 - Taxas de desenvolvimento embrionário dos grupos CTL e UNC.	78

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	HIPÓTESES.....	20
3	OBJETIVOS.....	21
3.1	OBJETIVOS geral	21
3.2	Objetivos específicos	21
4	REVISÃO DE LITERATURA.....	23
4.1	Epigenética	23
4.2	Modificações de histonas	24
4.3	Metilação e hidroxilação do DNA	25
5.1	Reprogramação Nuclear	29
5.1.1	Transferência Nuclear de Células Somáticas (TNCS)	29
5.1.2	Células menos diferenciadas como doadoras de núcleo.....	31
5.1.3	Células Tronco Induzidas (iPS)	32
5.2	Reprogramação Epigenética.....	34
5.3	Uso da UNC0638 como agente desmetilador.....	36
6	ANÁLISE EPIGENÉTICA DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS BOVINA E APLICAÇÃO NA TRANSFERÊNCIA NUCLEAR	38
6.1	Delinamento Experimental.....	39
6.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	40
6.2.1	Isolamento e Caracterização das MSC.....	40
6.2.2	Análise da expressão gênica	41
6.2.3	Quantificação da imunofluorescência por High Content Screening (HCS)	42
6.2.4	Transferência nuclear de células somáticas	44
6.2.4.1	Obtenção dos ovários	45
6.2.4.2	Recuperação oocitária e maturação in vitro (MIV).....	45
6.2.4.3	Produção de Embriões Por Transferência Nuclear	45
6.2.4.4	Cultivo Embrionário In Vitro	46
6.3	RESULTADOS.....	47

6.3.1	Isolamento das MSCs e fibroblastos.....	47
6.3.2	Expressão dos genes relacionados às marcas epigenéticas.....	47
6.3.3	MSCs e fibroblastos como doadores de núcleo na TNCS	49
6.4	DISCUSSÃO E CONCLUSÕES PARCIAIS	49
7	INIBIÇÃO DA G9A/GLP E SINCRONIZAÇÃO CELULAR NA GERAÇÃO DE IPS BOVINAS	53
7.1	Delinamento Experimental.....	54
7.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	56
7.2.1	Obtenção e cultivo celular	56
7.2.2	Tratamento com UNC0638 e caracterização das células tratadas	57
7.2.2.1	Imunofluorescência para detecção de H3K9me2	57
7.2.2.2	Análise da expressão gênica	58
7.2.2.3	Western blotting.....	58
7.2.2.4	Quantificação da imunofluorescência – High ContentScreening (HCS).....	59
7.3	Produção Células iPS Bovinas Através dos Fatores de Transcrição Relacionados à Pluripotência	60
7.3.1	Vetores	61
7.3.2	Produção de fibroblastos embrionários murinos para a utilização de monocamadas celulares de suporte.....	61
7.3.3	Produção de partículas lentivirais.....	61
7.3.4	Transdução celular.....	62
7.3.5	Detecção da Expressão da fosfatase alcalina	62
7.4	RESULTADOS.....	63
7.4.1	Detecção de H3K9me2 por imunofluorescência	63
7.4.2	Análise da expressão de genes relacionados às modificações epigenéticas	63
7.4.3	Análise por Western Blotting de H3K9me2	65
7.4.4	Quantificação de marcas epigenéticas por HCS	65
7.4.5	Produção de Células Pluripotentes Induzidas (iPS)	66
7.4.6	Detecção da Expressão da fosfatase alcalina nas colônias obtidas	68
7.5	DISCUSSÃO E CONCLUSÕES PARCIAIS	69
8	ESTUDO DA INTERAÇÃO ENTRE OS NÍVEIS DE H3K9ME2 DA CÉLULA DOADORA DE NÚCLEO SOBRE NÍVEIS DE 5MC E 5HMC DE EMBRIÕES CLONADOS	72
8.1	Delineamento Experimental.....	73

8.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	74
8.2.1	Cultivo celular.....	74
8.2.2	Transferência Nuclear de Células Somáticas.....	75
8.2.3	Fecundação in vitro.....	75
8.2.3.1	Processamento do sêmen e fecundação in vitro.....	75
8.2.3.2	Cultivo in vitro de embriões.....	76
8.2.3.3	Imunofluorescência para detecção de 5mC e 5hmC.....	76
8.3	RESULTADOS.....	77
8.3.1	Transferência Nuclear de Células com diferentes níveis de H3K9me2.....	77
8.3.2	Análise dos níveis de 5mC e 5hmC por imunofluorescência.....	78
8.4	DISCUSSÃO E CONCLUSÕES PARCIAIS.....	82
9	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	88
	REFERENCIAS.....	89

CAPÍTULO: INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A mudança de uma célula somática diferenciada para um estado pluripotente indiferenciado é conhecida como reprogramação nuclear. Esse processo pode ser obtido por três abordagens diferentes: através da fusão de uma célula somática com uma célula pluripotente, pela transferência de um núcleo somático para um óocito enucleado ou através da expressão ectópica de genes relacionados à pluripotência. As duas últimas abordagens têm sido mais exploradas atualmente (WILMUT et al., 1997; COWAN et al., 2005; TAKAHASHI; YAMANAKA, 2006).

Diversas são as aplicações dessas técnicas, como a terapia celular, modelos específicos para o estudo de doenças, produção de fármacos, melhoramento genético, preservação de espécies, entre outras (ZHAO et al., 2013).

Contudo, a eficiência dessas metodologias, de modo geral, permanece baixa. Tanto a transferência nuclear de células somáticas (TNCS) quanto a geração de células pluripotentes induzidas (iPS) são marcadas por eventos estocásticos em sua reprogramação (HANNA et al., 2009). A memória epigenética remanescente é apontada como a principal barreira para que ocorra uma reprogramação eficiente.

Diversas estratégias têm sido sugeridas para contornar esses obstáculos, como por exemplo a utilização de células menos diferenciadas como doadoras de núcleo (KATO et al., 2004), a utilização de drogas modificadoras de cromatina (HUANGFU et al., 2008b), a suplementação com vitaminas (ESTEBAN et al., 2010) etc.

O processo de reprogramação nuclear envolve diversos eventos, como a combinação de fatores de transcrição e a reconfiguração epigenética, que ocorre através de metilações no DNA, modificações de histonas e regulação por microRNAs, entre outras (WANG; WARREN; JIN, 2013).

Entretanto, a maioria dos mecanismos epigenéticos são descritos em camundongos. Diante disso, estudos para o entendimento de mecanismos básicos envolvidos na reprogramação nuclear de bovinos são de extrema importância.

Assim sendo, este trabalho tem como objetivo avaliar as características epigenéticas como a metilação do DNA e modificações de histonas de diferentes tipos celulares e testar sua utilização na TNCS. Terá como objetivo também, investigar o efeito da diminuição do nível de H3K9me2 de células submetidas ao processo de reprogramação nuclear tanto por TNCS quanto por geração de iPS.

2 HIPÓTESES

1. Células tronco mesenquimais são mais facilmente reprogramáveis que fibroblastos.
2. A eficiência da TNCS está relacionada aos níveis das modificações epigenéticas presentes durante o desenvolvimento: H3K9me2, H3k9me3, H3K9ac, 5hmC e 5mC.
3. Células bovinas com menores níveis de H3K9me2, possuem menor barreira epigenética e são mais facilmente reprogramáveis.
4. A sincronização do ciclo celular de células bovinas submetidas ao processo de geração de iPS facilita a reprogramação nuclear.
5. Células com um menor nível de H3K9me2 são mais facilmente desmetiladas durante o desenvolvimento embrionário devido a menor proteção da cromatina no processo de hidroxilação do DNA.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS GERAL

Utilizar células com diferentes características epigenéticas, seja por origem celular ou por indução, para estudar os mecanismos envolvidos reprogramação nuclear de bovinos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Analisar características epigenéticas de células tronco mesenquimais do tecido adiposo e utilizá-las como doadoras de núcleo na transferência nuclear.
2. Utilizar células com menor nível de H3K9me2 na geração de células tronco pluripotentes induzidas.
3. Utilizar células com menor nível de H3K9me2 como doadoras de núcleo na transferência nuclear.

CAPÍTULO: REVISÃO DE LITERATURA

4 REVISÃO DE LITERATURA

4.1 EPIGENÉTICA

Epigenética pode ser definida como uma adaptação estrutural de regiões cromossômicas a fim de registrar, sinalizar ou perpetuar estados de atividades alteradas (BIRD, 2007). Em outras palavras, o material genético pode se manifestar de forma diferente em cada tipo celular, isso só é possível porque em cada tipo celular são ativos diferentes genes, um vez que durante o desenvolvimento celular as células ‘desligam’ os genes desnecessários em sua especialização (LAW; JACOBSEN, 2010).

Durante a diferenciação celular, o genoma somático adquire modificações altamente especializadas no DNA e nas proteínas a ele associadas, sendo que tais modificações, chamadas de epigenéticas, são responsáveis pelo padrão espaço-temporal dos genes de uma determinada célula, constituinte de um tecido específico (FRANCASTEL et al., 2000; MÜLLER; LEUTZ, 2001). Essas mudanças incluem o aparecimento da metilação do DNA, modificações de histonas e outras modificações inativas da cromatina.

Os avanços no campo da epigenética tornaram possível o entendimento das diversas formas de controle gênico. Além de genes, mecanismos epigenéticos podem controlar a expressão alélica parental e a inativação cromossômica (inativação do cromossomo X), por exemplo. Os eventos da epigenética podem ser agrupados em quatro categorias principais: A metilação do DNA (adição de um radical metil à uma base nitrogenada), modificações nas proteínas histonas (proteínas que empacotam o DNA), posicionamento nucleossômico, estruturas DNA-proteínas que dependendo do seu posicionamento permitem ou não a ligação de agentes transcricionais (polimerases) no DNA e RNA não codificadores (COSTA, 2008; PORTELA; ESTELLER, 2010).

Cromatina é o complexo formado entre o DNA e proteínas específicas dentro do núcleo de eucariotos. O nucleossomo é a unidade fundamental da cromatina, ele é composto por um octâmero de quatro histonas, sendo duas cópias de cada uma (H2A, H2B, H3 e H4) (KOUZARIDES, 2002). Modificações nos resíduos chaves dessas histonas, criam configurações únicas em todos genes de cópias simples levando a ideia que, sobreposto ao código genético, está uma marcação epigenética representada por um ‘código de histona’ (JENUWEIN; ALLIS, 2001).

4.2 MODIFICAÇÕES DE HISTONAS

Existem, pelo menos, oito tipos distintos de modificações de histonas conhecidas, são elas: a acetilação, metilação, fosforilação, ubiquitinação, sumoilação, ribosilação de ADP, deiminação e isomerização de prolina (KOUZARIDES, 2002). Essas modificações estão envolvidas em atividades como transcrição, replicação, condensação e reparo de DNA.

Dentre essas modificações de histonas, uma das mais interessantes marcas epigenéticas a se considerar é a metilação e acetilação da histona H3 lisina 9 (H3-K9) (STRAHL; ALLIS, 2000). Essas modificações são fortemente associadas com as configurações da cromatina inativa (heterocromatina constitutiva) e ativa (eucromatina e heterocromatina facultativa) (RICE; ALLIS, 2001; KOUZARIDES, 2002). Além disso, ligação entre a metilação do DNA e da H3K9 tem sido estabelecida em outros organismos e em mamíferos (SANTOS et al., 2003).

As enzimas responsáveis por essa metilação e desmetilação da H3K9, são chamadas de metiltransferases de lisina ((KMTs) do inglês *lysine methyltransferases*) e desmetilases de lisina ((KDMs) do inglês *lysine demethylases*). A interação destas enzimas com as DNMTs, enzimas responsáveis pela metilação do DNA, é fundamental para o desenvolvimento embrionário (GEIMAN; ROBERTSON, 2002).

As KMTs possuem um alto nível de especificidade pela lisina e pelo substrato, bem como pelo nível de metilação. A SUV39H1/2 (também conhecida KMT1A/B), por exemplo, trimetila a lisina 9 da histona 3 a partir de um estado monometilado, enquanto a G9a e a GLP (também conhecidas como KMT1C e KMT1D, respectivamente) dimetilam a H3K9 (PETERS et al., 2001; TACHIBANA et al., 2002; SHINKAI; TACHIBANA, 2011; BLACK; VAN RECHEM; WHETSTINE, 2012). A primeira KDM descoberta foi a LSD1 (agora chamada de KDM1). Ela possui um domínio SWIRM, que tem sido encontrado em proteínas associadas a cromatina e a um domínio C terminal longo, com homologia significativa da sequência com oxidases amino dependentes de FAD (dinucleotídeo de flavina e adenina). Essas, por sua vez, desmetilam H3K4me2 e H3K4me1, modulando assim a expressão gênica (SHI; WHETSTINE, 2007; BLACK; VAN RECHEM; WHETSTINE, 2012).

Em seguida foram descobertas as famílias de KDMs que possuem um domínio JmjC (Jumonji C), que são proteínas que dependem de α -cetoglutarato, oxigênio molecular e Fe(II) como cofatores para desmetilação. Essas novas famílias também possuem especificidades no processo de desmetilação, por exemplo, as famílias de KDMs KDM2 (também conhecidas

como JHDM1) e KDM3 (JMJD1) são responsáveis por desmetilação de lisinas bimetiladas, enquanto que a família KDM4 (JMJD2) desmetilam as trimetiladas (SHI; WHETSTINE, 2007; BLACK; VAN RECHEM; WHETSTINE, 2012).

4.3 METILAÇÃO E HIDROXILAÇÃO DO DNA

Dentre os mecanismos epigenéticos, talvez o mais estudado seja a metilação do DNA, pois constitui uma das mais estáveis modificações e é a principal candidata a coordenar a herança epigenética entre as gerações (NG; GURDON, 2005; TCHURIKOV, 2005). O padrão de metilação do DNA é parte crucial na informação epigenética e é um marcador crítico para a distinção celular.

Devido sua importância e o envolvimento com diferentes funções biológicas a formação do nucleosídeo 5-metildeoxicitidina (5mC) é frequentemente considerada a quinta base do genoma (LISTER; ECKER, 2009).

A metilação do DNA consiste na adição covalente de um grupo metil para a posição 5 da base citosina, localizada na região promotora de um gene pelas enzimas metiltransferases (DNMT) (GEIMAN; ROBERTSON, 2002). As enzimas responsáveis pela transferência de um radical metil (CH₃) à citosina, são chamadas DNA metiltransferases (DNMTs).

Em mamíferos, essas enzimas podem ser agrupadas de acordo com a preferência por determinado substrato de DNA. As DNMT3a e DNMT3b são responsáveis pela metilação de fitas de DNA previamente desmetiladas, elas atuam no processo conhecido como *de novo* metilação. A DNMT3L não possui atividade enzimática, ela atua auxiliando as *de novo* metiltransferases na ligação do grupo doador de radical metil, S-adenosil-L-metionina, e estimula a atividade *in vivo* (KARETA et al., 2006). Por outro lado, a DNMT1 é responsável por manter o padrão de metilação durante a replicação, de forma que sua atividade de metilação da nova fita depende de uma marcação preexistente (KLOSE; BIRD, 2006). A DNMT2, entretanto, é uma metiltransferases homóloga que tem sido relacionada ao processo de metilação de RNA (GOLL et al., 2006).

Uma característica que torna a metilação do DNA um grande alvo de estudos é sua relação com alguns tipos de câncer. A relação com esta doença gera um grande interesse para um melhor entendimento desse mecanismo (BAYLIN, 2005). A relação entre a metilação de DNA e o câncer é complexa e o mecanismo envolvido é ambíguo, pois tanto a hipermetilação, excesso de metilação em uma região específica (nesse caso em genes supressores de tumor,

quanto a hipometilação, menor quantidade (mais especificamente em oncogenes), estão relacionadas ao surgimento de células tumorais (KIM et al., 2010).

Além de doença, a metilação do DNA é uma das modificações mais importante que ocorre no genoma. Após a fertilização e a certos pontos do desenvolvimento embrionário, um grande número de metilação é apagada (MEISSNER, 2010). Como consequência disso, as células tronco embrionárias podem se especializar em qualquer tipo celular. Em certos casos essa ampla desmetilação genômica pode ocorrer sem divisão celular e sem síntese de uma nova fita de DNA, entretanto, o grupo metil deve ser removido ativamente por algumas enzimas até pouco tempo desconhecidas. O mecanismo envolvido na desmetilação ativa é de muito interesse, pois se especula que algumas células possam ativar a desmetilação de seu material genético em função de uma rediferenciação (WU; ZHANG, 2010).

Mesmo ocorrendo essa onda de desmetilação global, diversos genes permanecem metilados. Uma dessas classes são chamados genes ‘imprinted’. O processo de imprinting genômico consiste na regulação parental, enquanto um alelo parental é reprimido o outro é expresso (SURANI, 1998; REIK; WALTER, 2001). Outra importante manutenção da metilação ocorre em relação aos elementos transponíveis, mesmo que sua significância biológica não esteja clara, algumas mutações são atribuídas a desmetilação desses elementos (BIRD, 2002).

Recentemente, a busca pelo processo de desmetilação ativa foi levada em uma nova direção. Em 2009, dois trabalhos distintos mostraram que o genoma mamífero contém não somente 5-metilcitosina como também 5-hidroximetilcitosina (5hmc), agora considerada a sexta base do genoma de organismos superiores (KRIAUCIONIS; HEINTZ, 2009; TAHILIANI et al., 2009).

Embora a discussão sobre essa forma oxidada da 5-metilcitosina seja recente, ela foi primeiro relatada na década de 50, por Wyatt e Cohen. Neste trabalho eles descreveram como uma nova base pirimídica de bacteriófagos (WYATT; COHEN, 1953). Já em mamíferos, a 5hmc foi primeiramente descrita em 1972 por Penn e colaboradores. Os autores mostraram que essa base modificada constitui cerca de 15% de toda a citosina do DNA extraído do cérebro de ratos, camundongos e sapos (PENN et al., 1972). No entanto, estes achados não foram reproduzidos (KOTHARI; SHANKAR, 1976) e somente em 2009 estudos envolvendo a 5hmc votaram a ser discutidos (KRIAUCIONIS; HEINTZ, 2009; TAHILIANI et al., 2009).

Esses trabalhos recentes sobre a sexta base sugerem que os mecanismos responsáveis pela oxidação de 5mc em 5hmc podem oferecer uma pista para a compreensão dos processos de controle epigenético (WALTER, 2011). A família das proteínas TET1, TET2 e TET3, que

são dioxigenases 2-oxoglutarato (2OG)- e Fe (II) dependentes, oxidam 5-metilcitosina em 5-hidroximetilcitosina no DNA (

Figura 1) (GLOBISCH et al., 2010; KO et al., 2010; SZWAGIERCZAK et al., 2010).

Figura 1 - Processo de oxidação da 5mC para 5hmC

Fonte: SAMPAIO, R. V., 2015

Legenda: Conversão da 5-metilcitosina em 5-hidroximetilcitosina por oxidação das enzimas TET.

Dahl et al. (2010) descreveram de forma sucinta em sua revisão como a 5-hmC pode influenciar a transcrição gênica, tanto a curto quanto a longo período, o que provavelmente terá um significado biológico in vivo. Esses mecanismos podem ocorrer das seguintes maneiras:

1- De forma passiva: A 5-hmC não é reconhecida pela DNMT, por isso, durante a replicação do DNA não ocorre a manutenção da metilação, resultando em uma desmetilação passiva do DNA.

2- De forma ativa: Algumas proteínas de reparo reconhecem a 5hmC, por exemplo a DNA Glicosilase 5hmC-específica (5hmC-DG), que pode converter 5hmC em citosina, levando a uma demetilação ativa do DNA.

3- Além de estar envolvida no processo de desmetilação do DNA, a 5hmC também pode influenciar a atividade transcricional de determinados genes através de modificação de histonas. Proteínas de Ligação Metil-CpG (MDB) que recrutam as Histonas Desacetilases de histonas (HDAC) não reconhecem a 5hmC, permitindo assim que a cromatina permaneça transcricionalmente ativa (DAHL; GRØNBÆK; GULDBERG, 2011).

Na tentativa de entender o papel da 5hmC, muitas técnicas têm sido desenvolvidas para permitir a quantificação em diferentes tecidos. A existência de três enzimas TET em mamíferos levanta possibilidade de que cada uma tenha um papel distinto nos alvos genômicos, tal qual sua expressão tecido-específico possa ter efeitos fisiológicos específicos (BRANCO; FICZ; REIK, 2012). Interessantemente, em células tronco embrionárias (CTE), TET1 é a enzima TET primária e sua repressão leva a uma diferenciação em corpos

embriões correlacionados com uma redução nos níveis de 5hmC (TAHILIANI et al., 2009). Além disso, altos níveis de expressão de *Tet1* são também detectadas em células germinativas primordiais (PGCs) (HAJKOVA et al., 2010), sugerindo que *Tet1* é associada a um estado pluripotente.

A expressão de *Tet3* é muito maior em oócitos e zigotos, onde o nível de 5hmC aumenta drasticamente após a fecundação no pronúcleo masculino (GU et al., 2011; IQBAL et al., 2011; WOSSIDLO et al., 2011). Em tecidos adultos, os níveis de 5mC são relativamente constantes (4-5% de todas as citosinas), enquanto que os níveis de 5hmC variam entre <0.1% e ~0.7% e são muito altos em tecidos do sistema nervoso central (GLOBISCH et al., 2010). Células tronco embrionárias apresentam em torno de ~ 0.4% de 5hmC (TAHILIANI et al., 2009).

Em camundongos, Ruzov et al. (2011) mostraram que diferente da 5mC, a 5hmC genômica é significativamente enriquecida em contextos embrionários, células multipotentes e em neurônios. Os pesquisadores sugerem que 5hmC é a primeira modificação epigenética que sua distribuição possui um enriquecimento específico de acordo com o tipo celular (

Figura 2).

Figura 2 - Distribuição da 5hmC nos diferentes tipos celulares

Fonte: Retirado e adaptado de Ruzov et al. (2011).

Legenda: Um resumo gráfico ilustrando a distribuição de 5-hidroximetilcitosina no desenvolvimento de mamíferos. Em destaque os tipos celulares com maiores níveis.

5.1 REPROGRAMAÇÃO NUCLEAR

5.1.1 Transferência Nuclear de Células Somáticas (TNCS)

A clonagem animal, também conhecida como transferência nuclear de células somáticas, consiste na injeção de uma célula (de origem embrionária, fetal ou adulta) no interior de um oócito maduro cujo DNA genômico foi previamente removido (WILMUT et al., 1997).

Embora a pesquisa com clonagem seja recente, o primeiro experimento considerado como a primeira clonagem de um vertebrado, induziu a formação de salamandra “gêmeas”, foi publicado em 1928, pelo embriologista alemão Hans Spemann. Esse experimento motivou o desenvolvimento da técnica de transferência de núcleo em anfíbios pelos pesquisadores Briggs e Kings (1952), que transferiram núcleos indiferenciados para ovos enucleados. Posteriormente, utilizando a mesma técnica, Sir John Gurdon (1962) transferiu células intestinais, neste caso mais diferenciadas, para ovos enucleados. Experimento que lhe renderia o Nobel em 2012 (LENSCH; MUMMERY, 2013).

Todos esses trabalhos pioneiros deram suporte para o entendimento da biologia do desenvolvimento. Contudo, somente em 1997 foi anunciada clonagem do primeiro mamífero adulto, a ovelha Dolly (WILMUT et al., 1997).

O nascimento de animais provenientes de TNCS demonstrou que o estado epigenético das células somáticas, incluindo aquelas terminalmente diferenciadas, apesar de estável, não é irreversível e pode ser reprogramado para um estado embrionário capaz de comandar o desenvolvimento de um novo organismo (JAENISCH; YOUNG, 2008).

Recentemente Mitalipov e colaboradores mostraram ser possível a derivação de células tronco embrionárias humanas a partir de embriões clonados. Essa abordagem abre novas perspectivas em relação clonagem terapêutica, pois torna possível a terapia celular autóloga de células pluripotentes verdadeiras (TACHIBANA et al., 2013).

Simonsson e Gurdon, em 2004, demonstraram que a desmetilação do DNA é necessária para a reprogramação epigenética do núcleo da célula somática (SIMONSSON; GURDON, 2004). Embora o núcleo da célula doadora seja parcialmente desmetilado, após transferência para um oócito enucleado, a desmetilação posterior não ocorre de maneira

completa; enquanto que os eventos da *de novo* metilação ocorrem precocemente em grande proporção dos embriões clonados (REIK; DEAN; WALTER, 2001) (

Figura 3). De maneira semelhante, alterações nos padrões de modificações pós-traducionais, principalmente a metilação das proteínas histonas, já foram descritos em embriões e animais clonados e são associadas ao padrão de metilação do DNA desses embriões (SANTOS et al., 2003).

Figura 3 - Dinâmica do processo de metilação no desenvolvimento embrionário e em clones

Fonte: Retirado e adaptado de Yang et al. (2011).

Legenda: (a)- Nas vesículas germinativas de camundongos os níveis de metilação aumentam de acordo com o crescimento oocitário. Após a fecundação ocorre a desmetilação passiva no pronúcleo feminino e ativa no masculino. No estágio de blastocisto ocorre a *de novo* metilação, com diferentes níveis de metilação na Massa Celular Interna (ICM) e no Trofotoderma (TE). Em clones algumas demetilações ocorrem entre a TNCS e a *de novo* metilação, além de uma metilação aberrante (hipermetilação) do TE. (b)- Em bovinos o processo de desmetilação passiva seguido da *de novo* metilação ocorre no estágio de 8 a 16 células. Em embriões clonados a *de novo* metilação ocorre de forma precoce no estágio de quatro células e o TE é hipermetilado.

Como revisado por Golbabapour, em 2011, uma das razões para essas anormalidades é a falha na reprogramação/remodelamento de células diferenciadas para um estágio que vai evoluir em neonato normal. Em outras palavras, células diferenciadas são envolvidas em programas que renovam sua totipotência para garantir a clonagem e a produção de uma prole saudável. Esses programas são modificações epigenéticas que ocorrem no núcleo das células doadoras para, eventualmente, torná-los similar a um embrião normal. Contudo, os mecanismos epigenéticos que são responsáveis pela transformação de uma célula somática

diferenciada para um estado pluripotente permanecem desconhecidos. Por isso, o estudo da clonagem se mostra como uma excelente via para o entendimento de mecanismos epigenéticos, diferenciação e reprogramação (GOLBABAPOUR; ABDULLA; HAJREZAEI, 2011).

Recentemente dois grupos distintos propuseram que, em mamíferos, o mecanismo responsável pela desmetilação ativa do DNA paterno seria realizado por uma hidroxilação do DNA. Neste processo o pro-núcleo masculino sofre ação das enzimas TET, principalmente a TET3, oxidando assim o DNA, enquanto o materno permanece metilado. Uma explicação para a não alteração do pro-núcleo feminino seria a ligação com a proteína STELLA/PGC7, entretanto, o mecanismo envolvido nesta proteção é desconhecido (IQBAL et al., 2011; WOSSIDLO et al., 2011). Além do processo natural de desmetilação do DNA, Wossidlo e colaboradores (2011) sugeriram que essas enzimas podem influenciar diretamente a reprogramação nuclear da célula somática durante a clonagem animal (WOSSIDLO et al., 2011).

5.1.2 Células menos diferenciadas como doadoras de núcleo

Apesar de um grande número de pesquisas em diferentes laboratórios, a eficiência da TNCS (a capacidade de chegar a um nascimento) permanece abaixo de 5% e muitas anormalidades têm sido reportadas (YANG et al., 2007).

Uma hipótese para essa baixa eficiência é que o grau de diferenciação da célula doadora de núcleo é inversamente proporcional à taxa de eficiência na TNCS (LIU et al., 2001; HOCHEDLINGER; JAENISCH, 2002; OBACK; WELLS, 2002; GREEN; WELLS; OBACK, 2007).

Por isso a escolha do doador de núcleo pode ser criticamente importante para a eficiência da TNCS, pois certos tipos de células são inerentemente mais eficientes para a clonagem que outras por causa da variabilidade do padrão epigenético e/ou diferentes capacidades em se reprogramarem (SANTOS et al., 2003).

Faast e colaboradores, em 2006, sugeriram que o uso de células menos diferenciadas, por serem mais facilmente reprogramáveis, poderia aumentar a eficiência da técnica em comparação ao uso de células mais diferenciadas (FAAST et al., 2006).

Kato et al. em 2004, foram os pioneiros na tentativa de utilização de células tronco mesenquimais ((MSC) do inglês *mesenchymal stem cell*) como doadoras de núcleo na técnica de clonagem. Os autores isolaram MSC bovinas da medula óssea e mostraram que estas

células foram reprogramadas por TNCS, apresentando um índice elevado de desenvolvimento embrionário e de indivíduos a termo (KATO et al., 2004).

Posteriormente, foi demonstrado que embriões clonados derivados de MSC de bovinos e suínos resultaram em alta taxa de desenvolvimento pré-implantacional quando comparados aos embriões clonados de fibroblastos adultos (COLLEONI et al., 2005).

Embora o uso de células tronco embrionárias (CTE) como doadora nuclear possa resultar em um aumento na eficiência da Transferência Nuclear (TN), a sua cultura *in vitro* ainda não foi bem estabelecida para algumas espécies como, por exemplo, em bovinos. Além disso, há evidências de que o uso de MSC como doadoras de núcleo aumenta as taxas de desenvolvimento da clonagem de animais domésticos, como suínos e bovinos (COLLEONI et al., 2005; LEE et al., 2010). As MSC utilizadas nestes estudos foram derivadas de tecidos como medula óssea, que não pode ser adquirido tão facilmente quanto aqueles recuperados do tecido adiposo, implicando em limitações práticas. Até o presente momento não há dados publicado utilizando MSC do tecido adiposo na transferência nuclear.

5.1.3 Células Tronco Induzidas (iPS)

Takahashi e Yamanaki recentemente conseguiram um significativo avanço no progresso do entendimento da aquisição da pluripotência ao reprogramarem células somáticas diferenciadas a um estado semelhante a células tronco embrionária (ES) (TAKAHASHI; YAMANAKA, 2006). Foram reprogramados, com sucesso, fibroblastos embrionários de camundongos (MEFs) e fibroblastos adultos em células pluripotentes após a transdução de quatro fatores de transcrição *Oct4*, *Sox2*, *c-Myc* e *Klf4* seguida de uma seleção para ativação do gene alvo de *Oct4*, *Fbx15*.

As células tronco pluripotentes induzidas (iPS) tem sido derivadas com sucesso de vários tipos de células somáticas. Primeiramente, elas foram obtidas de fibroblastos de diferentes origens e subsequentemente de queratinócitos, melanócitos, células sanguíneas, células tronco neurais, células beta pancreáticas, linfócitos B entre outras (AASEN et al., 2008; HANNA et al., 2008; HUANGFU et al., 2008b; STADTFELD; BRENNAND; HOCHEDLINGER, 2008; UTIKAL et al., 2009; LOH et al., 2010; MEDVEDEV et al., 2011). Esses resultados mostram que as iPS podem ser derivadas de células originadas de todas as três camadas de células germinativas (ectoderma, mesoderma e endoderma), embora a eficiência na dinâmica da derivação de linhagens estáveis de iPS depende

consideravelmente do método usado e o tipo de células somáticas (MAHERALI et al., 2008; ANOKYE-DANSO et al., 2011).

As iPS obtidas como um resultado de reprogramação direta tem um número de propriedades comuns que as fazem modelos promissoras para estudos no campo da biologia de células pluripotentes e hábeis para simular doenças na medicina regenerativa. (GRSKOVIC et al., 2011; TISCORNIA; VIVAS; IZPISÚA BELMONTE, 2011). Embora amplamente estudadas, iPS têm apresentado anormalidades tanto genéticas quanto epigenéticas, causando dúvidas em sua eventual aplicação (BAR-NUR et al., 2011; HUSSEIN et al., 2011).

Meissner et al. em 2010, mostraram que a metilação do DNA tem um papel crítico no restabelecimento da pluripotência (MEISSNER, 2010). Estudos comparativos de metilação do DNA em células tronco embrionárias (CTE) e tecidos diferenciados tem mostrado que a fração das ilhas CpGs, que incluem genes associados as células tronco e linhagens germinativas, bem como genes tecido-específico, tornam-se *de novo* metilados durante o desenvolvimento. Esta observação sugere que a metilação do DNA tenha um papel tanto na perda da pluripotência quanto na especificação celular seguinte (MEISSNER et al., 2008; MOHN et al., 2008).

A descoberta do mecanismo de desmetilação ativa catalisado pelas enzimas TET, discutido anteriormente, traz um novo enfoque no estudo da reprogramação epigenética em CTE e iPS. (TAHILIANI et al., 2009) Koh et al. (2011), por exemplo, relataram que *Tet1* e *Tet2*, mas não *Tet3*, são expressas em CTE e iPS. (KOH et al., 2011) Além disso, em uma análise funcional detalhada, eles revelaram uma nova ligação entre a expressão de *Tet1* e *Tet2*, o seu controle pelos mecanismos de pluripotência (*Oct4* e *SOX2*) e o potencial de diferenciação dessas células (KOH et al., 2011). Esses achados ligam diretamente os mecanismos de controle genético e epigenéticos, além de sugerir um importante papel da 5hmC na manutenção e diferenciação de CTE.

Todas essas modificações epigenéticas podem influenciar o resultado da reprogramação de células somáticas em iPS. Os tecidos embrionários, por exemplo, são mais eficientemente reprogramados, produzindo iPS que são muito próximas a CTE. Por outro lado, reprogramação de tecidos adultos, que são mais aplicados no modelamento de doenças e geração de terapias celulares, é ineficiente e limitado por barreiras relacionadas ao estado de diferenciação celular e idade das células doadoras (EMINLI et al., 2009; LI et al., 2009a; MARIÓN et al., 2009).

Por isso, o tratamento de células diferenciadas sendo reprogramadas com componentes que inibem a metilação da histona ou do DNA, bem como desacetilação das histonas, podem gerar células iPS mais eficientemente (HUANGFU et al., 2008a,b; LI et al., 2009b; MIKKELSEN et al., 2008; SHI et al., 2008b).

5.2 REPROGRAMAÇÃO EPIGENÉTICA

No momento da fecundação a desmetilação dos genomas materno e paterno, ocorrem de forma assimétrica. O pronúcleo feminino se torna passivamente desmetilado durante as subseqüentes clivagens, presumivelmente devido à remoção de DNMT1 (a DNA metiltransferase responsável pela manutenção da metilação após a replicação) do núcleo (CARDOSO, 1999). Já no pronúcleo masculino, a desmetilação global ocorre logo após a fecundação, o que por quase uma década foi descrito apenas como “desmetilação ativa”, um processo independente de replicação (MAYER et al., 2000).

O mecanismo de desmetilação do genoma materno e paterno permaneceu obscuro até o momento em que a família de proteínas TET3 foi descrita como enzimas responsáveis pela conversão de 5mC em 5-hidroximetilcitosina (5hmC) (KRIAUCIONIS; HEINTZ, 2009; TAHILIANI et al., 2009). Com a geração de anticorpos específicos para 5hmC, tornou-se claro que a suposta “desmetilação ativa” dos pronúcleos paternos nos zigotos após a fecundação foi devido a inabilidade dos anticorpos anti-5mC em reconhecer 5hmC e outros produtos da oxidação de 5mC. (IQBAL et al., 2011; WOSSIDLO et al., 2011)

Apenas em 2011 o ‘enigma’ da desmetilação assimétrica no zigoto começou a ser desvendado. Com a ajuda dos novos anticorpos anti-5hmC, Wossidlo e colaboradores descobriram que o genoma paterno era desmetilado por influência da TET3 e que o genoma materno era protegido de alguma forma contra a hidroxilação através da proteína STELLA/PGC7/DPPA3. Na ausência da proteína, até mesmo o pronúcleo feminino era oxidado pela TET3 (WOSSIDLO et al., 2011). Além do mecanismo de desmetilação assimétrica, os pesquisadores citados analisaram a relação da expressão de *Tet3* no oócito. Eles observaram que após a TNCS, o DNA do núcleo doador, aumentava consideravelmente a quantidade de 5hmC (WOSSIDLO et al., 2011).

No mesmo ano, Gu e colaboradores também mostraram que a oxidação da 5mC mediada por TET contribui para reprogramação epigenética do DNA do núcleo doador na TNCS, bem como, a reprogramação na TNCS pode compartilhar o mesmo mecanismo de

remodelamento do DNA na desmetilação assimétrica em oócitos fecundados (GU et al., 2011).

Antes desses trabalhos, Nakamura et al. (2007) já haviam previamente mostrado que zigotos sem STELLA/PGC7/DPPA3 perdem a regulação assimétrica da metilação do DNA, e apresentam uma perda total de 5mC em ambos os pronúcleos. Isso foi correlacionado com a hipometilação em muitos loci ‘imprinted’ maternos (*Peg1*, *Peg3*, *Peg1*) em zigotos deficientes de PGC7, como mostrado por sequenciamento de bissulfito. Além do mais, certos loci ‘imprinted’ paternos (H19, *Rasgrf1*), que são normalmente protegidos de uma perda de metilação global no genoma paterno, também se tornaram hipometilados em zigotos deficientes de PGC7. Esses resultados sugerem que PGC7 protege o genoma materno, bem como certos loci ‘imprinted’ paterno da perda de 5mC (NAKAMURA et al., 2007).

A assimetria entre os pronúcleos começa antes mesmo do processo de desmetilação. Uma das características principais é o empacotamento do DNA, enquanto o genoma materno contém histonas, o paterno é empacotado por protaminas, que serão substituídas por histonas acetiladas após a fecundação. Esse processo coincide com a desmetilação do DNA paterno em zigotos de camundongos. Além do mais, modificações de histonas, como di/trimetilação em H3K9, H4K20 e H3K27 estão presentes apenas nos cromossomos maternos (LEPIKHOV; WALTER, 2004; LIU; KIM; AOKI, 2004; VAN DER HEIJDEN et al., 2005). Além de camundongos, Lepikhov et al. (2008) mostraram que essa assimetria no padrão de histonas nos genomas paterno e materno e a desmetilação ativa é conservada também em coelhos e bovinos (LEPIKHOV et al., 2008).

Santos e colaboradores, mostraram, em 2003, que a metilação de H3K9 é reprogramada paralelamente a metilação do DNA em embriões normais e quando havia falha na reprogramação ambos se mostravam hipermetilados. Eles sugeriram também que tanto a metilação do DNA quanto a H3K9me2 são amplamente refratárias ao potencial de remodelamento do oócito (SANTOS et al., 2003).

Em 2012, Nakamura et al. estenderam os estudos referentes a esses achados para entender o mecanismo envolvido. Eles descobriram que a proteína PGC7 se liga especificamente a histona H3 lisina 9dimetilada(H3K9me2) no genoma materno em zigotos, onde essa ocupação global exclui TET3 e inibe a oxidação de 5mC mediada por Tet3 (NAKAMURA et al., 2012). Essa nova descoberta provê novos ‘insights’ na alteração do status da metilação do DNA global que ocorre na embriogênese inicial.

Interessantemente, também em 2012, Chen et al. sugeriram que a principal barreira para a total reprogramação das células somáticas em células tronco induzidas (iPSs) seria o

estado de metilação da histona H3 lisina 9 (H3K9). Em seu trabalho eles mostraram que o ambiente extracelular, incluindo fatores de sinalização, como as BMPs e pequenas moléculas como a vitamina C, podem regular o padrão de metilação H3K9 via metiltransferases e desmetilases, resultando assim em uma mudança global nos padrões de expressão gênica que reprimem ou promovem o estabelecimento da pluripotência (CHEN et al., 2013).

5.3 USO DA UNC0638 COMO AGENTE DESMETILADOR

A metilação do DNA e as modificações pós-traducionais das histonas formam a base para a memória epigenética celular. Estratégias químicas (uso de agentes modificadores da cromatina) que reduzam os níveis globais de metilação e aumentem os níveis de acetilação de células em cultura, anterior a transferência nuclear, podem aumentar a habilidade do oócito em reprogramar um núcleo para um estado totipotente, possibilitando um impacto positivo significativo na clonagem animal (EILERTSEN et al., 2007).

A metilação da histona H3K9, mediada por G9a, e a heterocromatinização representa um mecanismo altamente específico para o silenciamento epigenético de genes embrionários como *Oct4* e *Rex1* (FELDMAN et al., 2006). Além do mais, foi também demonstrado que o ‘knockdown’ de G9a pode ajudar na reprogramação baseada em fusão de células neurais adultas (MA et al., 2008).

Na TNCS, os níveis aberrantes da metilação de H3K9 foi apontado como uma das razões pela falha na reprogramação por TNCS em bovinos (SANTOS et al., 2003). Em iPS, a utilização de um inibidor de G9a, BIX01294, foi utilizado após a indução fatores de transcrição *Oct3/4* e *Klf4* em células progenitoras neurais, que expressam genes *Sox* endógeno, foi tão eficiente quanto a indução tradicional utilizando os quatro fatores *Oct3/4-Klf4/Sox2/c-Myc*. Isso mostra que o uso de um inibidor de G9a pode facilitar o processo de reprogramação (SHI et al., 2008b).

Na TNCS de ovelhas, porém, o tratamento com BIX 01294 nas células doadoras impediu a fusão com o citoplasma oocitário, causando a lise celular (FU et al., 2012). Os autores atribuíram esse problema à alta toxicidade deste inibidor.

Mais recentemente, um outro inibidor de G9a e GLP mostrou em sua atividade uma alta especificidade e menor toxicidade em comparação ao BIX01294 (VEDADI et al., 2011).

Ao nosso conhecimento, nenhum trabalho avaliou o tratamento de células bovinas com inibidores de G9a.

**CAPÍTULO III: ANÁLISE EPIGENÉTICA DE CÉLULAS TRONCO
MESENQUIMAIS BOVINA E APLICAÇÃO NA TRANSFERÊNCIA
NUCLEAR**

6 INTRODUÇÃO

A Transferência Nuclear de Células Somáticas (TNCS) consiste na reprogramação de um núcleo somático a um estado pluripotente, necessário para o desenvolvimento de um novo indivíduo. Para que esta reprogramação ocorra de forma eficiente o núcleo somático inicial sofre diversas alterações epigenéticas, como remodelação da cromatina e desmetilação do DNA (YANG et al., 2007).

A taxa de eficiência da técnica, porém, permanece muito baixa, em torno de 1-5% de nascimentos. Essa alta ineficiência tem sido associada ao grau de diferenciação da célula doadora de núcleo (HEYMAN, 2005).

A utilização de células doadoras menos diferenciadas surgiu como uma forma de facilitar o processo de apagamento da memória epigenética e, conseqüentemente, melhorar a reprogramação (FAAST et al., 2006). Estudos mostram uma relação inversamente proporcional entre o nível de diferenciação da célula doadora de núcleo e a eficiência na reprogramação por TNCS, de forma que a transferência nuclear (TN) de uma célula tronco neural apresenta melhores resultados quando comparados à utilização de uma célula neural terminantemente diferenciada como doadora de núcleo (BLELLOCH et al., 2006). Essa abordagem abre diversas possibilidades de utilização das células tronco como doadoras de núcleo.

Por definição, as células tronco são caracterizadas pela sua capacidade de auto-renovação e de diferenciação em linhagens de diferentes tipos celulares. (GIMBLE, 2003). Além das células tronco embrionárias (ESC) -do inglês *embryonic stem cell*, as células tronco podem ser adultas, quando isoladas de diferentes tecidos, e células tronco fetais (SCHWINDT; BARNABÉ; MELLO, 2005).

Alguns trabalhos mostraram que a utilização de células tronco mesenquimais (MSC) -do inglês *mesenchymal stem cell*, derivadas da medula óssea aumentou a eficiência da TNCS em suínos (FAAST et al., 2006; JIN et al., 2007) e em bovinos (COLLEONI et al., 2005). No entanto, a dificuldade de obtenção dessas células as tornam inviáveis para a ampla utilização na TNCS.

Por outro lado, o tecido adiposo tem sido descrito como uma excelente fonte de MSCs. A sua fácil manipulação permitiu o isolamento de MSCs em diferentes espécies como camundongo (YAMAMOTO et al., 2007), suínos (WILLIAMS et al., 2008), cães

(NEUPANE et al., 2008), equinos (DE MATTOS CARVALHO et al., 2009) e recentemente em bovinos e bubalinos (SAMPAIO et al., 2015).

Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar o padrão de marcas epigenéticas relacionadas à reprogramação nuclear em células tronco mesenquimais do tecido adiposo e utilizá-las como doadoras de núcleo na TNCS.

6.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Neste capítulo foram testadas as seguintes hipóteses:

Células tronco mesenquimais aumentam a eficiência da TNCS.

A eficiência da TNCS está relacionada aos níveis das modificações epigenéticas presentes durante o desenvolvimento: H3K9me2, H3k9me3, H3K9ac, 5hmC e 5mC.

Para isso, células tronco mesenquimais foram isoladas do tecido adiposo de bovinos em conjunto com fibroblasto do mesmo animal para comparação nos diferentes experimentos. As células utilizadas em todas as análises foram privadas de soro fetal bovino (SFB) por 24h para a sincronização do ciclo celular, procedimento necessário para a utilização como doadoras de núcleo na TNCS (CAMPBELL et al., 1996).

No primeiro experimento foram comparados os níveis das modificações supracitadas por meio de marcação por imunofluorescência e quantificação por *High Content Screening* (sistema de análise multiparamétrica), sendo possível, portanto, comparar simultaneamente todos os níveis das modificações estudadas simultaneamente.

No segundo experimento foram avaliados os níveis de expressão gênica dos transcritos codificadores de enzimas responsáveis pelas modificações epigenéticas testadas no primeiro experimento. São eles: *KDM4A*, *KDM4C*, *HDAC1*, *SETDB1*, *KDM3A*, *DNMT1*, *DNMT3A*, *EHMT1*, *SUV39H1*, *TET1* e *TET2*. Os transcritos foram avaliados por PCR em tempo real nos dois grupos experimentais, fibroblastos e MSCs. Por último, os dois tipos celulares foram utilizados como doadoras de núcleo na TNCS. Para a avaliação quanto a eficiência da técnica, as taxas de clivagem e formação de blastocisto foram comparadas entre os dois tipos celulares. O delineamento experimental está ilustrado abaixo (Figura 4).

Figura 4 - Desenho esquemático ilustrando os experimentos realizados no capítulo 3

Fonte: SAMPAIO, R.V., 2015

6.2 MATERIAL E MÉTODOS

6.2.1 Isolamento e Caracterização das MSC

O isolamento e caracterização das MSC foi realizado previamente (Anexo A). Foram utilizados tecido adiposo e biópsia de pele coletados de abatedouro. Resumidamente, as MSC foram isoladas por digestão enzimática da biópsia do tecido adiposo e cultivadas por pelo menos dez passagens in vitro, dando apoio a sua capacidade proliferativa. Estas células também foram submetidas à caracterização imunofenotípica para verificara presença de marcadores de MSC, CD90, CD105 e CD79, e ausência de marcadores de células tronco

hematopoiéticas, CD45, CD34 e CD73. A fim de provar a sua multipotência, as células foram induzidas a diferenciação em três tipos celulares diferentes: condrócitos, osteoblastos e adipócitos. Para confirmação da diferenciação, as células foram marcadas com corantes tecidos-específicos (condrogênico-Alcian Blue, osteogênica-Alizarina Red e adipogênica-Oil-Red O). Para a comparação nos diferentes experimentos, fibroblastos de tecido subcutâneo foram isolados dos mesmos animais. Biópsias de pele de aproximadamente 2cm² foram lavadas com tampão fosfato salino (fosfate buffer saline, PBS), divididas em pedaços menores e incubados por 3h a 38,5°C em solução de collagenase IV (Sigma, 0,040g / mL). Após incubação, o tecido digerido foi lavado e plaqueado em meio de cultivo completo α -MEM (Life Technologies) suplementado com 10% de soro fetal bovino e antibióticos (Gibco).

6.2.2 Análise da expressão gênica

Para análise de expressão gênica, as MSCs e fibroblastos foram cultivadas em placas de seis poços (Sarstedt). Assim como nas outras análises, as células foram privadas de SFB por 24h (descrito no delineamento experimental) seguindo o protocolo utilizado na transferência nuclear de células somáticas. O RNA total foi extraído dos dois tipos celulares usando o reagente TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) de acordo com as recomendações do fabricante, com poucas modificações. Para isso, um mix contendo 1000 μ l de TRIzol, 50 μ g de acrilamida linear (Ambion Inc., Austin, TX, USA) e 90 μ l de água tratada com DEPC (dietileno pirocarbonato) foi adicionado em cada poço. O RNA extraído foi eluído em 10 μ l de solução de DNase I (Invitrogen) mais 1 unidade/ μ l de RNase OUT para a degradação de DNA contaminante, como sugerido pelo fabricante. Após isto, o RNA foi imediatamente convertido em cDNA com o kit High-Capacity RNA-to-cDNA (Life Tech cat # 4387406) de acordo com o protocolo do fabricante, e armazenado a -20°C até o uso.

Os genes alvos de interesse foram os seguintes: *KDM4A*, *KDM4C*, *HDAC1*, *SETDB1*, *KDM3A*, *DNMT1*, *DNMT3A*, *EHMT1*, *SUV39H1*, *TET1* E *TET2* enquanto que os genes *RPL15*, e *PPIA* foram utilizados como genes endógenos ou de referência, conforme descrito anteriormente (MACABELLI et al., 2014). Oligonucleotídeos iniciadores para PCR em tempo real foram desenhados utilizando os programas Primer Express software v.3.1 (Applied Biosystems) e Primer-BLAST de acordo com as sequências disponíveis no GenBank (**Error! Reference source not found.**). A quantificação relativa dos transcritos de mRNA foi

realizada em reações de 15- μ l contendo 0.2 μ M de oligonucleotídeos iniciadores (descritos acima) mais 1 x SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) e 2 μ l de um cDNA diluído 8 vezes em água ultra-pura. Todas as amostras foram analisadas, para determinado gene, em duplicata na mesma placa de PCR. As seguintes condições de ciclagem foram aplicadas para amplificação: desnaturação inicial a 95°C por 10 min, seguido por 40 ciclos consistindo de 95°C por 15 seg, 60°C por 1 min. A fluorescência do SYBR Green foi lida no final de cada passo de extensão (60°C). Experimentos pilotos usando 5 diferentes concentrações de cDNA (extendendo-se de 4 vezes até 64 vezes diluído) foram corridas para ajustar as condições dos experimentos.. A especificidade dos produtos de PCR foi confirmada pela análise da curva de *melting*. A quantidade dos transcritos alvos foi determinada usando a seguinte fórmula: $E_{(target)}^{-\Delta Ct(target)}/E_{(ref)}^{-\Delta Ct(ref)}$, na qual o E corresponde a eficiência de amplificação e ΔCt a diferença do ciclo de threshold (Ct) entre as amostras controle e tratadas. Valores de Ct foram obtidos após retirar-se a média das duplicatas das amostras, enquanto E refere se a eficiência média estimada para cada par de primers (os quais variaram de 90% a 100%) usando o software LinRegPCR (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001; PFAFFL; HORGAN; DEMPFLER, 2002; RAMAKERS et al., 2003).

6.2.3 Quantificação da imunofluorescência por High Content Screening (HCS)

Níveis de marcas epigenéticas relacionadas ao desenvolvimento (H3K9me2, H3K9me3, H3K9ac, 5hmC e 5mC) foram comparadas entre as MSC e os fibroblastos. Para isso, foi realizado um ensaio de imunofluorescência tradicional e a quantificação foi realizada em um equipamento de High Content Screening (HCS).

O ensaio de imunofluorescência foi realizado em placas de 96 poços específicas (BD) e as imagens foram obtidas em um aparelho HCS (ImageXpress, Molecular Devices, Silicon Valley, CA, United States). Para isso, foram plaqueadas inicialmente 1x10³ células/poço e cultivadas 48h, sendo as últimas 24h em privação de SFB. Em seguida um protocolo tradicional de marcação por imunofluorescência foi seguido. Este protocolo foi baseado no trabalho de Sangalli et al. (2012) com poucas modificações. Resumidamente, placas destinadas à imunocitoquímica foram lavadas com PBS para a remoção do meio de cultivo, fixadas em paraformaldeído 4% por 20 min e lavadas em PBS.

Quadro 1– Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores usados nos experimentos de PCR em tempo Real (q-PCR)

Sigla do Gene	Nome do Gene	Sequência dos Oligonucleotídeos Utilizados (5'-3')	Temp de anelamento (°C)
<i>EHMT1</i>	Euchromatic Histone Methyltransferase 1	F: CAAGAGGAAGGGGAAGCCTG	60
		R: AACCTAACACAGAGCAGGGC	
HDAC1	Histone Deacetylase 1	F: TTACGACGGGGATGTTGGA	60
		R: GGCTTTGTGAGGGCGATAGA	
KDM3A	Lysine (K)-Specific Demethylase 3A	F: AGTGGCCTGCAATAATGTACAAA	60
		R: GAAAGACGAAGATTGTTTACATCC	
KDM4A	Lysine (K)-Specific Demethylase 4A	F: TGCTTCTGTAGCCTTGACCG	60
		R: GGTCAGGCAGAAATCGCAGA	
<i>KDM4C F</i>	Lysine (K)-Specific Demethylase 4C	F: CCCAAGCAGTTCTCAAGGGT	60
		R: GCTTCCTGGGTGATCTTGTC	
<i>SETDB1 F</i>	SET domain, bifurcated 1	F: CTGGAACCCAGTTCAAGCCT	60
		R: CAAGCTTTCACGTGCACCTGC	
<i>SUV39H1 F</i>	Suppressor of variegation 3-9 homolog 1	F: AGATCTATGACCGCCAGGGT	60
		R: GGAGGTTGGGGTCACAAGT	
<i>DNMT1</i>	DNA (Cytosine-5-)-Methyltransferase 1	F: GCAGTACCAGCCCATCCT	60
		R: GCGGGCAGCCACCA	
<i>PPIA</i>	Peptidylprolyl isomerase A (cyclophilin A) (PPIA)	F: GGTCCTGGCATCTTGTCCAT	60
		R: TGCCATCCAACCACTCAGTCT	
<i>RPL15</i>	Ribosomal protein L15	F: CAAACGCCAGTTCCTAAGG	60
		R: TCGAGCAAAGTTGAGCTGGTT	
<i>DNMT3A</i>	DNA (Cytosine-5-)-Methyltransferase 3 Alpha	F: GCTCATGTGTGGGAACAACAATT	60
		R: CACCAAGAGATCCACACATTCCA	
<i>Tet1</i>	Ten-eleven translocation methylcytosine dioxygenase 1	F: TGCCTACTTGCAACTGTCTTGATC	60
		R: TCTATCCTTACTGCATTTCTTTTGT	
<i>Tet2</i>	Ten-eleven translocation methylcytosine dioxygenase 2	F: GGATACACCTGTCAAGACTCAGTATGA	60
		R: GGACCTGCTCCTAGATGGGTATAA	

Fonte: (SAMPAIO, R. V., 2015)

Para a permeabilização, as placas foram incubadas em PBS com 1% de Triton X-100 em temperatura ambiente por 15 minutos, em seguida, os poços destinados para a marcação de 5hmC e 5mC, foram incubados por 12 min em HCl 4N para desnaturação do DNA e em seguida neutralizados em 100mM de Tris-HCl (pH 8.5) por 20 minutos. Todas as placas foram bloqueadas em PBS com 1% de BSA por 30 minutos à temperatura ambiente. Elas foram então encubadas com anticorpos específicos anti-H3K9me2 (polyclonal, # 07-441, Millipore, Billerica, MA, USA) anti-H3K9me3 (polyclonal, # 07-523, Millipore, Billerica,

MA, USA), anti-5 hydroxymethylcytosine (polyclonal, #AP9160a; Abgent - San Diego, CA, USA) e anti-5 methylcytidine (clone 33D3, #sc-56615; Santa Cruz, Santa Cruz, CA, USA) diluídos na concentração de 1:300 em PBS à 4°C overnight. No dia seguinte, as placas foram incubadas com anticorpos secundários marcados com Goat anti-MOUSE IgG - AlexaFluor 488 (#11008, Invitrogen - Foster City, CA, EUA) e Goat anti-rabbit IgG - Texas Red (#111075144, Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA) diluídos na concentração de 1:400 em PBS por 1h à temperatura ambiente. O controle negativo consistiu em uma parte das células incubada somente com o PBS sem o anticorpo primário. Após este período, os poços foram novamente lavados, em seguida os poços que não foram tratados com ácido foram submetidos à marcação com DAPI (Hoechst 33342 Life Technologies) nos outros foi utilizado o CellMask Blue (Molecular Probes). Acabado este período de incubação, os poços foram submetidos a mais uma etapa de lavagem, em seguida foram adicionados 100 µL de PBS (1X) e as placas foram recobertas com papel alumínio e armazenadas em geladeira (4°C). Para a aquisição das imagens, foi utilizado o sistema de HCS ImageXpress XL (Molecular Devices). As imagens foram obtidas utilizando-se a objetiva de 10X e os cubos com filtros de excitação e emissão ideais para cada fluoróforo. Os cubos utilizados foram de DAPI (para Hoechst 33342 e CellMask Blue), FITC (para FITC, DyLight 488 e Sytox Green), Cy3 (para o PI) e Texas Red (para Alexa 594), ainda ficando livre um quinto cubo, Cy5. O *software* utilizado para operar o sistema de HCS, bem como para a realização da análise das imagens, foi o *MetaXpress* (Molecular Devices). As análises de todos os experimentos foram realizadas utilizando-se o *Multi-Wavelength Cell Scoring Application Module*.

6.2.4 Transferência nuclear de células somáticas

As células isoladas e caracterizadas pertencentes ao grupo MSC e fibroblastos foram utilizadas como doadoras de núcleo na TNCS.

6.2.4.1 Obtenção dos ovários

Os ovários foram obtidos no Matadouro Frigorífico Olhos D'água, localizado no município de Ipuã, SP, sendo acondicionados em garrafas térmicas, e imediatamente transportados ao laboratório a temperatura entre 33 e 36 °C.

6.2.4.2 Recuperação oocitária e maturação in vitro (MIV)

Os ovários obtidos em abatedouro foram transportados para o laboratório em solução salina 0,9% 33 a 36 °C, e folículos entre 2 e 8mm foram aspirados utilizando agulha de 18 ga acoplada a seringa de 20mL. Oócitos com múltiplas camadas de células do *cumulus* e citoplasma homogêneo foram selecionados para MIV e grupos de 15 complexos *cumulus*-oócitos (COC) foram maturados sob óleo mineral (Dow CorningCo., Midland, MI, EUA) em gotas de 90µL de meio de cultivo de tecidos (TCM 199, GIBCO BRL) com sais de Earle, suplementado com 10% de SFB, 1,0µg/mL FSH (Folltropin™, Bioniche Animal Health, Belleville, Ont, Canadá), 50µg/mLhCG (Profasi™, Serono, São Paulo, Brasil), 1,0µg/mL estradiol, 0,20mM piruvato de sódio e 83,4 µg/mL de sulfato de amicacina (Instituto Bioquímico, Rio de Janeiro, Brasil). Os COCs foram mantidos em estufa com atmosfera de 5% CO₂ em ar e temperatura de 38,5°C por 18 horas.

6.2.4.3 Produção de Embriões Por Transferência Nuclear

O procedimento de TNCS foi realizado conforme o descrito por Sangalli et al. em 2012, com poucas modificações. Primeiramente as células isoladas, MSC e fibroblastos foram cultivadas em α -MEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e utilizadas entre a 3ª e 9ª passagem. Para a utilização na TNCS, as células foram sincronizadas por privação de SFB (0,5%) por 24h antes da transferência.

Complexos *cumulus*-oócito derivados de ovários de abatedouro e maturados *in vitro* por 18 horas foram incubados em solução de hialuronidase 0,2% (m/v) para remoção das

células do *cumulus*. Oócitos apresentando o primeiro corpúsculo polar foram selecionados e incubados por 15 minutos em SOF com 10 µg/mL de bizbenzimida (Hoechst 33342) e 7,5 µg/mL de citocalasina B a 38,5°C e atmosfera de 5% de CO₂ em ar e umidade máxima. Os procedimentos de micromanipulação foram realizados em SOF tamponado com HEPES (HSOF; (WELLS, 1999)) suplementado com 10% de SFB e 7,5µg/mL de citocalasina B. Para a enucleação, uma pipeta de borossilicato de vidro de 25 µm de diâmetro externo foi utilizada para a remoção do primeiro corpúsculo polar e citoplasma adjacente. A enucleação foi confirmada pela visualização do carioplasto aspirado dentro da pipeta exposta à luz ultravioleta. Células isoladas proveniente de cada grupo foram transferidas para o espaço perivitelínico de cada citoplasto receptor e os complexos citoplasto-célula foram eletrofundidos em solução de manitol 0,28M contendo 0,05 mM de cálcio, 0,1 mM de magnésio e 0,3mg/mL de BSA. A eletrofusão foi induzida por dois pulsos diretos de 2,0 kV/cm com duração de 20µs cada, utilizando equipamento Multiporator (Eppendorf). As taxas de fusão foram determinadas 60 minutos após a eletrofusão, e os oócitos reconstituídos com sucesso foram quimicamente ativados 26 horas após o início da MIV, utilizando 5 µM de ionomicina por 5 minutos em TCM 199 tamponado com HEPES e suplementado com 0,1% de BSA, seguido de incubação em SOF suplementado com 2mM de 6-dimetilaminopurina (DMAP, Sigma) por 4 horas a 38,5°C sob atmosfera úmida de 5% de CO₂ em ar.

6.2.4.4 Cultivo Embrionário In Vitro

Grupos de 20 a 25 embriões foram cultivados em microgotas de 90 µL de SOF contendo 5 mg/mL de BSA livre de ácidos graxos (fração V), cobertas por óleo mineral à 38,5°C sob atmosfera úmida de 5% de gás carbônico, 5% de oxigênio e 90% de nitrogênio, durante 7 dias (dia 0 = dia da transferência nuclear), até o estágio de blastocisto.

6.3 RESULTADOS

6.3.1 Isolamento das MSCs e fibroblastos

As MSCs isoladas do tecido adiposo e os fibroblastos aderiram ao plástico logo após o plaqueamento. Ambos apresentaram morfologia semelhante a fibroblasto (

Figura 5).

O resultado da caracterização das MSCs está descrito no anexo A.

6.3.2 Expressão dos genes relacionados às marcas epigenéticas.

Com o objetivo de investigar diferenças epigenéticas entre os dois tipos celulares, realizou-se a análise de expressão gênica de transcritos envolvidos em modificações epigenéticas. De maneira geral, todos os genes analisados não apresentaram um padrão na expressão em relação ao tipo celular. Foram analisados os transcritos relacionados à metilação (DNMT1 e DNMT3A) e desmetilação do DNA (TET1 e TET2), à desmetilação (KDM4A, KDM4C, KDM3A) e à metilação de histonas (EHMT1, SETDB1 e SUV39H1). Como endógenos foram utilizados os genes *RPL15* e *PPIA*.

Figura 5 - Fotomicrografia das células isoladas

Fonte: (SAMPAIO, R. V., 2015)

Legenda: (a)- Células tronco mesenquimais (MSCs) e (b) fibroblastos. Aumento de 20x. Todas as imagens foram feitas na mesma magnificação (20x).

O gene *DNMT3A*, envolvido no processo da *de novo* metilação apresentou menor expressão nas células mesenquimais quando comparado com as células de fibroblastos (Figura 6). A expressão deste gene apresentou tendência estatística ($p=0,06$).

Figura 6 – Expressão relativa de *DNMT3*, relacionado à metilação do DNA

Legenda: As barras indicam a média e o erro padrão da média de cada tipo celular. As células mesenquimais (MSC) apresentaram menor expressão comparadas aos fibroblastos. Foi observado uma tendência estatística na de expressão gênica ($P = 0,06$).

O gene *KDM3A*, envolvido no processo de desmetilação de histona, foi mais expresso em fibroblastos ($p < 0,05$) que nas MSCs (Figura 7).

Figura 7 - Expressão relativa de *KDM3A*, relacionado à desmetilação de histonas

Legenda: As barras indicam a média e o erro padrão da média de cada tipo celular. As células mesenquimais (MSC) apresentaram menor expressão comparadas aos fibroblastos. Foi observado diferença estatística na de expressão gênica ($P < 0,05$).

Os outros genes analisados não apresentaram diferença estatística entre os tipos celulares ($p > 0,05$).

6.3.3 MSCs e fibroblastos como doadores de núcleo na TNCS

Como método de avaliação da eficiência na reprogramação nuclear, as MSCs e os fibroblastos foram submetidos ao processo de transferência nuclear de células somáticas. Foram realizadas sete replicatas utilizando os dois tipos celulares em diferentes passagens (Tabela 1). Não foi observada diferença estatística nas taxas de blastocisto entre os dois tipos celulares, $30,65 (\pm 7.9 \text{ EP})$ e fibroblastos $31,57 (\pm 5.7 \text{ EP})$. Somente foi observado diferença entre as taxas de clivagens $60,56 (\pm 6.5 \text{ EP})$ e $71,31 (\pm 6.8 \text{ EP})$ para MSC e fibroblastos respectivamente ($p < 0.05$).

Tabela 1- Resultados das TNCS com diferentes doadores de núcleo, células tronco mesenquimais (MSC) e Fibroblastos

Tipo Celular	Embriões Cultivados	Embriões Fusionados % (n°)	Embriões Clivados % (n°)	Blastocistos % (n°)
MSC	281	76.57 ± 3.24 (260)	60.56 ± 6.5 (178) ^a	30.65 ± 7.9 (75)
Fibroblasto	255	76.28 ± 3.23 (272)	71.31 ± 6.8 (201) ^b	31.57 ± 5.7 (76)

Legenda: Valores com diferentes sobrescritos (a, b) dentro da mesma coluna são estatisticamente diferentes ($P=0.0001$). Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão ($n=7$).

6.4 DISCUSSÃO E CONCLUSÕES PARCIAIS

A produção de embriões por transferência nuclear de células somáticas é um processo ineficiente. Diversos trabalhos têm relacionado essa baixa eficiência ao estado de diferenciação da célula doadora de núcleo, uma vez que as taxas de gestação de células mais

diferenciadas são menores quando comparadas àquelas menos especializadas (HEYMAN, 2005).

Neste capítulo avaliamos algumas modificações epigenéticas relacionadas ao desenvolvimento embrionário, bem como enzimas responsáveis por essas modificações. Os níveis de H3K9me2, H3K9me3, H3K9ac, 5hmC e 5mC foram analisados por meio da análise de intensidade relativa de fluorescência por HCS, entretanto, os resultados não apresentaram nenhuma diferença estatística. Por se tratar de uma nova metodologia, mais estudos serão necessários para uma melhor avaliação.

A análise de expressão gênica mostrou que a *KDM3A*, gene relacionado à desmetilação de H3K9me2, estava mais expresso em fibroblasto ($p < 0,05$). A *KDM3A* está relacionada à modulação da diferenciação, através da ativação de genes controladores da diferenciação e proliferação (*Dab2*, *Pdlim4* e *FoxQ1*) (HERZOG et al., 2012). Esse papel na diferenciação pode explicar a maior expressão em fibroblasto, célula mais diferenciada que as MSC.

A análise mostrou também que a *DNMT3A*, relacionada à metilação de DNA, estava menos expressa em MSC. O resultado da análise de expressão deste gene mostrou uma tendência estatística ($p = 0,06$). Uma possível explicação para a menor expressão em MSC é que, assim como a *KDM3A*, a *DNMT3A* também está envolvida no processo de diferenciação celular (TUREK-PLEWA; JAGODZIŃSKI, 2005). Estudos futuros avaliando tanto a expressão gênica, quanto as modificações epigenéticas em nos embriões gerados por TNCS ajudarão a elucidar a diferença dos dois tipos celulares no desenvolvimento embrionário.

Os resultados encontrados na literatura acerca da utilização de MSC na TNCS são controversos. Em alguns casos a utilização de MSCs isoladas da medula óssea como doadoras de núcleo mostrou um aumento na produção de blastocistos quando comparadas aos fibroblastos, em espécies como suínos (FAAST et al., 2006; JIN et al., 2007) e até mesmo em bovinos (COLLEONI et al., 2005). Entretanto, esse aumento na eficiência não foi confirmado em outros estudos. (BOSCH; PRATT; STICE, 2006; MARTINEZ-DIAZ et al., 2010).

Da mesma forma, trabalhos utilizando MSC oriundas do tecido adiposo mostram resultados discrepantes. Recentemente, Oh e colaboradores, em 2014, mostraram que a utilização de MSC resultou em melhores taxas de desenvolvimento embrionários em relação à fibroblastos adultos (OH et al., 2014). Entretanto, assim como nossos resultados, a utilização de células isoladas do tecido adiposo não aumentou a produção de blastocisto em

camundongos (QIN et al., 2009), em suínos (BOSCH; PRATT; STICE, 2006) e em cachorro (KIM et al., 2010).

Outro ponto importante é alguns estudos têm especulado que as células mesenquimais seriam muito semelhantes a fibroblastos, visto que ambos apresentam similaridades na morfologia, imunofenotipagem e poder de diferenciação em outros tecidos (HANIFFA et al., 2009). Essa alta similaridade pode influenciar nas taxas pré-implantacionais.

Por outro lado, a avaliação da eficiência não pode ser restrita à produção blastocistos. Estudos anteriores mostram que a manutenção da prenhez, bem como o desenvolvimento a termo, são importantes para uma melhor compreensão da influência do perfil epigenético na TNCS, pois a taxa de prenhez pode ser diferente entre as células doadoras mesmo quando o desenvolvimento *in vitro* é similar (HEYMAN, 2005; YANG et al., 2007).

Por fim, nosso estudo mostrou que tecido adiposo de bovinos, é uma excelente fonte de células doadoras de núcleo, uma vez que MSC podem ser isoladas em grandes quantidades por um método simples e são tão eficientes quanto fibroblastos na TNCS. Entretanto, mais estudos serão necessários para a avaliação das modificações presentes nos embriões, assim como a avaliação do desenvolvimento pós-implantacional.

CAPÍTULO 4: INIBIÇÃO DA G9A/GLP E SINCRONIZAÇÃO CELULAR NA GERAÇÃO DE IPS BOVINAS

7 INTRODUÇÃO

As células tronco embrionárias ((ESC) do inglês *embryonic stem cell*), são células pluripotentes isoladas da massa celular interna de embriões. Essas células possuem a capacidade de auto-renovação e diferenciação em qualquer tipo celular.

A pesquisa com ESC traz diversas possibilidades no campo da pesquisa básica, para estudo do desenvolvimento inicial e regulação da pluripotência; da pesquisa médica, como desenvolvimento de fármacos e terapia celular; e na medicina veterinária (ZHAO et al., 2013).

Entretanto, para a maioria dos animais domésticos o isolamento de ESCs não foi bem caracterizado. Grande parte das células isoladas são consideradas apenas semelhantes, pois apresentam somente algumas características das ESC. Dificuldades na proliferação, manutenção por longos períodos e otimização dos meios de cultivo para cada espécie tem sido apontados como os principais problemas para estabelecimento destas células (KOH; PIEDRAHITA, 2014).

Para contornar essa dificuldade, o uso de células tronco pluripotentes induzidas ((iPS) do inglês *induced pluripotent stem cells*) tem se mostrado uma excelente ferramenta nos estudos relacionados à pluripotência, tanto em humanos (ZHAO et al., 2013), quanto em espécies de animais domésticos (KOH; PIEDRAHITA, 2014).

O procedimento para o estabelecimento das iPS consiste na reprogramação de um núcleo somático para um estado de pluripotência através da expressão ectópica de genes como o OCT4, SOX2, KLF4 e c-MYC (TAKAHASHI; YAMANAKA, 2006). No entanto, a taxa de eficiência na reprogramação por este método permanece baixa (HANNA et al., 2009).

A dificuldade em apagar a memória epigenética da célula somática tem sido apontada como uma das principais causas da baixa eficiência da técnica. Um exemplo que demonstra isso, é que as iPS diferenciam com muito mais facilidade para o mesmo tipo celular do qual a célula reprogramada foi isolada inicialmente (KIM et al., 2010).

Em camundongos, o nível de metilação da H3K9 foi apontado com uma das principais barreiras para a geração de iPS (CHEN et al., 2013). Além disso, nesta mesma espécie, resultados satisfatórios foram encontrados quando um inibidor específico de G9a (metiltransferase da H3K9) foi utilizado na geração de iPS (SHI et al., 2008b).

Além dessa barreira epigenética, o ciclo celular da célula submetida ao processo reprogramação também parece comprometer a eficiência. Na reprogramação via

transferência nuclear a sincronização do ciclo celular é fundamental para o sucesso da técnica (CAMPBELL et al., 1996). Recentemente, na geração de iPS, a sincronização do ciclo por privação de soro fetal bovino também aumentou a eficiência desta técnica em humanos (CHEN et al., 2012).

Desta forma, o objetivo deste capítulo foi avaliar o efeito da diminuição dos níveis H3K9me2 de células bovinas submetidas ao processo de geração de iPS. Para tal, utilizou-se um inibidor específico de metiltransferases de histona, a UNC0638.

7.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Neste capítulo duas hipóteses foram testadas:

1. Células bovinas com menores níveis de H3K9me2, possuem menor barreira epigenética e são mais facilmente reprogramáveis.
2. A sincronização do ciclo celular de células bovinas submetidas ao processo de geração de iPS facilita a reprogramação nuclear.

Com o intuito de verificar o efeito de UNC0638 e da privação de SFB (*starvation*) sobre as modificações epigenéticas, diversas análises foram feitas (Figura 8). Visando a resposta de todos os tratamentos, as células foram divididas em 6 grupos, ao passo que esses grupos foram divididos de acordo com o tratamento, o meio de cultivo e o período de tratamento (Quadro 2). O meio de cultura base para este experimento foi o meio α -MEM suplementado com antibióticos. A variação em cada grupo se deu a partir da concentração de SFB. O tempo de tratamento foi de no mínimo 96h, com a renovação após 48h. Apenas a privação de SFB foi feita em 48h. Nossos resultados anteriores mostram que com apenas 24h de *starvation* é suficiente para sincronização celular (MIRANDA et al., 2009), no entanto, o tempo de privação de SFB foi adaptado para seguir o melhor resultado encontrado no tratamento com UNC0638 (VEDADI et al., 2011).

Figura 8 - Desenho esquemático ilustrando os experimentos realizados no capítulo 4

Fonte: SAMPAIO, R.V., 2015

Com o objetivo de analisar e investigar qual o melhor momento para a modificação nuclear na geração de iPS, os tratamentos foram divididos em Pré e Pós transdução – dia início do protocolo de iPS (Figura 9).

Figura 9 - Desenho esquemático ilustrando a divisão dos grupos de acordo com o período de tratamento

Fonte: SAMPAIO, R.V., 2015

O grupo controle (CTL) foi tratado com 0,1% de DMSO por 96h antes e depois da transdução. O grupo UNC-Pré foi tratado com 250nM de UNC0638 somente antes da transdução, enquanto que o grupo UNC-Pós foi tratado somente depois. O grupo UNC Pré-Pós teve o tratamento realizado durante antes e depois da transdução. Os grupos S-CTL e S-UNC tiveram seus meios renovados com apenas 0,5% de SFB. O primeiro foi tratado com 0,1% de DMSO e o segundo com 250nM de UNC0638 (Quadro 2).

Quadro 2 - Divisão dos grupos de acordo com o tratamento

	Pré-Transdução		Pós-Transdução	
Tempo de Tratamento	48h	48h	48h	48h
CTL	01% DMSO	01% DMSO	01% DMSO	01% DMSO
UNC-Pré	250nM UNC0638	250nM UNC0638	01% DMSO	01% DMSO
UNC-Pós	01% DMSO	01% DMSO	250nM UNC0638	250nM UNC0638
UNC Pré-Pós	250nM UNC0638	250nM UNC0638	250nM UNC0638	250nM UNC0638
S-CTL	01% DMSO	Starvation	-	-
S-UNC	250nM UNC0638	Starvation + 250nM UNC0638	-	-

Fonte: SAMPAIO, R.V., 2015

7.2 MATERIAL E MÉTODOS

7.2.1 Obtenção e cultivo celular

Fibroblastos fetais bovinos foram derivados de um feto com aproximadamente 50 dias de idade gestacional. Após a remoção dos órgãos e Cabeça, o Tecido foi lavado com tampão fosfato salino (fosfato buffer saline, PBS), dividido em pedaços menores e incubados por 3h a

38,5°C em solução de collagenase IV (Sigma, 0,040g / mL). Após incubação, o tecido digerido foi lavado e plaqueado em meio de cultivo completo α -MEM (Life Technologies) suplementado com 10% de soro fetal bovino e antibióticos (Gibco).

7.2.2 Tratamento com UNC0638 e caracterização das células tratadas

Com o objetivo de diminuir os níveis de H3K9me2 utilizamos a UNC0638, uma probe química inibidora específica das enzimas metiltransferases de histona G9a e GLP. A UNC0638 foi considerada altamente específica e com baixa toxicidade quando comparada às outras inibidoras (VEDADI et al., 2011). Para avaliar o efeito do seu tratamento em células bovinas, foram realizados os experimentos a seguir.

7.2.2.1 Imunofluorescência para detecção de H3K9me2

As células foram cultivadas sobre lamínulas previamente esterilizadas dentro de placas cultivo de 30mm (Corning). Foram então tratadas por 96h (com renovação do tratamento após 48h) com 250 ou 500nM de UNC0638 e com 0,1% de DMSO como controle. Após o período de tratamento todas as células foram submetidas a análise por imunofluorescência para a detecção de H3K9me2.

O protocolo de imunofluorescência foi baseado no protocolo sugerido descrito por Oliveira e colaboradores com algumas modificações (PEREIRA et al., 2013). As amostras foram lavadas e fixadas em paraformaldeído (PFA) 4% por 20 min, em seguida as células foram permeabilizadas por 20 minutos em PBS com 1% (v/v) de Triton X-100 e lavadas em PBS. Após isto, os sítios de ligação não-específica foram bloqueados por 30 min à temperatura ambiente com tampão de bloqueio consistindo de PBS contendo 1% de BSA. As células foram então incubadas overnight a 4°C com o anticorpo primário anti-rabbit H3K9me2 (Millipore, Bedford, MA, USA) diluído na concentração 1:300. Após isto, amostras foram lavadas em PBS e incubadas por 1 h em temperatura ambiente (protegidas da luz) com o anticorpo secundário goat anti-rabbit marcados com FITC (excitação 488nm, emissão 520nm) diluído na concentração de 1:400. O controle negativo consistiu em uma

parte das células incubada somente com o PBS sem o anticorpo primário. Para a análise as lamínulas foram montados em lâminas com 12µL de solução anti-fade (ProLong Antifade Gold reagent with DAPI; Invitrogen) e cobertos com lamínulas. Por fim, as amostras foram analisadas por microscopia de fluorescência utilizando microscópio Zeiss e o software AXIOVISION 4.7.1 (Carl Zeiss).

7.2.2.2 Análise da expressão gênica

Com o objetivo de avaliar um possível efeito do tratamento de UNC0638 sobre outros genes relacionados à epigenética, células tratadas ou não com 250nM de UNC0638 foram coletadas para a análise de expressão gênica. Todo o procedimento desta análise está descrito no capítulo 3. As sequências utilizadas estão descritas no Quadro 3.

7.2.2.3 Western blotting

Com o objetivo de confirmar os resultados encontrados na análise por imunofluorescência, foi realizado a detecção dos níveis de H3K9me2 por Western Blotting (WB). Desta vez, além de analisar os níveis de H3K9me2 relativos ao tratamento, o efeito da sincronização celular por privação de SFB também foi testada. Para isso, as células foram cultivadas e tratadas de acordo com o descrito no delineamento experimental. Após esse período, as células foram tripsinizadas e coletadas para o procedimento de WB. Em seguida as células foram fervidas e centrifugadas, a proteína foi quantificada pelo método colorimétrico de Bradford e o WB foi adaptado a partir do protocolo sugerido por Pereira e colaboradores(2013). As proteínas homogeneizadas foram diluídas em solução de tampão Tris-HCl (TBS- 10% de *Sodium Dodecyl Sulfate* (SDS); 20% de sacarose; 5% de β -mercaptoetanol; 125 mM, pH 6.8) e desnaturadas a 100°C por 5 minutos, separadas em 12% de gel de poliacrilamida em TBS e transferidas para uma membrana de *Polyvinylidene Fluoride* (PVDF) por eletroforese. A membrana foi incubada overnight na solução de Tris-HCl com Tween-20 (TBS-T, 10 mM Tris pH 7.6; 0.9% de cloreto de sódio; 0.3% de Tween - 20) com 5% de leite desnatado. Anticorpo anti-H3K9me2 (Millipore, Bedford, MA, USA) na

concentração final de 0.1 µg/ml com 2% de leite desnatado (TBS-TB) overnight a temperatura ambiente e então lavado e incubado por 90 minutos com Dako-advance HRP Link (DakoCytomation, Carpinteria, CA, USA, #K4069). Os blots foram revelados usando reagents de detecção ECL Plus Western Blotting (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA, # RPN2132). A membrana foi exposta ao filme de raio X por 5 min.

Quadro 3 - Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores usados nos experimentos de PCR em tempo Real (q-PCR)

Sigla do Gene	Nome do Gene	Sequência dos Oligonucleotídeos Utilizados (5'-3')	Temp. de anelamento (°C)
<i>EHMT1</i>	Euchromatic Histone Methyltransferase 1	F: CAAGAGGAAGGGGAAGCCTG R: AACCTAACACAGAGCAGGGC	60
HDAC1	Histone Deacetylase 1	F: TTACGACGGGGATGTTGGA R: GGCTTTGTGAGGGCGATAGA	60
KDM3A	Lysine (K)-Specific Demethylase 3A	F: AGTGGCCTGCAATAATGTACAAA R: GAAAGACGAAGATTGTTTACATCC	60
KDM4A	Lysine (K)-Specific Demethylase 4A	F: TGCTTCTGTAGCCTTGACCG R: GGTCAGGCAGAAATCGCAGA	60
<i>KDM4C F</i>	Lysine (K)-Specific Demethylase 4C	F: CCCAAGCAGTTCTCAAGGGT R: GCTTCCTGGGTGATCTTGTC	60
<i>SETDB1 F</i>	SET domain, bifurcated 1	F: CTGGAACCCAGTTCAAGCCT R: CAAGCTTTCACTGTCACCTGC	60
<i>SUV39H1 F</i>	Suppressor of variegation 3-9 homolog 1	F: AGATCTATGACCGCCAGGGT R: GGAGGTTGGGGTCACAACTG	60
<i>DNMT1</i>	DNA (Cytosine-5-)-Methyltransferase 1	F: GCAGTACCAGCCCATCCT R: GCGGGCAGCCACCAA	60
<i>PPIA</i>	Peptidylprolyl isomerase A (cyclophilin A) (PPIA)	F: GGTCTTGGCATCTTGTCAT R: TGCCATCCAACCACTCAGTCT	60
<i>RPL15</i>	Ribosomal protein L15	F: CAAACGCCCAGTTCCTAAGG R: TCGAGCAAACCTTGAGCTGGTT	60
<i>DNMT3A</i>	DNA (Cytosine-5-)-Methyltransferase 3 Alpha	F: GCTCATGTGTGGGAACAACAATT R: CACCAAGAGATCCACACATTCCA	60

Fonte: SAMPAIO R. V., 2015

7.2.2.4 Quantificação da imunofluorescência – High Content Screening (HCS)

O efeito do tratamento com UNC0638 e da privação de SFB foram quantificados através da análise de imunofluorescência por High Content Screening (HCS). O ensaio de imunofluorescência foi realizado em placas de 96 poços específicas (BD) e as imagens foram obtidas em um aparelho HCS, o (ImageXpress, Molecular Devices, Silicon Valley, CA, United States). Para isso, foram plaqueadas inicialmente 1x10³ células/poço e cultivadas por

96h de tratamento. As trocas de meio obedeceram ao esquema apresentado anteriormente no delineamento experimental. O procedimento de quantificação por HCS foi o mesmo seguido no capítulo 3, assim como as mesmas marcas epigenéticas analisadas (H3K9me2, H3K9me3, H3K9ac, 5hmC e 5mC).

7.3 PRODUÇÃO CÉLULAS IPS BOVINAS ATRAVÉS DOS FATORES DE TRANSCRIÇÃO RELACIONADOS À PLURIPOTÊNCIA

O processo de indução de pluripotência foi seguido de acordo com o sugerido por Bressan (2013) com poucas modificações. A indução foi realizada através da introdução do vetor policistrônico mSTEMCCA contendo os fatores de transcrição relacionados à pluripotência Oct4, Sox2, c-Myc e Klf4 murinos (BREISSAN, 2013).

Células tratadas (de acordo com o descrito no delineamento) foram cultivadas (2×10^5 células em um poço de placa de 6 poços) e transduzidas com os fatores específicos através de mecanismo lentiviral na presença de $8\mu\text{g/ml}$ polibreno (Sigma). Cinco dias após a transdução, as células foram tripsinizadas e transferidas para poços de uma placa de 6 poços contendo uma monocamada de fibroblastos murinos fetais (MEFs) mitoticamente inativados por mitomicina C (Sigma). O meio de cultivo de células-tronco pluripotentes induzidas foi constituído de DMEM/F12 (Invitrogen) suplementado com 20% KO-SerumReplacement (Invitrogen), 2mM Glutamina (Invitrogen), 1% non-essential amino acids (Invitrogen), 0.055mM beta-mercaptoetanol (Invitrogen), 10ng/mLbFGF (Sigma) e antibióticos. O meio foi trocado a cada dois dias e as células foram avaliadas diariamente quanto a sua morfologia.

Cultivos celulares foram recuperados nos dias 0 (dia da transdução), 5 (dia do plaqueamento das células nas MEFs), 9, 13, 17 e 21 após a transdução para o acompanhamento da reprogramação induzida, assim como colônias foram também utilizadas para tal após repique.

As colônias iPS geradas foram cultivadas por pelo menos 10 passagens, sendo que durante tal período as colônias foram analisadas quanto a sua pluripotência segundo os quesitos descritos a seguir:

7.3.1 Vetores

Foram utilizados vetores lentivirais policistrônicos excisáveis STEMCCA (Stem Cell cassette, Sommer et al., 2009; Figura 2) contendo cDNA de OCT4, SOX2, c-MYC e KLF4 humanos (hSTEMCCA) ou murinos (mSTEMCCA). Os plasmídeos auxiliares consistiram nas construções contendo as sequências TAT, REV, Hgpm2 e VSVG.

7.3.2 Produção de fibroblastos embrionários murinos para a utilização de monocamadas celulares de suporte

As células utilizadas como monocamadas de suporte foram previamente preparadas (BREISSAN, 2013) e encontravam-se criopreservadas. Para a produção de monocamadas de fibroblasto murino previamente inativadas mitoticamente (MEFs), garrafas de cultivo de 75cm² apresentando aproximadamente 80% de confluência foram incubadas com mitomicina (10 mg / mL, Sigma) por 3h em incubadora. Após este período os cultivos foram lavados com PBS, tripsinizados e replaqueados em placas de cultivo na concentração de 1×10^5 células por placa de 35 milímetros (placa de 6 poços).

7.3.3 Produção de partículas lentivirais

As partículas lentivirais foram produzidas através da lipofecção de células 293FT (Invitrogen) com o reagente Lipofectamina 2000 (Invitrogen). Para tal, 5×10^6 células 293FT foram plaqueadas no dia anterior em placas de cultivo de 100 milímetros de modo que apresentassem 90% de confluência no momento da transfecção. Foram utilizados 12 µg dos vetores STEMCCA e 2 µg de cada vetor auxiliar, com exceção do plasmídeo VSVG, sendo utilizados 2,4 µg (protocolo adaptado de Darrell N. Kotton e Gustavo Mostoslavsky, Center for Regenerative Medicine- CReM, Boston University, comunicação pessoal).

A lipofecção foi incubada por 12 a 16 horas (*overnight*) em contato com a células, quando então o meio foi trocado. O sobrenadante (meio de cultivo) foi recolhido e repostado após 24, 48 e 72h após transdução, filtrado e mantidos a 4°C até serem concentrados em

ultracentrífuga (Beckman Coulter) por 1h40min a 48960g no rotor SW28. As partículas virais foram utilizadas no dia mesmo ou congeladas e mantidas a -80 °C e utilizadas quando necessário, sendo que não foram utilizadas partículas virais após um segundo congelamento.

7.3.4 Transdução celular

Foram adicionados ao cultivo celular, previamente plaqueado no dia anterior com 10^5 células por poço em placa de 6 poços, 50 μ L do concentrado viral acrescido de 8 η g /mL de polibreno (brometo de hexadimetrina, Sigma). O meio de cultivo foi renovado após incubação de 12-16 horas.

Após o período de tratamento descrito no delineamento pós-transdução, as células foram transferidas para as MEFs por um mínimo de 21 dias.

As células neste período (período de reprogramação) foram cultivadas em meio iPS composto por DMEM/F12 Knockout (Invitrogen) suplementado com 20% de substituto de soro knockout (*knockout serum replacement*, KSR, Invitrogen), 1% glutamina (Invitrogen), 1:1000 B-mercaptoetanol (Invitrogen), 1% aminoácidos não essenciais (Invitrogen), 10 μ g/mL de bFGF (PeproTech) e antibióticos (Penicilina / estreptomicina, Sigma), além de Fator inibidor de Leucemia humano (*Human Leukemia Inhibitory Factor*- LIF, 1000U/mL, Millipore), iGSK3 (inibidor da via de sinalização da glicogênio sintase quinase 3, 3 μ M, Stemgent) e iMEK (inibidor da via de sinalização da proteína quinase ativada por mitógeno quinase (1 μ M , Stemgent) quando especificado.

7.3.5 Detecção da Expressão da fosfatase alcalina

A atividade da enzima fosfatase alcalina foi observada nas células iPS através do kit de detecção de fosfatase alcalina (*Leukocyte Alkaline Phosphatase Kit*, Sigma), segundo recomendações do fabricante. Resumidamente, cultivos celulares foram fixados, incubados com uma mistura de solução alcalina de naftol AS-BI com *fast red violet* LB. Depósitos insolúveis de corante vermelho indicam os sítios de atividade da fosfatase alcalina.

7.4 RESULTADOS

7.4.1 Detecção de H3K9me2 por imunofluorescência

O tratamento com as duas concentrações, 250 e 500nM, mostrou uma diminuição visual na fluorescência das células marcadas com anticorpo anti-H3K9me2 em relação ao controle (Figura 10). As duas concentrações não diferiram entre si, por isso, para os experimentos de reprogramação nuclear, optamos por utilizar a concentração mais baixa para evitar possíveis efeitos de toxicidade.

Figura 10 - Núcleo de células marcadas com anticorpo anti-H3K9me2

Fonte: SAMPAIO, R.V., 2015

Legenda: (a) Células cultivadas com 0,1% de DMSO, (b) células tratadas com 250nM de UNC0638 e (c) com 500nM. Os tratamentos não mostraram diferença visual, Todas as imagens foram feitas com o mesmo tempo de exposição e na mesma magnificação (20x).

7.4.2 Análise da expressão de genes relacionados às modificações epigenéticas

De maneira geral, os genes analisados relacionados à epigenéticas tiveram uma maior expressão no grupo tratado com UNC0638. Entretanto, somente dois foram diferentes estatisticamente. O primeiro foi DNMT1, responsável pela metilação do DNA (Figura 11).

Figura 11 - Expressão relativa de *DNMT1*, relacionado à metilação do DNA

Legenda: As barras indicam a média e o erro padrão da média de cada tipo celular. As células do grupo controle apresentaram menor expressão comparadas às tratadas. Foi observado uma diferença estatística na de expressão gênica ($P = 0,05$).

O outro gene que foi diferente entre as células analisadas foi o *KDM4C*, gene responsável pela desmetilação de histonas trimetiladas (Figura 12).

Figura 12 - Expressão relativa de *KDM4C*, relacionado à desmetilação de histonas trimetiladas

Legenda- As barras indicam a média e o erro padrão da média de cada tipo celular. As células do grupo controle apresentaram menor expressão comparadas às tratadas. Foi observado uma diferença estatística na de expressão gênica ($P = 0,008$).

7.4.3 Análise por Western Blotting de H3K9me2

Por meio da técnica de WB, avaliou-se o efeito do tratamento com UNC0638 e a privação de SFB sobre os níveis de H3K9me2 (Figura 13). Para tal, os grupos foram organizados como CTL (0,1% de DMSO), UNC (250nM de UNC0638), S-CTL (*starvation* + 0,1% de DMSO) e S-UNC (*starvation* + 250nM de UNC).

Figura 13 - Imagem ilustrativa dos níveis de H3K9me2 nos diferentes grupos de tratamento

Fonte: SAMPAIO, R.V., 2015

Legenda: (A) O grupo CTL apresentou visualmente a maior quantidade de H3K9me2 quando comparado aos demais grupos. O grupo S-UNC apresentou o menor nível de H3K9me2. (B) Representação gráfica dos valores encontrados. A mesma quantidade de proteína de cada grupo foi adicionada para a análise.

7.4.4 Quantificação de marcas epigenéticas por HCS

Visando a comparação entre os tratamentos sobre as marcas epigenéticas, foi realizada a análise de fluorescência pelo método de *High Content Screening*. Da mesma forma que na análise por WB, neste experimento quatro grupos foram analisados CTL (0,1% de DMSO), UNC (250nM de UNC0638), S-CTL (*starvation* + 0,1% de DMSO) e S-UNC (*starvation* + 250nM de UNC). Entre todas as modificações epigenéticas avaliadas (H3K9me2, H3K9me3, H3K9ac, 5hmC e 5mC), somente a marcação para 5mC apresentou diferença estatística entre os grupos analisados ($p < 0,05$) (Figura 14).

Figura 14 - Níveis de 5mC analisados por *High Content Screening*.

Legenda: O Gráfico mostra a média de intensidade de fluorescência do anticorpo anti-5mC em unidades arbitrárias. Letras diferentes nas colunas indicam diferença significativa encontrada no teste Tukey ($p < 0,05$).

7.4.5 Produção de Células Pluripotentes Induzidas (iPS)

Como descrito no delineamento, foram testados diferentes tratamentos nas células utilizadas na geração de células pluripotentes induzidas (iPS). Assim como na TNCS (Capítulo 5), foi avaliado o método de starvation de sincronização celular combinado com diferentes tratamentos de UNC0638. Além disso, foi analisado o efeito das mudanças na cromatina antes e depois da transdução com vetor policistrônico mSTEMCCA contendo os fatores de transcrição relacionados à pluripotência Oct4, Sox2, c-Myc e Klf4 murinos. Após 21 dias de cultivo, com renovação de meio a cada 48 horas, foi observado a formação de estruturas com morfologia típica de células tronco embrionárias induzidas (iPS). (Figura 15).

Figura 15 - Estruturas formadas 21 dias após a transdução

Fonte: SAMPAIO, R.V., 2015
Legenda: Estruturas similares às embrionárias observadas 21 dias após a transdução, nos grupos de tratamento (a) CTL, (c) UNC Pós, (d) UNC Pré-Pós, (e) S-CTL e (f) S-UNC. O grupo (b) UNC Pré não apresentou estas estruturas. (a,b,c e e) Aumento de 20x. (d e f) aumentos de 4x.

Estas estruturas foram classificadas como ‘colônias’, quando a morfologia das células era homogênea e apresentava bordas regulares; e como ‘formação’ aquelas com bordas indefinidas e células heterogêneas (

Figura 16).

Figura 16 - Quantificação das estruturas formadas após 21 dias de cultivo

Legenda: Essas estruturas foram classificadas como “Formação”, apresentam bordas irregulares e população celular heterogênea e “Colônias”, apresentam bordas regulares e população celular homogênea. Os tratamentos adotados estão descritos no quadro 3.

No dia 21º de cultivo o grupo S-CTL apresentou o maior número de estruturas morfológicas semelhantes às células embrionárias, grupo onde as células foram sincronizadas por starvation.

7.4.6 Detecção da Expressão da fosfatase alcalina nas colônias obtidas

Depois de cultivá-las por 9 passagens, foi feita a detecção da atividade de fosfatase alcalina nas colônias geradas (Figura 17).

Figura 17 - Detecção da atividade de fosfatase alcalina em colônias na nona passagem (P9)

Fonte: SAMPAIO, R.V., 2015

Legenda: (a) S-CTL P9 e (b) S-CTL P9, Aumento de 4 e 20x respectivamente. (c) S-UNC P9 e (d) S-UNC P9, Aumento de 4 e 20x, respectivamente. Depósitos insolúveis de corante vermelho indicam os sítios de atividade da fosfatase alcalina.

7.5 DISCUSSÃO E CONCLUSÕES PARCIAIS

O estudo da reprogramação nuclear sofreu uma grande revolução com o advento da tecnologia de geração de células tronco pluripotentes adultas(iPS). A possibilidade de reprogramar uma célula adulta à um estado pluripotente sem que haja a necessidade da destruição de embriões, torna as iPS alvos de diversas pesquisas (ZHAO et al., 2013). Além da pesquisa médica, com possibilidade de terapia celular autóloga, as iPS são importantes alvos na medicina veterinária. Ela permite, por exemplo, o estudo de células pluripotentes em animais cujo isolamento de células tronco embrionárias não foi bem estabelecido (KOH; PIEDRAHITA, 2014). Entretanto, a eficiência na geração destas células permanece baixa.

Tanto a sincronização celular por privação de SFB quanto por contato, são práticas comum na TNCS. A adoção da sincronização celular é apontada como uma das chaves no sucesso em gerar a ovelha Dolly (CAMPBELL, 1999). Entretanto, poucos se sabe sobre o efeito na reprogramação celular de iPS.

Em 2012, Chen e colaboradores mostraram que a privação por 18h e a reintrodução de SFB aumentou significativamente a produção de células positivas (CHEN et al., 2012). Os autores especularam que a sincronização dessas células facilitou a transdução. Este resultado está de acordo com os nossos achados, o grupo com células privadas de SFB antes da transdução, gerou mais colônias e formações que os outros grupos. Além disso, o grupo que além do *starvation* foi tratado com UNC0638, produziram as melhores colônias morfolologicamente (dados não mostrados). Mais caracterizações deverão ser realizadas para provar a pluripotencialidade dessas colônias.

Nossa análise por WB e por imunofluorescência mostrou uma diminuição aparente nos níveis de H3K9me2 nas células utilizadas na geração de iPS, entretanto, a análise quantitativa por HCS não confirmou esses dados. Experimentos e análises futuras poderão elucidar essa discrepância, uma vez que esta tecnologia é muito recente, mais testes serão necessários para a padronização da desse tipo de análise.

Alguns trabalhos, em camundongos, têm mostrado que o uso de BIX01294 resultou em melhoras na eficiência de geração de iPS. Em ensaios iniciais no nosso experimento também foi testado tratamento com este inibidor, no entanto, a alta toxicidade mostrada por ensaio de MTT (sigla em inglês para 3-(4, 5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2, 5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide) confirmaram que mesmo em baixas concentrações, a proliferação e viabilidade foram alteradas, sugerindo alta toxicidade (dados não mostrados). Essa variação

de resultados pode ser decorrência de uma resistência espécie-específica. Por isso, decidimos pela escolha do UNC0638, que é um inibidor específico e com baixa toxicidade para o cultivo celular (VEDADI et al., 2011).

Os resultados de expressão gênica para *DNMT1*, responsável por metilar a nova fita de DNA durante a divisão celular, foi significativamente maior nas células tratadas com UNC0638 ($p=0,051$) quando comparadas com o grupo controle. A *DNMT1* possui relação direta com a *G9a* durante replicação (ESTÈVE et al., 2006). Além disso, existem evidências que a *G9a* pode recrutar DNMTs para locus de genes como o OCT4 durante a diferenciação (EPSZTEJN-LITMAN et al., 2008).

Entretanto, os dados de *High Content Screening* mostraram que os níveis de metilação do DNA das células tratadas com UNC0638 foram menores que os encontrados nas células controle, mostrando que pode não haver relação do transcrito com a modificação epigenética presentes nas células dos dois grupos experimentais.

Uma maior expressão de *KDM4C*, gene responsável pela desmetilação de H3K9me3, foi encontrada nas células tratadas com UNC0638, é sabido que este gene está relacionado com o desenvolvimento embrionário, assim como a *G9a* (WANG et al., 2010), entretanto, não fomos hábeis para identificar uma possível relação desse aumento com a inibição de *G9a*.

A análise da expressão dos mesmos genes nas colônias iPS geradas por esses tratamentos poderão ajudar em um melhor entendimento dos mecanismos envolvidos durante a reprogramação nuclear ao longo da indução de células tronco pluripotentes (iPS).

**CAPÍTULO 5: ESTUDO DA INTERAÇÃO ENTRE OS NÍVEIS DE
H3K9ME2 DA CÉLULA DOADORA DE NÚCLEO SOBRE NÍVEIS 5MC
E 5HMC DE EMBRIÕES CLONADOS**

8 INTRODUÇÃO

Durante o desenvolvimento inicial de mamíferos diversos eventos como metilação do DNA, remodelamento da cromatina e modificação das histonas interagem para estabelecer um padrão epigenético que suporte o desenvolvimento embrionário (IKEGAMI; OHGANE; TANAKA, 2009). No entanto, o estabelecimento desse padrão epigenético durante a reprogramação nuclear de células somáticas por Transferência Nuclear de Células Somáticas (TNCS) é ineficiente.

Embriões gerados por TNCS frequentemente apresentam padrões anormais de metilação do DNA e modificações das histonas (KANG et al., 2001; SANTOS et al., 2003). Esses padrões aberrantes são atribuídos ao nível de diferenciação celular das células doadoras de núcleo, uma vez que este é inversamente proporcional à eficiência da reprogramação nuclear (HOCHEDLINGER; JAENISCH, 2002).

Todavia, a baixa eficiência na reprogramação por TNCS pode ser melhorada através da alteração dos níveis de metilação globais da célula doadora, ainda que esta seja diferenciada, a hipometilação induzida através de drogas modificadores de cromatina pode facilitar o remodelamento epigenético ocorrido durante o desenvolvimento embrionário inicial (BLELLOCH et al., 2006).

Além da metilação, a hidroxilação do DNA, uma outra modificação na posição 5 da citosina com atividade contrária à 5-metilcitosina (5mC), tem ganhado destaque no estudo do desenvolvimento embrionário inicial. A 5-hidroximetilcitosina (5hmC) é responsável pela desmetilação ativa do genoma paterno durante a fecundação (IQBAL et al., 2011; WOSSIDLO et al., 2011). A mesma enzima responsável por essa desmetilação que ocorre no genoma paterno, Tet 3, também está relacionada aos eventos que ocorrem no núcleo somático durante a reprogramação mediada por TNCS (GU et al., 2011). No entanto, pouco se sabe sobre o mecanismo envolvido.

Diferentemente do que ocorre no genoma paterno, o processo de desmetilação ocorre de forma passiva no genoma materno, e é dependente da replicação celular. A proteína STELLA é descrita como a principal barreira para que pró-núcleo feminino não seja desmetilado de forma ativa (NAKAMURA et al., 2007). Além dela, a presença da H3K9me2 também foi associada a este processo de proteção à desmetilação (NAKAMURA et al., 2012).

Embora alguns trabalhos tenham relacionado os níveis de metilação da H3K9 da célula doadora à eficiência da TNCS (FU et al., 2012; SANTOS et al., 2003), mais estudos

são necessários para entender o mecanismo cooperativo entre as modificações das histonas e a metilação de DNA durante a reprogramação nuclear.

8.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Neste capítulo a hipótese de que células com um menor nível de H3K9me2 são mais facilmente desmetiladas durante o desenvolvimento embrionário devido a menor proteção da cromatina no processo de hidroxilação do DNA foi testada.

Para isso, nosso estudo foi dividido em dois grupos: um grupo de células tratadas com UNC0638 (grupo UNC), uma probe química inibidora específica das metiltransferases de histonas (HMTs, do inglês *histone methyltransferase*) G9a e GLP; e um grupo controle, com células sem tratamento, e contendo 0,1% de DMSO (veículo utilizado para diluir a droga), chamado a partir daqui de CTL. Além do tratamento, as células de ambos os grupos foram privadas soro fetal bovino (meio contendo 0,5% de SFB) para a sincronização celular.

No capítulo 4 analisamos o efeito do tratamento com UNC0638 e da privação de SFB sobre os níveis de H3K9me2, H3K9me3, H3K9ac, 5mC e 5hmC. Estas mesmas células também foram utilizadas como doadoras de núcleo na TNCS, e analisadas neste capítulo.

A análise do efeito do tratamento com UNC0630 sobre as modificações, bem como a análise de expressão gênica dos genes responsáveis por tais modificações foram feitas no capítulo 6.

Após o processo de TNCS, zigotos 18 horas após a ativação e blastocistos no sétimo dia cultivo foram coletados e fixados para análise dos níveis de 5mC e 5hmC por imunofluorescência. Além disso, embriões produzidos por fecundação in vitro também foram coletados e fixados no mesmo período de desenvolvimento para serem utilizados como referência, visto que possuem melhor potencial de desenvolvimento em relação aos clones (YANG et al., 2007). O delineamento experimental está ilustrado na Figura 18.

Figura 18 - Desenho esquemático ilustrando os experimentos realizados no capítulo 5

Fonte: SAMPAIO, R.V., 2015

8.2 MATERIAL E MÉTODOS

8.2.1 Cultivo celular

O protocolo de coleta, cultivo e tratamento das células doadoras de núcleo está descrito no capítulo 4.

8.2.2 Transferência Nuclear de Células Somáticas

Foram realizadas 7 rotinas de TNCS, as células doadoras de núcleo foram divididas em dois grupos: um grupo controle com 0,1% de DMSO e um grupo tratado com 250nM de UNC0638 durante 4 dias. Durante os dois primeiros dias, ambos os grupos foram cultivados com meio de cultivo Alpha-MEM (Life Technologies) com antibióticos e suplementado com 10% SFB, nos dois últimos dias, o meio de cultivo foi mantido, exceto a concentração de SFB foi reduzida para 0,5% para sincronização celular. De acordo com nossos resultados prévios, a privação de SFB durante 24h é suficiente para a sincronização do ciclo celular em G1/G0 (Miranda et al., 2009). No entanto, combinamos a privação de soro com o protocolo de melhor eficiência do tratamento com UNC0638 sugerido por Vedadi e colaboradores: este consiste de 96h de tratamento, com renovação do meio de cultivo após 48h devido a degradação da droga (VEDADI et al., 2011). O procedimento detalhado adotado na transferência nuclear foi descrito anteriormente no capítulo 3.

8.2.3 Fecundação in vitro

O procedimento de coleta dos ovários, seleção de COCs e maturação in vitro foram os mesmos adotados na TNCS. Estes procedimentos estão descritos no capítulo 03. Os demais protocolos estão descritos a seguir.

8.2.3.1 Processamento do sêmen e fecundação in vitro.

Depois da MIV dos oócitos e após a descongelação (37°C/30 segundos) do sêmen, o mesmo foi depositado em gradiente de Percoll 45% e 90% previamente preparado. Após centrifugação por 7 minutos a 3600xg, o sedimento suspenso foi removido, e então foram adicionados 500µL de meio de fecundação, procedendo-se nova centrifugação por 5 minutos a 520xg. Em seguida foi corrigida a dose de sêmen para 100×10^3 espermatozóides por microgota, avaliando-se concentração e motilidade espermática, e a mesma foi adicionada nas

gotas de fertilização onde os espermatozoides, na presença de heparina, foram capacitados. Os oócitos maturados foram transferidos para as gotas após serem lavados duas vezes em meio TL-Sêmen. O meio de fecundação era composto por TALP-FIV, 6mg/mL de BSA-FAF, 83,4µg/mL de amicacina e, 0,2 mM piruvato de sódio, 10 ug / mL de heparina, 18 mM de penicilamina, 10 uM de hipotaurina e 1,8 uM de epinefrina, e as gotas cobertas por óleo mineral. As placas então foram incubadas para a fecundação por 18 a 20 horas a 38,5 °C e atmosfera de 5% de CO₂. Sêmen do mesmo touro foi utilizado para todos os tratamentos e replicatas.

8.2.3.2 Cultivo in vitro de embriões.

Os presumíveis zigotos foram transferidos da placa de FIV para uma gota contendo 150 µL de meio TL-Sêmen para a remoção das células do cumulus remanescentes por meio de pipetagens sucessivas. Após a remoção, os mesmos foram separados das células desagregadas e lavados duas a três vezes em meio SOFaa (fluido sintético de oviduto acrescido de aminoácidos). Em seguida, foram distribuídos em gotas contendo meio composto por SOF suplementado com 5mg/mL de BSA e 2,5% de SFB, 0,2mM de piruvato de sodio e 50 µg/mL de gentamicina. As placas foram mantidas em incubadora a 38,5°C e 5% de CO₂ em ar e umidade alta, e trocas de meio foram realizadas nos dias 3 e 6 do cultivo, sendo a duração do CIV de 7 dias (fertilização corresponde ao dia 0).

8.2.3.3 Imunofluorescência para detecção de 5mC e 5hmC.

O procedimento de imunocitoquímica para detecção da 5mC e 5hmC foi realizado conforme os trabalhos de Inoue (2011) e Canovas (2011), com poucas modificações (CANOVAS; CIBELLI; ROSS, 2012; INOUE; ZHANG, 2011). Resumidamente, embriões clones com 18 horas após a ativação artificial, blastocistos clonados no sétimo dia de cultivo, bem como embriões produzidos por FIV 18h após a fecundação e blastocistos FIV também no sétimo dia de cultivo destinados à imunocitoquímica foram lavadas com PBS para a remoção do meio de cultivo, e fixados em paraformaldeído 4% por 20 min e armazenados em PBS

com 0,1% de PVP à 4°C para as análises futuras. Para a permeabilização, os embriões foram incubados em PBS com 1% de Triton X-100 em temperatura ambiente por 15 min, em seguida, incubados por 12 min em HCl 4N para desnaturação do DNA e neutralizados em 100mM de Tris-HCl (pH 8.5) por 20 min. Os embriões foram bloqueados em PBS com 1% de BSA por 30 min à temperatura ambiente. Os embriões foram então encubados com anticorpos específicos anti-5 methylcytidine (clone 33D3, #sc-56615; Santa Cruz, Santa Cruz, CA, USA) e anti-5 hydroxymethylcytosine (polyclonal, #AP9160a; Abgent - San Diego, CA, USA) diluídos na concentração de 1:300 em PBS à 4°C overnight. Após 2h lavando em 0,1% de Triton X-100, os embriões foram incubados com anticorpos secundários Goat anti-MOUSE IgG - AlexaFluor 488 (#11008, Invitrogen - Foster City, CA, EUA) e Goat anti-rabbit IgG - Texas Red (#111075144, Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA) diluídos na concentração de 1:400 em PBS por 1h à temperatura ambiente. O controle negativo consistiu em uma parte das células incubada somente com o PBS sem o anticorpo primário. Para a análise os embriões foram montados em lâminas com 12µL de solução anti-fade (ProLong Antifade Gold reagent with DAPI; Invitrogen) e cobertos com lamínulas. Por fim, as amostras foram analisadas por microscopia de fluorescência utilizando microscópio Zeiss e o software AXIOVISION 4.7.1 (Carl Zeiss).

8.3 RESULTADOS

8.3.1 Transferência Nuclear de Células com diferentes níveis de H3K9me2

Foram realizadas 7 rotinas de TNCS divididas entre os grupos controle (CTL) e tratado (UNC). Os embriões foram avaliados quanto as taxas de clivagem e de blastocisto, e não foi observada diferença estatística em nenhuma das taxas de desenvolvimento analisadas ($p > 0,05$) (Tabela 2).

Tabela 2 - Taxas de desenvolvimento embrionário dos grupos CTL e UNC.

Sincronização Celular	Tratamento	Clivagem % (EP)	Blastocistos % (EPM)
Starvation (0,5% de SFB)	CTL (0,1% DMSO)	67,71 ± 19,48 (7,9)	22,16 ± 11,00 (4,1)
	UNC (250nM UNC0638)	57,03 ± 22,72 (9,2)	19,89 ± 6,84 (2,5)

Legenda- As taxas de desenvolvimento embrionário foram comparadas entre os dois grupos. O número de embriões clivados e de blastocistos não apresentaram diferença estatística entre os dois grupos. Sete rotinas de transferência nuclear foram realizadas ($p < 0,05$).

8.3.2 Análise dos níveis de 5mC e 5hmC por imunofluorescência.

Imagens de embriões com 18h de cultivo tanto de FIV, quanto dos grupos CTL e UNC gerados por TNCS foram capturadas para análise relativa de fluorescência das duas marcações, 5hmC e 5mC (Figura 19).

Figura 19 - Imagens ilustrativas mostrando a diferenças entre intensidade de fluorescência dos diferentes grupos analisados

Fonte: SAMPAIO, R.V., 2015

Legenda: (a) Zigoto produzido por FIV 18h após a fecundação, (a') marcado com anticorpo anti-5hmC e (a'') com anticorpo anti-5mC. (b) Embrião de 1 célula produzido por TNCS com célula CTL, (b') marcado com anticorpo anti-5hmC e (b'') com anticorpo anti-5mC. (c) Embrião de 1 célula produzido por TNCS com célula tratada com 250nM de UNC0638, (c') marcado com anticorpo anti-5hmC e (c'') com anticorpo anti-5mC. As setas indicam a localização dos pró-núcleos. Todas as imagens foram feitas na mesma magnificação (40x).

Todas as imagens foram feitas com mesmo tempo de exposição para a comparação quanto aos níveis de intensidade de fluorescência. O nível de 5hmC dos embriões FIV foi menor que o nível apresentado pelo grupo CTL e em relação ao grupo UNC não apresentou diferença estatística. O nível 5hmC não foi significativamente diferente entre os grupos CTL e UNC (Figura 20).

Figura 20 - Intensidade relativa dos zigotos referentes aos níveis de metilação (5mC) e hidroxilação do DNA (5hmC)

Legenda: Os grupos foram divididos de acordo com a origem. Embriões com 18 pós-fecundação (FIV) e embriões produzidos por TNCS 18h pós-ativação de dois grupos: controle (CTL) e tratado (UNC). As letras diferentes indicam os grupos que apresentaram diferença estatística quando comparados entre si em relação aos níveis de 5hmC ($p < 0,05$).

Em relação ao nível de 5mC, a intensidade foi diferente estatisticamente entre todos os grupos analisados. O menor nível foi encontrado em embriões gerados por FIV, seguido do nível do grupo UNC, consequentemente, o maior nível de metilação foi encontrado no grupo CTL. Somente os embriões gerados por FIV apresentaram diferença estatística entre as intensidades de 5hmC e 5mC (Figura 21).

Figura 21 - Intensidade relativa dos zigotos referentes aos níveis de metilação (5mC)

Legenda: Os grupos foram divididos de acordo com a origem. Embriões com 18 pós-fecundação (FIV) e embriões produzidos por TNCS 18h pós-ativação de dois grupos: controle (CTL) e tratado (UNC). As letras diferentes indicam os grupos que apresentaram diferença estatística quando comparados entre si em relação aos níveis de 5mC ($p < 0,05$).

Para análise dos blastocistos gerados foi calculada a razão entre os níveis de 5hmC em relação aos níveis de 5mC dos diferentes grupos de embriões (Figura 22). Todas as imagens foram feitas com o mesmo tempo de exposição para análise.

Figura 22 - Imagens ilustrativas mostrando os níveis de 5hmC e 5mC em blastocistos de diferentes origens

Fonte: SAMPAIO, R.V., 2015

Legenda: (a) Blastocisto produzido por FIV marcado com anticorpo anti-5hmC e (a') com anticorpo anti-5mC. (b) Blastocisto produzido por TNCS com célula CTL marcado com anticorpo anti-5hmC e (b) com anticorpo anti-5mC. (c) Blastocisto produzido por TNCS com célula doadora tratada UNC marcado com anticorpo anti-5hmC e (c) com anticorpo anti-5mC. Todas as imagens foram feitas na mesma magnificação (400x).

A razão entre os níveis das marcas citadas foi em média de 2,5 entre os embriões gerados por FIV (Figura 23). Essa razão, quando comparada aos grupos de TNCS, foi diferente estatisticamente. No entanto, não foi encontrada diferença entre a razão dos grupos CTL e UNC.

Figura 23 - Razão entre os níveis de 5hmC e 5mC dos diferentes grupos de embriões

Legenda: As letras diferentes indicam os grupos que apresentaram diferença estatística quando comparados aos níveis de 5hmC ou 5mC ($p < 0,05$).

8.4 DISCUSSÃO E CONCLUSÕES PARCIAIS

Neste capítulo nós avaliamos os níveis metilação e hidroxilação de DNA dos embriões gerados por TNCS usando células tratadas com UNC0638, uma probe química inibidora da G9a/GLP, HMTs responsáveis pela bimetilação da histona H3, na lisina 9.

Diversos trabalhos no campo da reprogramação nuclear têm investigado a relação das modificações de histonas com a eficiência do processo de reprogramação da memória epigenética da célula somática (PASQUE et al., 2011). A bimetilação da H3K9 (H3K9me2) foi demonstrada ser uma barreira no processo de geração de células iPS em camundongos (CHEN et al., 2013). Outro estudo recente mostrou que no processo de reprogramação por TNCS a H3K9me3 também se comporta como uma barreira, prevenindo que genes essenciais para o desenvolvimento embrionário, silenciados no núcleo somático, sejam reativados

durante a transferência nuclear de camundongos (MATOBA et al., 2014). Além disso, os autores mostraram que quando os níveis dessa marcação foram diminuídos, a eficiência aumentou significativamente, demonstrando assim, o seu papel de proteção na reprogramação de células somáticas.

Além da metilação das histonas, diversos trabalhos têm relacionado o aumento na eficiência da TN as outras modificações, principalmente a acetilação de histona (KISHIGAMI et al., 2006; MARTINEZ-DIAZ et al., 2010; AKAGI et al., 2011;). Estes trabalhos utilizaram principalmente inibidores das desacetilases das histonas (HDACs, do inglês *histone deacetylase*) para modificar o epigenoma. No entanto, os resultados são controversos, apresentando diferentes efeitos dependendo das espécies estudadas. Em camundongos (KISHIGAMI et al., 2006) e suínos (ZHAO et al., 2009) estas drogas apresentaram melhoria na eficiência da clonagem, enquanto em bovinos seus efeitos permanecem controversos (IAGER et al., 2008; SANGALLI et al., 2012).

Inibidores de HMTs também tem sido utilizado no estudo da reprogramação mediada por TNCS ou pluripotência induzida. Além da eficiência mostrada na geração de células iPS (discutido no capítulo 4), o inibidor de G9a, BIX01294, também foi utilizado visando o aumento da eficiência na TNCS em ovelhas (FU et al., 2012). Entretanto, o tratamento de células doadoras com esta droga mostrou-se ser altamente tóxico, levando a lise celular durante o processão de fusão na TNCS. Os mesmos autores investigaram os efeitos do BIX após a ativação e não observaram diferença na produção de embriões clonados.

Inicialmente em nosso trabalho também foi utilizado o BIX-01294, contudo, ensaios de MTT (sigla em inglês para 3-(4, 5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2, 5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide) confirmaram que mesmo em baixas concentrações, este a proliferação e viabilidade, sugerindo toxicidade (dados não mostrados). Por isso decidimos pela escolha do UNC0638, que é um inibidor mais específico e com baixa toxicidade para o cultivo celular (VEDADI et al., 2011).

Nossos resultados mostraram que o tratamento com um inibidor específico de HMTs, a UNC0638, nas células doadoras de núcleo foi capaz de diminuir os níveis de metilação de DNA dos pseudo-pró-núcleos de embriões clonados quando comparados àqueles formados a partir das células controle. Essa diminuição confirma nossa hipótese de que uma célula somática com menores níveis de H3K9me2 pode ser desmetilada mais facilmente. Uma das explicações para entendimento da redução do nível de 5mC apresentado nos zigotos de clone, pode ser o nível menor de metilação das células tratadas encontrado na análise por HCS. No

entanto, por se tratar de um novo tipo de análise, experimentos futuros poderão esclarecer melhor esses resultados.

Por outro lado, esse resultado pode ser explicado por meio dos mecanismos encontrados no desenvolvimento embrionário durante a fecundação. Em 2012 Nakamura et al. mostraram que o pro-núcleo materno é protegido contra a desmetilação ativa através da ligação da proteína STELLA com a H3K9me2 presentes desde o desenvolvimento oocitário, diferentemente do ocorre no espermatozoide, empacotado principalmente por protaminas (NAKAMURA et al., 2012). Essa relação de proteção da H3K9me2 contra a desmetilação pode explicar os resultados encontrados em nosso trabalho, pois além de uma menor metilação no grupo tratado, os níveis de 5hmC do grupo UNC não apresentaram diferença quando comparados aos embriões gerados por fecundação *in vitro*.

Estudos relacionando o papel da STELLA no núcleo somático durante a transferência nuclear podem ajudar a melhor compreensão destes processos nos resultados encontrados. Outro mecanismo de grande relevância é a interação entre a G9a e as DNMTs na regulação da metilação do DNA, uma vez que estas estão intimamente ligados no processo de silenciamento de genes como o Oct-4 na diferenciação durante o desenvolvimento embrionário inicial (FELDMAN et al., 2006).

A desmetilação ineficiente ocorrida durante o desenvolvimento embrionário de clones é apontada como uma das principais causas de erros epigenéticos na reprogramação nuclear, devido a persistência da hipermetilação tanto do DNA quanto de histonas (DEAN et al., 2001; SANTOS et al., 2003). Essa falha proporciona, por exemplo, um padrão aberrante de metilação e mudanças na expressão gênica de bezerros clonados comparados a bezerros gerados por reprodução sexuada (LIN et al., 2008).

Alguns trabalhos sugerem que a hipometilação global induzida das células doadoras, seja por drogas específicas como a 5-aza-2'-deoxycytidine -um inibidor de metiltransferases- (DING et al., 2008; KUMAR et al., 2013) ou através da manipulação gênica (BLELLOCH et al., 2006), podem aumentar a eficiência da transferência nuclear. Em nosso estudo, os níveis de metilação do DNA encontrados nos zigotos tratados foram mais próximos aos níveis dos pró-núcleos oriundos de FIV, do que aos níveis de metilação do grupo controle. Porém, as taxas de desenvolvimento embrionários não foram diferentes estatisticamente entre os grupos gerados por células controle e tratadas. A não correspondência entre os baixos níveis de metilação do DNA com o aumento nas taxas de desenvolvimento encontrados em nossos resultados está de acordo com os resultados encontrados por outros trabalhos (ENRIGHT et al., 2003, 2005).

Além dos níveis de intensidade de fluorescência dos pró-núcleos analisamos também a razão entre metilação e hidroxilação do DNA. Os embriões de FIV apresentaram uma razão de 2,5, enquanto que os embriões de clone apresentaram uma razão de 1 e 0,8 nos grupos CTL e UNC, respectivamente. Nenhuma diferença foi encontrada entre os dois grupos de embriões clonados. A análise dos níveis de metilação e hidroximetilação por imunofluorescência em blastocistos é complexa devido a compactação da massa celular interna e da tridimensionalidade dos blastocistos. Futuros estudos avaliando estas modificações usando ensaios de metilação/hidroximetilação baseados em ELISA, ou sequenciamento após tratamento com bissulfito ajudarão a elucidar a relação entre estas modificações.

DNMT1, responsável por metilar a nova fita de DNA durante a divisão celular, foi significativamente mais expresso nas células tratadas com UNC0638 ($p=0,051$). A *DMNT1* possui relação direta com a *G9a* durante replicação (ESTEVE et al., 2006), entretanto, os níveis de metilação do DNA das células tratadas com UNC0638 apresentaram menor nível de metilação que as células controle, mostrando não haver relação do transcrito com a modificação presente.

Além da análise global dessas marcas epigenéticas, estudos sobre a regulação específica de genes importantes para o desenvolvimento embrionário são necessários para uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos no processo de reprogramação epigenética do núcleo somático. Abordagens como MeDIP e h-MEDIP, técnicas utilizadas para isolar regiões genômicas metiladas e hidroxiladas, respectivamente, poderão elucidar os genes alterados no desenvolvimento embrionário de clones.

Dentre os possíveis genes candidatos, os genes imprinted, surgiram como fortes candidatos para serem os responsáveis pelas baixas taxas de desenvolvimento observado nos clones. Estes possuem regulação por metilação de DNA de forma parental, e chamam a atenção por serem conhecidamente desregulados na clonagem (SMITH et al., 2012). Mudanças no controle epigenético destes genes durante o desenvolvimento embrionário *in vitro*, com maior frequência em clones, têm sido apontadas como a principal responsável pelo surgimento da Síndrome do Bezerro Macrossômico ((LOS) do inglês *Large offspring syndrome*) (YOUNG et al., 2001; YOUNG; SINCLAIR; WILMUT, 1998). Análises em placentas e fetos oriundos da TNCS têm mostrado que a hipometilação das regiões diferencialmente metiladas de genes imprinted seria uma das causas da falha no desenvolvimento de clones (SUZUKI et al., 2011).

A regulação dos genes imprinted também tem sido associada à modificação de histonas. Estudos em camundongos mostraram que genes imprinted paternalmente metilados, como H19-Igf2 e Rasgrf, podem ser protegidos contra a desmetilação quando ligados ao complexo H3k9me2/STELLA durante a fecundação (NAKAMURA et al., 2012). O mesmo mecanismo de proteção dos genes imprinted também foi observado no complexo formado entre H3K9me3 e as proteínas Trim28/Zfp57 no início da embriogênese (MESSERSCHMIDT et al., 2012) e nas células tronco embrionárias (QUENNEVILLE et al., 2012).

Estes estudos destacam a importância da interação entre as modificações de histonas com a metilação DNA. Nossos resultados corroboram com esta interação, entretanto, mais estudos são necessários para entender os mecanismos envolvidos em todas essas relações epigenéticas durante o desenvolvimento embrionário, principalmente em bovinos, nos quais estes são pobremente entendidos.

CAPÍTULO 6: CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

9 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Neste estudo, propomos a utilização de células com diferentes características epigenéticas para o entendimento da reprogramação nuclear de bovinos. Para isso, utilizamos dois métodos de reprogramação, a transferência nuclear e a geração de células tronco pluripotentes induzidas.

Ao utilizarmos células mesenquimais isoladas do tecido adiposo como doadoras de núcleo na TNCS, verificamos que as taxas de desenvolvimento embrionário não diferiram em relação ao grupo controle, no entanto, o tecido adiposo se mostrou como uma excelente fonte de células viáveis para a TNCS. Estudos analisando o padrão de expressão gênica dos embriões gerados, bem como o desenvolvimento a termo, poderão ser mais precisos na análise de diferença entre os dois tipos celulares.

Em relação a diminuição dos níveis de H3K9me2 de células submetidas a reprogramação por TNCS e a geração de iPS, nossos resultados indicaram uma relação direta dos níveis de H3K9me2 da célula doadora de núcleo com os níveis de metilação no início do desenvolvimento.

O tratamento com UNC0638 na geração de iPS não aumentou a produção de colônias em relação ao controle, entretanto, análises epigenéticas das colônias geradas com esse tratamento podem elucidar o efeito após o processo de reprogramação e manutenção da pluripotência. Apesar disso, surpreendentemente, constatamos que as células submetidas à privação de SFB por 48h geraram mais colônias e estruturas semelhantes às colônias de células embrionárias que os outros tratamentos. Este resultado indica a importância de estudos do e sua influência na geração de iPS bovinas.

Desta forma, os resultados obtidos nesse estudo colaboram com o entendimento de mecanismos envolvidos na reprogramação, tanto na TNCS quanto na geração de iPS e consequentemente servem de base para novas análises, necessárias para a melhor compreensão de alguns resultados.

REFERENCIAS

AASEN, T.; RAYA, A.; BARRERO, M. J.; GARRETA, E.; CONSIGLIO, A.; GONZALEZ, F.; VASSEN, R.; BILIĆ, J.; PEKARIK, V.; TISCORNIA, G.; EDEL, M.; BOUÉ, S.; IZPISÚA BELMONTE, J. C. Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes. **Nature biotechnology**, v. 26, n. 11, p. 1276–84, nov. 2008.

AKAGI, S.; MATSUKAWA, K.; MIZUTANI, E.; FUKUNARI, K.; KANEDA, M.; WATANABE, S.; TAKAHASHI, S. Treatment with a histone deacetylase inhibitor after nuclear transfer improves the preimplantation development of cloned bovine embryos. **The Journal of reproduction and development**, v. 57, n. 1, p. 120–6, fev. 2011.

ANOKYE-DANSO, F.; TRIVEDI, C. M.; JUHR, D.; GUPTA, M.; CUI, Z.; TIAN, Y.; ZHANG, Y.; YANG, W.; GRUBER, P. J.; EPSTEIN, J. A.; MORRISEY, E. E. Highly efficient miRNA-mediated reprogramming of mouse and human somatic cells to pluripotency. **Cell stem cell**, v. 8, n. 4, p. 376–88, 8 abr. 2011.

BAR-NUR, O.; RUSS, H. A.; EFRAT, S.; BENVENISTY, N. Epigenetic memory and preferential lineage-specific differentiation in induced pluripotent stem cells derived from human pancreatic islet beta cells. **Cell stem cell**, v. 9, n. 1, p. 17–23, 8 jul. 2011.

BAYLIN, S. B. DNA methylation and gene silencing in cancer. [s.d.].

BIRD, A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. **Genes & development**, v. 16, n. 1, p. 6–21, 1 jan. 2002.

BIRD, A. Perceptions of epigenetics. **Nature**, v. 447, n. 7143, p. 396–8, 24 maio 2007.

BLACK, J. C.; VAN RECHEM, C.; WHETSTINE, J. R. Histone lysine methylation dynamics: establishment, regulation, and biological impact. **Molecular cell**, v. 48, n. 4, p. 491–507, 30 nov. 2012.

BLELLOCH, R.; WANG, Z.; MEISSNER, A.; POLLARD, S.; SMITH, A.; JAENISCH, R. Reprogramming efficiency following somatic cell nuclear transfer is influenced by the differentiation and methylation state of the donor nucleus. **Stem cells (Dayton, Ohio)**, v. 24, n. 9, p. 2007–13, set. 2006.

BOSCH, P.; PRATT, S. L.; STICE, S. L. Isolation, characterization, gene modification, and nuclear reprogramming of porcine mesenchymal stem cells. **Biology of reproduction**, v. 74, n. 1, p. 46–57, 1 jan. 2006.

BRANCO, M. R.; FICZ, G.; REIK, W. Uncovering the role of 5-hydroxymethylcytosine in the epigenome. **Nature reviews. Genetics**, v. 13, n. 1, p. 7–13, jan. 2012.

BRESSAN, F. F. B. **Geração de células pluripotentes através da indução gênica e transferência de núcleo: modelo bovino de aquisição de pluripotência**. [s.l.] Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, 2013.

CAMPBELL, K. H. Nuclear equivalence, nuclear transfer, and the cell cycle. **Cloning**, v. 1, n. 1, p. 3–15, 5 jan. 1999.

CAMPBELL, K. H.; MCWHIR, J.; RITCHIE, W. A.; WILMUT, I. Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. **Nature**, v. 380, n. 6569, p. 64–6, 7 mar. 1996.

CANOVAS, S.; CIBELLI, J. B.; ROSS, P. J. Jumonji domain-containing protein 3 regulates histone 3 lysine 27 methylation during bovine preimplantation development. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, p. 2400–2405, 2012.

CARDOSO, M. C. DNA Methyltransferase Is Actively Retained in the Cytoplasm during Early Development. **The Journal of Cell Biology**, v. 147, n. 1, p. 25–32, 4 out. 1999.

CHEN, J.; LIU, H.; LIU, J.; QI, J.; WEI, B.; YANG, J.; LIANG, H.; CHEN, Y.; CHEN, J.; WU, Y.; GUO, L.; ZHU, J.; ZHAO, X.; PENG, T.; ZHANG, Y.; CHEN, S.; LI, X.; LI, D.; WANG, T.; PEI, D. H3K9 methylation is a barrier during somatic cell reprogramming into iPSCs. **Nature genetics**, v. 45, n. 1, p. 34–42, jan. 2013.

CHEN, M.; HUANG, J.; YANG, X.; LIU, B.; ZHANG, W.; HUANG, L.; DENG, F.; MA, J.; BAI, Y.; LU, R.; HUANG, B.; GAO, Q.; ZHUO, Y.; GE, J. Serum starvation induced cell cycle synchronization facilitates human somatic cells reprogramming. **PloS one**, v. 7, n. 4, p. e28203, 18 jan. 2012.

COLLEONI, S.; DONOFRIO, G.; LAGUTINA, I.; DUCHI, R.; GALLI, C.; LAZZARI, G. Establishment, differentiation, electroporation, viral transduction, and nuclear transfer of bovine and porcine mesenchymal stem cells. **Cloning and stem cells**, v. 7, n. 3, p. 154–66, 21 jan. 2005.

COSTA, F. F. Non-coding RNAs, epigenetics and complexity. **Gene**, v. 410, n. 1, p. 9–17, 29 fev. 2008.

COWAN, C. A.; ATIENZA, J.; MELTON, D. A.; EGGAN, K. Nuclear reprogramming of somatic cells after fusion with human embryonic stem cells. **Science (New York, N.Y.)**, v. 309, n. 5739, p. 1369–73, 26 ago. 2005.

DAHL, C.; GRØNBÆK, K.; GULDBERG, P. Advances in DNA methylation: 5-hydroxymethylcytosine revisited. **Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry**, v. 412, n. 11-12, p. 831–6, 12 maio 2011.

DE MATTOS CARVALHO, A.; ALVES, A. L. G.; GOLIM, M. A.; MOROZ, A.; HUSSNI, C. A.; DE OLIVEIRA, P. G. G.; DEFFUNE, E. Isolation and immunophenotypic characterization of mesenchymal stem cells derived from equine species adipose tissue. **Veterinary immunology and immunopathology**, v. 132, n. 2-4, p. 303–6, 15 dez. 2009.

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, 20 nov. 2001.

DING, X.; WANG, Y.; ZHANG, D.; GUO, Z.; ZHANG, Y. Increased pre-implantation development of cloned bovine embryos treated with 5-aza-2'-deoxycytidine and trichostatin A. **Theriogenology**, v. 70, n. 4, p. 622–30, 1 set. 2008.

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.

EMINLI, S.; FOUDI, A.; STADTFELD, M.; MAHERALI, N.; AHFELDT, T.; MOSTOSLAVSKY, G.; HOCK, H.; HOCHEDLINGER, K. Differentiation stage determines potential of hematopoietic

cells for reprogramming into induced pluripotent stem cells. **Nature genetics**, v. 41, n. 9, p. 968–76, set. 2009.

ENRIGHT, B. P.; KUBOTA, C.; YANG, X.; TIAN, X. C. Epigenetic characteristics and development of embryos cloned from donor cells treated by trichostatin A or 5-aza-2'-deoxycytidine. **Biology of reproduction**, v. 69, n. 3, p. 896–901, 1 set. 2003.

ENRIGHT, B. P.; SUNG, L.-Y.; CHANG, C.-C.; YANG, X.; TIAN, X. C. Methylation and acetylation characteristics of cloned bovine embryos from donor cells treated with 5-aza-2'-deoxycytidine. **Biology of reproduction**, v. 72, n. 4, p. 944–8, abr. 2005.

EPSZTEJN-LITMAN, S.; FELDMAN, N.; ABU-REMAILEH, M.; SHUFARO, Y.; GERSON, A.; UEDA, J.; DEPLUS, R.; FUKS, F.; SHINKAI, Y.; CEDAR, H.; BERGMAN, Y. De novo DNA methylation promoted by G9a prevents reprogramming of embryonically silenced genes. **Nature structural & molecular biology**, v. 15, n. 11, p. 1176–83, nov. 2008.

ESTEBAN, M. A.; WANG, T.; QIN, B.; YANG, J.; QIN, D.; CAI, J.; LI, W.; WENG, Z.; CHEN, J.; NI, S.; CHEN, K.; LI, Y.; LIU, X.; XU, J.; ZHANG, S.; LI, F.; HE, W.; LABUDA, K.; SONG, Y.; PETERBAUER, A.; WOLBANK, S.; REDL, H.; ZHONG, M.; CAI, D.; ZENG, L.; PEI, D. Vitamin C enhances the generation of mouse and human induced pluripotent stem cells. **Cell stem cell**, v. 6, n. 1, p. 71–9, 8 jan. 2010.

ESTÈVE, P.-O.; CHIN, H. G.; SMALLWOOD, A.; FEEHERY, G. R.; GANGISETTY, O.; KARPF, A. R.; CAREY, M. F.; PRADHAN, S. Direct interaction between DNMT1 and G9a coordinates DNA and histone methylation during replication. **Genes & development**, v. 20, n. 22, p. 3089–103, 15 nov. 2006.

FAAST, R.; HARRISON, S. J.; BEEBE, L. F. S.; MCILFATRICK, S. M.; ASHMAN, R. J.; NOTTLE, M. B. Use of adult mesenchymal stem cells isolated from bone marrow and blood for somatic cell nuclear transfer in pigs. **Cloning and stem cells**, v. 8, n. 3, p. 166–73, 29 jan. 2006.

FELDMAN, N.; GERSON, A.; FANG, J.; LI, E.; ZHANG, Y.; SHINKAI, Y.; CEDAR, H.; BERGMAN, Y. G9a-mediated irreversible epigenetic inactivation of Oct-3/4 during early embryogenesis. **Nature Cell Biology**, v. 8, n. 2, p. 188–194, fev. 2006.

FRANCASTEL, C.; SCHÜBELER, D.; MARTIN, D. I.; GROUDINE, M. Nuclear compartmentalization and gene activity. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 1, n. 2, p. 137–43, nov. 2000.

FU, L.; ZHANG, J.; YAN, F.-X.; GUAN, H.; AN, X.-R.; HOU, J. Abnormal histone H3K9 dimethylation but normal dimethyltransferase EHMT2 expression in cloned sheep embryos. **Theriogenology**, v. 78, n. 9, p. 1929–38, dez. 2012.

GEIMAN, T. M.; ROBERTSON, K. D. Chromatin remodeling, histone modifications, and DNA methylation-how does it all fit together? **Journal of cellular biochemistry**, v. 87, n. 2, p. 117–25, jan. 2002.

GIMBLE, J. M. Adipose tissue-derived therapeutics. **Expert opinion on biological therapy**, v. 3, n. 5, p. 705–13, ago. 2003.

GLOBISCH, D.; MÜNZEL, M.; MÜLLER, M.; MICHALAKIS, S.; WAGNER, M.; KOCH, S.; BRÜCKL, T.; BIEL, M.; CARELL, T. Tissue distribution of 5-hydroxymethylcytosine and search for active demethylation intermediates. **PloS one**, v. 5, n. 12, p. e15367, jan. 2010.

GOLBABAPOUR, S.; ABDULLA, M. A.; HAJREZAEI, M. **A concise review on epigenetic regulation: insight into molecular mechanisms.** [s.l: s.n.]. v. 12p. 8661–94

GOLL, M. G.; KIRPEKAR, F.; MAGGERT, K. A.; YODER, J. A.; HSIEH, C.-L.; ZHANG, X.; GOLIC, K. G.; JACOBSEN, S. E.; BESTOR, T. H. Methylation of tRNA^{Asp} by the DNA methyltransferase homolog Dnmt2. **Science (New York, N.Y.)**, v. 311, n. 5759, p. 395–8, 20 jan. 2006.

GREEN, A. L.; WELLS, D. N.; OBACK, B. Cattle cloned from increasingly differentiated muscle cells. **Biology of reproduction**, v. 77, n. 3, p. 395–406, 1 set. 2007.

GRSKOVIC, M.; JAVAHERIAN, A.; STRULOVICI, B.; DALEY, G. Q. Induced pluripotent stem cells--opportunities for disease modelling and drug discovery. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 10, n. 12, p. 915–29, dez. 2011.

GU, T.-P.; GUO, F.; YANG, H.; WU, H.-P.; XU, G.-F.; LIU, W.; XIE, Z.-G.; SHI, L.; HE, X.; JIN, S.; IQBAL, K.; SHI, Y. G.; DENG, Z.; SZABÓ, P. E.; PFEIFER, G. P.; LI, J.; XU, G.-L. The role of Tet3 DNA dioxygenase in epigenetic reprogramming by oocytes. **Nature**, v. 477, n. 7366, p. 606–10, 29 set. 2011.

HAIKOVA, P.; JEFFRIES, S. J.; LEE, C.; MILLER, N.; JACKSON, S. P.; SURANI, M. A. Genome-wide reprogramming in the mouse germ line entails the base excision repair pathway. **Science (New York, N.Y.)**, v. 329, n. 5987, p. 78–82, 2 jul. 2010.

HANIFFA, M. A.; COLLIN, M. P.; BUCKLEY, C. D.; DAZZI, F. Mesenchymal stem cells: the fibroblasts' new clothes? **Haematologica**, v. 94, n. 2, p. 258–63, 1 fev. 2009.

HANNA, J.; MARKOULAKI, S.; SCHORDERET, P.; CAREY, B. W.; BEARD, C.; WERNIG, M.; CREYGHTON, M. P.; STEINE, E. J.; CASSADY, J. P.; FOREMAN, R.; LENGNER, C. J.; DAUSMAN, J. A.; JAENISCH, R. Direct reprogramming of terminally differentiated mature B lymphocytes to pluripotency. **Cell**, v. 133, n. 2, p. 250–64, 18 abr. 2008.

HANNA, J.; SAHA, K.; PANDO, B.; VAN ZON, J.; LENGNER, C. J.; CREYGHTON, M. P.; VAN OUDENAARDEN, A.; JAENISCH, R. Direct cell reprogramming is a stochastic process amenable to acceleration. **Nature**, v. 462, n. 7273, p. 595–601, 3 dez. 2009.

HERZOG, M.; JOSSEAUX, E.; DEDEURWAERDER, S.; CALONNE, E.; VOLKMAR, M.; FUKS, F. The histone demethylase Kdm3a is essential to progression through differentiation. **Nucleic acids research**, v. 40, n. 15, p. 7219–32, 11 ago. 2012.

HEYMAN, Y. Nuclear transfer: a new tool for reproductive biotechnology in cattle. **Reproduction, nutrition, development**, v. 45, n. 3, p. 353–61, 1 jan. 2005.

HOCHEDLINGER, K.; JAENISCH, R. Monoclonal mice generated by nuclear transfer from mature B and T donor cells. **Nature**, v. 415, n. 6875, p. 1035–8, 28 fev. 2002.

HUANGFU, D.; MAEHR, R.; GUO, W.; EIJKELNBOOM, A.; SNITOW, M.; CHEN, A. E.; MELTON, D. A. Induction of pluripotent stem cells by defined factors is greatly improved by small-molecule compounds. **Nature biotechnology**, v. 26, n. 7, p. 795–7, 22 jul. 2008a.

HUANGFU, D.; OSAFUNE, K.; MAEHR, R.; GUO, W.; EIJKELNBOOM, A.; CHEN, S.; MUHLESTEIN, W.; MELTON, D. A. Induction of pluripotent stem cells from primary human fibroblasts with only Oct4 and Sox2. **Nature biotechnology**, v. 26, n. 11, p. 1269–75, nov. 2008b.

HUSSEIN, S. M.; BATADA, N. N.; VUORISTO, S.; CHING, R. W.; AUTIO, R.; NÄRVÄ, E.; NG, S.; SOUROUR, M.; HÄMÄLÄINEN, R.; OLSSON, C.; LUNDIN, K.; MIKKOLA, M.; TROKOVIC, R.; PEITZ, M.; BRÜSTLE, O.; BAZETT-JONES, D. P.; ALITALO, K.; LAHESMAA, R.; NAGY, A.; OTONKOSKI, T. Copy number variation and selection during reprogramming to pluripotency. **Nature**, v. 471, n. 7336, p. 58–62, 3 mar. 2011.

IAGER, A. E.; RAGINA, N. P.; ROSS, P. J.; BEYHAN, Z.; CUNNIFF, K.; RODRIGUEZ, R. M.; CIBELLI, J. B. Trichostatin A improves histone acetylation in bovine somatic cell nuclear transfer early embryos. **Cloning and stem cells**, v. 10, n. 3, p. 371–9, set. 2008.

IKEGAMI, K.; OHGANE, J.; TANAKA, S. Interplay between DNA methylation, histone modification and chromatin remodeling in stem cells and during development. **International Journal of ...**, 2009.

INOUE, A.; ZHANG, Y. Replication-dependent loss of 5-hydroxymethylcytosine in mouse preimplantation embryos. **Science (New York, N.Y.)**, v. 334, n. 6053, p. 194, 14 out. 2011.

IQBAL, K.; JIN, S.; PFEIFER, G. P.; SZABÓ, P. E. Reprogramming of the paternal genome upon fertilization involves genome-wide oxidation of 5-methylcytosine. p. 2–7, 2011.

JAENISCH, R.; YOUNG, R. Stem cells, the molecular circuitry of pluripotency and nuclear reprogramming. **Cell**, v. 132, n. 4, p. 567–82, 22 mar. 2008.

JENUWEIN, T.; ALLIS, C. D. Translating the histone code. **Science (New York, N.Y.)**, v. 293, n. 5532, p. 1074–80, 10 ago. 2001.

JIN, H.-F.; KUMAR, B. M.; KIM, J.-G.; SONG, H.-J.; JEONG, Y.-J.; CHO, S.-K.; BALASUBRAMANIAN, S.; CHOE, S.-Y.; RHO, G.-J. Enhanced development of porcine embryos cloned from bone marrow mesenchymal stem cells. **The International journal of developmental biology**, v. 51, n. 1, p. 85–90, jan. 2007.

KANG, Y. K.; KOO, D. B.; PARK, J. S.; CHOI, Y. H.; CHUNG, A. S.; LEE, K. K.; HAN, Y. M. Aberrant methylation of donor genome in cloned bovine embryos. **Nature genetics**, v. 28, n. 2, p. 173–7, jun. 2001.

KARETA, M. S.; BOTELLO, Z. M.; ENNIS, J. J.; CHOU, C.; CHÉDIN, F. Reconstitution and mechanism of the stimulation of de novo methylation by human DNMT3L. **The Journal of biological chemistry**, v. 281, n. 36, p. 25893–902, 8 set. 2006.

KATO, Y.; IMABAYASHI, H.; MORI, T.; TANI, T.; TANIGUCHI, M.; HIGASHI, M.; MATSUMOTO, M.; UMEZAWA, A.; TSUNODA, Y. Nuclear transfer of adult bone marrow mesenchymal stem cells: developmental totipotency of tissue-specific stem cells from an adult mammal. **Biology of reproduction**, v. 70, n. 2, p. 415–8, 1 fev. 2004.

KIM, K.; DOI, A.; WEN, B.; NG, K.; ZHAO, R.; CAHAN, P.; KIM, J.; ARYEE, M. J.; JI, H.; EHRLICH, L. I. R.; YABUUCHI, A.; TAKEUCHI, A.; CUNNIFF, K. C.; HONGGUANG, H.; MCKINNEY-FREEMAN, S.; NAVEIRAS, O.; YOON, T. J.; IRIZARRY, R. A.; JUNG, N.; SEITA, J.; HANNA, J.; MURAKAMI, P.; JAENISCH, R.; WEISSLEDER, R.; ORKIN, S. H.; WEISSMAN, I. L.; FEINBERG, A. P.; DALEY, G. Q. Epigenetic memory in induced pluripotent stem cells. **Nature**, v. 467, n. 7313, p. 285–90, 16 set. 2010.

KISHIGAMI, S.; MIZUTANI, E.; OHTA, H.; HIKICHI, T.; THUAN, N. VAN; WAKAYAMA, S.; BUI, H.-T.; WAKAYAMA, T. Significant improvement of mouse cloning technique by treatment

with trichostatin A after somatic nuclear transfer. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 340, n. 1, p. 183–9, fev. 2006.

KLOSE, R. J.; BIRD, A. P. Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. **Trends in biochemical sciences**, v. 31, n. 2, p. 89–97, fev. 2006.

KO, M.; HUANG, Y.; JANKOWSKA, A. M.; PAPE, U. J.; TAHILIANI, M.; BANDUKWALA, H. S.; AN, J.; LAMPERTI, E. D.; KOH, K. P.; GANETZKY, R.; LIU, X. S.; ARAVIND, L.; AGARWAL, S.; MACIEJEWSKI, J. P.; RAO, A. Impaired hydroxylation of 5-methylcytosine in myeloid cancers with mutant TET2. **Nature**, v. 468, n. 7325, p. 839–43, 9 dez. 2010.

KOH, K. P.; YABUUCHI, A.; RAO, S.; HUANG, Y.; CUNNIFF, K.; NARDONE, J.; LAIHO, A.; TAHILIANI, M.; SOMMER, C. A.; MOSTOSLAVSKY, G.; LAHESMAA, R.; ORKIN, S. H.; RODIG, S. J.; DALEY, G. Q.; RAO, A. Tet1 and Tet2 regulate 5-hydroxymethylcytosine production and cell lineage specification in mouse embryonic stem cells. **Cell stem cell**, v. 8, n. 2, p. 200–13, 4 fev. 2011.

KOH, S.; PIEDRAHITA, J. A. From “ES-like” cells to induced pluripotent stem cells: a historical perspective in domestic animals. **Theriogenology**, v. 81, n. 1, p. 103–11, 1 jan. 2014.

KOTHARI, R. M.; SHANKAR, V. 5-methylcytosine content in the vertebrate deoxyribonucleic acids: Species specificity. **Journal of Molecular Evolution**, v. 7, n. 4, p. 325–329, dez. 1976.

KOUZARIDES, T. Histone methylation in transcriptional control. **Current Opinion in Genetics & Development**, v. 12, n. 2, p. 198–209, abr. 2002.

KRIAUCIONIS, S.; HEINTZ, N. The nuclear DNA base 5-hydroxymethylcytosine is present in Purkinje neurons and the brain. **Science (New York, N.Y.)**, v. 324, n. 5929, p. 929–30, 15 maio 2009.

KUMAR, B. M.; MAENG, G.-H.; LEE, Y.-M.; LEE, J.-H.; JEON, B.-G.; OCK, S.-A.; KANG, T.; RHO, G.-J. Epigenetic modification of fetal fibroblasts improves developmental competency and gene expression in porcine cloned embryos. **Veterinary research communications**, v. 37, n. 1, p. 19–28, mar. 2013.

LAW, J. A.; JACOBSEN, S. E. Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals. **Nature reviews. Genetics**, v. 11, n. 3, p. 204–20, mar. 2010.

LEE, S.; KANG, E.; MAENG, G.; KIM, M.; PARK, J.; KIM, T.; HYUN, S.; LEE, E.; RHO, G. Mesenchymal Stem Cells. **Journal of Reproduction and Development**, v. 56, n. 2, p. 256–62, 2010.

LENSCH, M. W.; MUMMERY, C. L. From stealing fire to cellular reprogramming: a scientific history leading to the 2012 Nobel Prize. **Stem cell reports**, v. 1, n. 1, p. 5–17, jan. 2013.

LEPIKHOV, K.; WALTER, J. Differential dynamics of histone H3 methylation at positions K4 and K9 in the mouse zygote. **BMC developmental biology**, v. 4, p. 12, 21 out. 2004.

LEPIKHOV, K.; ZAKHARTCHENKO, V.; HAO, R.; YANG, F.; WRENZYCKI, C.; NIEMANN, H.; WOLF, E.; WALTER, J. Evidence for conserved DNA and histone H3 methylation reprogramming in mouse, bovine and rabbit zygotes. **Epigenetics & chromatin**, v. 1, n. 1, p. 8, jan. 2008.

LI, H.; COLLADO, M.; VILLASANTE, A.; STRATI, K.; ORTEGA, S.; CAÑAMERO, M.; BLASCO, M. A.; SERRANO, M. The Ink4/Arf locus is a barrier for iPS cell reprogramming. **Nature**, v. 460, n. 7259, p. 1136–9, 27 ago. 2009a.

LI, W.; WEI, W.; ZHU, S.; ZHU, J.; SHI, Y.; LIN, T.; HAO, E.; HAYEK, A.; DENG, H.; DING, S. Generation of rat and human induced pluripotent stem cells by combining genetic reprogramming and chemical inhibitors. **Cell stem cell**, v. 4, n. 1, p. 16–9, 9 jan. 2009b.

LIN, L.; LI, Q.; ZHANG, L.; ZHAO, D.; DAI, Y.; LI, N. Aberrant epigenetic changes and gene expression in cloned cattle dying around birth. **BMC developmental biology**, v. 8, p. 14, 2008.

LISTER, R.; ECKER, J. R. Finding the fifth base: genome-wide sequencing of cytosine methylation. **Genome research**, v. 19, n. 6, p. 959–66, jun. 2009.

LIU, H.; KIM, J.-M.; AOKI, F. Regulation of histone H3 lysine 9 methylation in oocytes and early pre-implantation embryos. **Development (Cambridge, England)**, v. 131, n. 10, p. 2269–80, 15 maio 2004.

LIU, L.; SHIN, T.; PRYOR, J. H.; KRAEMER, D.; WESTHUSIN, M. Regenerated bovine fetal fibroblasts support high blastocyst development following nuclear transfer. **Cloning**, v. 3, n. 2, p. 51–8, 5 jan. 2001.

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.

LOH, Y.-H.; HARTUNG, O.; LI, H.; GUO, C.; SAHALIE, J. M.; MANOS, P. D.; URBACH, A.; HEFFNER, G. C.; GRSKOVIC, M.; VIGNEAULT, F.; LENSCH, M. W.; PARK, I.-H.; AGARWAL, S.; CHURCH, G. M.; COLLINS, J. J.; IRION, S.; DALEY, G. Q. Reprogramming of T cells from human peripheral blood. **Cell stem cell**, v. 7, n. 1, p. 15–9, 2 jul. 2010.

MA, D. K.; CHIANG, C.-H. J.; PONNUSAMY, K.; MING, G.-L.; SONG, H. G9a and Jhdm2a regulate embryonic stem cell fusion-induced reprogramming of adult neural stem cells. **Stem cells (Dayton, Ohio)**, v. 26, n. 8, p. 2131–41, ago. 2008.

MACABELLI, C. H.; FERREIRA, R. M.; GIMENES, L. U.; DE CARVALHO, N. A. T.; SOARES, J. G.; AYRES, H.; FERRAZ, M. L.; WATANABE, Y. F.; WATANABE, O. Y.; SANGALLI, J. R.; SMITH, L. C.; BARUSELLI, P. S.; MEIRELLES, F. V.; CHIARATTI, M. R. Reference gene selection for gene expression analysis of oocytes collected from dairy cattle and buffaloes during winter and summer. **PloS one**, v. 9, n. 3, p. e93287, jan. 2014.

MAHERALI, N.; AHFELDT, T.; RIGAMONTI, A.; UTIKAL, J.; COWAN, C.; HOCHEDLINGER, K. A high-efficiency system for the generation and study of human induced pluripotent stem cells. **Cell stem cell**, v. 3, n. 3, p. 340–5, 11 set. 2008.

MARIÓN, R. M.; STRATI, K.; LI, H.; MURGA, M.; BLANCO, R.; ORTEGA, S.; FERNANDEZ-CAPETILLO, O.; SERRANO, M.; BLASCO, M. A. A p53-mediated DNA damage response limits reprogramming to ensure iPS cell genomic integrity. **Nature**, v. 460, n. 7259, p. 1149–53, 27 ago. 2009.

MARTINEZ-DIAZ, M. A.; CHE, L.; ALBORNOZ, M.; SENEDA, M. M.; COLLIS, D.; COUTINHO, A. R. S.; EL-BEIROUTHI, N.; LAURIN, D.; ZHAO, X.; BORDIGNON, V. Pre- and postimplantation development of swine-cloned embryos derived from fibroblasts and bone marrow cells after inhibition of histone deacetylases. **Cellular reprogramming**, v. 12, n. 1, p. 85–94, 11 mar. 2010.

MATOBA, S.; LIU, Y.; LU, F.; IWABUCHI, K. A.; SHEN, L.; INOUE, A.; ZHANG, Y. Embryonic Development following Somatic Cell Nuclear Transfer Impeded by Persisting Histone Methylation. **Cell**, v. 159, n. 4, p. 884–895, 2014.

MAYER, W.; NIVELEAU, A.; WALTER, J.; FUNDELE, R.; HAAF, T. Embryogenesis: Demethylation of the zygotic paternal genome. **Nature**, v. 403, n. 6769, p. 501–502, 3 fev. 2000.

MEDVEDEV, S. P.; GRIGOR'EVA, E. V.; SHEVCHENKO, A. I.; MALAKHOVA, A. A.; DEMENTYEVA, E. V.; SHILOV, A. A.; POKUSHALOV, E. A.; ZAIDMAN, A. M.; ALEKSANDROVA, M. A.; PLOTNIKOV, E. Y.; SUKHIKH, G. T.; ZAKIAN, S. M. Human induced pluripotent stem cells derived from fetal neural stem cells successfully undergo directed differentiation into cartilage. **Stem cells and development**, v. 20, n. 6, p. 1099–112, 25 jun. 2011.

MEISSNER, A. Epigenetic modifications in pluripotent and differentiated cells. **Nature biotechnology**, v. 28, n. 10, p. 1079–88, out. 2010.

MEISSNER, A.; MIKKELSEN, T. S.; GU, H.; WERNIG, M.; HANNA, J.; SIVACHENKO, A.; ZHANG, X.; BERNSTEIN, B. E.; NUSBAUM, C.; JAFFE, D. B.; GNIRKE, A.; JAENISCH, R.; LANDER, E. S. Genome-scale DNA methylation maps of pluripotent and differentiated cells. **Nature**, v. 454, n. 7205, p. 766–70, 7 ago. 2008.

MESSERSCHMIDT, D. M.; DE VRIES, W.; ITO, M.; SOLTER, D.; FERGUSON-SMITH, A.; KNOWLES, B. B. Trim28 is required for epigenetic stability during mouse oocyte to embryo transition. **Science (New York, N.Y.)**, v. 335, n. 6075, p. 1499–502, 23 mar. 2012.

MIKKELSEN, T. S.; HANNA, J.; ZHANG, X.; KU, M.; WERNIG, M.; SCHORDERET, P.; BERNSTEIN, B. E.; JAENISCH, R.; LANDER, E. S.; MEISSNER, A. Dissecting direct reprogramming through integrative genomic analysis. **Nature**, v. 454, n. 7200, p. 49–55, 3 jul. 2008.

MIRANDA, M. DOS S.; BRESSAN, F. F.; ZECCHIN, K. G.; VERCESI, A. E.; MESQUITA, L. G.; MERIGHE, G. K. F.; KING, W. A.; OHASHI, O. M.; PIMENTEL, J. R. V.; PERECIN, F.; MEIRELLES, F. V. Serum-starved apoptotic fibroblasts reduce blastocyst production but enable development to term after SCNT in cattle. **Cloning and stem cells**, v. 11, n. 4, p. 565–73, 21 dez. 2009.

MOHN, F.; WEBER, M.; REBHAN, M.; ROLOFF, T. C.; RICHTER, J.; STADLER, M. B.; BIBEL, M.; SCHÜBELER, D. Lineage-specific polycomb targets and de novo DNA methylation define restriction and potential of neuronal progenitors. **Molecular cell**, v. 30, n. 6, p. 755–66, 20 jun. 2008.

MÜLLER, C.; LEUTZ, A. Chromatin remodeling in development and differentiation. **Current Opinion in Genetics & Development**, v. 11, n. 2, p. 167–174, abr. 2001.

NAKAMURA, T.; ARAI, Y.; UMEHARA, H.; MASUHARA, M.; KIMURA, T.; TANIGUCHI, H.; SEKIMOTO, T.; IKAWA, M.; YONEDA, Y.; OKABE, M.; TANAKA, S.; SHIOTA, K.; NAKANO, T. PGC7/Stella protects against DNA demethylation in early embryogenesis. **Nature cell biology**, v. 9, n. 1, p. 64–71, jan. 2007.

NAKAMURA, T.; LIU, Y.-J.; NAKASHIMA, H.; UMEHARA, H.; INOUE, K.; MATOBA, S.; TACHIBANA, M.; OGURA, A.; SHINKAI, Y.; NAKANO, T. PGC7 binds histone H3K9me2 to protect against conversion of 5mC to 5hmC in early embryos. **Nature**, v. 486, n. 7403, p. 2–7, 21 jun. 2012.

NEUPANE, M.; CHANG, C.-C.; KIUPEL, M.; YUZHASIYAN-GURKAN, V. Isolation and characterization of canine adipose-derived mesenchymal stem cells. **Tissue engineering. Part A**, v. 14, n. 6, p. 1007–15, jun. 2008.

NG, R. K.; GURDON, J. B. Epigenetic memory of active gene transcription is inherited through somatic cell nuclear transfer. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 6, p. 1957–62, 8 fev. 2005.

OBACK, B.; WELLS, D. Donor cells for nuclear cloning: many are called, but few are chosen. **Cloning and stem cells**, v. 4, n. 2, p. 147–68, 5 jan. 2002.

OH, H. J.; PARK, J. E.; PARK, E. J.; KIM, M. J.; KIM, G. A.; RHEE, S. H.; LIM, S. H.; KANG, S. K.; LEE, B. C. Analysis of cell growth and gene expression of porcine adipose tissue-derived mesenchymal stem cells as nuclear donor cell. **Development, growth & differentiation**, v. 56, n. 9, p. 595–604, dez. 2014.

PASQUE, V.; JULLIEN, J.; MIYAMOTO, K.; HALLEY-STOTT, R. P.; GURDON, J. B. Epigenetic factors influencing resistance to nuclear reprogramming. **Trends in genetics**: **TIG**, v. 27, n. 12, p. 516–25, dez. 2011.

PENN, N. W.; SUWALSKI, R.; O'RILEY, C.; BOJANOWSKI, K.; YURA, R. The presence of 5-hydroxymethylcytosine in animal deoxyribonucleic acid. **The Biochemical journal**, v. 126, n. 4, p. 781–90, mar. 1972.

PEREIRA, F. T. V.; OLIVEIRA, L. J.; BARRETO, R. DA S. N.; MESS, A.; PERECIN, F.; BRESSAN, F. F.; MESQUITA, L. G.; MIGLINO, M. A.; PIMENTEL, J. R.; FANTINATO NETO, P.; MEIRELLES, F. V. Fetal-maternal interactions in the synepitheliochorial placenta using the eGFP cloned cattle model. **PloS one**, v. 8, n. 5, p. e64399, jan. 2013.

PETERS, A. H. F. M.; O'CARROLL, D.; SCHERTHAN, H.; MECHTLER, K.; SAUER, S.; SCHÖFER, C.; WEIPOLTSHAMMER, K.; PAGANI, M.; LACHNER, M.; KOHLMAIER, A.; OPRAVIL, S.; DOYLE, M.; SIBILIA, M.; JENUWEIN, T. Loss of the Suv39h Histone Methyltransferases Impairs Mammalian Heterochromatin and Genome Stability. **Cell**, v. 107, n. 3, p. 323–337, 2 nov. 2001.

PFAFFL, M. W.; HORGAN, G. W.; DEMPFLER, L. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. **Nucleic acids research**, v. 30, n. 9, p. e36, maio 2002.

PORTELA, A.; ESTELLER, M. Epigenetic modifications and human disease. **Nature biotechnology**, v. 28, n. 10, p. 1057–68, out. 2010.

QIN, Y.; JI, H.; WU, Y.; LIU, H. Chromosomal instability of murine adipose tissue-derived mesenchymal stem cells in long-term culture and development of cloned embryos. **Cloning and stem cells**, v. 11, n. 3, p. 445–52, 14 set. 2009.

QUENNEVILLE, S.; TURELLI, P.; BOJKOWSKA, K.; RACLOT, C.; OFFNER, S.; KAPOPOULOU, A.; TRONO, D. The KRAB-ZFP/KAP1 system contributes to the early embryonic establishment of site-specific DNA methylation patterns maintained during development. **Cell reports**, v. 2, n. 4, p. 766–73, 25 out. 2012.

RAMAKERS, C.; RUIJTER, J. M.; DEPREZ, R. H. L.; MOORMAN, A. F. . Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. **Neuroscience Letters**, v. 339, n. 1, p. 62–66, mar. 2003.

REIK, W.; DEAN, W.; WALTER, J. Epigenetic reprogramming in mammalian development. **Science (New York, N.Y.)**, v. 293, n. 5532, p. 1089–93, 10 ago. 2001.

REIK, W.; WALTER, J. Genomic imprinting: parental influence on the genome. **Nature reviews. Genetics**, v. 2, n. 1, p. 21–32, jan. 2001.

RICE, J. C.; ALLIS, C. D. Histone methylation versus histone acetylation: new insights into epigenetic regulation. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 13, n. 3, p. 263–273, jun. 2001.

SAMPAIO, R. V.; CHIARATTI, M. R.; SANTOS, D. C. N.; BRESSAN, F. F. Generation of bovine (*Bos indicus*) and buffalo (*Bubalus bubalis*) adipose tissue derived stem cells□: isolation , characterization , and multipotentiality. **Genetics and molecular research□: GMR**, v. 14, n. 1, p. 53–62, 2015.

SANGALLI, J. R.; DE BEM, T. H. C.; PERECIN, F.; CHIARATTI, M. R.; OLIVEIRA, L. DE J.; DE ARAÚJO, R. R.; VALIM PIMENTEL, J. R.; SMITH, L. C.; MEIRELLES, F. V. Treatment of nuclear-donor cells or cloned zygotes with chromatin-modifying agents increases histone acetylation but does not improve full-term development of cloned cattle. **Cellular reprogramming**, v. 14, n. 3, p. 235–47, 11 jun. 2012.

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**, v. 13, n. 13, p. 1116–1121, jul. 2003.

SCHWINDT, T. T.; BARNABÉ, G. F.; MELLO, L. Proliferar ou diferenciar?: perspectivas de destino das células-tronco. **J. bras. neurocir**, v. 16, n. 1, p. 13–19, 2005.

SHI, Y.; DESPONTS, C.; DO, J. T.; HAHM, H. S.; SCHÖLER, H. R.; DING, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic fibroblasts by Oct4 and Klf4 with small-molecule compounds. **Cell stem cell**, v. 3, n. 5, p. 568–74, 6 nov. 2008a.

SHI, Y.; DO, J. T.; DESPONTS, C.; HAHM, H. S.; SCHÖLER, H. R.; DING, S. A combined chemical and genetic approach for the generation of induced pluripotent stem cells. **Cell stem cell**, v. 2, n. 6, p. 525–8, 5 jun. 2008b.

SHI, Y.; WHETSTINE, J. R. Dynamic regulation of histone lysine methylation by demethylases. **Molecular cell**, v. 25, n. 1, p. 1–14, 12 jan. 2007.

SHINKAI, Y.; TACHIBANA, M. H3K9 methyltransferase G9a and the related molecule GLP. **Genes & development**, v. 25, n. 8, p. 781–8, 15 abr. 2011.

SIMONSSON, S.; GURDON, J. DNA demethylation is necessary for the epigenetic reprogramming of somatic cell nuclei. **Nature cell biology**, v. 6, n. 10, p. 984–90, out. 2004.

SMITH, L. C.; SUZUKI, J.; GOFF, A K.; FILION, F.; THERRIEN, J.; MURPHY, B. D.; KOHANGHADR, H. R.; LEFEBVRE, R.; BRISVILLE, A C.; BUCZINSKI, S.; FECTEAU, G.; PERECIN, F.; MEIRELLES, F. V. Developmental and epigenetic anomalies in cloned cattle. **Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene**, v. 47 Suppl 4, p. 107–14, ago. 2012.

STADTFELD, M.; BRENNAND, K.; HOCHEDLINGER, K. Reprogramming of pancreatic beta cells into induced pluripotent stem cells. **Current biology** □: **CB**, v. 18, n. 12, p. 890–4, 24 jun. 2008.

STRAHL, B. D.; ALLIS, C. D. The language of covalent histone modifications. **Nature**, v. 403, n. 6765, p. 41–5, 6 jan. 2000.

SURANI, M. A. Imprinting and the Initiation of Gene Silencing in the Germ Line. **Cell**, v. 93, n. 3, p. 309–312, 1 maio 1998.

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.

SZWAGIERCZAK, A.; BULTMANN, S.; SCHMIDT, C. S.; SPADA, F.; LEONHARDT, H. Sensitive enzymatic quantification of 5-hydroxymethylcytosine in genomic DNA. **Nucleic acids research**, v. 38, n. 19, p. e181, out. 2010.

TACHIBANA, M.; AMATO, P.; SPARMAN, M.; GUTIERREZ, N. M.; TIPPNER-HEDGES, R.; MA, H.; KANG, E.; FULATI, A.; LEE, H.-S.; SRITANAUDOMCHAI, H.; MASTERSON, K.; LARSON, J.; EATON, D.; SADLER-FREDD, K.; BATTAGLIA, D.; LEE, D.; WU, D.; JENSEN, J.; PATTON, P.; GOKHALE, S.; STOUFFER, R. L.; WOLF, D.; MITALIPOV, S. Human embryonic stem cells derived by somatic cell nuclear transfer. **Cell**, v. 153, n. 6, p. 1228–38, 6 jun. 2013.

TACHIBANA, M.; SUGIMOTO, K.; NOZAKI, M.; UEDA, J.; OHTA, T.; OHKI, M.; FUKUDA, M.; TAKEDA, N.; NIIDA, H.; KATO, H.; SHINKAI, Y. G9a histone methyltransferase plays a dominant role in euchromatic histone H3 lysine 9 methylation and is essential for early embryogenesis. **Genes & development**, v. 16, n. 14, p. 1779–91, 15 jul. 2002.

TAHILIANI, M.; KOH, K. P.; SHEN, Y.; PASTOR, W. A.; BANDUKWALA, H.; BRUDNO, Y.; AGARWAL, S.; IYER, L. M.; LIU, D. R.; ARAVIND, L.; RAO, A. Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. **Science (New York, N.Y.)**, v. 324, n. 5929, p. 930–5, 15 maio 2009.

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, 25 ago. 2006.

TCHURIKOV, N. Molecular Mechanisms of Epigenetics. **Biochemistry (Moscow)**, v. 70, n. 4, p. 18, 2005.

TISCORNIA, G.; VIVAS, E. L.; IZPISÚA BELMONTE, J. C. Diseases in a dish: modeling human genetic disorders using induced pluripotent cells. **Nature medicine**, v. 17, n. 12, p. 1570–6, 6 dez. 2011.

TUREK-PLEWA, J.; JAGODZIŃSKI, P. P. The role of mammalian DNA methyltransferases in the regulation of gene expression. **Cellular & molecular biology letters**, v. 10, n. 4, p. 631–47, jan. 2005.

UTIKAL, J.; MAHERALI, N.; KULALERT, W.; HOCHEDLINGER, K. Sox2 is dispensable for the reprogramming of melanocytes and melanoma cells into induced pluripotent stem cells. **Journal of cell science**, v. 122, n. Pt 19, p. 3502–10, 1 out. 2009.

VAN DER HEIJDEN, G. W.; DIEKER, J. W.; DERIJCK, A. A. H. A.; MULLER, S.; BERDEN, J. H. M.; BRAAT, D. D. M.; VAN DER VLAG, J.; DE BOER, P. Asymmetry in histone H3 variants and

lysine methylation between paternal and maternal chromatin of the early mouse zygote. **Mechanisms of development**, v. 122, n. 9, p. 1008–22, out. 2005.

VEDADI, M.; BARSYTE-LOVEJOY, D.; LIU, F.; RIVAL-GERVIER, S.; ALLALI-HASSANI, A.; LABRIE, V.; WIGLE, T. J.; DIMAGGIO, P. A.; WASNEY, G. A.; SIARHEYEVA, A.; DONG, A.; TEMPEL, W.; WANG, S.-C.; CHEN, X.; CHAU, I.; MANGANO, T. J.; HUANG, X.-P.; SIMPSON, C. D.; PATTENDEN, S. G.; NORRIS, J. L.; KIREEV, D. B.; TRIPATHY, A.; EDWARDS, A.; ROTH, B. L.; JANZEN, W. P.; GARCIA, B. A.; PETRONIS, A.; ELLIS, J.; BROWN, P. J.; FRYE, S. V.; ARROWSMITH, C. H.; JIN, J. A chemical probe selectively inhibits G9a and GLP methyltransferase activity in cells. **Nature Chemical Biology**, v. 7, n. 9, p. 648, ago. 2011.

WALTER, J. An epigenetic Tet a Tet with pluripotency. **Cell stem cell**, v. 8, n. 2, p. 121–2, 4 fev. 2011.

WANG, J.; ZHANG, M.; ZHANG, Y.; KOU, Z.; HAN, Z.; CHEN, D.-Y.; SUN, Q.-Y.; GAO, S. The histone demethylase JMJD2C is stage-specifically expressed in preimplantation mouse embryos and is required for embryonic development. **Biology of reproduction**, v. 82, n. 1, p. 105–11, 1 jan. 2010.

WANG, T.; WARREN, S. T.; JIN, P. Toward pluripotency by reprogramming: mechanisms and application. **Protein & cell**, v. 4, n. 11, p. 820–32, nov. 2013.

WELLS, D. N. Production of Cloned Calves Following Nuclear Transfer with Cultured Adult Mural Granulosa Cells. **Biology of Reproduction**, v. 60, n. 4, p. 996–1005, 1 abr. 1999.

WILLIAMS, K. J.; PICOU, A. A.; KISH, S. L.; GIRALDO, A. M.; GODKE, R. A.; BONDIOLI, K. R. Isolation and characterization of porcine adipose tissue-derived adult stem cells. **Cells, tissues, organs**, v. 188, n. 3, p. 251–8, jan. 2008.

WILMUT, I.; SCHNIEKE, A. E.; MCWHIR, J.; KIND, A. J.; CAMPBELL, K. H. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. **Nature**, v. 385, n. 6619, p. 810–3, 27 mar. 1997.

WOSSIDLO, M.; NAKAMURA, T.; LEPIKHOV, K.; MARQUES, C. J.; ZAKHARTCHENKO, V.; BOIANI, M.; ARAND, J.; NAKANO, T.; REIK, W.; WALTER, J. 5-Hydroxymethylcytosine in the mammalian zygote is linked with epigenetic reprogramming. **Nature communications**, v. 2, p. 241, jan. 2011.

WU, S. C.; ZHANG, Y. Active DNA demethylation: many roads lead to Rome. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 11, n. 9, p. 607–20, set. 2010.

WYATT, G. R.; COHEN, S. S. The bases of the nucleic acids of some bacterial and animal viruses: the occurrence of 5-hydroxymethylcytosine. **The Biochemical journal**, v. 55, n. 5, p. 774–82, dez. 1953.

YAMAMOTO, N.; AKAMATSU, H.; HASEGAWA, S.; YAMADA, T.; NAKATA, S.; OHKUMA, M.; MIYACHI, E.-I.; MARUNOUCHI, T.; MATSUNAGA, K. Isolation of multipotent stem cells from mouse adipose tissue. **Journal of dermatological science**, v. 48, n. 1, p. 43–52, out. 2007.

YANG, X.; SMITH, S. L.; TIAN, X. C.; LEWIN, H. A.; RENARD, J.-P.; WAKAYAMA, T. Nuclear reprogramming of cloned embryos and its implications for therapeutic cloning. **Nature genetics**, v. 39, n. 3, p. 295–302, mar. 2007.

YOUNG, L. E.; FERNANDES, K.; MCEVOY, T. G.; BUTTERWITH, S. C.; GUTIERREZ, C. G.; CAROLAN, C.; BROADBENT, P. J.; ROBINSON, J. J.; WILMUT, I.; SINCLAIR, K. D. Epigenetic

change in IGF2R is associated with fetal overgrowth after sheep embryo culture. **Nature Genetics**, v. 27, n. 2, p. 153–154, 2001.

YOUNG, L. E.; SINCLAIR, K. D.; WILMUT, I. Large offspring syndrome in cattle and sheep. **Reviews Of Reproduction**, v. 3, n. 3, p. 155–163, 1998.

ZHAO, J.; JIANG, W.; SUN, C.; HOU, C.; YANG, X.-M.; GAO, J. Induced pluripotent stem cells: origins, applications, and future perspectives. **Journal of Zhejiang University. Science. B**, v. 14, n. 12, p. 1059–69, dez. 2013.

ZHAO, J.; ROSS, J. W.; HAO, Y.; SPATE, L. D.; WALTERS, E. M.; SAMUEL, M. S.; RIEKE, A.; MURPHY, C. N.; PRATHER, R. S. Significant improvement in cloning efficiency of an inbred miniature pig by histone deacetylase inhibitor treatment after somatic cell nuclear transfer. **Biology of reproduction**, v. 81, n. 3, p. 525–30, set. 2009.

ANEXO A - Generation of bovine (*Bos indicus*) and buffalo (*Bubalus bubalis*) adipose tissue derived stem cells: isolation, characterization, and multipotentiality.

Generation of bovine (*Bos indicus*) and buffalo (*Bubalus bubalis*) adipose tissue derived stem cells: isolation, characterization, and multipotentiality

R.V. Sampaio^{1,2,3}, M.R. Chiaratti^{2,4}, D.C.N. Santos¹, F.F. Bressan²,
J.R. Sangalli^{2,3}, A.L.A. Sá¹, T.V.G. Silva¹, N.N. Costa¹, M.S. Cordeiro⁵,
S.S.D. Santos¹, C.E. Ambrosio², P.R. Adona⁶, F.V. Meirelles², M.S. Miranda¹
and O.M. Ohashi¹

¹Departamento de Biologia, Instituto de Ciências Biológicas,
Universidade Federal do Pará, Belém, PA, Brasil

²Departamento de Medicina Veterinária,
Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos,
Universidade de São Paulo, Pirassununga, SP, Brasil

³Departamento de Cirurgia, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia,
Universidade de São Paulo, Pirassununga, SP, Brasil

⁴Departamento de Genética e Evolução,
Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, Brasil

⁵Instituto Federal de Ciência e Tecnologia do Pará, Belém, PA, Brasil

⁶Universidade Norte do Paraná, Londrina, PR, Brasil

Corresponding author: R.V. Sampaio
E-mail: sampaiorv@gmail.com

Genet. Mol. Res. 14 (1): 53-62 (2015)

Received May 21, 2014

Accepted December 6, 2014

Published January 15, 2015

DOI <http://dx.doi.org/10.4238/2015.January.15.7>

ABSTRACT. Adult stem cells are known for their plasticity and their potential to differentiate into several different cell types; these characteristics have implications for cell therapy and reproductive biotechnologies. In this study, we report on the isolation and characterization of mesenchymal stem cells (MSC) derived from bovine and buffalo adipose tissue. Cells isolated using enzymatic digestion of

bovine and buffalo adipose-tissue biopsy samples were grown *in vitro* for at least 15 passages, verifying their capacity to proliferate. These cells were also subjected to immunophenotypic characterization for the presence of CD90, CD105, and CD79, and the absence of CD45, CD34, and CD73, which are positive and negative markers of MSC, respectively. To prove their multipotency, the cells were induced to differentiate into three different cell types, chondrocytes, osteoblasts, and adipocytes, which were stained with tissue-specific dyes (Chondrogenic-Alcian Blue, Osteogenic-Alizarin Red, and Adipogenic-Oil-Red O, respectively) to confirm differentiation. Gene expression analysis of pluripotency-related genes was also conducted. Our results suggest that adipose tissue from bovines and buffalos can be used as a source of MSC, making adipose tissue-derived cells an interesting option for cell therapy and regenerative medicine. Additionally, these findings have implications for reproductive biotechnology because the use of MSC as nuclear donors has been linked to an increase in the efficiency of nuclear transfer.

Key words: Cell therapy; Mesenchymal stem cells; Adipose tissue; Cattle; Buffalo

INTRODUCTION

Adult stem cells are known for their plasticity and their potential to differentiate into several different cell types (i.e., multipotency) (Bjornson et al., 1999). This multipotency has important implications for many fields of medicine as these cells could potentially be used for cell therapy in humans and animals. For instance, stem cell-based therapies may be used to regenerate compromised tissue, reestablishing its function and even reversing a patient's physical deficiency (Karp and Leng Teo, 2009). Although only stem cells derived from embryos in the early stages of development [embryonic stem cells (ESCs)] are thought to be totipotent, adult individuals also retain cells that are able to differentiate into many cell types; the origin of the cells determines the cell types (Passier and Mummery, 2003).

Adult stem cells, such as mesenchymal stem cells (MSC), represent a major source of multipotent cells, which are progenitors of cells from specific tissues (Pittenger et al., 1999). For instance, adipose-derived stem cells (ASC) are fibroblast-like cells that are capable of both supporting hematopoiesis and differentiating into adipocytes, fibroblasts, myoblasts, chondrocytes, and osteoblasts (Zuk et al., 2002). Moreover, although ASC are of mesodermal origin, data have shown they are capable of transdifferentiating into neural cells as well (Sanchez-Ramos et al., 2000). Despite their limited differentiation potential compared to ESCs, MSC have drawn much interest from researchers for both basic and applied studies involving their multipotency (Bjornson et al., 1999; Passier and Mummery, 2003; Karp and Leng Teo, 2009).

Adipose-derived stem cells can be easily retrieved in large amounts from the adipose tissue of adult individuals and cultured *in vitro*, making use of these cells a viable option for further applications, such as autologous transplants (Gimble, 2003; McCoy et al., 2008). Compared to bone marrow, which represents another major source of MSC, harvesting of fat cells has the advantage of being less invasive and producing more stem cells (Zuk et al., 2002; Rodriguez et al., 2005). In addition, harvesting cells from adipose tissue results in *in vitro*

cultures composed almost exclusively of MSC, whereas bone marrow-derived cultures have a less homogenous cell population (Zuk et al., 2002; Rodriguez et al., 2005; Zhu et al., 2008).

In addition to the importance of MSC in human cell therapies, these cells are also an extremely valuable tool for both basic science and livestock production because it has been hypothesized that the use of MSC as nuclear donors may lead to an increase in somatic cell nuclear transfer (SCNT) efficiency. MSC are more undifferentiated (or at least still contain trophic factors) than other somatic cells (i.e., granulosa cells and fibroblasts) commonly used in SCNT (Faast et al., 2006; Jin et al., 2007). Moreover, evidence indicates that the use of MSC as nuclear donors in SCNT increases the embryonic developmental rates of cloned domestic animals, such as pigs and bovines (Colleoni et al., 2005; Lee et al., 2010). The MSC used in those studies were derived from tissues, such as bone marrow, which cannot be sourced as easily as adipose tissue, implicating practical limitations.

Harvesting, isolation, and *in vitro* culture of ASC has not been well established for some species. Although there are protocols for the isolation of ASC from many species, including humans and equines (Zuk et al., 2002; de Mattos Carvalho et al., 2009), to our knowledge, there is no published data describing such procedures for large ruminants (i.e., bovines and buffalos). Large ruminants, such as bovines, have been suggested as a relevant model system for humans (Miziara et al., 2004; Berg et al., 2011). Moreover, new methods that increase SCNT efficiency in bovine have significant implications for livestock (Meirelles et al., 2010). Therefore, the aim of this study was to isolate, characterize, and investigate the multilineage differentiation potential of bovine (*Bos indicus*) and buffalo (*Bubalus bubalis*) MSC sourced from adipose tissue of adult animals.

MATERIAL AND METHODS

Unless otherwise stated, plastic ware was purchased from Corning Inc. (Corning, NY, USA) and chemicals from Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). *In vitro* experimental procedures were performed in humidified incubators maintained at 38.5°C in air with 5% CO₂. The present study complied with the International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals, as issued by the Council for the International Organizations of Medical Sciences. Five and three isolations were performed for bovine and buffalo ASC, respectively.

Isolation and culture of ASC

Adipose tissue was collected from the base of the tail for ASC isolation due to the absence of large vessels and the accessibility and availability of material at that location. Epidural anesthesia was administrated with 2% lidocaine chlorhydrate (Anestésico L, Eurofarma, São Paulo, SP, Brazil) to adult bovines (*B. indicus*) and buffalos (*B. bubalis*) before trimming and carefully cleaning the base of the tail. Then, an incision of 3-5 cm in length was made at the base of the tail for retrieval of approximately 5 g of adipose tissue, which was extensively washed in cold saline solution supplemented with 400 µg/mL streptomycin (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA) and 400 units/mL penicillin (Gibco BRL). Next, the tissue was minced for 30 min with a sterile scalpel blade on a plastic dish and digested with 0.001% type I collagenase (Gibco BRL) diluted in Alpha Minimum Essential Medium (α-MEM; Gibco BRL) with 100 µg/mL streptomycin, 100 U/mL penicillin, and 50 µg/mL nystatin. After digestion for 3 h at 38.5°C, collagenase activity was neutralized by the addition of an equal volume of α-MEM

containing 15% fetal bovine serum (FBS; Gibco BRL), 83.4 µg/mL amikacin sulfate, and 50 µg/mL nystatin. The treated tissue was centrifuged at 300 g for 10 min, and the pellet was resuspended in α -MEM supplemented with 15% FBS, 83.4 µg/mL of amikacin sulfate, and 50 µg/mL of nystatin. A second centrifugation step was performed at 300 g for 10 min, and the pellet was resuspended and plated on 35-mm plastic dishes with the same culture medium. Cells were maintained in incubators, and the culture medium was replaced every two days, except for the first medium change that was performed 24 h after cell culture.

Non-adherent cells, including hematopoietic cells, were removed after the first medium change because they are less capable of attaching to the surface of a plastic dish. When cells reached 60-75% confluence, they were trypsinized (Tryple Express, Gibco BRL) and plated on news dishes in α -MEM with 15% FBS and 83.4 µg/mL amikacin sulfate. Cells were grown for 15 and 25 passages for bovines and buffalos, respectively. Cells were plated at a density of 3×10^4 or 4×10^4 cells per 35-mm plate and replated every two and three days for bovines and buffalos, respectively. Cell doubling time was estimated in triplicate as described by Raoufi et al. (2011).

Immunophenotypic characterization

Cells were characterized by the presence of CD105 (endoglin), CD90 (Thy-1), and CD73, surface markers exclusive to MSC, and also by the absence of CD34, CD45, and CD79A, which are markers that are exclusive to hematopoietic cells, as previously reported (Dominici et al., 2006).

Primary antibodies were purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA), Alexa488- and Alexa594-conjugated secondary antibodies were purchased from Invitrogen (Carlsbad, CA, USA), and the Cy3-conjugated secondary antibody was purchased from Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, PA, USA). Cells were plated on coverslips after 1 or 2 passages and cultured for two days. They were then washed in phosphate buffer saline (PBS) and fixed in 4% paraformaldehyde in PBS for 15 min at room temperature and washed again in PBS. Next, cells were incubated in 5% bovine serum albumin in PBS for 15 min at room temperature and overnight at 4°C with each of the following antibodies diluted (1:50) in PBS: CD105, CD90, CD73, CD34, CD45, or CD79. Cells incubated without primary antibodies served as negative controls for all assays. Cells were then extensively washed in PBS and incubated for 45 min at room temperature with Alexa488- and Alexa594-conjugated secondary antibodies diluted 1:50 or Alexa488-, Alexa594- or Cy3-conjugated anti-mouse antibodies diluted 1:200. Cell nuclei were stained with 10 µg/mL Hoechst 33342 in PBS for 15 min at room temperature. Finally, cells were washed, mounted on microscope slides, and analyzed on a fluorescence microscope at 200X magnification (Nikon Eclipse TE 300, Nikon Instruments Inc., Tokyo, Japan). Negative controls were analyzed to account for secondary-antibody background due to unspecific staining of cells.

In vitro differentiation

Cells were tested for their potential to differentiate into osteogenic, adipogenic, and chondrogenic cells, as previously reported (Zuk et al., 2002). For osteogenic differentiation, 3×10^4 cells that had been passaged 3 to 5 times were plated on plastic dishes and cultured overnight. The culture medium was then replaced with α -MEM with 2% FBS, 0.1 µM dexamethasone, 50 µM ascorbic acid-2-phosphate, 10 mM β -glycerophosphate, and 83.4 µg/mL

amikacin sulfate. These cells were cultured in this medium for three weeks. For adipogenic differentiation, cells were cultured for three weeks as described previously but using D-MEM (Gibco BRL) with 2% FBS, 1 μ M dexamethasone, 10 μ M insulin, 100 μ M indomethacin, 0.5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine, and 83.4 μ g/mL amikacin sulfate. For chondrogenic differentiation, cells were plated as described above and cultured for 3 weeks in α -MEM, 6.25 μ g/mL insulin, 10 ng/mL TGF- β 1, 50 nM ascorbic acid-2-phosphate, and 83.4 μ g/mL amikacin sulfate. Cells plated as described above but cultured in regular culture medium (α -MEM with 15% FBS and 83.4 μ g/mL amikacin sulfate) were used as negative controls. For all 3 differentiation protocols, the culture medium was changed and the cells were monitored for morphological changes every 2 days.

Differentiation analysis

To confirm whether the cells had differentiated after exposure to each of the differentiation protocols, the cells were washed twice with PBS, fixed in 4% paraformaldehyde in PBS for 15 min at room temperature, washed again in PBS and stained, as described below. Briefly, for osteogenic differentiation, calcium deposition was visualized by staining the cells with 2% Alizarin Red S in water, pH 4.1, as previously reported (Yamamoto et al., 2007). For adipogenic differentiation, intracellular accumulation of lipid-enriched vacuoles was visualized by staining of the cells with 1.25% Oil Red O in 30% isopropanol for 10 min at room temperature, followed by washing with 60% isopropanol (Cheong et al., 1993; Zuk et al., 2002). For chondrogenic differentiation, the presence of proteoglycans in the cells was verified by staining of the cells with 1% Alcian Blue in 3% acetic acid, pH 2.5, as previously reported (Zuk et al., 2002). Stained cells were visualized under an inverted microscope at 400X magnification (Nikon Eclipse 50i, Nikon Instruments Inc.).

Gene expression analysis of pluripotency-related genes

Cells were submitted to semi-quantitative gene expression analysis of NANOG, OCT4 and SOX2 using GAPDH as a reference gene (Table 1). Briefly, RNA was extracted from cell cultures using Trizol reagent (Life Technologies Inc., Grand Island, NY, USA) following the manufacturer protocol and with the addition of 5 mg/mL linear acrylamide (Life Technologies). Samples were treated with DNase I and cDNA was produced following the High Capacity cDNA Reverse Transcription kit protocol (Applied Biosystems) and transcripts were amplified using qPCR and the Power SYBR Green reagent (Applied Biosystems). Primers were used at 400 nM at an annealing temperature of 60°C and over 40 cycles.

Table 1. Primers used to amplify genes from mesenchymal stem cells of bovine and buffalo.

Gene	Oligonucleotides (5'→3') (up/down)
GAPDH	GGCGTGAACACGAGAAGTATAA CCCTCCACGATGCCAAAGT
OCT4	CAGGCCCGAAAGAGAAAGC CGGGCACTGCAGGAACA
NANOG	CCCTCGACACGGACACTGT GACTGTCCTGAATAAGCAGATCCA
SOX2	TGCGAGCGCTGCACAT TCATGAGCGTCTTGGTTTCC

Standard curves were performed from a pool of 50 parthenogenetic bovine blastocysts. The efficiency of each gene was analyzed and cDNA was normalized and quantified as described by Livak and Schmittgen (2001).

RESULTS

Bovine and buffalo ASC adhered to plastic dishes shortly after plating and showed a fibroblast-like morphology with a single nucleus (Figure 1a and b).

Figure 1. Bovine (a) and buffalo (b) adipose-derived stem cells. Scale bar = 50 μ m (200X).

Figure 2. Growth curves of bovine (filled circle) and buffalo (open circle) adipose-derived stem cells (ASC). Bovine and buffalo ASC were replated every 48 or 72 h, respectively.

During the first and second cell passages, buffalo ASC grew slowly, but during the next 9 passages their growth became faster (31 ± 1.3 h doubling time), with buffalo ASC reaching the plateau phase after 72 days of culture (25 cell passages). Bovine ASC grew exponentially from the first cell passage until the ninth (30 ± 1.9 h doubling time) but reached the plateau phase earlier, after 28 days of culture (15 cell passages). As a result, the final amount of buffalo ASC was almost 4 fold higher than that of bovine ASC.

As expected, MSC did not express genes related to pluripotency. For characterization of ASC using immunocytochemistry, we provided a panel with specific positive and negative markers for both bovine and buffalo ASC. Cells from both bovines and buffalos were found to be positive for CD105, CD90, CD73 (Figure 3a-c and a'-c'), which are exclusively found in MSC. Conversely, the negative MSC markers, CD34, CD45, and CD79, did not stain bovine or buffalo ASC (Figure 3d-f and d'-f'), indicating an absence of contaminant hematopoietic cells in the culture. No difference in immunocytochemical staining was observed between bovines and buffalos. The presence of markers specific for MSC in bovine and buffalo cells supports the conclusion that these cells originated from ASC.

Figure 3. Immunophenotypic characterization of adipose-derived stem cells (ASC). Bovine (a-f) and buffalo (a'-f') ASC were analyzed for the presence of positive mesenchymal stem-cell markers, CD105 (a and a'), CD90 (b and b') and CD73 (c and c'), and negative mesenchymal stem-cell markers, CD 34 (d and d'), CD45 (e and e'), and CD79A (f and f'). These markers are indicated in red or green. All cells were also stained with Hoechst 33342 (indicated in blue), which exclusively dyes the cell nucleus. Scale bar = 25 μ m (400X).

When the multilineage differentiation potential of ASC was tested *in vitro*, standard morphological changes were observed in the cells depending on the differentiation protocol and time of exposure. Morphological changes were first seen within one week of treatment. It is worthwhile to note that morphological changes in response to differentiation treatments were seen earlier in cells derived from buffalos than those derived from bovines. These morphological changes included lipid accumulation due to differentiation into adipocytes and increased cell size due to chondrogenic and osteogenic differentiation. Cells subjected to an osteogenic differentiation protocol increased in size after 1 week of treatment. These cells stained positively for Alizarin Red S until the third week of treatment, indicating mineralized matrix deposition (Figure 4a and a').

Figure 4. Differentiation analysis of adipose-derived stem cells (ASC). Osteogenic (a and a'), adipogenic (b and b'), and chondrogenic (c and c') differentiation of bovine (a-c) and buffalo (a'-c') ASC. Scale bar = 50 μ m (200X).

Increased cell size was also observed in cells subjected to an adipogenic differentiation protocol, and these cells began to develop lipid-like vesicles within 1 week of treatment. After 2 to 3 weeks, these vesicles filled most of the cytoplasm and stained positively for Oil Red-O (Figure 4b and b'). Finally, glycosaminoglycan-rich matrixes were found in cells subjected to a chondrogenic differentiation protocol after 1 to 2 weeks of treatment, as indicated by Alcian Blue staining (Figure 4c and c'). In summary, these findings support the feasibility of derivation of ASC from bovine and buffalo adipose tissues.

DISCUSSION

Previous reports have described the isolation of MSC from several species and tissues; however, to our knowledge, isolation of ASC from bovines and buffalos has not yet been done (Bosnakovski et al., 2005; Rodriguez et al., 2005; Yamamoto et al., 2007; Neupane et al., 2008; de Mattos Carvalho et al., 2009; Bourzac et al., 2010; Raoufi et al., 2011). The ASC we isolated from bovines and buffalos in this study display similar characteristics (i.e., cell

morphology, doubling time, and multilineage differentiation potential) to those previously reported for MSC isolated from other species and tissues. The ASC origin of cells derived from bovine and buffalo adipose tissue is also indicated by the presence of specific immunocytochemical markers of MSC (Dominici et al., 2006). Moreover, adipose tissue is easily accessible for the isolation of MSC without hematopoietic cell contamination. A large number of ASC (i.e., 100,000 cells) can be derived, after only a few days of culturing, from a small biopsy of adipose tissue (i.e., 5 g), enabling the use of this method to generate MSC for large-scale downstream applications (Zhu et al., 2008).

Emerging cell-based therapies may benefit from a source of autologous multipotent stem cells. Adipose tissue represents a potential source of adult stem cells for tissue engineering applications, such as cell-based therapies or NT. However, additional studies and clinical trials need to be performed before these therapies become available in humans. Such studies include animal-based studies, which could be conducted in bovines because they have been recognized as a valuable model for such purposes (Chacko and Ranganathan, 2009; Berg et al., 2011). Compared to mouse models, bovine models are genetically closer to humans (Miz-iara et al., 2004) and have a longer lifespan potential (Clark et al., 2003). In addition, studies on bovines are ethically more acceptable than studies on non-human primates. In this context, ASC from bovine and buffalo adipose tissue provide a relevant model for basic and applied studies involving human stem cells. However, previous reports have shown a beneficial effect on SCNT efficiency when using MSC as nuclear donors compared to somatic cells, such as fibroblasts (Faast et al., 2006). Thus, the use of ASC as nuclear donors is an increasingly interesting option because it may lead to an augmentation in the efficiency of animal cloning. However, establishing a simple method for the isolation and culture of MSC is an important determinant in making their use viable for such applications.

In conclusion, the present study supports the hypothesis that MSC can be isolated from bovine and buffalo adipose tissues. Additionally, these data provide evidence that MSC derived from bovine and buffalo adipose tissue can be cultured *in vitro* for many passages without losing their multilineage differentiation potential.

ACKNOWLEDGMENTS

Research supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Pará (FAPESPA), VALE S.A, Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Células-Tronco e Terapia Celular (INCTC), and Universidade Norte do Paraná (UNOPAR).

REFERENCES

- Berg DK, Smith CS, Pearton DJ, Wells DN, et al. (2011). Trophectoderm lineage determination in cattle. *Dev. Cell* 20: 244-255.
- Bjornson CR, Rietze RL, Reynolds BA, Magli MC, et al. (1999). Turning brain into blood: A hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells *in vivo*. *Science* 283: 534-537.
- Bosnakovski D, Mizuno M, Kim G, Takagi S, et al. (2005). Isolation and multilineage differentiation of bovine bone marrow mesenchymal stem cells. *Cell Tissue Res*. 319: 243-253.
- Bourzac C, Smith LC, Vincent P, Beauchamp G, et al. (2010). Isolation of equine bone marrow-derived mesenchymal stem cells: a comparison between three protocols. *Equine Vet. J.* 42: 519-527.

- Chacko E and Ranganathan S (2009). Genome-wide analysis of alternative splicing in cow: implications in bovine as a model for human diseases. *BMC Genomics* 10 (Suppl 3): S11.
- Cheong HT, Takahashi Y and Kanagawa H (1993). Birth of mice after transplantation of early cell-cycle-stage embryonic nuclei into enucleated oocytes. *Biol. Reprod.* 48: 958-963.
- Clark AJ, Ferrier P, Aslam S, Burl S, et al. (2003). Proliferative lifespan is conserved after nuclear transfer. *Nat. Cell Biol.* 5: 535-538.
- Colleoni S, Donofrio G, Lagutina I, Duchi R, et al. (2005). Establishment, differentiation, electroporation, viral transduction, and nuclear transfer of bovine and porcine mesenchymal stem cells. *Cloning Stem Cells* 7: 154-166.
- de Mattos Carvalho A, Alves AL, Golim MA, Moroz A, et al. (2009). Isolation and immunophenotypic characterization of mesenchymal stem cells derived from equine species adipose tissue. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 132: 303-306.
- Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, et al. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8: 315-317.
- Faast R, Harrison SJ, Beebe LFS, McIlpatrick SM, et al. (2006). Use of adult mesenchymal stem cells isolated from bone marrow and blood for somatic cell nuclear transfer in pigs. *Cloning Stem Cells* 8: 166-173.
- Gimble JM (2003). Adipose tissue-derived therapeutics. *Expert Opin. Biol. Ther.* 3: 705-713.
- Jin HF, Kumar BM, Kim JG, Song HJ, et al. (2007). Enhanced development of porcine embryos cloned from bone marrow mesenchymal stem cells. *Int. J. Dev. Biol.* 51: 85-90.
- Karp JM and Leng Teo GS (2009). Mesenchymal stem cell homing: the devil is in the details. *Cell Stem Cell* 4: 206-216.
- Lee SL, Kang EJ, Maeng GH, Kim MJ, et al. (2010). Developmental ability of miniature pig embryos cloned with mesenchymal stem cells. *J. Reprod. Dev.* 56: 256-262.
- Livak KJ and Schmittgen TD (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. *Methods* 25: 402-408.
- McCoy MK, Martinez TN, Ruhn KA, Wrage PC, et al. (2008). Autologous transplants of Adipose-Derived Adult Stromal (ADAS) cells afford dopaminergic neuroprotection in a model of Parkinson's disease. *Exp. Neurol.* 210: 14-29.
- Meirelles FV, Birgel EH, Perecin F, Bertolini M, et al. (2010). Delivery of cloned offspring: experience in Zebu cattle (*Bos indicus*). *Reprod. Fertil. Dev.* 22: 88-97.
- Miziara MN, Riggs PK and Amaral ME (2004). Comparative analysis of noncoding sequences of orthologous bovine and human gene pairs. *Genet. Mol. Res.* 3: 465-473.
- Neupane M, Chang CC, Kiupel M and Yuzbasiyan-Gurkan V (2008). Isolation and characterization of canine adipose-derived mesenchymal stem cells. *Tissue Eng. Part A* 14: 1007-1015.
- Passier R and Mummery C (2003). Origin and use of embryonic and adult stem cells in differentiation and tissue repair. *Cardiovasc. Res.* 58: 324-335.
- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, et al. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284: 143-147.
- Raoufi MF, Tajik P, Dehghan MM, Eini F, et al. (2011). Isolation and differentiation of mesenchymal stem cells from bovine umbilical cord blood. *Reprod. Domest. Anim.* 46: 95-99.
- Rodriguez AM, Elabd C, Amri EZ, Ailhaud G, et al. (2005). The human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Biochimie* 87: 125-128.
- Sanchez-Ramos J, Song S, Cardozo-Pelaez F, Hazzi C, et al. (2000). Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells *in vitro*. *Exp. Neurol.* 164: 247-256.
- Yamamoto N, Akamatsu H, Hasegawa S, Yamada T, et al. (2007). Isolation of multipotent stem cells from mouse adipose tissue. *J. Dermatol. Sci.* 48: 43-52.
- Zhu Y, Liu T, Song K, Fan X, et al. (2008). Adipose-derived stem cell: a better stem cell than BMSC. *Cell Biochem. Funct.* 26: 664-675.
- Zuk P, A, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, et al. (2002). Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol. Biol. Cell* 13: 4279-4295.